

## E. 結論

本研究により以下の成果を得た。

1) 一般原則として5項目を提示した。  
2) 製品の製造方法&品質(試験・評価・管理) MCP 項目として、①原材料となる細胞・組織とその特性解析、特性指標の把握、適格性、②その他の原材料、製造関連物質の適格性と品質管理(特に生物由来物質、複合製品の非細胞・組織成分等)、③微生物、とくにウイルス安全性、④製造工程の妥当性、一定性、⑤最終製品の品質管理、⑥安定性(貯法・有効期限設定、凍結/解凍、運搬する場合等)、⑦製品レベルと製法レベルでの適切な組合せによる品質管理を挙げ、それぞれについてさらに詳細な留意事項や技術要素を提示した。  
3) 非臨床安全性試験についてはケース・バイ・ケースが原則であるものの、概念として関係者が共有すべき MCP として4項目、技術的な観点で関係者が共有すべき MCP あるいは留意点として6項目を提示した。  
4) 非臨床有効性(POC)試験に関しては必然的にケース・バイ・ケースが原則であるものの、概念として関係者が共有すべき MCP として3項目を提示した。  
5) 臨床試験については、個々の製品に関する臨床試験の技術要件自体は、まさにケース・バイ・ケースで扱われるべきものであるが、先端医療である再生医療を適正に推進するための臨床試験の入り口に至るまでと開始に至る隘路を解消し、科学的合理性、倫理的妥当性、社会的理解、認知をいかに得るかについて検討した。検討内容は、①臨床試験開始の決定に際してのリスク分析の留意点と倫理、②先端医療としての再生医療のリスク・ベネフィット概念、③先端医療としての再生医療のリスク・ベネフィット概念などであった。  
6) 細胞種別 MCP と上乗せ方策については、「自己又は同種体性幹細胞」、「自己又

は同種 iPS (様) 細胞」、「ES 細胞」すべての細胞種間に通底し適用されるべき MCP とカテゴリーを同じくする細胞種内での MCP あるいは上乗せ分について検討した。  
7) 細胞バンクの概念と技術要件 MCP を提示した。  
8) 個別細胞特性解析、品質評価・管理、未分化細胞等混在細胞検出、目的細胞精製(又は目的外細胞除去)技術等、品質・安全性確保等すべてに渡って分析法が必須であり、産・学・官が共通に参照でき活用できる評価技術としてのコンセンサス・パッケージを策定することの意義、重要性に鑑み、普遍的な新規細胞解析技術開発例として網羅的糖鎖プロファイリング法を開発し、その有用性と適用可能性について検討した。  
9) ウイルス安全性 MCP として5項目を提示した。  
10) 造腫瘍性問題を、「品質:細胞特性問題」及び「安全性問題」面から、「安全性問題」には品質面(*in vitro*)からのアプローチと生物学的な面(*in vivo*)からのアプローチがあると整理して、MCP と上乗せにかかわるコンセプト及び評価技術要素を提示した。  
11) 抗原性に対処する MCP は製造関連物質から極力ヒトへの抗原性を示す可能性のある物質を用いないか、あるいは製造工程中で懸念ある物質を可能な限り除去すること、そのモニターを確実にすべきことを論考した。  
12) リスク評価によるケース・バイ・ケースアプローチでケース別/開発段階別上乗せ評価方策を例示的に策定し、提示した。  
13) 関連指針の相互比較からみたヒト細胞・組織加工製品(ヒト細胞調製品)の臨床研究と薬事開発に共通して参照可能な品質・安全性確保の技術要件の抽出・同定およびリスク・ベース・アプローチに基づいたケース別上乗せ評価方策に関する考察を行った。  
14) 再生医療製品にかかわる国際動向を調査研究し、MCP 等策定

のための参考とした。

#### <参考資料>

1. 「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成 18 年 7 月 3 日、全部改正平成 22 年 11 月 1 日、厚生労働省告示第 380 号)
2. 細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方(厚生省医薬安全局長通知平成 12 年 12 月 26 日医薬発第 1314 号別添 1, 一部改訂平成 19 年 3 月 30 日薬食発 0330030 号)
3. 「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について」(厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知 薬食監麻発 0327025 号, 平成 20 年 3 月 27 日)
4. 「ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」(厚生労働省医薬食品局長通知 薬食発第 0208003 号, 平成 20 年 2 月 8 日)(以下<自己指針>と略す)
5. 「ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」(厚生労働省医薬食品局長通知 薬食発第 0912006 号, 平成 20 年 9 月 12 日)(以下<同種指針>と略す)
6. 「ヒト組織を利用する医療行為の倫理的問題に関するガイドライン」(日本組織移植学会, 平成 20 年 8 月 23 日改訂)(以下<組織移植学会 GL>と略す)
7. 「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」(厚生労働省令第 68 号, 平成 21 年 3 月 31 日改

正)(以下<GCP 省令>と略す)

8. 「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について」(厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知 薬食監麻発 0327025 号, 平成 20 年 3 月 27 日)(以下<自己 GMP>と略す)

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(著書)

1. Hayakawa T, Ishii-Watabe A: Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity. *Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals: Practical and Applied Considerations* (ed. by Michael G. Tovey), pp.57-72 (2011) John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA
2. 早川堯夫: バイオ医薬品開発の主流を占める糖タンパク質. バイオ医薬品開発における糖鎖技術(早川堯夫、掛樋一晃、平林淳監修)、pp. 00 (2011)、シーエムシー出版、東京.
3. 早川堯夫: 後続タンパク質性バイオ医薬品の CMC のポイント. バイオシミラー・バイオベターの開発・事業化 支援マニュアル、pp. 47-81 (2011)、技術情報協会、東京.
4. 早川堯夫: タンパク質性バイオ医薬品開発の現状とこれから. バイオ医薬品の処方設計と開発技術(森下真莉子監修)、pp. 1-14 (2011)、シーエムシー出版、東京.
5. 早川堯夫: 医薬品等の製造とウイルス安全性確認の基本的考え方. 医薬品の品質管理とウイルス安全性(日本医薬品等ウイ

- ルス安全性研究会編)、pp. 30-41 (2011)、文光堂、東京。
6. 宮崎隆道、末盛博文 ヒトES細胞の維持培養方法 細胞工学別冊「細胞培養プロトコール」学研メディカル秀潤社編、学研メディカル秀潤社 2012 (印刷中)
- (論文：英文)
7. Yagi Y, Yamamoto S, Takehi K, Hayakawa T, Ohyama Y, Suzuki S. Application of partial-filling capillary electrophoresis using lectins and glycosidases for the characterization of oligosaccharides in a therapeutic antibody. *Electrophoresis*. 32(21):2979-85 (2011)
  8. Yamada K, Mitsui Y, Kakoi N, Kinoshita M, Hayakawa T, Takehi K:One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans. *Anal. Biochem.*, 2011 Dec 14. [Epub ahead of print], PMID: 22212498 [PubMed as supplied by publisher]
  9. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, Nonaka A, Sakurai F, Hayakawa T, Kusuda Furue M, Mizuguchi H. Efficient Generation of Functional Hepatocytes From Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 $\alpha$  Transduction. *Mol Ther.* 20(1) 127-137 (2012)
  10. Tashiro K, Kawabata K, Omori M, Yamaguchi T, Sakurai F, Katayama K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. *Stem Cell Res.* 2011 Sep 16. [Epub ahead of print]
  11. Oyama T, Yodohsi M, Yamane A, Takehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 879(27), 2928-34 (2011)
  12. Saga A, Okura H, Soeda M, Tani J, Fumimoto Y, Komoda H, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Daimon T, Hayakawa T, Matsuyama A. HMG-CoA reductase inhibitor augments the serum total cholesterol-lowering effect of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells in hyperlipidemic homozygous Watanabe rabbits. *Biochem Biophys Res Commun.* 412(1), 50-4 (2011)
  13. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Tashiro K, Katayama K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One.* 2011, 6(7):e21780.
  14. Yamamoto S, Shinohara C, Fukushima E, Takehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Partial-filling affinity capillary electrophoresis of glycoprotein oligosaccharides derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfon

- ic acid. *J Chromatogr A*, 218(29):, 4772-8 (2011)
15. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y: AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis from pluripotent embryonic cells. *Biochem J*, 437(2), 345-55(2011)
  16. Yodoshi M, Oyama T, Masaki K, Takehi K, Hayakawa T, Suzuki S.: Affinity entrapment of oligosaccharides and glycopeptides using free lectin solution. *Anal Sci*, 2011;27(4):395.
  17. Suzuki T, Sasaki T, Yano K, Sakurai F, Kawabata K, Kondoh M, Hayakawa T, Yagi K, Mizuguchi H. Development of a recombinant adenovirus vector production system free of replication-competent adenovirus by utilizing a packaging size limit of the viral genome. *Virus Res.*,158(1-2),154-60 (2011)
  18. Sugio K, Sakurai F, Katayama K, Tashiro K, Ma H, Kawabata K, Kawase A, Iwaki M, Hayakawa T, Fujiwara T, Mizuguchi H. Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences. *Clin Cancer Res.*, 17(9), 2807-18(2011)
  19. Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Takehi K. Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Biomed Chromatogr.* 2011. 25(5):588-93
  20. Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.*, 19(2), 400-7(2011)
  21. Okura H, Saga A, Fumimoto Y, Soeda M, Moriyama M, Moriyama H, Nagai K, Lee CM, Yamashita S, Ichinose A, Hayakawa T, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Tissue Eng Part C Methods.*, 17(2), 145-54(2011)
  22. Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T, Hayakawa H., Furue MK., Mizuguchi H. Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using Type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials*, (in press).
  23. Egli D, Akutsu H. Aging of the Female Reproductive System. *J Mamm Ova Res* 2011; 28: 118-125.
  24. Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H,

- Umezawa A. Beta-catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports* 2011; Article number: 68.
25. Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Reprogram*. 2011;13(4):361-370.
  26. Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A, Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem*. 2011; 286(23):20345-20353.
  27. Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet*. 2011; 7(5):e1002085.
  28. Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol*. 2011;11:22.
  29. Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*. 2011; 286(13):11593-11603.
  30. Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2012 Mar 8;3(2):8.
  31. Yamada K, Mitsui Y, Kakoi N, Kinoshita M, Hayakawa T, Takehi K. One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans. *Anal Biochem*. 2012 Feb 15;421(2):595-606. Epub 201
  32. Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, Jian Z, Saiki S, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, Iwamoto T, Hirano K, Inoue R, Kurose H. Cilostazol Suppresses Angiotensin II-induced Vasoconstriction via Protein Kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31:2278-86.
  33. Nishida M, Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H. TRPC3-mediated Ca<sup>2+</sup> influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;409:108-13.
  34. Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A,

- Yoshida S, Matsusaka K, Midorikawa Y, Ishikawa S, Soejima H, Fukayama M, Suemori H, Nakatsuji N, Kume S, Aburatani H. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. *Hum Mol Genet.* 2011 Jul 15;20(14):2710-21.
35. International Stem Cell Initiative, Suemori H., et al., Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol.* 2011 Nov 27;29(12):1132-1144.
36. Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One.* 2011;6(7):e22261
- (論文：和文)
37. 早川堯夫、水口裕之：iPS細胞と創薬、*Brain and Nerve* 64、47-57 (2012)
38. 早川堯夫：ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する2つの指針案。医学のあゆみ、239(14)、1466-1473 (2011)
39. 早川堯夫：ICH について。 *Drug Delivery System*, 26(5), 515-520 (2011)
40. 早川堯夫：再生医療推進のための規制環境の整備。医薬ジャーナル、10 (2011)
41. 早川堯夫、青井貴之、梅澤明弘、山中伸弥、小澤敬也、大和雅之、澤 芳樹、松山晃文、佐藤陽治：ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究 (その1) ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工
- 医薬品等の品質・安全性確保に関する指針整備と主なポイント。再生医療、10(3)、86-90 (2011)
42. 早川堯夫、青井貴之、梅澤明弘、小澤敬也、佐藤陽治、澤 芳樹、松山晃文、大和雅之、山中伸弥：ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究 (その2) ヒト (自己) 体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (案) - 総則、原材料及び製造関連物質、製造工程に関する留意事項について -。再生医療、10(3)、91-98 (2011)
43. 早川堯夫、青井貴之、梅澤明弘、小澤敬也、佐藤陽治、澤 芳樹、松山晃文、大和雅之、山中伸弥：ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究 (その3) ヒト (同種) 体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (案) - 総則、原材料及び製造関連物質、製造工程に関する留意事項について -。再生医療、10(3)、99-106 (2011)
44. 早川堯夫、青井貴之、梅澤明弘、小澤敬也、佐藤陽治、澤 芳樹、松山晃文、大和雅之、山中伸弥：ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究 (その4) ヒト (自己) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (案) - 総則、原材料及び製造関連物質、製造工程に関する留意事項について -。再生医療、10(3)、107-117 (2011)
45. 早川堯夫、青井貴之、梅澤明弘、小澤敬也、佐藤陽治、澤 芳樹、松山晃文、大和雅之、山中伸弥：ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究 (その5) ヒト (同種) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (案) -

- 総則、原材料及び製造関連物質、製造工程に関する留意事項について。再生医療、10(3), 118-128 (2011)
46. 早川堯夫、青井貴之、梅澤明弘、小澤敬也、佐藤陽治、澤 芳樹、松山晃文、大和雅之、山中伸弥：ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究（その6）ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）－総則、原材料及び製造関連物質、製造工程に関する留意事項について。再生医療、10(3), 129-140 (2011)
  47. 早川堯夫、青井貴之、梅澤明弘、小澤敬也、佐藤陽治、澤 芳樹、松山晃文、大和雅之、山中伸弥：ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究（その7）ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）－ヒト体性幹細胞、iPS（様）細胞又はES細胞を加工して製造される医薬品等（ヒト幹細胞加工医薬品等）の最終製品の品質管理。再生医療、10(3), 141-146 (2011)
  48. 早川堯夫、青井貴之、梅澤明弘、小澤敬也、佐藤陽治、澤 芳樹、松山晃文、大和雅之、山中伸弥：ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究（その8）ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）－ヒト体性幹細胞、iPS（様）細胞又はES細胞を加工して製造される医薬品等（ヒト幹細胞加工医薬品等）の非臨床試験及び臨床試験について。再生医療、10(3), 147-152 (2011)
  49. 早川堯夫：第十六改正日本薬局方について。日本薬局方試験法ガイド（医薬品医療機器レギュラトリー財団編）、pp. 3-13 (2011)、じほう、東京。
  50. 早川堯夫：後続タンパク質性医薬品の課題と展望。透析療法ネクスト XI 巻 95-107 (2011)
  51. 早川堯夫：第十六改正日本薬局方について。Phar. Tech. Japan., 27(8)、7-14(2011)
  52. 佐藤陽治、鈴木和博、早川堯夫：EUにおける細胞・組織加工製品の規制動向、医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス、42、142-8 (2011)
  53. 阿久津英憲、草川森士、梅澤明弘：「ヒトES細胞を用いた臨床試験」感染・炎症・免疫、41(4):68-72, 2011.
  54. 阿久津英憲、佐藤星子：「ヒトES細胞、iPS細胞」生命の誕生に向けて（第二版）編集；日本哺乳類動物卵子学会：268-272, 2011.
  55. 三浦巧、阿久津英憲：「目で見える生殖と再生 iPS細胞（図説）」HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 18(3):232-236, 2011.
  56. 安田智、佐藤陽治 再生医療に対する規制・制度等について：欧米の動向 幹細胞技術の標準化－再生医療への期待（一般財団法人バイオインダストリー協会 堀友繁 監修）2012（印刷中）
  57. 草川森士、佐藤陽治 再生医療・細胞治療の規制と開発支援に関する国際比較 「再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み」（株式会社シーエムシー出版、編集：岩田博夫、岸田晶夫、松岡厚子）2012（印刷中）
  58. 草川森士、佐藤陽治 再生医療における細胞・組織加工製品の治験とレギュレーション 実験医学増刊 2012（印刷中）
  59. 佐藤陽治、黒田拓也 ヒト多能性幹細胞を使った再生医療・細胞治療における造腫瘍性試験の現状 医学のあゆみ 2011; 239:1460-5.

## 2. 学会発表

1. Saga A, Okura H, Soeda M,

- Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Transplantation of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells reduces serum cholesterol and the effects could be augmented by HMG-CoA reductase inhibitor in hyperlipidemic Watanabe rabbits. The 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011.6.15-18)
2. Soeda M, Okura H, Saga A, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Transplantation of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells but not adipose tissue-derived stromal/stem cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. The 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011.6.15-18)
  3. Okura H, Saga A, Soeda M, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Miyagawa S, Sawa Y, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine chronic myocardial infarction model, The 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011.6.15-18)
  4. Sato Y, Atsuki H, Satoh M, Tanabe S, Yamaguchi T, Hayakawa T, Suzuki K. Identification of genes that regulate cardiomyogenesis in mouse embryonic cells. The 9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada (2011.6.15-18)
  5. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human somatic stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011.10.3-5)
  6. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human pluripotent stem cells. World Stem Cell Summit 2011, Pasadena, USA (2011.10.3-5)
  7. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese draft guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human stem cells. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany (2011.11.2-4)
  8. Okura H, Saga A, Soeda M, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: In situ stem cell therapy using human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells combined with HMG-CoA reductase inhibitor synergistically reduce serum cholesterol level in



- hyperlipidemic Watanabe rabbits, 84th American Heart Association Scientific Sessions, Orlando, USA(2011.11.12-16)
9. Okura H, Saga A, Soeda M, Tani J, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Tahara S, Hayakawa T and Matsuyama A: Transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits, 84th American Heart Association Scientific Sessions, Orlando, USA(2011.11.12-16)
  10. Hayakawa T: Biosimilar Products: Scientific Principles, Challenges, Opportunities Rapid Pharmaceutical Product Development. CMC Strategy Forum 2012, San Francisco, CA, USA (2012.1.22)
  11. 木下充弘、能登啓介、奥田茜、小南有加、早川堯夫、掛樋一晃. エイジングマーカーとしての糖鎖の可能性 第30回日本糖質学会年会、平成23年7月11日、長岡
  12. 橋本浩志、仲西暁良、木下充弘、鈴木匡、早川堯夫、掛樋一晃. 細胞外遊離 N-グリコイルノイラミン酸のヒト培養癌細胞への取り込み. 第30回日本糖質学会年会、平成23年7月11日、長岡
  13. 原沙弥香、山田佳太、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃. ヒト胃癌細胞中高フコシル化糖タンパク質のグライコプロテオーム解析. 第30回日本糖質学会年会、平成23年7月11日、長岡
  14. 神末和哉、大河原周平、山田佳太、岩塚欣也、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃. ヒト胃癌細胞 MKN45 細胞は糖タンパク質由来の遊離糖鎖を細胞外へ分泌する. 第30回日本糖質学会年会、平成23年7月11日、長岡
  15. 原沙弥香、山田佳太、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃. ヒト胃癌細胞中の高フコシル化糖タンパク質の探索. 第61回日本薬学会近畿支部、平成23年10月22日、神戸
  16. 神末和哉、大河原周平、山田佳太、岩塚欣也、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃. ヒト胃癌細胞 MKN45 による糖タンパク質由来遊離糖鎖の細胞外分泌. 第61回日本薬学会近畿支部、平成23年10月22日、神戸
  17. 中辻佑強、岸本昌太、木下充弘、早川堯夫、荒井昭博、中村伸、掛樋一晃. マイクチップ等電気泳動法によるタンパク質製剤の迅速解析技術の開発. 第61回日本薬学会近畿支部、平成23年10月22日、神戸
  18. 神末和哉、木下充弘、掛樋一晃. CESI-MS によるペプチド・タンパク質分析. 第31回キャピラリー電気泳動シンポジウム、平成23年11月11日、鶴岡
  19. 早川堯夫: 日本における後続タンパク質性医薬品の課題と展望. 第14回 ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ「日本で考えるバイオ後続品開発の明日」、東京(平成24年1月25日)
  20. 早川堯夫: ミニマム・コンセンサス・パッケージ (MCP) 策定に向けて. 第1回ミニマム・コンセンサス・パッケージ (MCP) 策定会議: 第1回再生医療薬事講習会 - 医療革新のために Scientific Common Sense を -、神戸(平成24年2月6日)
  21. 早川堯夫: 政策形成における科学と政府の役割及び責任に係わる原則の策定について. 政策形成における科学と政府の役割及び責任のあり方に関するワークショップ、(独)科学技術振興機構、研究開発戦略センター、東京(平成24年2月24日)
  22. Hayakawa T: Some Aspects of Development, Evaluation and Control of Cell/Tissue-Based Products in Japan. International Forum on Challenges and Opportunities Posed by Biopharmaceuticals,

- KFDA, Seoul, Korea (2012.3.27-29)
23. H Akutsu. "Development of xeno-free culture systems of human embryonic stem cells for cell therapy", JST/CIRM Workshop "Early translational research on stem cells", Kobe, 16<sup>th</sup> May, 2011.
  24. 阿久津英憲:「特別講演 再生医療を見すえたヒト ES 細胞の樹立」日本組織培養学会 第 84 回大会, 東京, 5 月 28 日, 2011 年
  25. H Akutsu. "Human ES cell and iPS cell derivation: Clinical application and biological characterization", 16<sup>th</sup> World Congress on In Vitro Fertilization, Tokyo, 13<sup>th</sup> Sep, 2011.
  26. 阿久津英憲:「臨床グレード ES 細胞の作製を目指して」理化学研究所筑波研究所, つくば, 11 月 7 日, 2011 年
  27. 阿久津英憲:「新たなヒト胚作製技術の報告(米国)について」第 64 回生命倫理専門調査会, 中央合同庁舎第 4 号館第 2 特別会議室, 1 月 17 日, 2012 年
  28. 阿久津英憲:「臨床応用を目指すヒト ES 細胞研究の現状」第 15 回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会, 厚生労働省 17 階専用第 18-20 会議室, 1 月 25 日, 2012 年
  29. 阿久津英憲:「新たなヒト胚作成技術について～SCNT 法による 3 倍体 ES 細胞論文の背景～」科学技術・学術審議会 生命倫理・安全部会 特定胚及びヒト ES 細胞等研究専門委員会(第 80 回), 文部科学省 16 階 特別会議室, 1 月 25 日, 2012 年
  30. 阿久津英憲:「ヒト ES 細胞の臨床応用へ向けた取り組み」バイオロジクスフォーラム第 9 回学術集会, 東京 タワーホール船堀, 2 月 22 日, 2012 年
  31. Fluorescent chemical probes for human stem cells Nao Hirata, Masato Nakagawa, Yuto Fujibayashi, Kaori Yamauchi, Asako Murata, Eihachiro Kawase, Shin-ichi Sato, Shin Ando, Young-Tae Chang, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Kazumitsu Ueda, Shinya Yamanaka, Motonari Uesugi. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (11/29-12/2 Tokyo)
  32. SnoN represses mesendodermal genes in human ES cells. Norihiro Tsuneyoshi, Tomoyuki Sumi, Akila Sadasivam, Jennica Tan Ee Kim, Norio Nakatsuji, Hirofumi Suemori, Norris Ray Dunn. Stem Cell Society Singapore (SCSS) Symposium 2011 (11/17 - 18, Singapore)
  33. ヒト ES 細胞の未分化性維持因子の探索を目的とした high content analysis(HCA). 熊谷英明、末盛博文、上杉志成、中辻憲夫、川瀬栄一郎. 第 34 回日本分子生物学会年会 (12/13-16、横浜)
  34. ヒト ES 細胞から definitive endoderm への高率な誘導方法の構築. 武内大輝、中辻憲夫、末盛博文. 第 34 回日本分子生物学会年会 (12/13-16、横浜)
  35. Kuramochi T, Satoh M, Atsuki H, Yasuda S, Hayakawa T, Suzuki K, Sato Y. Modes of action of genes facilitating ischemia-induced VEGF secretion in human mesenchymal stem cells. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都 (2012 年 3 月 14-16 日)
  36. 佐藤陽治 細胞治療・再生医療の規制の国際比較 第 12 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム, 東京 (2012 年 2 月 4 日)
  37. Sato Y. Update on the Regulation and Development of Cell/Tissue-Based Products in Japan. 2011 International Convention of the

- Pharmaceutical Society of Korea,  
仁川, 韓国 (2011年11月8日)
38. 佐藤陽治 ヒト iPS (様) 細胞を  
加工して製造される分化細胞の品  
質 第1回レギュラトリーサイエ  
ンス学会学術大会, 東京 (2011年  
9月3日)
39. Sato Y, Atsuki H, Satoh M,  
Tanabe S, Yamaguchi T,  
Hayakawa T, Suzuki K.  
Identification of genes that  
regulate cardiomyogenesis in  
mouse embryonic cells. The 10<sup>th</sup>  
Annual Meeting of the  
International Society for Stem  
Cell Research, Tronto, Canada  
(2011年6月15-18日)
40. Yasuda S, Hasegawa T, Hosono  
T, Satoh M, Yamaguchi T,  
Suzuki K, Sato Y. Genes  
associated with  
ischemia-induced VEGF  
secretion of human bone marrow  
mesenchymal stem cells. The  
10<sup>th</sup> Annual Meeting of the  
International Society for Stem  
Cell Research, Tronto, Canada  
(2011年6月15-18日)
- 41.

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

**H-1. 特許取得** なし

**H-2. 実用新案登録** なし

**H-3. その他** 特記事項なし

<Table. 1>

MCPの対象及び認識を共有すべき主な事項
■ 一般原則
■ GTP (Good Tissue Practice) MCP
■ 製品の製造方法 & 品質 (試験・評価・管理) MCP
■ 非臨床安全性試験 MCP
■ 非臨床有効性 (POC) 試験 MCP
■ 臨床試験 MCP
■ 細胞種別 MCP
■ 細胞バンクの概念と技術要件
■ 普遍的細胞特性解析手法及び品質解析手法
■ ウイルス安全性
■ 造腫瘍性試験
■ 抗原性
■ リスク評価によるケースバイケースアプローチ

<Table. 2>

最終製品の規格及び試験方法例: MCP項目 (青字)
(1)細胞数並びに生存率 * 暫定規格値
(2)確認試験: 重要細胞特性指標を選択
(3)細胞の純度試験 * 暫定規格値
(4)細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験 * 暫定規格値: 安全性上の重大な影響を及ぼす可能性が明らかに想定される場合
(5)製造工程由来不純物試験 * 暫定規格値: 存在する可能性があるもので、かつ、品質及び安全性の面からみて望ましくない物質
(6)無菌試験及びマイコプラズマ否定試験
(7)エンドトキシン試験
(8)ウイルス試験
(9)効能試験 * 暫定規格値
(10)力価試験 * 暫定規格値: 特定の生理活性物質が効能又は効果の本質
(11)力学的適合性試験 * 暫定規格値: 一定の力学的強度を必要とする製品

<Table. 3>

### 非臨床安全性試験MCP1

- 製品の特性及び適用法から評価が必要と考えられる安全性関連事項について、技術的に可能で、科学的合理性のある範囲で、適切な動物を用いた試験又は*in vitro*試験を実施
- 適切な製品モデル/疾患モデル動物の合理的活用
- 非細胞成分及び製造工程由来の不純物等については、可能な限り、動物を用いた試験ではなく理化学的分析法により評価
- 安全性評価は相対的なもの。細胞の種類・特性、適用法、適用量、適用部位、対象疾患、施術者の専門性、適切な安全性対策、有効性、臨床的意義等に依る

<Table. 4>

### 非臨床安全性評価の留意点(MCP2)

- 培養期間を超えて培養した細胞が目的外の形質転換や異常増殖を起こしていないことを明らかにする
- 必要に応じ、製品が産生する各種サイトカイン、成長因子等の生理活性物質の生体への影響を考察
- 製品の適用が患者の正常な細胞又は組織に影響を与える可能性、及びその安全性について検討、考察
- 製品の種類に応じて、異所性組織を形成する可能性、及びその安全性について検討、考察
- 望ましくない免疫反応が生じる可能性、及びその安全性について検討、考察
- 良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性

<Table. 5>

### 非臨床有効性評価の留意点

- 技術的に可能で、科学的に合理的な範囲で、実験動物や細胞等を用いて、期待される効果や体内動態等を検討。POCを示す
- 適切な製品モデル/疾患モデル動物の合理的活用
- 当該製品の効力又は性能による治療が他の治療法と比較したときはるかに優れて期待できることが国内外の文献又は知見等により合理的に明らかにされている場合には、治験開始段階では、必ずしも詳細な実験的検討は必要とされない

<Table. 6>

### 細胞種別MCPはその特性に基づき考慮

- 自己と同種
- 体性幹細胞：生体内での機能を期待する細胞への分化能を有するが、多系統への分化能を指しているわけではない
- iPS(様)細胞：ヒト体細胞を遺伝子導入・タンパク質導入・薬剤処理等により人為的に初期化(脱分化)して得られる細胞又は当該細胞の分裂により生ずる細胞であって、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞(少なくとも内胚葉、中胚葉又は外胚葉の一部の細胞)に分化する性質を有し、かつ、自己複製能力を維持しているもの又はそれに類する能力を有することが推定されるものをいう
- ES細胞：ヒト胚から採取された細胞又は当該細胞の分裂により生ずる細胞であって、胚でないもののうち、多能性(内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞に分化する性質をいう。)を有し、かつ、自己複製能力を維持しているもの又はそれに類する能力を有することが推定されるものをいう

<Table. 7>

Table1 Proposed structure of N-glycans observed in Toe and UTA-1 cell

Peak No.	Observed m/z	Proposed Structure	Peak No.	Observed m/z	Proposed Structure
1	1176		14	1744	
2	1379		15	1760	
3	1582		16	1906	
4	1354		17	2052	
5	1516		18	2272	
6	1678		19	1760	2x
7	1906		20	1906	2x
8	1840	2x	21	2068	2x
9	2053		22	2085	2x
10	2002		23	1986	SO <sub>2</sub> + 3x
11	2166	2x	24	1760	3x
12	1395		25	2272	3x
13	1541		26	1906	3x

<Table. 8-1>

*in vivo*試験法 主な造腫瘍性関連試験の能力と限界

試験法	測定事項	評価事項	利点	欠点
ヌードマウスへの移植	腫瘍形成	造腫瘍性細胞の検出	● 定量化の方策が整備 (WHO TRS 878)	● 時間 (数週間~数カ月) -費用がかかる ● 癌がん、乳がん、グリブ細胞腫、リンパ腫、白血病細胞に由来する細胞株は腫瘍を形成しない ● 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
NOD-SCIDマウスへの移植			● ヌードマウスよりも高感度	● 時間 (数週間~数カ月) -費用がかかる ● 定量化の方策が未整備 ● 胸腺腫を自然発症
DKO/NOG/SGMマウスへの移植			● NOD-SCIDよりも高感度 (?) / 胸腺腫なし	● 時間(数週間~数カ月) -費用がかかる ● 定量化の方策が未整備

*in vitro*試験法

試験法	測定事項	評価事項	利点	欠点
細胞増殖特性解析 (所定培養期間を超えた培養)	細胞増殖速度	不死化細胞の検出	● 簡便・安価 ● 時にはヌードマウスよりも高感度 ● 不死化していても腫瘍形成のないケース	● 僅かな不死化細胞の混入の検出には時間がかかる
フローサイトメトリー	細胞マーカー 蛋白質発現	造腫瘍性細胞 未分化細胞 の検出	● 短時間 (~1日) 簡便 ● 時には軟寒天コロニー試験よりも高感度 ● 細胞を識別・分離・回収できる	● 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない ● ゲートの掛け方で結果がばらつく
qRT-PCR	細胞マーカー 遺伝子発現		● 短時間 (~1日) 簡便 ● 時にはフローサイトメトリーよりも高感度	● 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない
軟寒天コロニー形成試験	コロニー形成	足場非依存的 増殖の検出	● <i>in vivo</i> 試験より短時間 (数週間~1カ月程度) ● 安価 ● 時にはヌードマウスよりも高感度	● 浮遊系細胞に使用できない ● 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない ● ヒES/iPS細胞は検出不能 (分散誘導性細胞死)
核型分析	染色体の数・サイズ・形	染色体異常 の検出	● 技術的に確立	● 相関性の問題 (染色体異常 ⇄ 造腫瘍性) ● 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
染色体CGH およびアレイCGH	ゲノムDNAのコピー数異常			
蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション(FISH)分析	特定遺伝子の位置・コピー数			

<Table. 8-2>

欧米で承認済みのヒト細胞・組織加工製品の造腫瘍性関連試験

(それぞれの審査概要から抽出・整理)

	製品名	細胞/足場材料	適用	造腫瘍性試験			核型分析	免疫不全動物を用いた他の試験(動物)	備考
				i vivo (動物)	軟寒天コロニー形成試験	細胞増殖特性解析			
USA	Carticel	自己軟骨細胞	軟骨損傷						
	Provenge	自己樹状細胞 (PAP抗原提示)	転移性前立腺がん						自己由来製品なので非臨床安全性試験なし
	hViv (azficel-T)	自己線維芽細胞	ほろい線解消美容整形						ヒトでの経験が豊富なので非臨床試験なし。なお臨床試験中に腫瘍形成1例
	HemaCord (HPC-C)	同種臍帯血造血前駆細胞	造血幹細胞移植			○			Coblyn form ing unit測定
	Epicel	自己角化細胞 / マウス細胞層	熱傷	○ (ヌードマウス)	○		○ (ヌードマウス)		ヌードマウス・軟寒天ともに陰性
	Apligraf (Graftskin)	同種角化細胞 + 同種線維芽細胞 / ウシ由来コラーゲン	皮膚潰瘍				○ (Nu-SCIDマウス)		
	TransCyte Derm agraft-TC)	同種線維芽細胞 / ナイロン基材	熱傷		○			○ (ヌードマウス)	軟寒天で陰性
	Derm agraft	同種線維芽細胞 / ポリグラクテンメッシュ	皮膚潰瘍	○ (ヌードマウス)				○ (ヌードマウス)	ヌードマウスで陰性
	OrCel	同種角化細胞 + 同種線維芽細胞 / ウシ由来コラーゲン	熱傷 表皮水疱症					○ (SCIDマウス、ヌードマウス)	
EU	ChondroCellect	自己軟骨細胞	軟骨損傷			○	○ (ヌードマウス)		既定期間を越えた培養で細胞老化確認

<Table. 9>

**相対的リスクと特徴から合理的試験の内容・程度・評価を考える  
患者さんのリスク(疾患というリスク及び時間経過に伴い増大するリスク)**

**VS**

**製品及び適用技術のリスク**

[下記の各要素、特にリスク軽減要素・対策を総合的に勘案: リスクを相対化]

- 対象疾患(重篤度、緊急度、希少性、QOL損失度等)
- 患者数(限定的であれば直接顔が見える治療となる。臨床研究・治験がそのまま治療)
- ウイルス等感染性物質(原材料細胞は可及的上流で制御、脱動物資材の使用)
- 原材料たる細胞の種類・特性(自己/同種、分化細胞/複機能性/多機能性)
- 製品の種類・特性(自己/同種、未分化細胞の残存、生理活性物質分泌能、安定性)
- 適用法、適用量、適用部位(局所/全身、細胞数、シート/構造物、腫瘍形成環境)
- 採取・移植・治療施設と従事者の専門性(高度であるほどリスク軽減効果大)
- 適用後の適切な安全性対策(副作用や健康被害への適切な対応策を前提に適用)
- 有効性(顕著な有効性が大きくリスクを上回ることによる有用性)
- ベネフィット(重篤・緊急・QOL損失の進行停止、治療の選択肢増大も臨床的意義あり)

**評価試験等にかかる時間、労力、コスト、科学的意義からみた合理性も勘案**



<Table.10>

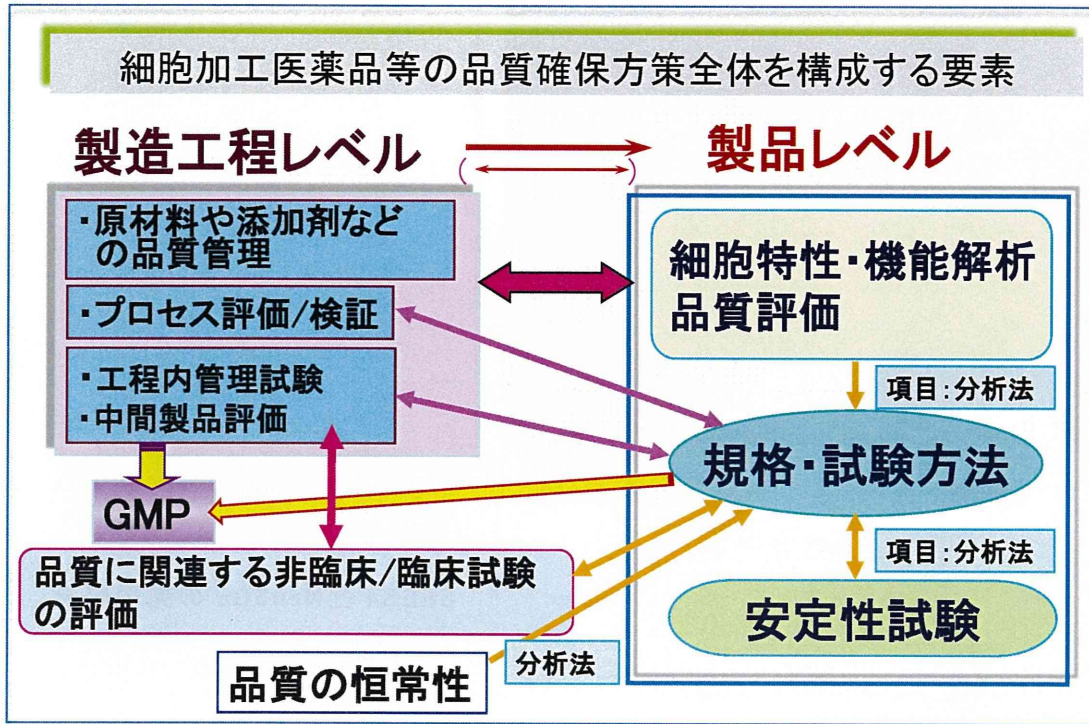
iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の臨床応用における  
MCP+ケース別（細胞種・特性、製品の種類、適用法、  
適用疾患、開発段階別）上乗せ例

	一般MCP	臨床研究	治験	備考
<b>製造・品質</b>				
原材料の細胞特性・品質(ヒト自己由来線維芽細胞)	△/○	○	○/◎	自己か同種により異なる
iPS細胞樹立法		○	○	
製品加工法(RPE:網膜色素上皮細胞誘導)	○	○	○	
製品規格 中間体・最終製品	○	○	◎	製品の特性により項目異なる
製品の安定性	△	△	○	保存期間・運搬の有無による
製造バリデーション			△	自己の場合:製法の頑健性
<b>非臨床安全性試験</b>				
長期培養	○	○	○	目的外形質転換能、未分化細胞残存
生理活性物質産生試験	△(○)			細胞の種類・特性を勘案
免疫原性 (免疫細胞による反応)	△			可能性を考察:同種/異種由来
単回投与毒性試験 異常毒性、用量設定	△			急性毒性危害要因を別途排除
安全性薬理試験	○			
造腫瘍性試験 最終製品・中間体	△			多能性幹細胞;適用細胞数;部位
未分化細胞混入	△	○	○	qRT-PCR等
異所性腫瘍形成	△			多能性幹細胞;適用法;部位
軟寒天コロニー形成試験	△			in vivo試験を行うなら不要
核型分析	△	△	△	
細胞毒性				
遺伝毒性				
体内動態	○			
フィーダー細胞のバリデーション				使用しない場合不要
セルバンク作成				
ウイルス検査				
ベクター安全性				除去効率・残存しない場合不要
<b>薬力学試験</b> non-clinical POC	○	○	○	
<b>書類整備</b>				
CPC書類(GMP図書)			○	
製品標準書	○	○	○	
三管理基準書			○	
共通の手順書			○	
製造SOP等	○	○	○	
施設関連書類	○	○	○	
試験物概要書	○	○	○	
臨床プロトコール	○	○	○	
同意説明文書	○	○	○	
症例報告書		○	○	

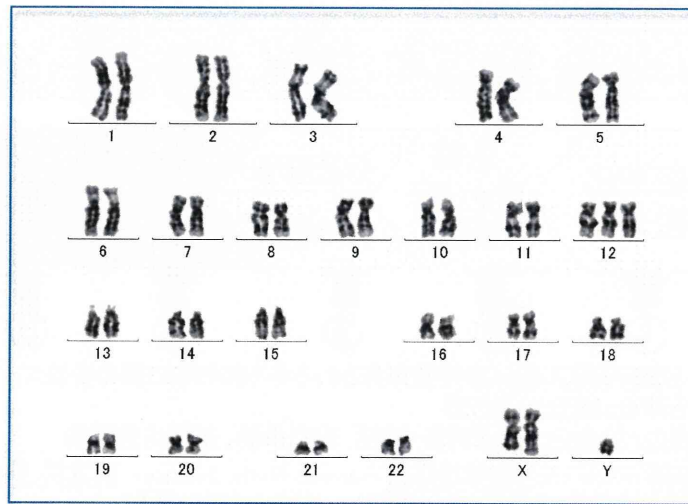
対象疾患

老人性加齢黄斑変性症

<Fig. 1>

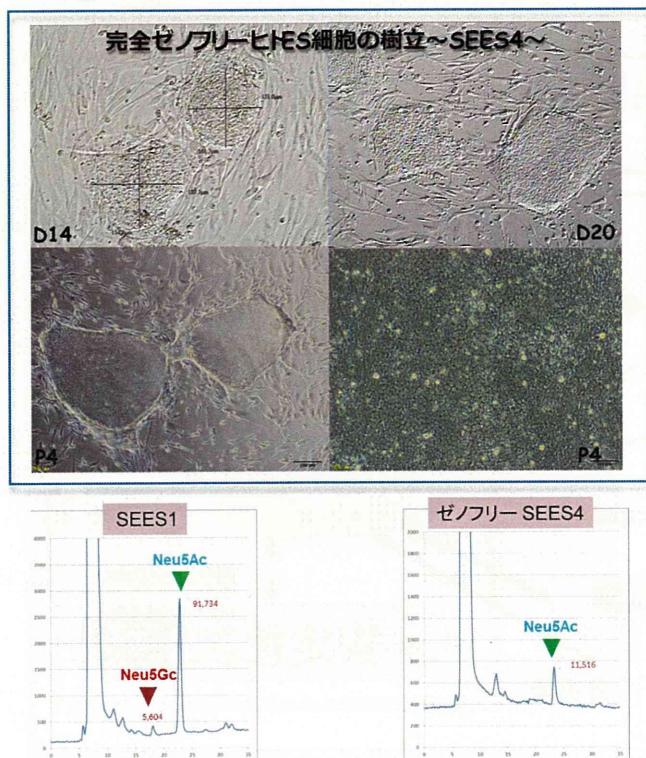


<Fig. 2>



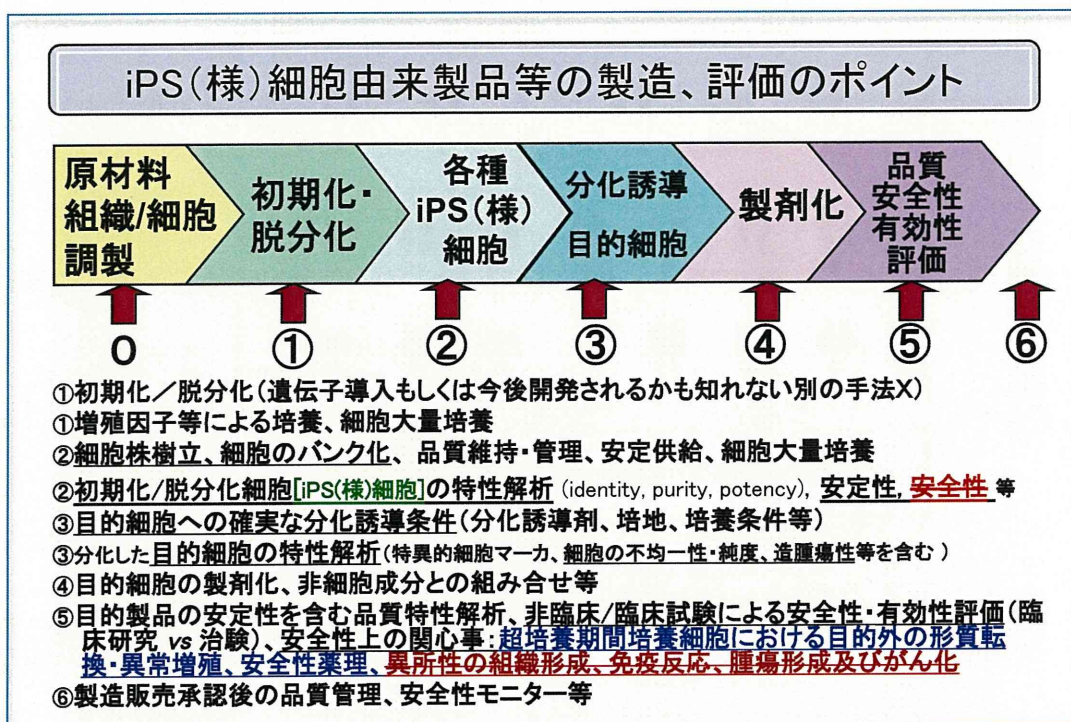
E S細胞で観察された染色体変異の一例

<Fig. 3>

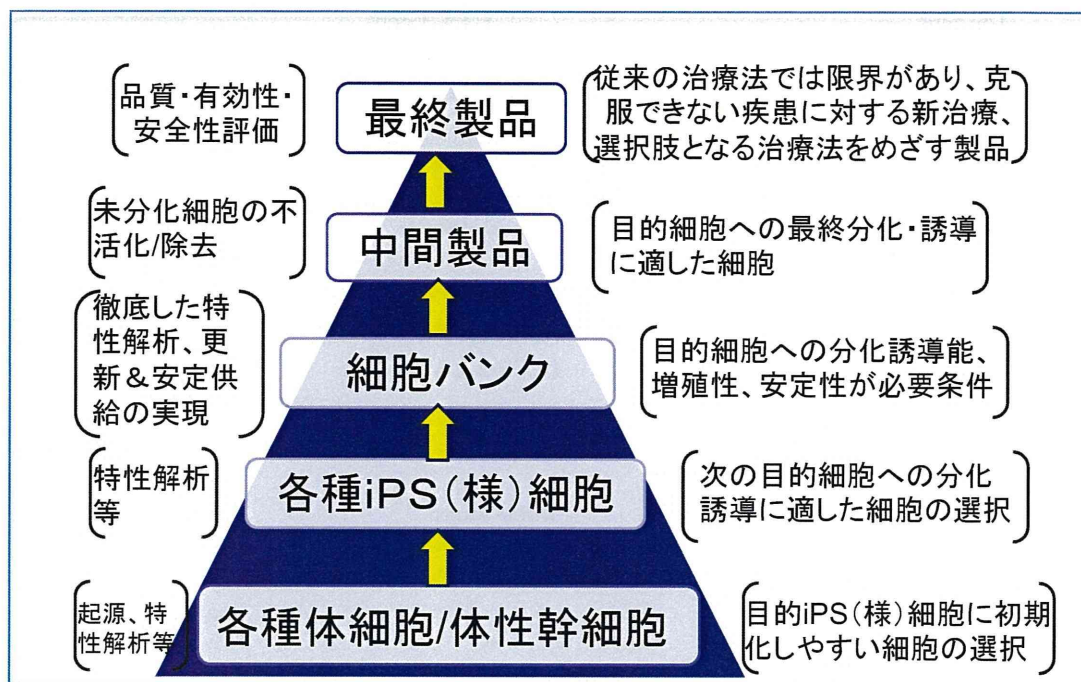


SEES4 と Neu5Gc の発現解析

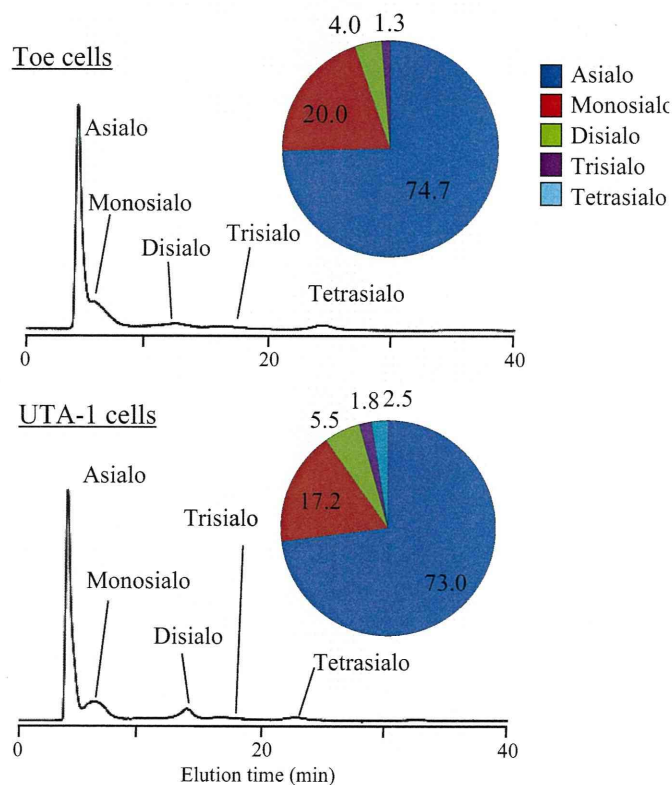
<Fig. 4>



<Fig. 5>



<Fig. 6>



Serotonin-affinity chromatography of N-glycans in Toe and UTA-1 cells. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-40 % solvent B) from 2 to 20 min and 1 M NaCl from 20 to 45 min.