

細胞培養工程で使用する異種動物由来の血清やその他に起因すると考えられるものの、混入原因や混入経路については不明な点が多い。iPS細胞などの各種幹細胞製品がヒト体内に移植されることを考えた場合、免疫原性を示しうる異種動物抗原糖鎖を検出する方法を開発するとともに、現行の方法で製造された各種幹細胞への異種動物抗原糖鎖混入の有無を確認しそれらの混入原因を明らかにしておくことは、高品質で安全性の高い細胞加工製品の開発・実用化を国内で推進するための基盤として極めて重要であると考えられる。

以上のような背景の下、初年度ではヒト細胞中の異種動物抗原糖鎖を検出する方法の開発ならびに開発し、iPS細胞中の異種動物抗原糖鎖の混入の有無について調査した。その結果、異種動物由来成分を含むと考えられる血清代替物 (KSR)、マウスフィダーレーヤー細胞を用いて培養された iPS 細胞中に NeuGc や  $\alpha$  Gal エピトープなどの動物抗原糖鎖が検出された。本年度は iPS 細胞への培養工程からの異種動物由来成分の混入について、異種動物由来成分の混入を防ぐ方策としての完全ヒト化培養法の効果について糖鎖レベルで評価した結果について報告する。

## B. 研究方法

### B.1 iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞 (Tic) はマイトマイシン C 処理したマウスフィダー細胞 (MEF, Reprocell) を播種した培養ディッシュ上で血清代替物 (Knockout Serum Replacment: KSR) を含む培養液を用いて培養したもの (KSR/MEF)、遺伝子組み換えヒトフィブロネクチンをコートした培養ディッシュ上で血清代替物 (KSR) を含む培養液を用いて培養したもの (KSR/FN)、遺伝子組み換えヒトフィブロネクチンをコートした培養ディッシュ上で完全ヒト化培養液 (FX) を用いて培養したもの (FX/FN)、マイトマイシン C 処理したマウスフィダー細胞

(MEF) を播種した培養ディッシュ上で完全ヒト化培養液 (FX) を用いて培養したもの (FX/MEF) の 4 種類とした。培養後の細胞は PBS (-) で 3 回洗浄後、PBS/1 mM-EDTA を加え 37°C で 5 分間静置後、培養ディッシュ全体を水平方向に叩きながら、コロニーを形成する細胞のみを剥離させた。剥離させた細胞は 15mL チューブに回収した。5 分間遠心(800 rpm)し細胞を回収した。上清を捨て新たに PBS (-) 10mL を加えて細胞を分散させながら洗浄し、5 分間遠心(800 rpm)した。遠心分離後、上清の PBS を捨て細胞を回収した。

### B.2 細胞総タンパク質分画の調製

培養細胞を 1 M EDTA を含む PBS 中に懸濁し、2 M Thiourea および 5 M Urea 水溶液、1 M DTT および Benzonase 溶液を加え室温でインキュベート後、12000 g、15 分間遠心分離後の上清を回収した。回収した上清に 5% 酢酸、5% 水、5% トリエチルアミンを含むアセトン溶液を加え、沈殿したタンパク質を遠心分離し回収した。得られた沈殿は 75% エタノールにて洗浄し細胞総タンパク質とした。

### B.3 N-結合型糖鎖の遊離と蛍光標識

総タンパク質分画を SDS、2-メルカプトエタノール、NP-40 を 1% ずつ含むリン酸緩衝液 (pH 7.5) で懸濁した後、N-glycanase F (2 unit) を加え、37°C で 12 時間酵素反応を行った。反応後、冷エタノールを加え 12000 g で 15 分間遠心分離し上清を濃縮乾固し、N-結合型糖鎖として回収した。糖鎖を含む試料に 2 アミノ安息香酸および NaBH<sub>3</sub>CN をそれぞれ 3% 含む 2% ホウ酸/4% 酢酸ナトリウム/メタノール溶液を 100  $\mu$ l 加えて 80°C で 1 時間加温した。反応後 Sephadex LH-20 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶出される蛍光性画分を回収し細胞タンパク質由来糖鎖とした。

### B.4 iPS 細胞のシアル酸分析

細胞あるいは培養細胞より回収した N-結合型糖鎖混合物の凍結乾燥物に水に 10  $\mu$ L と 0.2 M HCl (10  $\mu$ L)を加え、80  $^{\circ}$ C で 40 分間加水分解を行った。加水分解後、室温まで冷却後、0.7 M DMB 試薬(80  $\mu$ L)加え、50  $^{\circ}$ C で 150 分間誘導体化反応を行った。反応後、10  $\mu$ L を HPLC に注入し、シアル酸分析を行った。ポンプには Shimadzu LC10-ADVP、検出器には Waters 2475 型蛍光検出器を使用し、流速は 0.9 ml/min とした。カラムは逆相分配(ODS)カラム(COSMOSIL 5C18-AR-II; 4.6 x 150 mm)を用い、検出波長は励起波長 375 nm、蛍光波長 448 nm とした。溶出は 2 %MeCN/14 %MeOH 溶液を用い、イソクラティック溶出にて行った。

#### B.5 セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる糖タンパク質糖鎖の分析

ポンプには Shimadzu LC10-ADVP、検出器には Waters 2475 型蛍光検出器を使用し、流速 0.5 ml/min で分析した。カラムは LA-Serotonin (Japan Oil Mills, 4.6 x 150 mm)を用い、カラム温度は 25  $^{\circ}$ C とした。検出は励起波長(Ex) 350 nm、蛍光波長(Em) 425 nm により行った。移動相の溶液 A には水、溶液 B には 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 2 分間溶出液 B 5 %とし、溶出液 B が 37 分後に 75 %となるように直線グラジエント溶出を行い、その後 10 分間で溶出液 B が 100 %となるようにした。

#### B.6 順相分配 HPLC による N 結合型糖鎖の分析

カラムには Shodex NH2P-50 4E (4.6 mm x 250 mm、昭和電工)ならびに TSKgel Amide-80 (4.6 mm x 250 mm、TOSOH) を用い、溶離液 A を 2%  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{CN}$ 、溶離液 B に 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 3% Triethylamine/ $\text{H}_2\text{O}$  を用いた。溶出は 70%の溶離液 A によりカラムを平衡化した後、80 分で溶離液 B が 95%となるように直線グラジエント溶出を行った。また、蛍光検出は励起波長 350 nm、蛍光波長 425 nm で行った。

#### B.7 MALDI-TOF MS

装置には AXIMA-Resonance (Shimadzu 製)を用い、リニア-ネガティブイオンモードにより測定した。試料は DHB/メタノール溶液と等量混合し試料プレート上で風乾させた。

### C. 研究結果

#### C.1 異種動物由来成分の混入の低減のための培養液により培養された iPS 細胞のシアル酸分析

ヒト体内において免疫原性を示す異種動物抗原糖鎖としては、N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) や  $\alpha$ Gal エピトープ (Gal $\alpha$ 1-3Gal) が知られており、血清中の抗体との反応により炎症状態の惹起や拒絶反応を引き起こすことが知られている。特に、NeuGc についてはヒト以外の動物種に広く分布していること、細胞膜表面への非特異的吸着だけでなく、単糖として細胞内に取り込まれ、糖鎖生合成に利用される可能性があることが報告されている。本項では異種動物抗原糖鎖として NeuGc について、4 種類の培養法にて培養された iPS 細胞 (Tic) 中の NeuGc の定量分析を実施した。

細胞中の NeuGc を検出する方法として、NeuGc を特異的に検出するため複合糖質糖鎖を含む試料を塩酸加水分解し、遊離したシアル酸を 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) により蛍光標識化し、HPLC を用いて分析する方法を用いた。培養方法の異なる 4 種類の iPS 細胞についてシアル酸の分子種分析を行った結果を Fig. 1 に示す。ヒト iPS 細胞 (Tic) をマウスフィダー細胞 (MEF, Reprocell) を播種した培養ディッシュ上で血清代替物 (Knockout Serum Replacement: KSR) を含む培養液を用いて培養したもの (KSR/MEF) については、7.5 分付近に NeuGc が観察され、また約 10 分に NeuAc のピークが観察され、総シアル酸に占める NeuGc の相対比は 14.5%であった。次に、遺伝子組み換えヒトフィブロネクチンをコートした培養ディッシュ上で血清代替物 (KSR) を含む培養液を用いて培養したもの (KSR/FN) についても NeuGc、NeuAc とともに

観察されたが、NeuGcの相対比は6.3%であり、MEFを使用する場合と比べ50%以下に低下した。ヒトフィブロネクチンをコートした培養ディッシュ上で完全ヒト化培養液(FX)を用いて培養した細胞(FX/FN)については、NeuGcの相対比は3.9%であり、4種類のうち最もNeuGcの相対含量が低かった。さらに、MEFを播種した培養ディッシュ上でFXを用いて培養した細胞(FX/MEF)ではNeuGcの相対比は4.1%であり、完全ヒト化培養条件(FX/FNと同等のNeuGcしか検出されなかった。以上、KSRとMEFを用いて培養されたiPS細胞はNeuGcの混入が高く、完全ヒト化培養条件により培養されたiPS細胞はNeuGc含量が最も低かった。昨年度の本研究課題において、KSRは高い相対比でNeuGcを含むことから、KSR/MEFにおいて観察されるNeuGcはKSRに由来すると考えられた。また、非ヒト成分を含まない完全ヒト化培養液を用いた培養法では、最も低いNeuGc含量であったことから、FX/FN培養系は異種動物由来成分の混入を防ぐ方策として有効であることがわかった。

## C.2 異種動物由来成分の混入の低減のための培養液により培養されたiPS細胞のN-型糖鎖分析

前項の実験により異種動物由来成分の混入の低減のための培養液により培養されたiPS細胞では非ヒト型シアル酸であるNeuGcの混入を低減できることを示した。一方、培養液の組成は細胞内代謝に影響し結果として、糖鎖生合成にも影響することが考えられる。さらに、KSRやMEF由来の糖鎖の混入についても留意しなければならない。本項ではヒトiPS細胞(Tic)をマウスフィダー細胞(MEF)上、血清代替物(KSR)を含む培養液を用いて培養したもの(KSR/MEF)ならびに遺伝子組み換えフィブロネクチンと完全ヒト化培養液(FX)を用いて培養したもの(FX/FN)の2種類について、細胞総タンパク質分画よりN-結合型糖鎖を調製し、セロトニンアフィニティクロマトグラフィーを用いてシアル酸残基数に従い分画後、順相

分配型アミドカラムと質量分析法を組合わせて糖鎖構造を解析した。

セロトニンアフィニティクロマトグラフィーを用いて、総N-型糖鎖を分画後シアリダーゼ処理しアジアロ糖鎖としたものを順相分配型アミドカラムにより分離し各ピークをMALDI-QIT-MSを用いて解析した結果をFig.2およびFig.3に示す。KSR/MEFではアジアロ糖鎖分画にマンノース残基5~9残基からなる高マンノース型糖鎖が豊富に観察され、2本鎖糖鎖にフコースが1あるいは2残基付加した複合型糖鎖も観察された。モノシアロ分画は、アジアロ糖鎖分画に比べ複雑なプロファイルを示し、2本鎖糖鎖にフコースが0~2残基付加した複合型糖鎖ならびに3本鎖糖鎖にフコースが1残基付加した複合型糖鎖が観察された。ジシアロ分画では、複合型2本鎖糖鎖および複合型2本鎖糖鎖にフコースが1残基付加した糖鎖がジシアロ分画の95%以上を占める糖鎖であった。トリシアロ分画については、フコースを持たない2本鎖糖鎖、3本鎖糖鎖、4本鎖糖鎖にフコースが1残基付加した糖鎖が主として観察された。また、複合型4本鎖糖鎖の非還元末端にN-アセチルラクタミンを1および2残基有するポリラクタミン型糖鎖も観察された。

同様にFX/FNについて分析した結果をFig.3に示す。アジアロ糖鎖分画についてはKSR/MEFの場合と同様に、マンノース残基5~9残基からなる高マンノース型糖鎖が豊富に観察され、2本鎖糖鎖にフコースが1あるいは2残基付加した複合型糖鎖も観察された。モノシアロ分画は、アジアロ糖鎖分画に比べ複雑なプロファイルを示し、2本鎖糖鎖にフコースが0~2残基付加した複合型糖鎖ならびに3本鎖糖鎖にフコースが1残基付加した複合型糖鎖の含量が、KSR/MEFの場合に比べ高いことが分かる。ジシアロ分画については、複合型2本鎖糖鎖および複合型3本鎖糖鎖にフコースが1~2残基付加した糖鎖が多く発現しており、KSR/MEFの場合に比べ複雑なプロファイルを示す。

示した。トリシアロ分画については、フコースを1残基持つ3本鎖糖鎖が主として観察され、フコース1または2残基有する複合型4本鎖糖も観察された。以上のようにKSRを含む培養液(KSR/MEF)ならびにフィブロネクチンと完全ヒト化培養液(FX)を用いて培養した

(FX/FN) 場合では、複合型糖鎖分画(モノシアロ、ジシアロ、トリシアロ分画)で観察される糖鎖が異なっていた。両培養法において観察される糖鎖プロファイルの違いが、非ヒト成分に由来するものであるか、また培養法の違いによるiPS細胞の糖鎖生合成の変化によるものであるか不明であり、今後の解決すべき課題であると言える。

#### D. 考察

本年度は異種動物由来成分の混入を防ぐ方策としての完全ヒト化培養法の効果について糖鎖レベルで評価した。その結果、KSRなどの異種動物抗原糖鎖を含む培養条件下、培養されたiPS細胞はNeuGcが混入すること、完全ヒト化培養液(FX)とフィブロネクチン(FN)を用いる培養法により、iPS細胞へのNeuGcの混入を低減できることを明らかにした。また、異なる培養法で培養されたiPSのN-結合型糖鎖プロファイルが異なることを明らかにした。

#### E. 結論

本研究ではヒト細胞中の異種動物抗原糖鎖を検出する方法を用いて、iPS細胞中の異種動物抗原糖鎖の混入ならびに混入を防ぐ方策としての完全ヒト化培養法の有効性について調査した。その結果、完全ヒト化培養液(FX)とフィブロネクチン(FN)を用いる培養法により、iPS細胞へのNeuGcの混入を低減できることを明らかにした。次年度は混入したNeuGcのクリーニング法あるいは混入したNeuGcを継代培養により段階的に低減するためのプロトコルについて検討するとともに、細胞総タンパク質分画中に数%検出されたNeuGcの細胞表面上での発現についても詳細に解析し、細胞移植時におけるリスクについても評価していく

予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Mitsui Y, Yamada K, Hara S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K.

Comparative studies on glycoproteins expressing poly-lactosamine-type N-glycans in cancer cells. J Pharm Biomed Anal. 2012 70, 718-726.

Maeda E, Kita S, Kinoshita M, Urakami K, Hayakawa T, Kakehi K.

Analysis of nonhuman N-glycans as the minor constituents in recombinant monoclonal antibody pharmaceuticals.

Anal Chem. 2012 84(5), 2373-2379.

Yamada K, Mitsui Y, Kakoi N, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K.

One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans.

Anal Biochem. 2012 421(2), 595-606.

##### 2. 学会発表

再生医療実用化に向けた幹細胞の安全性評価における複合糖質糖鎖の利用

保村佳孝、木下充弘、館山大揮、古江美保、森山博由、早川堯夫、掛樋一晃

日本薬学会第132年会 3月、札幌

消化器系癌細胞に発現するCEA上の高フコシル化糖鎖の比較解析

原沙弥香、三ツ井洋輔、山田佳太、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

日本薬学会第132年会 3月、札幌

ヒト胃癌由来MKN45細胞における糖タンパク質由来遊離糖鎖の細胞外分泌

神末和哉、大河原周平、岩塚欣也、山田佳太、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

日本薬学会第132年会 3月、札幌

シーレス CE-ESI-TOF MS によるペプチド・タンパク質の分析

神末和哉、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
日本薬学会第 132 年会 3 月、札幌

PEG 修飾タンパク質の分子不均一性評価に関する研究

岸本昌太、前田瑛起、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
日本薬学会第 132 年会 3 月、札幌

マイクロチップ等電点電気泳動によるタンパク質製剤の迅速解析技術の開発

中辻佑強、岸本昌太、木下充弘、荒井昭博、中村 伸、早川堯夫、掛樋一晃  
日本薬学会第 132 年会 3 月、札幌

キャピラリー/マイクロチップ電気泳動のグライコバイオロジクスへの展開

木下充弘、中辻佑強、北荘一郎、荒井昭博、中村 伸、早川堯夫、掛樋一晃  
第 31 回日本糖質学会年会 9 月、鹿児島

ウサギ角膜上皮及び SIRC 細胞中の N-型糖鎖の比

岩塚欣也、岩本裕貴、木下充弘、稲田勝弘、安枝真一、掛樋一晃  
第 31 回日本糖質学会年会 9 月、鹿児島

マイクロチップ等電点電気泳動によるタンパク質製剤の迅速解析

中辻佑強、岸本昌太、松村千恵美、木下充弘、荒井昭博、中村伸、早川堯夫、掛樋一晃  
第 31 回日本糖質学会年会 9 月、鹿児島

マイクロチップ等電点電気泳動による糖タンパク質性バイオ医薬品の不均一性評価

中辻佑強、前田瑛起、岸本昌太、松村千恵美、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃  
第 32 回キャピラリー電気泳動シンポジウム  
11 月、大阪

1. 取得特許  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

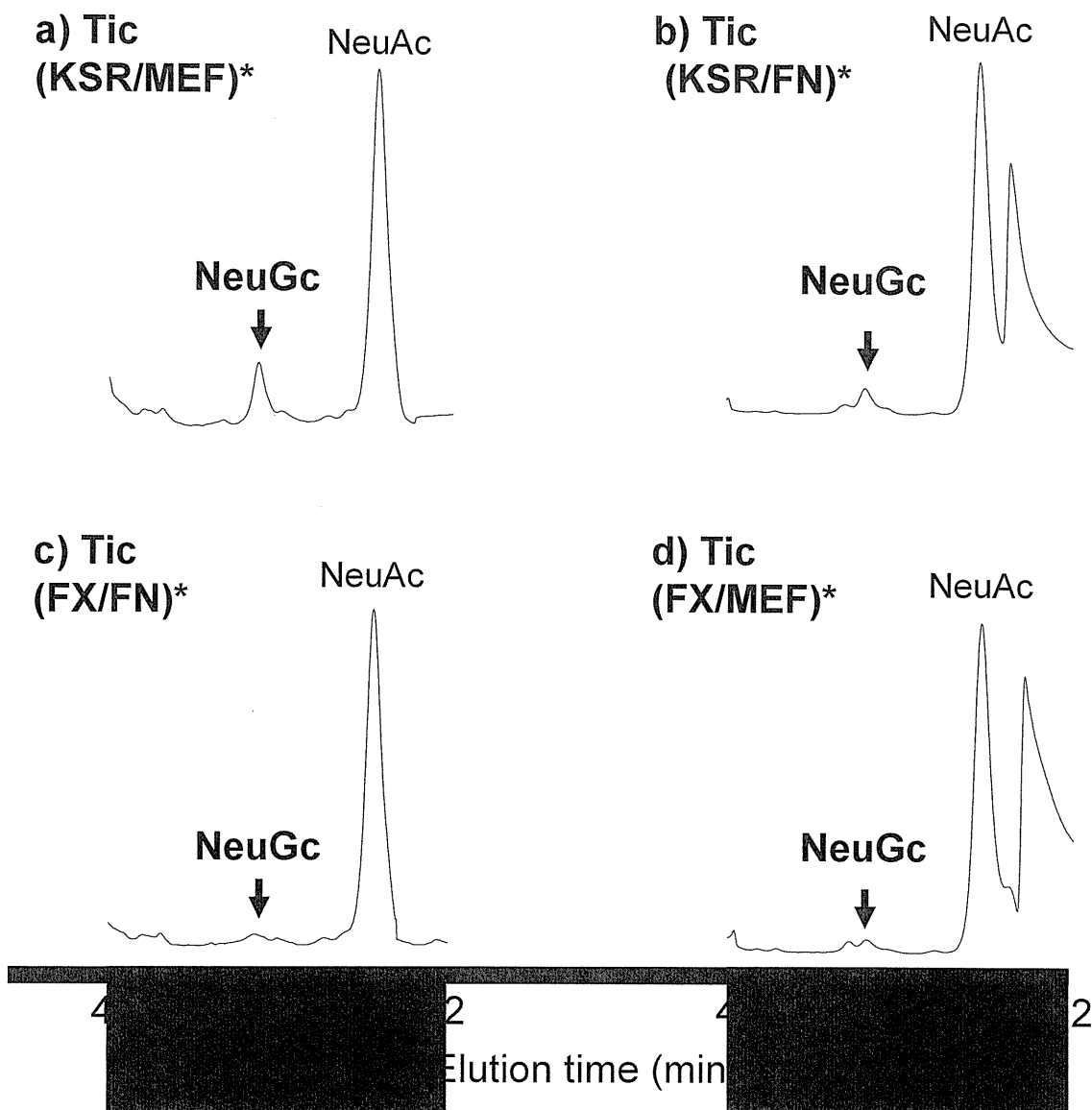


Fig.1. HPLC chromatogram of sialic acid analysis.

Analytical conditions: Column oven: 40 °C, Flow rate: 0.9 mL/min. Detection: Ex. 375 nm  
Em. 448 nm, Elution: Acetonitrile:Methanol:Water=2:14:84

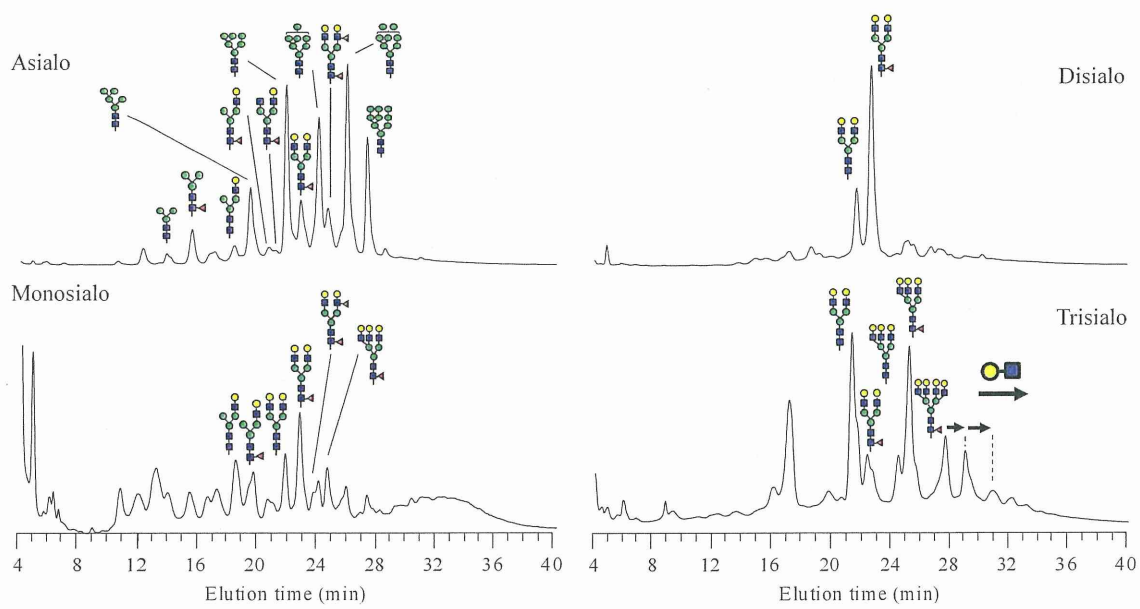


Fig.2. HPLC analysis of N-glycan cultured with KSR/MEF medium

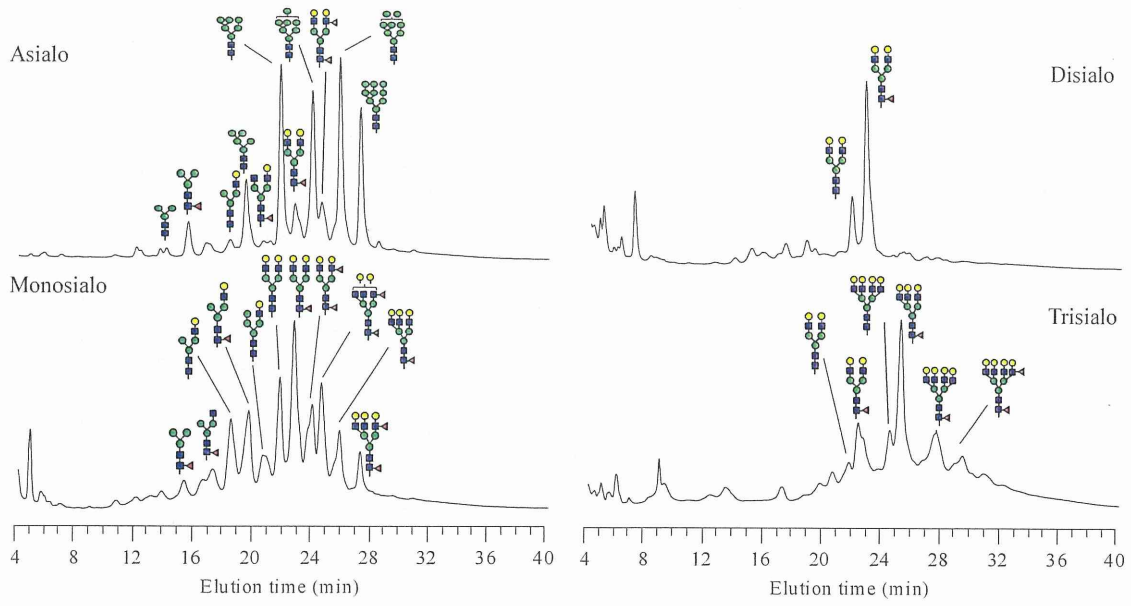


Fig.3. HPLC analysis of N-glycan cultured with FX/FN medium



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	頁
安田智, <u>佐藤陽治</u>	安全性評価の総論、造腫瘍性試験の現状と展望	江上美芽, 水谷学	幹細胞医療の実用化技術と産業展望	シーエムシー出版	東京	2013	247 -255
<u>佐藤陽治</u> , 村岡ひとみ	再生医療分野の関連規制：FDAの動向	技術情報協会	稀少疾患／難病の診断・治療と製品開発	技術情報協会	東京	2012	330 -335

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
草川森士, <u>佐藤陽治</u>	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	<i>実験医学</i>	30(10) 増刊	1702-7	2012
Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, <u>Hayakawa T.</u>	Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system.	<i>PLoS ONE</i>		in press	
Moriyama M, Moriyama H, Ueda A, Nishibata Y, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, <u>Hayakawa T.</u>	Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling.	<i>BMC Cell Biol</i>	7	13-21	2012
Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Kanda K, <u>Hayakawa T.</u> , Furue MK, Mizuguchi H.	3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing.	<i>Biomaterials,</i>	34(7)	1781-1789	2013

Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Sugawara M, Kikuchi K, Higuchi M, Nagamoto Y, Watanabe H, Tashiro K, Sakurai F, <u>Hayakawa T</u> , Furue MK, Mizuguchi H.	Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 $\alpha$ transduction.	<i>J Hepatol.</i>	57(3)	628-636	2012
Nagamoto Y, Tashiro K, Takayama K, Ohashi K, Kawabata K, Sakurai F, Tachibana M, <u>Hayakawa T</u> , Furue MK, Mizuguchi H.	The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets.	<i>Biomaterials.</i>	33(18)	4526-34	2012
Tashiro K., Kawabata K., Omori M., Yamaguchi T., Sakurai F., Katayama K., <u>Hayakawa T.</u> , Mizuguchi H.	Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction.	<i>Stem Cell Res.</i>	8(2)	300-311	2012
Takayama K, Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., <u>Hayakawa T.</u> , Furue MK., Mizuguchi H.	Efficient Generation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 $\alpha$ Transduction.	<i>Mol. Ther.,</i>	20(1)	127-137	2012
Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, <u>Sato Y</u> , Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H.	GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance.	<i>Nat Commun.</i>	4	Article number:1532	2013
Kuroda T, Yasuda S, <u>Sato Y</u> .	Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products.	<i>Biol Pharm Bull.</i>	36	189-92	2013
Nakaya M, Chikura S, Watari K, Mizuno N, Mochinaga K, Mangmool S, Koyanagi S, Ohdo S, <u>Sato Y</u> , Ide T, Nishida M, Kurose H.	Induction of cardiac fibrosis by $\beta$ -blocker in G protein-independent and GRK5/ $\beta$ -arrestin2-dependent signaling pathways.	<i>J Biol Chem.</i>	287	35669-77	2012

Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, <u>Sato Y.</u>	Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells.	<i>PLoS ONE.</i>	7	e37342	2012
Mitsui Y, Yamada K, Hara S, Kinoshita M, <u>Hayakawa T, Kakehi K.</u>	Comparative studies on glycoproteins expressing polylysamine-type N-glycans in cancer cells.	<i>J Pharm Biomed Anal.</i>	70	718-726	2012
Maeda E, Kita S, Kinoshita M, Urakami K, <u>Hayakawa T, Kakehi K.</u>	Analysis of nonhuman N-glycans as the minor constituents in recombinant monoclonal antibody pharmaceuticals.	<i>Anal Chem.</i>	84(5)	2373-2379	2012
Yamada K, Mitsui Y, Kakoi N, Kinoshita M, <u>Hayakawa T, Kakehi K.</u>	One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans.	<i>Anal Biochem.</i>	421(2)	595-606.	2012
Fukushima E, Yagi Y, Yamamoto S, Nakatani Y, <u>Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S.</u>	Partial filling affinity capillary electrophoresis using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump for sensitive profiling of glycoprotein-derived oligosaccharides.	<i>J Chromatogr A</i>	1246	84-9	2012
Yagi Y, <u>Kakehi K, Hayakawa T, Ohyama Y, Suzuki S</u>	Specific detection of N-glycolylneuraminic acid and Gal $\alpha$ 1-3Gal epitopes of therapeutic antibodies by partial-filling capillary electrophoresis.	<i>Anal Biochem.</i>	431(2)	120-126	2012
Morikawa T, Sueyoshi M, Chaipech S, Matsuda H, Nomura Y, Yabe M, Matsumoto T, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, <u>Hayakawa T, Muraoka O.</u>	Suppressive effects of coumarins from <i>Mammea siamensis</i> on inducible nitric oxide synthase expression in RAW264.7 cells.	<i>Bioorg Med Chem.</i>	20(16)	4968-77	2012

Iwatsuka K, Watanabe S, Kinoshita M, Kamisue K, Yamada K, <u>Hayakawa T</u> , Suzuki T, <u>Takehi K</u> .	Free glycans derived from glycoproteins present in human sera.	<i>J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.</i>	928C	16-21	2013
Morikawa T, Chaipech S, Matsuda H, Hamao M, Umeda Y, Sato H, Tamura H, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, <u>Hayakawa T</u> , Muraoka O.	Anti-hyperlipidemic constituents from the bark of <i>Shorea roxburghii</i> .	<i>J Nat Med.</i>	66(3)	516-24	2012
Chaipech S, Morikawa T, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, <u>Hayakawa T</u> , Muraoka O.	Structures of two new phenolic glycosides, kaempferiaosides A and B, and hepatoprotective constituents from the rhizomes of <i>Kaempferia parviflora</i> .	<i>Chem Pharm Bull (Tokyo)</i>	60(1)	1-8	2012
Morikawa T, Chaipech S, Matsuda H, Hamao M, Umeda Y, Sato H, Tamura H, Kon'i H, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, <u>Hayakawa T</u> , Muraoka O.	Antidiabetogenic oligostilbenoids and 3-ethyl-4-phenyl-3,4-dihydroisocoumarins from the bark of <i>Shorea roxburghii</i> .	<i>Bioorg Med Chem.</i>	20(2)	832-40	2012
Chaipech S, Morikawa T, Ninomiya K, Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, <u>Hayakawa T</u> , Muraoka O.	New flav-3-en-3-ol glycosides, kaempferiaosides C and D, and acetophenone glycosides, kaempferiaosides E and F, from the rhizomes of <i>Kaempferia parviflora</i> .	<i>J Nat Med.</i>	66(3)	486-92	2012

## 指針草案作成

草案作成者	文書名	発出元	文書番号	発出日
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(自己)体性幹細胞 加工医薬品等の品質及び 安全性の確保について	厚生 労働省	薬食発 0907 第 2 号	平成 24 年 9 月 7 日
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(同種)体性幹細胞 加工医薬品等の品質及び 安全性の確保について	厚生 労働省	薬食発 0907 第 3 号	平成 24 年 9 月 7 日
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(自己) iPS(様) 細 胞加工医薬品等の品質及 び安全性の確保について	厚生 労働省	薬食発 0907 第 4 号	平成 24 年 9 月 7 日
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(同種) iPS(様) 細 胞加工医薬品等の品質及 び安全性の確保について	厚生 労働省	薬食発 0907 第 5 号	平成 24 年 9 月 7 日
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 ES 細胞加工医薬品 等の品質及び安全性の確 保について	厚生 労働省	薬食発 0907 第 6 号	平成 24 年 9 月 7 日
西田幸一, 飯田知弘, 梅澤明弘, 小沢洋子, 瓶井資弘, 平形明人, 万代道子, 大和雅之, 森永千佳子, 佐藤陽治	次世代医療機器評価指標 策定事業 再生医療審査 WG 報告書 「自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮細 胞に関する評価指標 (案)」	厚生 労働省	パブリック コメント 案件番号 495120405	平成 25 年 3 月 19 日 (案の公示日)

## 政策提言

厚生科学審議会「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する検討の見直しに関する専門委員会」での提言
厚生労働省医薬食品局「薬事法改正における再生医療製品の位置づけに関する意見交換会」での提言
経済産業省「再生医療の実用化・産業化に関する研究会」での提言(最終報告書は2月公表)
厚生科学審議会科学技術部会「再生医療の安全性確保と推進に関する専門委員会」での提言

# 安全性評価の総論，造腫瘍性試験の現状と展望

安田 智，佐藤陽治

国立医薬品食品衛生研究所

『幹細胞医療の実用化技術と産業展望』

2013年3月 (株)シーエムシー出版刊 抜刷

## 第7章 品質評価

### 1 安全性評価の総論、造腫瘍性試験の現状と展望

安田 智<sup>\*1</sup>，佐藤陽治<sup>\*2</sup>

#### 1.1 はじめに

細胞・組織加工製品を用いた再生医療は、治療法に乏しく、重篤・致死的ないし QOL を著しく損なう疾病・損傷に対して極めて有効な治療法になると期待されており、細胞・組織加工製品の開発は世界的にも熾烈な競争が展開している。その中で、ヒト由来の体性幹細胞、胚性幹細胞、さらには人工多能性幹細胞等の幹細胞を用いた製品の開発も盛んに進んでいる。難治性疾患等の患者にいち早く有効な再生医療を届けるためにも、国際的な再生医療の開発・ビジネス競争でわが国が主導的地位を得るためにも、将来の開発動向を見据えつつ、細胞・組織加工製品の品質・安全性に関して新規かつ汎用性の高い評価技術・製造法の開発を行い、わが国から世界に向けて先導的に提示していくとともに、より高品質で安全性及び有効性の高い製品の開発・実用化を国内で適正に推進することが急務である。本節では、幹細胞を用いた細胞・組織加工製品（幹細胞加工製品）の安全性評価に関して全般的に述べた後に、特にヒト多能性幹細胞加工製品において重要な品質管理上および安全性上の関心事である「造腫瘍性」に焦点を当て、製品中への造腫瘍性細胞の混入を検出する試験系の現状と展望について概説したい。

#### 1.2 細胞・組織加工製品／幹細胞加工製品の安全性評価

細胞・組織加工製品の特性は、化学薬品やタンパク質性医薬品等とは著しく異なる。細胞・組織加工製品に特有の問題として、①形質は置かれる（微小）環境に依存する、②周囲の環境に対して薬理的・免疫学的・物理的に作用する、③長期培養により均一性が低下する場合がある、④脱分化・遊走の可能性がある、⑤壊れやすく寿命が有限である場合が多い、⑥高度な精製やウイルスの不活性化・除去が困難、ということが挙げられる。また、これらの問題の程度や重みは製品の種類により様々である。こうしたことから、細胞・組織加工製品の品質マネジメントの原則は、「リスク・ベース・アプローチ」とするのが妥当とされている。「リスク・ベース・アプローチ」とは、対象となる各製品に固有、かつその品質・安全性・有効性に関連するリスク要因を探

---

\*1 Satoshi Yasuda 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第2室 室長；先端医療振興財団 客員研究員

\*2 Yoji Sato 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長；先端医療振興財団 客員研究員；名古屋市立大学 大学院薬学研究科 医薬品質保証学分野 客員教授

り当てることをベースにし、その影響の度合いを科学的に評価することにより品質確保の方針・内容をケース・バイ・ケースで柔軟に定めるアプローチ方法である。なお、ここで言うリスクとは、ある目的（有効性・安全性など）を達成する上での阻害要因を指す。細胞・組織加工製品の安全性面での主なリスクとしては、「ウイルス等の感染性因子の伝搬」、「細胞の遺伝的不安定性と造腫瘍性」、「血清等の不純物混入」、「望まない免疫応答」、「非細胞成分による不必要な免疫応答、炎症反応、毒性」、「製品の意図しない生物応答」が挙げられ、製品開発においては、これらのリスクに対応した品質・安全性確保策が必要となる。特に、幹細胞は多分化能（multipotency）または多能性（pluripotency）と自己複製能という特徴を持ち、幹細胞を加工した製品は、加工内容や適用部位によっては、たとえ自己に由来するものであっても元来の細胞そのものではなく、また、存在していた、あるいは存在すべきであった（微小）環境とは異なる状態の下に臨床適用される可能性が高い。厚生労働省は、これらの点に留意し、各種幹細胞加工製品をより迅速に実用化するための品質・安全性確保に関する5つの指針を平成24年9月7日に発出した<sup>1)</sup>。

冒頭に述べたように、細胞・組織加工製品／幹細胞加工製品は重篤・致命的ないしQOLを著しく損なう疾病・損傷を適用対象として開発される場合が多い。従って、これらの製品を治験・臨床研究でヒトに初めて使用する際には、明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥当性を明らかにしたうえで、なお残る「未知のリスク」と、重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことによりQOLを著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できない患者が「新たな治療機会を失うことにより被るかも知れないリスク」とのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示した上で患者の自己決定権に委ねるという視点を持つこと、すなわち、リスク・期待されるベネフィットの情報を開示した上で、使用するかどうかの意思決定は患者が行うという視点を入れて評価することも重要である。

### 1.3 幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

#### 1.3.1 ヒト多能性幹細胞の造腫瘍性と造腫瘍性試験国際ガイドライン

「造腫瘍性」(tumorigenicity)とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力を言う。ヒトES細胞株やヒトiPS細胞株はテラトーマ(奇形腫)形成能、すなわち造腫瘍性を元来の特性として保持しており、この点がヒト体細胞・体性幹細胞とは大きく異なる。したがって、ヒト多能性幹細胞(ES/iPS細胞等)を原材料とした医薬品・医療機器においては、未分化細胞の混入・残留により異所性組織や腫瘍が形成される可能性があり、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。

現在、細胞の造腫瘍性試験に関する国際的なガイドラインとして唯一存在するのは、世界保健機関(WHO)の生物薬品標準化専門委員会第47次報告(1998)(Technical Report Series No.878, TRS 878)にあるAnnex I「生物薬品製造用の*in vitro*基材としての動物細胞の使用の要件」<sup>2)</sup>である。WHO TRS 878にある造腫瘍性試験の内容は、極めて大雑把に言えば、「ヌード



マウス等の動物 10 匹に  $10^7$  個の細胞を投与して 16 週間観察し、陽性対照としては Hela 細胞などを用いる」というものであるが、注意しなければならないのはその適用対象と目的である。

WHO TRS 878 の造腫瘍性試験の適用対象は、あくまでワクチンやタンパク質製剤など、ヒトを対象に *in vivo* 又は *ex vivo* で投与される生物薬品を製造する際に *in vitro* 基材として用いられるヒト又は動物由来の細胞株である。「患者に移植する細胞」および「治療を目的に患者に移植する細胞株の原料となる細胞」は、WHO TRS 878 の対象外とされており、その特性解析においては規制当局等との議論が必要とされている。

WHO TRS 878 における造腫瘍性試験の目的は、生物薬品用細胞基材となる細胞株の均一なバンク（セル・バンク）の造腫瘍性の程度又は有無を正確に把握することにある。造腫瘍性の程度の大幅な変化又はその有無に変化が生じた場合、細胞特性に何らかの異常が起こったという指標となる。つまり、既知あるいは未知のウイルス感染、変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化など、原因はいずれにせよ、セル・バンクの安定性上の異常が発生したことを検出するための方策として、セル・バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の一つとして評価し、品質管理に活用することが必要とされるわけである。

### 1.3.2 ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品についての造腫瘍性試験には、目的別に以下の 3 種類があり得る。①原材料の品質管理のための造腫瘍性試験、②製造工程管理のための造腫瘍性試験、③最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験、である。以下にこれら 3 種の造腫瘍性試験の特徴と方法について述べる。

#### (1) 原材料（細胞基材）の品質管理のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料は、文字通り、ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株等である。これらはヒト多能性幹細胞加工製品という生物製剤の一種を製造するための細胞基材である。従って、これらにおける「造腫瘍性」とは、すなわち生物製剤の原材料（細胞基材）の品質特性のひとつと捉えることが出来る。

ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料としてのヒト多能性幹細胞バンクの造腫瘍性における懸念事項は、WHO TRS 878 におけるセル・バンクの品質管理の考え方と同様に、「セル・バンクの造腫瘍性が既定の範囲内にあるか?」ということになる。ヒト多能性幹細胞加工製品の原材料としてのヒト多能性幹細胞バンクの造腫瘍性の意味づけは WHO TRS 878 における細胞基材の造腫瘍性の意味づけとほぼ同じであることから、その評価方法についても、WHO TRS 878 の方法を準用することが可能であると考えられる。

#### (2) 製造工程（中間製品）管理のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の中間製品となる細胞集団には、目的細胞ないしその前駆細胞に加え残存多能性幹細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。中間製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」とは、製造工程管理のための指標としての意味合いがある。製造工程管理における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」

ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」という2点がある。

中間製品の中に「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」ということに関しては、多能性幹細胞のマーカー遺伝子／マーカータンパク質を利用した方法により評価することが可能である。手技としては定量RT-PCRやフローサイトメトリーなどが挙げられる。

中間製品の中に「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということを評価するための方法としては、例えば細胞増殖特性の評価（不死化細胞の検出）や軟寒天コロニー形成試験（足場非依存性増殖細胞の検出、後述）が挙げられる。造腫瘍性形質転換細胞の検出に *in vivo* 造腫瘍性試験系を活用することも考えられるが、最終製品（ないし中間製品）の中に含まれる僅かな造腫瘍性細胞を検出する必要があるため、WHO TRS 878の方法よりも十分に低い検出限界を備えている必要がある。検出限界の低い試験系としては、T細胞、B細胞およびNK細胞を欠失したNOD/SCID/ $\gamma$ Cnull (NOG) など、ヌードマウスよりも免疫力の低下した重度免疫不全マウス系を利用することが考えられる<sup>3, 4)</sup>。ただし新規動物モデルを用いた科学的リスク評価のためには、細胞・組織加工製品の造腫瘍性の定量化方法の検討と、その標準化が必要である。

### (3) 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の最終製品中の細胞集団、すなわち「投与細胞」には、目的細胞に加え、混入する前駆細胞や残存多能性幹細胞およびその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。また、最終製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」には、ヒトでの生着部位での腫瘍形成能を考察する材料であることが要求される。すなわち、最終製品における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに加え、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」ということが挙げられる。

最終製品の中に「どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか」「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに関しては、多能性幹細胞のマーカー遺伝子／マーカータンパク質の検出、細胞増殖特性の評価、軟寒天コロニー形成試験などで評価できる可能性がある。

一方、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」という懸念については、*in vivo* 造腫瘍性試験が必要となる。その場合に考慮すべき点としては、①試験系の検出限界、②投与細胞数、③投与部位などが挙げられる。投与部位については可能ならばヒトでの投与部位に相当する部位を選択すべきである。もしも、物理学的障害を生ずるなどの理由により当該部位に対する投与細胞数に限界がある場合には、可能であれば投与部位を変更するのではなく、動物とヒトとの間の当該投与部位の相対的スケール比に応じて投与細胞数を調節する。すなわち、生着する微小環境と投与細胞との相互作用による腫瘍形成の可能性を考察することを優先する。免疫特権、炎症、虚血など、特殊な投与環境における細胞の挙動は動物モデルにおける *in vivo* での評価でなければ、考察することが困難だからである。

### 1.3.3 造腫瘍性関連 *in vitro* 試験

細胞集団の造腫瘍性、あるいは細胞集団中の造腫瘍性細胞を検出する系としていくつかの *in vitro* 試験系があるが、それぞれに長所と短所がある。それらを *in vivo* 試験法と併せて表1にまとめた。核型分析などの染色体異常を検出することを目的とする試験は技術的に確立されているものの、得られた結果と細胞の造腫瘍性との相関性が低いことが多く、最終製品の造腫瘍性を評価するというよりも、原材料の品質または製造過程における製品の遺伝的安定性を評価するという目的で実施されるべきものと言える。軟寒天コロニー形成試験は、がん細胞の多くが足場非依存的に増殖するのに対して接着性正常細胞は足場が存在しないとアポトーシス（アノイキス）を起こすという性質を生かした試験系で、細胞を分散して軟寒天に封入し、足場非依存的な細胞増殖を検出する試験である。ただし、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞はトリプシン処理などによる分散によってアポトーシスを起こす特異な性質を持つことが知られており、ヒト多能性幹細胞加工製品の場合、単純には軟寒天コロニー形成試験を適用できない。我々は、分散誘導性アポトーシスを抑制すると言われる ROCK 阻害剤存在下にヒト iPS 細胞を分散、軟寒天中に播種した経験があるが、それでもコロニー形成は認められなかった<sup>5)</sup>。フローサイトメトリーや定量 RT-PCR は、特定のマーカータンパク質・マーカー遺伝子の発現を指標に未分化細胞または造腫瘍性細胞を短時間で検出する簡便な系で、フローサイトメトリーの場合は細胞を分離・回収出来る点、定量 RT-PCR はその高い感度が利点である。我々は、初代培養ヒト体細胞中にヒト iPS 細胞を添加して検討した結果、フローサイトメトリーでは 0.1%、定量 RT-PCR の場合には 0.002% の存在比のヒト iPS 細胞を有意に検出することができることを明らかにしている<sup>5)</sup>。不死化細胞を *in vitro* で検出する系としては、所定の培養期間を超えて細胞を培養し、その増殖特性を解析する試験がある。これらを組み合わせて未分化細胞および不死化細胞の存在を否定できれば、最終製品の造腫瘍性はかなり低いことが示唆されるが、臨床試験に進むことの妥当性は、投与細胞数、投与部位、リスクマネジメントプラン、あるいは *in vivo* 造腫瘍性試験データ等によって製品ごとに判断されるべきだと考えられる。

### 1.3.4 ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

加工されていないヒト体細胞・体性幹細胞を使った移植医療の現場では造腫瘍性試験がほとんど行われていないことから明らかなように、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の原材料となる体細胞・体性幹細胞には、造腫瘍性がないと一般的に考えられている。従って、ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品の造腫瘍性に関しては、「加工後の最終製品中に目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が混入しているか」という懸念と「投与細胞が、生着する微小環境において腫瘍を形成するか」という懸念についてのみ検討すればよいということになる。

特に、製品中の細胞がドナーでの基本機能と同様の基本機能を示すことを期待して製品を使用（「相同の使用」(homologous use) という）する場合には、「最終製品中に目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が混入しているか」ということが適切な試験（細胞増殖特性解析等）により十分に否定できれば、造腫瘍性については移植医療と同レベルと考えられ、それ以上の検討は必

表 1 主な造腫瘍性関連試験の能力と限界

in vivo 試験法				
試験法	測定事項	目的	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 ● 膝がん、乳がん、グリア細胞腫、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
NOG/NSG 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	目的	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 = マーカー(-)の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ ● 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	細胞の検出	● 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 = マーカー(-)の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ
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	● in vivo 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 ● ヒト 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 in situ 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			