[医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，PMDRS, 54 (4)，300～311（2023)]

特集 mRNA医薬　―技術開発と求められる評価科学―

mRNA医薬の品質評価項目と分析手法

山本 武範*，内田 恵理子*，井上 貴雄*

Quality Evaluation Points and Analytical Methods for mRNA-based Therapeutics

Takenori YAMAMOTO*, Eriko UCHIDA* and Takao INOUE*

1. はじめに

mRNA医薬は，目的遺伝子をコードした長鎖の一本鎖RNAである「mRNA」を有効成分とし，mRNAから発現するタンパク質の作用により疾患の予防や治療を行う医薬品である．低分子医薬品やバイオ医薬品，核酸医薬品とは分子構造や製造法が異なることから，品質評価の観点で特有の考慮事項が存在する．

このため，mRNA医薬の分析については新規性の高い手法・技術が求められる場面が多く，評価科学の観点から，その分析能力，限界，再現性，堅牢性などの検証が求められる．現時点では，mRNA医薬の標準的な評価法として認知された試験法は存在しない。しかし，参考となる海外の規制関連文書としては，感染症予防用mRNAワクチンに関する世界保健機構（World Health Organization：WHO）のガイドライン[1] 及び米国薬局方の品質試験手順書[2]，また，国内の規制関連文書として，新型コロナウイルスmRNAワクチンの審議結果報告書[3, 4] 並びに生物学的製剤基準（生物基）[5] がある．

本稿では，mRNA医薬の構造と製造工程並びに考えられる品質評価項目を概説したうえで，上記の規制文書に記載されている品質評価項目及び分析手法を整理・解説した．また，国立医薬品食品衛生研究所において筆者らが実施しているウェット研究から明らかになってきた品質評価に関する留意点と課題についても併せて紹介する．

2. mRNA医薬の構造・製造工程と品質評価項目

現在臨床開発されているmRNA医薬の多くは，mRNAが脂質ナノ粒子（lipid nanoparticle: LNP）に封入された構造を有する．原薬であるmRNAは一般に数千塩基の一本鎖RNAからなり，5′末端から順に5′キャップ，5′非翻訳領域，翻訳領域，3′非翻訳領域，100塩基程度のポリAより構成される（Fig. 1）．mRNAを構成する塩基（A・G・C・U）については，天然型RNAのみで構成されるmRNAを投与した際に生じる過剰な免疫応答を回避するため，多くの場合，U（ウリジン）をN^1-メチルシュードウリジン等に置換したmRNAが用いられている．

mRNA原薬のRNA鎖は，直鎖化したプラスミドDNA等を鋳型とするインビトロ転写により合成され，更にキャップ化酵素などによるキャップ付加反応を経て製造される（Fig. 2：インビトロ転写時に同時にキャップを付加する製造法もある）．このため，mRNAの品質評価項目として，mRNAの一次構造（塩基配列），含量，全長mRNAの含有率，5′キャッ

＊ 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部　神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26（〒210-9501）
Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki City, Kanagawa 210-9501, Japan

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

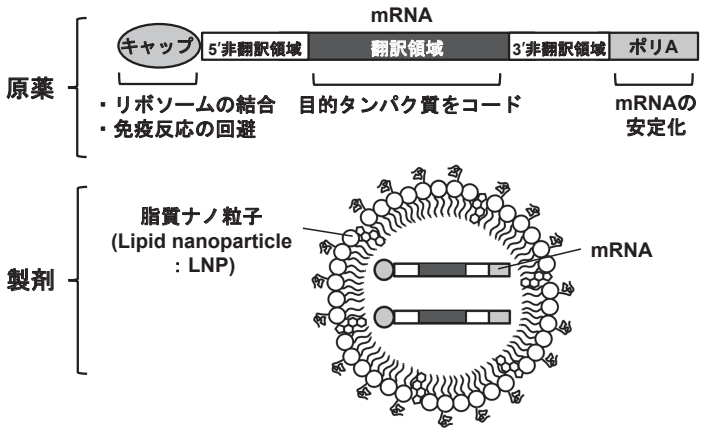

Fig. 1　mRNA医薬の構造

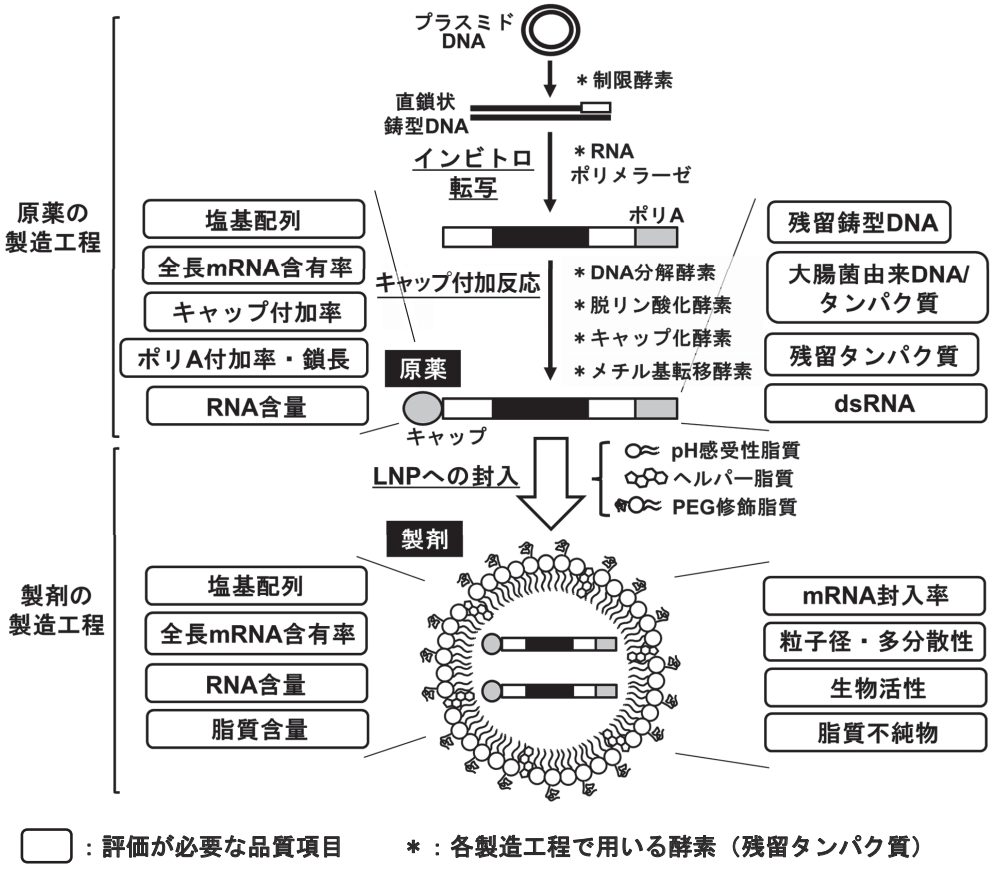

Fig. 2　mRNA医薬の製造工程と評価が必要な品質項目

プ構造とその付加率，3′ポリAの鎖長とその付加率などが考えられる．

また，製造工程において生成する可能性がある二本鎖RNA（double-stranded RNA：dsRNA）は炎症反応を惹起する可能性があることから，dsRNAの含量についても評価が必要と思われる．製造工程由来不純物の観点では，インビトロ転写で使用する鋳型DNA及び鋳型DNAの製造時に混入する大腸菌DNA/タンパク質，RNAポリメラーゼ等の酵素などの残留が考えられ，これらが評価項目になると思われる．

現在の主流であるLNP-mRNA製剤については，上記の過程で製造されたmRNA原薬をpH感受性脂質，ポリエチレングリコール（polyethylene glycol：

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

PEG）修飾脂質，ヘルパー脂質（リン脂質及びコレステロール）で構成される脂質成分の中に封入することにより製剤化される．LNPはヌクレアーゼによる分解からmRNAを保護するとともに，mRNAを標的細胞に送達する役割があり，十分な有効性を保持するためには，製剤としての種々の品質特性を確認する必要がある．まず，製剤中のmRNAの一次構造，含量，全長mRNA含有率については，原薬と同様に重要な品質特性であり，評価項目になると考えられる．これらに加えて，製剤に特有の評価項目として，LNPを構成する脂質の含量，LNPへのmRNA封入率，粒子径とその分布（多分散性）が挙げられる．更に，生物学的評価として，培養細胞において目的タンパク質の発現を確認することも重要と考えられる．

3. 規制関連文書に記載されている品質評価項目とその分析手法

本項では，WHOから発出された感染症予防用mRNAワクチンに関するガイドライン「Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations, Annex 3, TRS, No. 1039」[1]，並びに米国薬局方（United States Pharmacopeia: USP）の品質試験手順書「Analytical procedures for mRNA vaccines quality（ドラフト初版）」[2]を取り上げ，これらの文書に記載されている品質評価項目とその分析手法を概説する．

また，国内の文書として，ファイザー社及び武田/モデルナ社のmRNAワクチン（コミナティ筋注及びスパイクバックス筋注）の審議結果報告書[3,4]，並びに，これらの報告書に共通する規格試験が示された生物基〔コロナウイルス修飾ウリジンRNAワクチン（SARS-CoV-2）〕[5]について，提示された品質評価項目と試験法を解説する．

3.1 感染症予防用mRNAワクチンに関するWHOガイドライン

本文書（Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations, Annex 3, TRS, No. 1039）[1]はCOVID-19パンデミックを契機に，WHOの生物学的製剤の標準化に関する専門委員会（Expert Committee on Biological Standardization：ECBS）において作成されたものである．ドラフト版が2020年12月に公開され，2021年7月の修正案を経て，2021年12月に発出されている．

COVID-19予防用mRNAワクチンの緊急開発を支援するため，mRNAワクチンの製造，品質管理，非臨床及び臨床試験の一連の項目について規制上の留意事項が整理され，取りまとめられている．

本文書の対象は，感染症の「予防」を目的とした「ウイルスタンパク質（抗原）をコードするmRNAを封入したLNP製剤」に限定されている．mRNA原薬については，通常のmRNAに加えて，自己増殖型mRNAも対象に含まれる．一方，疾病の「治療」を目的とするmRNA医薬は本文書の対象外であり，モノクローナル抗体をコードするmRNAなど感染症の治療を目的とするmRNA医薬も同様に対象外である．本文書にはmRNAワクチンの原薬及び製剤の品質評価・管理に重要となる品質特性とその評価法が記載されており，概要としては「同一性，純度，品質，安全性などを示すために包括的な分析を実施した後に，品質管理のために限定された試験を設定することが適切である」としている．

以下に，原薬及び製剤の双方について，本文書に記載された品質評価項目と分析法の概要を述べる（Table 1，2：WHO）．

3.1.1 原薬

本文書に記載されているmRNA原薬の品質評価項目と評価に関する考え方は，以下のとおりである．

同一性：分子設計と原薬の同一性を確認するため，mRNAの塩基配列を確認する試験が必要とされる．分析手法としては，逆転写産物のサンガーシーケンスに加えて，逆転写を行わずmRNAの配列を直接読み取ることができるRNAシーケンス等が挙げられている．

定量・物性：mRNA原薬におけるRNA含量を定量する手法については，紫外分光法が例として挙げられている．mRNAの構造の完全性[注1]は重要品質特性とされており，全長mRNAとmRNA断片の割合（全長mRNA含有率），5′キャップ付加率，3′ポリA付加率又は鎖長，混入するdsRNAの割合につい

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

Table 1　WHO，USP，生物基における原薬の品質特性項目と分析手法

WHO[1]			USP[2]			生物基[5]	
項目	評価項目	分析法の例	項目	特　性	分析法	試験名	分析法
同一性	塩基配列確認	ダイレクトRNAシーケンス	同一性	塩基配列確認	NGS	（記載なし）	（記載なし）
		サンガーシーケンス			サンガーシーケンス		
		NGS			RT-PCR		
定量物性	mRNA定量	紫外分光法	定量	RNA含量	RT-qPCR/RT-dPCR	RNA含量試験	紫外分光法
					紫外分光法		
	全長mRNAとmRNA断片の割合，dsRNAの割合（全長mRNA含有率）	ゲル電気泳動，PCR，クロマトグラフィー	完全性	全長mRNA含有率	キャピラリーゲル電気泳動，ゲル電気泳動	RNA完全性試験	キャピラリーゲル電気泳動，LC
	5′キャップ付加率			5′キャップ付加率	IP-RP-HPLC	5′キャップ試験	LC
	3′ポリA付加率・鎖長			3′ポリA付加率	IP-RP-HPLC	ポリA鎖試験	PCR，LC
純度	鋳型DNA	qPCR	純度	鋳型DNA	qPCR	鋳型DNA試験	qPCR
	未利用NTPs，キャップ，酵素，mRNA断片，dsRNA	クロマトグラフィー		dsRNA	イムノブロット		

RT-PCR: 逆転写PCR，NGS: 次世代シーケンス，qPCR: 定量PCR，dPCR: デジタルPCR，IP-RP-HPLC: イオンペア逆相HPLC，NTPs: ヌクレオチド三リン酸，dsRNA: 二本鎖RNA

Table 2　WHO，USP，生物基における製剤の品質特性項目と分析手法

WHO[1]			USP[2]	生物基[5]	
項目	評価項目	分析法の例		試験名	分析法
同一性	塩基配列確認	ダイレクトRNA シーケンス		確認試験	RT-PCR
		サンガーシーケンス			
		NGS			
含量	mRNA含量	紫外分光法		RNA含量試験	蛍光分光法クロマトグラフィー
純度	mRNA由来不純物脂質由来不純物	（記載なし）		mRNA完全性	キャピラリーゲル電気泳動又はLC
力価	インビトロ力価測定	トランスフェクション，無細胞アッセイ		（記載なし）	（記載なし）
追加管理項目	脂質の種類・含量	（記載なし）		脂質含量試験	HPLC
	粒子径			粒子径及び多分散性	動的光散乱法
	多分散性				
	mRNAと脂質の比率			（記載なし）	（記載なし）
	mRNA封入率			mRNA封入率	蛍光強度又は吸光度

注1：mRNA原薬における「完全性（integrity）」とは，mRNAの構造が欠落せずに全体として保持されていることを概念的に示す用語であり，これを確認するための評価項目としては，一般には，全長mRNA含有率，5′キャップ付加率，3′ポリA付加率（あるいは3′ポリA鎖長）の三つが想定されるケースが多い．

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

て評価が必要とされる．多くの場合，3′ポリAは鋳型DNAにコードされ，インビトロ転写時に付加されるが，インビトロ転写後にポリAを付加する場合にはポリA鎖長が多様になるため，特に慎重な評価が必要とされている．これらの分析法としては，ゲル電気泳動，PCR，クロマトグラフィーが挙げられているが，個々の品質項目に対応する分析手法は明示されていない．

純度：鋳型DNAやmRNAに組み込まれなかった未利用ヌクレオチド及びキャップ，製造工程で用いる種々の酵素，mRNA断片，dsRNAについて評価が必要とされる．残留する鋳型DNAは定量PCR（quantitative PCR：qPCR），それ以外の不純物はクロマトグラフィーによる分析が推奨されている．

安全性及びその他の品質特性：Table 1に記載した項目以外にも，安全性に関連する試験として，無菌試験，微生物限度試験，エンドトキシン試験が挙げられ，発熱性物質試験が実施されることもあると記載されている．また，その他の品質特性として，外観，pH，場合によっては粘性等が管理項目になるとされる．

3.1.2　製剤

製剤（LNP-mRNA）の品質評価項目としては，原薬と同じく，同一性，含量，純度，安全性等が挙げられ，更に力価の評価が必要とされる．以下に各項目の概要を述べる．

同一性：原薬と同様に，ワクチンに含まれるmRNAについても塩基配列の確認が必要とされる．

含量：mRNAワクチンはmRNA含量に基づき投与量が決定されるため，mRNAの定量が必要とされる．特に混合ワクチンや多価ワクチンなど複数のmRNAが含まれるワクチンについては，各々のmRNA量を定量し，比率を確認する必要があるとしている．

純度：ワクチンの主たる構成要素であるmRNA及び脂質に由来する不純物，またワクチンの酸化や劣化により生じる不純物について，mRNAの完全性，粒子径，脂質等の不純物などの観点から試験を検討すべきとされている．

力価：適切な定量性を有する手法で力価を決定する必要があるとされている．投与されたmRNAワクチンの免疫原性の獲得には，標的細胞へのmRNAの送達やタンパク質への翻訳など複数の因子が関わっている．このため，力価の評価手法としては，培養細胞に製剤を添加する評価法（トランスフェクションによる発現解析）及び無細胞タンパク質合成システムを利用した評価法（インビトロ翻訳）が挙げられている．これらの手法を用いたタンパク質発現/翻訳のデータと臨床試験の結果の関連を精査することにより，選択した力価試験で品質管理を行うことの適切性を説明する必要があるとされている．

その他の品質特性：そのほかに評価が必要とされる品質特性として，外観，pHがあり，浸透圧や粘性等も時として重要であるとしている．更に，LNP-mRNAワクチンに特有の追加管理項目として，脂質の種類・含量，粒子径，多分散性，mRNAと脂質の比率，mRNAのLNPへの封入率の確認，及びLNP-mRNAの構造が凍結により変化しないこと等の確認も必要としている．

安全性：安全性に関しては原薬に準じた試験が必要とされている．

以上のように，WHOガイドラインには感染症予防用mRNAワクチンの原薬及び製剤に必要と考えられる品質評価項目が挙げられている．一方で，分析手法については，一部の評価項目で例示されているに過ぎず，また分析法の詳細も示されていない．

3.2　米国薬局方（USP）の品質試験手順書

USPは米国連邦食品医薬品化粧品法（Federal Food, Drug, and Cosmetic Act: FD & C Act）により認められている公定書であるが，日本薬局方と異なり，非政府団体であるUSP Conventionにより発行されている．本文書（Analytical procedures for mRNA vaccines quality：ドラフト初版）[2] は，USP Conventionが2022年3月に発出したmRNAワクチンの原薬に焦点を当てた品質試験手順書で，評価すべき品質特性とその具体的な品質評価法に関して，使用機器から試薬の組成に至るまでの実験条件や留意点などの詳細な情報が収載されている．

本文書では，mRNA原薬の品質特性を同一性，純度，含量，物性（完全性）に分類し，各品質特性の評価手法の詳細が示されている（Table 1：USP）．製剤については示されていないものの，ここで取り上げている品質評価法がLNP-mRNAから抽出したmRNAにも適用できるとされている．本ドラフト

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

は，一般公開されている情報源から転用されている方法を含み，産官学の代表者を含むUSPの生物製剤に関する科学専門委員会によって審査・発出されたものである．

以下に，本文書に収載されている個々の品質評価項目に対する分析手法の記載について概説する．

3.2.1　同一性

同一性を確認するための分析手法として，次世代シーケンスとサンガーシーケンスによる塩基配列確認，及びreverse transcription PCR（RT-PCR）が挙げられている．次世代シーケンスについては，断片化したmRNA原薬の逆転写産物ライブラリーの作製法から，シーケンスデータの解析法まで各工程の手順と留意点が示されている．サンガーシーケンスとRT-PCRに関しても，各酵素反応の詳細な条件が示されている．

3.2.2　定量

mRNA原薬の含量の定量法として，mRNAを逆転写した後，得られたcDNAのコピー数をqPCR及びデジタルPCR（digital PCR：dPCR）で測定する手法を挙げ，逆転写及びdPCRの反応条件が示されている．また，紫外分光法によるモル吸光係数を用いたRNA濃度の定量法については，定量の際の原薬の希釈に用いる溶液組成や正確な定量のための留意点が示されている．

3.2.3　完全性

mRNA原薬の完全性として，全長mRNA含有率，5′キャップ付加率，3′ポリA付加率の三つについて分析手法が示されている．

全長mRNA含有率：全長を保持した目的mRNAと断片化されたRNAをキャピラリーゲル電気泳動により分離し，各ピークの面積比からmRNAの含有率を算出する分析手法を挙げている．具体的には，代表的な二つのキャピラリーゲル電気泳動装置〔Fragment Analyzer（アジレント・テクノロジー社）及びPA 800 Plus（サイエックス社）〕について，それぞれの装置を用いた場合の分析手順と泳動条件が記載されている．また，変性アガロースゲルを用いた電気泳動による分離分析法に関しても，ゲル組成を含めた詳細な実験条件が示されている．

5′キャップ付加率：mRNA原薬の5′末端領域を，液体クロマトグラフィー（LC）での分離に適した鎖長になるよう切断して得られたRNA断片に対して，イオンペア逆相液体クロマトグラフィー（ion-pair reversed-phase high performance LC：IP-RP-HPLC）解析を行い，キャップ付加体とキャップ欠落体の量比を算出する方法が挙げられている．5′末端領域の切断反応の条件及びIP-RP-HPLCの分離条件が示されている．

3′ポリA付加率：キャップ付加率と同様に，mRNA原薬を切断して得たポリA領域を含むRNA断片をIP-RP-HPLCに供し，ポリA付加体とポリA欠落体等を分離分析することで，ポリA付加率を算出する方法が挙げられている．切断反応の条件，LCでの分離条件等が示されている．

3.2.4　純度

原薬の純度試験として，製造工程由来不純物としては残留鋳型DNA，目的物質由来不純物としてはdsRNAの試験法が挙げられている．

残留鋳型DNA：混入する鋳型DNAについて，qPCRを用いた分析手順が示されている．

dsRNA：炎症誘導の可能性があるdsRNAについては管理の必要性が記載されているものの，dsRNAの生成はmRNAの設計や製造工程に依存するため，特性評価に該当する可能性についても言及されている．抗dsRNA抗体を用いたイムノブロットによるdsRNA検出の手順が示されている．

本文書（Analytical procedures for mRNA vaccines quality：ドラフト初版）[2]については，2023年4月30日にドラフト第二版[6]が公開された．第二版では，原薬の品質評価として，トランスフェクション試薬を用いて培養細胞におけるタンパク質発現を確認する力価試験，残留T7 RNAポリメラーゼを含む複数の製造工程由来不純物に対する分析法等が追加されている．また，原薬に加えて，プラスミドDNAと製剤に関しても，品質特性と試験法が追加されており，mRNAワクチン開発の品質評価において，網羅的な品質試験手順書となっている．

3.3　mRNAワクチンの審議結果報告書

本邦では，コミナティ筋注（ファイザー社）及びスパイクバックス筋注（武田/モデルナ社）がCOVID-19予防用mRNAワクチンとして特例承認を取得しており，それぞれの審議結果報告書[3, 4]が公開されている．これらの文書から両製品における品質評価の概要を読み取ることができる（Table 3）．

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

原薬の特性解析においては，mRNAの塩基配列に関して，両社ともオリゴヌクレオチドマッピング[注2]や次世代シーケンスを用いた解析を実施している．また，5′キャップ及び3′ポリA鎖の構造について，IP-RP-HPLC-MSを用いた解析を実施している．mRNAは分子内の非共有結合により高次構造を形成していると考えられるが，この高次構造について，円偏光二色性スペクトル解析や示差走査熱量測定による解析を実施している．以上のように，両社とも先駆的な分析手法も導入して，mRNAの品質特性を詳細に解析している．

規格試験の評価項目に関しては両者で共通性が高いが，分析手法については異なる点がある．例えば，全長mRNA含有率の分析手法について，コミナティ筋注ではキャピラリーゲル電気泳動を用いているのに対して，スパイクバックス筋注では逆相HPLCを用いている．また，dsRNAに関しては，コミナティ筋注では規格として設定されているが，スパイクバックス筋注では設定されていない．これは，モデルナ社は独自のT7 RNAポリメラーゼの開発[7]などにより，dsRNAの混入を低減した製法を確立したことにより，dsRNAに関する評価を規格試験から除外したためと推察される．

3.4　生物学的製剤基準（生物基）

本邦では，ワクチン等の生物学的製剤は，保健衛生上特に注意を要する医薬品であるため，製造販売承認を受けた後も製造ロットごとに国立感染症研究所（感染研）が実施する国家検定に合格しなければ市場に出荷できない．生物基[5]は，「医薬品，医療機器等の品質，有効性及び安全性の確保等に関する法律」に基づいて制定されたワクチン等の生物学的製剤の製法，性状，品質，貯法等に関する基準集であり，これを基に，感染研における国家検定が実施される．生物基は，通則，医薬品各条，一般試験法からなり，COVID-19予防用mRNAワクチンの承認申請を受け，2021年2月，「コロナウイルス修飾ウリジンRNAワクチン（SARS-CoV-2）」が医薬品各条に収載された（Table 1, 2：生物基）．

生物基の医薬品各条には，本質及び性状，製法，試験，貯法及び有効期限の各項が記載されており，当該品目の本質及び性状の項目には，対象が「SARS-CoV-2のスパイクタンパク質をコードするmRNAを含む懸濁液」であることが示されている．

製法の項目では，原材料，原液及び最終バルクに分類して，鋳型DNA，mRNA原薬，LNP化した製剤の製法がそれぞれ概説されている．試験の項目はコミナティ筋注とスパイクバックス筋注に共通する品質規格として規定されており，原液（原薬）に対する試験として，鋳型DNA試験，5′キャップ試験，ポリA鎖試験，RNA完全性試験，RNA含量試験が挙げられている．また，小分製品（製剤）に対する試験として，RNA完全性試験，封入RNA試験，pH試験，エンドトキシン試験，無菌試験，RNA含量試験，脂質ナノ粒子径及び粒子の多分散性試験，脂質含量試験，表示確認試験の概要が記されている．

4. mRNA原薬の品質評価に関するウェット検証の例

以上，mRNAワクチンの規制関連文書に記載された品質に関する評価項目と分析法の例を概説した．今回取り上げた文書の間では，評価項目については共通点が多いものの，項目によっては対応する分析手法が異なっていたり，複数の分析手法が挙げられていた．これを踏まえ，今後は各分析手法の分析能力，限界，再現性，堅牢性等についてウェット検証を行い，各分析手法をmRNA医薬に適用した際の特性を明らかにするとともに，どのような場面でどの分析手法を用いるのが妥当であるかについて，整理していくことが重要と考える．

以降では，筆者らが実施しているmRNA原薬の品質評価に関する検討（Fig. 3）の一例を紹介し，ウェット研究から明らかになってきた品質評価における留意点と課題について述べる．

4.1　全長mRNA含有率の評価手法

mRNA原薬は翻訳領域のみならず，5′キャップ，3′ポリAなどを含むmRNAとしての完全な構造（完全性）を保持することが目的タンパク質の発現に必

注2：断片化したRNAフラグメント群の塩基配列をIP-RP-HPLC連結MS/MS（タンデム質量分析）により同定し，目的mRNAの塩基配列上にマッピングすることによってmRNAの塩基配列を直接解析する手法．

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

Table 3　mRNAワクチンの承認品目における品質特性項目と分析手法

	項目		試験	分析手法	
				コミナティ筋注	スパイクバックス筋注
特性解析	原薬	一次構造	RNA配列	オリゴヌクレオチドマッピング[a]；次世代シーケンス	塩基配列解析(サンガー法)，オリゴヌクレオチドマッピング[a]，次世代シーケンス
			5′キャップ構造	IP-RP-HPLC-UV/ESI MS[b]	IP-RP-HPLC-UV/ESI MS[b]
			ポリA鎖	IP-RP-HPLC-UV/ESI MS[b]	(非開示)
		高次構造	高次構造	円偏光二色性スペクトル	円偏光二色性スペクトル，示差走査熱量測定
		物理化学的性質		(記載なし)	紫外吸光係数
		生物学的性質		(記載なし)	*In vitro*翻訳，SDS-PAGE，ウェスタンブロット

		試験[c, d]		分析手法		
				生物学的製剤基準	コミナティ筋注	スパイクバックス筋注
規格試験	原薬	確認試験	塩基配列	(記載なし)	RT-PCR	(非開示)
		純度試験	mRNA完全性[d, e] 目的物質由来不純物	キャピラリーゲル電気泳動又はLC	キャピラリーゲル電気泳動	逆相-HPLC
			二本鎖RNA[f]	免疫ブロット[f]	免疫ブロット	(試験なし)
			鋳型DNA[d]	qPCR	qPCR	qPCR
			5′キャップ[d]	LC	逆相-HPLC	逆相-HPLC
			ポリA[d]	PCR又はLC	ddPCR	逆相-HPLC
		含量	mRNA[d]	分光光度計	紫外可視吸光度測定法	(非開示)
	製剤	確認試験	塩基配列[d]	RT-PCR	RT-PCR	(非開示)
			脂質	(記載なし)	HPLC	逆相-HPLC/CAD[g]
		純度試験	mRNA完全性[d] 目的物質由来不純物	キャピラリーゲル電気泳動又はLC	キャピラリーゲル電気泳動	逆相-HPLC
			脂質不純物	(記載なし)	HPLC	逆相-HPLC/CAD
		生物活性		(記載なし)	(非開示)	In vitro翻訳，SDS-PAGE
		封入RNA[d]		蛍光強度又は吸光度	蛍光分析	(非開示)
		粒子径及び多分散性[d]		動的光散乱法	動的光散乱法	動的光散乱法
		含量	mRNA[d]	蛍光強度又はLC	蛍光分析	イオン交換-HPLC
			脂質[d]	HPLC	HPLC	逆相-HPLC/CAD

[a] 分析原理に関しては本文中で記載.
[b] イオンペア-逆相-HPLC-紫外/エレクトロスプレーイオン化質量分析
[c] 性状，pH，エンドトキシン，微生物限度，浸透圧，不溶性異物，不溶性微粒子，採取容量，無菌の項目は表中に記載していない.
[d] 現行の生物学的製剤基準（厚生労働省告示第93号，令和5年3月27日）[5] に記載されている試験を示す.
[e] 本文中における全長mRNA含有率を指す.
[f] 生物学的製剤基準（厚生労働省告示第42号，令和3年2月14日）でのみ記載.
[g] 荷電化粒子検出器

要である．このため，製造工程においてmRNAの末端領域に軽微な分解が生じただけでも薬効の低下につながる可能性があり，全長mRNAの含有率を管理することが重要である．上述のように，国内で承認された二つのmRNAワクチンについても，キャピラリーゲル電気泳動（コミナティ筋注）や逆相-HPLC（スパイクバックス筋注）を用いて全長mRNA含有率の評価が行われている（Table 3）.

全長mRNA含有率の評価に当たっては，軽微な分解が生じたmRNAを全長mRNAと区別して検出する分離条件を設定することが望ましいが，数千塩基に及ぶmRNAをキャピラリーゲル電気泳動やLC

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

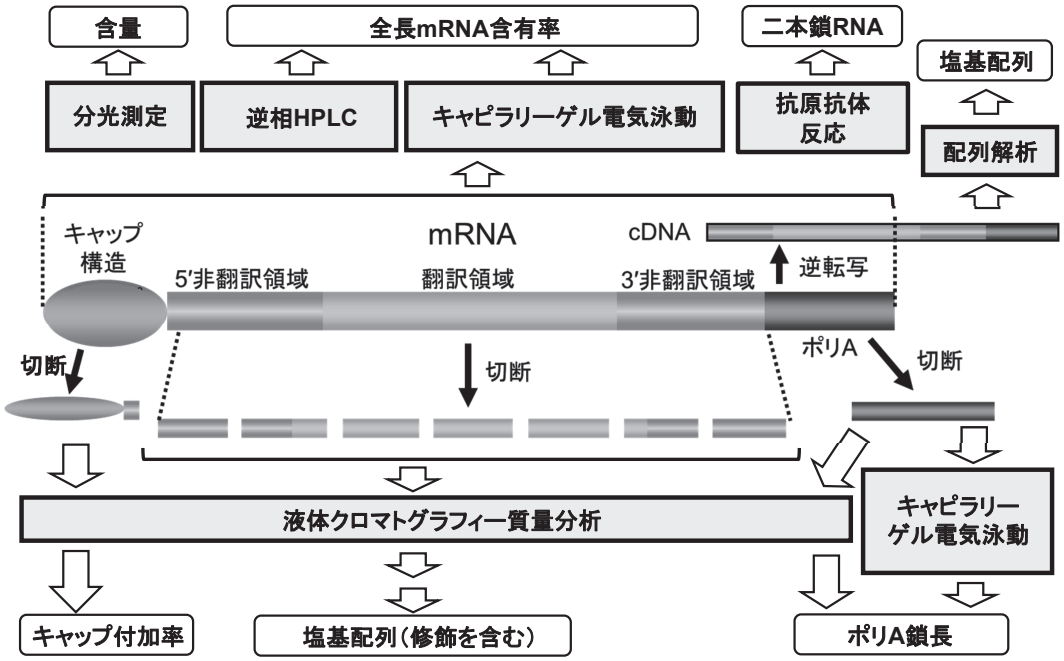

Fig. 3　国立医薬品食品衛生研究所で取り組んでいるmRNA医薬の品質評価法

で分離した事例はほとんどなく，分離条件に影響を及ぼす要因の詳細は不明である．筆者らは，特にキャピラリーゲル電気泳動におけるmRNAの分離に影響を与える分析上のパラメータの整理を進めており，以下にその概要を紹介する．

4.2　キャピラリーゲル電気泳動法によるmRNAの分離に影響を与える因子

キャピラリー電気泳動法は内径100 μm以下のキャピラリー内を電場として，この中を荷電試料が移動することに基づく分析法である．特に分子ふるい効果を持つゲルを充填したキャピラリー内で分離を行う手法をキャピラリーゲル電気泳動法と呼び，核酸を分子量に応じて分離することができる．

以下，キャピラリーゲル電気泳動を用いてmRNAを分離する際に影響を与える分析上の要因について述べる．

4.2.1　分析装置の特性

mRNAの分離分析を目的としたキャピラリー電気泳動装置として，現時点ではFragment Analyzer（アジレント・テクノロジー社）とPA 800 Plus（サイエックス社）が広く用いられており，USPのドラフトにもそれぞれの装置を用いた場合の分析条件が詳細に記載されている[2]．Fragment Analyzerは販売当初より同社のmRNA分析用試薬キット・泳動条件を用いることを前提としてシステムが構築されているため，分離条件の最適化を目的としたカスタマイズには向いていないが，12〜96検体の安定的な同時分析を可能としている．一方で，PA 800 Plusは自作したゲルや試薬が使用可能であることから，多くの分析条件をユーザーが変更できるという特徴があり，分離条件の最適化が可能である．PA 800 Plusは多検体の同時分析には対応していないが，サイエックス社はよりスループット性を高めた機種として，8検体を同時分析可能なBioPhase 8800の販売を開始しており，筆者らも活用している．

以下では，分析条件のカスタマイズに長けたPA 800 Plusを用いて取得したデータを基に，mRNAの分離条件を最適化するうえでの留意点を整理する．

4.2.2　ゲル担体

現時点でmRNA分離に適した標準的なゲル担体は確立されていないが，古くはリボソーマルRNAの分離分析を目的として，直鎖状高分子であるpolyvinylpyrrolidone（PVP）がゲル担体として用いられてきた[8]．USPの品質試験手順書においても，PA 800 Plusを用いた分離条件のゲル担体にPVPが用いられている[2]．また近年では，長鎖RNAの分

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

離を目的とした他のゲル担体も検討されているが[9]，この論文では独自に内部修飾を施したキャピラリーを用いているため，今後市販のキャピラリーを用いて各ゲル担体の特性を検証する必要がある．

4.2.3　ゲル濃度

mRNA試料をキャピラリーゲル電気泳動に供すると，試料に含まれるRNAはキャピラリー内で鎖長に従って分離され，核酸塩基の紫外吸収等に基づきピークとして検出される．市販のRNAラダー（様々な鎖長のRNAの混合物）を用いた筆者らの検討では，ゲル濃度が低い場合には各ピークが近接し分離が不十分になる一方で，ゲル濃度が高すぎる場合には，特に4000塩基長を超える長鎖RNAのピーク幅が広くなり分離能が低下する傾向が認められている．このようなデータを考慮すると，キャピラリーゲル電気泳動法のゲル濃度については，目的mRNAの塩基長付近の分離能が高くなる条件に最適化することが重要である．

4.2.4　変性剤

長鎖の一本鎖核酸であるmRNAは，分子内において部分的に相互作用（非共有結合）することにより多様な高次構造を形成していると考えられる．高次構造の多様性は電気泳動で検出されるピーク幅を広くし，目的mRNAと塩基長がわずかに異なる不純物RNAのピークを分離・検出することを困難にする．尿素等の変性剤は分子内に形成される非共有結合を解離させることにより高次構造をほどき，構造の多様性を低下させる作用を有する．

筆者らの検討では，尿素濃度が不十分な条件では，特に3000塩基以上の長鎖のRNAについてピーク幅が広くなり，分離能が低下する傾向が認められている．このことから，長鎖のmRNAを分離する場合には特に十分量の変性剤を含むゲル溶液を使用することが重要である．

4.2.5　泳動前の熱処理

熱処理はRNA分子内に形成される非共有結合を解離させるため，一本鎖核酸の高次構造の多様性を低下させることができる．このため，電気泳動の前処理として，mRNA試料に熱処理を施すことが分離能の向上に有効である．一方で，RNAは高温により分解が促進されるため，特に長鎖のmRNAに対して熱処理を施す場合には，分解の影響がない条件を検討する必要がある（60～70℃で短時間処理後に急冷する条件が用いられることが多い）．

筆者らの検討では，泳動前に熱処理を行わない場合には，その後，十分な変性剤を含むゲル溶液を用いてキャピラリーゲル電気泳動に供したとしても，長鎖長のRNAのピーク幅が広くなり分離能が低下することを見出している．このことは，mRNAの高次構造の一部は尿素等の変性剤のみでは十分に変性しないことを示しており，熱処理との併用によって分離条件の最適化を図ることが重要と考える．

4.2.6　泳動温度

上述のように，mRNAが形成する高次構造の多様性は加熱により低減させることができることから，電気泳動中の温度も分離に影響すると考えられる．サイエックス社のキャピラリーゲル電気泳動装置（PA 800 Plus及びBioPhase 8800）は，キャピラリー温度を制御することが可能である．そこで，この機能を用いて泳動時の温度を検討したところ，35℃の条件では25℃と比較してより高い分離能を示すことが確認された．このことは，泳動温度の適度な上昇はRNAの分離能の向上に有効であることを示している．

4.3　キャピラリーゲル電気泳動によるmRNAの分離限界

筆者らは，以上の留意点を踏まえ，「キャピラリーゲル電気泳動の各分析パラメータを最適化した条件でmRNAをどこまで分離できるのか」について検証を行っている．具体的には，コミナティ筋注及びスパイクバックス筋注のmRNA原薬の塩基長に近い約4000塩基長のmRNAを用いて検証を行った．その結果，塩基長の約5%にあたる200塩基以上が欠損している場合には分離可能であるが，それより小さい軽微な欠損については評価が難しいことを見出している．

4.4　mRNAの完全性評価における課題

上述のように，mRNA原薬は5′キャップ，翻訳領域及び非翻訳領域，3′ポリAから構成されているため，mRNAの完全性の評価においてはこれらの要素が評価される．キャップ付加率はmRNAの5′末端から20塩基程度の位置を配列特異的に切断して得られたRNA断片をHPLCにより分離し，得られたクロマトグラムにおけるキャップ付加体と

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.

キャップ欠落体のピーク面積比から評価できる[2]．ポリA鎖長に関しては，ポリA以外の領域を消化・精製して得たポリAをLC-MS解析により評価できる[10]．一方で，全長を保持したmRNAに関しては，キャピラリーゲル電気泳動で評価した場合には，例えば全長が4000塩基長程度のmRNAの場合には，200塩基以下の欠損は評価が難しい．

以上の試験で評価可能な配列領域を総合すると，5′末端領域の一部（5′末端から20～200塩基の領域），又は3′末端領域の一部（コミナティ筋注のポリA鎖長を例にすると，3′末端から110～200塩基の領域）の分解により生じる不純物は，いずれの試験でも評価できないことになる（Fig. 4）．

今後，これら各試験法の守備範囲の隙間に当たる領域をカバーできる評価手法の開発が必要と考えられ，一例として，LC-MS/MSを用いたオリゴヌクレオチドマッピング（3.3. を参照）のような網羅的なRNA配列・構造の分析手法が挙げられる[11]．本法に関しては，mRNAをLC-MS/MS解析に適した鎖長に断片化する必要があるが，現時点ではこの断片化工程を十分に制御できていないため，今後最適な断片化工程の確立が必要である．

5. 終わりに

本稿ではmRNA医薬の品質評価を行う際に参考になる文書として，感染症予防用mRNAワクチンに関する三つの規制文書及び本邦で承認された二つのmRNAワクチンの審議結果報告書を挙げ，それらの品質評価に関する記載を概説した．ここで示された品質評価項目とその評価法は感染症を対象とするmRNAワクチンに限定したものではなく，今後，急速な進展が期待される治療用のmRNA医薬においても共通すると考えられる．

また，本稿ではこれらの文書で挙げられている品質評価手法の一例として，キャピラリーゲル電気泳動による全長mRNA含有率の測定法を取り上げ，筆者らのウェット検証から得られた知見の一部を紹介した．キャピラリーゲル電気泳動やHPLCは他のモダリティの品質評価・管理においては，確立された手法として汎用されているが，多様な高次構造を有する長鎖一本鎖核酸であるmRNAを分析対象とする場合には，その特有の物理的化学的性質を考慮した条件検討及び最適化が必要である．

今後，候補となる各分析手法について，それらの分析限界を明らかにするとともに，適切な分析のための留意点を抽出・整理していくことが求められる．また，既存の分析手法に加え，オリゴヌクレオチドマッピングやRNAシーケンスなどの新しい技術を導入した分析手法についても，その特性を踏まえて，十分に検証を行う必要があろう．

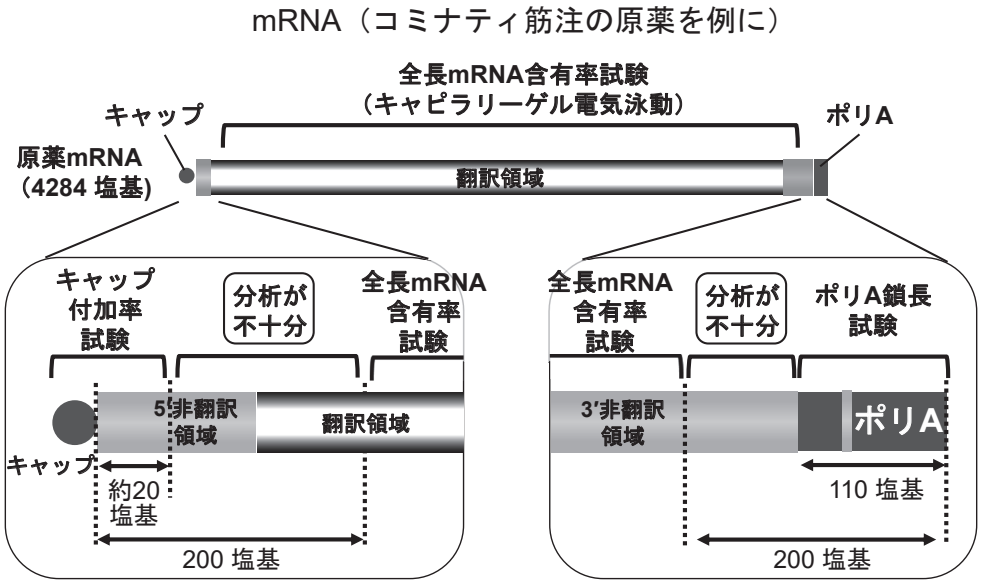

Fig. 4　mRNAに対する各試験法の分析可能領域

本誌掲載記事の無断転載・翻訳を禁止します．また，無断複写・複製は著作権法上の例外を除き禁止されています．

文　献

1）World Health Organization. Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations, Annex 3, WHO Technical Report Series（TRS）, No. 1039, 2022. https://www.who.int/publications/m/item/annex-3-mRNA-vaccines-trs-no-1039（accessed 2023-06-13）.

2）USP. Analytical Procedures for mRNA Vaccines－Draft. https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/usp-nf-notices/mrna-vaccine-chapter.pdf（ドラフト初版）（accessed 2023-06-13）.

3）厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課．審議結果報告書（コミナティ筋注）．令和3年2月12日．https://www.mhlw.go.jp/content/10601000/000739089.pdf（accessed 2023-06-13）.

4）厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課．審議結果報告書（COVID-19ワクチンモデルナ筋注）．令和3年5月20日．https://www.pmda.go.jp/drugs/2021/P20210519003/400256000_30300AMX00266_A100_4.pdf（accessed 2023-06-13）.

5）厚生労働省．生物学的製剤基準，p.52-53．厚生労働省告示第93号，令和5年3月27日．https://www.niid.go.jp/niid/images/qa/seibutuki/seibutsuki_japanese/20230327.pdf（accessed　2023-06-13）.

6）Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality－2nd Edition, Draft guidelines. https://go.usp.org/mRNAVaccineQuality（ドラフト第二版）（accessed 2023-06-13）.

7）Dousis, A.; Ravichandran, K.; Hobert, EM.; Moore, MJ.; Rabideau, AE. An engineered T7 RNA polymerase that produces mRNA free of immunostimulatory byproducts. *Nat. Biotech*. 2023, **41**, p.560-568. doi.org/10.1038/s41587-022-01525-6.

8）Khandurina, J.; Chang, HC.; Wanders, B.; Guttman, A. Automated high-throughput RNA analysis by capillary electrophoresis. *Biotechniques*. 2002, **32**, p.1226-1228. doi: 10.2144/02326bm02.

9）Tian Lu, T.; Klein, LJ.; Ha, S.; Rustandi, RR. High-Resolution capillary electrophoresis separation of large RNA under non-aqueous conditions. *J. Chromatogr. A*. 2020, 1618, 460875. doi: 10.1016/j.chroma.2020.460875.

10）Beverly, M.; Hagen, C.; Slack, O. Poly A tail length analysis of in vitro transcribed mRNA by LC-MS. *Anal. Bioanal. Chem*. 2018, **410**, p.1667-1677. doi: 10.1007/s00216-017-0840-6.

11）Jiang, T.; Yu, N.; Kim, J.; Murgo, JR.; Kissai, M.; Ravichandran, K.; Miracco, EJ.; Presnyak, V.; Hua, S. Oligonucleotide Sequence Mapping of Large Therapeutic mRNAs via Parallel Ribonuclease Digestions and LC-MS/MS. *Anal. Chem*. 2019, **91**, p.8500-8506. doi: 10.1021/acs.analchem.9b01664.

No reproduction or translation of articles in this journal without permission. Moreover, copy or reproduction without permission is prohibited except for exception under copyright laws.