

浸透圧測定によって細胞および遺伝子治療のプロセス開発と製造を改善するための8つのメソッド



Dr. Kristeena Wright, Applications Scientist at Advanced Instruments

Graphical Abstract

なぜ浸透圧なのか？

培養条件と培地選択を最適化することにより、細胞の健全性と密度を最大化し、結果としてウイルス収量を最大限に高める

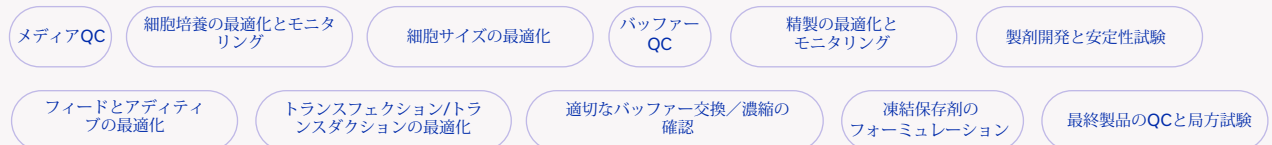
原料の濃度をチェックし、精製・ろ過ステップのインプロセスモニタリングを行い、純度、細胞/ウイルスの安定性、収率の最大化を図る

最終的な組成、投与量、安定性をモニターし、それを確実にする

ワークフロー



活用事例



内容

1. メディアの品質管理 (QC)
2. 培養の拡張とモニタリング
3. トランスフェクション効率と浸透圧ショック
4. ベクターの生産と安定性
5. バッファーのQCと精製
6. 濃縮とバッファー交換
7. プレフォーミュレーションプロセス
8. 最終製品検査

Background

遺伝子治療や細胞治療は、致命的ではないにせよ、しばしば衰弱させる難病の治療に革命をもたらす可能性を持っています。臨床における高い成功率と最近の医薬品承認が、このエキサイティングな治療研究分野への継続的な投資を後押ししており、2019年末時点で臨床試験中の治療法は1000を越えています[1]。臨床における先進的な勢いにもかかわらず、これらの新規薬剤をより多くの患者集団が利用できるようにするためには、解決すべき課題が残されています。現状では、ウイルスベクター生産における下流の回収率は、プロセスにもよりますが、5~30%と低くなっています[2]。製造能力、生産収率、サプライチェーン・ロジスティクスは、患者が安全で手ごろな価格の治療薬を入手できるようにするために、引き続き改善の焦点となる領域です。

1 Advanced Instruments



改善と成功の鍵は、ロバスト性と再現性を確保するために、高品質のプロセス設計とプロセスパラメーターを導入することです。常に製品と工程を管理するために、どのようなツールやチェック項目を導入すればよいのでしょうか？

浸透圧は溶質濃度の尺度であり、長い間バイオファーマ分野で重要な測定法とされてきました[3, 4]。単純な溶液から複雑な溶液まで、浸透圧は温度や圧力に影響されない一貫した貴重な濃度指標であり、バイオプロセスにおいてユニークで有益なパラメータとされています。浸透圧は膜を透過する溶質の移動に直接影響するため[5]、細胞プロセッシングやその後の注入製剤の試験において、浸透圧測定は必須となります。それだけでなく、生物製剤のワークフローにおいてこの試験の用途は数多くあり、細胞治療や遺伝子治療の開発では、さらにエキサイティングなアプリケーションとして恩恵を受けることは間違いありません。ここでは、先進医療における浸透圧試験の新たな8つの用途を以下に概説します。

What Is Osmolality?

浸透圧は、溶質がどれだけ存在するかを表す液体の特性指標です。より複雑な溶液の場合は、全体的な濃度を反映し、臨床およびバイオ医薬品の領域で貴重な測定基準となります。浸透圧は質量の関数としての濃度であり、温度や圧力の影響を受けません。浸透圧は非常に密接に関連しており、バイオ医薬品業界では一般的に、溶媒が溶液中に浸透するのを防ぐのに必要な圧力という観点から溶液濃度を表すのに使用されています。どちらも、浸透圧の特性に関連する溶液の濃度を表すのによく使われます。生物学的製剤製造のための一般的な局法試験として、浸透圧試験は生物学的製剤行程で広く用いられていますが、ここでは、先進治療薬製造における浸透圧試験の8つの新しい用途について概説します。

1. Media Quality Control (QC)

細胞の増殖／拡張と最終的な収量の最適化

細胞培地の浸透圧は、細胞増殖とベクター生産を最適化し維持するためにコントロールされなければなりません。培地ベンダーは、その溶液の浸透圧の範囲を測定し、報告しており、研究者は各培地バッチの浸透圧を仕様に照らし合わせてチェックし、特定の細胞株や細胞種に適切な環境を確保するのが一般的です。後にフラスコやバイオリクターで使用されるにせよ、培地は最適な細胞増殖と拡張を確実にするために、あらかじめ決められた浸透圧の仕様を満たさなければなりません[6]。仕様から外れると、増殖速度や生存可能なHEK 293細胞濃度が低下し、増殖阻害や効果的なベクター生産ができなくなる可能性があることが立証されています[7]。感染時の浸透圧が330mOsmの細胞では、480mOsmの細胞に比べて生産性が最大10倍高いことが示されました。GEヘルスケア・ライフサイエンスのバイオプロセス担当GMであるOliver Loeillot氏によると、医薬品メーカーは既製の培地を購入する傾向にあり、この細胞培養セグメントは2017年に14億ドルと評価され、今後数年間で約8%の成長が予測されています [8]。この伸びは、品質管理がこれまで以上に重要であることを意味します。

この明確なニーズと市場動向は、浸透圧が細胞・遺伝子治療の初期段階において最適な増殖と生産性を確保するための細胞培地の調製に不可欠なパラメーターであることを示しています。

2 Advanced Instruments

2. Culture Expansion and Monitoring

細胞が最適な属性（最適な生産量、サイズ、成長速度）に達するための理想的な環境を整える

浸透圧は、細胞培養モニタリングにおいて重要なプロセスパラメーター（Critical Process Parameter : CPP）としての役割を果たし続けています。細胞による培地基質の消費と排泄物の生成は、動的な浸透圧プロファイルを生み出します。加えて、異なる給餌と補給戦略、および特定のガスレベルを用いたpH制御戦略は、浸透圧に異なる影響をもたらします[7, 9]。

浸透圧は、乳酸産生（pHに影響される）と培地塩基添加の重要な指標であり、最終的には細胞培養におけるグリコシル化に影響を与えることが知られています。幹細胞の培養条件を設定する際、細胞の生存能や生産性といった重要な品質特性（critical quality attributes : CQA）を最適に保つために、浸透圧が重要であることは多くの文献で示されています。浸透圧を高くすることで、老廃物の比生産率を高めたり、細胞の成長を遅らせて生産性を最大化したりすることができます[10, 11]。

ある研究では、450mOsmの無血清培地での軟骨細胞の増殖率が、400mOsmのそれよりも0.65倍生産性が低いという結果が出ています [12]。全体的な増殖は、290~350mOsmの培地が最適と判断されました。この具体的な浸透圧の範囲は、前述の戦略を念頭に置きながら、培養と増殖のたびに設定しなければなりません。浸透圧をモニタリングしないと、上流工程や最終的な医薬品のCQAが損なわれる可能性があります。

3. Transfection Efficiency and Osmotic Shock

安定したトランスフェクション・システムを確立し、最適な細胞力価を得る

高いウイルス力価を得るためには、高いトランスフェクション効率を達成することが重要ですが、遺伝子治療の開発では、トランスフェクション効率が劣ることがよくあります。トランスフェクションの方法にかかわらず、プラスミドで細胞をトランスフェクションしてウイルス産生を開始する際には、浸透圧が重要なポイントとなります。HEK293細胞は非常にトランスフェクションしやすく、その有効性が知られているため、ポリエチレンイミン(PEI)を介したトランスフェクションが一般的です。多くの理論では、浸透圧は内在化したPEI:DNA複合体の安定性に関与していると考えられています。PEI:DNA複合体のその場での複合化速度やダイナミクスは、浸透圧を含む多くのパラメータに依存するとされています[13]。

複合プロトンが輸送エンドソームに入ることによって浸透圧が上昇し、DNAが放出されて標的細胞に送達されるという仮説に基づいています。これは、他の変数とともに、信頼性が高く再現性のある方法を確立するために、プロセス開発の初期段階で考慮し、特徴づける必要があります細胞治療や遺伝子治療の分野ではあまり進展していませんが、浸透圧が、イムノポレーション[14]やエレクトロポレーション[15,16]などの様々なシステムにおいて、効果的なトランスフェクションにおける主要な因子であることを示唆する証拠があります。浸透圧は、緩衝液が細胞膜を通過する能力に影響します。そのため、培地やトランスフェクション・カクテルの浸透圧に関する仕様を設定することは極めて重要です。トランスフェクションされる細胞の安定性と透過性を考慮すると、微妙なバランスが必要となります。同じことが、細胞関連アデノ随伴ウイルス(AAV)の放出を目的とする細胞溶解時にも適用することができます。浸透圧ショックは、その名の通り、細胞環境の浸透圧に大きく依存し、遺伝物質にアクセスする方法の一つです。高塩濃度（高浸透圧）でのインキュベーションは、ウイルスゲノムを露出させることができる反面、ダメージを与える可能性もはらんでいます[17]。繰り返しになりますが、制御された再現性のあるプロセスを開発するためには、浸透圧の厳密な仕様範囲を設定することが不可欠です。このような初期の上流工程管理は、最適な力価と最終的な収量を確保するために確立されます。

4. Vector Production and Stability

ベクターの安定性を最大化するために、膜の組成と構造に影響を与える

高いウイルスベクター力価はベクターの安定性に大きく依存しますが、レトロウイルス（およびレンチウイルスのサブセット）では、エンベロープタンパク質が散在する脂質二重層からなる外側のエンベロープによって、この安定性が本質的に損なわれています。

ベクターの安定性、特にエンベロープ型ベクターの安定性は、培地の浸透圧が高いほど向上するという考えを支持するエビデンスがあります[18]。RVベクターを作製するためにハエの細胞株を用いた一連の研究では、細胞培地の浸透圧が高いと、ウイルス膜のコレステロール対リン脂質の比率が低くなり、ベクターの安定性が向上することが示されています[19]。膜脂質の産生は、細胞の糖代謝に大きく影響されます。Amaralらは、糖代謝の亢進と、その結果生じる培地の浸透圧の上昇（ソルビトールの存在による）が、レトロウイルスの安定性と生産性に正の相関があることを発見しました [18, 20]。このエビデンスは、安定したレトロウイルスが確立された培地の浸透圧に大きく依存していることを強く示唆しています。培地と緩衝液の浸透圧の仕様は、ベクターの生産と安定性に対するこれらの影響を考慮する必要があります。

5. Buffer QC and Purification

下流のバッファーとインプロセス精製を包括的に制御する

我々は最近、浸透圧をpHや導電率と並ぶ、下流緩衝液の直交特性として解説しました [21]。これらのバッファーにおける組成の問題や逸脱を特定できなければ、プロセスや製品の逸脱につながる可能性があります。浸透圧試験は、バッファーQC中及び精製中のインプロセスパラメーターとして実施されるべきだと思われます。これは、下流工程における工程内試験にも適用されます。最近の発表では、UV吸光度と組み合わせ、精製中のタンパク質濃度の予測因子としての浸透圧について述べられています[22]。これは、より多くの時間と技術的専門知識を必要とする標準的な濃度測定法に代わる、迅速で正確な予測測定を提供するものです。不純物の早期同定は、操作コストと最終的な製品収量を節約することにつながります。これが遺伝子治療製造のワークフローにどのように反映されるかは未知数であるが、下流工程における直交パラメータとしての浸透圧の役割は、貴重なツールとして浮上して来ています。

6. Concentration and Buffer Exchange

高い過回収率をサポートし、高い製品生産量を実現

細胞治療や遺伝子治療における限外ろ過/透析ろ過（UF/DF）は、タンジェンシャルフローろ過（TFF）に依存しており、高度な治療法は非常に繊細であるため、様々なアプリケーションにおいて有利であることが証明されています [2]。ウイルス、特にレンチウイルス(LV)はmAbsよりはるかに大きいため、高い回収率と一貫したプロセス性能を得ることは困難です。さらに、製剤中のウイルスベクターを高濃度にするには、エンベロープウイルス（レトロウイルス）や非エンベロープウイルス（AAV）の凝集につながります[2]。凝集は特にエンベロープ・ウイルスは外壁が粘着性を持つ傾向があります。ろ過操作は、大きなエンベロープウイルスの膜を傷つけ、ベクターの安定性と形質導入効率に大きな影響を与える可能性があります[23]。浸透圧は、AAVの凝集の可能性を減らす上でも重要な役割を果たし、AAV2ベクターの蓄積を防ぐ賦形剤のレベルをチェックするために使用されています[24]。UF/DFは、細胞治療や遺伝子治療のワークフローにおける緩衝液交換にも使用されます。浸透圧試験は、このような交換の効率と完了を確認するのに役立ちます。一般的なバッファー成分の特性により、導電率やpHメーターは、スタートマトリックスと最終製剤バッファー間の差異を捉える分解能を持たない場合があります。我々は、浸透圧がこのような状況で直交する値を提供することを明らかにしました [21]。浸透圧は、溶質が膜を通過する能力を表すため、ろ過プロセス中の溶液を包括的に把握するために必要不可欠なものです。

浸透圧は、AAVの凝集の可能性を低減する上でも重要な役割を果たし、AAV2ベクターの蓄積を防ぐ賦形剤のレベルをチェックするために使用されています[24]。

4 Advanced Instruments

7. Pre-formulation Processing

製剤への最終ろ過段階における製品の力価および安定性の最適化

浸透圧試験は、最終製剤のバッファーの出荷規格として一般的に使用されており、細胞・遺伝子治療製品は非常にデリケートであるため、その管理には厳密さが要求されます。浸透圧については、さらなる検討が必要な、より新しい可能性も考えられます。上述したように、LVの無菌ろ過は、回収率の低さ [2]のために、最終的なろ過や薬剤の製剤化に影響を与えるという難点があることが知られています。浸透圧が高いほど不要な溶質や不純物が含まれている可能性があるため、浸透圧は最終工程や最終製品の純度や安全性の指標となりえます。

これは、最終的な無菌ろ過を行わないウイルス処理に特に有用です[25]。さらに、浸透圧はウイルスの流体力学的半径に関与し、製剤開発チームがさらなるろ過ステップのために分子量カットオフを最適化するのに役立つ可能性があります。ウイルスの特性における浸透圧と浸透圧の役割[26]は、他の細胞タイプのエビデンス[27]とともに、この応用に期待できません。浸透圧のような変数が、 $0.45\mu\text{m}$ または $0.22\mu\text{m}$ のフィルターを通したLVの濾過性に影響することを示す追加研究が完了すれば、これは興味深いものになるかもしれません。製剤前の原薬の浸透圧がそのろ過と回収に影響を与えるという明確な証拠があり、その特性を明らかにすることで、高品質の製剤を提供するために必要な制御が可能になる可能性があります。



8. Final Product Testing

CQAの最適化による高品質医薬品のプロモーション

浸透圧試験は、長い間、生物学的製剤（FDA）リリースのための包括的測定とみなされてきました。細胞が出発点であり終着点である細胞治療に、このことはどのように反映されるのでしょうか？細胞のバンキングと増殖について具体的に論じる場合、最適な同一性、安全性、純度、安定性を促進するために、包括的な試験プラットフォームが必要とされています[28]。これらのCQAは、薬剤の中間体や製品を保存するために細胞を凍結保存する際にも維持・保護されなければなりません[29]。凍結に先立ち、接着細胞を損傷させることなくきれいに剥離する必要があります。

解離剤の浸透圧が、剥離する細胞凝集塊の大きさに影響するという仮説を支持するエビデンスが示されています[6]。凍結／融解サイクルは細胞の安定性と回復に有害であるため、凍結保存剤（図1のようなもの）は、バイオプロセス全体を通して細胞の品質と重要な品質特性の保持を確実にするために、浸透圧の基準を満たす必要があります。最近、凝固点降下浸透圧計を用いて、様々な自家製および市販の凍結保存剤の浸透圧を調べる研究が実施されました。

5 Advanced Instruments

	CryoStor 55	Trehalose	Glycerol	PEG/DMSO 1	PEG/DMSO 2
Trehalose Solution Base DMEM media 10% DMSO 10% FBS 50mM trehalose					
Glycerol Solution Base DMEM media 10% glycerol					
PEG and DMSO (1) Base DMEM media 7.5% DMSO 2.5 PEG 2% BSA					
PEG and DMSO (2) Base DMEM media 7.5% PEG 2.5% DMSO 2% BSA					
MEAN	1410	2122	2083	1318	1117
STD DEV	4.10	4.10	5.10	1.30	1.80
%CV	0.29	0.20	0.25	0.10	0.16

Figure 1. 細胞治療および遺伝子治療における一般的な凍結保存剤のレシピと浸透圧。凝固点降下浸透圧計を用いた様々な凍結保存液の浸透圧試験 (n=5) の要約データを示す。高濃度とDMSOのインテグレーションにもかかわらず、浸透圧テストは健全な信頼性と再現性を示した。CV、変動係数；PEG、ポリエチレングリコール；DMSO、ジメチルスルホキシド

当然のことながら、凍結保護剤を導入して細胞を凍結させることは、その浸透圧にかなりの影響を与え [30-32]、このプロセスを繰り返すことはますます複雑になっていきます。凍結前に凍結保存液の浸透圧を調べることで、その組成が正しいことが確認され、今後の保存工程に信頼性がもたらされます。保存は、細胞バンキングから注射のための臨床環境への輸送に至るまで、治療開発の様々な段階で重要な意味を持ててきます (Figure 2)。従って、凍結保存特性を確実にし、製品のCQAを保護するために、ワークフロー全体を通してこれらの段階で浸透圧試験を実施することが必要となります。

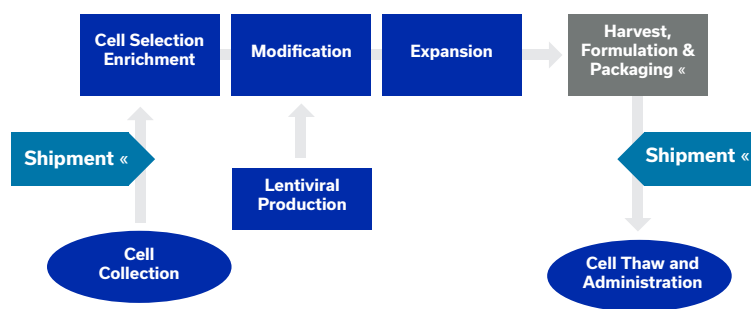


Figure 2. 細胞ベースの遺伝子治療の一般的なワークフロー。凍結保存の適応は«で示されている。

Conclusion

細胞・遺伝子治療開発の成功は、再現性やスケールアップに関するプロセス管理の精度に大きく左右されます。この分野が成熟するにつれて、製品の品質と同様に、これらの品質に対する期待が高まるため、規制機関からの監視の目が厳しくなることは間違いありません。医薬品開発者は、プロセス性能の低さという障害を克服しなければなりません。堅牢なプロセス管理戦略の必要性が高まるにつれ、信頼性の高い正確なパラメータが要求されますが、浸透圧試験はその要求に適合します。浸透圧試験は、バイオプロセス全体の溶液に対して、信頼性が高く正確な濃度測定を提供します。この迅速で簡便な試験のいくつかの応用例をここに概説しましたが、この分野が成長し続けるにつれて、さらに多くのことが明らかになると期待されています。浸透圧とウイルスベクター開発に関する過去の研究は、ここに示したように重要なものでありながら、なぜ浸透圧を各段階で測定しなければならないかという話には、以前はなっていませんでした。このようなテーマが支持されるにつれ、浸透圧を主要なCQAと結びつけることに一貫した関心が寄せられてきました。最適な収量、純度、安定性をサポートするこのパラメーターの能力は十分に確立されており、あらゆる先進治療ラボでの実施をサポートしています。浸透圧計の技術と能力の進歩は、バイオプロセスにおける浸透圧試験の継続的な増加につながるものと期待されます。細胞治療と遺伝子治療は短期間で大きな進歩を遂げ、製造ワークフローを一貫して改善する方法を特定することが望まれています。浸透圧は、バイオプロセスの信頼性を高める1つだけでなく、8つの方法を提供します。

References

1. Medicine, A.f.R. ARM Annual Report & Sector Year in Review: 2019. Advancing Gene, Cell, & Tissue-Based Therapies 2020 [cited 2020 Mar 15].
2. Forsberg, N.e.a. Key Considerations in Gene Therapy Manufacturing for Commercialization. 2018.
3. Osmolality and Osmolarity. 2017, US Pharmacopeia.
4. Osmolality. European Pharmacopeia.
5. Sweeney, T.E. and C.A. Beuchat, Limitations of methods of osmometry: measuring the osmolality of biological fluids. *Am J Physiol*, 1993. 264(3 Pt 2): p. R469-80.
6. Nie, Y., et al., Scalable passaging of adherent human pluripotent stem cells. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e88012.
7. Ferreira, T.B., et al., Two different serum-free media and osmolality effect upon human 293 cell growth and adenovirus production. *Biotechnol Lett*, 2005. 27(22): p. 1809-13.
8. Stanton, D., Multi-Media Player: GE Invests in EU and US Plants to Tap \$1.4bn Market. 2018, Biopharm Intl.
9. Gilbert, A., Y. Huang, and T. Ryll, Identifying and eliminating cell culture process variability. *Pharm. Bioprocess.*, 2014. 2(6): p. 519-534.
10. Bohnenkamp, H., U. Hilbert, and T. Noll, Bioprocess development for the cultivation of human T-lymphocytes in a clinical scale. *Cytotechnology*, 2002. 38(1-3): p. 135-45.
11. Potocar, U., et al., Adipose-Derived Stem Cells Respond to Increased Osmolarities. *PLoS One*, 2016. 11(10): p. e0163870.
12. Koo, J., et al., Controlling medium osmolality improves the expansion of human articular chondrocytes in serum-free media. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010. 16(5): p. 957-63.
13. Gutierrez-Granados, S., et al., Advancements in mammalian cell transient gene expression (TGE) technology for accelerated production of biologics. *Crit Rev Biotechnol*, 2018. 38(6): p. 918-940.
14. Tzavelas, C., et al., Effect of osmolarity and presence of serum on the efficiency of cell transfection using immunoporation. *Anal Cell Pathol*, 2001. 22(4): p. 223-7.
15. Golzio, M., et al., Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys J*, 1998. 74(6): p. 3015-22.
16. van den Hoff, M.J., et al., The osmolality of the electroporation medium affects the transient expression of genes. *Nucleic Acids Res*, 1990. 18(21): p. 6464.
17. Cordova, A., et al., Osmotic shock and the strength of viral capsids. *Biophys J*, 2003. 85(1): p. 70-4.
18. Coroadinha, A.S., et al., Effect of osmotic pressure on the production of retroviral vectors: Enhancement in vector stability. *Biotechnol Bioeng*, 2006. 94(2): p. 322-9.
19. Rodrigues, A., P.M. Alves, and A.S. Coroadinha, Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus, in *Viral Gene Therapy*, K. Xu, Editor. 2011, Intech. p. 15-40.
20. Amaral, A.I., et al., Improving retroviral vectors production: role of carbon sources in lipid biosynthesis. *J Biotechnol*, 2008. 138(3-4): p. 57-66.
21. Wright, K., Osmolality as a concentration measurement method for key buffers in bioprocessing. 2019, Advanced Instruments.
22. Felfodi, E., et al., Osmolality is a predictor for model-based real time monitoring of concentration in protein chromatography. *Journal of Chem Tech & Biotech*, 2019.
23. Morenweiser, R., Downstream processing of viral vectors and vaccines. *Gene Ther*, 2005. 12 Suppl 1: p. S103-10.
24. Wright, J., et al., Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation. *Molecular Therapy*, 2005. 12(1): p. 171-178.
25. Moleirinho, M.G., et al., Current challenges in biotherapeutic particles manufacturing. *Expert Opin Biol Ther*, 2020. 20(5): p. 451-465.
26. Choi, H.J., et al., Effect of Osmotic Pressure on the Stability of Whole Inactivated Influenza Vaccine for Coating on Microneedles. *PLoS One*, 2015. 10(7): p. e0134431.
27. Rosinski, M., S. Reid, and L.K. Nielsen, Osmolarity effects on observed insect cell size after baculovirus infection are avoided using growth medium for sample dilution. *Biotechnol Prog*, 2000. 16(5): p. 782-5.
28. Armstrong, A., Advances in Assay Technologies for CAR T-Cell Therapies. *Biopharm Intl*, 2016. 28(2): p. 32-37.
29. Rafiq, Q., et al. The role of biopreservation in cell and gene therapy bioprocessing. *Cell & Gene Therapy Insights*, 2017. 332-344 DOI: DOI: 10.18609/cgti.2017.037.
30. Casula, E., et al., Osmotic behaviour of human mesenchymal stem cells: Implications for cryopreservation. *PLoS One*, 2017. 12(9): p. e0184180.
31. Li, Y. and T. Ma, Bioprocessing of cryopreservation for large-scale banking of human pluripotent stem cells. *Biores Open Access*, 2012. 1(5): p. 205-14.
32. Petrenko, Y., et al., Clinically Relevant Solution for the Hypothermic Storage and Transportation of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int*, 2019. 2019: p. 5909524.

輸入販売元

 **KIKO-TECH**
キコーテック株式会社 事業開発部

本社 大阪府箕面市船場西三丁目10番3号
〒562-0036 TEL 072(730)6790 FAX 072(730)6795
東京支社 神奈川県川崎市中原区新丸子東三丁目1200番地 KDX武蔵小杉ビル
〒211-0004 TEL 044(430)3245 FAX 044(433)4390

<https://www.kiko-tech.co.jp/>

