

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）リポソーム医薬品の同等性/同質性の確保に向けた単一粒子分析法の研究
（英 語） Investigating single-particle analysis for ensuring the comparability of liposomal drug products

研究開発実施期間：令和 5 年 7 月 20 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）原矢 佑樹
（英 語） Yuki Haraya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立医薬品食品衛生研究所・生化学部第四室・室長
（英 語） National Institute of Health Sciences・Division of Biochemistry・Section Chief

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：

1. 研究背景

リポソーム製剤は、低分子薬物等を生体内に効率的に送達するドラッグデリバリーシステム（DDS）として臨床応用が進んでいるナノ粒子医薬モダリティであり、国内外で先発品および後発品の開発が進められている。また、近年では、標的分子との相互作用を利用した表面修飾型の標的化リポソーム製剤の開発も進展している。このように、リポソーム製剤は、既存薬物の有効性・安全性の改善、医療上のアンメットニーズへの対応、さらには次世代 DDS 製剤の開発において重要な位置を占める医薬品モダリティである。

一方で、リポソーム製剤は、脂質膜構造、封入薬物、粒子サイズ、形態、表面特性などが相互に関係する複雑な超分子集合体である。そのため、脂質組成、製造工程、保存条件等の変化により、薬物保持性・放出性や体内動態などの製剤機能が変化する。このような特徴から、リポソーム製剤では、恒常的な製品品質の確保に加え、原材料や製造工程の変更やスケールアップ等に伴う同等性/同質性評価や、後発品開発における先発品との同等性/同質性評価において、通常の低分子医薬品とは異なる高度な品質評価が必要となる。

従来一般的な分析手法では、平均粒子径、粒度分布、平均薬物封入率など、粒子集団全体を平均化した特性値が主に取得される。しかし、リポソーム製剤は必ずしも均一な粒子集団ではなく、同一製剤中にも、サイズ、形態、薬物封入状態、表面特性の異なる粒子が混在し得る。そのため、平均特性値のみでは、製剤中に存在する少数の異質な粒子や、粒子集団内の不均一性に関する情報が埋もれてしまう可能性がある。この分析技術上の制約は、リポソーム医薬品の同等性/同質性をより精緻に評価する上で特に重要な技術的課題である。本課題に対して、個々の粒子に関する物理量を計測し、単粒子レベルで粒子特性の分布を捉える「単一粒子分析法」が重要な分析概念として確立されつつあり、クライオ電子顕微鏡法をはじめとする各種単一粒子分析法の開発が世界的に進んでいる。

本研究では、このような規制科学上の課題に対応するため、原子間力顕微鏡法（AFM）を基盤とした単一粒子分析手法を確立し、リポソーム医薬品の同等性/同質性評価に資する成果を得ることを目的とした。

2. 研究成果および考察

（1）リポソーム製剤を対象とした AFM の開発

本研究ではまず、低分子薬物を封入したモデルリポソーム製剤を対象として、AFM による単一粒子分析法の開発を進めた。令和 5 年度には、化学修飾した固体基板上にリポソーム粒子を固定して観察し、粒子高さや面積相当直径などの形態パラメータを用いて、個々の粒子の形態・サイズを解析する方法を検討した。その結果、リポソームの形態・サイズは、脂質の組成や化学的变化、リポソーム内外の環境条件、薬物封入状態、製造・調製に由来する要因など、各種因子によって影響を受けることを明らかにした。また、薬物封入の有無や過剰な薬物封入に伴う粒子特性の変化を、単一粒子レベルで検出し得る分析法を構築した。

令和 6 年度には、AFM を応用した本分析技術の特性解明を進めた。構造的に異なる粒子が混在するモデル製剤を用いることで、製剤中に含まれる異質な粒子集団を単一粒子レベルで捉えられることを示した。一方で、リポソームの形態・サイズには複数の物理化学的因子が反映されるため、実製剤において形態・サイズの変化が検出された場合、その原因を単一の因子に直ちに特定することは困難であることが分かった。この点は本手法の限界であるが、リポソーム製剤の品質に関わる複合的な物理化学的变化を、粒子単位の形態・サイズ情報として捉えられることは、同等性/同質性評価における本手法の有用性を示すものでもある。

さらに、リポソーム製剤の品質特性を多面的に評価するため、薬物放出特性を評価する試験系の構築にも取り組んだ。動的透析法（DLS）、液体クロマトグラフィー法、および数理モデルを組み合わせる方法を開発し、

ドキソルビシン封入リポソーム製剤からの薬物放出挙動を解析する基盤を確立した。本基盤は、AFM で取得する形態・サイズ情報と、製剤機能である薬物放出特性とを関連付けて評価するために有用である。

令和 7 年度には、種類や製造時期の異なるリポソーム医薬品を対象として、本研究で開発した AFM の適用性を追検証した。その結果、種々の実製剤に対して、粒子形態・サイズ情報の取得が安定して可能であることを確認した。また、動的光散乱法や薬物放出解析法を含む平均特性分析法との比較を進めた結果、これらの手法では把握しにくい粒子集団内の特性の不均一性を、AFM によって補完的に評価できることを示した。これらの成果から、開発した単一粒子分析手法は、リポソーム製剤の品質特性をより詳細に把握し、同等性/同質性を科学的に評価するために有用であることを示した。

（２）標的化リポソーム製剤の表面修飾状態を評価する AFM の検討

表面修飾型リポソームでは、標的分子との相互作用や体内動態に関わる「表面修飾の不均一性」を評価する分析法の整備が、今後の同等性/同質性評価において重要な課題である。

令和 6 年度には、カンチレバー、観察条件、新たな試料固定法などの AFM 計測に必須となる測定条件を最適化し、表面修飾リポソームを安定して観察するための方法を整備した。

令和 7 年度には、表面修飾率の異なるモデルリポソームを用い、AFM 観察により得られる粒子数、粒子高さ、粒度分布等の変化を評価した。その結果、表面修飾状態の違いが粒子高さや形態分布の変化として反映されることを見いだした。

本研究により、AFM を用いた形態・サイズ解析が、表面修飾型リポソーム製剤における修飾状態の差異を簡便に評価し得る手法として、同等性/同質性の確保に資することを提示した。

（３）クライオ電子顕微鏡法との比較を通じた AFM の有用性検証

本研究では、単一粒子分析法として現在広く用いられているクライオ電子顕微鏡法と、本研究で開発した AFM について、それぞれの特性と適用範囲を比較することで、AFM の有用性を検証した。

クライオ電子顕微鏡法は、急速凍結により液中環境を反映した状態でナノ粒子製剤の内部構造や膜構造を直接可視化できる手法であり、構造評価において不可欠な分析法である。一方で、装置・人材・運用に関する負担に加え、試料調製や観察視野の選択に由来するバイアス、ならびにスループットの制約といった課題が依然として残されていることを、本研究での実験結果および調査結果に基づき整理した。

一方、AFM は、内部構造の直接観察には限界があるものの、クライオ電子顕微鏡法では明瞭に捉えられなかった「リポソーム製剤間の形態・サイズ分布の非類似性」を、より簡便かつ再現性良く取得できることを実証した。AFM では固体基板との相互作用を介して粒子が固定化される過程が形態・サイズ情報に反映されうするため、この分析特性が製剤間差異の検出感度に寄与していることが示唆された。また、物理的・化学的に均一性の高い固体表面を有する観察基板を用いることで、粒子固定化に伴う空間的な偏りが抑制され、観察視野に起因するサンプリングバイアスが低減される可能性が示された。

以上より、AFM は、固体基板との相互作用を含む観察原理に基づき、粒子集団内の不均一性に起因する形態・サイズ分布情報を直接評価できる有用な単一粒子分析手法として、リポソーム製剤の品質評価における有効な評価手段であることを示した。

（４）成果の文書化および外部発信

本研究で得られた知見は、学術論文、総説、学会発表、シンポジウム等を通じて外部に発信した。AFM を用いたナノ脂質膜小胞の力学的特性計測法とその応用に関する総説を公表し、本研究の基盤となる単一粒子分析技術の考え方と応用を整理した。また、リポソーム製剤を含むナノ粒子製剤の品質評価において AFM と相補

的に重要となるクライオ電子顕微鏡法についても、原理、応用、課題を整理した総説を公表した。さらに、リポソーム製剤の薬物放出特性評価に関する研究成果について、動的透析法と速度論的解析を組み合わせた原著論文として公表した。

加えて、日本薬学会、日本薬剤学会、日本 DDS 学会、AMED レギュラトリーサイエンス公開シンポジウム、国際レギュラトリーサイエンス会議等において、本研究成果を発表し、リポソーム製剤を含む脂質ナノ製剤の品質評価における単一粒子分析法の意義について情報発信を行った。これらの活動を通じて、大学、製薬企業、規制当局等の関係者との議論を深め、ナノ粒子応用医薬品の品質評価に関する課題認識の共有に努めた。

また、薬学系学生を対象としたレギュラトリーサイエンスに関する講義や、一般を対象とした国立医薬品食品衛生研究所シンポジウムにおける講演を通じて、先端的医薬品の品質評価に関する科学・技術対話にも取り組んだ。これにより、専門家のみならず、医薬品開発や薬事・品質評価に関心を持つ学生および一般の参加者に対しても、ナノ粒子医薬品の品質評価の重要性を発信した。

さらに、本研究と関連する技術的知見に基づき、第十九改正日本薬局方の参考情報に収載される「原子間力顕微鏡によるナノ粒子のサイズ及び形態解析法」を技術的に補完する解説を、第十九改正日本薬局方 技術情報 JPTI 2026 (2026 年度発刊予定) に執筆した。本解説では、AFM によるナノ粒子解析における固定化、計測、解析上の留意点を整理し、リポソーム製剤を含むナノ粒子試料へ AFM を適用するための実践的な情報提供を行った。

3. 総括および本研究の意義

以上のように本研究は、リポソーム医薬品の同等性/同質性の確保に向けて、AFM を活用した単一粒子分析基盤を開発するとともに、その適用性、限界性、および有用性を体系的に明らかにした。本分析基盤は、リポソーム医薬品に限らず、脂質ナノ粒子をはじめとするナノ粒子応用医薬品の品質評価において、従来の平均特性評価を補完する単一粒子レベルの解析に貢献するものである。特に、本研究で開発した AFM 計測法は、製法変更やスケールアップ、後発品開発など、製造条件の差異が製品の同等性/同質性に与える影響を粒子単位で比較評価するための技術基盤として有用であり、今後の規制科学的議論にも資するものである。さらに、本研究で明確化した単一粒子分析法の役割、適用場面および測定上の留意点は、リポソーム医薬品の開発および後発品評価に関するガイドラインにおける技術的論点整理に資する知見である。また、本研究で確立した AFM を基盤とする単一粒子分析手法は、粒子レベルでの構造・機能評価に関する方法論を提供し、単一粒子分析法の今後の発展および高度化に貢献するものである。

英文：

Liposome formulations are established nanoparticle-based drug delivery systems that improve the efficacy and safety of therapeutic agents. They are important modalities for addressing unmet medical needs, and both innovator and generic products have been developed. In addition, surface-modified liposomes are being developed as next-generation targeted delivery systems. However, liposomes are complex molecular assemblies in which membrane structure, encapsulated drug, particle size, morphology, and surface properties are interrelated. Variations in factors such as lipid composition, manufacturing processes, scale, storage conditions, and surface modification can affect drug retention, release behavior, pharmacokinetics, and other product-related functions. Therefore, rigorous quality characterization is required to support comparability assessments associated with manufacturing changes, scale-up, and generic product development. Conventional analytical methods for liposome formulations often rely on measurements that inherently reflect ensemble-averaged properties of the constituent particle population, and therefore provide bulk descriptors such as mean particle size and drug encapsulation efficiency. These ensemble-averaged methods, including dynamic light scattering and drug release assays, are essential for routine quality control, but may not fully capture particle-level heterogeneity.

This study established a single-particle analytical framework based on AFM, including a chemically modified substrate immobilization strategy, as a complementary approach. Individual liposomes were analyzed using morphological parameters such as particle height and area-equivalent diameter. The results showed that liposome morphology and size are governed by multiple interrelated factors, including lipid composition, physicochemical modifications, environmental conditions, and encapsulation state. Although these factors were examined using controlled model systems, morphological changes observed in real formulations reflect their combined effects, making it difficult to attribute such changes to a single dominant cause. This limits straightforward mechanistic interpretation, but it also indicates that the AFM-based single-particle approach can capture composite physicochemical changes in liposome formulations as particle-level heterogeneity, which may not be apparent from ensemble-averaged measurements.

To link structural properties with function, an *in vitro* drug release evaluation system was developed by combining dynamic dialysis, liquid chromatography, and kinetic modeling for doxorubicin-loaded liposomes, enabling correlation between AFM-derived morphology and drug release behavior. The applicability of the developed AFM method was further evaluated using liposomal products with different types and manufacturing histories. AFM detected differences in size and morphological distributions that were not clearly reflected in parameters obtained by ensemble-averaged methods, including dynamic light scattering and drug release assays. Cryo-electron microscopy was also applied as a comparator; however, under the tested conditions, it did not clearly resolve the formulation-dependent differences in size and morphological distributions observed by AFM. AFM was also applied to surface-modified liposomes as a model for targeted formulations. After optimizing measurement conditions, differences in surface modification levels were reflected in AFM-derived morphological distributions.

Overall, this study established an AFM-based single-particle analysis framework for liposomal drug products and clarified its applicability, limitations, and complementary role relative to ensemble-averaged methods. The results provide analytical concepts and technical considerations for evaluating particle-level heterogeneity that may not be apparent from ensemble-averaged measurements. The framework developed here is expected to contribute broadly to quality evaluation strategies for nanoparticle-based pharmaceuticals beyond liposomal systems, including lipid nanoparticles and related advanced drug delivery platforms. These findings may also serve as technical reference information for future regulatory-science discussions on the quality evaluation of nanoparticle-based medicinal products.