

(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2017-508148

(P2017-508148A)

(43) 公表日 平成29年3月23日(2017.3.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	2 G O 4 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/34	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
	GO 1 N 21/64 F	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)		

(21) 出願番号 特願2016-552289 (P2016-552289)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月16日 (2015.2.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年10月11日 (2016.10.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2015/050370
 (87) 国際公開番号 W02015/121597
 (87) 国際公開日 平成27年8月20日 (2015.8.20)
 (31) 優先権主張番号 1451216
 (32) 優先日 平成26年2月17日 (2014.2.17)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 1451215
 (32) 優先日 平成26年2月17日 (2014.2.17)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 1402281
 (32) 優先日 平成26年10月10日 (2014.10.10)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 508019311
 ユニヴェルシテ クロード ベルナール
 リヨン 1
 フランス国 エフ-69622 ヴィル
 ルバンヌ セデ, ブルヴァール デュ
 11 ノヴァンブル 1918, 43
 (71) 出願人 508071375
 ソントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシエ
 ルシュ・サイエンティフィック
 フランス国 F-75794, パリ セデ
 ックス 16, リュ ミッシェル アンジ
 ュ, 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織の放射線感受性を判定するための予測的方法

(57) 【要約】

患者の非照射部位またはわずかに照射を受けた部位からサンプリングされた細胞から、患者の有する電離放射線に対する細胞放射線感受性を予測するための方法であって、(i) サンプリングされた細胞は増幅され、この増幅された細胞が前記「細胞サンプル」を構成し、(ii) 細胞サンプルについて、マーカー pH2AX を使用して、0分 (t0、非照射状態) および吸収線量 D の照射後の観察時間 t4 である観察時間 t において得られた核病巣の平均個数を判定し (この平均個数を $N_{pH2AX}(t)$ とする)、(iii) グレイ (Gy) で表される、超過すべきでない合計線量 (TDNTBE) が、少なくともパラメータ $N_{pH2AX}(t4)$ を使用して判定され、t4 は、DNA 切断の比率がその残留値に到達するまでの所要時間を表す固定値である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の非照射部位またはわずかに照射を受けた部位からサンプリングされた細胞から得られた細胞サンプルの有する、電離放射線に対する細胞放射線感受性を予測するための方法であって、

(i) サンプリングされた前記細胞は増幅され、当該増幅された細胞が前記「細胞サンプル」を構成し、

(ii) 前記細胞サンプルについて、マーカー $pH2AX$ を使用して、観察時間 t において得られた核病巣の平均個数を判定し、この平均個数を $N_{pH2AX}(t)$ とし、前記観察時間 t が、0 分すなわち非照射状態を表す t_0 および、吸収線量 D での照射後の観察時間 t_1 と、好ましくは t_2 と t_3 と t_4 から選択される少なくとも一つであり、

(iii) グレイ (Gy) で表される、超過すべきでない合計線量 ($TDNTBE$) が、少なくともパラメータ $N_{pH2AX}(t_4)$ を使用して判定され、

前記 t_4 は、DNA 切断のレベルがその残留値に到達するまでの所要時間を表す固定値であり、好適には、 t_3 の 6 倍～8 倍となるよう、但し、12 時間以上、好ましくは 12 時間～48 時間、より好ましくは約 24 時間となるよう選択され、

前記 t_3 は、その終了時に、放射線抵抗性を有する患者から採取した対照細胞の DSB の約 25% が修復される時間を表す固定値であり、好適には、 t_2 の 3 倍～5 倍となるよう、ただし、2.5 時間以上 6 時間以下、好ましくは 3 時間～5 時間、より好ましくは約 4 時間となるよう選択され、

前記 t_2 は、その終了時に、放射線抵抗性を有する患者から採取した前記対照細胞の DSB の約 50% が修復される時間を表す固定値であり、好適には、 t_1 の 5 倍～7 倍となるよう、ただし、35 分以上 90 分以下、好ましくは 45 分～75 分、より好ましくは約 60 分となるよう選択され、

t_1 は、その終了時に、放射線抵抗性を有する患者から採取した前記対照細胞内で、認識された DSB の数が最大値に達する時間を表す固定値であり、好適には、照射の停止から 5 分～15 分、好ましくは 7.5 分～12.5 分、より好ましくは約 10 分となるよう選択される

ことを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 において、

時間 t に細胞 100 個について観察された核病巣の平均個数 (% で表す) が判定され、この平均個数を $N_{MN}(t)$ をとし、前記時間 t は少なくとも、非照射である t_0 および吸収線量 D での照射後の t_4 であり、前記パラメータ $N_{MN}(t_4)$ が、 $TDNTBE$ を判定するために使用される

ことを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 において、

$TDNTBE$ が、

$N_{pH2AX}(t_0) \leq 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / N_{pH2AX}(t_4)$ により、または、

$N_{pH2AX}(t_0) > 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [N_{pH2AX}(t_4) + N_{pH2AX}(t_0)]$ により判定される

ことを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 2 または 3 において、

前記 $TDNTBE$ が、

$N_{pH2AX}(t_0) \leq 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [0.4 \times N_{MN}(t_4)]$ により、または、

$N_{pH2AX}(t_0) > 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [2 + (0.4 \times N_{MN}(t_4))]$ により、または、

10

20

30

40

50

$N_{PH2AX}(t)$]により判定される
ことを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 つにおいて、
前記サンプリングされた細胞が、患者の皮膚生検材料から採取された線維芽細胞であることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか 1 つにおいて、
前記吸収線量 D が $0.5 \text{ Gy} \sim 4 \text{ Gy}$ 、好ましくは $1 \text{ Gy} \sim 3 \text{ Gy}$ 、より好ましくは $1.7 \text{ Gy} \sim 2.3 \text{ Gy}$ 、さらに好ましくは 2 Gy である
ことを特徴とする方法。

10

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか 1 つにおいて、
 t_1 が 8 分 \sim 12 分であり、 t_2 が 50 分 \sim 70 分であり、 t_3 が 3.5 時間 \sim 4.5 時間であり、 t_4 が 22 時間 \sim 26 時間である
ことを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 6 または 7 において、
 t_1 が 10 分、 t_2 が 60 分、 t_3 が 4 時間、 t_4 が 24 時間であり、 D が 2 Gy である
ことを特徴とする方法。

20

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか 1 つにおいて、
 $N_{PH2AX}(t)$ の判定には、免疫蛍光試験を伴う
ことを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれか 1 つにおいて、
放射線抵抗性を有する患者から採取した前記対照細胞は、吸収線量 2 Gy での照射の後に示すインビトロのクローン原性生存率が 55% よりも高い細胞として選択される
ことを特徴とする方法。

30

【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれか 1 つにおいて、
放射線抵抗性を有する患者から採取した前記対照細胞は、放射線治療中または治療後に重大な組織反応を示さなかった患者から採取した細胞として選択される
ことを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 3 から 11 のいずれか 1 つにおいて、
前記マーカー $pH2AX$ を使用して観察時間 t_1 、 t_2 、および t_3 において得られた核病巣の前記平均個数が、 DSB 部位認識の動態曲線の形状を検証するために使用される
ことを特徴とする方法。

40

【請求項 13】

請求項 1 から 12 のいずれか 1 つにおいて、
マーカー $pATM$ および $MRE11$ のうち少なくとも一方を使用した、観察時間 t と、吸収線量 D での照射後の t_1 、 t_2 、 t_3 、および t_4 から選択される少なくとも 1 つの観察時間とにおいて得られた核病巣の平均個数が判定され、これら平均個数をそれぞれ $N_{pATM}(t)$ および $N_{MRE11}(t)$ とする
ことを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 1 から 13 のいずれか 1 つにおいて、
 $TDNTBE$ よりも前に、患者の放射線感受性グループが、

50

(a) $N_{pH2AX}(t4) < 2$ 、且つ、 $N_{pATM}(t1) > N_{pATM}(t2)$ 、
且つ、 $N_{pATM}(t1) > 30$ 、且つ $A < 10$ 、且つ、 $B < 5$ 、且つ、 $C < 2$ であり、
但し

$$C = N_{pH2AX}(t0) + N_{MN}(t0);$$

$B =$ 大核 ($150 \mu m^2$ よりも大きい核) の $t0$ におけるパーセンテージ;

$A = N_{MRE11}(t0) + t0$ における細胞 1 個あたりの $pH2AX$ 小病巣数
であるとき、サンプルは放射線抵抗性を有する (グループ I) と見なされ、

(b) ($N_{pH2AX}(t4) > 8$ 、または、 $N_{MN}(t4) > 24$)

であるとき、サンプルは高放射線感受性を有する (グループ III) と見なされ、

(c) その他のすべての条件の場合は、サンプルは中等度の放射線感受性を有する (グループ II) と見なされる、手順に従い判定される

ことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療用放射線生物学の分野に関し、より具体的には、放射線生物学的臨床検査方法の分野に関する。本発明は、複数のパラメータと細胞的酵素的基準の判定および相関に基づいて、細胞的、組織的、且つ臨床的な放射線感受性を予測するための新規な方法に関する。

【背景技術】

【0002】

放射線治療を受けるがん患者の約 1 ~ 15% には、組織反応 (例えば、皮膚炎または直腸炎) が現われる。この組織応答は、治療に影響を及ぼし得、計画されたプロトコルが終了する前に、医師が放射線治療の中止を決定してしまうこともある。また、上記の組織反応は、患者が電離放射線に対して特に高い感受性をもつことの指標でもある。さらに、放射線治療は、目に見える最初の組織兆候が現われたときに中断したとしても、治療後の合併症の罹患率だけでなく、患者の死亡率さえも上昇させ得る。この原因は、治療を早期に中止したために治療対象のがんを完全に根絶することができなかつたことに加え、放射線自体によって健康な組織に付帯的な損傷が誘発されることである。

【0003】

電離放射線に対する組織の感受性の問題が、DNA 損傷の修復メカニズムの問題と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、電離放射線はフリーラジカルを発生することにより (特に、過剰酸化により) および DNA 損傷に起因するその他の反応種を発生することにより、複数種の化学結合を切断し得る。内因性または外因性ストレス (例えば、電離放射線およびフリーラジカル) が引き起こす DNA の損傷は、特に印加されたエネルギーに応じて、塩基の損傷、一本鎖切断、および二本鎖切断 (double-strand breaks, DSB) といった、さまざまな種類の DNA 損傷につながり得る。未修復の DSB は、細胞の死滅、毒性、および、より具体的には放射線感受性に関係する。不十分に修復された DSB は、ゲノム不安定性、変異促進性現象、およびがん素因に関係する。生体は、DNA 損傷の種類ごとに特定の修復システムを備えている。ほ乳類は、2 つの主要な DSB 修復様式、すなわち、縫合 (suture) による修復 (鎖の結紮) と、組替えによる修復 (相同鎖または非同源鎖の挿入) とを備える。

【0004】

電離放射線に対する組織の感受性は、器官ごとに大きく変化し、また、個人差も大きいことが知られている。1981年に、Fertil および Malaise により、「固有放射線感受性」の概念化された。したがって、放射線治療の治療効果と副作用についての各種の研究により、放射線抵抗性が特に高い個人と、これとは対照的に、臨床的に認識できるが重大ではない副作用から、致命的な副作用までの放射線感受性をもつ個人とが存在することが分かっている。その遺伝的起源が認識されたと思われる、極端な放射線感受性をもつ特定のまれな例を除いても、放射線感受性は概して遺伝的素因に由来し、したがって、個人に特

10

20

30

40

50

有のものであると考えられている。このため、任意の患者がリスクを伴わずに受けることができる最大蓄積線量を判定できるように、予測的検査方法があることが望ましい。この問題は、主に高電離線量の放射線治療において起こるものである。しかし、放射線治療に使用されるものと同様に、これ以外の強電離線量のあらゆる種類の被ばくについても、問題となりやすい。

【0005】

一般にATMおよびATRとして呼ばれる、キナーゼのファミリーのうちの2つのタンパク質が、DSBの検出、修復、およびシグナリングに関係していることが知られている。これらの作用には、少なくとも、BRCA1という呼称で知られるタンパク質の存在と、種々のATM基質の順序づけられたリン酸化のカスケード(cascade de phosphorylations ordonnee)の存在が必要である(N. Foray他、“A subset of ATM-and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA 1 protein”、TheEMBOJournal、2003年、vol. 22(11)、p.2860-2871を参照)。細胞の放射線感受性の説明モデルにATM酵素を使用する試みが行われ(Joubert他、“DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response; At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?”、Int.J.Radiat.Biol.2008年、vol. 84(2)、p. 107-125を参照)、これにより、3種類の放射線感受性の識別が可能になった。すなわち、放射線抵抗性を有する細胞(グループI放射線感受性)、中等度の放射線感受性を有する細胞(グループII放射線感受性)、および、極端に放射線感受性が高い細胞(グループIII放射線感受性)の3種類である。しかし、これに基づく予測モデルは提案されていない。特に、臨床データ(組織重症度)と放射線生物学的データとの間の関係は確立されていない。同様に、“Rencontres Nucleaire & Sante”(2008年1月25日(XP55131242)におけるN. Forayの発表“Les reparatoses: nouveaux concepts sur la prediction de la radiosensibilite”, delivered during “Rencontres Nucleaire & Sante”では、放射線起因の二本鎖切断の数を説明するために、異なるマーカーpH2AXおよびMRE11の役割とその経時的変化が示唆されている。この発表では、臨床レベルで観察される放射線感受性レベルを定量化および識別する組織重症度については言及されていない。

10

20

【0006】

ATMがDNA損傷の検出と修復に寄与可能となる条件については、多くの文献に記載されている。国際公開第2004/013634号(KUDOS Pharmaceuticals Ltd)には、MRE11/Rad51/NBS1複合体を含む他の応答因子と相互作用する、ATM依存性DNA損傷のシグナル伝達経路の識別が記載されている。米国特許出願公開第2007/0072210号明細書(OuchiおよびAglipay)には、DNA損傷への応答を促進する有力な治療剤をスクリーニングする方法が提案されている。この方法では、BAAT1として知られるタンパク質(BRCA1遺伝子と関連するがん素因に関係する)と、ATMタンパク質と、候補化合物とが混合され、候補化合物を含まない対照混合物に対して、ATMのリン酸化が増大すれば、後者がDNA修復を促進する潜在的な有効成分として識別される。欧州特許出願公開第2466310号明細書(Helmholtz Zentrum Muenchen)には、H2AXヒストンのリン酸化型(gamma-H2AXまたはg-H2AXと呼ばれる)存在下での、DNAの二本鎖切断の修復が記載されている。国際公開第00/47760号および米国特許第7279290号明細書(St. Jude's Children's Research Hospital)には、DNA修復における、ATMのキナーゼ官能基の役割について記載されている。

30

40

【0007】

したがって、これらの文献には修復経路についての記載はあるものの、臨床的関連を確証する相関については何らの提示もない。

【0008】

欧州特許第1616011号明細書(International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology)には、DNA修復における遺伝的欠陥を診断する方法が開示されている。この方法は、検査対象のサンプルから分離した細胞の培養、キメラポリペプチドを

50

使用しての上記細胞のインキュベーション、および細胞応答の特性判定の、3つの工程に基づく。この細胞応答は、細胞内タンパク質、具体的には、p53、ATM, Chk1, Chk2, BRCA1, BRCA2, Nbs1, MRE11, Rad50, Rad51タイプおよびヒストンからなる生化学的マーカーの発現率である。しかし、放射線起因の発現では、上記タンパク質の官能性を予測することはできない(ある種の症候群は、タンパク質が変異していても、正常な発現率を示す)。これらの手順は、機能的な検査とは言えない。

【0009】

国際公開第01/90408号、国際公開第2004/059004号、および国際公開2006/136686号(French Atomic Energy Commission)には、電離性放射線照射の結果生じるDNA損傷の観察方法が記載されている。最初の文献は、DNA損傷切開活性を開示しているが、DNAの除去と再合成の酵素活性の定量化や、DSB修復の定量化を可能にするものではない。その他の2つの文献には、超らせん状円形二本鎖DNAを使用した、生物培地のDNAの修復性能についての定量的評価の記載がある(3番目の文献によれば、多孔性ポリアクリルアミドヒドロゲル膜における固定)。これらの方法は、生理学的環境における生体内原位置の(in situ)DSBには直接関連せず、これらの方法の臨床的適用を評価するための相関は存在しない。

10

【0010】

韓国公開特許第20030033519号公報には、触媒活性またはスーパーオキシドジスムターゼの活性から放射線感受性を推定することが提案されており、韓国公開特許第20030033518号公報では、グルタチオンペルオキシダーゼまたはグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼが使用されている。このような方法は、DNAの損傷または修復に直接関連したマーカーを検出するものではない。

20

【0011】

米国特許出願公開第2011/312514号明細書(Dana Farber Cancer Institute)には、FANCD2病巣の検出をマーカーとして利用することが提案されている。米国特許出願公開第2007/0264648号明細書(National Institute of Radiological Sciences)には、DNAオリゴマーを利用して、放射線治療中の副作用の出現を予測することが提案されている。しかし、FANCD2病巣のレベルが正常なときにも、ある種の放射線感受性が観察され得る。

30

【0012】

米国特許出願公開第2008/234946号明細書および米国特許出願公開第2012/041908号明細書(University of South Florida他)は、健康な細胞ではなく、がん細胞の放射線感受性を予測する方法が記載されているが、これはゲノムデータに基づくものであり、機能試験に基づくものではない。

【0013】

国際公開第2014/154854号(Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier)には、対象の放射線感受性を、少なくとも1種の放射線感受性バイオマーカーを使用して予測する方法が記載されている。この方法は、DNAの損傷または修復に直接関連したマーカーを検出するものではなく、また、プロテオミクスデータに基づくものである。さらに、この特許出願は、放射線生物学的データと組織反応との重症性の定量的関係については説明していない。

40

【0014】

国際公開第2013/187973号(University of California)には、細胞の放射線感受性および/または対象の放射線感受性を、対照群に比して判定するためのシステムと方法とが記載されている。より具体的には、この方法は、生物学的サンプルへの照射と、赤血球内、リンパ球内、および一次細胞内の放射線起因病巣の検出および定量化とを含む。これらは、抗pH2AX、抗MRE11、および抗ATMを含む一組のマーカーから選択される1種以上の検出マーカーを使用して、血液サンプルから得られる結果である。照射後の各観察時間(2時間以内)における放射線起因病巣の定量化により、その修復動

50

態の判定ができ、これが実験的に対象の放射線感受性と相関される。しかし、リンパ球内の病巣の分析は、その核が小さいために、非常に困難である。さらに、上記の方法では、医師は患者の治療について決断をすることができない。

【0015】

米国特許第8269163号明細書(New York University School of Medicine)には、トリアージによって患者に適切な緊急治療を受けさせることを目的として、人を対象とした電離放射線への偶発的暴露の重大性を簡単且つ迅速に評価する際にマーカーとして使用可能な多数のタンパク質が記載されている。この特許は、生物学的線量測定(偶発的線量の判定)に関し、一方、放射線感受性は、分かっている線量を使用して検出される。

【0016】

国際公開第2010/88650号(University of Texas)には、特定の放射線治療に対して感受性または耐性を有するがん細胞を識別するための方法および組成物が記載されている。したがって、この文献は、すべての放射線治療に適用可能ではない。

【0017】

国際公開第2010/136942号(Philips)には、バイオマーカーを使用して、放射線治療中に患者をモニタリングするための包括的方法が記載されている。この方法は、撮像装置から抽出された画像から少なくとも1つのディスクリプタを得る工程を含む。このディスクリプタは、放射線治療の関心組織か、この目標部位の近傍の組織に属するものである。この方法は、さらに、関心組織領域における放射線治療の副作用の検出または定量化が可能な、疾病に特有の生物学的マーカーを少なくとも1種選択する工程を含む。この方法は、さらに、選択した疾病に特有のバイオマーカーのインビトロでの測定値を少なくとも1つ回収する工程を含む。さらには、上記少なくとも1種のバイオマーカーのインビトロ測定値の少なくとも1つのディスクリプタを、相関技術により処理する工程を含み、関心組織領域における放射能毒性を示すシグナルが出力される。しかし、この特許の教示は、組織依存の毒性を考慮するのみであって、個人の毒性については考慮しないものであり、主に画像解析に基づいている。

【0018】

国際公開第2010/109357号には、正常な組織における合併症の確率と、各患者に特有のマーカーに従った腫瘍制御の確率との最適化に基づいて、適用性のある放射線治療プロトコルを計画するための方法および装置が記載されている。正常な組織に関連するマーカーの値は、インビトロ検査値と、タンパク質の質量分析シグネチャーと、患者の履歴データとを含む。インビトロ検査値は、細胞的、プロテオミクスの、および遺伝的起源のものであってもよく、種々の細胞計数、HB、CRP、PSA、TNF-アルファ、フェリチン、トランスフェリン、LDH、IL-6、ヘプシジン、クレアチニン、グルコース、HbA1c、およびテロメアの長さなどであるが、これに限定されない。患者の履歴マーカーは、これまでの腹部手術、ホルモン薬剤または抗凝固剤の投与、糖尿病、年齢、および腫瘍増殖に関連する測定値を含む。各種の切除または化学療法薬剤に関連するバイオマーカーなどの、放射線毒性に関連しないバイオマーカーも想定される。しかし、個人の放射線感受性は考慮されていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

出願人は、このような多彩な従来技術が存在するにもかかわらず、上記の特許には、放射線治療後の組織反応のリスクの評価を可能にし、且つ、どんな患者にも、また、DSBを誘発可能ないかなる種類の電離放射線にも使用され得る、予測可能な、個人の放射線感受性の定量化の方法が記載されていないことに注目した。すなわち、個人の放射線感受性を予測する方法を提供するという課題には、実効的な解決手段がまだない。本発明は、組織的および臨床的放射線感受性を予測する新規な方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0020】

10

20

30

40

50

発明者らは以下の知見を得、本発明の方法はこの知見から考案された。すなわち、DNAの二本鎖切断(DSB)は、それが修復されないときには、放射線感受性を最もよく予測する放射線起因の損傷の種類を表し、修復が不十分なときには、ゲノム不安定性を最もよく予測する放射線起因損傷の種類を表す、という知見である。発明者らは、DSBは、結合(joining)と呼ばれる主要な修復様式により、および/または、MRE11依存性組替えと呼ばれる非主要で不完全な修復様式により対処されることを発見した。これら修復様式は、ATMタンパク質により制御される。マーカーpH2AXは、結合修復様式により認識されたDSBを示す。マーカーMRE11は、不完全なMRE11依存性組替えにより処置されたDSB部位を示す。マーカーpATMは、H2AXのリン酸化とMRE11依存性経路の阻害とによる結合経路の活性化についての情報を提供する。

10

【0021】

発明者らは、また、ATMタンパク質の細胞質型が、酸化的ストレス、特に、DSBを誘発する電離放射線に係るストレスの後に、細胞核内に移動することを観察した。

【0022】

外因性ストレスによるDNA損傷を観察するためには、DNAの自然な状態と放射線起因の状態との両方を考慮する必要がある。さらに、放射線照射後には、DNA修復を考慮する必要があるが、このDNA修復の動態は、修復メカニズムに依存するため、放射線起因損傷の種類に依存する。さらには、DNA修復の有効性とスピードには個人差があること、また、例外的な放射線感受性につながる特定の遺伝的条件が存在することも知られている。

20

【0023】

本発明によれば、上記の問題は、1)非形質転換細胞、特に、皮膚生検材料の細胞の増幅と、2)ヒトの休止期細胞に有効な機構モデルと、3)治療方法の如何に関わらず有効な、DSBの認識、修復、およびシグナリングの機能検査とに基づく方法により解決される。

【0024】

本発明の第1の主題は、患者の非照射部位またはわずかに照射を受けた部位からサンプリングされた細胞から得られた細胞サンプルの有する、電離放射線に対する細胞放射線感受性を予測するための方法である。この方法においては、

(i) サンプリングされた上記細胞は増幅され、当該増幅された細胞が上記「細胞サンプル」を構成し、

30

(ii) 上記細胞サンプルについて、マーカーpH2AXを使用して、得られた核病巣の平均個数を観察時間tにおいて判定し(この平均個数を $N_{pH2AX}(t)$ とする)、上記観察時間tが0分(t_0 、非照射状態)と、吸収線量Dでの照射後のt4(および好ましくはt1、t2、およびt3)とであり、

(iii) グレイ(Gy)で表される、超過すべきでない合計線量(TDNTE)が、少なくともパラメータ $N_{pH2AX}(t_4)$ を使用して判定され、

(iv) 上記細胞サンプルに関し、マーカーpH2AX、pATM、およびMRE11のうちの少なくとも2種を使用して、核病巣の平均個数を観察時間tにおいて判定し、これらの平均個数をそれぞれ、 $N_{pH2AX}(t)$ 、 $N_{pATM}(t)$ 、 $N_{MRE11}(t)$ とし、上記観察時間tは、0分すなわち非照射状態をあらわす t_0 と、吸収線量Dでの照射後の観察時間t1とt2とt3とt4から選択される少なくとも1つであり、

40

(v) 上記サンプルの放射線感受性グループが、少なくとも上記平均個数 $N_{pH2AX}(t)$ 、 $N_{pATM}(t)$ 、および $N_{MRE11}(t)$ を使用して判定され、

上記t4は、DNA切断のレベルがその残留値に到達するまでの所要時間を表す固定値であり、好適には、t3の6倍~8倍となるよう、但し、12時間以上、好ましくは12時間~48時間、より好ましくは約24時間となるよう選択され、

上記t3は、その終了時に、放射線抵抗性を有する患者から採取した対照細胞のDSBの約25%が修復される時間を表す固定値であり、好適には、t2の3倍~5倍となるよう、ただし、2.5時間以上6時間以下、好ましくは3時間~5時間、より好ましくは

50

約 4 時間となるよう選択され、

上記 t_2 は、その終了時に、放射線抵抗性を有する患者から採取した上記対照細胞の DSB の約 50% が修復される時間を表す固定値であり、好適には、 t_1 の 5 倍～7 倍となるよう、ただし、35 分以上 90 分以下、好ましくは 45 分～75 分、より好ましくは約 60 分となるよう選択され、

t_1 は、その終了時に、放射線抵抗性を有する患者から採取した上記対照細胞内で、認識された DSB の数が最大値に達する時間を表す固定値であり、好適には、照射の停止から 5 分～15 分、好ましくは 7.5 分～12.5 分、より好ましくは約 10 分となるよう選択される。

【0025】

好適な実施形態では、マーカー pH2AX を使用して観察時間 t_1 、 t_2 、および t_3 において得られた核病巣の平均個数が、DSB 動態認識の形状および修復曲線を検証するために使用される。

【0026】

グレイ (Gy) で表される、超過すべきでない合計線量 (TDNTBE) は、放射線治療医にとって重要なパラメータであり、これによって、任意の患者が潜在的な致命的反応を起こさずに吸収できる最大線量を予測できる。このパラメータによって、放射線感受性が特に高い患者に対する放射線治療を排除することもできる。

【0027】

TDNTBE は、理想的には、皮膚等価物として表される。試験は皮膚線維芽細胞について行われるので、TDNTBE を他の組織に直接的に定量的外挿することはできない。そのため、予測は、実質的には、皮膚または生物学的に等価な組織 (例えば、肺線維芽細胞) の放射線起因応答に関連する。しかし、内皮や星状細胞や上皮等の他の組織への外挿が、質的に行われてもよい。とはいえ、各組織に特有の是正的要因のより正確な定義が待たれる。

【0028】

本発明によれば、TDNTBE を、

$N_{pH2AX}(t_0) \leq 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / N_{pH2AX}(t_4)$] により、または、

$N_{pH2AX}(t_0) > 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [N_{pH2AX}(t_4) + N_{pH2AX}(t_0)]$ により判定可能である。

【0029】

本発明の方法の変形例では、上記細胞サンプルに関し、時間 t において細胞 100 個について観察された核病巣の平均個数 (% で表す) も判定され (この平均個数を $N_{MN}(t)$) とする)、時間 t は少なくとも、 t_0 (非照射) および吸収線量 D での照射後の t_4 であり、パラメータ $N_{MN}(t_4)$ が、上記 TDNTBE を判定するために使用される。しかし、実験に基づく小核測定 of 統計的不確実性は、免疫蛍光検査で観察される核病巣の個数の統計的不確実性よりも高いため、病巣測定の予測的数値は、小核の予測的数値よりも好ましいといえるであろう。

【0030】

したがって、例えば、次式により、 $N_{MN}(t)$ に基づいて TDNTBE を判定することができる。

【0031】

$N_{pH2AX}(t_0) \leq 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [0.4 \times N_{MN}(t_4)]$]、または

$N_{pH2AX}(t_0) > 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [2 + (0.4 \times N_{MN}(t_4))]$]

本発明の方法の変形例の一方または他方を使用すると、小数が得られる。上記式の一方または他方の使用後に得られる、最終の TDNTBE の値は、計算で得られた値を算術的に丸めたものに相当する整数である。本発明により判定された TDNTBE は、この整数

10

20

30

40

50

に相当する。

【0032】

本発明の方法の変形例の1つによれば、好適には、タイプII放射線感受性グループ（中程度の放射線感受性）に属する患者については、正確なTDNTBEを患者に割り当てることを目的に、患者の放射線感受性グループが、上記TDNTBEよりも前に判定される。

【0033】

サンプルの放射線感受性は、上記の式によって、以下の方法で判定される。

(a) $N_{pH2AX}(t4) < 2$ 、且つ、 $N_{pATM}(t1) > N_{pATM}(t2)$ 、且つ、 $N_{pATM}(t1) > 30$ 、且つ、 $A < 10$ 、且つ、 $B < 5$ 、且つ、 $C < 2$ であり、但し、

$$C = N_{pH2AX}(t0) + N_{M N}(t0);$$

$B =$ 大核 ($150 \mu m^2$ よりも大きい核) の $t0$ におけるパーセンテージ；

$A = N_{MRE11}(t0) + t0$ における細胞1個あたりのpH2AX小病巣数であるとき、サンプルは放射線抵抗性を有すると見なされ、

(b) ($N_{pH2AX}(t4) > 8$ 、または、 $N_{M N}(t4) > 24$) であるとき、サンプルは高い放射線感受性を有すると見なされ、

(c) その他のすべての条件の場合は、サンプルは中等度の放射線感受性を有すると見なされる。

【0034】

一部の患者については、がん罹患しやすい患者に一般的に見られる高頻度組替え現象が原因となって、DNAの二本鎖切断(DSB)が連続的に自然発生することにより、DNAの修復が阻害され得る。DSBの自発的な過剰生産は、矛盾しない2つの影響をもち得る。すなわち、自然状態において、pH2AXによる標識により、通常見られるpH2AX病巣よりも小さい核病巣が出現し得るが、これらは多数のDSBの存在を反映する（「小巣」現象）。同様に、SSBの過剰生産はクロマチンの脱凝縮につながることもあり、これにより、細胞核が大きくなる（概して、 $150 \mu m^2$ を超える大きさ；「大核」現象に相当）。これらの2つの現象は、ゲノム不安定性が高いことを反映している。

【0035】

次いで、放射線感受性グループIIの患者について、上記2つの変形例を介して、TDNTBEが判定される。具体的には、次式の通りである。

【0036】

$N_{pH2AX}(t0) \leq 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / N_{pH2AX}(t4)$] により、または、

$N_{pH2AX}(t0) > 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [N_{pH2AX}(t4) + N_{pH2AX}(t0)]$ により判定される。

【0037】

あるいは、第2の変形例によれば、数式：TDNTBEを $N_{M N}(t)$ に基づいて、次式により判定できる。

【0038】

$N_{pH2AX}(t0) \leq 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [0.4 \times N_{M N}(t4)]$] により、または、

$N_{pH2AX}(t0) > 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [2 + (0.4 \times N_{M N}(t4))]$] により判定できる。

【0039】

本発明の方法の変形例の一方または他方を使用すると、小数が得られる。上記式の一方または他方を使用後に得られる、最終のTDNTBEの値は、計算で得られた値を算術的に丸めたものに相当する整数である。本発明により判定されたTDNTBEは、この整数に相当する。

【0040】

10

20

30

40

50

本発明の方法は、好ましくは線維芽細胞である健康な組織サンプルを少なくとも1つ使用する。この線維芽細胞は、好ましくは、患者の結合組織からサンプリングされる。このサンプリングは、生検により行ってもよい。したがって、好適な実施形態においては、上記のサンプリングされた細胞は、患者の皮膚生検材料から採取された線維芽細胞である（典型的には、「皮膚パンチ生検」として知られる方法に従ってサンプリングされる）。この組織サンプルを、適切な培地で培養する。

【0041】

細胞のサンプリング（具体的には、好ましい実施形態では、線維芽細胞株の生検の確立を介する）の後に行われる本発明の方法の第1の工程では、DNAの自然状態（ t_0 における状態）、言い換えれば、照射を受けない状態の特徴を特定する。この工程は、特に、核の大きさ、小核の存在、自発的アポトーシス体および複数の損傷を有する複数の細胞についての調査を含んでもよい。細胞は、蛍光顕微鏡で観察される。DAPI染料（4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール、二塩酸塩についてはCAS No. 28718-90-3）を使用すると、ゲノム不安定性の指標である、細胞100個についての小核のレベルが判定される。アポトーシス体も判定される。その存在がクロマチンの脱凝縮を示す、異常に大きい核の集団も判定される。

10

【0042】

電離放射線は、吸収線量（ D と称され、グレイで表されるパラメータ）により定義される。本発明によれば、吸収線量 D は、 $0.5\text{ Gy} \sim 4\text{ Gy}$ 、好ましくは $1\text{ Gy} \sim 3\text{ Gy}$ 、より好ましくは $1.7\text{ Gy} \sim 2.3\text{ Gy}$ 、さらに好ましくは 2 Gy である。これらの範囲は、典型的には、個別の放射線治療セッション、部位に応じたセッションの回数、および、腫瘍の進行のタイプと状態に対応する。

20

【0043】

本発明の方法においては、すべての時間値 t_1 、 t_2 、 t_3 、および t_4 を、一連の検査の開始時に（つまり、少なくとも1人の任意の患者につき、好ましくは、この方法を統計的に意義のある一群の観察に対して校正するためには、複数の患者につき）定義すること、および、これら時間値が上記時間間隔を表す全パラメータの判定すべてについて同じであることが重要である。

【0044】

本発明の方法では、 t_1 は、好適には8分～12分であり、および/または、 t_2 は、好適には50分～70分であり、および/または、 t_3 は、好適には3.5時間～4.5時間であり、および/または、 t_4 は、好適には22時間～26時間である。4つの条件すべてが満足されるのが好ましい。

30

【0045】

本発明の方法における、特に有利で、また、標準化が簡単な変形例では、 t_1 が10分、 t_2 が60分、 t_3 が4時間、 t_4 が24時間であり、 D が 2 Gy である。

【0046】

好適には、 $N_{pH2AX}(t)$ の判定には、免疫蛍光試験を伴う。

【0047】

放射線抵抗性を有する患者からの対照細胞が、臨床的検査を通じて、放射線治療中または治療後に重大な組織反応を示さなかった患者として選択された患者からの細胞として選択され得る。上記対照細胞は、また、吸収線量 2 Gy での照射の後に示すインビトロのクロン原性生存率が、55%よりも高い細胞として選択されてもよい。

40

【0048】

以下、典型的な実施形態について説明する。

【0049】

細胞は、マーカー $pH2AX$ を使用して、観察する。マーカー $pATM$ および/または $MRE11$ を使用した、観察時間 t における観察（これらの平均個数を、それぞれ、 $N_{pATM}(t)$ 、 $N_{MRE11}(t)$ と呼ぶ）と、吸収線量 D での照射後の t_1 、 t_2 、 t_3 および t_4 から選択される少なくとも1つの観察時間における観察とを、追加すること

50

もできる。ある実施形態では、マーカー p H 2 A X と、複数溶解細胞の存在とによって、病巣の個数が判定される。p A T M タンパク質の位置と M R E 1 1 タンパク質の位置（核内（n u c l e a r）または細胞質内（c y t o p l a s m i c））が記録される。

【0050】

この第1の工程により、自然状態における潜在的なゲノム不安定性が識別できる。

【0051】

本発明の方法の第2の工程は、所望の吸収線量 D（例えば 2 G y）での放射線照射と、電離放射線に対する細胞応答の評価とを含む。

【0052】

a) 第1の実施形態では、放射線起因 D S B の結合（j o i n i n g ,）による修復を調べる。結合は、D S B の主要な修復様式である。細胞1個あたりの p H 2 A X 病巣の個数が t 4 において判定され、さらに、必要に応じて t 1、t 2 において、場合によっては t 3 においても判定される。t 3 での判定により、t 1 から t 4 までの動態速度の定義を強固にできる。好適な実施形態においては、t 4 の後、放射線起因の小核のレベルを推定するために、小核のレベルの判定も行う。これにより、未修復 D S B の優位性に基づいた放射線感受性の推定ができる。

10

【0053】

b) 第2の実施形態では、A T M 依存性のキナーゼ活性化の機能性の測定を通して、電離放射線に対する細胞応答についてより詳細な調査が行われる。放射線抵抗性の対照細胞においては、A T M タンパク質のリン酸化型（p A T M）は、自然状態では、細胞質内にある（c y t o p l a s m i c）ことが知られている。出願人は、照射後状態では、A T M タンパク質のリン酸化型が、核内にある（n u c l e a r）傾向があることを発見した。一旦、核に移動すると、p A T M 型は、結合による修復メカニズムを活性化し、不完全な M R E 1 1 依存性修復の経路を阻害する。

20

【0054】

一例として、放射線照射（例えば、吸収線量 2 G y）の後、p A T M 型が細胞質局在性を示す場合には、p A T M 型は細胞質から核に移行しない、または、正常に移行できないと結論づけることができる。この理由としては、A T M の変異、または、放射線照射後に A T M が核に移行するのを補助する A T M のパートナータンパク質いずれかの変異が考えられる。いずれにせよ、このことは、相当高い放射線感受性を示すものである。

30

【0055】

この p A T M タンパク質の位置判定は、少なくとも t 1 および t 2 において行われ、必要に応じて、t 3 および t 4 においても行われる。

【0056】

c) 第3の実施形態は、上記の実施形態と組み合わせ可能であり、電離放射線に対する細胞応答の、M R E 1 1 依存性経路を介しての調査が拡大される。結合による主要な修復経路については、その能力を p H 2 A X 免疫蛍光検査により定量化可能であるが、この修復経路に加え、出願人は、別の修復経路を識別した。この別の修復経路は、結合の代替手段であり、遺伝子欠損の場合には、結合に代わって使用される。これが、M R E 1 1 依存性組替えによる修復である。この経路の能力は、M R E 1 1 病巣の免疫蛍光検査の動態研究により定量化可能である。この測定は、少なくとも t 1、t 2、および t 3 において行われ、必要に応じて t 4 においても行われる。出願人が得た知見によると、放射線抵抗性の対照株においては、M R E 1 1 は細胞質内にあり、M R E 1 1 病巣の個数は、線量 2 G y の後 4 時間までは、非常に少ない（典型的には、M R E 1 1 病巣の個数は 7 ± 2 ）。放射線照射後約 2 4 時間で、標識（m a r k i n g）は細胞内となる。

40

【0057】

最後の工程では、放射線起因の損傷の状態および/または患者の放射線感受性、特に、患者に特有の T D N T B E を予測するために、結果がスコア計算によって評価される。

【図面の簡単な説明】

【0058】

50

図 1 A、B および C は、それぞれ、非照射細胞からの (A) 小核病巣の個数の変化、(B) マーカー p H 2 A X の個数の変化、(C) マーカー p A T M の個数の変化を、C T C A E 分類に沿った重症度と関連させて示す。非照射細胞の小核、p H 2 A X 病巣、および p A T M 病巣からは、放射線感受性は予測できない。

【 0 0 5 9 】

組織反応の重症度については、2 つの異なる尺度、すなわち、C T C A E 分類と R T O C 分類がある。

【 0 0 6 0 】

いわゆる C T C A E (Common Terminology Criteria for Adverse Events) 分類は、米国国立がん研究所 (National Cancer Institute of the United States of America) に

10

よって 2 0 0 6 年に発表された、がん治療における有害事象 (特に、副作用) の用語基準である。

【 0 0 6 1 】

有害事象とは、有害で意図的でない何らかの兆候、症状、または疾病に相当し、医学的治療または医学的処置の使用に時間的に関連し、当該治療または当該医学的処置に関係があると見なされる場合も見なされない場合もある。有害事象は、医療用文書管理のため、また、科学的分析中に使用される、特定の事象を独自の形で表したものである。

【 0 0 6 2 】

C T C A E では、有害事象の意味を明確にする目的で、各有害事象が簡潔に定義されている。この尺度は、他の遺伝毒性ストレス (例えば、火傷) にも有効であるが、特に放射線治療において使用される。

20

【 0 0 6 3 】

グレードは、有害事象の重症度を示す。C T C A E には 5 つの重症度グレード (1 ~ 5) があり、各有害事象の重症度について、独自の臨床的説明がされている。これを以下の表 1 に示す。各重症度グレードは、特定された組織反応により定義される。

【 0 0 6 4 】

【 表 1 】

グレード 1	軽い重症度；無症候または軽い症状；臨床的または診断上の観察のみ；介入は不要
グレード 2	中等度の重症度；最小限の、局所的な、または非侵襲性の行為が必要；年齢に応じた手段的日常生活動作を制限 (食事の準備、買い物、電話の使用、等)
グレード 3	重度または医療的に重大な重症度であるが、直ちに生命にかかわるわけではない；入院または入院の延長が必要；障害事象；日常生活での身辺動作を制限する事象 (入浴、着替え、自身での食事、トイレの使用、服薬、寝たきりではない)
グレード 4	生命にかかわる結果；緊急介入が必要
グレード 5	有害事象に関連する死亡

30

40

表 1 : C T C A E 尺度の最新版 (発行元 : 米国国立がん研究所、発行日 : 2 0 1 0 年 6 月 1 4 日)

【 0 0 6 5 】

これら 5 つのグレードに、組織への影響がないことに相当するグレード 0 が加わる。

【 0 0 6 6 】

50

1984年に放射線治療腫瘍学グループ (Radiation Therapy Oncology Group、RTOG) により提案された、歴史的な分類である、いわゆるRTOG分類は、放射線治療後に発生するすべての種類の毒性を実質的に網羅している。

【0067】

しかし、RTOG分類はある種のがんには適用不可であり、一方、CTCAE分類はあらゆる種類のがんに使用される。

【0068】

図2Aおよび図2Bには、放射線照射後24時間の小核の個数の変化を、CTCAE (図2A) またはRTOG (図2B) の重症度グレードと関連させて示す。小核は、DAPI蛍光マーカを使用して標識し、その後、蛍光シグナル分析によって定量化した。図2中、放射線感受性グループ (I、II、III) は、ローマ数字で示す。

10

【0069】

放射線照射後24時間の小核の個数によって予測できるのは、グループIIIの放射線感受性のみである。

【0070】

図3A、B、およびCには、放射線照射後24時間のpH2AX病巣の個数の変化を、CTCAE (図3B) またはRTOG (図3C) の重症度グレードと関連させて示す。図3Aは、マーカーpH2AXを使用して得られた平均病巣数の経時的動態を示す。

【0071】

放射線照射後24時間にCTCAEまたはRTOG (組織反応の2つの異なる重症度尺度) の重症度グレードと関連させて得られたpH2AX病巣数によって予測できるのは、グループI、II、またはIIIの放射線感受性のみであり、重症度グレードの予測はできない。

20

【0072】

図4Aは、収集した患者のサンプル (皮膚線維芽細胞) のすべての細胞株について、2 Gyでの放射線照射後10分にマーカーpH2AXを使用して得られた平均病巣数を示す。点線は、DSBの正常な発生率、すなわち、細胞1個についての、1 Gyあたりの40のDSBを示す。

【0073】

図4Aは、グループIIの放射線感受性を有する患者由来のすべての細胞が、2 Gyの後に予想されたよりも少ないpH2AX病巣 (DNAの二本鎖切断 (DSB)) で特徴付けられることを示している。このことは、DSBが不十分にしか認識されていない事実により説明される。

30

【0074】

図4Bは、線量2 Gyの放射線照射の後の各時間 (0分、10分、および1時間) での、細胞質内および核内でのpATMの発現を示している。非照射細胞と、2 Gyの放射線照射後10分の細胞とについて、対応する免疫蛍光法データが示されている。

【0075】

図4Bに示すデータは、pATM病巣の個数に関連し、ATMの「細胞 - 核移行 (cyto-nuclear transit)」を示唆している。

40

【0076】

図4 (C) は、マーカーpATMを使用して上記の収集した細胞に基づき経時的に得られた平均病巣数の動態を示す。便宜上、10分、1時間、4時間、および24時間にて実施された測定に関連するエラーバーは省略した。図4Aおよび図4Cにおいて、各点は、個別の3回の繰返しの平均を表し、エラーバーは各カテゴリーについての標準偏差を表す。

【0077】

図5は、2 Gyの放射線照射後10分でのpATM病巣の個数の変化 (図5A) と、1時間でのpATM病巣の個数の変化 (図5B) とを、CTCAE重症度グレードと関連させて示す。図5Cは、図5Aと5Bとにそれぞれ示した、2 Gyの放射線照射後10分お

50

よび24時間に得られた2つの値の間のpATM病巣数の最大数を、CTCAE重症度グレードと関連させて示す。

【0078】

図5Bには、グレード0、すなわち、組織への影響がないことが示されている。

【0079】

図5Cは、患者100人について、放射線生物学的パラメータとCTCAE分類に準じた重症度グレードとの関連を示す。つまり、図5Cは、CTCAE重症度グレードと、2Gyの放射線照射後10分および1時間に得られた2つの値の間のpATM病巣数の最大数との間に存在する相関関係の臨床評価を表している。

【0080】

図5中、放射線感受性グループ(I、II、IIIaおよびIIIb)は、ローマ数字で示されている。図5A、5B、および5Cについては、各点は、各カテゴリにおける個別の3回の繰返しの平均を示す。

【0081】

(2Gy+10分)中のpATM病巣の最大数、または、(2Gy+1時間)中のpATM病巣の最大数により、反応の重症度グレードのみならず、すべてのグループをも予測することができる。

【0082】

図6Aには、マーカーpATMを使用して得られた病巣の最大数を、先ほど図3Bおよび図5Cに示したpH2AX病巣数と関連させて表している。

【0083】

図6Bは、図6Aのものと同じデータを示し、様々なヒト放射線感受性グループ(グループI、グループII、およびグループIII)を表す、明確に画定された信頼区間が図示されている。放射線感受性は、二本鎖切断の認識と修復により判定される。

【0084】

図6Cには、グループ種類ごとのグループ発生数を示す。任意のグループへの所属確率是对応する信頼区間の反転に比例すると考えられ、各グループの正規化頻度が図6C中の棒グラフで表されている。点線は、最良なデータ調整($r = 0.9$)を生成するガウスに相当する。

【発明を実施するための形態】

【0085】

発明の説明

A. 全般的な定義

「放射線起因の損傷」、「放射線起因の」、「放射線感受性」、「放射線抵抗性」、「放射線毒性」、および「放射線治療」という用語はすべて、電離放射線、特に、アルファ()粒子またはベータ()粒子からなる粒子放射線、あるいは、高エネルギー電磁放射線、特に、ガンマ()線放射またはX線放射について言う。

【0086】

「ATMの細胞-核移行」という用語は、ATMタンパク質の、特に放射線照射後の、細胞質から核への移動のことを言う。

B. 詳細な説明

以下、複数の変形例を有する実施形態について説明する。この実施形態は、ヒト患者に適する。

1. 検査準備

細胞のサンプリングおよびサンプリングされた細胞の操作の前に、(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、(典型的には、医師から)患者のHIVまたはC型肝炎への感染の可能性について通知を受ける。この通知の目的は、オペレータが、サンプリング中、操作中、および細胞培養の管理中に、適切な生物学的安全対策を取ることができるようにすることである。

【0087】

10

20

30

40

50

次に、オペレータは、患者から細胞サンプルを採取する。オペレータは、皮膚サンプルの生検によりサンプルを採取することが好ましい。このサンプリングは、好適には、「皮膚パンチ生検」として公知の方法により実施可能である。細胞サンプルは、20%ウシ胎児血清を加えたDMEM無菌培地 (sterile fetal bovine serum DMEM+20% medium) に置く。直ちに、サンプルを専門検査室に移す。これは、サンプルを38時間を越える時間、室温に置いてはならないからである。

【0088】

検査室へ移動するとすぐに、細胞サンプル (典型的には生検材料) を、ウイルス性または化学的転換剤を使用せずに、増幅可能な細胞株として樹立させる。この操作は、Elkin M. 他による刊行物 "The radiobiology of cultured mammalian cells" (Gordon and Breach (1967年)) で強調されたような、培養検査室では公知の補助的手技に従って行う。細胞の個数が十分になったら (1~3週間)、本発明の方法を使用して、最初の試験を行う。細胞を、ペトリ皿内のスライドガラスに接種する。上記スライドガラスのうちの一部には、医療用照射器内で、公認線量測定法に従い、吸収線量D (例えば、2 Gy) で照射を行う。他のスライドガラスには照射を行わず、自然状態を表すものとする (吸収線量は0 Gy)。

10

【0089】

放射線照射は、例えば、 3 Gy min^{-1} の吸収線量率で、6 MVの光子を送出する医療用加速装置を使用して実施可能である。照射後は、後述する修復時間を経るために、細胞は培養インキュベーター内で37°Cに維持される。

20

【0090】

照射済みの細胞について、放射線起因の状態に対応する特徴を、複数の修復時間 (照射後修復時間) の後に取得する。好ましくは、少なくとも2つの時点、さらに好ましくは少なくとも3つの時点、具体的には、 t_1 、 t_2 、 t_3 および t_4 が獲得される。上記の特徴は、マーカー pH 2 AX に対応する病巣により表される。

【0091】

次いで、スライドガラス上の細胞を固定し、溶解し、ハイブリダイズする。これには、公知の手順 (引用のBodgi 他 の刊行物を参照) が使用できる。具体的に、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、20 mMのpH 7.4のHEPES緩衝液 (4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンサルホン酸)、50 mMのNaCl、3 mMのMgCl₂、300 mMのスクロース、0.5% Triton X-100 (化学式 $t\text{-Oct-C}_6\text{H}_4\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH}$ (式中 $x = 9 \sim 10$) で表される非イオン界面活性剤、CAS No. 9002-93-1、Sigma Aldrich社製) で3分間透過処理した。その後、カバーライドを、免疫学的染色の前に、リン酸緩衝生理食塩水 (PBSとして知られる) 中で洗浄した。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で知られる; Sigma Aldrich社製) を添加したPBS中で、37°C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。抗pH 2 AX一次抗体は1:800の濃度で使用し、他の一次抗体は1:100の濃度で使用した。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°Cで20分間行った。核を標識するために、スライドガラスを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を使用した染色も、間接的に、フェーズG₁にある細胞 (DAPI染色が均一な細胞) の個数、フェーズSにある細胞 (多数のpH 2 AX病巣を有する細胞) の個数、フェーズG₂にある細胞 (DAPI染色が不均一な細胞) の個数、および中期 (染色体が見える状態) の判定を可能にする。

30

40

【0092】

免疫蛍光顕微鏡 (例えばオリンパスモデル) を用いて、これらのスライド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、G₀/G₁にある少なくとも5

50

0個の細胞の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もよく、または、自動顕微鏡で行ってもよい。ソフトウェアまたは自動顕微鏡方法は、手動作業で較正されることが好ましい。

【0093】

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回の個別の一連の試験(照射)を行い、規定の時間につき、各病巣数の平均を計算する。

2. 生物学および臨床的パラメータの判定

2.1 概説および使用するマーカー

本発明は、とりわけ、マーカー pH2AX について、非照射の細胞(自然状態)および照射済み細胞(放射線起因状態)に関して得られたデータの使用に基づく。本発明の方法は、修復の継続時間と関連した、上記マーカーによる標識の動態調査に基づく。つまり、サンプルは、放射線照射の停止からの規定の時間の経過後に標識され、サンプルの免疫蛍光が調査される。例えば、 t_0 、 t_1 (好ましくは10分)、 t_2 (好ましくは1時間)、 t_3 (好ましくは4時間)、および t_4 (好ましくは24時間)に位置する5つの点で表される全動態曲線を計測できる。ここで、 t_0 は照射前の状態(自然状態)である。好適には、他の2種のマーカー、具体的には pATM および MRE11、を使用して得られたデータを関連付ける。

【0094】

しかし、出願人は、ある特定の点(ある特定の修復時間に相当する)は、その他の点よりも重要であり、ある特定の点は予測的ではない、ということを見出した。任意の時間に判定されたパラメータを適切に選択することで、測定回数を減らすことができ、よって、本方法の予測性能を低減させることなく、診断にかかるコスト全体が削減される。この簡便化された方法が、本発明の予測的方法の基本を成す。

【0095】

サンプリングが $n = 3$ (ガウス標準誤差 SE ではない)であれば、それぞれのマーカーによる各点と各線量の平均は、平均値の標準誤差(SEM)を使用して計算される。

【0096】

(i) pH2AX は、ヒストン H2AX 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、主要な修復様式、すなわち、結合により認識される。実質的に、マーカー pH2AX は、もっぱら核病巣の形で核内にあり、病巣の個数と大きさのみが分析される。

【0097】

(ii) pATM は、ATM キナーゼタンパク質のセリン 1981 におけるリン酸化型を指す。本願出願人の知見によると、ATM は、放射線照射後、正常な条件下(放射線抵抗性状態)では、細胞質から核に移動する。pATM は、主に細胞質において濃縮され、DSB 部位を標識する。マーカー pATM は、局在により特徴付けられるが、これは核病巣を伴わない均一な細胞質内局在(細胞質病巣はない)か、核病巣のみの形でもっぱら核内にある局在(均一な核内局在はない)か、あるいは、細胞質病巣および核病巣であり得る。

【0098】

(iii) MRE11 は、DNA を切断するエンドヌクレアーゼである。本願出願人の知見によれば、MRE11 は、修復プロセス完了時に修復が不十分な DSB を標識する。マーカー MRE11 は、病巣を伴わず細胞質内にあるか、または、病巣を伴わず細胞質内および核内にあるか、または、病巣を伴って細胞質内および核内にある。

【0099】

DAPI (当業者には公知の DNA マーカー)による対比染色により、細胞質内局在化または核局在化の位置特定をするための、核の位置特定が可能になる(この分布は、電離放射線の影響下で、MRE11 および pATM について変更される)。この目的は、病巣についてのデータに対する相補的な細胞マーカーである、小核、アポトーシス体、およ

10

20

30

40

50

び核の大きさを定量化することである。

2.2 生物学的パラメータ

次の事項が、以下のように定義および判定される。

・ $N_{pH2AX}(t)$ 、 $N_{pATM}(t)$ 、 $N_{MRE11}(t)$ ：マーカー $pH2AX$ 、 $pATM$ 、および $MRE11$ を使用して、観察時間 t_0 （非照射）または放射線照射（吸収線量：2 Gy）後の観察時間 t_1 、 t_2 、 t_3 、 t_4 において、得られる核病巣の平均個数。但し、パラメータ $N_{pH2AX}(t)$ の判定は本発明の方法において必須であるのに対し、他のパラメータ $N_{pATM}(t)$ および $N_{MRE11}(t)$ の判定は任意であるが、好適である。

・ 自然状態（ $t = t_0$ 、すなわち、放射線照射なし）、または、吸収線量 2 Gy での放射線照射後の $t = t_4$ のときに、細胞 100 個につき観察される小核の個数（％）。

2.3 予測的評価

測定された生物学的データに基づき、臨床的パラメータまたは放射線治療パラメータを予測することを目的としている。これには、スコアの数学的値またはスコアに関連付ける数式に直接的に基づき、定量的分析を含む。この分析は、潜在的な致命的反応を避けるために、超過すべきではない合計線量（TDNTBE と呼ばれる基準）に関する。この基準は、放射線治療を受ける予定または放射線治療中の患者に適用できる。

【0100】

この超過すべきではない合計線量（TDNTBE）は、グレイ（Gy）で表され、放射線治療医にとって重要なパラメータである。これによって、任意の患者が潜在的な致命的反応を起こさずに吸収できる最大線量を予測できる。このパラメータによって、放射線感受性が特に高い患者に対する放射線治療を避けることもできる。

【0101】

本発明によれば、TDNTBE を、

$N_{pH2AX}(t_0) \leq 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / N_{pH2AX}(t_4)$] により、または、

$N_{pH2AX}(t_0) > 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [N_{pH2AX}(t_4) + N_{pH2AX}(t_0)]$ により判定可能である。

【0102】

本発明の方法の変形例では、上記細胞サンプルについて、時間 t における細胞 100 個についての核病巣の平均個数（％で表す）が観察され（この平均個数を $N_{MN}(t)$ と称する）、時間 t は、少なくとも t_0 （非照射）および吸収線量 D での照射後の t_4 であり、パラメータ $N_{MN}(t_4)$ が、上記 TDNTBE を判定するために使用される。しかし、実験による小核測定の統計的不確実性は、免疫蛍光検査で観察される核病巣の個数の統計的不確実性よりも高いため、病巣測定の予測的数値は、小核の予測的数値よりも好ましいといえるであろう。

【0103】

したがって、TDNTBE を、

$N_{pH2AX}(t_0) \leq 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [0.4 \times N_{MN}(t_4)]$]、または

$N_{pH2AX}(t_0) > 3$ であれば、数式： $TDNTBE = 60 / [2 + (0.4 \times N_{MN}(t_4))]$] により判定する。

【0104】

この定量的分析に基づき、より質的な診断が行われうる。この診断は、上記定量的分析に影響されるが、医師の注意を喚起するあらゆる臨床要素を考慮するであろう。

【0105】

TDNTBE と、 $pH2AX$ 病巣数と、2 Gy での放射線照射後 24 時間に得られた小核の個数との相関を、自然状態の $pH2AX$ 病巣数と関連付けて検証した。この検証は、1970 年代に、1、2 回の放射線治療セッションで照射を受け、ATM 遺伝子の変異が起こった、高い放射線感受性を有する患者について収集された一群の遡及的データにより

10

20

30

40

50

行った。照射後の死亡ケース（CTCAE分類に沿った重症度グレード5）については、1970年代から今日に至るまで文献に記載があり、系統的には、毛細血管拡張性失調症のケースか、リガーゼ4の突然変異が生じた患者のケースに相当する（A. Joubert他、“DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?”, published in the International Journal of Radiation Biology, 2008年、vol. 84(2), p107-125を参照）。これらの遡及的データに基づき、且つ、これらの放射線治療セッション中の合計蓄積線量を考慮して、対応する未修復二本鎖切断（DSB）の数を対比できた。実際には、未修復二本鎖切断の数は、多数の失調株において、および、LIG4突然変異（180BR細胞株）ケース1つについて計測した。これらの細胞株は、系統的に、1回の照射量後の致死限界値を超える未修復切断の比率を示した。表2に示した、AT患者および180BR患者からの細胞株との値には、そこを超えると未修復切断の数が患者にとって致命的となる閾値を判定するための証拠が含まれている。これらの特殊なケースに相当するCTCAE重症度グレードは5（=死亡）である。従って、TDNTBEは、この未修復DSBの数に到達可能な、合計蓄積線量であると定義できる。

10

【0106】

本発明の方法の別の変形例では、細胞サンプルについて、まず放射線感受性グループが判定される。

【0107】

放射線感受性グループ（GROUP）の定義は、本発明によるスコアおよび患者の臨床像から、医師が既知の遺伝的症候群との類似性を判定する際の手助けになる。これらのグループは、上記で引用したJoubert他による刊行物に定義された。

20

【0108】

・本発明によれば、次のように考えられる：

$$N_{pH2AX}(t4) < 2、且つ$$

$$N_{pATM}(t1) > N_{pATM}(t2)、且つ$$

$$N_{pATM}(t1) > 30、且つ$$

$$A < 10、且つ$$

$$B < 5、且つ$$

$$C < 2であり、$$

但し

$$C = N_{pH2AX}(t0) + N_{MN}(t0)；$$

$$B = \text{大核}(150\mu m^2 \text{ よりも大きい核}) \text{ の } t0 \text{ におけるパーセンテージ；}$$

$A = N_{MRE11}(t0) + t0$ における細胞1個あたりのpH2AX小病巣の個数；
であれば、放射線感受性グループ（GROUP基準）は、「グループI」と見なされ、当該の細胞は、放射線抵抗性を有する。

30

【0109】

（ $N_{pH2AX}(t4) > 8$ 、または、 $N_{MN}(t4) > 24$ ）であれば、放射線感受性グループ（GROUP基準）は、「グループIII」と見なされ、当該の細胞の放射線感受性は高い。

40

【0110】

その他すべての条件については、GROUP基準が「グループII」と見なされ、当該の細胞は、中等度の放射線感受性を示す。

【0111】

患者の放射線感受性グループを判定したのち、上記の変形例の一方または他方に従って、TDNTBEが判定される。

【0112】

実際には、これらの数式は、タイプIIの放射線感受性グループ（中程度の放射線感受性）に属する患者、標準的な治療を受けることができる、放射線抵抗性を有する患者（グループI）、および、いかなる条件においても照射を受けない、放射線感受性が高い患者の

50

T D N T B E を判定するのに特に適している。

【 0 1 1 3 】

以下、本発明を実施例に基づき説明するが、これらの実施例は本願をなんら限定するものではない。これらの実施例は、患者の細胞株の分析に関連し、超過すべきではない合計線量の判定を可能にするものである。

実施例

1. 検査準備

当業者に公知の「皮膚パンチ生検」法を使用した生検により、皮膚細胞サンプルを患者から採取した。この細胞サンプルを、20%ウシ胎児血清を加えたDMEEM無菌培地に置いた。その後、細胞サンプルが38時間を越えて室温に置かれることを避けるため、サンプルを直ちに専門検査室に移動させた。

10

【 0 1 1 4 】

検査室へ移動するとすぐに、培養研究機関と当業者とには公知の方法で、生検で得られた細胞サンプルを増幅可能な細胞株として樹立させた。特に、トリプシン分散によって、細胞は、新しい培地内で再度希釈され、所望の個数の細胞が得られるまでこれを繰り返す。十分な個数の細胞を得たのち(概して1~3週間後)、本発明の方法を使用して最初の試験を行った。細胞を、ペトリ皿内のスライドガラスに接種した。上記スライドガラスのうちの一部には、医療用照射器内で、公認線量測定法に従い、2 Gyの吸収線量Dで照射を行った。他のスライドガラスには照射を行わず、自然状態を表すものとした(吸収線量は0 Gy)。

20

【 0 1 1 5 】

その後、スライドガラス上の細胞を、固定し、溶解し、ハイブリダイズした。これら細胞を、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、20 mMのpH 7.4のHEPES緩衝液(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸)、50 mMのNaCl、3 mMのMgCl₂、300 mMのスクロース、0.5% Triton X-100(化学式t-Oct-C₆H₄-(OCH₂CH₂)xOH(式中x=9~10)で表される非イオン界面活性剤、CAS No. 9002-93-1、Sigma Aldrich社製)で3分間透過処理した。その後、カバースライドを、免疫学的染色の前に、リン酸緩衝生理食塩水(PBSとして知られる)中で洗浄した。インキュベーションは、2%ウシ血清アルブミン(BSAまたはフラクシオンVで知られる; Sigma Aldrich社製)を添加したPBS中で、37°Cで40分間行い、その後、PBSでの洗浄を行った。抗pH2AX一次抗体は1:800の濃度で使用し、他の一次抗体は1:1000の濃度で使用した。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°Cで20分間行った。

30

【 0 1 1 6 】

次に、核を標識するために、スライドガラスを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を使用した染色によっても、間接的に、休止期G₀/G₁にある細胞(DAPI染色が均一な細胞)の個数、合成期Sにある細胞(多数のpH2AX病巣を有する細胞)の個数、休止期G₂にある細胞(DAPI染色が不均一な細胞)の個数、および有糸分裂期M(染色体が見える状態)の判定が可能である。DAPIでの対比染色により、特に、細胞質内局在化または核局在化の位置特定をするための、核の位置特定ができ、したがって、存在する小核の定量化ができた。

40

【 0 1 1 7 】

免疫蛍光顕微鏡(例えばオリンパスモデル)を用いて、スライドガラスから結果を得た。読取りは、異なるマーカーpH2AX、pATM、およびMRE11を使用して、各点においてG₀/G₁にある少なくとも50個の細胞で得られた病巣をカウントすることにより直接的に行うとともに、専用の画像解析ソフトウェア(imageJ)を使用して行った。

50

2. 自然状態および吸収線量 2 Gy の照射後修復の 10 分後 (t 1)、1 時間後 (t 2)、4 時間後 (t 3)、および 24 時間後 (t 4) における pH 2 A X 病巣、M R E 1 1 病巣、および p A T M 病巣の個数、自然状態および吸収線量 2 Gy の照射後の修復時間 24 時間で細胞 100 個について観察された小核の個数 $N_{M N} (t)$ (% で表す)、自然状態での細胞 1 個あたりの p H 2 A X 小病巣の個数、ならびに、t 0 における大核 (150 μm^2 よりも大きい核) のパーセンテージの判定

非照射細胞 (自然状態、すなわち t 0) については、これら細胞の免疫蛍光分析により、自然状態の p H 2 A X の平均個数、自然状態の細胞 1 個あたりの p H 2 A X 小病巣の個数、t 0 における大核 (150 μm^2 よりも大きい核) のパーセンテージ、および自然に観察された小核の個数を得た。

【 0 1 1 8 】

照射済みの細胞については、放射線照射は、3 Gy min⁻¹ の吸収線量率で、6 M V の光子を送出する医療用加速装置を使用して実施した。吸収線量 2 Gy での照射の後、細胞を培養インキュベーター内で 37 °C で維持した。照射済み細胞 (放射線起因状態) については、サンプルを規定の期間後、具体的には、放射線照射の停止から 10 分後 (t 1)、1 時間後 (t 2)、4 時間後 (t 3)、24 時間後 (t 4) に標識した。マーカー p H 2 A X、M R E 1 1、および p A T M を使用して、上記の各照射後修復時間 (10 分後 (t 1)、1 時間後 (t 2)、4 時間後 (t 3)、および 24 時間後 (t 4)) において獲得した核病巣の、平均個数を得た。上記サンプルの免疫蛍光分析によって、吸収線量 2 Gy での照射後 24 時間後に観察された、細胞 100 個あたりの小核の個数 $N_{M N} (t)$ (% で表す) も判定した。

【 0 1 1 9 】

診断の根拠として使用するのに十分な統計的信頼度を備える結果を得るために、一連の照射を個別に 3 回実施した。自然状態 (t 0)、照射後修復の 10 分後 (t 1)、1 時間後 (t 2)、4 時間後 (t 3)、および 24 時間後 (t 4) における各病巣数の平均と平均標準誤差 (S E M) とを計算した。各種の患者皮膚細胞サンプルについての計算結果を、次の表に示す (表 2 参照)。

【 0 1 2 0 】

表 2 : ある患者の放射線感受性および T D N T B E の判定。判定は、患者の種々の皮膚細胞サンプルについて、自然状態 (t 0) および / または、2 Gy で照射後の 10 分後 (t 1)、1 時間後 (t 2)、4 時間後 (t 3)、および 24 時間後 (t 4) における p H 2 A X 病巣、p A T M 病巣、および M R E 1 1 病巣の個数、自然状態および吸収線量 2 Gy での照射後の修復期間 24 時間後 (t 4) に細胞 100 個について観察された小核の個数 $N_{M N} (t)$ (% で表す)、自然状態での細胞 1 個あたりの p H 2 A X 小病巣の個数、および、t 0 における大核 (150 μm^2 よりも大きい核) のパーセンテージと関連させて行った。(* この患者は放射線抵抗性を有し、したがって標準的な放射線治療プロトコルを受けることができる。すなわち、前立腺がん治療のための 70 Gy、乳がん治療のための 40 Gy の照射を受けることができる。)

【 0 1 2 1 】

10

20

30

【表 2】

細胞株	自然状態 (t0) での pH2AX 病巣数 (t0)	修復 24 時間後 (t4) の細胞 1 個あたりの pH2AX 病巣数 (%)	修復 24 時間後 (t4) の放射線起因小核の平均個数 (%)	大核のハセフジ (%)	t0 における pH2AX 小病巣数	N _{MRE11} (t0)	小核の平均個数 (t0)	修復 10 分後 (t2) の N _{DAM}	修復 1 時間 (t2) 後の N _{DAM}	本発明に従って判定された、サブドットの放射線感受性	重症度	皮膚等価物内で超過すべきでない合計線量 (Gy)	
												pH2AX 病巣を考慮した第 1 の変形例	小核を考慮した第 2 の変形例
HF19	0±0	0.1±0.0	1±1	0	0	0±0	0±0	40±2	20±1	ケル-7° I	1	600*	75
19HM	0.65±0.07	2.07±0.16	4.67±1.15	0	0	0±0	4.67±1.15	26±4	16.7±8.8	ケル-7° II	2	27-31	26-43
29CLB	1.45±0.23	1.9±0.34	10.67±1.15	0	43.33	0.3±0.3	4.33±0.58	20±6	23.3±3.3	ケル-7° III	3	27-38	13-16
01DAX	1.38±0.24	4.66±0.79	10.17±6.37	0	0	0±0	10.17±6.37	16.7±6.7	23.3±8.8	ケル-7° III	3	11-16	9-39
13CLB	0.69±0.1	1.25±0.21	8.33±3.11	0	0	0±0	3±1	13.3±3.3	15±3	ケル-7° III	4	41-58	13-29
35CLB	1.09±0.23	2.01±0.15	9.67±2	33	0	0±0	2±0	30±6	16.7±3.3	ケル-7° III	2	28-32	13-20
01PAU	2.45±1.21	1.65±0.13	5.33±1.15	1.67	43.33	0±0	5.33±1.15	0±0	23.3±4.4	ケル-7° III	3	34-39	23-36
AT2EM	4.00±1.00	16.00±4.00	25.00±3.00	5	100	0±0	25.0±3.0	0±0	1±0	ケル-7° III	5	2-4	5-6
AT5BI	3.00±1.00	17.00±6.00	30.00±3.00	5	100	0±0	30±3	0±0	0±0	ケル-7° III	5	2-5	4-5
AT4BI	2.00±1.00	22.00±4.00	39.00±3.00	5	100	0±0	4±1	0±0	3±1	ケル-7° III	5	2-3	4
AT1BR	2.00±1.00	12.00±4.00	28.00±3.00	5	100	0±0	4.2±1.0	0±0	1±0	ケル-7° III	5	4-8	5-6
180BR	3.00±1.00	35.00±3.00	37.00±3.00	5	100	0±0	4.5±2.0	36±2	20±1	ケル-7° III	-	1-2	3-4

10

20

30

40

【0122】

2.3 超過すべきではない合計線量の予測的評価

患者の種々の皮膚細胞サンプル (表 2 参照) に関し、放射線治療を受ける予定または放射線治療中の患者の、潜在的な致命的反応を避けるためには超過すべきではない合計線量

50

(TDNTE) が判定された。

【0123】

グレイ (Gy) で表される超過すべきではない合計線量 (TDNTE) は、

$N_{pH2AX}(t_0) \leq 3$ であれば、数式： $TDNTE = 60 / N_{pH2AX}(t_4)$ により、

または

$N_{pH2AX}(t_0) > 3$ であれば、数式： $TDNTE = 60 / [N_{pH2AX}(t_4) + N_{pH2AX}(t_0)]$ により判定した。

【0124】

本発明の別の変形によれば、グレイ (Gy) で表される超過すべきではない合計線量 (TDNTE) を、時間 t において観察される細胞 100 個あたりの小核の個数 (% で表される) を考慮して、

$N_{pH2AX}(t_0) \leq 3$ であれば、 $TDNTE = 60 / [0.4 \times N_{MN}(t_4)]$

または、

$N_{pH2AX}(t_0) > 3$ であれば、 $TDNTE = 60 / [2 + (0.4 \times N_{MN}(t_4))]$ によっても判定した。

【0125】

時間 t_0 および t_4 は、それぞれ、自然状態すなわち非照射と、吸収線量 D での照射後の時間 t_4 に対応する。

【0126】

グレイ (Gy) で表される超過すべきではない合計線量 (TDNTE) の定量的値を表 2 に示す。

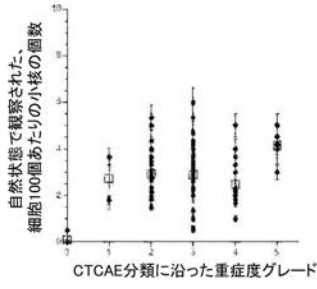
【0127】

重症度グレード 2 ~ 4 は、組織反応 (例えば、皮膚炎、直腸炎、など) に対応する。重症度グレード 1 は、耐えられる程度の副作用であり、医師によっては、グレード 0 (影響なし) と混同されることも多い。

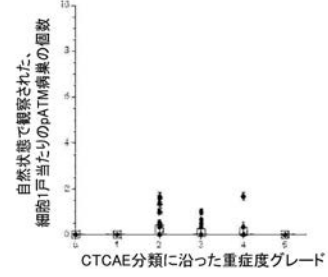
10

20

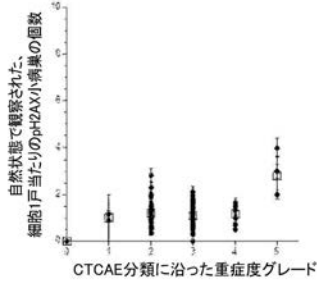
【 図 1 A 】



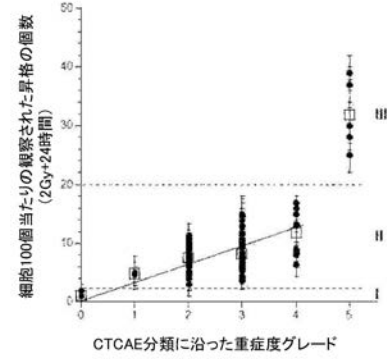
【 図 1 C 】



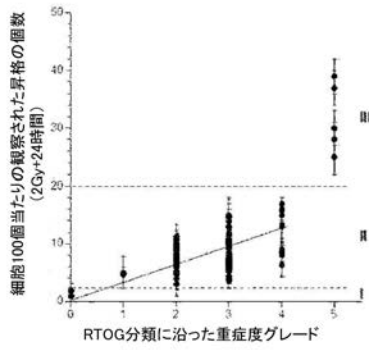
【 図 1 B 】



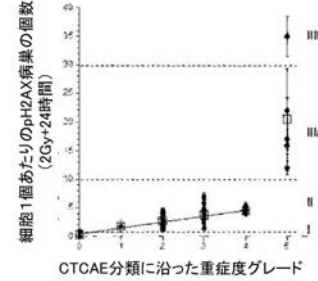
【 図 2 A 】



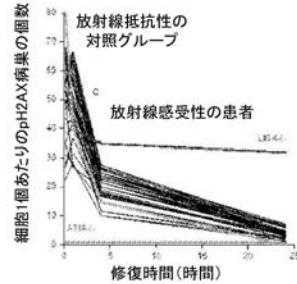
【 図 2 B 】



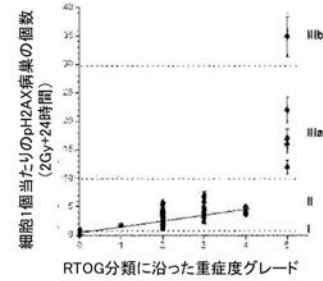
【 図 3 B 】



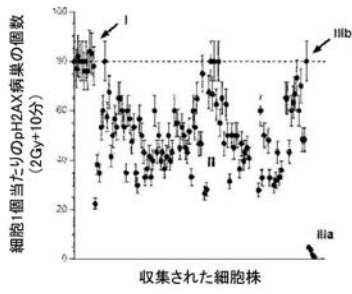
【 図 3 A 】



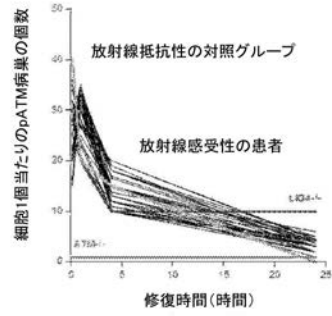
【 図 3 C 】



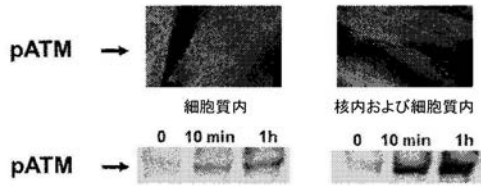
【 図 4 A 】



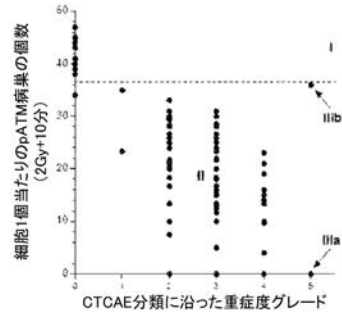
【 図 4 C 】



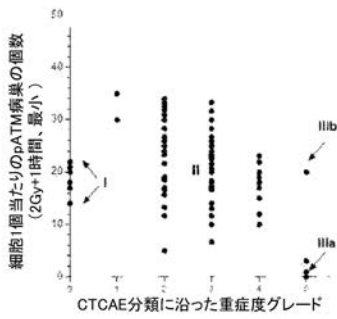
【 図 4 B 】



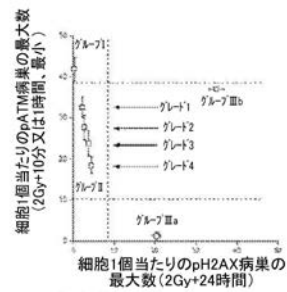
【 図 5 A 】



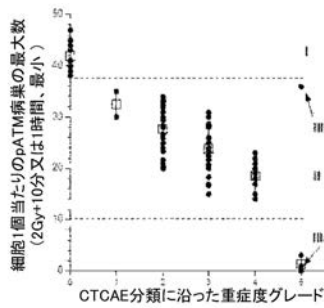
【 図 5 B 】



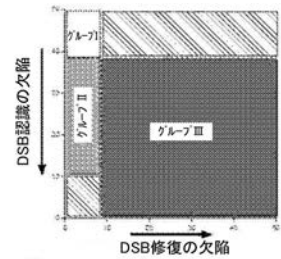
【 図 6 A 】



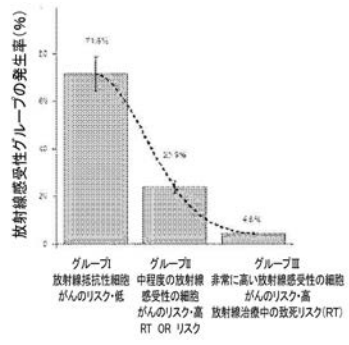
【 図 5 C 】



【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FR2015/050370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. G01N33/573	G01N33/68	A61N5/10 A61B5/00 G01N21/25
G01N33/50		
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N A61N A61B		
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, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
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 page 3, column 1, paragraph 2 page 3, column 2, paragraph 2 page 4, column 1 - column 2 page 5, column 1 page 6, column 1 - column 2 figure 3 abstract the whole document -/--	1-4,7-9, 12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 30 March 2015		Date of mailing of the international search report 09/04/2015
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 Helliot, Bertrand

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2015/050370

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>-----</p> <p>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, 13 December 2011 (2011-12-13), pages 96-106, XP009179289, ISSN: 1477-6545, DOI: 10.1504/IJLR.2011.044191 page 4, paragraph 2 page 5, paragraph 3-4 page 6, paragraph 1-2 page 8, paragraph 2-3 page 5, paragraph 2-3 figures 1-3 abstract the whole document</p>	1,3-11, 13,14
A	<p>-----</p> <p>Michel Bourguignon: "Actualités en radioprotection Seuil probabiliste chez l'adulte", 10 February 2012 (2012-02-10), XP055131240, Retrieved from the Internet: URL:http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alpesmed/evenements/rns/Rencontres_nuclaires_annees_precedentes/rencontresnuclaires_sante2012/pdf/vendredi/m_bourguignon_vendredi_10_fevrier_RNS_2012.pdf [retrieved on 2014-07-23] the whole document</p>	1-14
A	<p>-----</p> <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:http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alpesmed/evenements/rns/Rencontres_nuclaires_annees_precedentes/rencontresnuclaires2008/pdf/25_01_08/04_Foray.pdf [retrieved on 2014-07-23] the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2015/050370

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<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.crcl.fr/Portals/0/Equipes/Equipe-Ansieux/Puisieux/poster-radiobiology-group-(2).pdf [retrieved on 2014-07-23] the whole document</p>	1-14
A	<p>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] page 1490, column 2, paragraph 1 page 1488, column 1, paragraph 3 abstract the whole document</p>	1-14
A	<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, 23 February 2007 (2007-02-23), pages 129-142, XP022089743, ISSN: 1278-3218, DOI: 10.1016/J.CANRAD.2007.01.003 page 130, column 1, paragraph 1</p>	1-14
A	<p>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 July 2008 (2008-07-01), pages 533-548, XP055130893, ISSN: 0955-3002, DOI: 10.1080/09553000802195331 abstract the whole document</p>	1-14

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/050370

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE	
INV. G01N33/573 G01N33/50	G01N33/68 A61N5/10 A61B5/00 G01N21/25
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 A61N A61B	
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, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, 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 page 3, colonne 1, alinéa 2 page 3, colonne 2, alinéa 2 page 4, colonne 1 - colonne 2 page 5, colonne 1 page 6, colonne 1 - colonne 2 figure 3 abrégé le document en entier -/-
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents
<input type="checkbox"/>	Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:	
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*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
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*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
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)	*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
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
30 mars 2015	09/04/2015
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Helliot, Bertrand

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/050370

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>-----</p> <p>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, 13 décembre 2011 (2011-12-13), pages 96-106, XP009179289, ISSN: 1477-6545, DOI: 10.1504/IJLR.2011.044191 page 4, alinéa 2 page 5, alinéa 3-4 page 6, alinéa 1-2 page 8, alinéa 2-3 page 5, alinéa 2-3 figures 1-3 abrégé le document en entier</p> <p>-----</p>	1,3-11, 13,14
A	<p>-----</p> <p>Michel Bourguignon: "Actualités en radioprotection Seuil probabiliste chez l'adulte", 10 février 2012 (2012-02-10), XP055131240, Extrait de l'Internet: URL:http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alpesmed/evenements/rns/Rencontres_nuclaires_annees_precedentes/rencontresnuclaires_sante2012/pdf/vendredi/m_bourguignon_vendredi_10_fevrier_RNS_2012.pdf [extrait le 2014-07-23] le document en entier</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>-----</p> <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:http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alpesmed/evenements/rns/Rencontres_nuclaires_annees_precedentes/rencontresnuclaires2008/pdf/25_01_08/04_Foray.pdf [extrait le 2014-07-23] le document en entier</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/050370

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>A Granzotto ET AL: "Towards a first classification of human radiosensitivity: radiotherapy, radiodiagnosis and history of radiobiology HIGH DOSES STUDIES - THE HUMAN RADIOSENSITIVITY",</p> <p>30 mars 2012 (2012-03-30), XP055131016, Extrait de l'Internet: URL:http://www.crcl.fr/Portals/0/Equipes/Equipe-Ansieu-Puisieux/poster-radiobiology-group-(2).pdf [extrait le 2014-07-23] le document en entier</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>JOUBERT A ET AL: "Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: Consequences for computed tomography therapy",</p> <p>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] page 1490, colonne 2, alinéa 1 page 1488, colonne 1, alinéa 3 abrégé le document en entier</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>JOUBERT ET AL: "Radiosensibilité intrinsèque et cassures double-brin de l'ADN dans les cellules humaines",</p> <p>CANCER RADIOTHERAPIE, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 11, no. 3, 23 février 2007 (2007-02-23), pages 129-142, XP022089743, ISSN: 1278-3218, DOI: 10.1016/J.CANRAD.2007.01.003 page 130, colonne 1, alinéa 1</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>CHARLES THOMAS ET AL: "Low-dose hyper-radiosensitivity of progressive and regressive cells isolated from a rat colon tumour: Impact of DNA repair",</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY, vol. 84, no. 7, 1 juillet 2008 (2008-07-01), pages 533-548, XP055130893, ISSN: 0955-3002, DOI: 10.1080/09553000802195331 abrégé le document en entier</p> <p>-----</p>	1-14

1

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 1402282

(32)優先日 平成26年10月10日(2014.10.10)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(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 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, 2 8

(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 - 7 5 0 1 3 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1

(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 グランゾット アドリーヌ

フランス国 リヨン, リュ マリウス ベルリエ, 8 4

(72)発明者 デビック クレマン

フランス国 リヨン, クール ガンベッタ, 1 0 5

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 FA02 FA03

4B063 QA20 QQ02 QQ08 QR14 QR48 QR72 QR77 QS28 QS36 QS39

QX01

专利名称(译)	确定组织放射敏感性的预测方法		
公开(公告)号	JP2017508148A	公开(公告)日	2017-03-23
申请号	JP2016552289	申请日	2015-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	儿子托国家德比拉尔外壳格哈德科学费点击 儿子托莱昂基地猪油 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	Üniversite电克劳德·伯纳德·里昂1 Sontoru法国国家科研费点击 里昂ペラーson米卡 Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗		
发明人	フォレイ ニコラス グランゾット アドリーヌ デビック クレマン		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 C12Q1/34 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/5014 G01N33/5005 G01N33/6881 G01N2333/47 G01N2333/4703 G01N2333/912 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.Y C12Q1/02 C12Q1/34 G01N33/53.D G01N21/64.F		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/EA01 2G043/FA02 2G043/FA03 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QR14 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
优先权	2014051216 2014-02-17 FR 2014051215 2014-02-17 FR 2014002281 2014-10-10 FR 2014002282 2014-10-10 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种预测患者的细胞放射敏感性的方法，该方法对从患者的未辐照或微辐照部位采样的细胞产生的电离辐射进行电离，其中将采样的细胞放大，使用标记pH2AX，在0分钟的照射后的观察时间t4 (t0，非照射状态) 和吸收剂量D，将该扩增后的细胞构成“细胞样品” (ii)。判断在观测时间t获得的核焦点的平均数量为 (该平均数量为NpH2AX (t))， (iii) 灰色 (Gy)，不应超过 至少使用参数N pH2AX (t4) 确定剂量 (TDNTBE)，其中t4是一个固定值，表示DNA断裂速率达到其残留值所需的时间。

(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2017-508148 (P2017-508148A) (43) 公表日 平成29年3月23日 (2017.3.23)
(5) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考) 2G043 4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	
C12Q 1/34 (2006.01)	C12Q 1/34	
GO1N 21/64 (2006.01)	GO1N 33/53	D
	GO1N 21/64	F
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)
(21) 出願番号 特願2016-552289 (P2016-552289)	(71) 出願人 508019311	
(86) (22) 出願日 平成27年2月16日 (2015.2.16)	ユニヴェルシテ クロード ベルナル	
(85) 翻訳文提出日 平成28年10月11日 (2016.10.11)	リヨン 1	
(86) 国際出願番号 PCT/FR2015/050370	フランス国 エフ-69622 ヴィル	
(87) 国際公開番号 W02015/121597	ルバンヌ セザ、ブルヴァール デュ	
(87) 国際公開日 平成27年8月20日 (2015.8.20)	11 ノヴァンブル 1918、43	
(31) 優先権主張番号 1451216	(71) 出願人 508071375	
(32) 優先日 平成26年2月17日 (2014.2.17)	ソントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェ	
(33) 優先権主張国 フランス (FR)	ルシュ・サイエンティフィック	
(31) 優先権主張番号 1451215	フランス国 F-75794、パリ セザ	
(32) 優先日 平成26年2月17日 (2014.2.17)	ックス 16、リュ ミッシェル アンジ	
(33) 優先権主張国 フランス (FR)	ユ、3	
(31) 優先権主張番号 1402281		
(32) 優先日 平成26年10月10日 (2014.10.10)		
(33) 優先権主張国 フランス (FR)		
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 組織の放射線感受性を判定するための予測的方法		