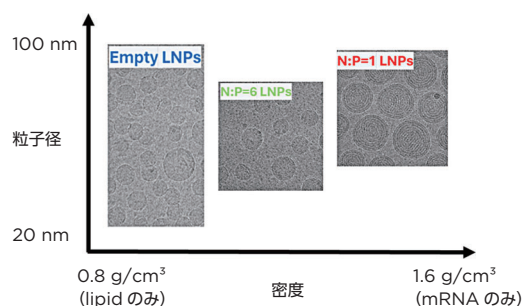




超遠心分析法がもたらす mRNA-LNP製剤CQA評価の新たな指標 — 密度に基づくmRNA-LNPの品質特性の理解と管理 —

はじめに

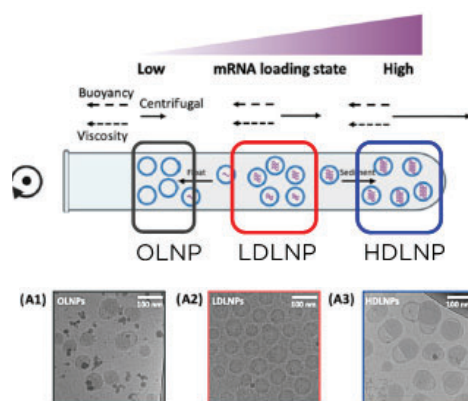
近年、mRNA-LNP製剤の実用化に向けた取り組みが進む中、不均一性の高い mRNA-LNP 製剤における品質特性の理解および管理の重要性が高まっています。これまで、主に海外を中心として、mRNA-LNP製剤に特有の重要品質特性（Critical Quality Attributes: CQA）に関する研究が進められ、ガイドライン等においては、多面的な特性評価の必要性が示されています¹。例えば、mRNA-LNP製剤では、粒子サイズ分布のみでは品質や薬効を十分に評価できないケースがあります。このような場合、LNP中における mRNA の内包状態を反映した密度分布など、より本質的な物理化学的な特性評価による補完が重要となります。ここでは、mRNA-LNP の特性評価に有効な手法として、超遠心分析法（AUC）に着目し、その有用性と課題について解説します。



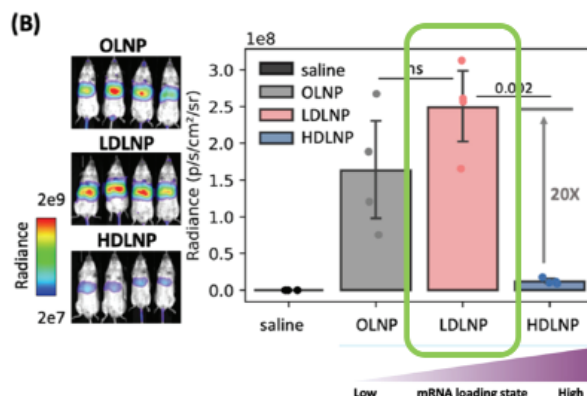
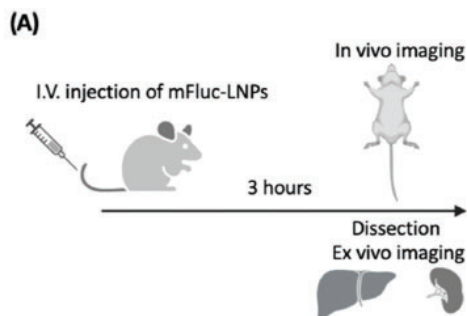
LNPは粒子径・密度の不均一性が高い

超遠心理論を活用した mRNA 充填量に起因する LNP 不均一性の理解と CQA 評価指標

mRNA-LNP精製において、超遠心分離で得たS値（密度）の異なる3つのフラクションの物性および生物活性解析から、内包 mRNA 充填量の違いが粒子密度、粒子径、形状、さらには生物活性と強く関連することが示されました^{2,3,4}。これは、LNPの不均一性が粒子サイズや拡散特性ではなく、mRNA量に起因する密度および沈降挙動の差によって特徴付けられることを示唆しています。したがって、粒子径や拡散定数を指標とする分離法よりも、沈降係数や密度を指標とする超遠心分離法が有効であると言えます。さらに、これらの遠心理論に基づく物理パラメータは、mRNA-LNP製剤のCQA評価、特に内包RNA分布、サイズ分布、多分散性の詳細な理解と管理に有用な指標となり得ると示唆されます。



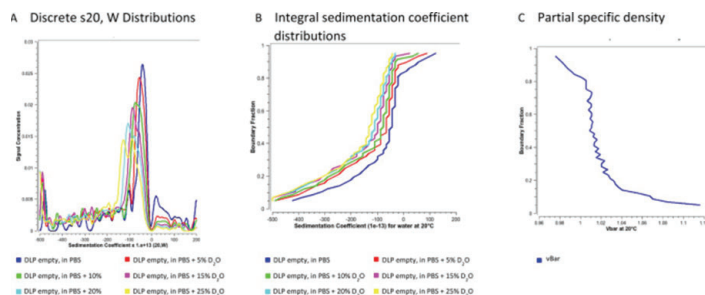
分画超遠心法（30,000xg、120分）で超遠心後、3つのフラクションに分画。OLNPは中空構造、HDLNPは過剰にmRNAが内包されていた²。



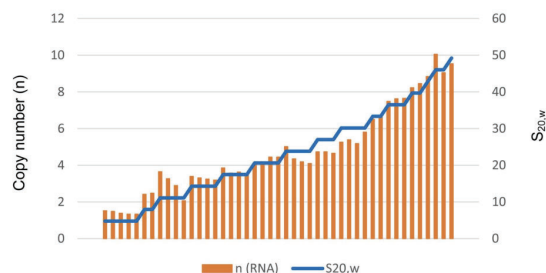
生体投与試験の結果、LDLNPが最も高い活性を示し、mRNA密度の高いHDLNPでは活性が最も低いことから、mRNAの充填量（密度）や粒径、形状といった物理的パラメータが大きく影響することが示唆された²。

密度マッチング速度法による、mRNA-LNPの内包性を反映させた特性評価

超遠心分析法の解析手法の一つである密度マッチング速度法（Density Matching SV-AUC）は、mRNA-LNP中のmRNA内包量分布を定量評価するための重要な解析手法です⁵。重水によりサンプル溶媒の密度を段階的に変化させつつLNPの沈降係数を測定し、その溶媒密度依存性から沈降係数がゼロとなる点を外挿することで、LNPの実効密度および偏比容を求めます⁶。本手法により、サンプル中のmRNA-LNPの偏比容分布を評価でき、さらに、mRNAとEmpty LNPの偏比容・モル質量を組み合わせることで、単一LNP粒子あたりのmRNAコピー数を理論的に推定することも可能です⁶。



重水を使用した密度マッチング速度法を用いて、LNPの密度を測定し、偏比容を推定⁶



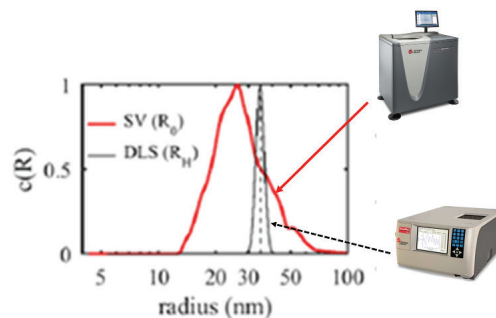
lipidのモル質量とmRNAのモル質量および、LNP(Full)のモル質量分布を組み合わせることで、LNP当たりのmRNAコピー数（理論値）を算出⁶

他の分析法で検出困難な不均一性・微量成分に対するSV-AUCの技術的優位性

SV-AUCの大きな優位性は、動的光散乱法（DLS）や電子顕微鏡（cryoTEM）では見落とされやすい不均一性や微量成分を、高分解能かつ定量的に検出できる点にあります。

DLSは散乱強度加重かつ非分離型の手法であるため、大粒子や凝集体の影響を強く受け、実際には多分散であっても単分散に見える場合があります^{7,8}。

一方AUCは、遠心場下での沈降挙動に基づき成分を分離解析でき、サイズ分布や多分散性に加え、微量凝集体やフリー RNAまで同時に評価可能です⁷。

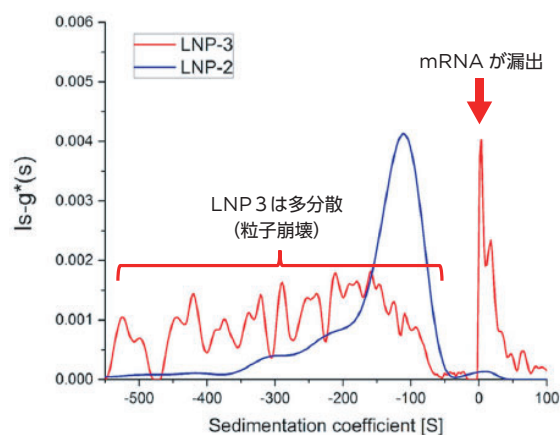


DLSでは粒子サイズが34nm付近の単一ピークとして検出されたが、AUCでは15～60nmの多分散として検出⁷

Sample	mRNA	Z av (d,nm)	PDI	Encapsulation Efficiency (%)
LNP-1	I	86	0.07	97
LNP-2	I	69	0.08	95
LNP-3	II	110	0.09	74
LNP-4	III	79	0.08	99

（上図）DLSではLNP3は粒子サイズ110 nmで単分散という結果が得られた。

（右図）AUCではLNP3（赤線）は沈降係数の分布関数が-300～-10Sと広く多分散であること、さらにmRNAのシグナルも検出されたことから、mRNAが漏出していたことも明らかとなった⁸。



脂質ナノ粒子 解析ソリューション

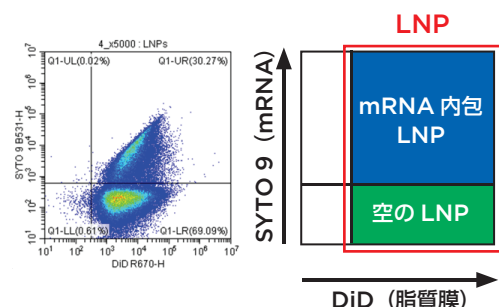
LNPの精製・特性評価に関するアプリケーションノートや技術資料をご紹介します。ぜひご確認ください！

<https://bit.ly/4dwBiC2>



AUCとナノフローサイトメーターの併用による mRNA-LNP 製剤 CQA 評価の高度化

AUCは高い分離・分解能を有しますが、一方で粒子数を直接測定することはできません。このため、ナノフローサイトメーターなどの粒子数測定法と併用することで、mRNA-LNP 製剤の CQA 評価に定量性と信頼性を付与することが可能となります。



脂質とmRNAをそれぞれDiDおよびSYTO9でラベリングした上で、ナノフローサイトメーター CytoFLEX nanoを用いてLNPのポピュレーション解析を行った。mRNAを含まない空のLNPも免疫活性化作用を有するため、ワクチンなどへの応用には有用であると考えられる。一方で、免疫活性化が不要な薬剤への応用（タンパク質補充療法やゲノム編集等）においては、空のLNPが過剰な免疫応答や炎症反応などの副作用を引き起こす可能性がある。

今後、ワクチン以外の用途においては、mRNAを含むLNPと空のLNPを分離し、それぞれを定量的に評価する必要がある。その点で、本測定法は有用であると考えられる。

データ提供：ベックマン・コールター株式会社

解説：名古屋大学 学際統合物質科学研究機構 生物有機化学研究室 木村 誠悟 先生

おわりに

分析用超遠心システム Optima AUCは、サイズや密度が不均一な mRNA-LNP 製剤を高分解能かつ定量的に解析できる有用な手法で以下の測定・評価が可能です。

- 高分解能で定量性のあるサイズ分布測定
- RNAカプセル化の評価
- 高度な凝集物・粒子の評価
- 無固定・無標識（ラベルフリー）の非破壊解析
- 他の測定法の解析データを補完

さらにCytoFLEX nanoを用いることで、mRNAを含むLNPと空のLNPの割合および粒子数を定量的に評価することが可能となります。

このように、AUC とナノフローサイトメーターを組み合わせることで、密度・サイズ・粒子数・内包率を統合的に評価することが可能となり、品質評価から製剤設計、プロセス開発まで幅広く貢献し、物性理解を深めることで薬効最大化と品質保証の両立を実現します。



参考文献

1. Nogueira S S, Samaridou E, Simon J, Frank S, Beck-Broichsitter M, Mehta A Analytical techniques for the characterization of nanoparticles for mRNA delivery *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 198 (2024) 114235
2. Liao S, Tan Z, Wu S, Huang X, Xu J, Zhang Y, et al. Transfection potency of lipid nanoparticles containing mRNA depends on relative loading levels. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2024;17(2):3097-105.
3. Vaidya A, Parande D, Khadse N, Vargas-Montoya N, Vikram Agarwal V, Ortiz C, Ellis G, Kaushal N, Sarode A, Karve S, DeRosa F Analytical Characterization of Heterogeneities in mRNA-Lipid Nanoparticles Using Sucrose Density Gradient Ultracentrifugation. *Anal. Chem.* 2024, 96, 5570–5579
4. Patel N, Mukandavire C, Kim J, Choi J, Lee H, Shin S, et al. Development and characterization of an in vitro cell-based assay to predict potency of mRNA-LNP-based vaccines. *Vaccines*. 2023;11(7):1224.
5. Henrickson A, Liu J, Jobby N, Xu Y, Arisaka F, Sahin G, et al. Density matching multi-wavelength analytical ultracentrifugation to measure drug loading of lipid nanoparticle formulations. *ACS Nano*. 2021;15(3):5068-76.
6. Bepperling A, Richter G. Determination of mRNA copy number in degradable lipid nanoparticles via density contrast analytical ultracentrifugation. *Eur Biophys J*. 2023;52(4-5):393-400.
7. Zhao H, Sousa AA, Schuck P. Flotation coefficient distributions of lipid nanoparticles by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *ACS Nano*. 2024;18(28):18663-72.
8. Guerrini G, Mehn D, Scaccabarozzi D, Gioria S, Calzolari L. Analytical ultracentrifugation to assess the quality of LNP-mRNA therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2024;25(11):5718.

分析用超遠心機

Optima AUC

不均一性の高いmRNA-LNPの特性解析

遠心力を利用し、担体を必要としない自然な状態で溶液中の溶質を沈降させ、全ての溶質の沈降挙動を独自の光学系にてスキャン測定する分析機器です。

超遠心分析法によって、不均一性の高いmRNA-LNPのサイズ分布、mRNAの内包状態に関連した密度分布、フリーmRNAや凝集物の検出など、様々な特性解析でき、他法で得られるデータをより強固なものとしします。

Optima AUCの詳細はこちら

<https://www.beckman.jp/centrifuges/analytical-ultracentrifuges/optima-auc>



ナノフローサイトメーター

CytoFLEX nano

LNPの粒子数・内包率の定量評価

ナノ粒子解析専用開発された高感度フローサイトメーターであり、40 nmから1 μ mのナノ粒子を測定することが可能です。4レーザー、6つの蛍光チャンネルおよび5つの側方散乱光チャンネルを搭載し、粒子のサイズ、数、特性をシングル粒子レベルで多面的に解析することが可能です。

CytoFLEX nanoの詳細はこちら

<https://www.beckman.jp/flow-cytometry/research-flow-cytometers/cytoflex-nano>



超遠心機

Optima XPNシリーズ OptiMATE Gradient Maker

不均一性の高いmRNA-LNPの分画

mRNA-LNPを高純度化するためには速度ゾーン密度勾配超遠心法を利用します。

誰でも簡単に密度勾配が精製できるOptiMATE Gradient Makerと密度勾配超遠心を最適化するソフトウェアを備えた超遠心機 Optima XPNシリーズで精製ワークフローを効率化します。

OptiMATE Gradient Makerの詳細はこちら

<https://www.beckman.jp/centrifuges/optimate-gradient-maker>



Optima XPNシリーズの詳細はこちら

<https://www.beckman.jp/centrifuges/ultracentrifuges/optima-xpn>



Beckman CoulterおよびBeckman Coulterロゴは、Beckman Coulter, Inc.の商標です。



ベックマン・コールター ライフサイエンス

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063 東京都江東区有明 3-5-7 TOC 有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730

✉ bckk_ls_web@beckman.com

TEL : 03-6745-4704

URL : <https://www.beckman.jp>



ベックマン・コールター ライフサイエンスは Danaher の一員です。