

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-530313

(P2018-530313A)

(43) 公表日 平成30年10月18日(2018.10.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2018.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	Z 2 G 0 4 5
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	Y
<b>G O 1 N 33/48 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/48	P

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2018-509827 (P2018-509827)	(71) 出願人	518055165 ネオリス ディアグノスティック フランス国 リヨン, リュ ラエネク 2 8
(86) (22) 出願日	平成28年8月16日 (2016. 8. 16)	(71) 出願人	591100596 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ ディカル フランス国、エフー75013 パリ、リ ュ・ドゥ・トルビアック 101
(85) 翻訳文提出日	平成30年4月10日 (2018. 4. 10)	(71) 出願人	516241740 ソントル レオン ベラード フランス国 リヨン, プロムナード レア エ ナポレオン ブルキアン, 28
(86) 国際出願番号	PCT/FR2016/052083		
(87) 国際公開番号	W02017/029450		
(87) 国際公開日	平成29年2月23日 (2017. 2. 23)		
(31) 優先権主張番号	1501745		
(32) 優先日	平成27年8月19日 (2015. 8. 19)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		
(31) 優先権主張番号	1559962		
(32) 優先日	平成27年10月20日 (2015. 10. 20)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学的因子または生化学的因子によるDNA切断遺伝子毒性作用を個人について予測する方法

(57) 【要約】

少なくとも1種の化学的もしくは生化学的因子、または、化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせによるDNA切断毒性作用に対する、個人から採取した組織の感受性を評価するための方法であって、前記少なくとも1種の化学的もしくは生化学的因子の作用濃度、または、前記化学的因子同士、または生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせに含まれる化学的および/または生化学的因子の作用濃度を設定する工程(a)と、個人の評価対象組織から細胞を採取する工程(b)と、細胞を分散および/または増幅して、細胞サンプルを得る工程(c)と、細胞サンプルと、工程(a)で規定された作用濃度の少なくとも1種の化学的もしくは生化学的因子(または、化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせ)とを、所定の時間にわたり接触させる工程(d)と、DNA二本鎖切断の数、当該数を表わすバイオマーカー、小核の数のうちの少なくとも1つを検出する工程(e)とを含み、工程(b)、(c)、(d)および(e)は、連続して行わなければならない、工程(a)を工程(e)よりも前に行わなければならない、方法。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも 1 種の化学的もしくは生化学的因子、または、化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせによる DNA 切断毒性作用に対する、被験者の組織サンプルの感受性を評価するための方法であって、

前記少なくとも 1 種の化学的もしくは生化学的因子の作用濃度、または、前記化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせに含まれる化学的および/または生化学的因子の作用濃度を設定する工程 (a) と、

被験者の評価対象組織から細胞をサンプル採取する工程 (b) と、

前記細胞を分散および/または増幅して、細胞サンプルを得る工程 (c) と、

前記細胞サンプルと、前記工程 (a) で規定された前記作用濃度の前記少なくとも 1 種の化学的もしくは生化学的因子 (または、前記化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせ) とを、所定の時間にわたり接触させる工程 (d) と、

DNA 二本鎖切断の数、当該数を表わすバイオマーカー、小核の数のうちの少なくとも 1 つを検出する工程 (e) とを含み、

前記工程 (b)、(c)、(d) および (e) は、連続して行わなければならない、前記工程 (a) を前記工程 (e) よりも前に行わなければならない、方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、

前記化学的もしくは生化学的因子、または、前記化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせによる DNA 切断毒性作用に対する、前記組織の感受性を表わす診断スコアを、前記 DNA 二本鎖切断の数 (および/または前記小核の数) および前記作用濃度を使用して求める工程 (f) をさらに含む、方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法において、

二本鎖切断を検出する前記工程 (e) が、好適には、免疫蛍光検査、細胞遺伝学的試験、およびパルス電界電気泳動からなる群から選択される技術を使用して実施される、方法。

## 【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の方法において、

前記工程 (e) において、pH2AX、53BP1、Phospho-DNA-PK、および MDC1 からなる群から選択されるバイオマーカーを検出する、方法。

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法において、

前記 pH2AX バイオマーカーを検出するとともに、好ましくは、該バイオマーカーの核病巣の数と大きさを検出する、方法。

## 【請求項 6】

請求項 4 または 5 に記載の方法において、

細胞核の位置特定に適した対比染色を行うことにより、小核 (MN) を定量化する、方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか 1 つに記載の方法において、

前記工程 (e) において、前記作用濃度が、予め決定された基準濃度  $C_{ref}$  であり、

前記 DNA 二本鎖切断の数を pH2AX 免疫蛍光検査により求め、DAPI 対比染色の後に小核 (MN) の数を検出し、

その後、前記細胞サンプルについて、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref})$  と  $N_{MN}(24h, C_{ref})$  とを求め、

前記細胞サンプルについて、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref})$   $\geq 2$ 、または、 $N_{MN}(24h, C_{ref})$   $\geq 2\%$  であれば、

遺伝子毒性リスクが低いと推論し、および/または、遺伝子毒性リスクが「グループ

10

20

30

40

50

1」であるとし、

前記細胞サンプルについて、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) > 8$ 、または、 $N_{MN}(24h, C_{ref}) > 10\%$ であれば、

遺伝子毒性リスクが非常に高いと推論し、および/または、遺伝子毒性リスクが「グループIII」であるとし、

その他のすべての場合は、遺伝子毒性リスクが中程度であると推論し、および/または、遺伝子毒性リスクが「グループII」であるとする、方法。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 つに記載の方法において、

前記作用濃度が、好適には、予め決定された基準濃度  $C_{ref}$  であり、好適には、この決定は、

(i) いわゆる基準細胞（感受性グループI）を分散および/または増幅することにより細胞サンプルを準備し、該細胞サンプルを複数の分画に細分し、

(ii) 試験対象である前記少なくとも 1 種の化学的または生化学的因子を、前記化学的または生化学的因子の濃度範囲（例えば  $nM$  から  $mM$  にわたる濃度範囲）から選択される複数の濃度で、所定の時間（好ましくは 24 時間）にわたって、前記細胞サンプルの各分画にそれぞれ塗布し、

(iii) 前記細胞サンプルの各分画について、細胞 1 個あたりの  $pH2AX$  病巣の数、および/または、細胞 1 個あたりの小核の数を求め、

(iv) (好ましくは、 $DAPI$  対比染色を使用する  $pH2AX$  マーカー免疫蛍光検査により) 前記  $pH2AX$  マーカーを使用して、観察時間  $t$  および濃度  $C$  において得られる核病巣の平均数（この平均数を  $N_{pH2AX}(t, C)$  と呼ぶ）を求め、

観察時間  $t$  および濃度  $C$  において観察される細胞 100 個あたりの小核の平均数（この平均数を  $N_{MN}(t, C)$  と呼ぶ）を求め、

好ましくは、一度に少なくとも 50 個の核（ガウス標準誤差）について、または、50 個の核についての独立した 3 回の実験（平均値の標準誤差）について行われる測定される、各測定についての標準誤差 を求め、

式： $N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) + 2 = 2$ 、または、 $N_{MN}(24h, C_{ref}) + 2 = 2\%$  が成り立つ濃度としてのいわゆる基準濃度  $C_{ref}$  を求める方法により実施する、方法。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか 1 つに記載の方法において、

前記少なくとも 1 種の化学的因子が、金属または非金属陰イオン、非金属陽イオン、有機陰イオン、有機陽イオン、両性化合物、必要であれば中性無機化合物、必要であれば中性有機化合物、必要であれば有機金属化合物、不溶性化合物から選択される、方法。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれか 1 つに記載の方法において、

前記少なくとも 1 種の化学的または生化学的因子が、（水性または非水性の）液体媒体に溶解した状態、粒子形状、ナノ微粒子形状、細胞膜に固定された状態、気体の状態である、方法。

【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれか 1 つに記載の方法において、

前記少なくとも 1 種の生化学的因子が、（必要であれば組換）ペプチド、抗体、抗原、（必要であれば非活性化）ウイルス、ウイルス断片、細胞断片から選択される、方法。

【請求項 12】

請求項 1 から 10 のいずれか 1 つに記載の方法において、

(i) サンプル採取された上記組織からの細胞を、単離および/または増幅し、これら増幅した細胞が「前記細胞サンプル」を構成し、

(ii) 上記細胞サンプルについて、 $pH2AX$  マーカーを使用して得られる核病巣の平均数を観察時間  $t$  において求め（これら平均数を  $N_{pH2AX}(t)$  とし、前記観察時間

10

20

30

40

50

は  $t = 0$  (前記少なくとも 1 種の化学的もしくは生化学的因子 (または化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせ) に対する非暴露状態である、 $t_0$ ) および、少なくとも、前記細胞サンプルと前記作用濃度の前記少なくとも 1 種の化学的もしくは生化学的因子 (または化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせ) とを、所定時間にわたり接触 (この接触を「遺伝子毒性暴露」と呼ぶ) させた後の  $t_4$  であり、

(iii) 少なくとも前記平均数  $N_{pH_2AX}(t)$  を使用して、前記サンプルの遺伝子毒性暴露に対する感受性グループを判定する、方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法において、

前記細胞サンプルについて、好ましくは少なくとも  $t_0$  および  $t_4$  である時間  $t$  において観察される細胞 100 個あたりの小核の平均数 [% で表わす] (この平均数を  $N_{MN}(t)$  と呼ぶ) をさらに求める、方法。

【請求項 14】

請求項 13 または 14 に記載の方法において、

$t_4$  は、DNA 切断のレベルがその残留値に到達する時間を表す固定値であり、12 時間以上でなくてはならず、好ましくは 12 時間 ~ 48 時間であり、より優先的には約 24 時間である、方法。

【請求項 15】

請求項 8 から 14 のいずれか 1 つに記載の方法において、

前記いわゆる基準細胞が、HF19 細胞株、IMR90 細胞株、48BR 細胞株、70BR 細胞株、142BR 細胞株、155BR 細胞株、MRC5 細胞株、1BR3 細胞株、149BR 細胞株、および MRC9 細胞株から選択され、より好ましくは、1BR3 細胞株、149BR 細胞株、および MRC9 細胞株から選択される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、毒物学の分野に関し、より具体的には遺伝毒性検査方法の分野に関する。より具体的には、本発明は、直接的または間接的に DNA を切断する化学的因子 (具体的には、ある種の金属、殺虫剤、および化学療法用のある種の活性物質) への暴露後の細胞毒性の予測方法に関する。この方法は、複数の細胞パラメータと酵素パラメータとの決定および相互検証、ならびに、評価基準に基づくものである。

【背景技術】

【0002】

ますます多くの文献データによって、二本鎖切断 (DSB) が、修復されない場合には、細胞死亡率および細胞毒性と最も相関性が高い DNA 損傷であり、修復が不十分な場合には、ゲノムの不安定さと癌リスクに最も相関性が高い DNA 損傷であることが報告されている (Jeggio, Loblrich, "DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact?", *Oncogene* 26(56) p.7717-7719 (2007年); Joubert、他、"Radiation biology: major advances and perspectives for radiotherapy", *Cancer Radiotherapy* 15(5) p.348-354 (2011年))。このような結論は、もともとは放射線誘導 DSB について確立されたものであるが、すべての DNA 切断治療について有効であると考えられる。したがって、DSB の定量化と DSB 修復経路の機能性に基づいた、毒性リスクおよび発癌性リスクの評価が有望視されている。しかし、DSB の判定、および、それを制御する修復モデルと信号モデルとは、放射線生物学者や遺伝毒物学者の総意を得るまでには至っていない。反対に、いくつかの研究においては、非修復 DSB の数とヒトの細胞の細胞放射線感受性との間の定量的相関が免疫蛍光検査を利用して示され、現在のパラダイムと対立する分子モデルが提案されている (Joubert、外、"DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?", *Int.J.Radiation Biology* 84(2), p.1-

10

20

30

40

50

19 (2008年); Joubert、外、(2011年の上記記事))。より最近では、同じ研究者グループにより、金属(具体的には、Pb, Cd, Al)に対するヒト組織の特定の反応が発表された(Viau、外、"Cadmium inhibits non-homologous end-joining and over-activates the MRE11-dependent repair pathway", *Mutation Research* 654 p.13-21 (2008年); Gastaldo、外、"Lead contamination results in late and slowly repairable DNA double-strand breaks and impacts upon the ATM-dependent signaling pathways", *Toxicology Letters* 173, p.201-214 (2007年); Gastaldo、外、"Induction and repair rate of DNA damage: A unified model for describing effects of external and internal irradiation and contamination with heavy metals", *J Theoretical Biology* 251 p.68-81 (2008年))。

10

## 【0003】

毒性および癌は、物理的因子(X線、粒子、紫外線、熱)、化学的因子(アルキル化剤、化学療法に使用されるある種の活性物質、ある種の金属)、生物学的因子(ある種のウイルスまたはバクテリア)等の様々な外的因子により引き起こされ得る。これらの遺伝子毒性ストレス要因のうち、電離放射線は、その生物学的作用についての記載が最も豊富な外的因子である(Thomas、外、"Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance response", *International Journal of Radiation Biology*, 89(10) p813-822 (2013年); Colin C.、外、"MRE11 and H2AX biomarkers in the response to low-dose exposure: balance between individual susceptibility to radiosensitivity and to genomic instability", *International Journal of Low Radiation: 8(2)p96-106* (2011年)); Joubert A.、外、"Irradiation in the presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: consequences for computed tomography therapy", *International Journal of Radiation: Oncology Biology Physics*, 62(5) p1486-1496 (2005年))。しかし、その他のすべてのストレス要因については、対ストレス反応の分子モデルおよび細胞モデルの検証、および、パラメータの明確な特定がなされなければならないことが、毒性および発癌性のリスク評価の歴史により示されている。個人的要因が、考慮すべき主要な要因の1つであることは明らかであると言えるが、当該モデルの妥当性が再び問われる(DorrおよびHendry、"Consequential late effects in normal tissues" *Radiation Oncol.* 61(3):223-31 (2001年); Granzotto、外、"Individual susceptibility to radiosensitivity and to genomic instability: its impact on low-dose phenomena" *Health Phys.* 100(3):282 (2011年))。したがって、何らかの遺伝子毒性ストレスに関連するリスクについて信頼性のある診断を行うためには、妥当なパラメータを使用した、十分な数の個人についての確固たるプレデータ、細胞モデルが必要である。

20

30

## 【0004】

現在、ある種の金属およびメタロイド(例えば、Al, Cd, U, As, SeおよびSb)による遺伝子毒性作用、ならびに、それら金属やメタロイドの関連ナノ微粒子形状についての研究がさかんに文献発表されている(Polya およびCharlet, "Increasing arsenic risk?", *Nature Geoscience* 2, p.383-384 (2009年); Akhter、外、"Cancer targeted metallic nanoparticle: targeting overview, recent advancement and toxicity concern", *Curr. Pharm. Des.* 17(18), p.1834-1850 (2011年); Almeida、外、"In vivo biodistribution of nanoparticles", *Nanomedicine (Lond)* 6(5), p.815-835 (2011年); Pereira、外、"Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells", *Aquatic Toxicology* 109, p.11-16 (2012年); Pereira、外、"Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells", *Mutation Research* 750, p.19-26 (2013年))。特に、半導体産業が引き起こす水を介しての暴露、および、殺虫剤に関しての発表が増えている(Garaj-VrhovacおよびZeljezic, "Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Pesticide genotoxicity revealed by comet assay", *Mutation Research* 469(2), p.279-285 (2000年); Garaj-Vrhovac、外、"Efficacy of HUMN cri

40

50

teria for scoring the micronucleus assay in human lymphocytes exposed to a low concentration of p,p'-DDT", Braz J Med Biol Res 41(6), p.473-376 (2008年); Guilherme、外、"Differential genotoxicity of Roundup(R) formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla Anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms", Ecotoxicology 21(5), p1381-90. (2012年) )。しかし、産業発展、大気汚染、および農業生産高の増大の必要性を考慮すれば、これらの2種類の因子が、重大な社会的課題であることは明らかである。実際に、環境的背景においても職業的背景においても、これら2種類の因子は健康に関わる問題の中心である。科学者らの間では、ある種のナノ微粒子酸化化合物が、遺伝子毒性と発癌現象を引き起こすのではないかと疑いがもたれている。ナノ微粒子が有する特定の生物学的作用についての研究は、当然、そのような技術が人間と環境とに及ぼす作用についての研究立案に含まれる。

10

#### 【0005】

電離放射線に対する組織の感受性の問題は、DNA損傷修復メカニズムの問題から切り離すことができないことも知られている。実際、細胞レベルでは、電離放射線はある種の化学結合を切断して、(特に過酸化によって)遊離基や、DNA損傷の原因となるその他の反応種を発生させる。内因性攻撃または外因性攻撃(例えば、電離放射線および遊離基)によってDNAが傷つけられると、受けたエネルギーに応じて各種のDNA損傷(具体的には、塩基損傷、一本鎖切断、および二本鎖切断(DSB))が引き起こされ得る。非修復DSBは、細胞死および毒性に関連し、より具体的には、放射線感受性に関係する(電離放射線への暴露の場合)。修復が不十分なDSBは、ゲノムの不安定さ、突然変異を促進する現象、および癌の素因に関係する。身体は、それぞれの種類のDNA損傷について、特定の修復システムを備えている。DSBに関しては、哺乳類は2つの主要な修復方法を備えている。すなわち、縫合修復(鎖の連結)および組換修復(相同鎖または非同相鎖の挿入)である。

20

#### 【0006】

電離放射線に対する組織の感受性は、各臓器または各個人によって大きく変動することも知られている。FertilおよびMalaiseにより、「内因性放射線感受性」が概念化された("Inherent cellular radiosensibility as a basic concept for human tumor radiotherapy", Int.J. Radiation Oncology Biol. Phys. 7, p.621-629 (1981年); "Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: Analysis of 101 published survival curves", Int.J. Radiation Oncology Biol. Phys. 11, p. 1699-1707 (1985年))。したがって、放射線治療の作用と副作用とについてのさまざまな研究により、特に高い放射線抵抗性を示す人が存在する一方で、放射線感受性を示す人も存在し、また、その放射線感受性は、臨床的に認識されるが重視するほどではない副作用のレベルから、致命的作用までの範囲にわたり得ることがわかっている。放射線感受性が極端に高い稀なケースは、遺伝的起源であることが実証されたようであるが、そのようなケースを別にしても、放射線感受性は、概して、遺伝的素因に端を発するものであると考えられている。つまり、放射線感受性は、個人に特有のものである。

30

40

#### 【0007】

放射線感受性にあてはまることは、癌に対する素因にもあてはまり、より具体的には、放射線誘発癌にあてはまる。したがって、生物学的に過剰な線量は、毒性リスクと発癌リスクの両方を増大させる。よって、DNA切断遺伝子毒性因子への暴露に起因する上記リスクと生物学的過剰線量とを判定可能な予測試験方法を利用できることは、有用であると言える。

#### 【0008】

Joubertらの刊行物("DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response; At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?", published in Int. J. Radiation Biology 84(2), p.107-1

50

25 (2008年))では、ヒトの放射線感受性を3つのグループに分類することが提案された。すなわち、グループI(放射線抵抗性があり、癌リスクの低いグループ)と、グループII(中等度の放射線感受性があり、癌リスクが高いグループ)と、グループIII(放射線感受性が過剰であり、癌リスクが高いグループ)である。この分類は、分子的な評価基準に基づいており、ヒトの放射線感受性のすべてのケースを説明できる。金属や殺虫剤のような化学的因子が誘発する遺伝子毒性ストレスについては、このような個人的要因を考慮した分類は存在しない。

【0009】

H2AXまたはpH2AXが、特にDNA切断因子が使用される場合に、DNA損傷の検出および修復のマーカーとして使用されることは、多くの文献に記載されている。

10

【0010】

国際公開第2014/152873号には、ヒストンH2AXの発現を定量化することにより、化学療法に使用される活性物質の遺伝子毒性を定量化する方法が記載されている。

【0011】

国際公開第2005/113821号には、毒性が最小であるタバコ製品を特定するための方法において、DNA二本鎖切断の検出手段としてpH2AXマーカーを使用することが記載されている。これらの方法では、タバコの煙を所定の時間(15分、20分、30分、40分、または1時間)細胞と接触させる。そして、pH2AX病巣の有無が、免疫蛍光検査により検証される。しかし、この方法は、そこに含まれるDNA切断因子が正確には知られていない化学品のカクテルに関連するものである。

20

【0012】

国際公開第2005/113821号(Vector Tobacco/New York Medical University)には、pH2AXマーカーを使用して、DNA二本鎖切断の検出およびタバコの毒性を評価を行うことが記載されている。H2AXの発現レベルを利用して、DNA二本鎖切断の検出および抗癌剤の有効性の評価を行う別の方法が、国際公開第2014/152873号(Pioma)に記載されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

出願人は、従来技術がこのように広範囲にわたるのにも関わらず、DNA切断を引き起こす化学的因子への暴露に関する、生物学的に過剰な用量およびリスクを定量化する方法が存在しないことに注目した。これらの因子に係る、個人のための遺伝子毒物学的予測方法を提供するという問題には、実効的な解決手段がまだ無い。本発明は、DNA切断を引き起こす化学的因子への暴露に関する毒性リスクを予測するための新規な方法を提案することを目的としている。

30

【課題を解決するための手段】

【0014】

発明者らは、DNA二本鎖切断(DSB)が、その非修復時には、遺伝子毒性を最も好適に予測する損傷であり、その一方、不十分な修復時には、ゲノムの不安定さを最も好適に予測する損傷であるという知見を得、この知見に基づき本発明の方法を完成させた。本発明の範囲において、発明者らは、DSBが、縫合と呼ばれる主要な修復方法、および/または、MRE11依存組換と呼ばれる不完全な修復方法により対処されることを発見した。この2つの修復方法の間の平衡は、個人的要因であって、ATMタンパク質によって制御される。pH2AXマーカーは、縫合修復方法により認識されたDSB部位を示す。MRE11マーカーは、MRE11に依存した不完全な修復により対処されたDSBを示す。pATMマーカーは、H2AXのリン酸化による縫合経路の活性化と、MRE11依存経路の阻害とに関する情報を提供する。

40

【0015】

発明者らは、さらに、酸化型のストレスの後、特に、DSBを誘発するとともに細胞質

50

内での酸化を引き起こすストレスの後に、A T Mタンパク質の細胞質型が細胞核内で移動することを観察した。

【0016】

発明者らは、これらのモデルが、金属、殺虫剤、ナノ微粒子およびある種の化学療法用薬剤といった、多数の化学的・生化学的DNA切断因子に有効であることを示した。

【0017】

外因性遺伝子毒性攻撃に起因するDNA損傷に対処するためには、以下を考慮する必要がある。

- ・DNAの自然状態、および
- ・DNAのストレス起因状態

さらには、遺伝子毒性ストレスへの暴露後には、DNA修復を考慮する必要がある。DNA修復の動態は、ストレスの種類だけでなく、潜在的には影響を受けた組織の種類にも依存する。DNA修復の有効性と速度は個人により変動し、さらには、例外的な感受性に繋がる特定の遺伝的条件が存在することが知られている。

【0018】

最終的には、被験者間の差異のより良い把握のためには、生物学的用量または基準濃度に基づいたシステムを構築し、同じ基準における現象をより適切に定量化することが必要である。

【0019】

本発明によれば、上記問題は、以下に基づく方法によって解決される。

(i) 非形質変換細胞を分散および/または増幅して、細胞サンプルを準備する。非形質変換細胞は、被験者からサンプル採取されたものであり、例えば、当該被験者の皮膚生検材料であってもよく、対照とするDNA切断ストレスに耐性があると考えられる、いわゆる基準細胞（例えば、グループIの被験者の細胞）であってもよい。

(ii) 基準細胞（グループI）の細胞サンプルを所定のストレスに暴露した後、基準濃度を決定する。なお、この工程は実施済みであってもよいし、発明の実験データベースに含まれていてもよい。

(iii) 休止状態のヒト細胞に有効な機械的モデルを規定する。

(iv) 当該被験者の細胞について、上記基準濃度における、機能性DSB認識、修復、信号発信テストを実施する。

【0020】

上記のいわゆる基準対照細胞は、当該のDNA切断ストレスに対し耐性があると考えられる細胞である。好ましくは、これらの細胞は、化学的因子が誘発するストレスおよび放射線に耐性があることが好ましい（例えば、グループIの被験者の細胞）。遺伝子毒性の研究において、対照として通常使用される市販の細胞を使用可能である。具体的には、1BR3細胞株（Killalea、外、"Factors in post dialysis CAPD fluid affecting 3H cholesterol efflux from human skin fibroblasts", Biochemical Society Transactions 25 p123S (1997年)）、149BR細胞株およびMRC9細胞株（Watanabe、外、"Comparison of lung cancer cell lines representing four histopathological subtypes with gene expression profiling using quantitative real-time PCR", Cancer Cell International 10(2) p1-12 (2010年)）などが挙げられる。さらに、HF19、IMR90、48BR、70BR、142BR、155BRおよびMRC5等の細胞を、いわゆる基準参照細胞として使用してもよい。

【0021】

したがって、本発明の第1の目的は、DNA切断ストレスに対する被験者の感受性を、該被験者からサンプル採取した細胞（好ましくは皮膚細胞）から得られた細胞サンプルを使用して予測するための方法を提供し、実験を行う基準濃度を規定することである。この方法は、以下を含む。

【0022】

（いわゆる基準を規定する工程）

10

20

30

40

50

(i) 研究対象の化学的または生化学的因子によって基準濃度が予め決定されていない場合には、いわゆる基準細胞（感受性グループI）を分散および/または増幅することによって細胞サンプルを準備し、DNA切断因子を、DNA切断因子の広い濃度範囲（例えば、nMからmMにわたる）内の複数の濃度で、所定の時間（好ましくは24時間）にわたって上記細胞サンプルに塗布する。DAPI対比染色を用いたpH2AX免疫蛍光検査を行う。この検査によって、細胞サンプルについて、塗布されたすべての濃度における小核の分析も可能である。

(ii) pH2AXマーカーを使用して、観察時間tおよび濃度Cにおいて得られる核病巣の平均数（この平均数を、 $N_{pH2AX}(t, C)$ と呼ぶ）、または観察時間tおよび濃度Cにおいて観察される細胞100個あたりの小核の平均数（この平均数を、 $N_{MN}(t, C)$ と呼ぶ）、または一度に少なくとも50個の核（ガウス標準誤差）について、または、50個の核についての独立した3回の実験（平均値の標準誤差）について行わなければならないこれらの各測定についての誤差に相当する標準誤差、を求め、

(iii) いわゆる基準濃度 $C_{ref}$ は、式： $N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) + 2 = 2$ 、または、 $N_{MN}(24h, C_{ref}) + 2 = 2\%$ が成り立つ濃度である。

#### 【0023】

（いわゆるリスク評価工程）

(i) 被験者の細胞を分散および/または増幅することにより細胞サンプルを準備する。この細胞サンプルに、上記で既定した基準濃度 $C_{ref}$ を所定の時間（好ましくは24時間）にわたり塗布する。DAPI対比染色によりpH2AX免疫蛍光検査の判定を行う。

(v) 上記細胞サンプルについて、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref})$ と $N_{MN}(24h, C_{ref})$ とを求める。

(vi) 細胞サンプルについて、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) \leq 2$ 、または、 $N_{MN}(24h, C_{ref}) \leq 2\%$ であれば、遺伝子毒性リスクは低いと考えられ、「グループI」とされる。

(vii) 細胞サンプルについて、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) > 8$ 、または、 $N_{MN}(24h, C_{ref}) > 10\%$ であれば、遺伝子毒性リスクは非常に高いと考えられ、「グループIII」とされる。

(viii) その他のすべての場合では、遺伝子毒性リスクは中程度と考えられ、「グループII」とされる。

#### 【0024】

本発明のさらなる目的は、少なくとも1種の化学的もしくは生化学的因子、または、化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせによるDNA切断毒性作用に対する、被験者からサンプル採取された組織の感受性を評価するための方法である。この方法は、

上記少なくとも1種の化学的もしくは生化学的因子の作用濃度、または、上記化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせに含まれる化学的因子、生化学的因子、またはこれらの因子の作用濃度を設定する工程(a)と、

被験者の評価対象組織から細胞をサンプル採取する工程(b)と、

上記細胞を分散および/または増幅して、細胞サンプルを得る工程(c)と、

上記細胞サンプルと、前記工程(a)で規定された上記作用濃度の上記少なくとも1種の化学的もしくは生化学的因子（または、前記化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせ）とを、所定の時間にわたり接触させる工程(d)と、

DNA二本鎖切断の数、当該数を表わすバイオマーカー、小核の数のうちの少なくとも1つを検出する工程(e)とを含み、

上記工程(b)、(c)、(d)および(e)は、連続して行わなければならない、上記工程(a)を前記工程(e)よりも前に行わなければならない。

#### 【0025】

このような化学的因子は、例えば、金属または非金属陰イオン、非金属陽イオン、有機陰イオン、有機陽イオン、両性化合物、必要であれば中性無機化合物、必要であれば中性

10

20

30

40

50

有機化合物、必要であれば有機金属化合物、不溶性化合物であってもよい。また、上記化学的因子は、例えば、（水性または非水性の）液体媒体に溶解した状態、粒子形状、ナノ粒子形状、細胞膜に固定された状態、気体の状態であってもよい。

【0026】

上記生化学的因子は、例えば、（必要であれば組換）ペプチド、抗体、抗原、（必要であれば非活性化）ウイルス、ウイルス断片、細胞断片であってもよい。

【0027】

好適には、本発明の方法は、上記化学的もしくは生化学的因子、または、上記化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせによるDNA切断毒性作用に対する、上記組織の感受性を表わす診断スコアを、上記DNA二本鎖切断の数（および/または前記小核の数）および前記作用濃度を使用して求める工程（f）をさらに含む。

10

【0028】

本発明の方法によれば、二本鎖切断を検出する上記工程（e）が、好適には、免疫蛍光検査、細胞遺伝学的試験、およびパルス電界電気泳動からなる群から選択される技術を使用して実施される。

【0029】

ある実施形態では、上記工程（e）において、pH2AX、53BP1、Phospho-DNA-PK、およびMDC1からなる群から選択されるバイオマーカーを検出する。好適には、pH2AXバイオマーカーを検出するとともに、好ましくは、該バイオマーカーの核病巣の数と大きさを検出する。特に好ましい実施形態では、細胞核の位置特定に適した対比染色を行うことにより、小核（MN）を定量化する。

20

【0030】

本発明の上記工程（e）において、好適には、作用濃度が予め決定された基準濃度 $C_{ref}$ である。ある実施形態では、DNA二本鎖切断の数をpH2AX免疫蛍光検査により求め、DAPI対比染色の後に小核（MN）の数を検出し、その後、上記細胞サンプルについて、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref})$ と $N_{MN}(24h, C_{ref})$ とを求める。上記細胞サンプルについて、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref})^2$ 、または、 $N_{MN}(24h, C_{ref})^2$ であれば、遺伝子毒性リスクが低いと考え、および/または、遺伝子毒性リスクが「グループI」であるとする。上記細胞サンプルについて、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) > 8$ 、または、 $N_{MN}(24h, C_{ref}) > 10\%$ であれば、遺伝子毒性リスクが非常に高いと考え、および/または、遺伝子毒性リスクが「グループIII」であるとする。その他のすべての場合では、遺伝子毒性リスクが中程度であると考え、および/または、遺伝子毒性リスクが「グループII」であるとする。

30

【0031】

本発明の上記工程（e）において、好適には、作用濃度が予め決定された基準濃度 $C_{ref}$ である。好適には、この決定は、

(i) いわゆる基準細胞（感受性グループI）を分散および/または増幅することにより細胞サンプルを準備し、該細胞サンプルを複数の分画に細分し、

(ii) 試験対象である上記少なくとも1種の化学的または生化学的因子を、上記化学的または生化学的因子の濃度範囲（例えば、nMからmMにわたる濃度範囲）から選択される複数の濃度で、所定の時間（好ましくは24時間）にわたって、前記細胞サンプルの各分画にそれぞれ塗布し、

40

(iii) 前記細胞サンプルの各分画について、細胞1個あたりのpH2AX病巣の数、および/または、細胞1個あたりの小核の数を求め、

(iv) (好ましくは、DAPI対比染色を使用したpH2AXマーカー免疫蛍光検査により)pH2AXマーカーを使用して、観察時間tおよび濃度Cにおいて得られる核病巣の平均数( $N_{pH2AX}(t, C)$ )を求め、

観察時間tおよび濃度Cにおける、細胞100個あたりの小核の平均数（この平均数を $N_{MN}(t, C)$ と呼ぶ）を求め、

好ましくは、一度に少なくとも50個の核（ガウス標準誤差）について、または、5

50

0個の核についての独立した3回の実験（平均値の標準誤差）について行われる、これら測定についての標準誤差を求め、

式： $N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) + 2 = 2$ 、または、 $N_{MN}(24h, C_{ref}) + 2 = 2\%$ が成り立つ濃度としてのいわゆる基準濃度 $C_{ref}$ を求める方法により実施する。

【0032】

好適には、上記のいわゆる基準細胞が、HF19細胞株、IMR90細胞株、48BR細胞株、70BR細胞株、142BR細胞株、155BR細胞株、MRC5細胞株、1BR3細胞株、149BR細胞株、およびMRC9細胞株から選択され、より好ましくは、1BR3細胞株、149BR細胞株、およびMRC9細胞株から選択される。

10

【0033】

少なくとも1種の化学的もしくは生化学的因子、または、化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせによるDNA切断毒性作用に対する、被験者の組織サンプルの感受性を評価するための方法の一実施形態によれば、

(i) サンプル採取された上記組織からの細胞を、単離および/または増幅し、これら増幅した細胞が「細胞サンプル」を構成し、

(ii) 上記細胞サンプルについて、pH2AXマーカーを使用して得られる核病巣の平均数を観察時間 $t$ において求め（これら平均数を $N_{pH2AX}(t)$ とし、観察時間は $t = 0$ （上記少なくとも1種の化学的もしくは生化学的因子（または化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせ）に対する非暴露状態である、 $t_0$ ）および、少なくとも、上記細胞サンプルと、作用濃度の上記少なくとも1種の化学的もしくは生化学的因子（または化学的因子同士、生化学的因子同士、もしくはこれらの組み合わせ）とを、所定時間にわたり接触（この接触を「遺伝子毒性暴露」と呼ぶ）させた後の $t_4$ であり、

20

(iii) 少なくとも上記平均数 $N_{pH2AX}(t)$ を使用して、上記サンプルの遺伝子毒性暴露に対する感受性グループを判定する。

【0034】

$t_4$ は、DNA切断のレベルがその残留値に到達する時間を表す固定値であり、12時間以上でなくてはならず、好ましくは12時間～48時間であり、より優先的には約24時間である。

30

【0035】

ある実施形態では、上記細胞サンプルについて、観察時間 $t$ において観察される細胞100個あたりの小核の平均数[%で表わす]（この平均数を $N_{MN}(t)$ と呼ぶ）を求める。時間 $t$ は、少なくとも、 $t_0$ （生物学的吸収用量 $D$ への非暴露状態）および $t_4$ （生物学的吸収用量 $D$ への暴露後）である。

【0036】

本発明の範囲において、グループ評価基準が、臨床的評価基準に従って定義される。グループI = 臨床兆候無し、グループII = 臨床兆候有り、グループIII = 致命的影響

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1中、(A)、(B)、(C)は、細胞サンプルを所定の濃度のグリホサート(CAS No. 1071-83-6)に接触させてから24時間のpH2AX病巣の数の変動を、線維芽細胞株1BR3（図1中の(A)）、149BR（図1中の(B)）および04PSL（図1中の(C)）に対する当該グリホサート濃度ごとに示す。

40

【図2】図2中、(A)、(B)、(C)は、細胞サンプルを所定の濃度の5FUに接触させてから24時間のpH2AX病巣の数の変動を、線維芽細胞株MRC9（図2中の(A)）、03HLS（図2中の(B)）およびGM02718（図2中の(C)）に対する当該5FUの濃度ごとに示す。

【発明を実施するための形態】

【0038】

50

ヒトである患者に適した複数の代替的实施形態を包含する一実施形態について、以下に説明する。

#### 試験の準備

細胞サンプルの採取および細胞サンプルの操作の前に、(例えば、細胞学的分析研究施設に所属する)各オペレータは、患者のHIVまたはC型肝炎への感染の可能性について(典型的には、医師から)通知を受ける。これにより、オペレータが、採取中、操作中、および細胞培養の管理中に、適度に高められた生物学的安全対策を取ることができる。

#### 【0039】

作業者は、細胞サンプルを準備するための組織サンプルを患者から採取する。好ましくは、生検により皮膚サンプルを採取する。好適には、このサンプル採取は、「皮膚パンチ」生検として知られる方法によって行ってもよい。この組織サンプルを、無菌20%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地に配置する。組織サンプルは、すぐに専門の実験室に移す。ここで、サンプルを38時間を超える時間、室温に置いたままにはならない。

#### 【0040】

サンプルとして採取された組織は、以下の工程により、単離および/または増幅される。

#### 【0041】

ある実施形態では、組織サンプル(典型的には生検材料)を、受領後すぐに、増幅可能な細胞株の形に株化する。株化は、Elkindらによる刊行物("The radiobiology of cultured mammalian cell", Gordon and Breach (1967年))により強調されるように、ウイルス性または化学的形質転換剤を使用せずに、培養研究施設に公知の補助的手順に従って行われる。十分な数の細胞を得たのち(典型的には1~3週間後)、本発明の方法で第1の実験を実施する。細胞サンプルを準備し、細胞をペトリ皿内のカバーガラス上に接種する。これらのカバーガラスの一部を、濃度が異なる金属、殺虫剤、またはその他の任意のDNA切断化学的因子または生化学的因子で汚染する。その他の部分は汚染しない。この部分は、自然状態を表わす。汚染中、細胞は培養インキュベータ内で37℃に維持される。

#### 【0042】

汚染細胞については、DNA切断化学的因子または生化学的因子を添加しての培養時間経過後の状態に対応する特徴を獲得する。この特徴は、マーカーpH2AXに対応する病巣により表される。次いで、カバーガラス上の細胞を固定し、溶解し、ハイブリダイズする。以下の公知の手順(Bodgi, 外, "A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity", J Theor Biol. 21 p 333:135-45.2013年)を実施する。

#### 【0043】

細胞を、3%パラホルムアルデヒドおよび2%スクロース中で、室温で15分間固定し、さらに、20mMのpH7.4のヘペス緩衝液(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸)、50mMのNaCl、3mMのMgCl<sub>2</sub>、300mMのスクロース、0.5%Triton X-100(化学式t-Oct-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>OH(式中x=9~10))で表される非イオン界面活性剤(CAS No. 9002-93-1、例えばSigma Aldrich社製)で3分間透過処理する。その後、免疫学的染色に先立ち、カバーガラスを、リン酸塩緩衝生理食塩水(PBSとして知られる)中で洗浄する。インキュベーションは、2%ウシ血清アルブミン(頭文字のBSAまたはフラクシオンVとして知られる(例えばSigma Aldrich社製))を添加したPBS中で、37℃で40分間行った。インキュベーションの後、PBSで洗浄を行った。一次抗体である抗pH2AXは、1:800の濃度で使用する。抗マウス二次抗体FITCまたは抗ウサギ二次抗体TRITC(1:100、Sigma Aldrich社製)を使用したインキュベーションを、2%BSA中で、37℃で20分間行った。核を標識するために、カバーガラスをDAPI(4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)含有のVectashield™で処理した。DAPIでの着色は、間接的に、フェーズG<sub>1</sub>にある細胞(核のDAPI着色が均一)の個数、フェーズS

10

20

30

40

50

にある細胞（核が多数の pH 2 AX 病巣を有する）の個数、および、フェーズ  $G_2$  にある細胞（核の DAPI 着色が不均一）の個数、および中期（染色体が見える）にある細胞の個数の判定も可能にする。

【0044】

免疫蛍光顕微鏡（例えばオリンパスモデル）にセットした上記カバーガラスから結果を得る。読取りは、直接的（典型的には、各点につき、 $G_0 / G_1$  にある細胞少なくとも 50 個について病巣をカウントする）であってもよく、専用の画像解析ソフトウェアを使用して行ってもよく、または、自動化顕微鏡で行ってもよい。ソフトウェアまたは自動化顕微鏡法は、手動測定により較正されることが好ましい。

【0045】

診断の根拠として使用するのに十分な統計的信頼度を有する結果を得るために、少なくとも 3 回の個別の一連の実験（暴露）を行い、規定の時間について各病巣数の平均を計算する。

生物学的・臨床的パラメータの判定

総論および使用マーカー

本発明は、とりわけ、非汚染（自然状態）細胞上の pH 2 AX マーカーおよび汚染細胞上の pH 2 AX マーカーのうち的一方について得られたデータの利用を基本とする。本発明の方法は、所定の汚染時間におけるこのマーカーでの標識の研究に基づくものである。つまり、汚染の中断からの規定の時間間隔後にサンプルを標識し、サンプルの免疫蛍光を調査する。

【0046】

サンプル採取が  $n = 3$ （ガウスタイプの「標準誤差 SE」ではない）であれば、各マーカーを使用して得られる各点と各用量の平均は、平均値の標準誤差（「SEM」と呼ばれる）を使用して計算される。

【0047】

pH 2 AX は、ヒストン H 2 AX の X 変異体のセリン 439 におけるリン酸化型を指し、本願出願人の知見によれば、DNA の二本鎖切断（DSB）の数を標識する。DSB は、主要かつ信頼できる修復方法、すなわち、縫合により認識される。実質的に、マーカー pH 2 AX は、もっぱら核病巣の形をとって核状であり、病巣の個数と大きさのみが分析される。

【0048】

DAPI（当業者には公知の DNA マーカー）を使用した対比染色により、細胞質または核内局在を位置づける核の位置を特定することができ、これにより小核を定量化できる。小核は、病巣についての相補的細胞マーカーである。

生物学的・臨床的パラメータ

以下のように、定義付けおよび決定を行う。

・  $N_{pH2AX}(t)$  : マーカー pH 2 AX を使用して、観察時間  $t_0$ （非汚染）または  $t_4$  において得られる核病巣の平均個数。ここで、パラメータ  $N_{pH2AX}(t)$  の決定は本発明の方法の範囲において必須である。

・  $N_{MN}(t)$  : 自然に（ $t = t_0$ 、すなわち、非汚染で）観察される、または、汚染後の  $t = t_4$  において観察される、細胞 100 個あたりの小核の数（%で表わす）

本発明の方法は、所定の金属に対する細胞の感受性は対象細胞に従って変動することを示す。例えば、 $100 \mu M$  のアルミニウムで汚染された星状細胞に見られる切断（HA 細胞、H 2 AX 病巣は 2）は、同じ濃度についての内皮細胞の切断（HMEC 細胞、H 2 AX 病巣は 3.7）に比較して少ない（表 1 参照）。さらに、同じ金属について、本発明者は、提案された単一毒性尺度と、例えば、鉛の場合（鉛中毒）やカドミウムの場合（イタイタイ病）の場合について記載されたある種の臨床兆候との間には、対応関係があることを示した（表 3 参照）。

【0049】

また、本発明の方法によれば、銅で汚染された細胞では、最も高濃度（1 mM）の試験

10

20

30

40

50

において、(試験対象の細胞の種類により2~21個の範囲にわたる)H2AX病巣によって可視化された多数のDNA切断が見られることがわかった(表1および表2を参照)。

#### 【0050】

本発明の方法は非常に感受性が高いので、非常に低濃度のDNA切断化学的因子が組織に与える影響を特徴付けることができる。この低濃度は、具体的には、飲用水中の化学的因子の規制値のオーダーであって、例えば、銅では2mMオーダー(2mg/L)、アルミニウムでは200μmオーダー、カドミウムでは5μmオーダー、Pb(鉛)では10μMオーダーである。

#### 予測的評価

これは、測定した生物学的データを使用して、臨床的パラメータを予測することを目的とする。

#### 【0051】

スコアの数学的値またはスコアに相関する数式から直接的に導出される定量的診断は、以下の基準に関連する。

#### 【0052】

(i) グループI, II, またはIIIへの患者の分類(GROUPと呼ばれる基準)

感受性グループ(GROUP)の定義は、本発明に係るのスコアと、既知の遺伝的症候群から類推される患者の臨床プロフィールとに基づいて、医師が判定を行う際の補助となる。これらのグループは、当初、上記のJoubertらの刊行物(Int. J. Radiat. Biol. 84 (2), p. 107-125 (2008年))に定義された。

#### 【0053】

本発明では、以下のように考察される。

#### 【0054】

細胞サンプルについて、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) \leq 2$ 、または、 $N_{MN}(24h, C_{ref}) \leq 0.5\%$ 、好ましくは、 $N_{MN}(24h, C_{ref}) \leq 1\%$ 、さらに好ましくは、 $N_{MN}(24h, C_{ref}) \leq 2\%$ であれば、遺伝子毒性リスクが低いと考えられ、または、遺伝子毒性リスクが「グループI」であるとされる。

#### 【0055】

細胞サンプルについて、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) > 8$ 、または、 $N_{MN}(24h, C_{ref}) > 10\%$ であれば、遺伝子毒性リスクが非常に高いと考えられ、または、遺伝子毒性リスクが「グループIII」であるとされる。

#### 【0056】

その他のすべての場合では、遺伝子毒性リスクが中程度であると考えられ、また遺伝子毒性リスクが「グループII」であるとされる。

#### 実施例

##### 実施例1

##### 対照線維芽細胞株についての、グリホサート(化学的因子)の基準濃度の決定

市販の1BR3および149BR対照線維芽細胞を、所望の細胞数を得られるまで、供給会社(SIGMA-ALDRICH)の推奨に従って増幅した。十分な数の細胞を得たのち(概ね1~3週間後)、本発明の方法で第1の実験を実施した。細胞をペトリ皿内のカバーガラス上に接種した。これらのカバーガラスの一部を、下記の表1に示す濃度のグリホサート(CAS No. 1071-83-6)を含む試験培地に接触させた。

#### 【0057】

10

20

30

40

【表 1】

表 1  
 グリホサートと、1BR3および149BR対照線維芽細胞  
 ならびにO4PSL細胞との接触後24時間における、  
 使用されたグリホサート濃度ごとのpH2AX病巣数の検出

グリホサ ート濃度 ( $\mu$ M)	1BR3(対照細胞)			149BR(対照細胞)			O4PSL		
	pH2AX( 24h)	SEM	pH2AX(24 h) +2 $\times$ SEM	pH2AX (24h)	SEM	pH2AX(24 h) +2 $\times$ SEM	pH2AX( 24h)	SEM	pH2AX(24 h) +2 $\times$ SEM
3	1.6	0.128	1.856	0.8	0.064	0.928	1.7	0.136	1.972
10	1.6	0.128	1.856	1	0.08	1.16	1.8	0.144	2.088
30	1.9	0.152	2.204	1.5	0.12	1.74	4.1	0.328	4.756
100	2	0.16	2.32	1.8	0.144	2.088	6	0.48	6.96
300	2.3	0.184	2.668	3	0.24	3.48	8.4	0.672	9.744

10

20

## 【0058】

所定濃度のグリホサートとの接触後、細胞を培養インキュベータ内で37℃で保存した。表1に示す所定濃度のグリホサートとの接触の24時間後、pH2AXマーカーを使用して得られた核病巣の平均数を求めた。免疫蛍光顕微鏡(オリンパスモデル)にセットした上記カバーガラスから結果を得た。読取りは、各点につき、pH2AXマーカーを利用して、 $G_0/G_1$ にある少なくとも50個の細胞の病巣をカウントすることにより直接的に、または、専用の画像解析ソフトウェア(imageJ)を使用して行った。

## 【0059】

診断の根拠として使用するのに十分な統計的信頼度を有する結果を得るために、3回の個別の一連の実験を行った。対照細胞と所定濃度のグリホサートとの接触から24時間後の各病巣数の平均と平均値の標準誤差(「SEM」または )を計算した。計算値を表1に示す。

30

## 【0060】

このように、対照皮膚細胞サンプル1BR3および149BR(表1参照)について、基準濃度を決定した。基準濃度は、次式の濃度として決定した。

## 【0061】

$$N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) + 2 \cdot SEM = 2$$

式中、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref})$ は対照細胞と所定濃度のグリホサートとの接触から24時間後のpH2AX病巣の数の測定の標準誤差であり、これらの測定は50個の細胞についての3回の個別の実験により実施した(平均の標準誤差)。

40

## 【0062】

図1は、対照細胞1BR3(図1中(A)を参照)および149BR(図1中(B)を参照)の、グリホサートとの接触後24時間における細胞1個あたりのpH2AX病巣数の変動を、使用されたグリホサートの濃度ごとに示している。2種類の対照細胞149BRおよび1BR3について、式： $N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) + 2 \cdot SEM = 2$ で規定される濃度 $C_{ref}$ は、100 $\mu$ Mである。

## 試験の準備(細胞株O4PSL)

当業者には公知方法である「皮膚パンチ」生検によって、患者から皮膚細胞サンプルを採取した。この細胞サンプルを、20%無菌ウシ胎児血清を添加したDMEM培地に配置

50

した。38時間超える時間、室温に置いたままにしないように、細胞サンプルを、すぐに専門の実験室に移した。

#### 【0063】

受領後すぐ、培養研究施設および当業者に公知の方法により、上記の生検による細胞サンプルを増幅可能な04PSL細胞株に株化した。具体的には、トリプシン分散液を使用して、細胞を補充培地に再度希釈する。所望の数の細胞が得られるまで、同様の作業を行う。十分な数の細胞を得たのち（概ね1～3週間後）、本発明の方法で第1の実験を実施した。04PSL細胞株を、ペトリ皿内のカバーガラス上に接種した。これらのカバーガラスの一部を、濃度100 $\mu$ Mのグリホサートに接触させた。検証のため、これらのカバーガラスの別の部分を所定の濃度のグリホサートに接触させた（表1、図1中の（C）を参照）。

10

#### 【0064】

所定濃度のグリホサートとの接触後、細胞を培養インキュベータ内で37℃で保存した。表1に示す所定濃度のグリホサートとの接触の24時間後、pH2AXマーカーを使用して得られた核病巣の平均数を求めた。免疫蛍光顕微鏡（オリンパスモデル）にセットした上記カバーガラスから結果を得た。読取りは、各点につき、pH2AXマーカーを利用して、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>にある少なくとも50個の細胞の病巣をカウントすることにより直接的に、または、専用の画像解析ソフトウェア（imageJ）を使用して行った。

#### 【0065】

診断の根拠として使用するのに十分な統計的信頼度を有する結果を得るために、3回の個別の一連の実験を行った。対照細胞と所定濃度のグリホサートとの接触から24時間後の各病巣数の平均と平均値の標準誤差（「SEM」または $\sigma$ ）を計算した。計算値を表1および図1中（C）に示す。

20

#### 04PSL細胞株の遺伝子毒性リスクの判定

グリホサート濃度100 $\mu$ Mにおいて、04PSL細胞株について得られたpH2AX病巣の数は約7個であり、この数は式： $2 < N_{pH2AX}(24h) < 8$ が妥当であることを示す。したがって、04PSL細胞株については、グリホサートに関連する遺伝子毒性リスクは「グループII」、または、中程度である。04PSL細胞株は、化学感受性を有する。

#### 実施例2

30

#### 対照線維芽細胞株についての、化学療法用薬剤5FU（化学的因子）の基準濃度の決定

市販のMRC9対照線維芽細胞を、所望の細胞数を得られるまで、供給会社（SIGMA-AALDRICH）の推奨に従って増幅した。十分な数の細胞を得たのち（概ね1～3週間後）、本発明の方法で第1の実験を実施した。細胞をペトリ皿内のカバーガラス上に接種した。これらのカバーガラスの一部を、下記の表2に示す濃度の5FUを含む試験培地に接触させた。

#### 【0066】

【表 2】

表 2  
5FUと、MRC9対照線維芽細胞、ならびに、GM02718細胞  
およびO3HLS細胞との接触後24時間における、  
使用された5FU濃度ごとのpH2AX病巣数の検出

5FU 濃度 ( $\mu$ M)	MRC9(対照細胞)			GM02718			O3HLS		
	pH2AX (24h)	SEM	pH2AX(24h) +2 $\times$ SEM	pH2AX (24h)	SEM	pH2AX(24h) +2 $\times$ SEM	pH2AX (24h)	SEM	pH2AX(24h) +2 $\times$ SEM
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.00	1.16	0.41	1.97	2.70	0.31	3.32	1.40	0.04	1.49
3.00	1.38	0.28	1.93	2.41	0.01	2.43	1.69	0.29	2.26
10.00	0.30	0.11	0.51	2.96	0.46	3.87	1.63	0.03	1.69
30.00	1.18	0.41	2.01	2.38	0.00	2.38	2.00	0.29	2.59

10

20

## 【0067】

所定濃度の5FUとの接触後、細胞を培養インキュベータ内で37℃で保存した。表2に示す所定濃度の5FUとの接触の24時間後、pH2AXマーカーを使用して得られた核病巣の平均数を求めた。免疫蛍光顕微鏡(オリンパスモデル)にセットした上記カバーガラスから結果を得た。読取りは、各点につき、pH2AXマーカーを利用して、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>にある少なくとも50個の細胞の病巣をカウントすることにより直接的に、または、専用の画像解析ソフトウェア(imageJ)を使用して行った。

## 【0068】

診断の根拠として使用するのに十分な統計的信頼度を有する結果を得るために、3回の個別の一連の実験を行った。対照細胞と所定濃度の5FUとの接触から24時間後の各病巣数の平均と平均値の標準誤差(「SEM」または )を計算した。計算値を表2に示す。

30

## 【0069】

このように、対照皮膚細胞サンプルMRC9(表2、図2中(A)を参照)について、基準濃度を決定した。この基準濃度は、次式の濃度として決定した。

## 【0070】

$$N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) + 2 \cdot SEM = 2$$

式中、 $N_{pH2AX}(24h, C_{ref})$ は対照細胞と所定濃度のグリホサートとの接触から24時間後のpH2AX病巣の数の測定の標準誤差であり、これらの測定は50個の細胞についての3回の個別の実験により実施した(平均の標準誤差)。

40

## 【0071】

図2は、対照細胞MRC9(図2中(A)を参照)の、5FUとの接触後24時間における細胞1個あたりのpH2AX病巣数の変動を、使用された5FUの濃度ごとに示している。対照細胞株MRC9について、式： $N_{pH2AX}(24h, C_{ref}) + 2 \cdot SEM = 2$ で規定される濃度 $C_{ref}$ は、30 $\mu$ Mである。

試験の準備(細胞株GM02718およびO3HLS)

GM02718細胞株を、所望の細胞数を得られるまで、供給会社(Coriel Institute)の推奨に従って増幅した。

## 【0072】

50

03HLS細胞株については、当業者には公知方法である「皮膚パンチ」生検によって、患者から皮膚細胞サンプルを採取した。この細胞サンプルを、20%無菌ウシ胎児血清を添加したDMEM培地に配置した。38時間超える時間、室温に置いたままにしないように、細胞サンプルを、すぐに専門の実験室に移した。

【0073】

受領後すぐ、培養研究施設および当業者に公知の方法により、上記の生検による細胞サンプルを増幅可能な03HLS細胞株に株化した。具体的には、トリプシン分散液を使用して、細胞を補充培地に再度希釈する。所望の数の細胞が得られるまで、同様の作業を行う。

【0074】

十分な数の細胞を得たのち（概ね1～3週間後）、本発明の方法で第1の実験を実施した。GM02718細胞株または03HLS細胞株を、ペトリ皿内のカバーガラス上に接種した。これらのカバーガラスの一部を、濃度30 $\mu$ Mの5FUに接触させた。検証のため、これらカバーガラスの別の部分を所定の濃度の5FUに接触させた（GM02718細胞株については、表2および図2中の（B）を、03HLS細胞株については、図2中の（C）を参照）。

【0075】

所定濃度の5FUとの接触後、細胞を培養インキュベータ内で37 $^{\circ}$ Cで保存した。表2に示す所定濃度の5FUとの接触の24時間後、pH2AXマーカーを使用して得られた核病巣の平均数を求めた。免疫蛍光顕微鏡（オリンパスモデル）にセットした上記カバーガラスから結果を得た。読取りは、各点につき、pH2AXマーカーを利用して、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>にある少なくとも50個の細胞の病巣をカウントすることにより直接的に、または、専用の画像解析ソフトウェア（imageJ）を使用して行った。

【0076】

診断の根拠として使用するのに十分な統計的信頼度を有する結果を得るために、3回の個別の一連の実験を行った。対照細胞と所定濃度の5FUとの接触から24時間後の各病巣数の平均と平均値の標準誤差（「SEM」または $\sigma$ ）を計算した。計算値を、細胞株GM02718については表2および図2中（B）に、細胞株03HLSについては図2中（C）に示す。

GM02718細胞株および03HLS細胞株の遺伝子毒性リスクの判定

5FUの濃度30 $\mu$ Mにおいて、GM02718細胞株および03HLS細胞株について得られたpH2AX病巣の数は、それぞれ、約2.38個および2.59個であり、これら数は式： $2 < N_{pH2AX}(24h) < 8$ が妥当であることを示す。したがって、GM02718細胞株および03HLS細胞株については、5FUに関連する遺伝子毒性リスクは「グループII」、または、中程度である。GM02718細胞株および03HLS細胞株は、化学的感受性を有する。

その他の実施例

以下の表は、上記の「発明の詳細な説明」に記載の通りに実施した数々の実験の結果をまとめたものである。

【0077】

表3および表4中、「pH2AX」は、細胞サンプルと濃度C（ $N_{pH2AX}(24h, C)$ ）の化学的因子との接触後24時間において、pH2AXマーカーを使用して得られた核病巣の平均数（ $N_{MN}(24h, C)$ ）を示す。また、「小核」は、細胞サンプルと濃度Cの化学的因子との接触後24時間において観察された、細胞100個あたりの小核の平均数（ $N_{MN}(24h, C)$ ）を示す。

【0078】

10

20

30

40

【表 3】

表 3

DNA切断因子である殺虫剤（グリホサート、ペルメトリン、  
 チアベンダゾール、PCP、アトラジン）と、O4PSL細胞、  
 O1PAU細胞、O8HNG細胞、1BR3細胞との接触後24時間における、  
 使用された殺虫剤の濃度ごとのpH2AX病巣数と小核数の検出

細胞株	DNA切断因子	マーカー	濃度[ $\mu$ M]						
			0	3	10	30	100	150	300
O4PSL	グリホサート	小核	1	6	4	10		12	14
		pH2AX	0	1.7	1.9	4.8	6.5		8.7

10

細胞株	DNA切断因子	マーカー	濃度[ $\mu$ M]				
			0	0.3	1	5	10
O1PAU	ペルメトリン	小核	2	2	2	4	6
		pH2AX	0	0.1	0.2	1.3	1.8

20

細胞株	DNA切断因子	マーカー	濃度[ $\mu$ M]				
			0	0.3	1	3	10
O8HNG	チアベンダゾール	小核	0	2	4	10	10
		pH2AX	0	1.8	2	4.3	6

細胞株	DNA切断因子	マーカー	濃度[ $\mu$ M]						
			0	0.3	3	10	30	50	100
1BR3	PCP	小核	1	2	4	10		10	20
		pH2AX	0	1.2		1.5	1.9		4.3

30

細胞株	DNA切断因子	マーカー	濃度[ $\mu$ M]							
			0	0.01	0.1	0.3	1	10	20	30
1BR3	アトラジン	小核	1	5	6		13.5	15	40	
		pH2AX		1	1.3	1.8		3.1		3.5

【 0 0 7 9 】

【表 4】

表 4

対照神経系細胞株であるHa（星状細胞）、Hah（海馬星状細胞）およびHasp（脊髄星状細胞）と、金属化合物（ $AlCl_3$ 、 $Cu$ 、 $CuCl_2$ 、 $CuSO_4$ 、 $Pb(NO_3)_2$ 、 $CdCl_2$ 、酢酸カドミウムまたは酢酸クエン酸カドミウム）との接触後24時間における、使用された金属化合物の濃度ごとのpH2AX病巣数と小核数の検出

細胞株	DNA 切断因子	マーカー	濃度 [ $\mu M$ ]					
			3	10	30	100	300	1000
Ha	$AlCl_3$	pH2AX	0.34	0.88	1.37	2.18	2.96	6.04
		小核	10	15	16.7	46.7	56.7	70
	Cu	pH2AX		0.3	0.62	2.55	0	0
		小核		4	5	13	20	50
Hah	$AlCl_3$	pH2AX	0.07	0.68	0.83	1.22	1.77	2.28
		小核	2	2	4	6	20	30
	Cu	pH2AX		1.01	1.87	2.62	5.45	6.61
		小核		6	10.7	20.7	46.7	73.3
Hasp	$AlCl_3$	pH2AX	0.84	0.46	0.74	2.15	1.7	1.62
		小核	2	4	4	7.3	8.7	13
	Cu	pH2AX		0.29	0.64	1.13	1.78	2.36
		小核		4	7	9	10	16
	$AlCl_3$	pH2AX	3.2	3.2	5.7	3.7	4.5	9.9
		小核	1.75	3.75	5	4.33	7.33	11.5
	$CuCl_2$	pH2AX	1.6	1.9	1.6	1.5	5.3	21.4
		小核	4	6.7	5.3	6.7	7.3	4
	$CuSO_4$	pH2AX	1.9	2.3	3.4	6.4	20.1	30.2
		小核	3	5	4.7	5.3	9.3	4
	$Pb(NO_3)_2$	pH2AX		4	7.5	15	21	
		小核		0	7	12	20	10
	$CdCl_2$	pH2AX		1.9	3.7	8.3		
		小核		3.5	9	12.25		
	酢酸カドミウム	pH2AX		5	5.5	7		
		小核		5	10	10		
酢酸クエン酸カドミウム	pH2AX		1	4.75	7			
	小核							

10

20

30

40

## 【0080】

上記の表4の実験データを使用して、基準濃度 $C_{ref}$ を求めた。具体的には、 $Pb(NO_3)_2$ の基準濃度( $C_{ref} < 1 \mu M$ )および $CdCl_2$ の基準濃度( $C_{ref} = 10 \mu M$ )を求めた。具体的には、 $Pb(NO_3)_2$ および $CdCl_2$ について、これらのデータを以下の表5中の観察された臨床兆候と相関させた。

## 【0081】

【表 5】

表 5 本発明の単一毒性尺度と対応する臨床兆候との間の対応関係の数値例

化学種	基準濃度 $C_{r.o.f}$	アルゴリズムに基づく予測	観察された臨床的影響
鉛 [使用された塩 : $Pb(NO_3)_2$ ]	$< 1 \mu M$ $N_{pH2AX}(24h) < 2$	「グループ II」予測リスクは $1 \mu M \sim 30 \mu M$ $2 < N_{pH2AX}(24h) < 8$	鉛中毒の兆候の発症 (血中 $100 \mu g/l$ を超える、約 $2 \mu M$ に相当)
		「グループ III」予測リスクは $30 \mu M$ より高い $N_{pH2AX}(24h) > 8$	即時の致命的影響は一切観察されず
カドミウム [使用された塩 : $CdCl_2$ ]	$10 \mu M$ $N_{pH2AX}(24h) < 2$	「グループ II」予測リスクは $10 \mu M \sim 100 \mu M$ $2 < N_{pH2AX}(24h) < 8$	富山地域 (日本) の住人が被った暴露と、その後の全身性カドミウム中毒 (イタイタイ病) に関連
		「グループ III」予測リスクは $100 \mu M$ より高い $N_{pH2AX}(24h) > 8$	致死性煙霧濃度 : $40 \sim 50 mg/m^3$ 、すなわち、 $245 \mu m/m^3$ (100 分内で死亡)
クロム [使用された塩 : $Na_2CrO_4$ ]	$3 nM$ $N_{pH2AX}(24h) < 2$	「グループ II」予測リスクは $3 nM \sim 30 nM$ $2 < N_{pH2AX}(24h) < 8$	井戸水に $1.19 g/l$ ( $4.6 mM$ に相当) の濃度の、米国ヒンクリーの中毒事件 (エリン・プロコピッチ事件) 水道水中の濃度は $23 nM$ と予想された
		「グループ III」予測リスクは $30 nM$ より高い $N_{pH2AX}(24h) > 8$	

グループ基準の定義は以下のとおり :

グループ I = 臨床兆候無し

グループ II = 臨床兆候有り

グループ III = 致命的影響

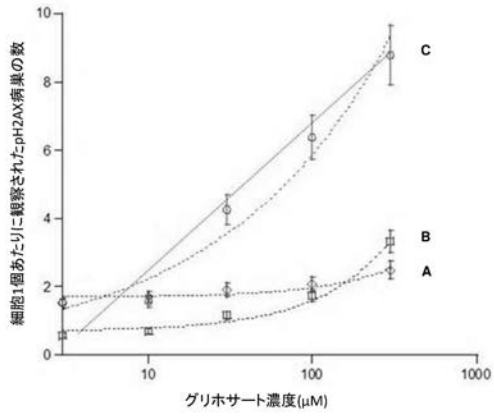
10

20

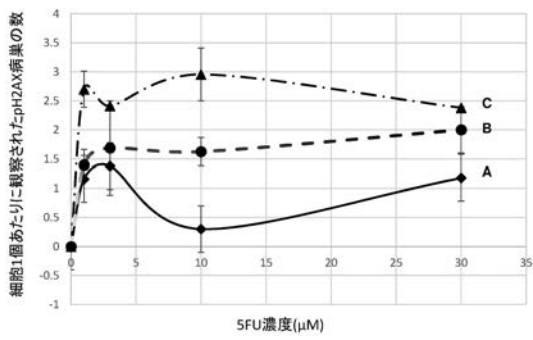
30

40

【 図 1 】



【 図 2 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FR2016/052083
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/50 C12Q1/68 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHARLES THOMAS ET AL: "Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR) response*", INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY, vol. 89, no. 10, 1 October 2013 (2013-10-01), pages 813-822, XP055130896, ISSN: 0955-3002, DOI: 10.3109/09553002.2013.800248 the whole document abstract page 2; figures 1-4; tables II-IV ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 September 2016		13/10/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Boiangiu, Clara

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FR2016/052083
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COLIN C ET AL: "MRE11 and H2AX biomarkers in the response to low-dose exposure: balance between individual susceptibility to radiosensitivity and to genomic instability", INTERNATIONAL JOURNAL OF LOW RADIATION, INDERSCIENCE PUBLISHERS, vol. 8, no. 2, 1 January 2011 (2011-01-01) , pages 96-106, XP009179289, ISSN: 1477-6545, DOI: 10.1504/IJLR.2011.044191 the whole document abstract pages 99-104; figures 1-3 -----	1-15
X	JOUBERT A ET AL: "Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: Consequences for computed tomography therapy", INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION: ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS, PERGAMON PRESS, USA, vol. 62, no. 5, 1 August 2005 (2005-08-01) , pages 1486-1496, XP027750052, ISSN: 0360-3016 [retrieved on 2005-08-01] the whole document page 1487 - page 1494; figures 1-5 -----	1-15
Y	EP 2 466 310 A1 (HELMHOLTZ ZENTRUM MUENCHEN [DE]) 20 June 2012 (2012-06-20) the whole document paragraphs [0002] - [0012], [0041] - [0045], [0205] - [0216]; claim 10 -----	1-15
Y	CHARLES THOMAS ET AL: "Low-dose hyper-radiosensitivity of progressive and regressive cells isolated from a rat colon tumour: Impact of DNA repair", INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY, vol. 84, no. 7, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 533-548, XP055130893, ISSN: 0955-3002, DOI: 10.1080/09553000802195331 the whole document abstract; figures 1-8 page 536 - page 546 ----- ----- -/--	1-15

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2016/052083

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>JOUBERT ET AL: "Radiosensibilite intrinseque et cassures double-brin de l'ADN dans les cellules humaines", CANCER RADIOTHERAPIE, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 11, no. 3, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 129-142, XP022089743, ISSN: 1278-3218, DOI: 10.1016/J.CANRAD.2007.01.003 the whole document figure 5</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
Y	<p>Nicolas Foray: "Les réparatoses : nouveaux concepts sur la prédiction de la radiosensibilité", 25 January 2008 (2008-01-25), XP055131242, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alpesmed/evenements/rns/Rencontres_nuclaires_annees_precedentes/rencontresnucleaires2008/pdf/25_01_08/04_Foray.pdf">http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alpesmed/evenements/rns/Rencontres_nuclaires_annees_precedentes/rencontresnucleaires2008/pdf/25_01_08/04_Foray.pdf</a> [retrieved on 2014-07-23] the whole document specialement le diapos 17, 18</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
Y	<p>K. ROTHKAMM ET AL: "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 100, no. 9, 29 April 2003 (2003-04-29), pages 5057-5062, XP055268274, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0830918100 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
Y	<p>S. BURMA ET AL: "ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 45, 2 November 2001 (2001-11-02), pages 42462-42467, XP055268489, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.C100466200 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-15

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2016/052083

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>Sabine Levegrn ET AL: "FITTING TUMOR CONTROL PROBABILITY MODELS TO BIOPSY OUTCOME AFTER THREE-DIMENSIONAL CONFORMAL RADIATION THERAPY OF PROSTATE CANCER: PITFALLS IN DEDUCING RADIOBIOLOGIC PARAMETERS FOR TUMORS FROM CLINICAL DATA", Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1064-1080, XP055268652, Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036030160101731X/pdf?md5=52d70b3a6e9e18b4a416a7f5f1e940f4&amp;pid=1-s2.0-S036030160101731X-main.pdf [retrieved on 2016-04-26] the whole document abstract; table 1</p>	1-15
Y	<p>WO 2014/152873 A1 (PIOMA INC [US]) 25 September 2014 (2014-09-25) the whole document</p>	1-15
Y	<p>WO 2005/113821 A1 (VECTOR TOBACCO LTD; NEW YORK MEDICAL UNIVERSITY [US]; ALBINO ANTHONY []) 1 December 2005 (2005-12-01) the whole document</p>	1-15
Y	<p>A Granzotto ET AL: "Towards a first classification of human radiosensitivity: radiotherapy, radiodiagnosis and history of radiobiology HIGH DOSES STUDIES - THE HUMAN RADIOSENSITIVITY", 30 March 2012 (2012-03-30), XP055131016, Retrieved from the Internet: URL:http://www.crc1.fr/Portals/0/Equipes/Equipe AnsieauPuisieux/poster radiobiology group (2).pdf [retrieved on 2014-07-23] the whole document</p>	1-15
Y	<p>Stephen P Jackson: "Carcinogenesis Young Investigator Award Sensing and repairing DNA double-strand breaks", Carcinogenesis, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 687-696, XP055273458, Retrieved from the Internet: URL:http://carcin.oxfordjournals.org/content/23/5/687.full.pdf the whole document</p>	1-15

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2016/052083

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	FR 3 017 625 A1 (UNIV CLAUDE BERNARD LYON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; CT LEON BE) 21 August 2015 (2015-08-21) the whole document	1-15
	-----	
X,P	FR 3 017 624 A1 (UNIV CLAUDE BERNARD LYON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; CT LEON BE) 21 August 2015 (2015-08-21) the whole document	1-15
	-----	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2016/052083

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2466310	A1	20-06-2012	EP 2466310 A1	20-06-2012
			WO 2012080515 A1	21-06-2012
-----				
WO 2014152873	A1	25-09-2014	EP 2971282 A1	20-01-2016
			US 2016041175 A1	11-02-2016
			WO 2014152873 A1	25-09-2014
-----				
WO 2005113821	A1	01-12-2005	US 2008227088 A1	18-09-2008
			US 2010132726 A1	03-06-2010
			US 2011214680 A1	08-09-2011
			WO 2005113821 A1	01-12-2005
-----				
FR 3017625	A1	21-08-2015	NONE	
-----				
FR 3017624	A1	21-08-2015	NONE	
-----				

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2016/052083

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. G01N33/50 C12Q1/68 G01N33/68 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHARLES THOMAS ET AL: "Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR) response*", INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY, vol. 89, no. 10, 1 octobre 2013 (2013-10-01), pages 813-822, XP055130896, ISSN: 0955-3002, DOI: 10.3109/09553002.2013.800248 le document en entier abrégé page 2; figures 1-4; tableaux II-IV ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
<p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
30 septembre 2016		13/10/2016
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Boiangiu, Clara

1

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2016/052083

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	COLIN C ET AL: "MRE11 and H2AX biomarkers in the response to low-dose exposure: balance between individual susceptibility to radiosensitivity and to genomic instability", INTERNATIONAL JOURNAL OF LOW RADIATION, INDERSCIENCE PUBLISHERS, vol. 8, no. 2, 1 janvier 2011 (2011-01-01) , pages 96-106, XP009179289, ISSN: 1477-6545, DOI: 10.1504/IJLR.2011.044191 le document en entier abrégé pages 99-104; figures 1-3 -----	1-15
X	JOUBERT A ET AL: "Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: Consequences for computed tomography therapy", INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION: ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS, PERGAMON PRESS, USA, vol. 62, no. 5, 1 août 2005 (2005-08-01), pages 1486-1496, XP027750052, ISSN: 0360-3016 [extrait le 2005-08-01] le document en entier page 1487 - page 1494; figures 1-5 -----	1-15
Y	EP 2 466 310 A1 (HELMHOLTZ ZENTRUM MUENCHEN [DE]) 20 juin 2012 (2012-06-20) le document en entier alinéas [0002] - [0012], [0041] - [0045], [0205] - [0216]; revendication 10 -----	1-15
Y	CHARLES THOMAS ET AL: "Low-dose hyper-radiosensitivity of progressive and regressive cells isolated from a rat colon tumour: Impact of DNA repair", INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY, vol. 84, no. 7, 1 janvier 2008 (2008-01-01), pages 533-548, XP055130893, ISSN: 0955-3002, DOI: 10.1080/09553000802195331 le document en entier abrégé; figures 1-8 page 536 - page 546 -----	1-15

-/--

1

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2016/052083

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>JOUBERT ET AL: "Radiosensibilité intrinsèque et cassures double-brin de l'ADN dans les cellules humaines", CANCER RADIOTHERAPIE, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 11, no. 3, 1 mai 2007 (2007-05-01), pages 129-142, XP022089743, ISSN: 1278-3218, DOI: 10.1016/J.CANRAD.2007.01.003 le document en entier figure 5</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
Y	<p>Nicolas Foray: "Les réparatoses : nouveaux concepts sur la prédiction de la radiosensibilité", 25 janvier 2008 (2008-01-25), XP055131242, Extrait de l'Internet: URL: <a href="http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alpesmed/evenements/rns/Rencontres_nuclaires_annees_precedentes/rencontresnucleaires2008/pdf/25_01_08/04_Foray.pdf">http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alpesmed/evenements/rns/Rencontres_nuclaires_annees_precedentes/rencontresnucleaires2008/pdf/25_01_08/04_Foray.pdf</a> [extrait le 2014-07-23] le document en entier spécialement le diapos 17, 18</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
Y	<p>K. ROTHKAMM ET AL: "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 100, no. 9, 29 avril 2003 (2003-04-29), pages 5057-5062, XP055268274, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0830918100 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
Y	<p>S. BURMA ET AL: "ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 45, 2 novembre 2001 (2001-11-02), pages 42462-42467, XP055268489, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.C100466200 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-15

1

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (avril 2005)

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2016/052083

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>Sabine Levegrn ET AL: "FITTING TUMOR CONTROL PROBABILITY MODELS TO BIOPSY OUTCOME AFTER THREE-DIMENSIONAL CONFORMAL RADIATION THERAPY OF PROSTATE CANCER: PITFALLS IN DEDUCING RADIOBIOLOGIC PARAMETERS FOR TUMORS FROM CLINICAL DATA", Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys, 1 janvier 2001 (2001-01-01), pages 1064-1080, XP055268652, Extrait de l'Internet:            URL:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036030160101731X/pdf?md5=52d70b3a6e9e18b4a416a7f5f1e940f4&amp;pid=1-s2.0-S036030160101731X-main.pdf            [extrait le 2016-04-26]            le document en entier            abrégé; tableau 1</p>	1-15
Y	<p>WO 2014/152873 A1 (PIOMA INC [US])            25 septembre 2014 (2014-09-25)            le document en entier</p>	1-15
Y	<p>WO 2005/113821 A1 (VECTOR TOBACCO LTD; NEW YORK MEDICAL UNIVERSITY [US]; ALBINO ANTHONY []) 1 décembre 2005 (2005-12-01)            le document en entier</p>	1-15
Y	<p>A Granzotto ET AL: "Towards a first classification of human radiosensitivity: radiotherapy, radiodiagnosis and history of radiobiology HIGH DOSES STUDIES - THE HUMAN RADIOSENSITIVITY",            30 mars 2012 (2012-03-30), XP055131016,            Extrait de l'Internet:            URL:http://www.crc1.fr/Portals/0/Equipes/Equipe AnsieauPuisieux/poster radiobiology group (2).pdf            [extrait le 2014-07-23]            le document en entier</p>	1-15
Y	<p>Stephen P Jackson: "Carcinogenesis Young Investigator Award Sensing and repairing DNA double-strand breaks",            Carcinogenesis,            1 janvier 2002 (2002-01-01), pages 687-696, XP055273458,            Extrait de l'Internet:            URL:http://carcin.oxfordjournals.org/content/23/5/687.full.pdf            le document en entier</p>	1-15

1

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2016/052083

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	FR 3 017 625 A1 (UNIV CLAUDE BERNARD LYON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; CT LEON BE) 21 août 2015 (2015-08-21) le document en entier -----	1-15
X,P	FR 3 017 624 A1 (UNIV CLAUDE BERNARD LYON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; CT LEON BE) 21 août 2015 (2015-08-21) le document en entier -----	1-15

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2016/052083

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 2466310	A1	20-06-2012	EP 2466310 A1	20-06-2012
			WO 2012080515 A1	21-06-2012
-----				
WO 2014152873	A1	25-09-2014	EP 2971282 A1	20-01-2016
			US 2016041175 A1	11-02-2016
			WO 2014152873 A1	25-09-2014
-----				
WO 2005113821	A1	01-12-2005	US 2008227088 A1	18-09-2008
			US 2010132726 A1	03-06-2010
			US 2011214680 A1	08-09-2011
			WO 2005113821 A1	01-12-2005
-----				
FR 3017625	A1	21-08-2015	AUCUN	
-----				
FR 3017624	A1	21-08-2015	AUCUN	
-----				

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71) 出願人 508071375

ソントル・ナショナル・ドウ・ラ・ルシェルシュ・サイエンティフィック  
フランス国 F - 7 5 7 9 4 , パリ セデックス 1 6 , リュ ミッシェル アンジュ , 3

(71) 出願人 508019311

ユニヴェルシテ クロード ベルナル リヨン 1  
フランス国 エフ - 6 9 6 2 2 ヴィルールバンヌ セデ , ブルヴァール デュ 1 1 ノヴァ  
ンブル 1 9 1 8 , 4 3

(74) 代理人 110001427

特許業務法人前田特許事務所

(72) 発明者 フォレイ ニコラス

フランス国 メリエ , クロ ド ラ パール , 4 4 8

(72) 発明者 ファーラゾ メラニー

フランス国 ユジューヌ , プラス ド ロテル ド ヴィル 1 5

(72) 発明者 ソンゾーニ ローレンス

フランス国 ブール - カン - プレス , ブールパール ヴィクトル ユゴー 4 5

(72) 発明者 ボドギ ラリー

フランス国 リヨン , リュ デュゲクラン 3 0 8

(72) 発明者 ペレイラ サンドリーヌ

フランス国 メラルグ , クール デ ザルブ 2 0

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA13

专利名称(译)	用化学或生物化学因子预测个体DNA裂解的遗传毒性效应的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018530313A</a>	公开(公告)日	2018-10-18
申请号	JP2018509827	申请日	2016-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院 儿子托莱昂基地猪油 儿子托国家德比拉尔外壳格哈德科学费点击		
申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 里昂ペラーson米卡 Sontoru法国国家科研费点击 Université电克劳德·伯纳德·里昂1		
[标]发明人	ファーラゾメラニー ソソゾーニローレンス ポドギラリー ペレイラサンドリーヌ		
发明人	フォレイ ニコラス ファーラゾメラニー ソソゾーニローレンス ポドギラリー ペレイラ サンドリーヌ		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/5014 C12Q1/6883 C12Q2600/142 G01N33/5044 G01N33/68 G01N2800/40 G01N2800/60 G01N2800/709		
FI分类号	C12Q1/68.Z G01N33/53.Y G01N33/48.P		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA13		
优先权	2015001745 2015-08-19 FR 2015059962 2015-10-20 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

至少一种化学或生物化学试剂或化学试剂彼此生化因素一起，或以DNA切割的毒性作用是由于用于评估来自个体的组织的敏感性的这些的组合，在方法其中所述至少一种化学或生化因子的工作浓度或所述化学试剂之间或生化因子之间的工作浓度，设定待评估的个体和个体的组合中包含的化学和/或生化因子的作用浓度的步骤(a)，从待评估的个体收集细胞的步骤(b)，分散的步骤和/或获得细胞样品的步骤(c)；分离细胞样品和至少一种化学或生物化学因子(或化学元素，生物化学)的步骤接触DNA双链断裂数，DNA双链断裂数，表示数量的微生物数，微生物数的至少一个的步骤(d)(B)，(c)，(d)和(e)必须连续进行，步骤(a)在步骤(e)之前进行一定有办法。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2018-530313 (P2018-530313A)
	(43) 公表日	平成30年10月18日(2018.10.18)
(51) Int. Cl.	F I	ターマコード(参考) 2 G 0 4 5
<b>C 1 2 Q 1 / 6 8</b> <b>G O 1 N 3 3 / 5 3</b> <b>G O 1 N 3 3 / 4 8</b>	<b>(2018.01)</b> <b>(2006.01)</b> <b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1 / 6 8 Z G O 1 N 3 3 / 5 3 Y G O 1 N 3 3 / 4 8 P
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)		
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2018-509827 (P2018-509827) 平成28年8月16日(2016.8.16) 平成30年4月10日(2018.4.10) PCT/FR2016/052083 W02017/029450 平成29年2月23日(2017.2.23) 1501745 平成27年8月19日(2015.8.19) フランス(FR) 1559962 平成27年10月20日(2015.10.20) フランス(FR)	(71) 出願人 ネオリス ディアグノスティック フランス国 リヨン, リュ ラエネク 2 8 (71) 出願人 591100596 アンステイチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ ディカル フランス国、エフー75013 パリ、リ ュ・ドゥ・トルビアク 101 (71) 出願人 516241740 ソントル レオン ペラード フランス国 リヨン, ブロムナード レア エ ナボレオン ブルキアン, 28
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 化学的因子または生化学的因子によるDNA切断遺伝子毒性作用を個人について予測する方法		