

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-337152

(P2004-337152A)

(43) 公開日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	2 G O 4 5
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/78	C 2 G O 5 4
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48	M 4 B O 6 3
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/48	P
// GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/50	Z

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-68280 (P2004-68280)  
 (22) 出願日 平成16年3月11日 (2004. 3. 11)  
 (31) 優先権主張番号 03005335.9  
 (32) 優先日 平成15年3月12日 (2003. 3. 12)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCH  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラッセ124

(74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志

(74) 代理人 100108774  
 弁理士 橋本 一憲

(74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞増殖阻害活性および毒性の同時決定方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ある物質の細胞増殖阻害活性および細胞毒性(細胞死の誘導)を同時に測定するための方法を提供する。

【解決手段】死細胞または生細胞のいずれかを特異的に染色する第一の蛍光色素で処理し、全ての細胞を染色する第二の蛍光色素で処理した後、ラテックス粒子を加え、選択的に第三の蛍光色素によってそのラテックス粒子を染色する。ラテックス粒子量に対する全細胞量の比率を決定した後、フローサイトメトリー解析により第一の波長において第一蛍光色素により放出される蛍光による、死細胞または生細胞の数、第一の角度における散乱光による、または第二の波長において第二蛍光色素により放出される蛍光による、容量当たりの全細胞数、第二の角度における散乱光による、または第三の波長において第三蛍光色素により放出される蛍光による、容量当たりのラテックス粒子の数を決定する。これらの結果を用いて、この物質の細胞増殖活性および毒性を決定する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下を特徴とする、増殖している哺乳動物細胞試料を試験系として使用して、ある物質の細胞増殖阻害活性および細胞毒性（細胞死の誘導）を同時に決定するための方法：

a) 所定の容量における、細胞懸濁液または付着細胞としての該細胞試料を、少なくとも2つの異なる所定の濃度の該物質で処理する段階；

b) 該細胞試料を、死細胞または生細胞のいずれかを特異的に染色する第一の蛍光色素で処理し、選択的に全ての細胞を染色する第二の蛍光色素で処理する段階；

c) 該細胞試料に、約1 $\mu$ mから約20 $\mu$ mに渡るサイズの所定の量のラテックス粒子を該容量になるまで加え、選択的に第三の蛍光色素によって該ラテックス粒子を染色する段階；

d) 該試料における、ラテックス粒子の量に対する全細胞量の比率を決定する段階；

e) 段階d)の結果を用いて、かつ該試料におけるフローサイトメトリー解析によって、以下を決定する段階；

第一の波長において該第一蛍光色素により放出される蛍光による、死細胞または生細胞の数；

第一の角度における散乱光による、または第二の波長において該第二蛍光色素により放出される蛍光による、容量当たりの全細胞数；

第二の角度における散乱光による、または第三の波長において該第三蛍光色素により放出される蛍光による、容量当たりのラテックス粒子の数；ならびに

f) 段階d)およびe)の結果を用いて、該物質の細胞増殖活性および毒性を決定する段階

10

20

## 【請求項2】

蛍光色素によって死細胞が特異的に染色され、示差的な側方散乱光および前方散乱光によって、ラテックス粒子の数および細胞数が測定されることを特徴とする、請求項1記載の方法。

## 【請求項3】

細胞がヒトのCD34<sup>+</sup>前駆細胞であることを特徴とする、請求項1または2記載の方法。

## 【請求項4】

細胞を複数の装置において同時に培養し、試料を自動ピペット操作によってフローサイトメトリー解析装置に移すことを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項記載の方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ある物質の細胞増殖阻害活性および毒性を同時に決定するための方法であって、そのような物質の増殖阻害における活性についてのスクリーニング中に行うことができる方法を提供する。

## 【背景技術】

## 【0002】

強力な増殖阻害剤である物質の同定は、好ましくは腫瘍学の分野における、創薬の過程において非常に重要である。そのような候補物質の抗増殖効果を調べるための、様々なインビトロ細胞系アッセイ法が存在する。そのようなアッセイ法の例は、例えばMTT比色アッセイ法、[3H]チミジン取り込みアッセイ法、およびWSTアッセイ法である（非特許文献1、非特許文献2）。薬剤の開発に関しては、そのようなアッセイ法を、多数の潜在的な薬剤候補のハイスループットスクリーニングにおいて使用できることが必要である。

40

## 【0003】

造血細胞の増殖状態を決定するためには、調査する物質、およびATPの存在下において発光を生じ、増殖状態の基準として発光を検出することができる試薬に細胞集団を接触させることが公知である（特許文献1）。蛍光測定により細胞培養における細胞数を決定するためのアッセイ法は、特許文献2において説明されている。

## 【0004】

50

しかし、そのようなアッセイ法は時間がかかり、限られた結果のみを提供し、増殖の阻害と細胞死の誘導とを識別するものではない。

【0005】

したがって、ある物質の増殖に対する影響および細胞死の誘導に対する影響を、単純な方法で同時に決定することを可能にするアッセイ法が必要とされる。さらに、そのようなアッセイ法を自動的に行い得ることが必要である。

【0006】

【特許文献1】米国特許公開第2002/0146680号

【特許文献2】米国特許第5,972,639号

【非特許文献1】Johnston, P. 「Cellular Assays in HTS, Methods in Molecular Biology」、第110巻 Janzen W.P.(編)、Humana Press、NJ、107~116

【非特許文献2】Bellamy, W.T.、Drugs 44(1992)、690~708

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、ある物質の細胞増殖阻害活性および毒性を同時に決定するための方法であって、そのような物質の増殖阻害における活性についてのスクリーニング中に行うことができる方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、以下を特徴とする、増殖している哺乳動物細胞を試験系として使用する、ある物質の細胞増殖阻害活性および細胞毒性(細胞死の誘導)を同時に決定するための方法を提供する：

a) 所定の容量における、細胞懸濁液または付着細胞としての細胞試料を、少なくとも2つの異なる所定の濃度の物質で処理する段階；

b) この細胞試料を、死細胞または生細胞のいずれかを特異的に染色する第一の蛍光色素で、および選択的に全ての細胞を染色する第二の蛍光色素で処理する段階；

c) この細胞試料に、約1 $\mu$ mから約20 $\mu$ mの範囲に渡るサイズの、所定の量のラテックス粒子をその容量にまで加え、選択的にこのラテックス粒子を第三の蛍光色素で染色する段階；

d) この試料における、ラテックス粒子の量に対する全細胞量の比率を決定する段階；

e) 段階d)の結果を用いて、およびこの試料におけるフローサイトメトリー解析によって、以下を決定する段階：

第一の波長において第一蛍光色素により放出される蛍光による、死細胞または生細胞の数；

第一の角度における散乱光による、または第二の波長において第二蛍光色素により放出される蛍光による、容量当たりの全細胞数；

第二の角度における散乱光による、または第三の波長において第三蛍光色素により放出される蛍光による、容量当たりのラテックス粒子の数；ならびに

f) 段階d)およびe)の結果を用いて、この物質の細胞増殖活性および毒性を決定する段階。

【0009】

本発明の好ましい態様においては、死細胞は蛍光色素によって特異的に染色され、ラテックス粒子の数および細胞数は示差的な側方散乱光および前方散乱光によって測定される。

【0010】

本発明のさらなる好ましい態様においては、細胞はヒトのCD34<sup>+</sup>前駆細胞である。

【0011】

本発明の好ましい態様においては、本方法は少なくとも5つの異なる濃度の調査する物質において実施され、好ましくは、増殖および細胞死の誘導についてのIC<sub>50</sub>値の算出を可

20

30

40

50

能にする。好ましくは、濃度範囲は約1倍から10,000倍である。

【0012】

調査する物質で細胞を処理した後、細胞増殖を可能にするような標準的な条件下で細胞を培養する。本発明の好ましい態様においては、細胞は複数の装置において、好ましくはマルチウェルマイクロタイタープレートにおいて並行して培養される。さらに、調査する物質も、好ましくは自動ピペット操作法によって、これらの装置に異なる濃度で加えられる。

【0013】

本発明に係る方法においては、(1)以下を特徴とする、増殖している哺乳動物細胞試料を試験系として使用して、ある物質の細胞増殖阻害活性および細胞毒性(細胞死の誘導)

10

a) 所定の容量における、細胞懸濁液または付着細胞としての細胞試料を、少なくとも2つの異なる所定の濃度の物質で処理する段階；

b) 細胞試料を、死細胞または生細胞のいずれかを特異的に染色する第一の蛍光色素で処理し、選択的に全ての細胞を染色する第二の蛍光色素で処理する段階；

c) 細胞試料に、約1 $\mu$ mから約20 $\mu$ mに渡るサイズの所定の量のラテックス粒子をその容量になるまで加え、選択的に第三の蛍光色素によってラテックス粒子を染色する段階；

d) この試料における、ラテックス粒子の量に対する全細胞量の比率を決定する段階；

e) 段階d)の結果を用いて、かつこの試料におけるフローサイトメトリー解析によって、以下を決定する段階；

20

第一の波長において第一蛍光色素により放出される蛍光による、死細胞または生細胞の数；

第一の角度における散乱光による、または第二の波長において第二蛍光色素により放出される蛍光による、容量当たりの全細胞数；

第二の角度における散乱光による、または第三の波長において第三蛍光色素により放出される蛍光による、容量当たりのラテックス粒子の数；ならびに

f) 段階d)およびe)の結果を用いて、この物質の細胞増殖活性および毒性を決定する段階。

【0014】

また、本発明に係る方法においては、(2)蛍光色素によって死細胞が特異的に染色され、示差的な側方散乱光および前方散乱光によって、ラテックス粒子の数および細胞数が測定されることを特徴とする、上記(1)記載の方法であることを特徴とする。

30

【0015】

また、本発明に係る方法においては、(3)細胞がヒトのCD34<sup>+</sup>前駆細胞であることを特徴とする、上記(1)または(2)記載の方法であることを特徴とする。

【0016】

また、本発明に係る方法においては、(4)細胞を複数の装置において同時に培養し、試料を自動ピペット操作によってフローサイトメトリー解析装置に移すことを特徴とする、上記(1)から(3)のいずれか一つに記載の方法であることを特徴とする。

【発明の効果】

40

【0017】

本発明により、ある物質の細胞増殖阻害活性および毒性を同時に決定するための方法であって、そのような物質の増殖阻害における活性についてのスクリーニング中に行うことができる方法が提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

細胞の阻害剤であることが疑われる物質の存在下における、細胞培養中の細胞増殖の遅延は、細胞死および/または細胞増殖阻害によって引き起こされ得る。したがって、培養後の細胞の量を決定しただけでは、その物質の毒性および/または阻害活性を直接結論付けることはできない。そのような結論を得るには、生細胞および死細胞の量、ならびに全

50

細胞量に関するそれらの比率を知ることが必要である。本発明は、迅速にこれらのパラメータを同時に決定するための方法を提供する。さらに、本発明に従う方法は、自動的に行うことができ、物質の毒性および増殖阻害活性のハイスループット研究を可能にする。

**【0019】**

本発明に従い、規定の(所定の)ラテックス粒子のアリコートを各細胞培養装置に加える。フローサイトメトリー解析の間のラテックス粒子の計測に基づき、全ての計測が行われた液体の容量を評価することが可能である。したがって、本発明は、容量当たりの全細胞量(細胞増殖の基準である)、ならびに試験系の細胞に対して増殖阻害剤である、および/または毒性であることが疑われる物質の存在下における培養後の、容量当たりの生細胞の量を同時に決定するための方法を提供する。物質の異なる濃度について、全細胞の量を死細胞または生細胞の量と比較することによって、物質の細胞増殖阻害と毒性との関係についての情報が提供される。これは、図3から即時に推定されうる。死細胞の全細胞に対する割合が有意に増加する一方で、全細胞数が減少する場合、これはその物質が高い毒性を有することを示す。しかし、物質濃度が高くなるにつれ死細胞の全細胞に対する割合が有意に増加しない一方で、全細胞数が減少する場合は、その物質は低い毒性を示す。高い毒性を有する物質の例は、図3に示される。5-フルオロウラシルおよびドキソルビシンは、著しい増殖阻害と同時に毒性を示す物質である。5-フルオロウラシルに関しては、増殖阻害が50%より多く認められるような物質の濃度範囲については、全細胞に対する死細胞の割合は、物質濃度に伴い0%から25%の範囲にある。ドキソルビシンについては、死細胞の割合は40%およびさらにそれ以上にまで増加する一方、増殖阻害は約80%である。

10

20

**【0020】**

増殖している細胞、例えばCD34細胞の培養過程は、下記にて説明されるように実施される。生細胞または死細胞を染色し、解析する細胞培養培地の容量の基準として、ラテックス粒子をそれぞれ計測するために、FACS解析の前に、生細胞または死細胞を染色するための蛍光色素、および別個の数のラテックスビーズを各ウェルの装置(好ましくはマイクロタイタープレートまたは同様のもの)に加える。異なる装置において、調査する物質を加え細胞培養を行った後、マイクロタイタープレートを、FACSフローチェンバーを通して各ウェルからの細胞試料のアリコートを送る、自動ピペット機器上に置く。別個の数のラテックスビーズが解析され(それにより、測定される培地容量についての情報が与えられ)、測定が停止しれ、ピペット操作ロボットが次のウェルからアリコートを採取し、前と同様に解析が再度開始される。

30

**【0021】**

本明細書において使用される「調査する物質」または「物質」という用語は、増殖阻害活性または細胞毒性活性を有することが疑われる任意の物質を表す。この物質は、例えば抗体、ポリペプチド、短鎖ペプチド、オリゴヌクレオチド、または低分子量の化合物でありうる。化合物は、少なくとも2つの異なる濃度において、しかし好ましくは、より多くの濃度において、例えば5つのまたはそれ以上の異なる濃度において使用される。この理由は、そのような異なる濃度についての結果に基づき、濃度依存的な増殖阻害および細胞死の誘導を非常に容易に調べることができ、その物質が細胞死を相当に誘導するかどうか、および/または増殖を阻害するかどうかを決定できるためである。これらの値を比較するため、特に増殖および細胞死の誘導の濃度依存性を比較するため、例えば細胞死の相当な誘導を示さずに強力な増殖阻害を示す、潜在的な候補物質を同定することが可能である。さらに、本発明の方法を異なる濃度で行うことによって、増殖(「増殖活性」)および細胞死の誘導(「毒性」)の双方についての $IC_{50}$ 値を計算することができる。濃度および濃度の範囲は、調査する物質の望ましい効力およびその研究に用いられる細胞型にも依存する。通常、濃度範囲はマイクロモルの範囲にあり、約0.01  $\mu$ M/mlから100  $\mu$ M/mlの間である。

40

**【0022】**

本明細書において使用される「細胞」という用語は、増殖アッセイ法のための試験系として有用な、増殖している哺乳動物細胞を表す。そのような細胞は最先端技術において周

50

知であり、例えばヒトCD34<sup>+</sup>前駆細胞および幹細胞、リンパ球、正常な線維芽細胞/ケラチノサイト、正常な内皮細胞および上皮細胞、人工の形質転換哺乳動物細胞、白血病細胞および固形腫瘍細胞である。そのような細胞の増殖は、パクリタキセル、ドキシソルピシン、または5-フルオロウラシルのような、既知の阻害剤によって阻害されうる。

#### 【0023】

通常、細胞は並行する装置に播種し、懸濁液中にて増殖させる。一般的に、および例えば、CD34細胞の培養のために96ウェルマイクロタイタープレートを使用する場合、ウェル毎に100細胞~400細胞/200 $\mu$ lを播種し、標準的な条件下で(調査する物質を含まずに)、好ましくはそれらがウェル毎に約10,000細胞/200 $\mu$ lに達するまで増殖させる。細胞の培養のためには、従来培養培地、好ましくは成長因子を加えたものを使用する。

10

#### 【0024】

本明細書において使用される「ラテックス粒子」という用語は、細胞計数のための自動計器用較正液(calibrating fluid)において広く使用されるようなラテックス粒子を表す。そのようなラテックス粒子は、例えば米国特許第3,977,995号において説明されている。そのようなラテックス粒子は、通常ポリスチレンポリビニルトルエンまたはスチレンジビニルベンゼンコポリマーから作製される合成ラテックスからなる。粒子サイズは通常1 $\mu$ m~約20 $\mu$ mの範囲に渡り、粒子は細胞懸濁液に10,000粒子/200 $\mu$ lの量で加えられる。

#### 【0025】

本発明に従って決定するためのパラメータの測定は、異なる波長における蛍光および異なる角度における散乱光を測定し、そのようなシグナルを与える細胞の量と相関させることができる装置における、フローサイトメトリー解析によって行われる。1つの試料由来の細胞が、並行して、またはあるパラメータから即座に次のパラメータへと、装置の解析手段を通して流れている間に、パラメータが決定される(同時決定)。好ましくは、そのような決定は解析用FACS機器の使用によって行われる。散乱光は異なる角度で、好ましくは前方散乱光(FSC)(最大散乱光角度20°まで、好ましくはそれ未満)および側方散乱光(SSC)(角度約90°)として測定される。細胞およびラテックス粒子はそのサイズがあまり異なる可能性があるが、散乱光に関するそれらの挙動は、おそらく細胞の内部構造および形状、ならびにそれらの異なる不応指数(refractory index)に基づき、かなり異なる。この相違に基づき、細胞(生存/増殖している細胞、生存している分裂停止細胞、および死細胞)は、かなり異なる散乱光角度によって、ラテックス粒子から容易に識別されうる。SSCはラテックスビーズを示し、FSCは細胞を示す(図2aを参照のこと)。しかし、全ての細胞または全てのラテックス粒子を蛍光色素で染色し、異なる波長における蛍光を調べることによって、ラテックス粒子と細胞を識別することも可能である。測定するパラメータの使用は、単に使用する装置によって提供される可能性および利便性に依存する。装置によって3つまたは4つの異なる蛍光波長で同時に蛍光を測定することが可能な場合は、ラテックス粒子、全ての細胞、および分裂細胞または死細胞のいずれかを、蛍光色素で特異的に標識することができる。したがって、ラテックス粒子と死細胞、生細胞と増殖している細胞、および生細胞と分裂停止細胞を、直接識別するのに、散乱光パラメータは有用ではないという前提で、散乱光および蛍光の全ての組み合わせをパラメータの測定に使用することができる。

20

30

40

#### 【0026】

本明細書において使用される「死細胞または生細胞を特異的に染色する蛍光色素」という用語は、死細胞のみに入る色素(例えばヨウ化プロピジウム)、または生細胞においてのみ濃縮される色素(例えばフルオレセインジアセテート)を表す。全ての細胞の細胞計数が必要とされる場合、死細胞の染色および生細胞の染色に、蛍光色素が有用である(例えば、ヘキスト33342)。生細胞または死細胞を選択的に標識するのに有用な、多数の蛍光色素が記載されている(例えば、Molecular Probesのカatalog; <http://www.molecularprobes.com/>)。蛍光色素は、例えば最終濃度1 $\mu$ g/mlのように、適切な量を加えられる。

#### 【0027】

以下の実施例および図面は、本発明の理解に役立つために提供し、本発明の真の範囲

50

は添付の特許請求の範囲において示される。本発明の趣旨から逸脱せずに、示される手順において改変を行い得ることは理解される。

#### 【0028】

##### 実施例

典型的な実験設定においては、免疫磁気細胞選別によってヒト臍帯血のCD34<sup>+</sup>細胞を高純度にまで (>90%) 単離し、アリコートに分注して、DMSOを含む培地中で凍結する。細胞培養の設定のためには、凍結したCD34<sup>+</sup>細胞を解凍し、96ウェルプレートの1つのウェルの完全培地200  $\mu$ l中に、200個の細胞を播種する。細胞培養基本培地は、20%ヒトAB血清および抗生物質 (pen/strep) を補充したIMDM培地からなる。以下のサイトカインカクテルを添加することによって、CD34<sup>+</sup>細胞は活性化される：hu-SCF (100 ng/ml)、hu-IL6 (10 ng/ml)、hu-GM-CSF (100 U/ml)、hu-TPO (25 ng/ml)、およびhu-EPO (5 U/ml)。37  $^{\circ}$ C、高湿度、および7% CO<sub>2</sub>でインキュベーター中にて培養を行う。

#### 【0029】

2つの異なる実験設定を使用することができる：1) 休止細胞を優先的に攻撃するために、培地にサイトカインを補充する前に阻害剤化合物を添加し；かつ2) 活性化細胞を優先的に攻撃するために、サイトカインを用いたCD34活性化の4日後に阻害剤化合物を添加する。

#### 【0030】

図1において示されるように、活性化されたCD34生細胞は、培養4日後に大きな球状の細胞として現れる (パネルA)。細胞をさらに3日間増殖させた場合、細胞数は有意に増加した (パネルC)。細胞毒性薬剤は、培養4日後の顕微鏡像において断片化されているように見える、CD34細胞における細胞死を誘導し (パネルB)、細胞数には有意な増加がないまま、断片化された細胞の数が増加する (パネルD)。

#### 【0031】

CD34<sup>+</sup>細胞の増殖速度に依存して、9日から10日間の細胞培養後に、採取ならびに細胞数および細胞毒性の解析を行う。細胞数および細胞毒性はFACS技術によって解析する。ウェル中に存在する細胞の数は、内部ビーズ標準との比較によって計数する。10,000ビーズのアリコートを、200  $\mu$ lの培地容量を有する各ウェル (FluoSpheres (登録商標) ポリスチレン、15  $\mu$ m; Molecular Probes) に加える。図2において示されるように、典型的なFACS機器の設定においては、生細胞は前方散乱 (FSC) および低い側方散乱 (SSC) の中間 / 右側の位置に現れるが、加えられた標準ビーズはより低いFSCおよび高いSSCを有する領域に存在する (パネルA)。長方形の領域として示されるゲートは、標準ビーズ上に設定され、個々の数が計測され、解析は停止し、細胞を含む対応する容量の培地が計算される。パネルEは、この測定、解析されたCD34細胞の生存率アッセイを示す。生細胞は、低いヨウ化プロピジウム標識を示すか、または標識を示さずに、前方散乱 (FSC) の中間 / 右側の位置に再度現れる。少数の死細胞が、生細胞集団に対して左側または上部 / 左側の位置に現れる。FACS測定によって、ここで1つのアリコートのビーズ計数を行い、ウェル内に存在する細胞数を計算する一方、この測定中に、細胞毒性、死細胞の数が並行して記録される (ヨウ化プロピジウムの添加；最終濃度1  $\mu$ g/ml)。細胞毒性化合物濃度の増加に伴い、死細胞集団における細胞数は有意に増加する (図2パネルFおよびパネルG)。最大の阻害および細胞毒性濃度においては、生細胞集団においては、もはやごく少数の細胞しか存在せず、PI染色または断片化の増加によって明らかのように、細胞の大多数が死滅した (パネルH)。

#### 【0032】

あるウェルにおけるCD34細胞数および死細胞の割合の計算の典型的な例が、2つの細胞毒性化合物、即ち5-フルオロウラシルおよびドキシソルピシンに関して、図3に示される。ウェル毎の細胞数は、試験される各濃度について棒グラフとして示す。5-フルオロウラシルについては、細胞数は0.3  $\mu$ mol/l ~ 1.0  $\mu$ mol/lの間で有意に減少し、1 ng/mlの最低濃度のドキシソルピシンにおいて、細胞数は既に減少する。IC<sub>50</sub>計算プログラムを適用し、阻害剤化合物についてのIC<sub>50</sub>値を計算したところ、5-フルオロウラシルおよびドキシソルピシ

10

20

30

40

50

ンについてそれぞれ、0.34 μmol/lおよび0.67 ng/mlであった。PI陽性細胞画分の解析（図2パネルE～パネルH）から得られた死細胞の割合の増加は、実線として示される。

【図面の簡単な説明】

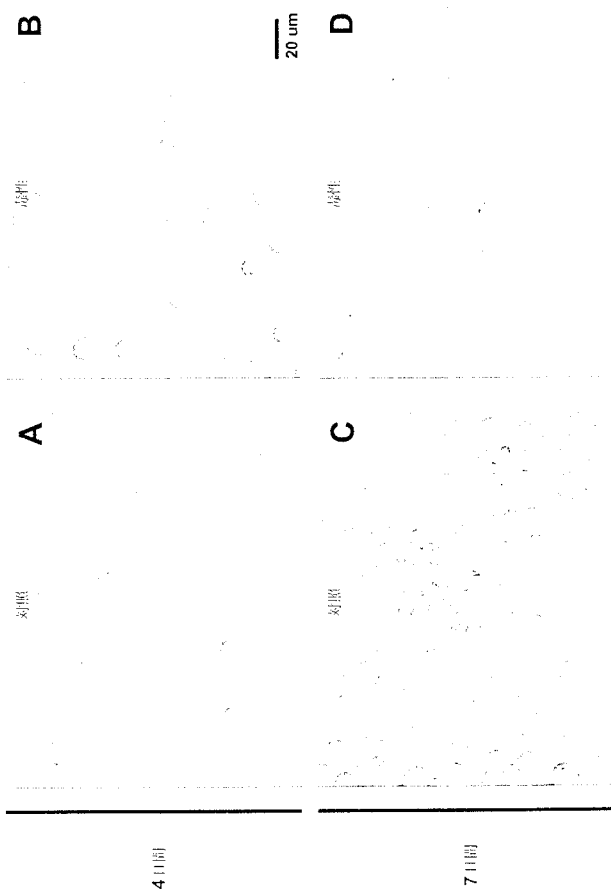
【0033】

【図1】CD34細胞集団における細胞の増殖および細胞死の顕微鏡解析を示す図である。サイトカインによって刺激したCD34細胞を、細胞毒性化合物で処理せずに、または処理して、4日間および7日間培養した。

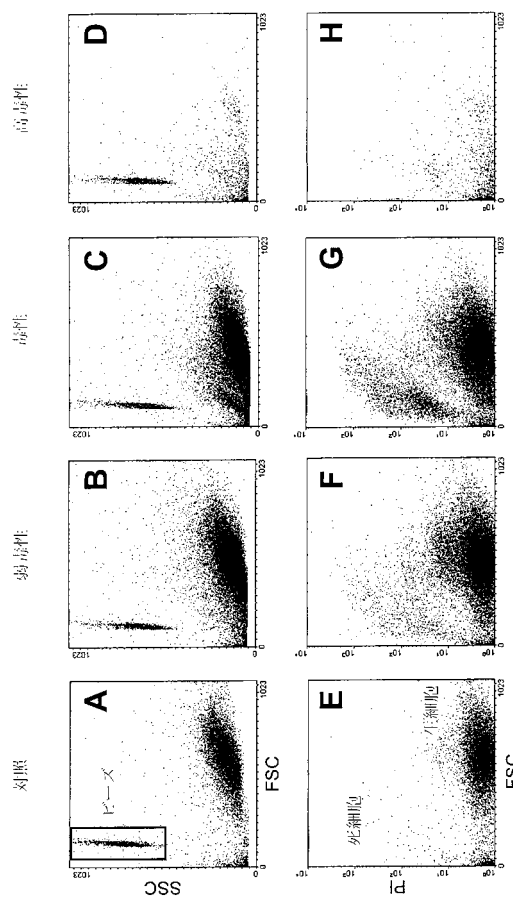
【図2】10日間培養した、標準ビーズ、ならびにサイトカインによって刺激したCD34生細胞およびCD34死細胞のFACS解析を示す図である。細胞は、未処理（左列）か、または異なるレベルの細胞傷害を誘導する細胞毒性薬剤で処理した。

【図3】図2において示されるようなFACS解析から定量化した死細胞の細胞数および割合を示す図である。2つの典型的な細胞毒性化合物、5-フルオロウラシル（0.1 μmol/l～100 μmol/l）およびドキシソルピシン（1 ng/ml～1,000 ng/ml）を示す。細胞数解析についてのIC<sub>50</sub>値は、5-フルオロウラシルおよびドキシソルピシンについてそれぞれ、0.34 μmol/lおよび0.67 ng/mlに相当する。

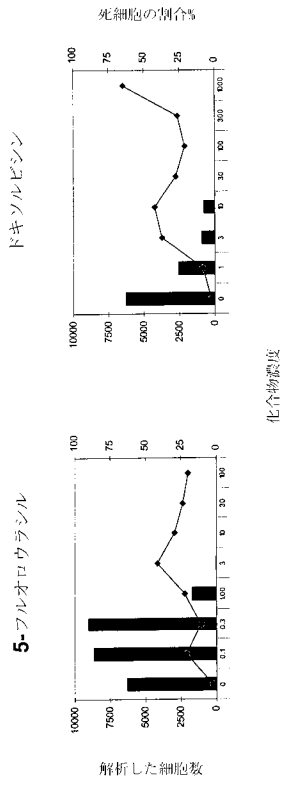
【図1】



【図2】



【 図 3 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/15

Z

(72)発明者 ベルンハルト ゲラー

ドイツ国 ペンツベルク ローゼンシュトラッセ 1 2

(72)発明者 マンフレッド カビーズ

ドイツ国 ペンツベルク グラスワンドシュトラッセ 7シー

Fターム(参考) 2G045 BB24 CB01 FB12 GC15 GC22

2G054 AA08 BB08 CE02 EA03 FA08

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QR66 QR69 QR90 QS24 QS36 QX02