

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 26 年 12 月 25 日 (2014.12.25)

【公表番号】特表 2012-506702 (P2012-506702A)

【公表日】平成 24 年 3 月 22 日 (2012.3.22)

【年通号数】公開・登録公報 2012-012

【出願番号】特願 2011-533384 (P2011-533384)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 1 0 2

C 1 2 N 5/00 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成 26 年 11 月 7 日 (2014.11.7)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

霊長類の体細胞を再プログラムする方法であって、以下の工程、

(1) S V 4 0 T 抗原および 1 つまたは複数個の能力決定因子をコードする少なくとも 1 種の非ウイルスエピソームベクターを、霊長類体細胞を再プログラムするのに十分な条件の下で、該霊長類体細胞に導入する工程であって、前記少なくとも 1 種の非ウイルスエピソームベクターが、単一の形質導入を使用して、前記霊長類体細胞に導入され、前記霊長類体細胞が、胎児または出生後の個体から得られたものである工程、

(2) 前記細胞を培養して、前記霊長類体細胞より高い能力レベルを有する再プログラムされた細胞を得る工程であって、該再プログラムされた細胞が、前記胎児または出生後の個体と遺伝的に同一であり、かつ 1 つまたは複数個の能力決定因子をコードする少なくとも 1 種の非ウイルスエピソームベクターを前記体細胞に曝露することに関連するどのような構成要素も含まない工程、  
を含むことを特徴とする再プログラム方法。

【請求項 2】

前記霊長類が、ヒトである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 1 つまたは複数個の能力決定因子が、ヒト OCT - 4、ヒト SOX 2、ヒト LIN 2 8、ヒト NANOG、ヒト c - Myc、およびヒト KLF 4 を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つのベクターが、単一ベクターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記単一ベクターが、少なくとも 1 つの配列内リボソーム進入部位を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記単一ベクターが、順番に、第一のプロモータ、OCT4、IRES2、SOX2、第二のプロモータ、SV40T抗原、IRES2、およびKLF4を含む、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記ベクターが、順番に、第一のプロモータ、OCT4、IRES2、SOX2、第二のプロモータ、c-Myc、IRES2、KLF4、第三のプロモータ、NANOG、IRES2、およびLIN28を含む、請求項4に記載の方法。

【請求項8】

第一のベクターが、順番に、第一のプロモータ、OCT4、IRES2、SOX2、第二のプロモータ、SV40T抗原、IRES2、およびKLF4を含み、第二のベクターが、順番に、第三のプロモータ、OCT4、IRES2、SOX2、第四のプロモータ、NANOG、IRES2、およびKLF4を含み、第三のベクターが、順番に、第五のプロモータ、c-Myc、IRES2、LIN28を含み、前記プロモータが、同一である必要がない、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記第一の、第二の、第三の、第四の、および第5の各プロモータが、伸長因子1 (EF1) 遺伝子プロモータである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

第一のベクターが、順番に、第一のプロモータ、OCT4、IRES2、SOX2、第二のプロモータ、KLF4、IRES2、c-Myc、第三のプロモータ、NANOG、IRES2、およびLIN28を含み、第二のベクターが、順番に、第四のプロモータ、OCT4、IRES2、SOX2、第五のプロモータ、SV40T抗原、IRES2、およびKLF4を含み、前記プロモータが、同一である必要がない、請求項5に記載の方法。

【請求項11】

前記第一の、第三の、第四の、および第五の、各プロモータが、EF1 遺伝子プロモータであり、また第二のプロモータが、サイトメガロウイルス・前初期遺伝子(CMV)プロモータである、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

第一のベクターが、順番に、第一のプロモータ、OCT4、IRES2、SOX2、第二のプロモータ、NANOG、IRES2、およびLIN28を含み、第二のベクターが、順番に、第三のプロモータ、OCT4、IRES2、SOX2、第四のプロモータ、SV40T抗原、IRES2、およびKLF4を含み、ならびに、第三のベクターが、順番に、第五のプロモータ、OCT4、IRES2、SOX2、第六のプロモータ、c-Myc、IRES2、およびKLF4を含み、前記プロモータが、同一である必要がない、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

霊長類多能性細胞の濃縮された集団であって、以下の工程、SV40T抗原および1つまたは複数個の能力決定因子をコードする少なくとも1種の非ウイルスエピソームベクターを、能力決定因子を発現するのに十分な条件の下で、霊長類体細胞に導入する工程であって、前記霊長類体細胞が、胎児または出生後の個体から得られ、もって、前記体細胞を再プログラムして、前記霊長類多能性細胞を産生する工程を含む方法により産生され、

前記細胞が、前記胎児または出生後の個体と遺伝的に同一であり、かつ前記能力決定因子を前記体細胞に曝露することに関連するどのような構成要素も含まないことを特徴とする、集団。

【請求項14】

前記霊長類が、ヒトである、請求項13に記載の前記集団。

【請求項15】

前記1つまたは複数個の能力決定因子が、ヒトOCT-4、ヒトSOX2、ヒトLIN

28、ヒトNANOG、およびヒトc-Mycを含む、請求項13に記載の集団。

【請求項16】

多能性の誘導に関連するどのような構成要素も実質的に含まない霊長類誘導多能性細胞。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0027

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0027】

ORF上流または下流の発現に関して、様々なプロモータ、IRES配列、および、導入遺伝子の配置の相対的効果を、以前に記述(Yuet al., 上記参照)したように、形質導入後ヒト体細胞を再プログラムできるかをテストするために、様々な導入遺伝子発現カセットをpSIN4、修飾したレンチウイルス・ベースのベクターへと別々にクローニングして評価した。293FT細胞に、下記に示すようにSuperFect(Qiagen, Valencia, CA)を使いIRES1またはIRES2で連結されたOCT4とSOX2を発現するレンチウイルスのプラスミドベクターで形質導入した。細胞は、形質導入2日後に収集した。図1Aは、293FT細胞内のOCT-4とSOX2のウェスタンブロット法による解析を示す。レーン1、pSIN4-EF2-OCT4-IRES1-SOX2、レーン2、pSIN4-EF2-OCT4-IRES2-SOX2、レーン3、pSIN4-EF2-OCT4-F2A-SOX2、レーン4、pSIN4-EF2-OCT4-IRES1-PURO、レーン5、pSIN4-EF2-SOX2-IRES1-PURO、レーン6、プラスミド無し(コントロール)。マウス抗ヒトOCT4モノクローナル抗体(1:500, Santa Cruz, Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, sc-5279)とヤギ抗ヒトSOX2ポリクローナル抗体(1:500, R&D Systems, Minneapolis, MN AF2018)を使用して、OCT4とSOX2それぞれの相対的発現を検出した。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0029

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0029】

実施例2

レンチウイルス・コンストラクトを使用したヒト新生児包皮線維芽細胞の再プログラム化

予備的再プログラムの実験は、レンチウイルスベクターをヒト新生児の包皮線維芽細胞に導入することによって行った。図2Aは、OCT4、SOX2、LIN28、および、さらにc-MYCを導入する場合、NANOGが再プログラム効率にかなりのプラス効果をもたらすことを示し、また、OCT4、SOX2、および、LIN28との組み合わせでは、c-MYCまたはKLF4が無い場合でもNANOGが再プログラムを補助できることを示す。使用したレンチウイルスのコンストラクトは、pSIN4-EF2-OCT4-IRES2-SOX2(O2S)、pSIN4-EF2-NANOG-IRES2-LIN28(N2L)、pSIN4-EF2-LIN28-IRES1-PURO(L)、pSIN4-CMV-c-Myc-IRES1-PURO(M)、pSIN4-EF2-KLF4-IRES1-PURO(K)であった。形質導入20日後、アルカリ・ホスファターゼ-陽性ヒトiPS細胞コロニーを計数した。iPS細胞コロニーの数は、 $2.5 \times 10^4$ 個のヒト新生児包皮線維芽細胞(継代数9)の inputs 由来であった。薄灰色の棒は、再プログラムされて形成した、代表的なヒトES細胞形態を有するコロニーの合計数を表し、濃い灰色棒は、分化が最も少なかった大型コロニーの数を表す。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0035

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0035】

製造元の指示に従い、ヒト真皮線維芽細胞キット (Normal Human Dermal Fibroblasts, Amaxa, Inc. Cat. No. VPD-1001) を使用して、単一のヌクレオフェクション・イベント経由で線維芽細胞にベクターを導入した。ヌクレオフェクション後、照射を受けたマウス胚性線維芽細胞 (MEF) が播種された3個の10cmの皿の上に形質導入した線維芽細胞(それぞれ $\sim 0.8$ から $1.0 \times 10^6$ 細胞)を直ちにプレートした。包皮線維芽細胞培地は一日おきに交換した。4日後、包皮線維芽細胞培地をヒト胚性幹細胞培地 (DMEM/F12培地に以下を補充、20%ノックアウト血清リプレーサー、0.1mMの非必須アミノ酸(全てInvitrogen Corp.製)、1mMのグルタマックス、0.1mMのメルカプトエタノール、および、前記した100ng/mlのゼブラフィッシュタンパク・塩基性線維芽細胞増殖因子 (zbFGF) (Amit et al., Developmental Biology 227: 271-278 (2006); Ludwig et al., Nature Methods 3: 637-646 (2006)、ここで、それぞれは、参照により全体を説明したものとしてここに組み入れる)と交換した。プレーティング8~10日後、播種されたMEFが、再プログラム培地を維持出来なくなったとき、照射されたMEFで馴化したヒト胚性幹細胞培地を代わりに使用した。適切な時期(形質導入2~3週間後)に、ヒトiPSコロニー発生の徴候としてアルカリ・ホスファターゼにより培養物を着色した。

【誤訳訂正5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0037

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0037】

ヒト新生児包皮線維芽細胞生存物について、導入された導入遺伝子コンストラクトの量の効果も、予備的実験で評価した。図3Cは、ヌクレオフェクション後翌日の細胞コンフルエンスから推定した、ヌクレオフェクションの効率性とヒト新生児包皮線維芽細胞の生存物について、使用されたpCEP4-EGFPのエピソームのベクターの量の効果を示す。ヌクレオフェクションされた約 $1 \times 10^6$ 個の包皮線維芽細胞を6ウェル・プレートの各ウェルにプレートした。灰色線は形質導入されなかった対照の線維芽細胞を表し、黒色線は形質導入された線維芽細胞を表す。

【誤訳訂正6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0039

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0039】

図4Bは、エピソームのベクターの形質導入18日後に観察した形態変化をもつ典型的なコロニーの明視野顕微鏡のイメージを示す。図4Cは、エピソームのベクターの形質導入18日後のアルカリホスファターゼ-陽性コロニーの明視野顕微鏡イメージを示す。

【誤訳訂正7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0040

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

## 【 0 0 4 0 】

形質導入 25 ~ 30 日後、ヒト i P S 細胞コロニーに形態的に類似した多くの非 i P S 細胞コロニーがある故に、再プログラム培養物を一度新鮮な 10 c m の M E F 皿 ( 1 : 3 比 ) に移した。そして、その後の解析のためにコロニーを選択した。図 4 D は、形質導入再プログラム培養後 28 日目の第一継代 6 日後のヒト i P S 細胞コロニーの明視野顕微鏡イメージを示す。スケールバーは、0 . 1 m m を表す。再プログラムされた細胞は、後の解析のために、前述した馴化培地 ( X u e t a l . , N a t . B i o t e c h n o l . 19 : 971 ( 2001 ) 、参照により全体を説明したものとして本明細書に組み込む ) を用い、マトリゲル ( B D B i o s c i e n c e s , B e d f o r d , M A ) のフィーダ・フリー培養で維持した。

## 【 誤 訳 訂 正 8 】

【 訂 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 訂 正 対 象 項 目 名 】 0 0 4 2

【 訂 正 方 法 】 変 更

【 訂 正 の 内 容 】

## 【 0 0 4 2 】

本開示に記述した本発明のいくつかの改作は当業者においては通常の最適化事項であり、本発明の精神もしくは添付の請求項の範囲を逸脱することなく実施できることを理解されたい。明細書で上述した出版物と特許は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明の記述した方法とシステムの様々な改変と変形は、本発明の範囲と精神を逸脱することなく、当業者には明らかである。しかし、上記した本発明の実施例と実施形態は、例証的であり、本発明を限定するわけではない。本発明は、下記の請求項の範囲に付随する実施例と実施形態の全ての改変体を含む。

【表 1】

表1: 遺伝子の再プログラム及び翻訳要素

遺伝子表記	略称	由来	配列番号	受入番号又は配列
<i>OCT4</i>	O	hESC	1	NM_002701
<i>SOX2</i>	S	hESC	2	NM_003106
<i>NANOG</i>	N	hESC	3	NM_024865
<i>LIN28</i>	L	hESC	4	NM_024674
<i>c-Myc</i>	M	hESC	5	NM_002467
<i>KLF4</i>	K	hESC	6	NM_004235
<i>SV40 T</i>	T	pBABE-puro SV40 LT p	7	EF579667
<i>TERT</i>	TERT	pBABE-hygro- hTERT	8	NM_198253
<i>IRES1</i>	1	pIRESpuro3	--	
<i>IRES2</i>	2	pIRES2EGFP	--	
<i>F2A</i>	F2A	(合成)	9	
<i>CMV</i>	C		10	
<i>EF1<math>\alpha</math></i>	E		11	
<i>EF2<math>\alpha</math></i>	-		12	

【表 2】

表2:エピソード構築物

番号	名称	大きさ(bp)
1	pCEP4-EGFP	10984
2 <sup>b</sup>	pEP4-E-O2S(2)	13523
3 <sup>b</sup>	pEP4-E-M2K	14293
4 <sup>a</sup>	pCEP4-M2K	13643
5 <sup>b</sup>	pEP4-E-K2M	14268
6 <sup>a</sup>	pCEP4-K2M	13636
7 <sup>b</sup>	pEP4-E-N2K	13819
8 <sup>b</sup>	pEP4-E-T2K	15071
9 <sup>a</sup>	pCEP4-M2L	12852
10 <sup>b</sup>	pEP4-E-N2L	13020
11 <sup>b</sup>	pEP4-E-T2L	14284
12 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-C-M2K	16038
13 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-E-M2K	16680
14 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-C-K2M	16010
15 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-E-K2M	16652
16 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-E-N2K	16206
17 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-E-T2K	17458
18 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-E-N2L	15415
19 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-E-T2L	16679
20 <sup>c</sup>	pEP4-O2S-C-M2L	15247
21 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-E-K2T	17474
22 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-C-M2L-E-N2K	19956
23 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-C-M2K-E-N2L	19956
24 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-C-K2M-E-N2L	19949
25 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-C-M2L-E-T2K	21220
26 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-C-M2K-E-T2L	21220
27 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-C-K2M-E-T2L	21213
28 <sup>c</sup>	pEP4-E-O2S-C-M2L-E-K2T	21224

<sup>a</sup>全ての連結遺伝子カセットは、BamHIと、NheIとの制限部位において、pCEP4-EGFPにクローン化された。

<sup>b</sup>全ての連結遺伝子カセット及びEF1 $\alpha$ プロモーターは、BamHIとSpeI (19)との制限部位において、pCEP4-EGFPにクローン化された。

<sup>c</sup>全ての発現カセットは、amHIと、NruIとの制限部位において、pCEP4-EGFPにクローン化された。

【表 3】

表3:再プログラム活性についての試験したエピソーム構築物の組合せ

pCEP4-EGF( $\mu$ g) の等量	試験 番号	プラスミド	$\mu$ g	形態変化	AP+コロニー /プレート
実験1					
6.3	1	pEP4-E-O2S-C-M2K	9.2	+/-	0
6.3	2	pEP4-E-O2S-K2Neo	9.3	+/-	0
6.3		pCEP4-M2L	7.4		
6.3	3	pEP4-E-O2S-E-N2K	9.3	+/-	0
6.3		pCEP4-M2L	7.4		
6.3	4	pEP4-E-O2S-E-T2K	10	+++	0
6.3		pCEP4-M2L	7.4		
6.3	5	pEP4-E-O2S-E-TERT2K	10.8	+/-	0
6.3		pCEP4-M2L	7.4		
6.3	6	pEP4-E-O2S-C-M2L	8.7	+/-	0
6.3		pEP4-E-N2K	7.9		
6.3	7	pEP4-E-O2S-C-M2L	8.7	+	0
6.3		pEP4-E-T2K	8.6		
6.3	8	pEP4-E-O2S-C-M2L	8.7	+/-	0
6.3		pEP4-E-TERT2K	9.4		
実験2					
3.3	1	pEP4-E-O2S-C-M2K	5.0	+/-	0
3.3	2	pEP4-E-O2S-E-M2K	5.0	+/-	0
3.3	3	pEP4-E-O2S-C-K2M	5.0	+/-	0
3.3	4	pEP4-E-O2S-E-K2M	5.0	+/-	0
2.5	5	pEP4-E-O2S(2)	3.0	+/-	0
2.5		pCEP4-M2K	3.0		
2.5	6	pEP4-E-O2S(2)	3.0	+/-	0
2.3		pEP4-E-M2K	3.0		
2.5	7	pEP4-E-O2S(2)	3.0	+/-	0
2.5		pCEP4-K2M	3.0		
2.5	8	pEP4-E-O2S(2)	3.0	+/-	0
2.3		pEP4-E-K2M	3.0		
1.7	9N	pEP4-E-O2S(2)	2.0	+/-	0
1.5		pEP4-E-N2K	2.0		
1.7		pCEP4-M2L	2.0	+/-	0
1.7	10N	pEP4-E-O2S(2)	2.0	+/-	0
1.7		pEP4-E-N2L	2.0		
1.7		pCEP4-M2K	2.0		
1.7	11N	pEP4-E-O2S(2)	2.0	+/-	0
1.7		pEP4-E-N2L	2.0		
1.5		pEP4-E-M2K	2.0		



1.7	12N	pEP4-E-O2S(2)	2.0	+/-	0
1.7		pEP4-E-N2L	2.0		
1.7		pCEP4-K2M	2.0		
1.7	13N	pEP4-E-O2S(2)	2.0	+/-	0
1.7		pEP4-E-N2L	2.0		
1.5		pEP4-E-K2M	2.0		
2.3	14N	pEP4-E-O2S-E-N2K	3.5	+/-	0
2.1		pCEP4-M2L	2.5		
2.5	15N	pEP4-E-O2S-E-N2L	3.5	+/-	0
2.1		pCEP4-M2K	2.5		
2.5	16N	pEP4-E-O2S-E-N2L	3.5	+/-	0
1.9		pEP4-E-M2K	2.5		
2.5	17N	pEP4-E-O2S-E-N2L	3.5	+/-	0
2.1		pCEP4-K2M	2.5		
2.5	18N	pEP4-E-O2S-E-N2L	3.5	+/-	0
1.9		pEP4-E-K2M	2.5		
実験3					
1.7	9T	pEP4-E-O2S(2)	2.0	++	0
1.4		pEP4-E-T2K	2.0		
1.7		pCEP4-M2L	2.0		
1.7	10T	pEP4-E-O2S(2)	2.0	+	0
1.5		pEP4-E-T2L	2.0		
1.7		pCEP4-M2K	2.0		
1.7	11T	pEP4-E-O2S(2)	2.0	+	0
1.5		pEP4-E-T2L	2.0		
1.5		pEP4-E-M2K	2.0		
1.7	12T	pEP4-E-O2S(2)	2.0	+/-	0
1.5		pEP4-E-T2L	2.0		
1.7		pCEP4-K2M	2.0		
1.7	13T	pEP4-E-O2S(2)	2.0	+/-	0
1.5		pEP4-E-T2L	2.0		
1.5		pEP4-E-K2M	2.0		
2.2	14T	pEP4-E-O2SET2K	3.5	+++	0
2.1		pCEP4-M2L	2.5		
2.3	15T	pEP4-E-O2S-E-T2L	3.5	+	0
2.1		pCEP4-M2K	2.5		
2.3	16T	pEP4-E-O2S-E-T2L	3.5	+	0
1.9		pEP4-E-M2K	2.5		
2.3	17T	pEP4-E-O2S-E-T2L	3.5	+/-	0
2.1		pCEP4-K2M	2.5		
2.3	18T	pEP4-E-O2S-E-T2L	3.5	+/-	0
1.9		pEP4-E-K2M	2.5		
1.9	19	pEP4-E-O2S-E-T2K	3.0	+++	1
2.0		pEP4-E-O2S-E-N2K	3.0		

17		pCBP4-M2L	2.0		
実験4					
6	1	pEP4-E-O2S-C-M2K-E-N2L	10.9	+/-	0
4	2	pEP4-E-O2S-C-M2K-E-N2L	7.3	+++	0
2		pEP4-E-O2S-E-T2K	3.2		
6	3	pEP4-E-O2S-C-K2M-E-N2L	10.9	+/-	0
4	4	pEP4-E-O2S-C-K2M-E-N2L	7.3	++	2
2		pEP4-E-O2S-E-T2K	3.2		
3	5	pEP4-E-O2S-E-N2L	4.2	+/-	0
3		pEP4-E-O2S-E-M2K	4.6		
3	6	pEP4-E-O2S-E-N2L	4.2	++	1
2		pEP4-E-O2S-E-T2K	3.2		
3		pEP4-E-O2S-E-M2K	4.6		
3	7	pEP4-E-O2S-E-N2L	4.2	+/-	0
3		pEP4-E-O2S-C-M2K	4.4		
3	8	pEP4-E-O2S-E-N2L	4.2	+	0
2		pEP4-E-O2S-E-T2K	3.2		
3		pEP4-E-O2S-C-M2K	4.4		
3	9	pEP4-E-O2S-E-N2L	4.2	+/-	0
3		pEP4-E-O2S-E-K2M	4.5		
3	10	pEP4-E-O2S-E-N2L	4.2	+/-	0
2		pEP4-E-O2S-E-T2K	3.2		
3		pEP4-E-O2S-E-K2M	4.5		
3	11	pEP4-E-O2S-E-N2L	4.2	+/-	0
3		pEP4-E-O2S-C-K2M	4.4		
3	12	pEP4-E-O2S-E-N2L	4.2	+	0
2		pEP4-E-O2S-E-T2K	3.2		
3		pEP4-E-O2S-C-K2M	4.4		
2	13	pEP4-E-O2S-C-M2L-E-T2K	3.9	+	0
4		pEP4-E-O2S-E-N2K	5.9		
6	14	pEP4-E-O2S-C-M2K-E-T2L	11.6	+	0
3	15	pEP4-E-O2S-C-M2K-E-T2L	5.8	+	0
3		pEP4-E-O2S-E-N2K	4.4		
6	16	pEP4-E-O2S-C-K2M-E-T2L	11.6	+/-	0
3	17	pEP4-E-O2S-C-K2M-E-T2L	5.8	+	0
3		pEP4-E-O2S-E-N2K	4.4		

6	18	pEP4-E-O2S-C-M2L-E-K2T	11.6	+/-	0
3	19	pEP4-E-O2S-C-M2L-E-K2T	5.8	+/-	0
3		pEP4-E-O2S-E-N2K	4.4		
3	20	pEP4-E-O2S-E-K2T	4.8	+/-	0
3		pEP4-E-O2S-E-N2K	4.4		
2		pEP4-E-O2S-C-M2L	2.8		

+/-: 形態変化を伴なうコロニーは全く又はほとんど観察されなかった。(図4B)

+, ++及び+++: 形態変化を伴なうコロニーの異なる数(少ない方から多い方)を観察した。