

問題は改善されることが期待される。

本研究の結果をもとに、更に各種の造腫瘍性試験系のバリデーションを進め、それらの能力と限界を見極めたうえで、一段と高性能な造腫瘍性試験の開発を行うと同時に、試験法の標準化をすすめることにより、細胞・組織加工製品の品質評価・工程評価および安全性評価を容易にし、細胞・組織加工製品ならびに再生医療・細胞治療の実用化が促進されることが期待される。

### **E-2 細胞・組織加工製品の感染制御法の開発**

Cycleave RT-ICAN 法を用いた HBV ウイルスゲノム核酸検出は、ウイルス否定試験に十分実用可能であると考えられる。今後は、実用性についても立証をより堅固なものにするべく、(1) 現プロトタイプ技術を用いた検体検査 (iPS 細胞, ES 細胞, 体性幹細胞など) の実施例を増やし、その有用性評価データの蓄積をすすめる必要がある。また、(2) 本法に対してのリアルタイム蛍光検出技術適用における問題点の改善や、(3) HCV, HIV-2, HTLV-1&2, Parvo19, CMV, EBV 等に代表される他の個別ウイルス検出系の構築、および、(4) それらを組み合わせたマルチプレックスな検出系となる (MFLC-ICAN : Multiplex-Ladder Forming Cycleave ICAN) 法への斬新かつ確実な技術開発に努める必要がある。本年度の研究成果は、これらの (1) ~ (4) に示したウイルス遺伝子の網羅的検出系としての完成にまた一步前進した画期的な基盤技術を築いたという点で、その意義は大きいと考えられる。

### **E-3 細胞・組織加工製品の免疫原性制御法の開発**

本研究では糖鎖を指標として、ヒト細胞中の異種動物抗原糖鎖の混入ならびに混入原因について調査するとともに、糖鎖を指標とする

iPS 細胞とその起源細胞の特性評価の実行可能性について検証した。糖鎖は動物種特異的であり、ヒト以外の動物種でのみ発現する幾つかの糖鎖は、iPS 細胞への異種動物成分混入を評価する指標として有用性が高いと言える。

### **F. 健康危険情報**

なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y. A novel *in vitro* method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One* (submitted)
2. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Okura H, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of *in vivo* tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R $\gamma^{null}$  mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *PLoS One* (submitted)
3. 佐藤陽治 再生医療／細胞治療における細胞培養に関する規制 『再生医療の細胞培養技術開発と応用展開』株式会社シーエムシー出版 (印刷中)
4. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療製品の造腫瘍性評価 最新医学 (印刷中)
5. 佐藤大作, 佐藤陽治 規制関連 『再生医療用語集』(印刷中)
6. 村岡ひとみ, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の臨床研究から実用化までの道のり 老年医学 (印刷中)
7. 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来移植細胞中に混入する造腫瘍性細胞／未分化細胞の *in vitro* 検出法 *Cytometry Research* (印刷中)
8. 安田智, 佐藤陽治 再生医療製品の品質関連規制と対応の留意点 『動物細胞の培養を成功させる条件設定集』技術情報協会 (印刷中)
9. 田埜慶子, 草川森士, 佐藤陽治 「細胞・組織加工製品の製造における造腫瘍性評価」技術情報協会 (印刷中)
10. 田埜慶子, 佐藤陽治 再生医療製品の素材としての多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) の品質 レギュラトリーサイエンス学会誌 2014;4:71-77.
11. 中島啓行, 安田智, 佐藤陽治 ヒトES・iPS 細胞に由来する再生医療製品の造腫瘍性をどう見るか? 実験医学別冊ES・iPS 細胞実験スタンダード 羊土社, 東京 (2014), pp. 61-69
12. 佐藤陽治 ヒト人工多能性幹細胞由来移植細胞の製造管理のための *in vitro* 造腫瘍性評価系の開発 薬学雑誌 2013;133:1381-8.
13. Kanemura H, Go MJ, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, Sato Y, Takahashi M, Kawamata S. Pigment Epithelium-Derived Factor Secreted from Retinal Pigment Epithelium Facilitates Apoptotic Cell Death of iPSC. *Sci Rep*. 2013;3:2334.
14. 草川森士, 佐藤陽治 再生医療・細胞治療のレギュレーション—日米欧三極の比較— 再生医療 2013;12(2):145-149.
15. Sato Y, Tsutsumi H, Sawada R, Suzuki T, Yasuda S. Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-proceed products. *Bull Natl Inst Health Sci*. 2013;131:16-19.
16. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. *In vitro* detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Methods in Stem Cells and Tissue Repair*, in press.
17. 五十嵐友香, 佐藤陽治 再生医療製品の造腫瘍性・悪性腫瘍形成能の評価 医学のあゆみ. 2013; 246: 1069-70.
18. Moriyama M, Moriyama, Uda J, Matsuyama A, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2014;134(6): 1627-35.
19. Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. *PLoS One*. 2013;8(6):e66274.
20. Takayama K, Nagamoto Y, Mimura N, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M,

- Hayakawa T, Kawabata K, Mizuguchi H. Long-Term Self-Renewal of Human ES/iPS-Derived Hepatoblast-like Cells on Human Laminin 111-Coated Dishes. *Stem Cell Reports*. 2013;1(4):322-335.
21. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Okano T, Furue MK, Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF $\beta$  receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. *Development*. 2014;141(1):91-100.
  22. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Kanda K, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*. 2013;34(7):1781-9.X
  23. Kinoshita M, Nakatsuji Y, Suzuki S, Hayakawa T, Takehi K. Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method. *J Chromatogr A*. 2013;1309:76-83.
  24. Iwatsuka K, Watanabe S, Kinoshita M, Kamisue K, Yamada K, Hayakawa T, Suzuki T, Takehi K. Free glycans derived from glycoproteins present in human sera. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013;928:16-21.
  25. Yodoshi M, Iikeda N, Yamaguchi N, Nagata M, Nishida N, Takehi K, Hayakawa T, Suzuki S. A novel condition for capillary electrophoretic analysis of reductively aminated saccharides without removal of excess reagents. *Electrophoresis*. 2013; 34(22-23), 3198–3205.
  26. Kinoshita M, Mitsui Y, Kakoi N, Yamada K, Hayakawa T, Takehi K. Common Glycoproteins Expressing Polylactosamine-Type Glycans on Matched Patient Primary and Metastatic Melanoma Cells Show Different Glycan Profiles. *J Proteome Res*. 2014;13(2):1021-33.
  27. Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Stem Cells & Dev* (2014) in press.
  28. 森山博由, 森山麻里子, 早川堯夫.『ヒト脂肪由来間葉系幹細胞における効率的かつ厳密に発現制御可能なレンチウイルス発現システムの構築』Sept, 18, 2013. *BioMed circus*.
  29. Iwatsuka K, Iwamoto H, Kinoshita M, Inada K, Yasueda SI, Takehi K. Comparative Studies of N-Glycans and Glycosaminoglycans Present in SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea) Cells and Corneal Epithelial Cells from Rabbit Eyes. *Curr Eye Res*. 2014 in press.

## G-2 学会発表

1. Satoh M, Ohki T, Kubo T, Sato Y, Muto S. Study of immunomodulatory effects in human mesenchymal stem cells. 第87回日本薬理学会年会(2014年3月21日, 仙台)
2. Sato Y. Tumorigenicity tests for human cell-processed therapeutic products. IABS-JST Joint Workshop “Challenges Toward Sound Scientific Regulation of Cell Therapy Products”, Kyoto, Japan (2014年3月7-8日)
3. 佐藤陽治 再生医療等製品の品質・安全性確保のための技術的課題 第13回日本再生医療学会総会(2014年3月6日, 京都)
4. 佐藤陽治 The Johnson & Johnson Innovation Award 受賞講演「ヒト多能性幹細胞加工製品に残存する未分化多能性幹細胞の高感度検出法の開発」 第13回日本再生医療学会総会(2014年3月5日, 京都)
5. 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 松山さと子, 川真田伸, 澤芳樹, 佐藤陽治 デジタルPCRを用いたヒトiPS細胞由来分化細胞に残存する未分化iPS細胞の高感度検出法の開発 第13回日本再生医療学会総会(2014年3月5日, 京都)
6. 城しおり, 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 佐藤陽治 ヒトiPS細胞の分化プロペンシティ予測のための細胞特性プロファイ

- リング 第 13 回日本再生医療学会総会  
(2014 年 3 月 4 日, 京都)
7. 田埜慶子, 安田智, 梅澤明弘, 佐藤陽治  
ヒト多能性幹細胞由来再生医療製品中に  
混入する未分化細胞の高効率培養法の開  
発 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014  
年 3 月 4 日, 京都)
  8. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S,  
Kawamata S, Sato Y. Application of droplet  
digital PCR technology to detection of  
residual undifferentiated cells in  
cardiomyocytes derived from human iPS  
cells. World Stem Cell Summit 2013, San  
Diego (2013年12月4-6日)
  9. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada  
N, Kuroda T, Sawada R, Matsuyama A,  
Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y.  
Characterization of *in vivo* tumorigenicity  
test using severe immunodeficient  
NOD/Shi-scid IL2r<sup>null</sup> mice for quality  
assessment of human cell-processed  
therapeutic products. World Stem Cell  
Summit 2013, San Diego (2013年12月4-6  
日)
  10. Suzuki T, Suresh T, Yamada M, Honma M,  
Suzuki K, Sato Y. Use of the Next  
Generation Sequencers for the Evaluation of  
Genomic Integrity of Cellular Therapy  
Products. The 11<sup>th</sup> International Conference  
on Environmental Mutagens, Foz Do Iguacu,  
Brazil (2013 年 11 月 3-8 日)
  11. Sato Y. Japanese Regulatory Principles for  
Ensuring Quality and Safety of  
Cell/Tissue-Processed Products. World  
Summit on Regenerative Medicine 2013 (by  
TERMIS-AP), Xi'an, China (2013 年 10 月  
20-21 日)
  12. 佐藤陽治 再生医療製品の品質評価法開  
発—残存造腫瘍性細胞の定量— 第 5 回  
MCP 策定会議/第 5 回再生医療薬事講習  
会 (2013 年 10 月 4 日, 東京)
  13. 佐藤陽治 レギュラトリーサイエンスか  
らみた再生医療実現への課題 第 8 回レ  
ギュラトリーサイエンス学会シンポジウ  
ム ~再生医療の早期実現に向けて~  
(2013 年 10 月 3 日, 東京)
  14. 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来移植細胞中  
に残存する未分化細胞の *in vitro* 検出法の  
開発 第 23 回日本サイトメトリー学会学  
術集会 (2013 年 6 月 23 日, 東京)
  15. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Kuroda  
T, Sawada R, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato  
Y. Validation of *in vivo* tumorigenicity test  
for the process control of  
cell/tissue-engineered products using severe  
immunodeficient NOG mice. International  
Society for Stem Cell Research 11 th Annual  
Meeting, Boston (2013 年 6 月 12-15 日)
  16. 佐藤陽治 iPS 創薬の鍵を握る細胞の品  
質管理 バイオフィナンスギルド第 11  
期第 10 回セミナー「iPS 細胞創薬の急進  
展と落とし穴」(2013 年 5 月 17 日, 東京)
  17. 佐藤陽治 再生医療・細胞治療の規制に  
関する国際比較 日本バイオマテリアル  
学会2013年度第1回セミナー (2013年5月  
10日, 東京)
  18. 早川堯夫: 再生医療製品・遺伝子治療薬  
等の品質評価の上での科学的妥当性とは.  
第 10 回医薬品レギュラトリーサイエンス  
フォーラム (基調講演), 東京  
(2013.12.12)
  19. 木下充弘, 三ツ井洋介, 原沙也香, 山田  
佳太, 早川堯夫, 掛樋一晃: ヒトメラノ  
ーマ細胞のグライコフォームフォーカス  
トプロテオミクス, 2013 年 8 月 第 32 回  
日本糖質学会年会 (2013.8.)
  20. 神末和哉, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一  
晃: シースレスインターフェースを備え  
た CE-ESI-MS による糖タンパク質分析と  
その応用. 2013 年 11 月 第 33 回キャピ  
ラリー電気泳動シンポジウム (2013.11.)
  21. 木下充弘, 鈴木茂生, 早川堯夫, 掛樋一  
晃: レーザー回折法を用いる Sub-visible  
領域タンパク質凝集体の解析. 第 134 年  
回日本薬学会年会 (2014.3.)
  22. 岩本裕貴, 安井裕太郎, 岩塚欣也, 鈴木  
茂生, 早川堯夫, 掛樋一晃: ウサギ角膜上  
皮細胞の糖鎖生合成に対する外的物理的  
ストレスの影響 (2014.3.)

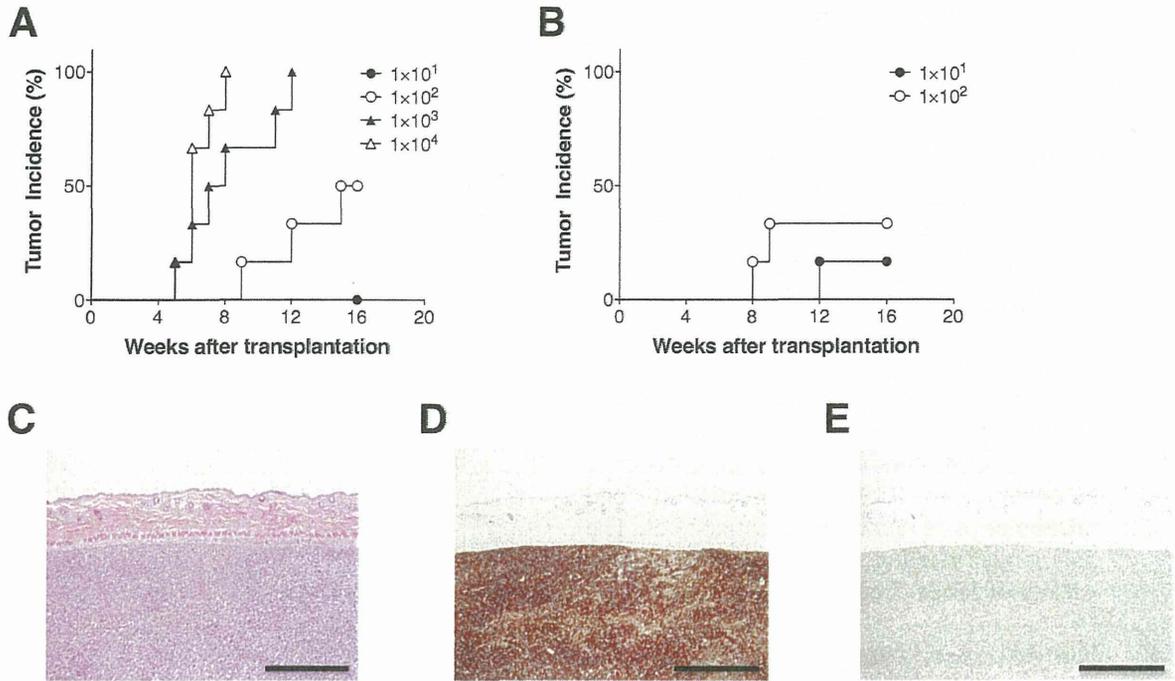
23. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. The 7th Notch meeting, Feb. 14-15, 2013. National Institute of Genetics, Mishima.
24. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 「脂肪組織由来体性幹細胞の製造方法」 関西 8 私大新技術開発説明会, Mar, 1, 2013. JST 本部本館ホール, 東京.
25. 森山麻里子, 宇田純輝, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. Notch シグナルが皮膚を正しく構築する仕組み. 皮膚の会 (総会), Mar, 16-17, 下呂, 岐阜.
26. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞の Notch シグナル亢進と解糖系調節機構の解明. Mar, 21-23, 2013. 第 12 回日本再生医療学会総会.
27. Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Uda Junki, Matsuyama Akifumi, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. INDISPENSABLE ROLES OF BNIP3, AN INDUCER OF AUTOPHAGY, IN BOTH DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. May 8-11, 2013, 2013 International Investigative Dermatology Meeting, Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, Scotland
28. Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 12-15, 2013, 11<sup>th</sup> ISSCR at BOSTON, U.S.A.
29. Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Uda Junki, Matsuyama Akifumi, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. INDISPENSABLE ROLES OF BNIP3, AN INDUCER OF AUTOPHAGY, IN BOTH DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. June 12-15, 2013, 11<sup>th</sup> ISSCR at BOSTON, U.S.A.
30. Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 13, 2013, CBRC, Harvard Medical School, Boston, U.S.A.
31. 野村昇吾, 森山麻里子, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「表皮分化過程における Forkhead box タンパク質の関与」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
32. 曾根千晶, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) を用いたインスリン産生細胞の作製」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
33. 大森重成, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) を用いた効率的なドパミン産生細胞作製」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
34. 石原 慎, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 「低酸素培養における Notch シグナルを介した解糖系調節機能の解明」 June 12-15, 2013, 第 4 回生命機能研究会, 滋賀.
35. 森山麻里子, 宇田純輝, 北川綾弓, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
36. 古谷圭史, 村上健太, 雨宮有佑, 北野亮介, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床段階における指針について. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
37. 村上健太, 古谷圭史, 雨宮有佑, 北野亮介, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. ヒト幹

細胞加工医薬品開発をめざしたヒト体性幹細胞樹立のための基準. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.

38. 北川綾弓, 森山麻里子, 宇田純輝, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/12, 2013, 同志社女子大, 京都.
39. Junki Uda, Mariko Moriyama, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Indispensable roles of BNIP3, an inducer of autophagy, in both differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. The 35<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Dec 3-6, Kobe, Japan.
40. Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露を介する脂肪由来間葉系幹細胞のドーパミン産生細胞分化. Mar, 4-6, 2013. 第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
41. Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞の Notch 進と解糖系調節機構の解明. Mar, 4-6, 2013. 第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
42. Takao Hayakawa. Overview on core technical element for early product development, evaluation and control of cell-based product, IABS-JST Joint Workshop on “Challenges towards sound scientific regulation of cell therapy products”, March 7-8, 2014, Kyoto, Japan.
43. 山田佳太, 栢原春奈, 稲垣瑞穂, 金丸義敬, 矢部富雄, 鈴木徹, 中込治, 中込とよ子, 木下充弘, 掛樋一晃: ヒトロタウウイルス感染機構の解明に向けたグライコムクス解析 2013 年 8 月 第 32 回日本糖質学会年会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

<u>H-1 取得特許</u>	なし
<u>H-2 実用新案登録</u>	なし
<u>H-3 その他</u>	なし



**Figure 1-1 NOG マウスへの HeLa 細胞添加 hMSC の投与と結節形成**

一定量の HeLa 細胞と  $10^6$  個または  $10^7$  個の hMSC とをマトリゲル内で混合した標品を NOG マウスに皮下投与し 16 週間観察した.  $10^6$  個の hMSC に HeLa 細胞を添加した群 (A) と  $10^7$  個の hMSC に HeLa 細胞を添加した群における, 腫瘍発生の時間経過を示す (N=6).  $10^6$  個の hMSC に  $10^4$  個の HeLa 細胞を添加した標品を投与した際に形成された腫瘍の H&E 染色像 (C), HLA 抗体による染色像 (D) およびビメンチン (間葉系細胞のマーカー) に対する抗体による染色像 (E). スケールは  $500\mu\text{m}$

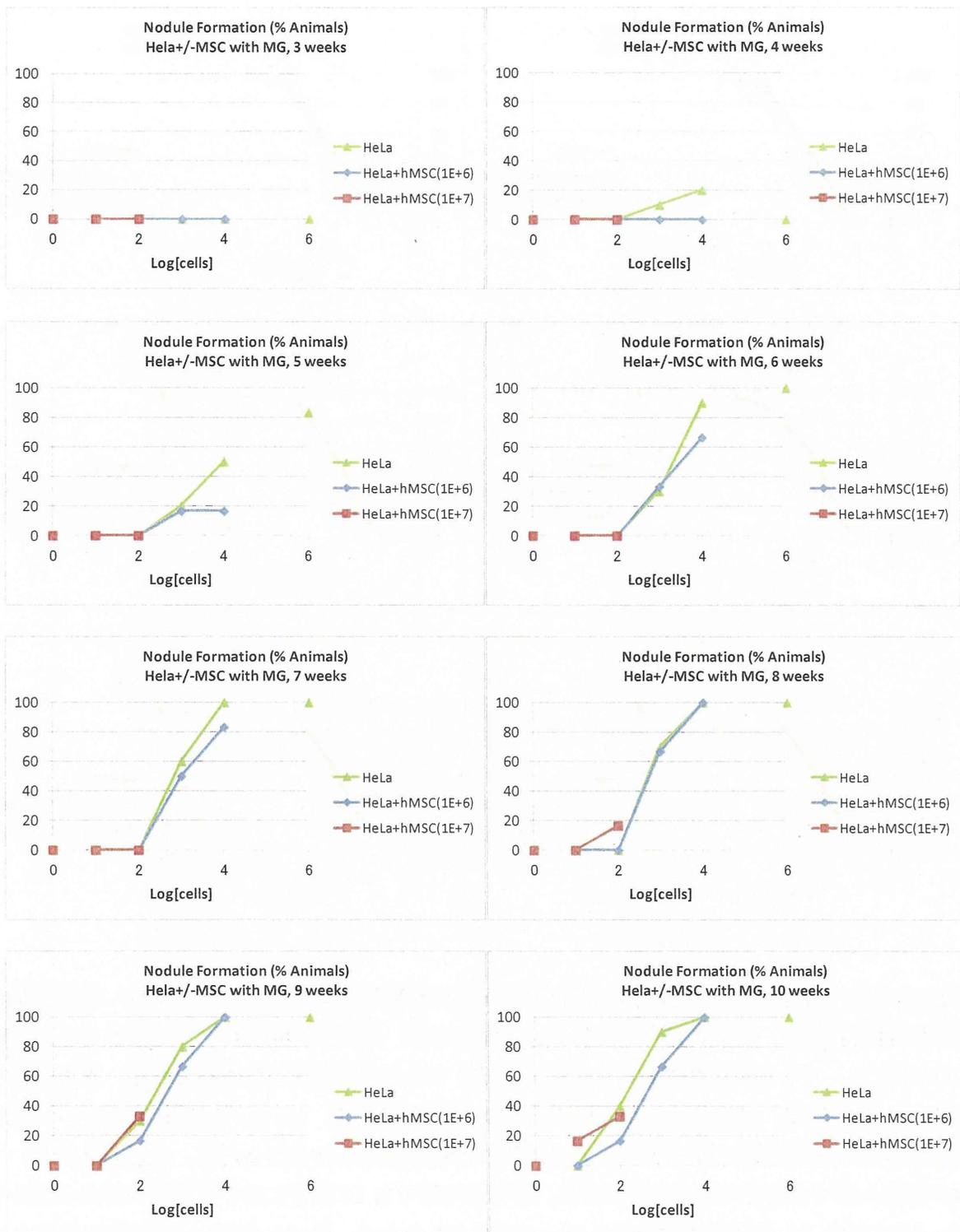
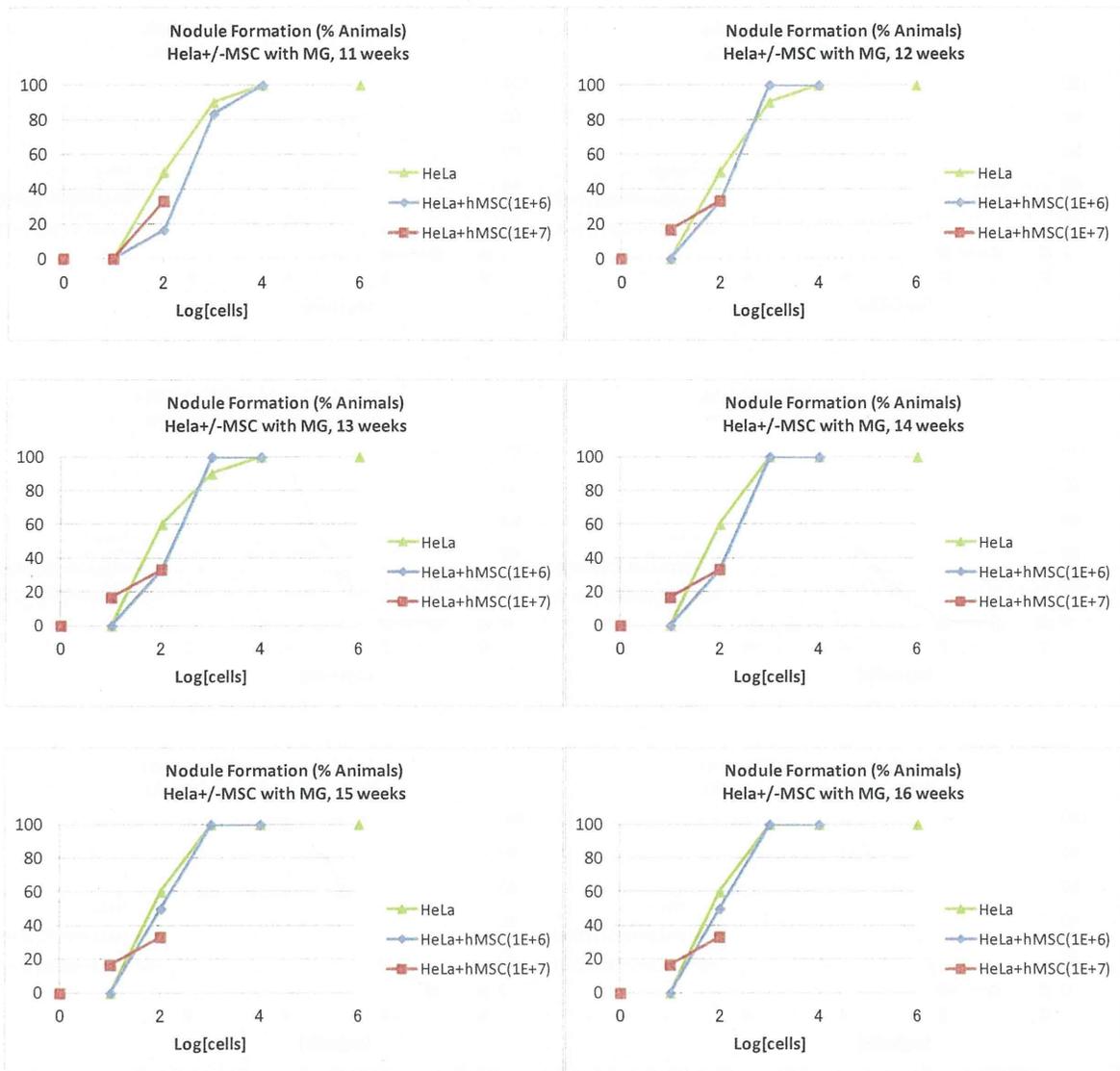
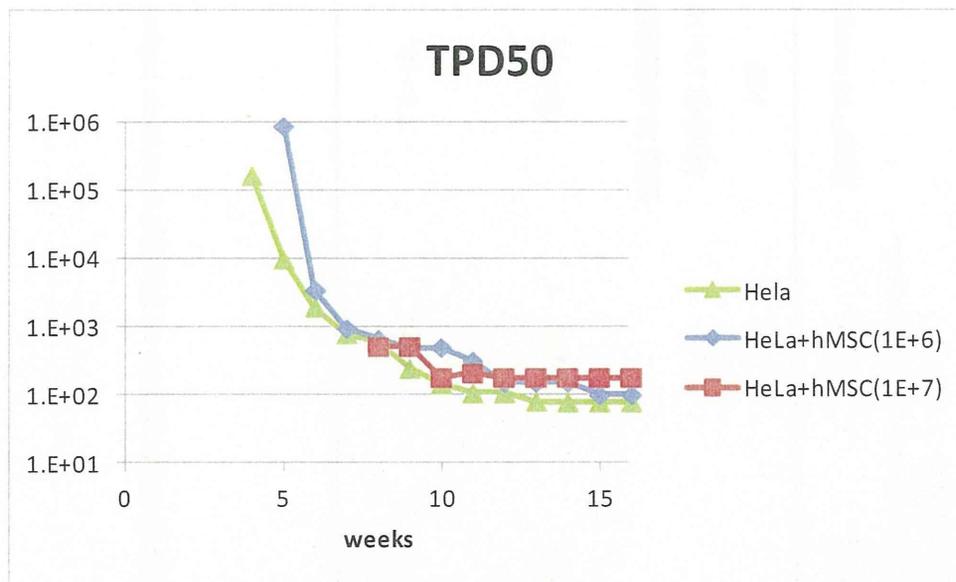


Figure 1-2 NOG マウスへの HeLa 細胞添加 hMSC の投与と結節形成確率の用量 - 作用関係



**Figure 1-2 NOG マウスへの HeLa 細胞添加 hMSC の投与と結節形成確率の用量 - 作用関係(続)**  
 縦軸は腫瘍発生率，横軸は投与された HeLa 細胞の数.  $10^7$  個の hMSC に一定量の HeLa 細胞をスパイクし，マトリゲルに懸濁した状態で NOG マウスの背部皮下に移植した後，腫瘍形成を観察した. その結果，細胞移植後 7 週間後までは HeLa 細胞  $10^1$ ,  $10^2$  個/ $10^7$  個 hMSC のいずれの群においても移植細胞由来と推定される結節の形成は認められなかったが，8 週間後において， $10^2$  個混入群では結節の形成が認められ， $10^1$  個投与群でも 10 週目において結節の形成が認められた. 図は平成 24 年度報告書にあるデータと統合したもの. N=10 (HeLa 単独投与群)または 6 (hMSC との同時投与群)



**Figure 1-3 NOG マウスへの HeLa 細胞添加 hMSC の投与における TPD<sub>50</sub> 値の推移**

縦軸は TPD<sub>50</sub> 値，横軸は細胞移植後の経過時間． HeLa 細胞単独投与群， 10<sup>6</sup> 個の hMSC との同時投与群， 10<sup>7</sup> 個の hMSC との同時投与群のいずれにおいても約 16 週目の時点では TPD<sub>50</sub> 値はほぼ安定していた． 10<sup>7</sup> 個の hMSC との同時投与群については，ダミー変数として HeLa 細胞 10<sup>4</sup> 個を 10<sup>7</sup> 個の hMSC と同時に投与した場合の腫瘍形成率を 100%と仮定して TPD<sub>50</sub> を計算した． 図は平成 24 年度報告書にデータと統合したもの． N=10 (HeLa 単独投与群)または 6 (hMSC との同時投与群)

Table 1-1 HeLa 細胞単独投与後および hMSC との同時投与後 16 週目における TPD<sub>50</sub> 値

Strain	Group	Tumor incidence at indicated HeLa cell dose at 16w					TPD <sub>50</sub> at week 16
		0	1×10 <sup>1</sup>	1×10 <sup>2</sup>	1×10 <sup>3</sup>	1×10 <sup>4</sup>	
NOG	HeLa					6/6 <sup>a</sup>	ND (参考値 7.9×10: 平成 24 年度報告書)
NOG	HeLa/hMSC (1×10 <sup>6</sup> )	0/6	0/6	3/6	6/6	6/6	1.0×10 <sup>2</sup>
NOG	HeLa/hMSC (1×10 <sup>7</sup> )	0/6	1/6	2/6	-	(6/6) <sup>c</sup>	1.8×10 <sup>2</sup>

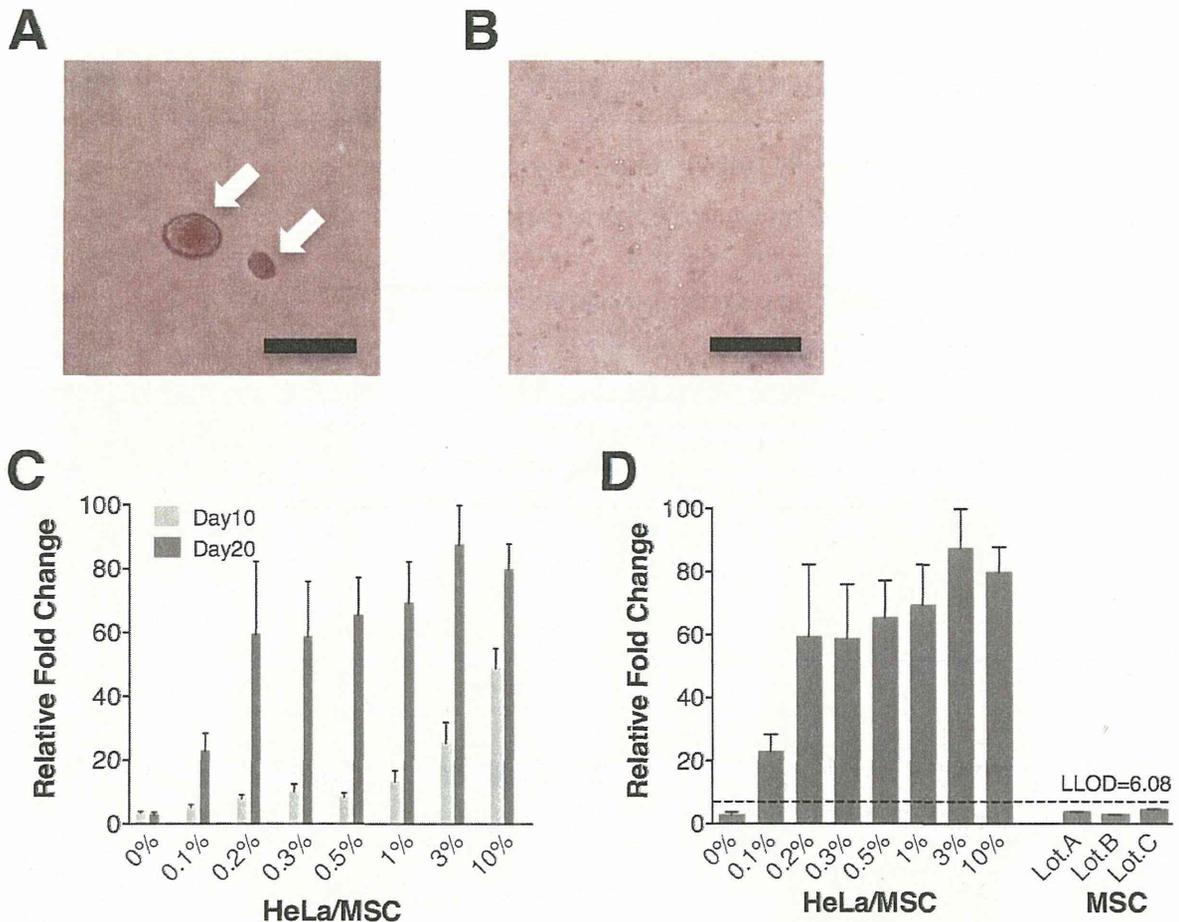
<sup>a</sup>: Positive control

<sup>b</sup>: No. of mice in which tumors formed/total no. of mice inoculated

<sup>c</sup>: Since not all animals inoculated with the highest dose (10<sup>2</sup>) have formed tumors, it was assumed that the tumor incidence of animals at an even higher dose step (a dummy set of data) would have been 100%.

-: Not tested.

ND: Not determined.



**Figure 1-4 HeLa 細胞を添加した hMSC での軟寒天コロニー形成試験**

軟寒天中では 20 日間の間に HeLa 細胞はコロニーを形成するが (A), hMSC ( $1.0 \times 10^4$  cells/well) は全くコロニーを形成しない (B). 矢印は HeLa 細胞由来のコロニーを指す. スケールは  $250\mu\text{m}$ .  $1.0 \times 10^4$  個の hMSC に一定の混入率で HeLa 細胞をスパイクした際のコロニー形成を, 10 日間ないし 20 日間観察した (C). HeLa 細胞をスパイクした hMSC および 3 ロットの hMSC (HeLa 細胞添加なし) を軟寒天中で 20 日間培養した際の生細胞シグナル (D). 生細胞数は, CytoSelect™ キットを用いて評価した. 下方検出限界は 3 ロットの hMSC の生細胞シグナルの平均値にその標準偏差の 3.3 倍を足した数値として算出した. 数値はブランク (細胞添加なしの軟寒天ウェル) の値でノーマライズし, 平均値 $\pm$ 標準偏差として表示した (N=3).

## Primer、Probeの設計\_HBV

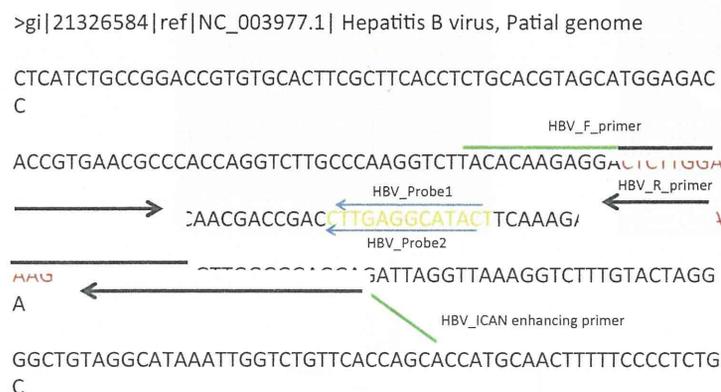


図 2-1 : HBV ウイルスゲノム DNA 配列増幅可能領域および Cycleave RT-ICAN 法で用いた primer の設定領域

## Primer、Probeの反応確認\_HBV

### Primer, Probe set 1

ICANF ; HBV\_F  
CTCTTGGACTCTCAGCA(AUG)  
ICANR ; HBV\_R  
TCCTCCAGTCTTTAAACA(MAC)  
Probe ; HBV\_probe1  
Eclips-AGT(A)TGCCTCAA-Cy5

### Primer, Probe set 2

ICANF ; HBV\_F  
CTCTTGGACTCTCAGCA(AUG)  
ICANR ; HBV\_R  
TCCTCCAGTCTTTAAACA(MAC)  
Probe ; HBV\_probe2  
Eclips-GT(A)TGCCTCAAG-Cy5

(斜字)はRNA

### Primer, Probe set 3

HBV\_ICAN enhancing primer  
tcctctgtgtaCTCCTCCCCCAACTCCTCCC  
ICANF ; HBV\_F  
CTCTTGGACTCTCAGCA(AUG)  
ICANR ; HBV\_R  
TCCTCCAGTCTTTAAACA(MAC)  
Probe ; HBV\_probe1  
Eclips-AGT(A)TGCCTCAA-Cy5

### Primer, Probe set 4

HBV\_ICAN enhancing primer  
tcctctgtgtaCTCCTCCCCCAACTCCTCCC  
ICANF ; HBV\_F  
CTCTTGGACTCTCAGCA(AUG)  
ICANR ; HBV\_R  
TCCTCCAGTCTTTAAACA(MAC)  
Probe ; HBV\_probe2  
Eclips-GT(A)TGCCTCAAG-Cy5

図 2-2 : HBV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleave RT-ICAN 法で用いた primer 配列情報

## Primer、Probeの反応確認\_HBV

### ICAN反応

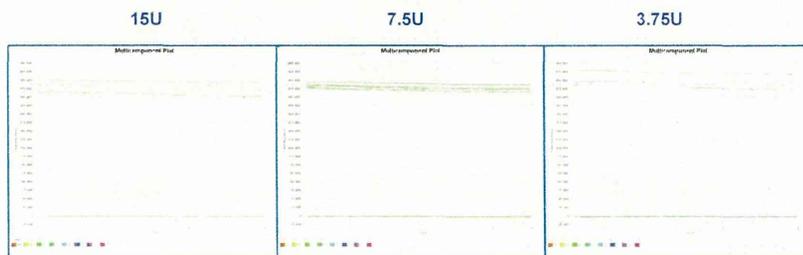
HBV plasmid DNA (ATCC45020D) 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup>, 10<sup>0</sup>, NTC  
ICAN buffer  
ICAN F primer(1uM)  
ICAN R primer (1uM)  
ICAN enhancing primer(0 or 0.04uM)  
Cycling probe (0.2uM)  
BcaBEST DNA Pol. 11U  
Tli RNaseH 3.75U 7.5U 15U/25ul  
55C, 90min

図 2-3 : HBV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleave RT-ICAN 法の確認反応条件

## Primer、Probeの反応確認\_HBV

Primer, Probe  
set 1

Probeによる  
検出されず。



Primer, Probe  
set 2

Probeによる  
検出されず。

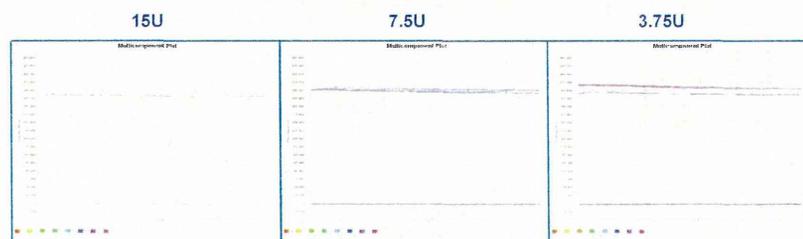
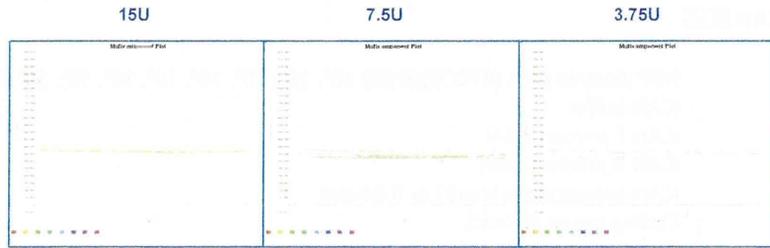


図 2-4 : HBV ウイルスゲノム DNA 検出用新規アルゴリズムにより設計した Primer,Probe ペアを用いた Probe 発色検出による qPCR 試験

# Primer、Probeの反応確認\_HBV

Primer, Probe set 3

Probeによる検出されず。



Primer, Probe set 4

10<sup>3</sup> copyのtemplateを検出

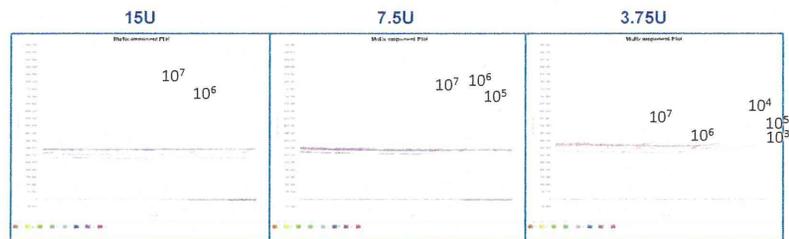


図 2-5 : HIV-detective Ladder forming RT-ICAN 法にて Primer, Probe 設計に成功したアルゴリズムをベースに設計した Primer,Probe を用いた Probe 発色検出による qPCR 試験

## Cycleave PCRによるHBVの検出

### PCR

HBV plasmid DNA (ATCC45020D) 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup>, 10<sup>0</sup>, NTC  
 Cycleave PCR Reaction Mix  
 PCR F primer(0.2uM)  
 PCR R primer (0.2uM)  
 HBV\_Probe1\_FAM or HBV Probe2\_FAM (0.2uM)

95 °C, 30sec  
 95 °C, 5sec  
 55 °C, 10sec } 45 cycles      3.75U/reaction Tli RNaseH濃度  
 72 °C, 20sec

Name	Sequence
PCR HBV F primer	ctcttgactctcagca
PCR HBV R primer	tcctcccagctctttaaca
HBV_Probe1_FAM	Eclips-AGT <sup>a</sup> TGCCTCAA-FAM
HBV_Probe2_FAM	Eclips-GT <sup>a</sup> TGCCTCAAG-FAM

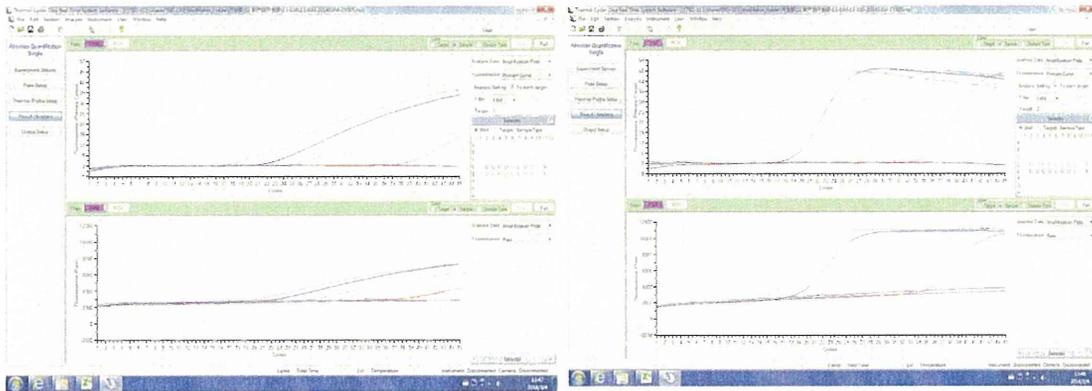
図 2-6 : Cycleave-ICAN 法による HBV ウイルスゲノム DNA 検出のための反応条件

# Cycleave PCRによるHBVの検出

DNA プライマー

HBV\_Probe1\_FAM

HBV\_Probe2\_FAM



Cycleave PCRによる検出感度は10 copy  
HBV\_Probe2の方が切断効率が良い。

図 2-7 : Cycleave-ICAN 法による HBV ウイルスゲノム DNA 検出

## Primer、Probeの設計 \_ HCV

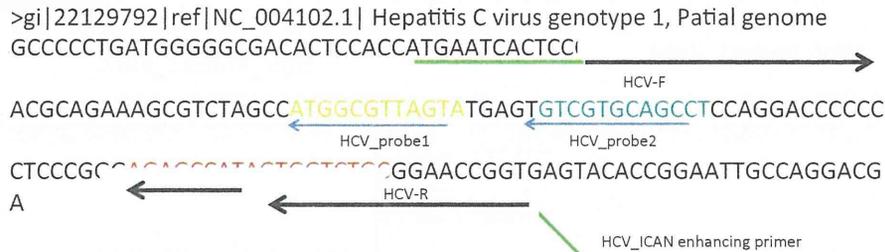


図 2-8 : HCV ウイルスゲノム DNA 配列増幅可能領域および Cycleave RT-ICAN 法で用いた primer の設定領域

## Primer、Probeの反応確認\_HCV

### Primer, Probe set 1

ICANF ; HCV\_F  
 CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)  
 ICANR ; HCV\_R  
 GCAGACCACTATGGC(UCU)  
 Probe ; HCV\_probe1  
 Eclips-TACT(A)ACGCCAT-Rox

### Primer, Probe set 2

ICANF ; HCV\_F  
 CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)  
 ICANR ; HCV\_R  
 GCAGACCACTATGGC(UCU)  
 Probe ; HCV\_probe2  
 Eclips-AG(G)CTGCACGAC-Rox

(斜字)はRNA

### Primer, Probe set 3

HCV\_ICAN enhancing primer  
 gggagtgattcaCTCACCGTTCCGAGACCA  
 ICANF ; HCV\_F  
 CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)  
 ICANR ; HCV\_R  
 GCAGACCACTATGGC(UCU)  
 Probe ; HCV\_probe1  
 Eclips-TACT(A)ACGCCAT-Rox

### Primer, Probe set 4

HCV\_ICAN enhancing primer  
 gggagtgattcaCTCACCGTTCCGAGACCA  
 ICANF ; HCV\_F  
 CTGTGAGGAACTACTGTC(UUC)  
 ICANR ; HCV\_R  
 GCAGACCACTATGGC(UCU)  
 Probe ; HCV\_probe2  
 Eclips-AG(G)CTGCACGAC-Rox

図 2-9 : HCV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleave RT-ICAN 法で用いた primer 配列情報

## Primer、Probeの反応確認\_HCV

### ICAN反応

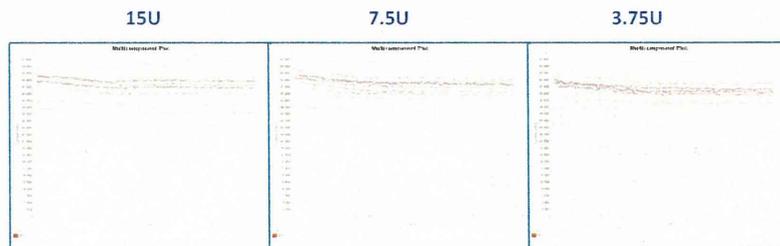
HCV plasmid DNA (pCMV-3010)  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ , NTC  
ICAN buffer  
ICAN F primer(1uM)  
ICAN R primer (1uM)  
ICAN enhancing primer(0 or 0.04uM)  
Cycling probe (0.2uM)  
BcaBEST DNA Pol. 11U  
Tli RNaseH 3.75U 7.5U 15U/25ul  
55C, 90min

図 2-10-1 : HCV ウイルスゲノム DNA 検出用 Cycleave RT-ICAN 法の確認反応条件

## Primer、Probeの反応確認\_HCV

Primer, Probe  
set 1

Probeによる  
検出されず。



Primer, Probe  
set 2

Probeによる  
検出されず。

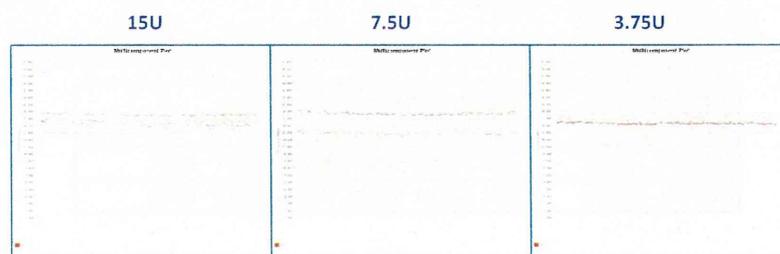


図 2-10-2 : HCV ウイルスゲノム DNA 検出用新規アルゴリズムにより設計した Primer,Probe ペアを用いた Probe 発色検出による qPCR 試験

## Primer、Probeの反応確認\_HCV

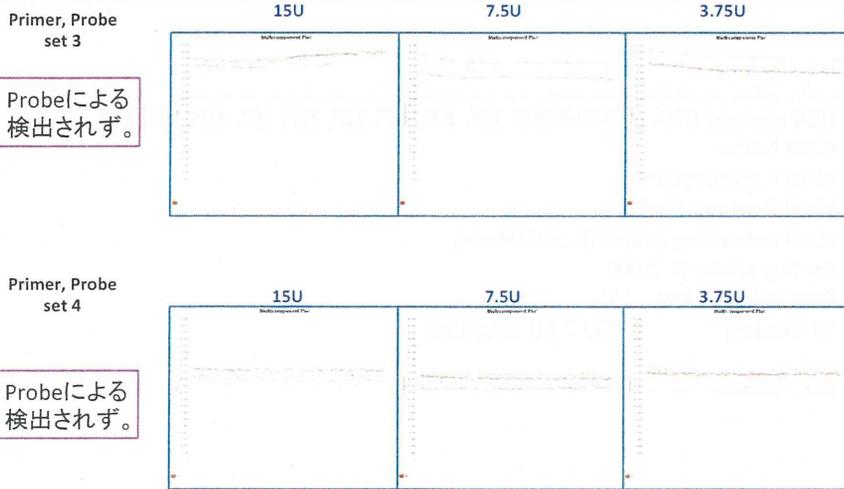


図 2-11 : HIV-detective Ladder forming RT-ICAN 法にて Primer, Probe 設計に成功したアルゴリズムをベースに設計した Primer,Probe を用いた Probe 発色検出による qPCR 試験

## Cycleave PCRによるHCVの検出

### PCR

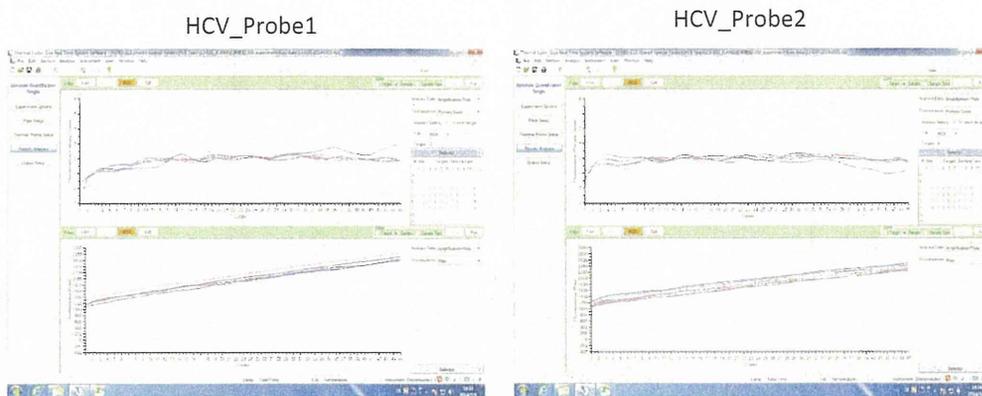
HCV plasmid DNA (pCMV-3010)  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ , NTC  
 Cycleave PCR Reaction Mix  
 PCR F primer(0.2uM)  
 PCR R primer (0.2uM)  
 HCV\_Probe1 or HCV Probe2 (0.2uM)

95 °C, 30sec  
 95 °C, 5sec  
 55 °C, 10sec  
 72 °C, 20sec } 45 cycles

PCR_HCV-F	ctgtgaggaactactgtc
PCR_HCV-R	gcagaccactatggc
Probe_HCV1	Eclips-TACTaACGCCAT-ROX
Probe_HCV2	Eclips-AGgCTGCACGAC-ROX

図 2-12-1 : Cycleave-ICAN 法による HCV ウイルスゲノム DNA 検出のための反応条件

# Cycleave PCRによるHCVの検出



Probe設定精度を上げててもCycleave PCRにおいてHCVの検出が難しい。

図 2-12-2 : Cycleave-ICAN 法による HCV ウイルスゲノム DNA 検出

# SYBR PCRによるHCVの検出

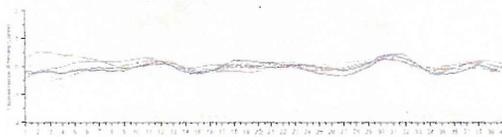
## 方法

HCV plasmid DNA (pCMV-3010) 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup>, 10<sup>0</sup>, NTC  
 SYBR Premix ExTaq (Tli RNaseH Plus)  
 PCR F primer(0.2uM)  
 PCR R primer (0.2uM)

PCR HCV-F_long	actcccctgtgaggaaactactgtc
PCR HCV-R_long	accggtlccgcagaccactalggc

95 °C, 30sec  
 95 °C, 5sec } 40 cycles  
 60 °C, 30sec }

## 結果



本Primer setにおいて、PCR増幅が確認できない。

図 2-13 : Cycleave-ICAN 法による HCV ウイルスゲノム DNA 検出