

(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2007-259846

(P2007-259846A)

(43) 公開日 平成19年10月11日(2007. 10. 11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z	4 B O 6 3
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	

審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2006-345880 (P2006-345880) (22) 出願日 平成18年12月22日 (2006. 12. 22) (31) 優先権主張番号 特願2006-53945 (P2006-53945) (32) 優先日 平成18年2月28日 (2006. 2. 28) (33) 優先権主張国 日本国(JP)	(71) 出願人 390014960 シスメックス株式会社 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 (74) 代理人 100088867 弁理士 西野 卓嗣 (72) 発明者 田中 聡 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内 (72) 発明者 柴山 正樹 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内 (72) 発明者 石原 英幹 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内 最終頁に続く
--	--

(54) 【発明の名称】 悪性腫瘍の性質の判定方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 悪性腫瘍の性質を精度良く判定することのできる方法を提供する。

【解決手段】 パラメータを獲得する工程と第一比較工程と第二比較工程と判定工程とを含む悪性腫瘍の性質の判定方法を提供する。パラメータを獲得する工程では、悪性腫瘍の腫瘍細胞に含まれる第一のサイクリン依存性キナーゼ（第一C D K）の活性値及び発現量から得られる第一パラメータと、腫瘍細胞に含まれる第二のサイクリン依存性キナーゼ（第二C D K）の活性値及び発現量から得られる第二パラメータと、第一パラメータと第二パラメータに基づいて得られる第三パラメータと、前記腫瘍細胞のサイクリンの発現量から得られる第四パラメータとが獲得される。第一比較工程では、前記第三パラメータが第一の閾値と比較される。第二比較工程では、前記第四パラメータが、第二の閾値と比較される。判定工程では、第一比較結果及び第二比較結果に基づいて悪性腫瘍の性質が判定される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

悪性腫瘍の腫瘍細胞に含まれる第一のサイクリン依存性キナーゼ（第一 C D K）の活性値及び発現量から得られる第一パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれる第二のサイクリン依存性キナーゼ（第二 C D K）の活性値及び発現量から得られる第二パラメータと、前記第一パラメータ及び前記第二パラメータに基づいて得られる第三パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれるサイクリンの発現量から得られる第四パラメータとを獲得する工程と、前記第三パラメータを、第一の閾値と比較する第一比較工程と、前記第四パラメータを、第二の閾値と比較する第二比較工程と、第一比較結果及び第二比較結果に基づいて前記悪性腫瘍の性質を判定する工程と、を含む悪性腫瘍の性質の判定方法。

10

【請求項 2】

前記第一パラメータが、前記第一 C D K の比活性である請求項 1 記載の判定方法。

【請求項 3】

前記第二パラメータが、前記第二 C D K の比活性である請求項 1 又は 2 記載の判定方法。

【請求項 4】

前記第三パラメータが、第一パラメータと第二パラメータとの比である請求項 1 ～ 3 の何れかに記載の判定方法。

【請求項 5】

前記第一 C D K 及び前記第二 C D K が、C D K 1、C D K 2、C D K 4 及び C D K 6 からなる群から選択される請求項 1 ～ 4 の何れかに記載の判定方法。

20

【請求項 6】

前記サイクリンが、前記第一 C D K 又は前記第二 C D K と複合体を形成する請求項 1 ～ 5 の何れかに記載の判定方法。

【請求項 7】

前記サイクリンが、C D K 1、C D K 2、C D K 4 及び C D K 6 からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D K と複合体を形成する請求項 1 ～ 6 の何れかに記載の判定方法。

【請求項 8】

前記サイクリンが、サイクリン A、サイクリン B、サイクリン D 及びサイクリン E からなる群から選択される請求項 7 に記載の判定方法。

30

【請求項 9】

前記第一 C D K が C D K 1 である請求項 5 の何れかに記載の判定方法。

【請求項 10】

前記第二 C D K が C D K 2 である請求項 5 の何れかに記載の判定方法。

【請求項 11】

前記サイクリンがサイクリン B 又はサイクリン E である請求項 8 の何れかに記載の判定方法。

【請求項 12】

前記悪性腫瘍が上皮細胞由来のがんである請求項 1 ～ 11 の何れかに記載の判定方法。

【請求項 13】

前記悪性腫瘍が乳がんである請求項 1 ～ 12 の何れかに記載の判定方法。

40

【請求項 14】

前記悪性腫瘍の性質が、前記悪性腫瘍の再発リスクである請求項 1 ～ 13 の何れかに記載の判定方法。

【請求項 15】

前記判定工程において、前記第一比較結果及び前記第二比較結果に基づいて、前記悪性腫瘍を再発リスクの異なる三群の何れかに分類する、請求項 1 ～ 14 の何れかに記載の判定方法。

【請求項 16】

前記悪性腫瘍が、ステージ分類においてステージ I 又はステージ IIA の悪性腫瘍である、請

50

求項 1 ～ 15 の何れかに記載の判定方法。

【請求項 17】

悪性腫瘍の腫瘍細胞に含まれる第一のサイクリン依存性キナーゼ（第一 C D K）の活性値及び発現量から得られる第一パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれる第二のサイクリン依存性キナーゼ（第二 C D K）の活性値及び発現量から得られる第二パラメータと、前記第一パラメータ及び前記第二パラメータに基づいて得られる第三パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれるサイクリンの発現量から得られる第四パラメータとを獲得する工程と、前記第三パラメータを、第一の閾値と比較する第一比較工程と、第一比較結果に基づいて、前記悪性腫瘍の性質を判定する第一判定工程と、を含み、前記第一判定工程で判定が確定されなかった場合、
前記第四パラメータを、第二の閾値と比較する第二比較工程と、
第二比較結果に基づいて前記悪性腫瘍の性質を判定する第二判定工程と、
をさらに含む悪性腫瘍の性質の判定方法。

10

【請求項 18】

悪性腫瘍の腫瘍細胞に含まれる第一のサイクリン依存性キナーゼ（第一 C D K）の活性値及び発現量から得られる第一パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれる第二のサイクリン依存性キナーゼ（第二 C D K）の活性値及び発現量から得られる第二パラメータと、前記第一パラメータ及び前記第二パラメータに基づいて得られる第三パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれるサイクリンの発現量から得られる第四パラメータとを獲得する工程と、前記第三パラメータを、第一の閾値と比較する第一比較工程と、
第一比較結果に基づいて、前記悪性腫瘍を、A 群及び前記 A 群よりも再発リスクが高い群の何れかに分類する第一分類工程と、を含み、
前記悪性腫瘍が前記 A 群よりも再発リスクが高い群に含まれると判定された場合、
前記第四パラメータを、第二の閾値と比較する第二比較工程と、
第二比較結果に基づいて前記 A 群よりも再発リスクが高い群を、B 群と前記 B 群よりも再発リスクが高い C 群とに分類する第二分類工程と、
をさらに含む悪性腫瘍の再発リスクの判定方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、患者から採取した悪性腫瘍の腫瘍細胞において発現しているタンパク質を分析し、分析結果に基づいて悪性腫瘍の性質を判定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、悪性腫瘍細胞のサイクリンの発現量を測定することによって悪性腫瘍の性質を判定できることが知られている。例えば、非特許文献 1 では、乳がんの予後予測をサイクリン E の発現量を用いて行っている。非特許文献 1 では、乳がん患者から採取した腫瘍細胞におけるサイクリン E の発現量を測定し、サイクリン E の発現量が多い場合は生存率が低い、即ち予後が悪いということが報告されている。しかしながら、サイクリン E が低発現の悪性腫瘍であっても再発する場合などがあり、サイクリン E の発現量に基づく悪性腫瘍の予後予測や再発リスク判定の精度は充分ではない。

40

【0003】

また、非特許文献 2 では、悪性及び非悪性のヒト乳房病変におけるサイクリン B 1 及び C D K 1 の発現量を測定している。この文献では、サイクリン B 1 や C D K 1 の発現量を用いることにより、良性又は前癌病変と乳がんとを区別できうることが報告されている。しかしながら、この文献では、サイクリン B 1 や C D K 1 の発現量しか測定されておらず、また、悪性腫瘍の再発リスクなどの悪性腫瘍の性質を判定する方法については一切記載されていない。

【0004】

【非特許文献 1】 Keyomarsi K., et al., The New England Journal of Medicine, vol.

50

347, No. 20, 2002, pages 1566-1575.

【非特許文献2】Hisanori Kawamoto., et al., American Journal of Pathology, vol. 150, No. 1, 1997, pages 15-23

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、患者から採取した悪性腫瘍の腫瘍細胞で発現している分子の分析結果に基づいて悪性腫瘍の性質を精度良く判定することのできる方法を提供することである。

【課題を解決するための手段及び発明の効果】

【0006】

本発明の第一の局面による悪性腫瘍の性質の判定方法は、悪性腫瘍の腫瘍細胞に含まれる第一のサイクリン依存性キナーゼ（第一CDK）の活性値及び発現量から得られる第一パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれる第二のサイクリン依存性キナーゼ（第二CDK）の活性値及び発現量から得られる第二パラメータと、前記第一パラメータ及び前記第二パラメータに基づいて得られる第三パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれるサイクリンの発現量から得られる第四パラメータを獲得する工程と、前記第三パラメータを、第一の閾値と比較する第一比較工程と、前記第四パラメータを、第二の閾値と比較する第二比較工程と、第一比較結果及び第二比較結果に基づいて前記悪性腫瘍の性質を判定する工程と、を含む。

【0007】

この方法によると、悪性腫瘍の腫瘍細胞で発現している複数のCDK及びサイクリンの分析結果を用いるため、悪性腫瘍の性質を精度良く判定することができる。

【0008】

本発明の第二の局面による悪性腫瘍の性質の判定方法は、悪性腫瘍の腫瘍細胞に含まれる第一のサイクリン依存性キナーゼ（第一CDK）の活性値及び発現量から得られる第一パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれる第二のサイクリン依存性キナーゼ（第二CDK）の活性値及び発現量から得られる第二パラメータと、前記第一パラメータ及び前記第二パラメータに基づいて得られる第三パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれるサイクリンの発現量から得られる第四パラメータとを獲得する工程と、前記第三パラメータを、第一の閾値と比較する第一比較工程と、第一比較結果に基づいて、前記悪性腫瘍の性質を判定する第一判定工程と、を含み、前記第一判定工程で判定が確定されなかった場合、前記第四パラメータを、第二の閾値と比較する第二比較工程と、第二比較結果に基づいて前記悪性腫瘍の性質を判定する第二判定工程と、をさらに含む。

【0009】

この方法によると、悪性腫瘍の腫瘍細胞で発現している複数のCDK及びサイクリンの分析結果を用い、さらに第一判定工程で判定が確定されなかった腫瘍細胞について第二比較工程及び第二判定工程を実行するため、悪性腫瘍の性質を精度良く且つより少ないステップで判定することができる。

【0010】

本発明の第三の局面による悪性腫瘍の再発リスクの判定方法は、悪性腫瘍の腫瘍細胞に含まれる第一のサイクリン依存性キナーゼ（第一CDK）の活性値及び発現量から得られる第一パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれる第二のサイクリン依存性キナーゼ（第二CDK）の活性値及び発現量から得られる第二パラメータと、前記第一パラメータ及び前記第二パラメータに基づいて得られる第三パラメータと、前記腫瘍細胞に含まれるサイクリンの発現量から得られる第四パラメータとを獲得する工程と、前記第三パラメータを、第一の閾値と比較する第一比較工程と、第一比較結果に基づいて、前記悪性腫瘍を、A群及び前記A群よりも再発リスクが高い群の何れかに分類する第一分類工程と、を含み、前記悪性腫瘍が前記A群よりも再発リスクが高い群に含まれると判定された場合、前記第四パラメータを、第二の閾値と比較する第二比較工程と、第二比較結果に基づいて前記A群よりも再発リスクが高い群を、B群と前記B群よりも再発リスクが高いC群とに分類する第

10

20

30

40

50

二分類工程と、をさらに含む。

【0011】

この方法によると、悪性腫瘍の腫瘍細胞で発現している複数のCDKの分析結果を用いて、腫瘍細胞を、A群及びA群よりも再発リスクが高い群の何れかに分類し、A群よりも再発リスクが高い群に分類された場合、さらにサイクリンの分析結果を用いてB群及びC群に分類するため、悪性腫瘍を再発リスクの程度の異なる三群に分類することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本実施形態の判定方法は、悪性腫瘍の腫瘍細胞に含まれる第一CDK、第二CDK及びサイクリンを用いて悪性腫瘍の性質を判定する方法である。

10

【0013】

本明細書における悪性腫瘍とは、造血器由来の悪性腫瘍、上皮細胞由来の癌腫、肉腫などを含む。造血器由来の悪性腫瘍としては、白血病や悪性リンパ腫などを例示することができる。癌腫としては、乳がん、胃がん、大腸がん、食道がん、前立腺がんなどを例示することができる。肉腫としては、骨肉腫や軟部肉腫などを例示することができる。

【0014】

判定に用いられる腫瘍細胞は、早期がんの腫瘍細胞であることが好ましい。本明細書における早期がんとは、ステージ分類においてステージI及びステージIIAと判定されるがんのことである。

ステージ分類とは悪性腫瘍の悪性度を示す分類である。悪性腫瘍の種類により、分類方法は多少異なるが、例えば乳がんの場合、悪性度の低い順にステージ0～IVに分類される。また、一般的にステージIIは、悪性度の低い順にステージIIA及びステージIIBに分類され、ステージIIIは、悪性度の低い順にステージIIIA及びステージIIIBに分類される。このステージ分類は、TNM分類に基づいている。TNM分類とは、国際対がん連合(UICC)による悪性腫瘍の病期分類である。「T」は原発腫瘍の規模を示し、T0(原発巣が確認できない)～T4(腫瘍が体外へ露出)に分けられる。「N」は近傍リンパ節への浸潤度合いを示し、N0(リンパ節転移なし)～N3(体の正中に近いところにあるリンパ節(胸骨傍リンパ節)に転移が疑われる)に分けられる。「M」は遠隔転移の有無を示し、M0(遠隔転移なし)及びM1(遠隔転移あり)に分けられる。

20

30

乳がんの場合、ステージIの悪性腫瘍とは、TNM分類において「T1, N0, M0」である悪性腫瘍を指し、ステージIIAとは、TNM分類において「T0, N1, M0」、「T1, N1, M0」又は「T2, N0, M0」である悪性腫瘍を指し、ステージIIBとは、TNM分類において「T2, N1, M0」又は「T3, N0, M0」である悪性腫瘍を指す。

【0015】

上記判定方法で判定される悪性腫瘍の性質としては、腫瘍細胞の増殖能、再発リスク(転移のしやすさ)などが挙げられる。この判定方法は特に再発リスクの判定を行なうために用いられることが好ましい。再発とは、腫瘍の治療(摘出、抗がん剤治療、ホルモン治療など)から一定期間経過した後、同じ部位に悪性腫瘍が再現する場合及び腫瘍細胞が原発巣から分離して遠隔組織へ運ばれそこで自立的に増殖する場合をいう。再発が起こるか否かは腫瘍細胞の増殖能、生存能、移動能などに左右される。

40

【0016】

本発明の一実施形態による悪性腫瘍の判定方法は、各パラメータを獲得するパラメータ獲得工程と、第一比較工程と、第二比較工程と、判定工程とを含む。

【0017】

パラメータ獲得工程では、腫瘍細胞に含まれる第一CDKの第一パラメータと、腫瘍細胞に含まれる第二CDKの第二パラメータと、第一パラメータと第二パラメータから得られる第三パラメータと、腫瘍細胞に含まれるサイクリンの発現量から得られる第四パラメータとを求める。

50

C D Kとは、サイクリンというタンパク質が結合することによって活性化される酵素の総称で、その種類に応じて細胞周期の特定時期で機能している。C D Kの種類としては、C D K 1、C D K 2、C D K 3、C D K 4、C D K 5、C D K 6、C D K 7などが挙げられる。本実施形態では少なくとも二種類のC D K（第一C D K及び第二C D K）が用いられ、C D K 1、C D K 2、C D K 4及びC D K 6からなる群から選択される二種類のC D Kを組み合わせて用いることが好ましい。これは、C D K 1、C D K 2、C D K 4及びC D K 6が、細胞周期の時期の移行に直接的に関与しているからである。例えば、細胞周期のG1期からS期への移行の引き金を引くのはC D K 4又はC D K 6とサイクリンDとの複合体であり、それによってC D K 2とサイクリンEとの複合体の活性化がおり、細胞は本格的にS期に突入することになる。その後C D K 2とサイクリンAとの複合体の活性化により細胞はS期からG2期へ移行し、C D K 1とサイクリンBとの複合体の活性化によって細胞はM期へ進むことができる。また、C D K 1及びC D K 2の組み合わせを用いることがより好ましい。即ち、第一C D KがC D K 1であり、第二C D KがC D K 2であることがより好ましい。

【0018】

第一パラメータは第一C D Kの活性値及び発現量から得られるパラメータであり、第二パラメータは第二C D Kの活性値及び発現量から得られるパラメータである。これらのパラメータとして、活性値及び発現量の何れかを単独で用いてもよいし、活性値と発現量とを加減乗除などして計算される値を用いてもよいが、活性値と発現量との比を用いることが好ましい。活性値と発現量との比としては、活性値を発現量で除することにより得られる値（比活性）、発現量を活性値で除することにより得られる値（比活性の逆数）などを用いることができる。

【0019】

第三パラメータは第一パラメータと第二パラメータとに基づいて得られるパラメータである。第三パラメータとしては、第一パラメータと第二パラメータとを加減乗除などして計算される値を用いることができるが、第一パラメータと第二パラメータとの比を用いることが好ましい。第一パラメータと第二パラメータの比としては、第一パラメータを第二パラメータで除することにより得られる値、第二パラメータを第一パラメータで除することにより得られる値などを用いることができる。

【0020】

サイクリンとは、細胞周期関連因子として知られるタンパク質の一種であり、C D Kなどのタンパク質リン酸化酵素の調節サブユニットを構成する。サイクリンの種類としては、サイクリンA、サイクリンB、サイクリンC、サイクリンD、サイクリンE、サイクリンH、サイクリンK、サイクリンTなどが挙げられる。用いるサイクリンとしては、第一C D K又は第二C D Kと複合体を形成しうるサイクリンが好ましい。具体的には、上述したような理由から、C D K 1、C D K 2、C D K 4及びC D K 6からなる群から選択されるC D Kと複合体を形成するサイクリンが好ましく、このようなサイクリンとしては、サイクリンA、サイクリンB、サイクリンD、サイクリンEが挙げられる。また、この中でも、サイクリンBやサイクリンEを用いることがより好ましい。なお、本明細書におけるサイクリンBとは、サイクリンB 1、サイクリンB 2なども含む。本明細書におけるサイクリンEとは、サイクリンE 1、サイクリンE 2なども含む。

【0021】

第四パラメータは、発現量から得られるパラメータである。第四パラメータとしては、発現量と活性値とを加減乗除などして計算される値を用いてもよいが、発現量を単独で用いることが好ましい。

【0022】

第一比較工程では、第一C D Kに基づいた第一パラメータと第二C D Kに基づいた第二パラメータから得られる第三パラメータを、このパラメータに対応する閾値（以下、第一の閾値とする）と比較する。

【0023】

10

20

30

40

50

第一の閾値は、腫瘍細胞のどのような性質を判定するかによって適宜設定される。例えば、腫瘍細胞の再発リスクを判定する場合、複数の患者から採取された乳がん細胞のうち摘出手術後5年間の再発の有無が既知の細胞について、第三パラメータを算出し、算出された値を小さい順に並べて、患者集団を所定の分離比率で高値群（再発リスクが高い群）と低値群（再発リスクが低い群）とに分離できる値を第一の閾値とすることができる。分離比率としては、例えば、乳がんの場合、摘出手術後5年間の再発率が約30%であるため、高値群の分離比率が少なくとも患者集団の30%であることが好ましいが、低値群に分類された患者が再発を起こすということのないようにするため、高値群を30%よりも高い割合とすることがより好ましい。即ち、第一の閾値として、患者集団を、高値群：低値群が30：70となる値、好ましくは40：60となる値、より好ましくは50：50となる値（中央値）、60：40となる値などを用いることができる。なお、正確に患者集団を50：50や60：40に分離できる値が存在しないことも考えられるため、分離比率は厳密に設定する必要はない。例えば、患者集団を構成する患者数が99である場合は患者集団を50：50に分離できる値が存在しない。このような場合は分離比率を50：49などに設定してもよい。

10

【0024】

腫瘍細胞によっては、第一パラメータ、第二パラメータ又はこれら両方の値が非常に小さい場合や、逆に、非常に大きい場合があり、第三パラメータが第一の閾値とはかけ離れた値となることがある。このような場合、第一の閾値だけでなく、第一パラメータ及び第二パラメータのそれぞれに対しても閾値を設定することが好ましい。即ち、第一比較工程において、第一パラメータとこれに対応する閾値との比較、第二パラメータとこれに対応する閾値との比較、及び第三パラメータと第一の閾値との比較を実行してもよい。例えば、第一パラメータが対応する閾値未満であり、且つ第二パラメータが対応する閾値未満であった場合は、第三パラメータと第一の閾値との比較結果に関わらず再発リスクが低いと判定してもよい。また、第二パラメータが対応する閾値以上であった場合は、第三パラメータと第一の閾値との比較結果に関わらず再発リスクが高いと判定してもよい。

20

【0025】

また、第三パラメータとして、第一パラメータと第二パラメータとの比の値を用いると、分母が0となることがある。このような場合は比の値を算出することができないため、無限大として取り扱い、第一の閾値以上であるとする事ができる。

30

【0026】

第二比較工程では、腫瘍細胞に含まれるサイクリンの発現量から得られる第四パラメータを、このパラメータに対応する閾値（以下、第二の閾値とする）と比較する。

【0027】

第二の閾値は、腫瘍細胞のどのような性質を判定するかによって適宜設定される。例えば、腫瘍細胞の再発リスクを判定する場合、一定期間経過後の再発の有無が既知である腫瘍細胞について、上記の第一比較工程の結果と組み合わせて再発リスクを判定する際に実際の再発の有無と高確率で合致する第二の閾値を設定することができる。

【0028】

第一比較工程及び第二比較工程は、判定工程を実行する前であれば、どちらを先に実行してもよい。

40

【0029】

活性値や発現量の測定に供される測定用試料は、患者から採取した腫瘍細胞を用いて調製することができる。CDKやサイクリンの所定のパラメータを測定することができれば、その調製方法は特に限定されない。例えば、測定用試料としては、細胞を可溶化した試料（細胞可溶化液）を用いることができる。細胞可溶化液は、患者から採取した腫瘍細胞に界面活性剤を含む緩衝液を添加し、緩衝液中で腫瘍細胞を物理的及び／又は化学的に処理することにより調製される。このような処理を行うことにより、細胞に含まれるCDKやサイクリンなどのタンパク質が液中に遊離する。この細胞可溶化液を遠心分離してCDKやサイクリンを含む上清を採取し、これを測定用試料とすることができる。

50

【0030】

C D Kの活性値の測定方法は特に限定されず、従来公知の方法で測定することができる。例えば、32 P標識したA T P (γ - [32 P] - A T P)を用いる方法が挙げられる。この方法によると、測定用試料と、基質と、 γ - [32 P] - A T Pとを混合し、キナーゼの作用によって基質に32 Pを導入する。次に、32 Pで標識されたリン酸化基質の標識量を測定し、キャリブレーションで作成された検量線をもとにリン酸化基質を定量する。定量されたリン酸化基質量に基づいてキナーゼの活性値を算出する。また、放射性物質を用いない方法として、特開2002-335997号公報に開示の方法を用いることができる。この方法によると、先ずこれらキナーゼの何れか又は両方を含む試料と、基質と、アデノシン5'-O-(3-チオトリホスフェート)(A T P- γ S)とを混合し、キナーゼの作用によって基質にモノチオリン酸基を導入する。導入されたモノチオリン酸基の硫黄原子に標識蛍光物質又は標識酵素を結合させることによって基質を標識し、標識されたモノチオリン酸化基質の標識量を測定し、キャリブレーションで作成された検量線を基にモノチオリン酸化基質を定量する。定量されたモノチオリン酸化基質量に基づいてキナーゼの活性値を算出する。測定は、抗C D K抗体を含む試薬、C D Kの基質を含む試薬、A T P- γ Sを含む試薬及びリン酸化された基質に結合可能な標識物質を含む試薬を備えた試薬キットを用いて行うことができる。なお、C D Kの基質及びA T P- γ Sは同一の容器に収容されていてもよい。

10

【0031】

C D Kやサイクリンの発現量の測定方法は特に限定されず、従来公知の方法で測定することができる。例えば、E L I S A、ウェスタンブロッティング、特開2003-130871号公報に開示の方法などを用いて測定用試料を測定して、C D Kやサイクリンの発現量を得ることができる。特開2003-130871号公報に開示の方法を利用する場合、下記に示す方法でC D Kやサイクリンの発現量を測定することができる。まず、測定用試料を疎水性多孔性膜に接触させて、測定用試料中のC D K又はサイクリンを該膜に結合させる。次に、標識化されているか、または標識との反応性部位を有し、かつC D K又はサイクリンと特異性を有する抗体を、C D K又はサイクリンと結合させる。標識化されていない抗体を用いた場合には、標識との反応性部位に標識を作用させて該抗体を標識化する。そして、C D K又はサイクリンに結合した標識の量を測定する。予め作製した検量線をもとに、該標識の量を用いて、C D K又はサイクリンの発現量を測定する。

20

30

【0032】

測定用試料は患者から採取した腫瘍細胞から調製されるため、測定用試料によって含まれる腫瘍細胞数が異なる。このため、サイクリンなどのタンパク質の発現量の測定値は測定用試料に含まれる腫瘍細胞の多寡によって変動してしまう。従って、発現量の測定値を補正することが好ましい。発現量の測定値の補正としては、例えば、ハウスキーピング遺伝子によってコードされるタンパク質(以下、ハウスキーピングタンパク質とする)の発現量を用いて行なうことができる。ハウスキーピングタンパク質はどの細胞でもほぼ一定量発現しているタンパク質であり、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(G A P D H)やアクチンなどを例示することができる。具体的には、測定用試料のタンパク質の発現量だけでなく、ハウスキーピングタンパク質の発現量も測定し、測定用試料のタンパク質の発現量をハウスキーピングタンパク質の発現量で除することにより発現量の測定値を補正することができる。なお、第一パラメータとして発現量又は活性値と発現量との比を用い、第二パラメータとして発現量又は活性値と発現量との比を用い、第三パラメータとして第一パラメータと第二パラメータとの比を用いる場合、第一C D Kの発現量及び第二C D Kの発現量が測定されるが、ハウスキーピングタンパク質の発現量は計算上相殺されるため上記のような補正は必要ない。

40

【0033】

判定工程では、第一C D Kの活性値及び発現量から得られる第一パラメータと、第二C D Kの活性値及び発現量から得られる第二パラメータとに基づいて得られる第三パラメータを対応する第一の閾値と比較した結果と、サイクリンの発現量から得られる第四パラメ

50

ータを対応する第二の閾値と比較した結果とに基づいて悪性腫瘍の性質を判定する。例えば、悪性腫瘍の性質として再発リスクの判定を行う場合、これらの結果に基づいて、判定対象の悪性腫瘍を再発リスクの程度の異なる三群（例えば、高、中及び低）の何れかに分類することができる。判定の具体的な方法としては、例えば、下記に示す第一の判定方法～第五の判定方法の何れかを用い、再発リスクを判定することができる。

【0034】

第一の判定方法では、第三パラメータを第一の閾値と比較した結果と、第四パラメータを第二の閾値と比較した結果とを組み合わせる再発リスクを判定する。これらの比較結果の両方で閾値未満の場合には再発リスクが低いと考えられ、「A群」と判定する。これらの比較結果の何れか一方が閾値以上、他方が閾値未満の場合には、「A群」と判定された腫瘍細胞よりも再発リスクが高い「B群」と判定する。これらの比較結果の両方が閾値以上の場合には、「B群」と判定された腫瘍細胞よりも再発リスクが高い「C群」と判定する。

10

また、ここで、「B群」と判定されるものについて、第三パラメータが第一の閾値以上のものと第四パラメータが第二の閾値以上のものと再発リスクの程度の異なる場合も考えられる。そのような場合は、さらに、第三パラメータが第一の閾値以上のものを「B-1群」と判定し、第四パラメータが第二の閾値以上のものを「B-2群」と判定してもよい。これにより、判定対象の悪性腫瘍を再発リスクの程度の異なる四群の何れかに分類することができる。

【0035】

20

第二の判定方法は、第三パラメータを第一の閾値と比較し、第三パラメータが閾値以上の場合には「C群」と判定を確定させる。第三パラメータが閾値未満の場合には判定が確定されないため、第四パラメータを第二の閾値と比較する。第四パラメータが閾値以上の場合には、「C群」と判定された腫瘍細胞よりも再発リスクが低い「B群」と判定する。第四パラメータが閾値未満の場合には、「B群」と判定された腫瘍細胞よりも再発リスクが低い「A群」と判定する。

【0036】

第三の判定方法では、第四パラメータを第二の閾値と比較し、第四パラメータが閾値以上の場合には「C群」と判定を確定させる。第四パラメータが閾値未満の場合には判定が確定されないため、第三パラメータを第一の閾値と比較する。第三パラメータが閾値以上の場合には、「C群」と判定された腫瘍細胞よりも再発リスクが低い「B群」と判定する。第三パラメータが閾値未満の場合には、「B群」と判定された腫瘍細胞よりも再発リスクが低い「A群」と判定する。

30

【0037】

第四の判定方法では、第三パラメータを第一の閾値と比較し、第三パラメータが閾値未満の場合には、「A群」と判定を確定させる。第三パラメータが閾値以上の場合には判定が確定されないため、第四パラメータを第二の閾値と比較する。第四パラメータが閾値未満の場合には、「A群」と判定された腫瘍細胞よりも再発リスクが高い「B群」と判定する。第四パラメータが閾値以上の場合には、「B群」と判定された腫瘍細胞よりも再発リスクが高い「C群」と判定する。

40

【0038】

第五の判定方法では、第四パラメータを第二の閾値と比較し、第四パラメータが閾値未満の場合には、「A群」と判定を確定させる。第四パラメータが閾値以上の場合には判定が確定されないため、第三パラメータを第一の閾値と比較する。第三パラメータが閾値未満の場合には、「A群」と判定された腫瘍細胞よりも再発リスクが高い「B群」と判定する。第三パラメータが閾値以上の場合には、「B群」と判定された腫瘍細胞よりも再発リスクが高い「C群」と判定する。

【0039】

なお、第一～第五の判定方法において、A群、B群及びC群は、それぞれの判定方法における相対的な再発リスクの相違を示している。各判定方法において、Aは相対的に再発

50

リスクが低いことを示し、Cは相対的に再発リスクが高いことを示し、BはAとCとの中間であることを示す。なお、閾値は各判定方法で同一であってもよいし、異なってもよい。

【0040】

第一の判定方法～第五の判定方法の何れを用いるかは、悪性腫瘍の種類、パラメータの種類、臨床データとの相関などを考慮して決定することができる。悪性腫瘍の再発リスクを判定する場合、第一及び第四の判定方法の何れかを用いることが好ましく、第四の判定方法を用いることがより好ましい。

【0041】

第一の判定方法を用いる場合、第三パラメータを第一の閾値と比較する第一比較工程及び第四パラメータを第二の閾値と比較する第二比較工程は、再発リスクを判定する工程の前であれば、どちらを先に実行してもよい。

【0042】

第二～第五の判定方法を用いる場合、第三パラメータを第一の閾値と比較する第一比較工程又は第四パラメータを第二の閾値と比較する第二比較工程のうち、まず、いずれか一方の比較工程を実行し、その比較結果に基づいて第一の再発リスク判定工程を実行し、ここで判定が確定されない場合においてのみ、他方の比較工程を実行し、その比較結果に基づいて第二の再発リスク判定工程を実行するようにしてもよい。これにより、より少ないステップで再発リスクの判定を行うことができる。具体的には、第四の判定方法では、第三パラメータを第一の閾値と比較する第一比較工程を実行し、この比較結果に基づいて、前記悪性腫瘍を、A群及び前記A群よりも再発リスクが高い群の何れかに分類する工程を実行し、悪性腫瘍が前記A群よりも再発リスクが高い群に含まれると判定された場合、さらに、第四パラメータを第二の閾値と比較する第二比較工程を実行し、この比較結果に基づいて前記A群よりも再発リスクが高い群を、B群と前記B群よりも再発リスクが高いC群とに分類する工程を実行する。これにより、より少ないステップで再発リスクの程度の異なる三群に分類することができる。

【0043】

CDKは細胞の増殖に深く関わるため、CDKを用いた比較工程（第一比較工程）を実行することにより、腫瘍細胞の増殖能を精度良く捉えることができる。前述のように細胞の増殖能は細胞の再発リスクを左右する一つの大きな要素である。また、細胞周期関連因子であるサイクリンも細胞の増殖に関連し、悪性腫瘍の再発リスクを判定する有用な因子であるが、判定の精度が充分ではない。また、第一比較工程及び第二比較工程の何れか一方を用いると、悪性腫瘍を再発リスクの異なる二群に分類することができる。さらに、例えば本実施形態の第四の判定方法を用いると、これらの比較工程の結果を組み合わせることにより、第一比較工程の結果を用いて再発リスクが高いと判定された群を、第二比較工程の結果を用いてさらに再発リスクが極めて高い群と一般的な再発率を示す群とに分類することができる。このため、悪性腫瘍の再発リスクをより精度良く予測することができる。

【0044】

上記のような悪性腫瘍の性質の判定結果は、治療方法を選択する際の指標となり得る。例えば、悪性腫瘍を患う患者に対して化学療法（抗がん剤療法）などのアグレッシブな治療を行なうか、ホルモン療法などのマイルドな治療を行なうかなどを決定する一助となる。また判定結果によって薬剤の投与量や種類を調節することも可能である。

【0045】

上記本実施形態の方法は、コンピュータにおいて実行されることが好ましい。以下、上記の方法を実施するためのコンピュータシステム（図1）及び判定フロー（図2）について説明する。

【0046】

図1に示すシステム100は、コンピュータ本体110、必要データをコンピュータ本体110に入力する入力デバイス130、及び入出力データ等を表示するディスプレイ1

10

20

30

40

50

20を備え、さらに必要に応じて外部記録媒体140が含まれ得る。ここで、本実施形態のプログラム140aは、外部記録媒体140に記録されていてもよいし、コンピュータ本体110に備え付けのメモリ110b~110dに保存されていてもよい。コンピュータ本体110内において、CPU110a、メモリ110b~110d、入出力インターフェイス110f、画像出力インターフェイス110h、読出装置110eは、それぞれバス110iにて、データの送受信可能なように接続されている。

【0047】

図2は、上記第一の判定方法による再発リスク判定を実行するためのプログラムの動作を示すフローチャートであり、このプログラムはメモリ110dに格納されている。

まず、入力デバイス130により検体のCDK2比活性とCDK1比活性との比（CDK2比活性／CDK1比活性：第三パラメータ）及びサイクリンの発現量（第四パラメータ）が入力されると、CPU110aが入出力インターフェイス110fを介してこれらのパラメータデータを取得し、RAM110cに記憶させる（ステップS11）。 10

【0048】

CPU110aは、予めプログラムのデータとしてメモリ110dに記憶されていた第三パラメータに対応する閾値、および第四パラメータに対応する閾値を呼び出して、これらの閾値とパラメータデータとの比較を実行する（ステップS12）。

【0049】

次に、CPU110aは、比較結果に基づいて再発リスクの予測判定を行う（ステップS13）。CPU110aは、第三パラメータが閾値以上であり、且つ第四パラメータが閾値以上である場合には、再発リスク「高」と判定する。第三パラメータが閾値以上であり、且つ第四パラメータが閾値未満である場合には、再発リスク「中」と判定する。第三パラメータが閾値未満であり、且つ第四パラメータが閾値以上である場合には、再発リスク「中」と判定する。第三パラメータが閾値未満であり、且つ第四パラメータが閾値未満である場合には、再発リスク「低」と判定する。 20

【0050】

そして、CPU110aは、上記の判定結果を、RAM110cに格納するとともに画像出力インターフェイス110hを介してディスプレイ120に出力する（ステップS14）。

【0051】

なお、本実施形態においては、各種パラメータデータや活性値、発現量などを、入力デバイス130を用いて入力したが、これに限定されるものではなく、例えば、操作者による入力ではなく、各種パラメータデータや活性値、発現量などが測定装置から入出力インターフェイス110fを介して自動的に取得されるようにしてもよい。また、第三パラメータとして、CDK2比活性／CDK1比活性の値を入力したが、CDK1の発現量と活性値およびCDK2の発現量と活性値を入力し、CPU110aがこれらの値からCDK2比活性／CDK1比活性の値を算出して、この値を閾値との比較に用いてもよい。 30

【0052】

（実施例1）

（1）測定用試料の調製 40

乳がんステージ分類においてステージI又はステージIIAに分類される乳がん患者51名（患者1~51）から摘出した腫瘍細胞塊51検体を用いて、下記のような手順で測定用試料1~51を調製した（なお、各患者のステージ分類は下記表1に示される）。

先ず、緩衝液中の腫瘍細胞塊が約150mg/mlとなるように、緩衝液A（0.1w/v%のノニデットP-40（カルビオケム社）、50mMのトリス塩酸（pH7.4）、5mMのEDTA、50mMのフッ化ナトリウム、1mMのオルトバナジン酸ナトリウム及び100μl/mlのプロテアーゼ阻害剤カクテル（シグマ社）を含む）と腫瘍細胞塊とをチューブに収容した。

電動ホモジナイザを用いて、緩衝液A中で腫瘍細胞塊をホモジナイズし、腫瘍細胞を破碎して細胞可溶化液を調製した。次に、細胞可溶化液を4℃で15000rpm、5分間 50

遠心分離し、上清を測定用試料として用いた。

【0053】

(2) サイクリンE及びGAPDH発現量の測定

タンパク質含有量が15 µgとなる量の測定用試料と、この測定用試料の3分の1の量のSDSローディングバッファ(200 mMのトリス塩酸(pH 6.8)、40%のグリセロール、8%のSDS及び10%の2-メルカプトエタノールを含む)とを混合し、100℃で5分間加熱した。

加熱後の測定用試料を用いてSDS-PAGEを行い、ゲルを室温で15分間トランスファーバッファ(39 mMのグリシン、48 mMのトリス、0.1%のSDS及び20%のメタノールを含む)に浸漬して平衡化した。

ゲル中のタンパク質を、Mini Trans-Blot cell transfer system(バイオラッド社)を用いて100 V、4℃、一時間でImmobilon FL membrane(ミリポア社)に転写した。

メンブレンを、ブロッキング試薬A(ブロックエース(商品名:大日本製薬)を含む)で37℃、1時間ブロッキングを行い、さらに洗浄液A(25 mMのトリス塩酸(pH 7.4)、150 mMのNaCl及び0.02%のTween 20を含む)で洗浄した。

洗浄後、メンブレンに、サイクリンEに特異的に結合するマウス抗サイクリンE抗体(クローンHE)(一次抗体:サンタクルズ社)溶液5 mlをブロットし、メンブレンのサイクリンと一次抗体とを反応させた。

メンブレンを20 mlの洗浄液Aで洗浄した後、メンブレンに、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識ウサギ抗マウスIgG(二次抗体:ダコ社)溶液5 mlをブロットし、メンブレンの一次抗体と二次抗体とを反応させた。

メンブレンを20 mlの洗浄液Aで洗浄した後、メンブレンをECL plus(GEヘルスケア社)に5分間浸漬し、メンブレンに吸着したサイクリンEの量を蛍光イメージアナライザMolecular Imager FX(バイオラッド社)によって蛍光の検出を行った。

【0054】

GAPDH発現量の測定は、ブロッキング試薬として、ブロッキング試薬Aではなくブロッキング試薬B(4%のBSA、25 mMのトリス塩酸(pH 7.4)、150 mMのNaCl及び0.02%のTween 20を含む)を用いること、一次抗体として、ウサギ抗サイクリンE抗体ではなくウサギ抗GAPDH抗体を用いること、二次抗体としてHRP標識ウサギ抗マウスIgGではなく、ビオチン標識化ヤギ抗ウサギ抗体を用いること、及びECL plusにメンブレンを浸漬するのではなくメンブレン上でFITC conjugated streptavidin(ベクター社)をビオチン標識化ヤギ抗ウサギ抗体に結合させることにより蛍光の検出を行うこと以外は、上述のサイクリンEの発現量測定と同様の実験手順で行なった。

【0055】

GAPDHの発現量は、サイクリンEの発現量の測定値を補正するために用いられた。以下でサイクリンEの発現量とされる値は、GAPDHの発現量による補正後の値(サイクリンE発現量/GAPDH発現量で算出される値)である。

【0056】

サイクリンE発現量の測定結果は、下記表1に示される。

【0057】

(3) CDK1及びCDK2発現量の測定

PVDFメンブレン(ミリポア社製)をセットしたブロッタの各ウェルに、測定用試料を50 µlずつ収容し、ウェルの底面、すなわちメンブレンの裏面から負圧約250 mmHgで約30秒間吸引してメンブレンに測定用試料中のタンパク質を吸着させた。

ウェルに洗浄液B(25 mMのトリス塩酸(pH 7.4)及び150 mMのNaClを含む)を100 µl収容し、負圧500 mmHgで15秒間吸引してメンブレンを洗浄した。

洗浄後、ブロッキング試薬B(4%のBSA、25 mMのトリス塩酸(pH 7.4)及び150 mMのNaClを含む)を各ウェルに40 µl収容し、15分間静置した後、負

10

20

30

40

50

圧 5 0 0 m m H g で 1 5 秒間吸引してメンブレンをブロッキングした。

ブロッキング後、ウェルに C D K 1 に特異的に結合するウサギ抗 C D K 1 抗体（一次抗体：サンタクルズ社）溶液 4 0 μ l を収容し、室温で約 3 0 分間静置してメンブレンの C D K 1 と一次抗体とを反応させた後、ウェル底面から負圧 5 0 0 m m H g で約 1 5 秒間吸引した。

ウェルに洗浄液 B を 1 0 0 μ l 収容し、負圧 5 0 0 m m H g で 1 5 秒間吸引してメンブレンを洗浄した。

ウェルにビオチン化した抗ウサギ I g G - B 抗体（二次抗体：サンタクルズ社）溶液 4 0 μ l を収容し、室温で約 3 0 分間静置してメンブレンの一次抗体と二次抗体とを反応させた後、ウェル底面から負圧 5 0 0 m m H g で約 1 5 秒間吸引した。

10

ウェルに洗浄液 B を 1 0 0 μ l 収容し、負圧 5 0 0 m m H g で 1 5 秒間吸引してメンブレンを洗浄した。

ウェルに F I T C で標識したストレプトアビジンを含む標識溶液 5 0 μ l を収容し、室温で約 3 0 分間静置して、メンブレンの二次抗体を F I T C で標識した後、ウェル底面から負圧 5 0 0 m m H g で約 1 5 秒間吸引した。

ウェルに洗浄液 B を 5 0 μ l 収容し、負圧 5 0 0 m m H g で 1 5 秒間吸引した。これを 5 回繰り返し、メンブレンを洗浄した。

メンブレンをプロッターからとりはずし、2 0 % メタノール約 5 分間濯ぎ、約 2 0 分間室温で乾燥させた後、メンブレンに吸着されたタンパク質の蛍光強度を、蛍光イメージアナライザ Molecular Imager FX（バイオラッド社）によって分析、測定した。測定値は検量線をもとに算出した。

20

【 0 0 5 8 】

検量線は、0 . 0 0 5 % のノニデット P - 4 0 及び 5 0 μ g / m l の B S A を含む洗浄液 B 中に、5 種類の濃度の組換え C D K 1 を溶解した溶液を、上記と同様に処理したウェルに 5 0 μ l ずつ注入し、上記と同様の実験手順で F I T C 標識し、蛍光強度を測定して、蛍光強度と C D K 1 発現量との関係を表すことにより検量線を作成した。

【 0 0 5 9 】

C D K 2 発現量の測定は、一次抗体としてウサギ抗 C D K 1 抗体ではなくウサギ抗 C D K 2 抗体を用いること以外は上述の C D K 1 の発現量測定と同様の実験手順で行なった。

【 0 0 6 0 】

30

（ 4 ） C D K 1 及び C D K 2 の活性測定

1 . 5 m l エッペンドルフチューブに緩衝液 A を 5 0 0 μ l 収容し、さらに測定用試料を添加した。測定用試料は、チューブに収容した混合液中の全タンパク質量が 1 0 0 μ g となるように調節して添加された。

ここに抗 C D K 1 抗体（サンタクルズ社）2 μ g 及び 2 0 μ l のプロテイン A をコートしたセファロースビーズ（バイオラッド社）を加えて 4 $^{\circ}$ C、1 時間静置して C D K 1 と抗 C D K 1 抗体とを反応させた。

反応後、ビーズをビーズ洗浄用緩衝液（0 . 1 w / v % のノニデット P - 4 0 及び 5 0 m M のトリス塩酸（p H 7 . 0）を含む）で三回洗浄し、1 5 μ l の溶解緩衝液 A 中に再懸濁させて、抗 C D K 1 抗体を介して C D K 1 が結合したセファロースビーズを含む試料を得た。

40

この試料に、C D K 1 の基質溶液（1 0 μ g ヒストン H 1（アップステイトバイオテクノロジー社）1 0 μ g、5 m M の A T P - γ S（シグマ社）、2 0 m M のトリス塩酸（p H 7 . 4）及び 0 . 1 % の T r i t o n X - 1 0 0 を含む）を添加した。基質溶液は、チューブに収容した混合液の総量が 5 0 μ l となるように調節して添加された。これを 3 7 $^{\circ}$ C で 1 0 分間震蕩してキナーゼ反応を行ない、ヒストン H 1 にモノチオリン酸基を導入した。

キナーゼ反応後、2 0 0 0 r p m で 2 0 秒間遠心分離してビーズを沈殿させ、上清 1 8 μ l を採取した。

この上清に、結合緩衝液（1 5 0 m M のトリス塩酸（p H 9 . 2）及び 5 m M の E D T

50

Aを含む) 15 μ l と、10 mMのヨードアセチルビオチン溶液 (100 mMのトリス塩酸 (pH 7.5) 及び1 mMのEDTAを含む) とを添加して90分間、室温、暗所で静置することにより、モノチオリン酸基を導入された基質 (モノチオリン酸化基質) の硫黄原子にヨードアセチルビオチンを結合させた。

ヨードアセチルビオチンとモノチオリン酸基との反応の停止は、2-メルカプトエタノールの添加により行なった。

ヨードアセチルビオチンが結合したモノチオリン酸化基質0.4 μ gを含む試料を、スロットブロッターを用いてPVDFメンブレン上にブロットした。

このPVDFメンブレンを1w/v%のBSAを含む溶液でブロッキングし、ストレプトアビジン-FITC (ベクター社) を添加して37°Cで一時間反応させた。

10

反応後、PVDFメンブレンを50 mMの洗浄液Bで三回洗浄した。

洗浄後、蛍光イメージアナライザMolecular Imager FX (バイオラッド社) を用いてPVDFメンブレンの蛍光分析を行なった。活性値は、検量線に基づいて算出された。

【0061】

検量線は、二種類の濃度のタンパク質 (ビオチン標識免疫グロブリン) を含む溶液をPVDFメンブレンにブロットし、上記と同様の方法でFITC標識し、タンパク質の蛍光強度を蛍光イメージアナライザで測定することによって作成した。従って、測定されるCDK1の活性1U (ユニット) は、前記タンパク質1ngのときの蛍光量と同等の蛍光強度を示す値をいう。

【0062】

20

CDK2の活性値は、抗CDK1抗体ではなく、抗CDK2抗体 (サンタクルズ社) を用いること以外はCDK1の活性値の測定と同様にして測定された。

【0063】

(5) CDK比活性の算出

上記で測定したCDK活性値及びCDK発現量から、下記式により、CDK比活性 (mU/ng) を算出した。

CDK比活性 = CDK活性値 / CDK発現量

【0064】

算出されたCDK1の比活性及びCDK2の比活性を基に、CDK1比活性とCDK2比活性との比 (CDK2比活性 / CDK1比活性; 以下、比活性の比とする) を算出した。

30

CDK1比活性、CDK2比活性及び比活性の比は、下記表1に示される。

【0065】

(6) 閾値の設定及び再発リスク判定

サイクリンE発現量に対応する閾値と、比活性の比に対応する閾値とを設定した。サイクリンE発現量と閾値との比較結果と、比活性の比と閾値との比較結果とを組み合わせ、悪性腫瘍の性質の判定を行なった。

【0066】

比活性の比の閾値は、46に設定した。この値は、乳がん患者129名から採取した腫瘍細胞129検体の比活性の比を算出し、比活性の比の値を小さい方から順に並べた際に、129検体を65:64に分離できる値である。比活性の比の値が46以上の場合に「High」とし、46未満の場合に「Low」とした。また、CDK1比活性が20未満かつCDK2比活性が500未満の場合は比活性の比の値に関わらず「Low」とした。さらに、CDK2比活性が10000以上の場合は比活性の比の値に関わらず「High」とした。この比較結果は、下記表1に示される。

40

【0067】

サイクリンE発現量の閾値は、1.7に設定した。この値は、患者1~61の再発の有無と、比活性の比と対応する閾値との比較結果を考慮に入れて設定された値である。サイクリンE発現量が1.7以上の場合は「High」とし、0.7未満の場合は「Low」とした。この比較結果は、下記表1に示される。

【0068】

50

これらの比較結果を用い、下記判定条件に基づいて再発リスク判定を行なった。

比活性の比と閾値との比較結果が「Low」であった場合は、サイクリンEの発現量に関わらず、「再発リスク低」と判定した。

比活性の比と閾値との比較結果が「High」であり、サイクリンE発現量と閾値との比較結果が「Low」であった場合は、「再発リスク中」と判定した。

比活性の比と閾値との比較結果が「High」であり、サイクリンE発現量と閾値との比較結果が「High」であった場合は、「再発リスク高」と判定した。

【0069】

再発リスク判定において、「再発リスク低」と判定された腫瘍細胞は、細胞の増殖能が低く、生存能や移動能なども低いと考えられるため、再発の可能性は低いと解される。「再発リスク中」と判定された腫瘍細胞は、「再発リスク低」と判定された腫瘍細胞よりも再発のリスクが高いと解される。「再発リスク高」と判定された腫瘍細胞は、「再発リスク中」と判定された腫瘍細胞よりも再発のリスクが高いと解される。

10

【0070】

再発リスクの判定結果及び再発の有無を下記表1に示す。表中「再発」の列において、0は「再発無し」を示し、1は「再発有り」を示す。なお、再発の有無は、患者1～51から腫瘍細胞塊を摘出した後、各患者に対してホルモン治療を施し、摘出手術後5年間で再発が認められたか否かを示したものである。

【0071】

【表 1】

患者	ステージ 分類	サイクリンE 発現量	サイクリンE 閾値との比較	CDK1比 活性	CDK2比 活性	比活性の 比	比活性の比 閾値との比較	再発 リスク	再発
1	Stage II A	2.066	High	0.0	1869	∞	High	高	1
2	Stage II A	2.950	High	155.8	46513	298.5393	High	高	1
3	Stage II A	12.561	High	0.0	2134	∞	High	高	1
4	Stage II A	2.091	High	46.9	2534	54.08023	High	高	1
5	Stage I	1.890	High	1214.5	19523	16.07537	High	高	1
6	Stage II A	0.100	Low	0.0	1299	∞	High	中	0
7	Stage II A	0.241	Low	32.1	1719	53.558	High	中	0
8	Stage II A	1.287	Low	0.0	4148	∞	High	中	0
9	Stage II A	0.203	Low	16.3	1676	102.7896	High	中	0
10	Stage II A	0.252	Low	19.4	2008	103.4629	High	中	0
11	Stage II A	0.235	Low	1.4	870	630.1985	High	中	0
12	Stage II A	0.524	Low	0.0	841	∞	High	中	0
13	Stage I	0.612	Low	24.8	5313	213.9562	High	中	0
14	Stage II A	1.596	Low	2.3	2143	950.3821	High	中	0
15	Stage II A	0.242	Low	108.3	5689	52.53776	High	中	1
16	Stage II A	0.767	Low	25.8	3836	148.6678	High	中	1
17	Stage I	4.169	High	35.4	869	24.55147	Low	低	0
18	Stage I	5.754	High	20.5	905	44.08187	Low	低	0
19	Stage II A	5.538	High	0.0	0	0	Low	低	0
20	Stage II A	14.714	High	0.0	0	0	Low	低	0
21	Stage I	6.422	High	0.0	0	0	Low	低	0
22	Stage II A	2.801	High	296.2	4629	15.62883	Low	低	0
23	Stage II A	2.851	High	87.6	2409	27.48521	Low	低	0
24	Stage II A	0.495	Low	252.2	0	0	Low	低	0
25	Stage II A	0.426	Low	0.0	0	0	Low	低	0
26	Stage II A	0.623	Low	37.9	663	17.5057	Low	低	0
27	Stage II A	1.061	Low	191.7	446	2.324838	Low	低	0
28	Stage II A	0.730	Low	100.6	4597	45.69739	Low	低	0
29	Stage II A	0.321	Low	0.0	0	0	Low	低	0
30	Stage II A	0.258	Low	303.7	863	2.842991	Low	低	0
31	Stage II A	0.683	Low	52.4	509	9.721846	Low	低	0
32	Stage I	0.244	Low	159.3	265	1.662478	Low	低	0
33	Stage II A	0.429	Low	179.3	4062	22.64937	Low	低	0
34	Stage I	0.767	Low	54.6	2016	36.89663	Low	低	0
35	Stage I	0.848	Low	0.0	188	∞	Low	低	0
36	Stage II A	0.765	Low	150.8	1532	10.16112	Low	低	0
37	Stage II A	0.068	Low	0.0	0	0	Low	低	0
38	Stage II A	0.117	Low	33.8	944	27.90448	Low	低	0
39	Stage II A	0.507	Low	0.0	0	0	Low	低	0
40	Stage II A	0.667	Low	209.3	0	0	Low	低	0
41	Stage I	0.000	Low	123.9	4333	34.96368	Low	低	0
42	Stage II A	0.550	Low	231.0	3060	13.24827	Low	低	0
43	Stage II A	0.491	Low	152.9	1286	8.413254	Low	低	0
44	Stage II A	1.590	Low	191.6	4251	22.18577	Low	低	0
45	Stage I	1.492	Low	15.8	0	0	Low	低	0
46	Stage I	0.291	Low	44.3	0	0	Low	低	0
47	Stage II A	1.128	Low	39.2	1398	35.6983	Low	低	0
48	Stage II A	0.809	Low	16.9	167	9.898566	Low	低	0
49	Stage I	1.081	Low	0.0	0	0	Low	低	0
50	Stage II A	0.440	Low	98.1	993	10.11741	Low	低	0
51	Stage I	0.697	Low	0.0	0	0	Low	低	0

【0072】

表1において、発現量や活性値が検出限界以下であった場合は0として取り扱った。また、CDK1比活性が0であり、CDK2比活性が0よりも高値であった場合は、比活性

の比が「無限大 (∞)」であるとし、比活性の比の閾値 4.6 に比べて「High」であると判定した。また、CDK1 比活性及び CDK2 比活性の両方が 0 であった場合は、比活性の比が「0」であるとし、比活性の比の閾値 4.6 に比べて「Low」であると判定した。なお、表 1 において患者 35 は、比活性の比が無限大となっているが、CDK1 比活性が 2.0 未満且つ CDK2 比活性が 5.0 未満であるため、上述の通り、比活性の比と閾値 4.6 との比較結果は、「Low」となった。

【0073】

再発リスク毎の再発率を下記表 2 に示す。表 2 において、「患者数」の列には、各再発リスクの患者の総数が示されており、「再発者数」の列には、各再発リスクの患者のうち悪性腫瘍の再発が確認された患者数を示す。再発リスク高と判定された患者 5 名（患者 1 ～ 5）は何れも、ホルモン治療を行ったにも関わらず術後 5 年間で再発を起こした（再発率 100%）。再発リスク中と判定された患者 11 名（患者 6 ～ 16）のうち術後 5 年間で再発を起こしたのは 2 名であった（再発率 18%）。再発リスク低と判定された患者 35 名（患者 17 ～ 51）は何れも術後 5 年間では再発を起こさなかった（再発率 0%）。

10

【0074】

【表 2】

再発リスク	患者数	再発者数	再発率 (%)
低	35	0	0
中	11	2	18
高	5	5	100
全体	51	7	14

20

30

【0075】

以上の結果より、本実施例の方法によって「再発リスク高」と判定された場合は、ホルモン治療を行っても悪性腫瘍が再発する可能性が非常に高い、と予想することができる。また、「再発リスク低」と判定された場合は、ホルモン治療を行うと悪性腫瘍が再発する可能性が非常に低くなる、と予想することができる。また、「再発リスク中」と判定された患者に対してホルモン治療を行った場合の再発率 18% は、一般的な早期乳がんの再発率（10～20%）とほぼ等しい。

【0076】

特に、本実施例の方法によると、CDK 比活性の比と閾値との比較結果が「High」である患者を、サイクリンの発現量と閾値との比較結果を用いて「再発リスク高」及び「再発リスク中」の何れかに細分類することができ、再発予測の精度を向上することができる。

40

【0077】

（実施例 2）

（1）測定用試料の調製

乳がんステージ分類においてステージ I 又はステージ IIA に分類される乳がん患者 76 名（患者 1 ～ 76）から摘出した腫瘍細胞塊 76 検体を用いて、実施例 1 の測定用試料の調製と同様の手順で測定用試料 1 ～ 76 を調製した（なお、各患者のステージ分類は下

50

記表 3 及び表 4 に示される)。

【0078】

(2) サイクリン B 1 発現量の測定

サイクリン B 1 の発現量の測定は、一次抗体としてウサギ抗 C D K 1 抗体ではなく、サイクリン B 1 に特異的に結合するウサギ抗サイクリン B 1 抗体 (サンタクルズ社) を用いること以外は実施例 1 の C D K 1 の発現量測定と同様の実験手順で行なった。

【0079】

(3) C D K 1 及び C D K 2 発現量の測定

C D K 1 及び C D K 2 発現量の測定は、実施例 1 の C D K 1 及び C D K 2 の発現量測定と同様の実験手順で行なった。

10

【0080】

(4) C D K 1 及び C D K 2 の活性測定

C D K 1 及び C D K 2 の活性の測定は、実施例 1 の C D K 1 及び C D K 2 の活性測定と同様の実験手順で行なった。

【0081】

(5) C D K 比活性の算出

C D K 1 比活性、C D K 2 比活性及び C D K 1 比活性と C D K 2 比活性との比 (比活性の比) は、実施例 1 の C D K 比活性の算出で用いた式と同じ式を用いて算出した。

C D K 1 比活性、C D K 2 比活性及び比活性の比は、下記表 3 及び表 4 に示される。

【0082】

20

(6) 閾値の設定及び再発リスク判定

サイクリン B 1 発現量に対応する閾値と、比活性の比に対応する閾値とを設定した。サイクリン B 1 発現量と閾値との比較結果と、比活性の比と閾値との比較結果とを組み合わせ悪性腫瘍の性質の判定を行なった。

【0083】

比活性の比の閾値は、46 に設定した。この値は、乳がん患者 129 名から採取した腫瘍細胞 129 検体の比活性の比を算出し、比活性の比の値を小さい方から順に並べた際に、129 検体を 65 : 64 に分離できる値である。比活性の比の値が 46 以上の場合に「H i g h」とし、46 未満の場合に「L o w」とした。また、C D K 1 比活性が 20 未満且つ C D K 2 比活性が 500 未満の場合は比活性の比の値に関わらず「L o w」とした。さらに、C D K 2 比活性が 10000 以上の場合は比活性の比の値に関わらず「H i g h」とした。この比較結果は、下記表 3 及び表 4 に示される。

30

【0084】

サイクリン B 1 発現量の閾値は、0.0195 に設定した。この値は、患者 1 ~ 76 の再発の有無と、比活性の比と対応する閾値との比較結果を考慮に入れて設定された値である。サイクリン B 1 発現量が 0.0195 以上の場合は「H i g h」とし、0.0195 未満の場合は「L o w」とした。この比較結果は、下記表 3 及び表 4 に示される。

【0085】

これらの比較結果を用い、下記判定条件に基づいて再発リスク判定を行なった。

比活性の比と閾値との比較結果が「L o w」であり、サイクリン B 1 発現量と閾値との比較結果が「L o w」であった場合は、「再発リスク低」と判定した。

40

比活性の比と閾値との比較結果が「H i g h」であり、サイクリン B 1 発現量と閾値との比較結果が「L o w」であった場合は、「再発リスク中」と判定した。また、比活性の比と閾値との比較結果が「L o w」であり、サイクリン B 1 発現量と閾値との比較結果が「H i g h」であった場合も、「再発リスク中」と判定した。

比活性の比と閾値との比較結果が「H i g h」であり、サイクリン B 1 発現量と閾値との比較結果が「H i g h」であった場合は、「再発リスク高」と判定した。

【0086】

再発リスク判定において、「再発リスク低」と判定された腫瘍細胞は、細胞の増殖能が低く、生存能や移動能なども低いと考えられるため、再発の可能性は低いと解される。「

50

再発リスク中」と判定された腫瘍細胞は、「再発リスク低」と判定された腫瘍細胞よりも再発のリスクが高いと解される。「再発リスク高」と判定された腫瘍細胞は、「再発リスク中」と判定された腫瘍細胞よりも再発のリスクが高いと解される。

【0087】

再発リスクの判定結果及び再発の有無を下記表3及び表4に示す。表中「再発」の列において、0は「再発無し」を示し、1は「再発有り」を示す。なお、再発の有無は、腫瘍細胞塊を摘出した後に治療を施さなかったもしくはホルモン治療を施した患者1～76について、摘出手術後5年間で再発が認められたか否かを示したものである。

【0088】

【表3】

患者	ステージ分類	サイクリンB1 発現量	サイクリンB1 閾値との比較	CDK1 比活性	CDK2 比活性	比活性の比	比活性の比 閾値との比較	再発 リスク	再発
1	Stage I	0.04541	High	176.50359	10179.57242	57.67346	High	高	1
2	Stage II A	0.04107	High	46.85581	2533.97281	54.08023	High	高	1
3	Stage II A	0.03589	High	0	841.38124	∞	High	高	0
4	Stage II A	0.03502	High	0	2133.95337	∞	High	高	1
5	Stage II A	0.03322	High	31.41812	5108.06498	162.58340	High	高	0
6	Stage I	0.03023	High	24.83021	5312.57824	213.95621	High	高	0
7	Stage II A	0.02793	High	1.38070	870.11784	630.19848	High	高	0
8	Stage II A	0.02689	High	108.28745	5689.17972	52.53776	High	高	1
9	Stage II A	0.02671	High	155.80197	∞	∞	High	高	1
10	Stage I	0.02586	High	1214.46645	19522.99602	16.07537	High	高	1
11	Stage II A	0.02218	High	25.80227	3835.96673	148.66781	High	高	1
12	Stage II A	0.02157	High	19.41183	2008.40442	103.46291	High	高	0
13	Stage II A	0.02098	High	169.00953	∞	∞	High	高	1
14	Stage I	0.02028	High	16.02857	2465.61777	153.82644	High	高	0
15	Stage II A	0.01985	High	0	1869.29070	∞	High	高	1
16	Stage I	0.01928	Low	16.59366	3065.34083	184.72969	High	中	0
17	Stage II A	0.01770	Low	0	4148.04356	∞	High	中	0
18	Stage II A	0.01492	Low	0	1091.10461	∞	High	中	0
19	Stage II A	0.01481	Low	32.09491	1718.93943	53.55800	High	中	0
20	Stage II A	0.01372	Low	16.30544	1676.02894	102.78957	High	中	0
21	Stage II A	0.01352	Low	0	1298.86187	∞	High	中	0
22	Stage II A	0.00821	Low	0	∞	∞	High	中	1
23	Stage II A	0.13871	High	98.14011	992.92383	10.11741	Low	中	0
24	Stage I	0.06268	High	114.42248	0	0	Low	中	0
25	Stage II A	0.05743	High	57.87807	0	0	Low	中	0
26	Stage I	0.05531	High	0	0	0	Low	中	0
27	Stage I	0.05517	High	0	0	0	Low	中	0
28	Stage II A	0.04794	High	421.96126	8581.66038	20.33755	Low	中	0
29	Stage II A	0.04376	High	85.91934	732.34735	8.52366	Low	中	0
30	Stage I	0.03870	High	0	0	0	Low	中	0
31	Stage II A	0.03544	High	190.13758	3775.30139	19.85563	Low	中	0
32	Stage II A	0.03492	High	0	0	0	Low	中	0
33	Stage I	0.03128	High	123.93678	4333.28586	34.96368	Low	中	0
34	Stage II A	0.02883	High	52.38498	509.27877	9.72185	Low	中	0
35	Stage II A	0.02631	High	33.83529	944.15610	27.90448	Low	中	0
36	Stage II A	0.02565	High	87.63474	2408.65926	27.48521	Low	中	0
37	Stage II A	0.02483	High	152.90897	1286.44512	8.41325	Low	中	0
38	Stage I	0.02371	High	51.42980	1234.42935	24.00222	Low	中	0

【0089】

10

20

30

40

【表 4】

患者	ステージ 分類	サイクリンB1 発現量	サイクリンB1 閾値との比較	CDK1 比活性	CDK2 比活性	比活性の比	比活性の比 閾値との比較	再発 リスク	再発
39	Stage II A	0.02180	High	176.71590	6192.48701	35.04205	Low	中	0
40	Stage I	0.02155	High	20.52354	904.71593	44.08187	Low	中	0
41	Stage I	0.02141	High	13.94306	601.71022	43.15483	Low	中	0
42	Stage II A	0.02044	High	39.15167	1397.64821	35.69830	Low	中	0
43	Stage I	0.02037	High	15.79414	0	0	Low	中	0
44	Stage II A	0.01953	High	18.61619	0	0	Low	中	1
45	Stage II A	0.01946	Low	230.98749	3060.18486	13.24827	Low	低	0
46	Stage I	0.01935	Low	25.65663	0	0	Low	低	0
47	Stage II A	0.01925	Low	0	0	0	Low	低	0
48	Stage I	0.01912	Low	35.40095	869.14539	24.55147	Low	低	0
49	Stage II A	0.01840	Low	191.67842	445.62122	2.32484	Low	低	0
50	Stage I	0.01782	Low	0	0	0	Low	低	0
51	Stage II A	0.01739	Low	37.85326	662.64792	17.50570	Low	低	0
52	Stage II A	0.01735	Low	191.61616	4251.15167	22.18577	Low	低	0
53	Stage II A	0.01734	Low	296.19120	4629.12075	15.62883	Low	低	0
54	Stage I	0.01682	Low	0	0	0	Low	低	0
55	Stage I	0.01677	Low	26.98432	902.53753	33.44674	Low	低	0
56	Stage I	0.01615	Low	0	0	0	Low	低	0
57	Stage I	0.01615	Low	54.63500	2015.84718	36.89663	Low	低	0
58	Stage I	0.01497	Low	0	187.69165	∞	Low	低	0
59	Stage I	0.01478	Low	0	0	0	Low	低	0
60	Stage II A	0.01469	Low	150.77813	1532.07394	10.16112	Low	低	0
61	Stage I	0.01440	Low	159.30846	264.84676	1.66248	Low	低	0
62	Stage II A	0.01412	Low	285.45529	4604.22420	16.12941	Low	低	0
63	Stage I	0.01399	Low	216.20425	6239.16828	28.85775	Low	低	0
64	Stage II A	0.01397	Low	0	0	0	Low	低	0
65	Stage II A	0.01332	Low	179.32800	4061.66649	22.64937	Low	低	0
66	Stage II A	0.01285	Low	16.86012	166.89101	9.89857	Low	低	0
67	Stage II A	0.01185	Low	0	0	0	Low	低	0
68	Stage II A	0.01184	Low	252.21810	0	0	Low	低	0
69	Stage II A	0.01179	Low	0	0	0	Low	低	0
70	Stage II A	0.01168	Low	303.65537	863.28933	2.84299	Low	低	0
71	Stage II A	0.01143	Low	0	0	0	Low	低	0
72	Stage II A	0.01071	Low	0	0	0	Low	低	0
73	Stage I	0.00829	Low	68.96305	1332.02803	19.31510	Low	低	0
74	Stage II A	0.00716	Low	188.47428	0	0	Low	低	0
75	Stage II A	0.00631	Low	100.59602	4596.97529	45.69739	Low	低	0
76	Stage I	0.00629	Low	116.35529	2789.75360	23.97616	Low	低	0

10

20

30

【0090】

表3及び表4において、発現量や活性値が検出限界以下であった場合は0として取り扱った。また、CDK1比活性が0であり、CDK2比活性が0よりも高値であった場合は、比活性の比が「無限大(∞)」であるとし、比活性の比の閾値46に比べて「High」であると判定した。また、CDK1比活性及びCDK2比活性の両方が0であった場合は、比活性の比が「0」であるとし、比活性の比の閾値46に比べて「Low」であると判定した。なお、表4において患者58は、比活性の比が無限大となっているが、CDK1比活性が20未満且つCDK2比活性が500未満であるため、上述の通り、比活性の比と閾値46との比較結果は、「Low」となった。

40

【0091】

再発リスク毎の再発率を下記表5に示す。表5において、「患者数」の列には、各再発リスクの患者の総数が示されており、「再発者数」の列には、各再発リスクの患者のうち悪性腫瘍の再発が確認された患者数を示す。再発リスク高と判定された患者15名(患者1～15)は何れも、ホルモン治療を行ったにも関わらず15人中9人が術後5年間で再発を起こした(再発率60%)。なお、「再発リスク高」と判定された患者に対してホル

50

モン治療を行った場合の再発率60%は、ステージ分類でステージIIIに分類される乳がんの再発率と同等である。「再発リスク中」と判定された患者29名（患者16～44）のうち術後5年間で再発を起こしたのは二名であった（再発率6.9%）。なお、この二名のうち、患者22は比活性の比と閾値との比較結果では「Low」に分類され、患者44はサイクリンB1発現量と閾値との比較結果では「Low」に分類される。「再発リスク低」と判定された患者32名（患者45～76）は何れも術後5年間では再発を起こさなかった（再発率0%）。

【0092】

【表5】

再発リスク	患者数	再発者数	再発率(%)
低	32	0	0.0
中	29	2	6.9
高	15	9	60.0
全体	76	11	14.5

10

20

【0093】

以上の結果より、本実施例の方法によって「再発リスク高」と判定された場合は、ホルモン治療を行っても悪性腫瘍が再発する可能性が高い、と予想することができる。また、「再発リスク低」と判定された場合は、ホルモン治療を行うと悪性腫瘍が再発する可能性が非常に低くなる、と予想することができる。

【0094】

特に、本実施例の方法によると、CDK比活性の比と閾値との比較結果とサイクリンの発現量と閾値との比較結果とを組み合わせることにより、個々の比較結果では「Low」と分類されてしまう患者の中から再発する可能性のある患者を「再発リスク中」として分類することができ、再発予測の精度を向上することができる。

30

【0095】

上述したような再発リスクの予測結果は、悪性腫瘍患者の治療方針を決定する際の指標として有用である。例えば、再発リスク高と判定された場合はよりアグレッシブな治療法（例えば、化学療法など）を選択することができる。また、再発リスク中と判定された場合は、その患者に応じて、他の様々な要因（例えば、年齢、核異型度、腫瘍径など）を複合的に鑑みて治療方法を選択することができる。また、再発リスク低と判定された場合は、副作用が強く経済的負担の重い化学療法ではなく、ホルモン治療によって再発を抑制できる可能性が高いことがわかる。

40

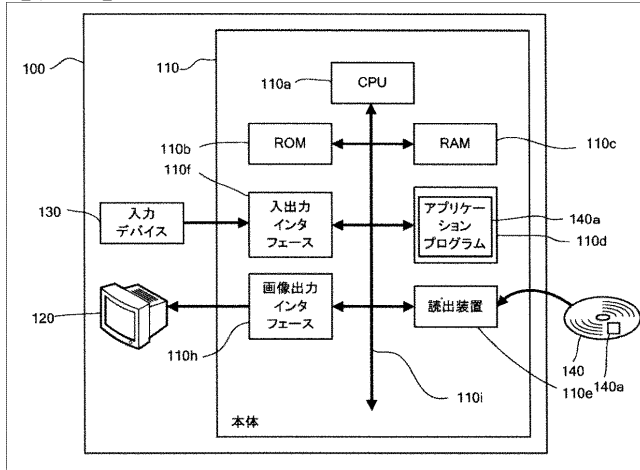
【図面の簡単な説明】

【0096】

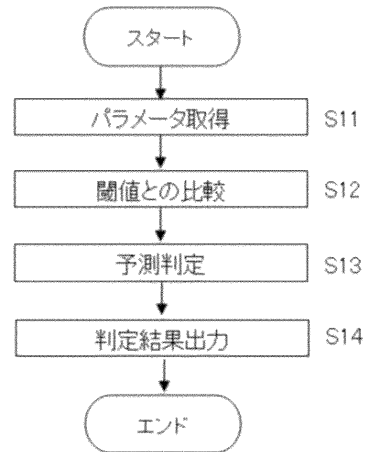
【図1】本実施形態の方法を実施するためのコンピュータシステムの概略図である。

【図2】第一の判定方法に基づいた判定フローである。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

- (72)発明者 松嶋 朋子
神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- (72)発明者 片山 あや
神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- (72)発明者 川崎 由子
神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ02 QQ27 QR48 QS16 QS33 QX02