



- (51) 国際特許分類:
C12M 1/34 (2006.01) C12Q 1/6897 (2018.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/042047
- (22) 国際出願日: 2019年10月25日(25.10.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 株式会社 東芝(KABUSHIKI KAISHA TOSHIBA) [JP/JP]; 〒1050023 東京都港区芝浦一丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 川田 滋久(KAWATA, Shigehisa); 東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内 Tokyo (JP). 石原 美津子(ISHIHARA,

Mitsuko); 東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内 Tokyo (JP). 猿渡 さえ子(SARUWATARI, Saeko); 東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内 Tokyo (JP).

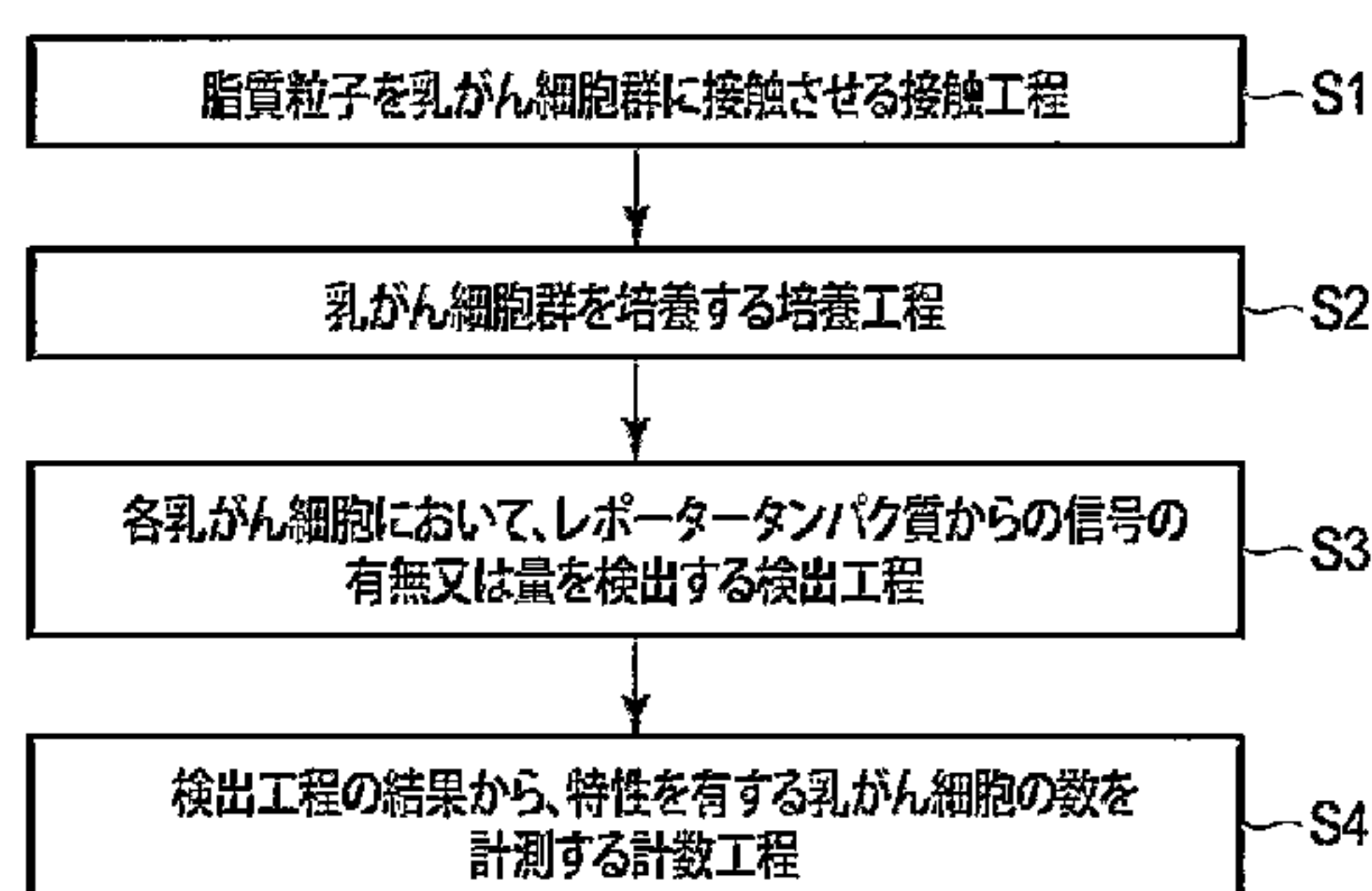
(74) 代理人: 特許業務法人スズエ国際特許事務所(S & S INTERNATIONAL PPC); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目12番9号 スズエ・アンド・スズエビル Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,

(54) Title: METHOD, KIT, AND PROGRAM FOR DETERMINING CHARACTERISTIC OF TUMOR CELL GROUP

(54) 発明の名称: 腫瘍細胞群の特性を決定する方法、キット及びプログラム

[図1]



- S1... CONTACT STEP FOR BRINGING LIPID PARTICLES INTO CONTACT WITH BREAST CANCER CELL GROUP
- S2... CULTURE STEP FOR CULTURING BREAST CANCER CELL GROUP
- S3... DETECTION STEP FOR DETECTING PRESENCE OR AMOUNT OF SIGNAL FROM REPORTER PROTEIN IN BREAST CANCER CELLS
- S4... COUNTING STEP FOR COUNTING THE NUMBER OF BREAST CANCER CELLS THAT HAVE THE CHARACTERISTIC FROM THE RESULT OF THE DETECTION STEP

(57) Abstract: A method according to an embodiment of the present invention is a method for determining a characteristic of a cancer cell. This method includes a contacting step for bringing lipid particles which include a lipid membrane and a first nucleic acid included in the lipid membrane into contact with a tumor cell group (the first nucleic acid having a promoter sequence of a marker gene for determining a characteristic, and a reporter gene which is connected so as to be able to function downstream from the promoter sequence), a culture step for culturing the tumor cell group, a detection step for detecting the presence or amount of a signal from a reporter protein expressed from the reporter gene in tumor cells included in the tumor cell group, and a counting step for counting the number of tumor cells that have the characteristic from the result of the detection step.

(57) 要約: 実施形態に従う方法は、腫瘍細胞の特性を決定する方法である。本方法は、脂質膜と、脂質膜に内包された第1核酸とを含む脂質粒子を腫瘍細胞群に接触させる接触工程(第1核酸は、特性を決定するためのマーカー遺伝子のプロモーター配列と、プロモーター配列の下流に機能可能に連結されたレポーター遺伝子とを有する)、腫瘍細胞群を培養する培養工程、腫瘍細胞群に含まれる各腫瘍細胞において、レポーター遺伝子から発現するレポータータンパク質からの信号の有無又は量を検出する検出工程、及び検出工程の結果から、特性を有する腫瘍細胞の数を計測する計数工程を含む。

KN, KP, KR, KW, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

腫瘍細胞群の特性を決定する方法、キット及びプログラム

技術分野

[0001] 本発明の実施形態は、腫瘍細胞群の特性を決定する方法、キット及びプログラムに関する。

背景技術

[0002] 乳がんの患者数は年々増加している。医療費削減、並びに患者及び医療従事者の負担軽減のために、乳がんの薬剤感受性を正確に予測することが求められている。近年では、乳がんの薬剤感受性を予測するための種々のマーカーが発見されてきている。

[0003] 例えば、患者から採取された乳がん細胞におけるマーカー遺伝子の転写物（mRNA）量をPCR法やマイクロアレイ法で検出することにより、乳がんの薬剤感受性を予測することができる。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表2019-514930号公報

特許文献2：特表2012-523828号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の実施形態は、腫瘍細胞群の特性を正確に決定することができる方法、キット及びプログラム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

[0006] 実施形態に従う方法は、腫瘍細胞群の特性を決定する方法である。本方法は、脂質膜と、脂質膜に内包された第1核酸とを含む脂質粒子を腫瘍細胞群に接触させる接触工程（第1核酸は、特性を予測するためのマーカー遺伝子

のプロモーター配列と、プロモーター配列の下流に機能可能に連結されたレポーター遺伝子とを有する)、腫瘍細胞群を培養する培養工程、腫瘍細胞群に含まれる各腫瘍細胞において、レポーター遺伝子から発現するレポータータンパク質からの信号の有無又は量を検出する検出工程、及び検出工程の結果から、特性を有する腫瘍細胞の数を計測する計数工程を含む。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]図1は、第1実施形態の方法の一例を示すフローチャートである。

[図2]図2は、第1実施形態の脂質粒子の一例を示す断面図である。

[図3]図3は、第1実施形態の第1核酸の一例を示す模式図である。

[図4]図4は、第1実施形態の方法の一例を示すフローチャートである。

[図5]図5は、第1実施形態の方法における信号の得られる様式を示す模式図及びグラフである。

[図6]図6は、第2実施形態の方法の一例を示すフローチャートである。

[図7]図7は、第2実施形態の方法の一例を示すフローチャートである。

[図8]図8は、第3実施形態に用いる第1核酸の一例を示す模式図である。

[図9]図9は、第3実施形態に用いる第1核酸の一例を示す模式図である。

[図10]図10は、第3実施形態の方法の一例を示すフローチャートである。

[図11]図11は、第3実施形態の方法の一例を示すフローチャートである。

[図12]図12は、第4実施形態の方法の一例を示すフローチャートである。

[図13]図13は、第4実施形態の方法の一例を示すフローチャートである。

[図14]図14は、第5実施形態の細胞培養検出デバイスの使用時の様子の一例を示す斜視図である。

[図15]図15は、図14に示す光学センサをA-A'に沿って切断したときの断面の拡大図である。

[図16]図16は、第5実施形態の細胞特性決定システムの一例を示すブロック図である。

[図17]図17は、例1において用いたベクターを示す模式図である。

[図18]図18は、例1において用いたベクターを示す模式図である。

[図19]図19は、例3の実験結果を示すグラフである。

[図20]図20は、例3の実験結果を示すグラフである。

[図21]図21は、例4の実験結果を示す顕微鏡写真（J P E G形式）である。

[図22]図22は、例4の実験結果を示す顕微鏡写真（ビットマップ形式）である。

発明を実施するための形態

[0008] 以下に、図面を参照しながら種々の実施形態について説明する。各図は実施形態とその理解を促すための模式図であり、その形状や寸法、比などは実際と異なる箇所があるが、これらは以下の説明と公知の技術を参酌して適宜、設計変更することができる。

[0009] 実施形態に従う方法は、腫瘍細胞の特性を予測する方法である。本方法は、脂質膜と、脂質膜に内包された第1核酸とを含む脂質粒子を腫瘍細胞群に接触させる接触工程（第1核酸は、特性を予測するためのマーカー遺伝子のプロモーター配列と、プロモーター配列の下流に機能可能に連結されたレポーター遺伝子とを有する）、腫瘍細胞群を培養する培養工程、腫瘍細胞群に含まれる各腫瘍細胞において、レポーター遺伝子から発現するレポータータンパク質からの信号の有無又は量を検出する検出工程、及び検出工程の結果から、特性を有する腫瘍細胞の数を計測する計数工程を含む。

[0010] 以下、各実施の形態について説明する。

[0011] ・第1の実施形態

（乳がん細胞群の薬剤への感受性を決定する方法）

第1の実施形態に従う方法は、乳がん細胞群の薬剤への感受性を決定する方法である。

[0012] 実施形態に従う乳がんは、例えば、動物の乳腺に形成される悪性腫瘍（新生物）をいう。乳がんは、「乳癌」又は「乳腺腫瘍」等と一般に称されるもの、並びに、乳管がん及び小葉がんを含む。また、乳がんは、何れの病期のものも含み、例えば、がんが乳腺に留まった状態、更に周辺の組織までがん

が及んだ状態、更にリンパ節へのがんの転移がある状態、及び更に離れた臓器へのがんの転移がある状態等を含む。

[0013] 乳がん細胞群とは、好ましくは乳がん罹患した対象から採取された乳がん細胞群であり、複数の乳がん細胞を含む。乳がん細胞群は、例えば、乳がんの病変部の針による吸引（穿刺吸引、針生検若しくはマンモトーム生検等）又は外科的切除、或いは乳腺分泌液（乳汁）の採取等により得られた試料に含まれるものである。

[0014] 対象は、例えば哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

[0015] 乳がん細胞群は、採取後に適切に処理したものであってもよい。適切な処理とは、例えば、細切、分散、他の細胞群の除去又は乳がん細胞群の単離等である。或いは、乳がん細胞群は、採取又は前処理された乳がん細胞群を乳がんの特性を失わない方式で培養した培養細胞であってもよい。或いは、乳がん細胞群は、株化した乳がん細胞群等であってもよい。以下、「乳がん細胞群」を単に「細胞群」とも称する。また、「乳がん細胞」を単に「細胞」とも称する。

[0016] 細胞群の薬剤への感受性とは、細胞群が薬剤の治療効果を受けるか否か又は治療効果を受ける程度をいう。例えば、細胞群が特定の薬剤への感受性を有するとは、細胞群がその薬剤による治療効果を受けることをいい、例えば、その薬剤によって細胞群に含まれる細胞が減少するか又は消滅するか、或いは細胞の増殖が抑制されることを意味する。反対に、細胞群が特定の薬剤への感受性を有しないとは、細胞群がその薬剤に対して抵抗性（耐性）を有し、治療効果が無いか又は少ないことをいう。

[0017] 薬剤は、例えば乳がんの治療に一般的に用いられる抗腫瘍活性を有する薬剤から選択され得る。例えば、薬剤は、抗がん剤、ホルモン療法剤、分子標的薬又は免疫賦活剤等の何れかから選択される。抗がん剤は、例えば、アントラサイクリン系薬剤、微小管作用薬、アルキル化薬、代謝拮抗薬又は白金錯体等を含み、ホルモン療法剤は、例えば、アロマターゼ阻害剤、LH-RHアゴニスト製剤、抗エストロゲン薬又は黄体ホルモン薬等を含む。しかし

ながら、薬剤は、上記のものに限定されるものではない。

[0018] 例えば、実施形態に係る方法においては、乳がん細胞群における感受性が調査される薬剤が上記の何れかから１種選択される。或いは、第３実施形態で説明するように複数種の薬剤が選択されてもよい。以下、１つの薬剤について調査する例を示す。

[0019] 実施形態に係る乳がん細胞の薬剤への感受性を決定する方法は、例えば、図１に示す次の工程を含む。

[0020] (Ｓ１) 脂質膜と、脂質膜に内包された第１核酸とを含む脂質粒子を乳がん細胞群に接触させる接触工程（第１核酸は、乳がん細胞の薬剤への感受性を決定するためのマーカー遺伝子のプロモーター配列と、プロモーター配列の下流に機能可能に連結されたレポーター遺伝子とを有する）、

(Ｓ２) 乳がん細胞群を培養する培養工程、

(Ｓ３) 乳がん細胞群に含まれる各乳がん細胞において、レポーター遺伝子から発現するレポータータンパク質からの信号の有無又は量を検出する検出工程、及び

(Ｓ４) 検出工程の結果から、薬剤感受性を有する腫瘍細胞の数を計測する計数工程。

[0021] まず、接触工程Ｓ１で用いる脂質粒子について説明する。図２に示すように、脂質粒子１は、例えば脂質膜２と脂質膜２の内腔２aに内包された第１核酸３とを備える。第１核酸３は、例えば核酸凝縮ペプチド４により凝縮されて脂質膜２に内包されている。詳しくは後述するが、第１核酸３を乳がん細胞内に導入するためのキャリアとして用いられる。

[0022] 脂質膜２は、複数の脂質分子２bが非共有結合で配列してできた略球状の中空体である。脂質膜２は、脂質単分子膜であってもよいし、脂質二重膜であってもよい。また、脂質膜２は、一層の膜からなっているてもよいし、多重層の膜からなっているてもよい。

[0023] 脂質膜２の材料となる脂質は、例えば、生体膜の主成分である脂質（以下、「ベース脂質」と称する）を含む。ベース脂質は、リン脂質又はスフィン

ゴ脂質、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、ケファリン又はセレブロシド、或いはこれらの組み合わせ等である。

[0024] 例えば、ベース脂質として、

1, 2-ジオレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、

1, 2-ステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DSE)、

1, 2-ジパルミトイル-*s n*-グリセロ-3-ホスファチジルコリン (DPPC)、

1-パルミトイル-2-オレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスファチジルコリン (POPC)、

1, 2-ジ-*O*-オクタデシル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DOTMA)、

1, 2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン (DODAP)、

1, 2-ジミリストイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン (14:0 DAP)、

1, 2-ジパルミトイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン (16:0 DAP)、

1, 2-ジステアロイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン (18:0 DAP)、

N-(4-カルボキシベンジル)-*N*, *N*-ジメチル-2, 3-ビス(オレオイロキシ)プロパン (DOBAQ)、

1, 2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DOTAP)、

1, 2-ジオレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホクロリン (DOPC)

、

1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホクロリン (DLPC)
)、

1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン (DOPS)、又は

コレステロール、

或いはこれらの何れかの組み合わせ等を用いることが好ましい。

[0025] 脂質膜2はベース脂質の他に、以下に説明する第1の脂質化合物、第2の脂質化合物、又はその両方を更に含むことが好ましい。

[0026] 第1の脂質化合物は、 $Q-CHR_2$ の式で表すことができる。

[0027] (式中、

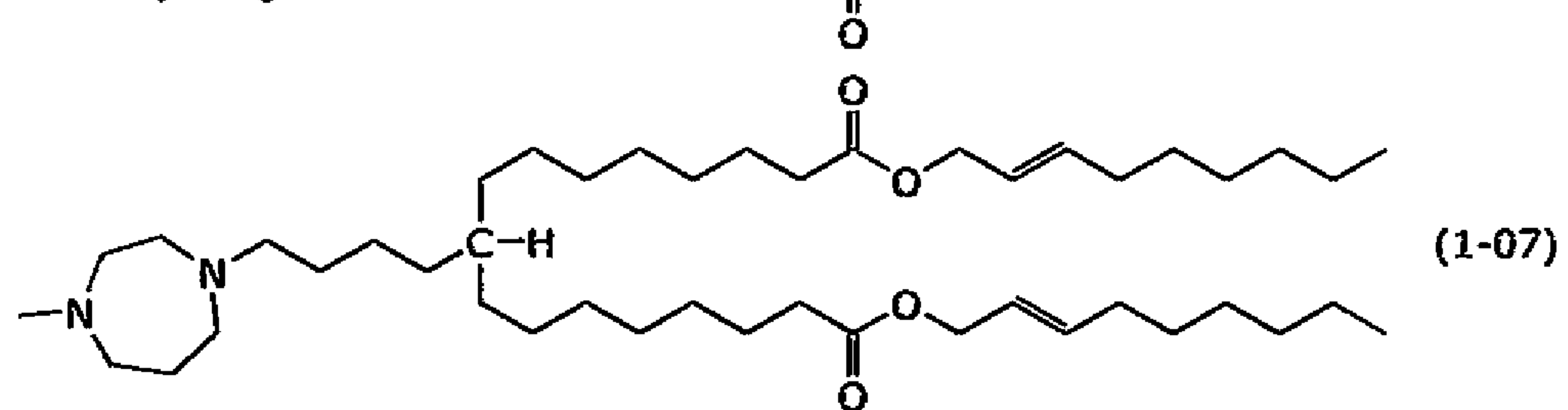
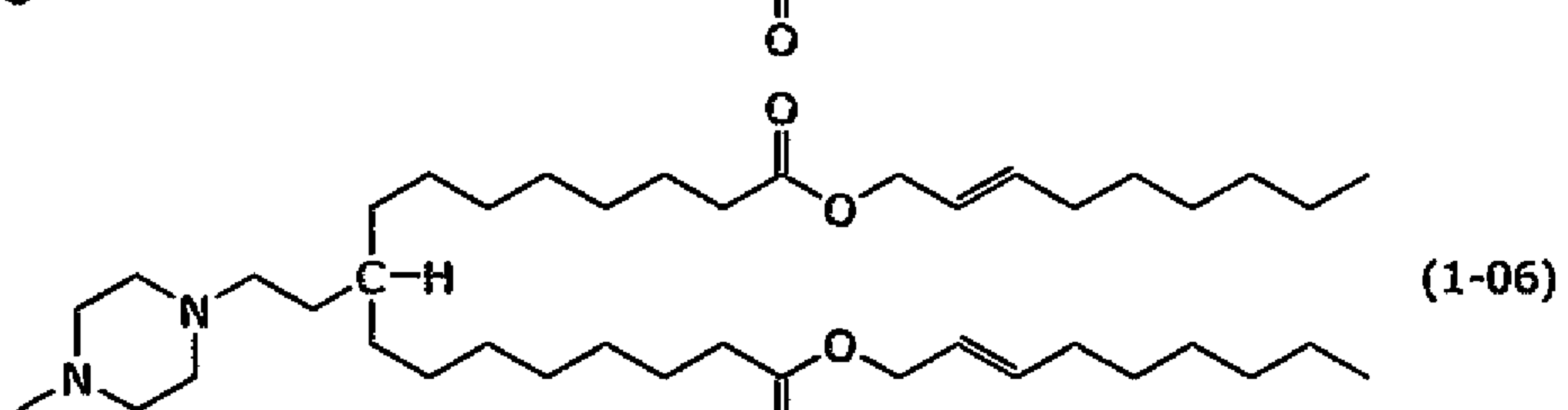
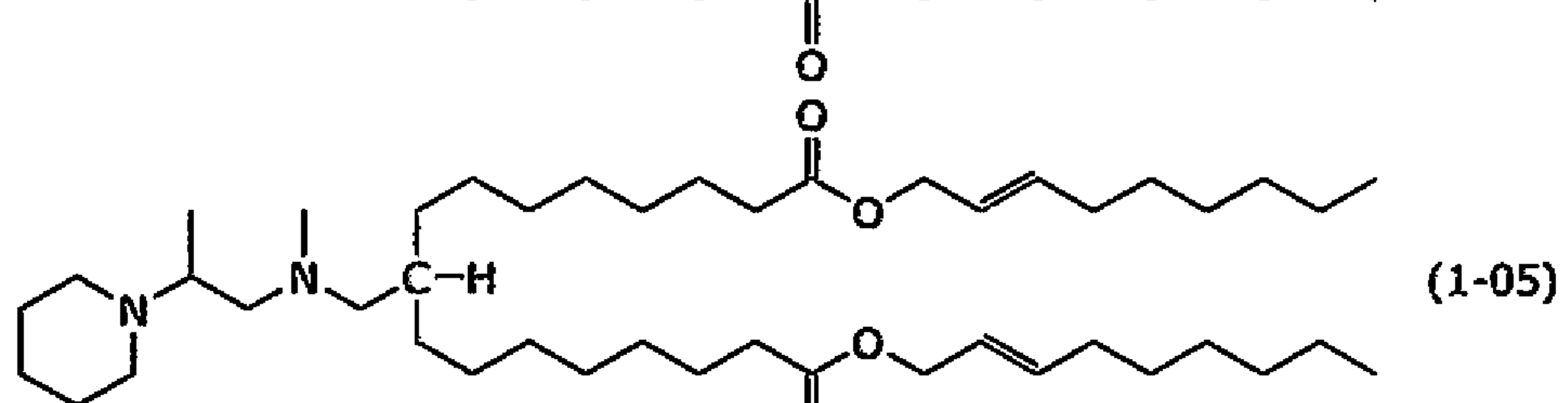
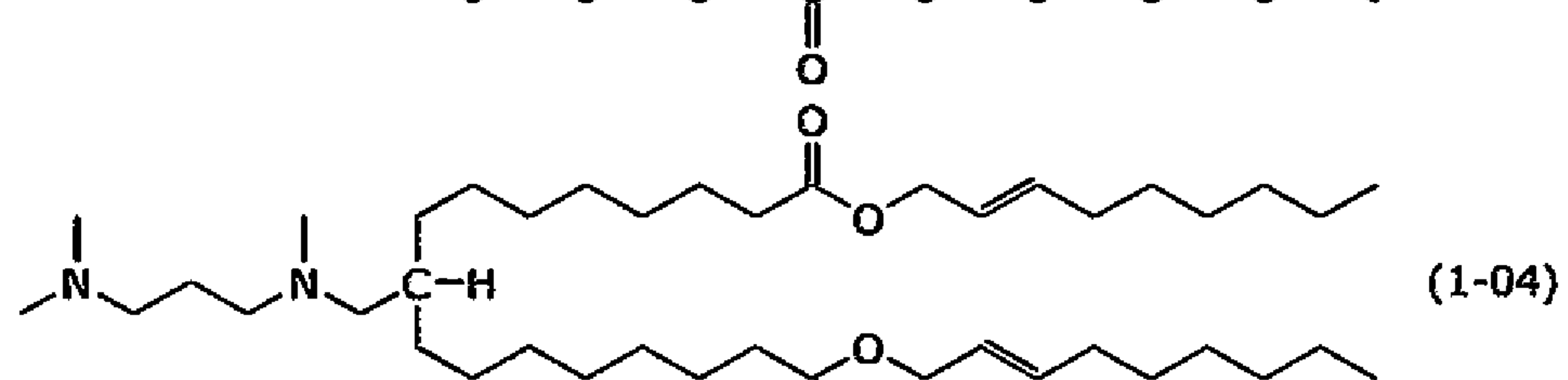
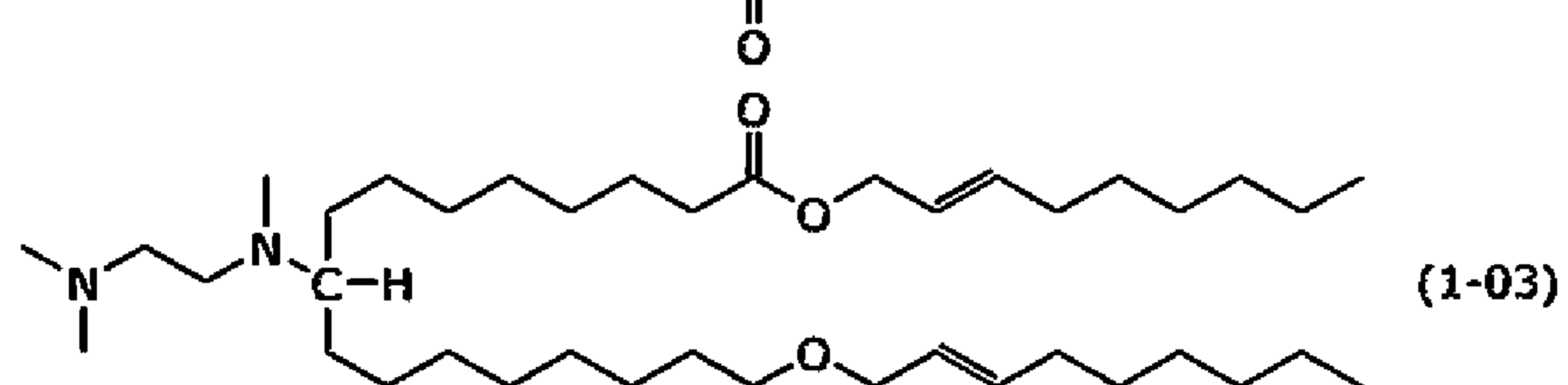
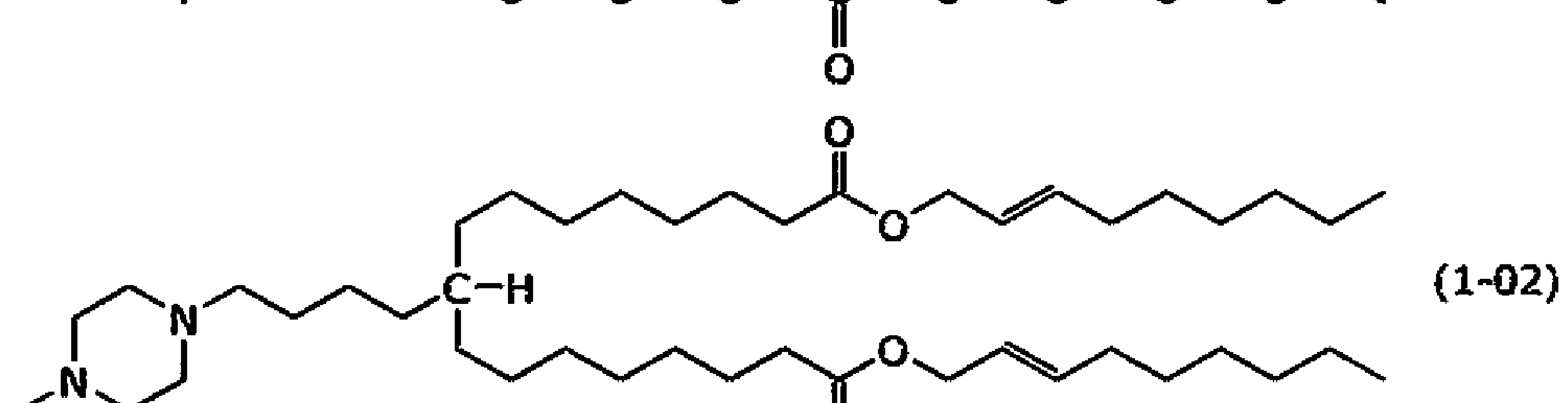
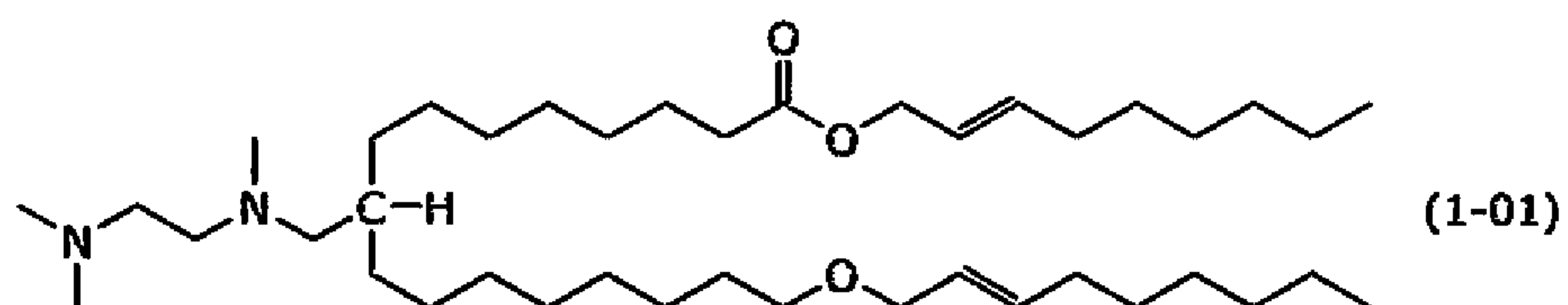
Qは、3級窒素を2つ以上含み、酸素を含まない含窒素脂肪族基であり、

Rは、それぞれ独立に、 $C_{12} \sim C_{24}$ の脂肪族基であり、

少なくとも一つのRは、その主鎖中又は側鎖中に、 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-O-C(=O)-O-$ 、 $-S-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-S-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、及び $-NHC(=O)-$ からなる群から選択される連結基LRを含む)。

[0028] 第1の脂質化合物として、例えば、下記式で表される構造を有する脂質を用いれば、核酸の導入効率がより優れているため好ましい。

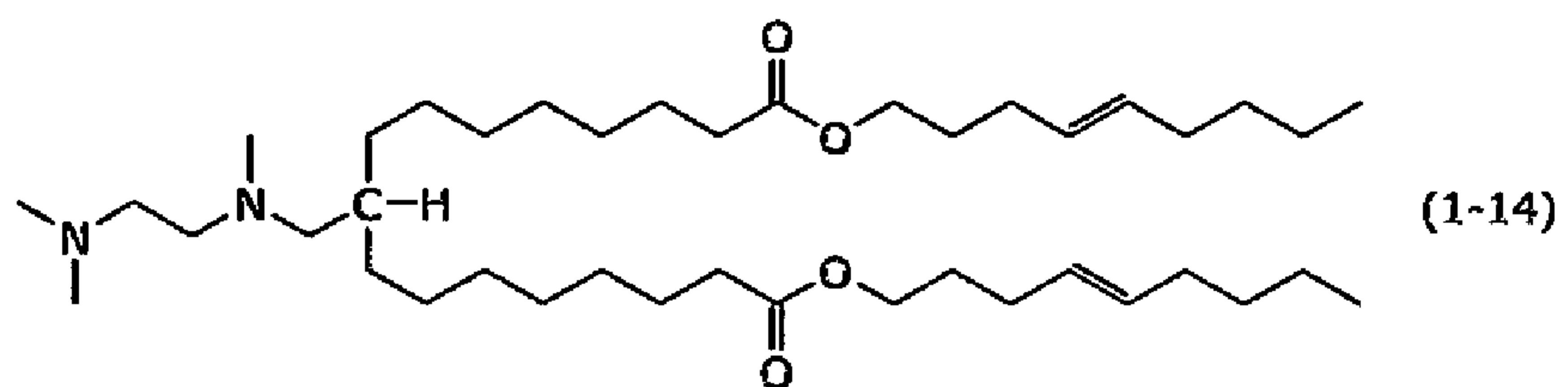
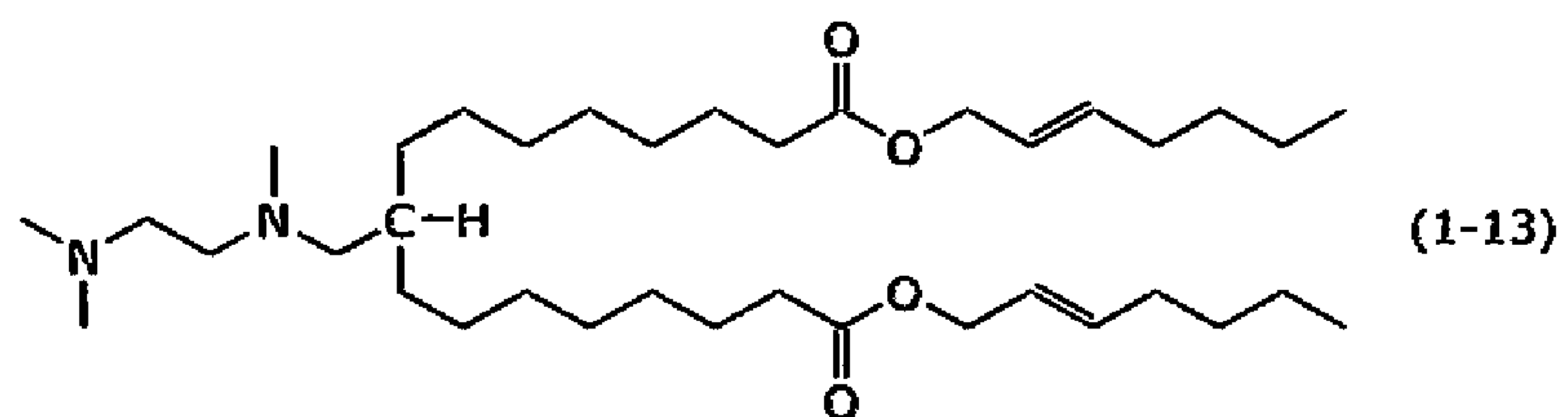
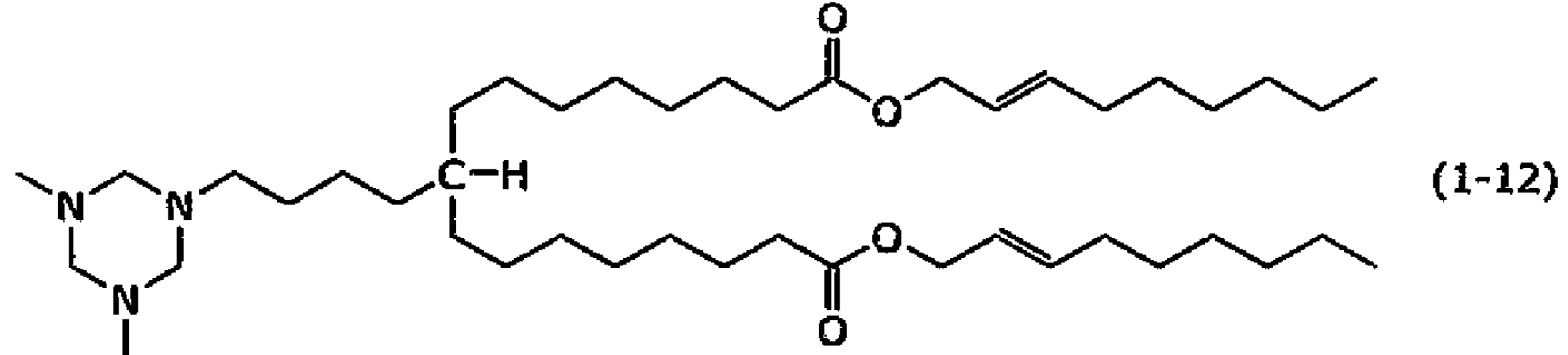
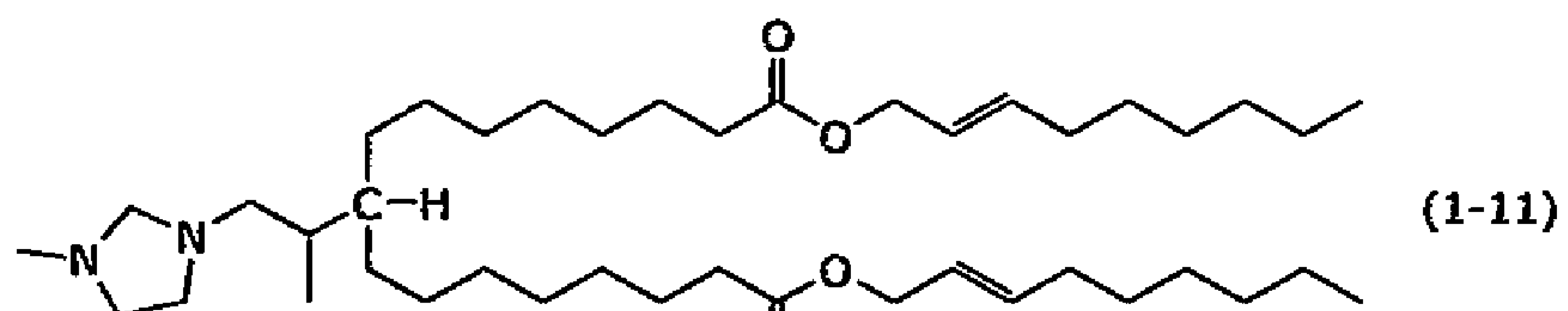
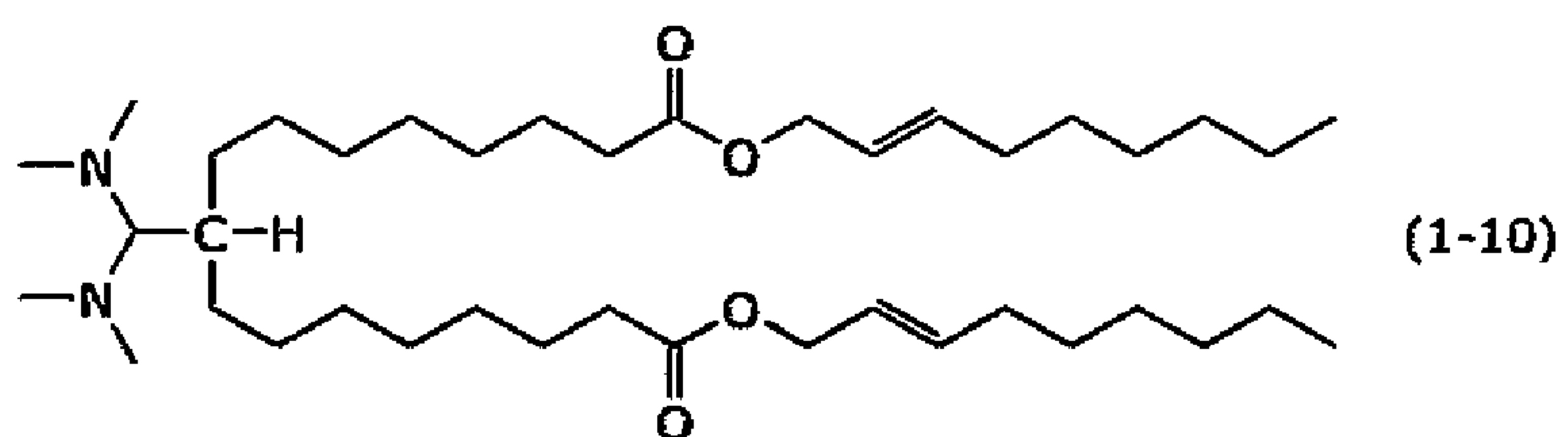
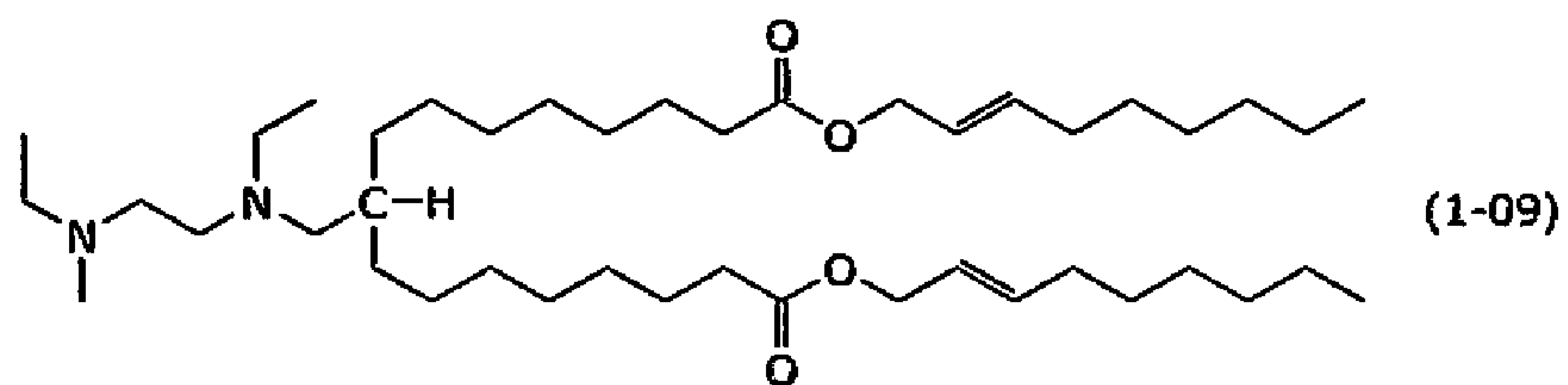
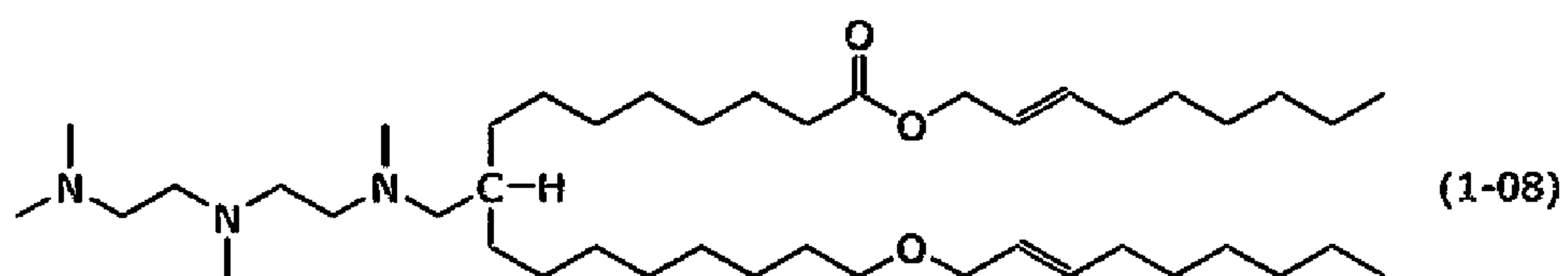
[化1-1]



(つづく)

[化1-2]

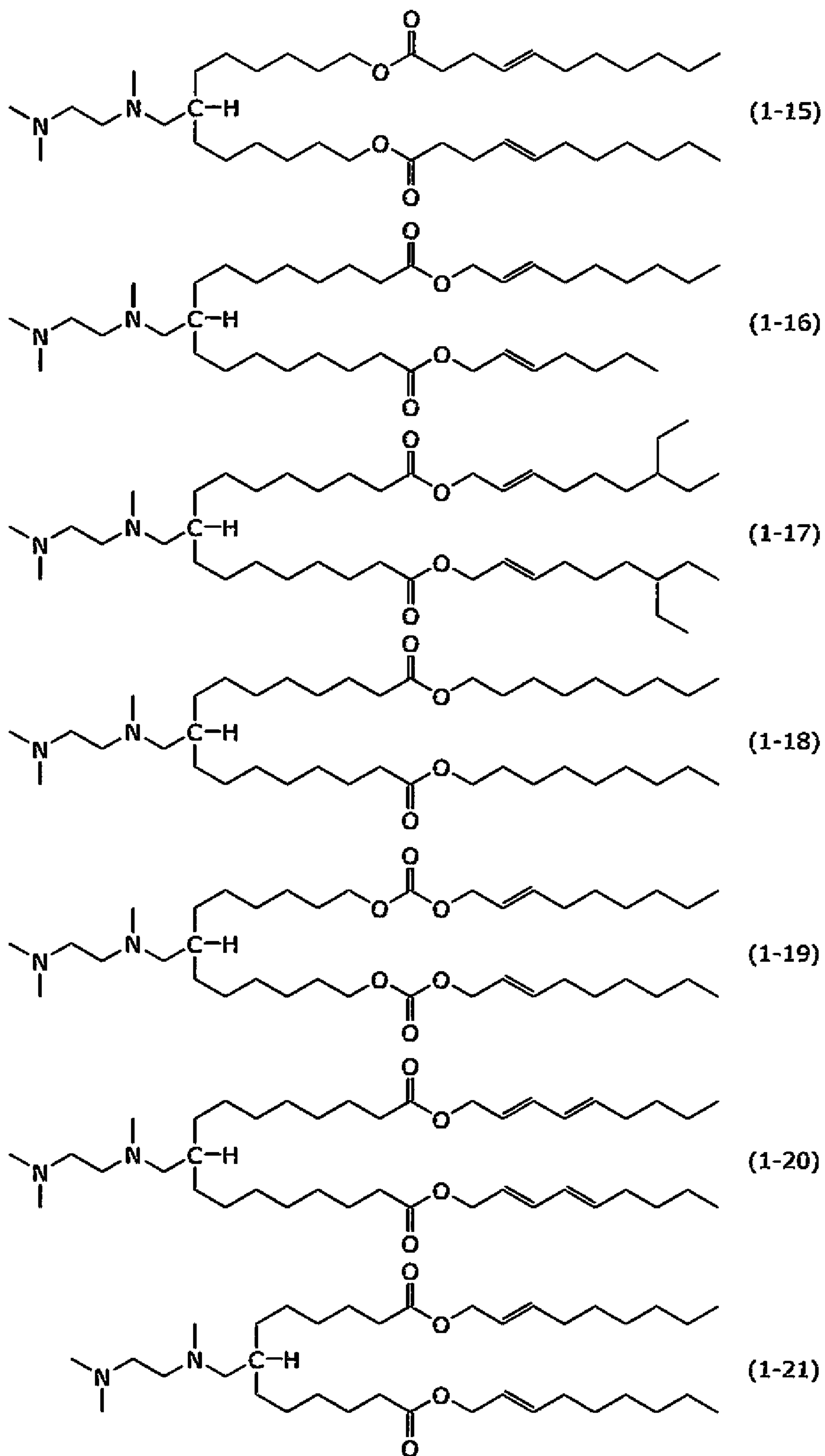
(つづき)



(つづく)

[化1-3]

(つづき)



[0029] 第2の脂質化合物は、 $P - [X - W - Y - W' - Z]_2$ の式で表すことがで

きる。

[0030] (式中、

Pは、1つ以上のエーテル結合を主鎖に含むアルキレンオキシであり、

Xは、それぞれ独立に、三級アミン構造を含む2価連結基であり、

Wは、それぞれ独立に、 $C_1 \sim C_6$ アルキレンであり、

Yは、それぞれ独立に、単結合、エーテル結合、カルボン酸エステル結合、チオカルボン酸エステル結合、チオエステル結合、アミド結合、カルバメート結合及び尿素結合からなる群から選ばれる2価連結基であり、

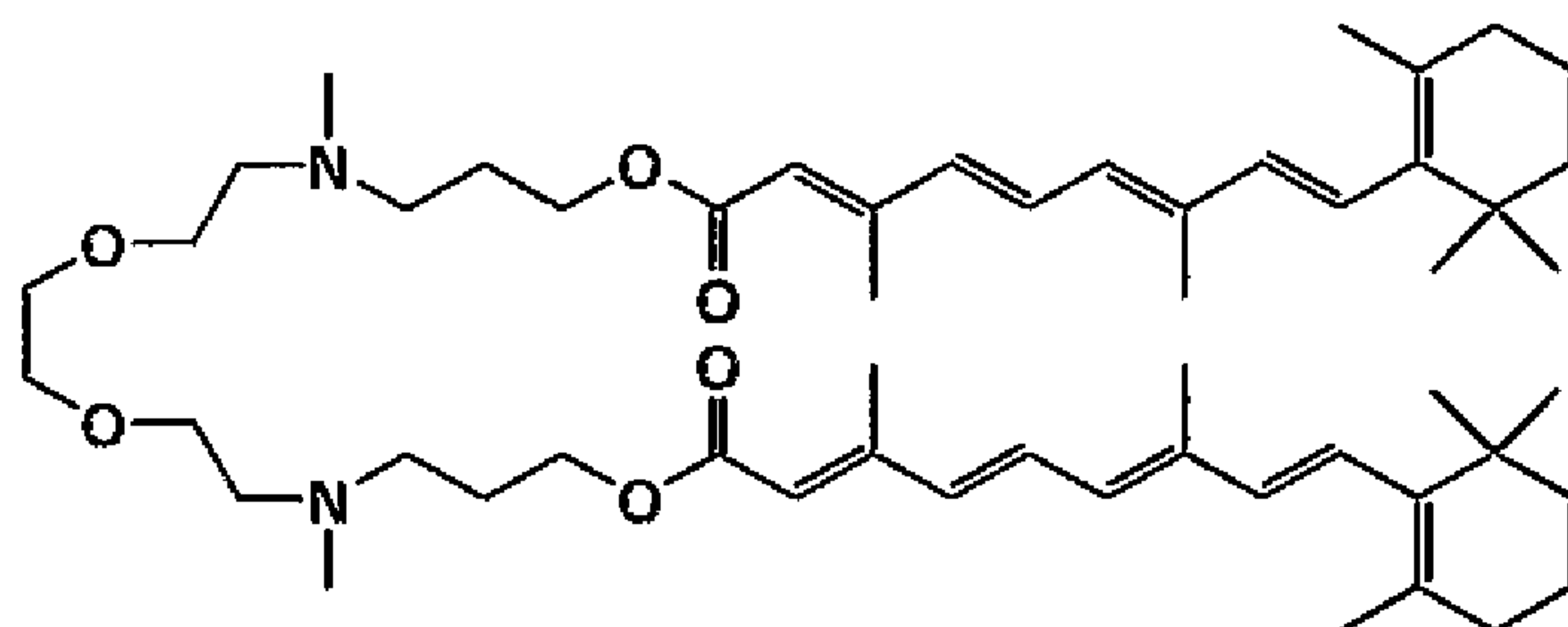
W'は、それぞれ独立に、単結合又は $C_1 \sim C_6$ アルキレンであり、

Zは、それぞれ独立に、脂溶性ビタミン残基、ステロール残基、又は $C_{12} \sim C_{22}$ 脂肪族炭化水素基である)。

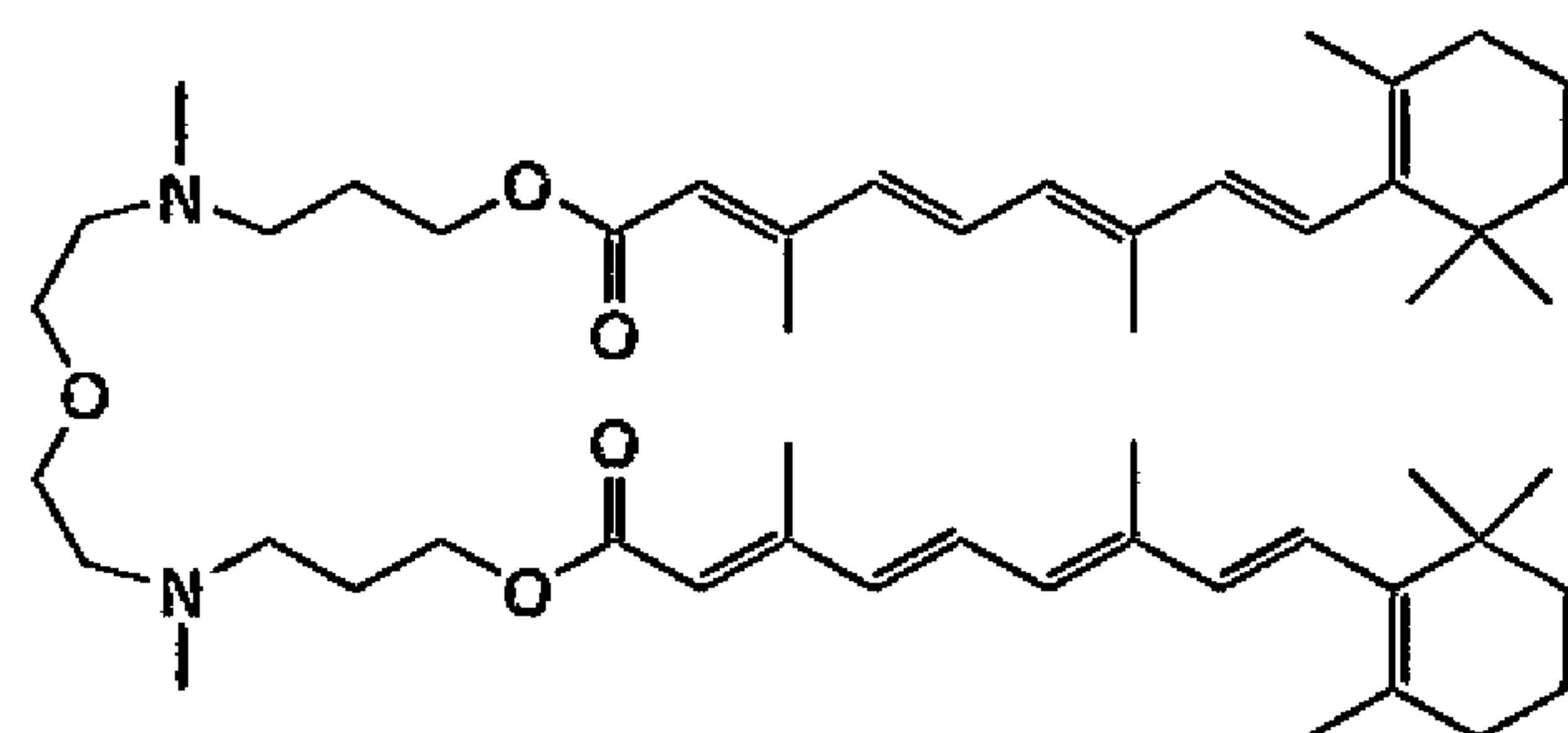
[0031] 第2の脂質化合物を含む場合、Pに含まれるエーテル結合を構成する酸素が、内包される核酸と水素結合を形成するため、核酸の内包量が多くなる。

[0032] 例えば、以下の構造を有する第2の脂質化合物を用いれば、核酸内包量により優れているため好ましい。

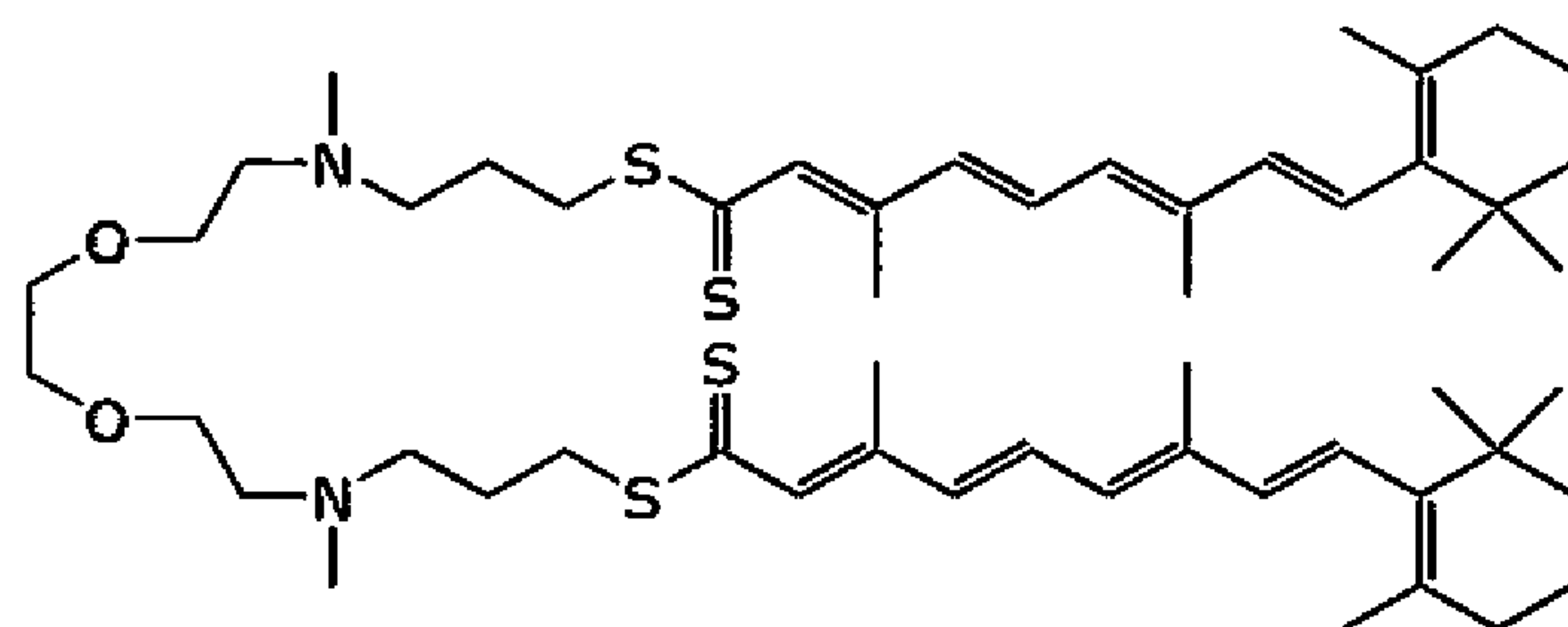
[化2-1]



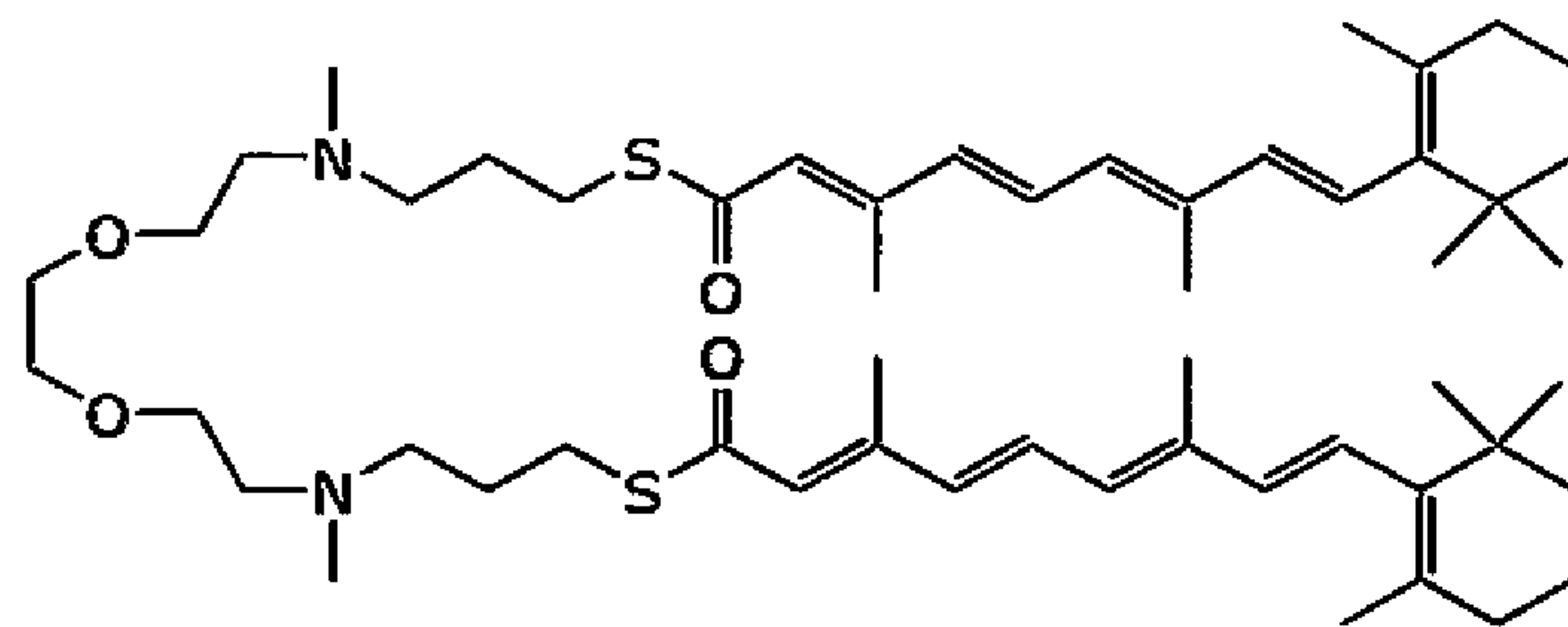
(2-01)



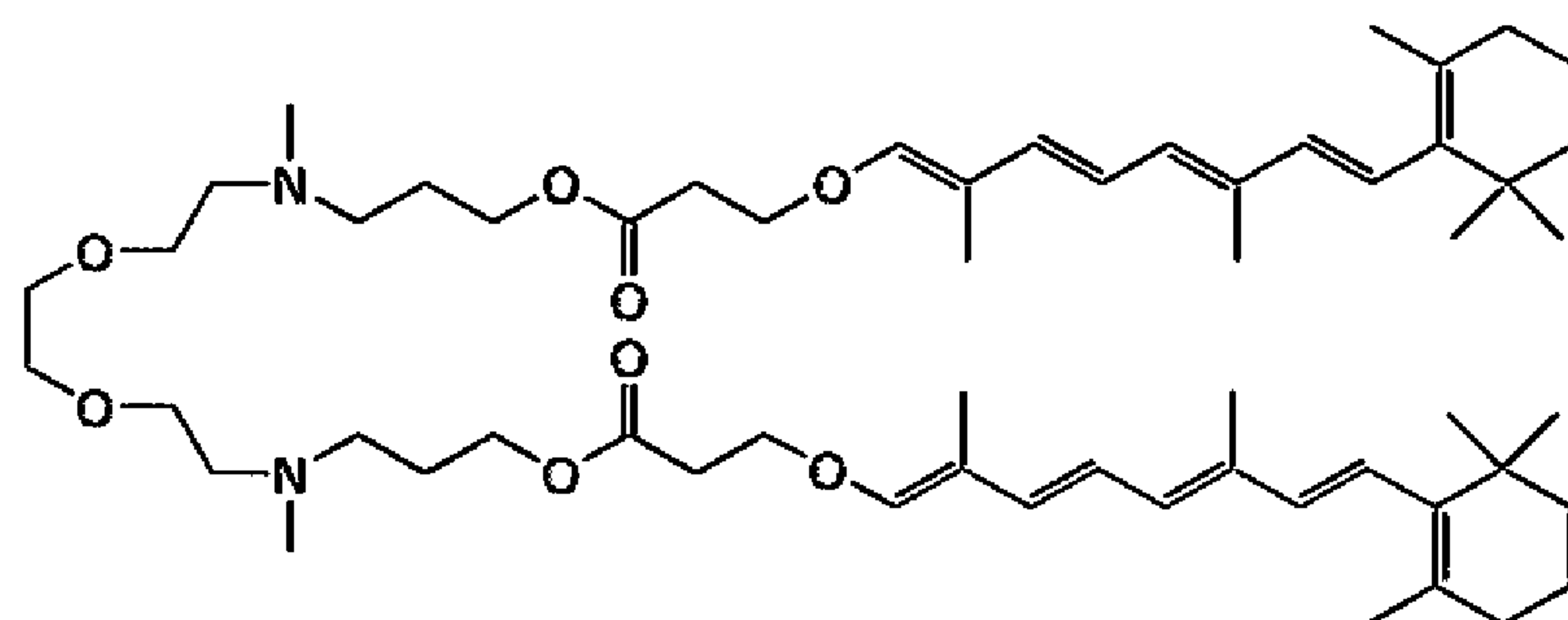
(2-02)



(2-03)



(2-04)

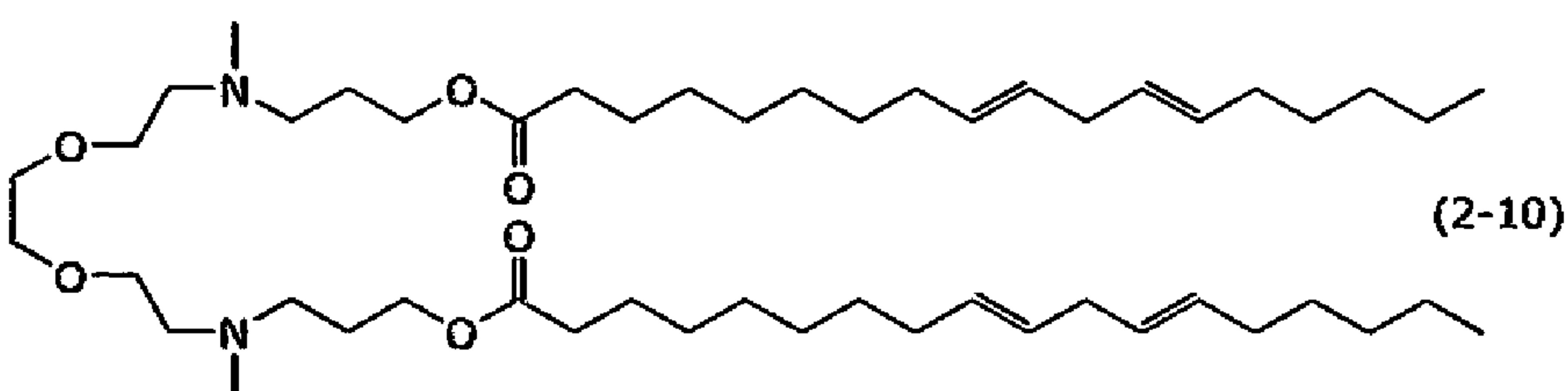
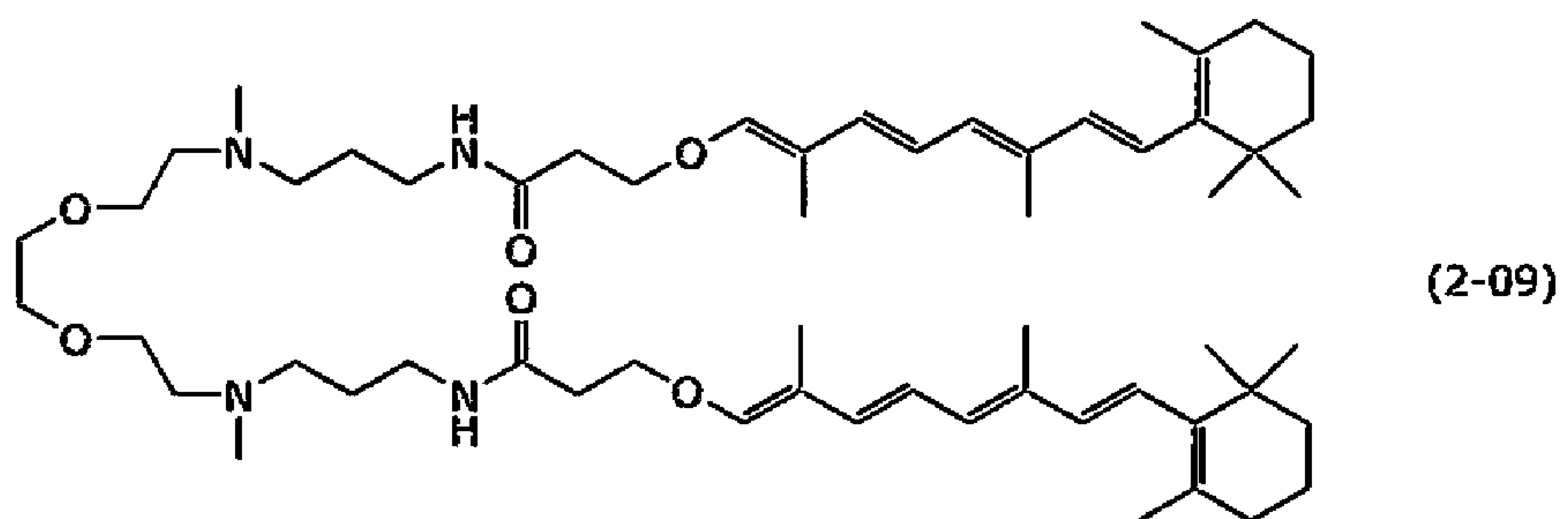
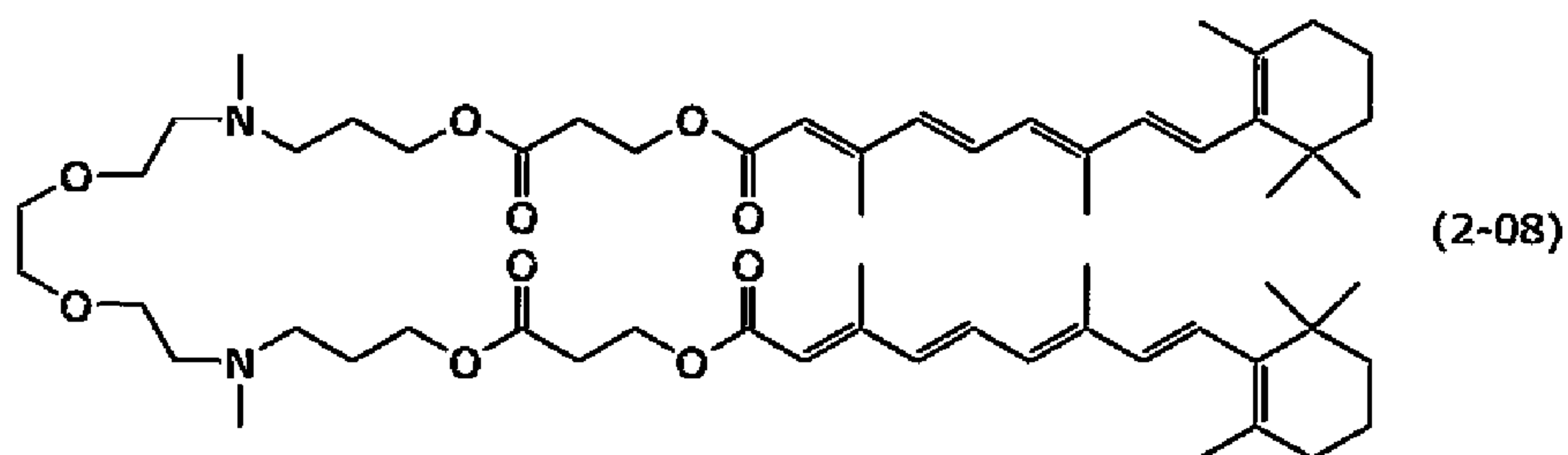
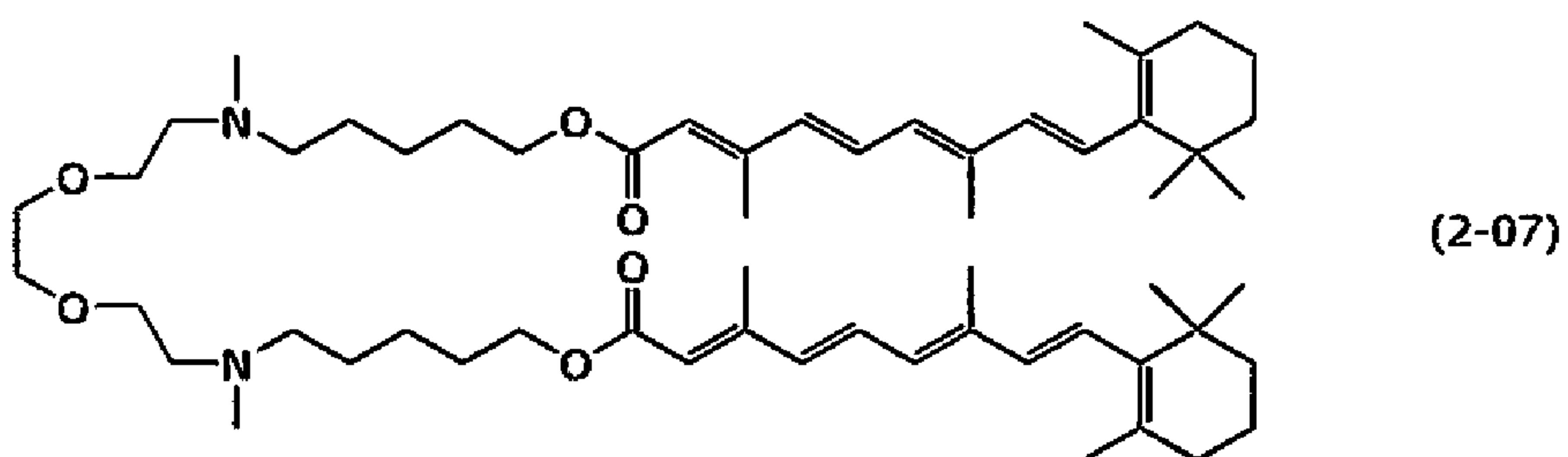
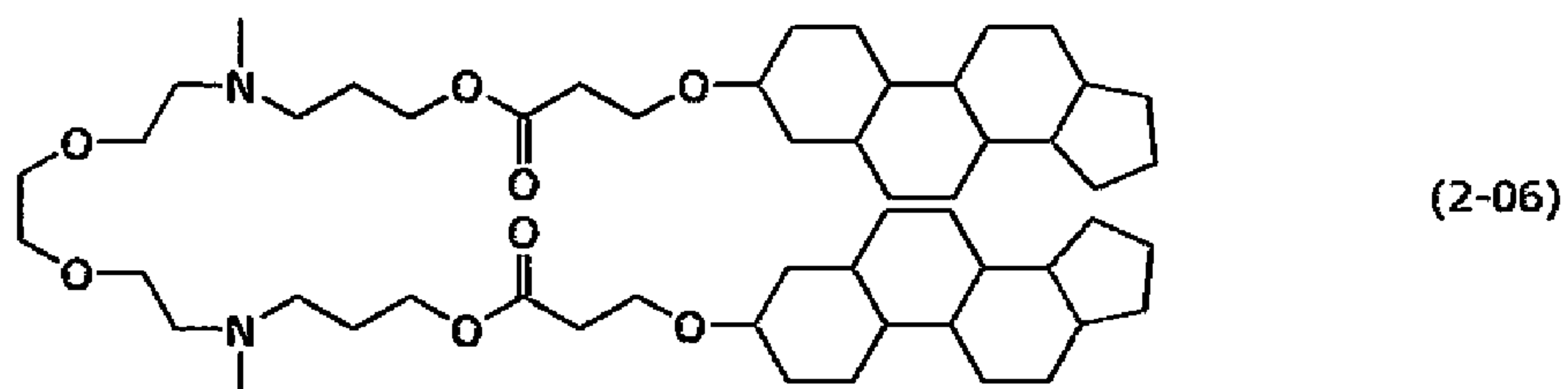


(2-05)

(つづく)

[化2-2]

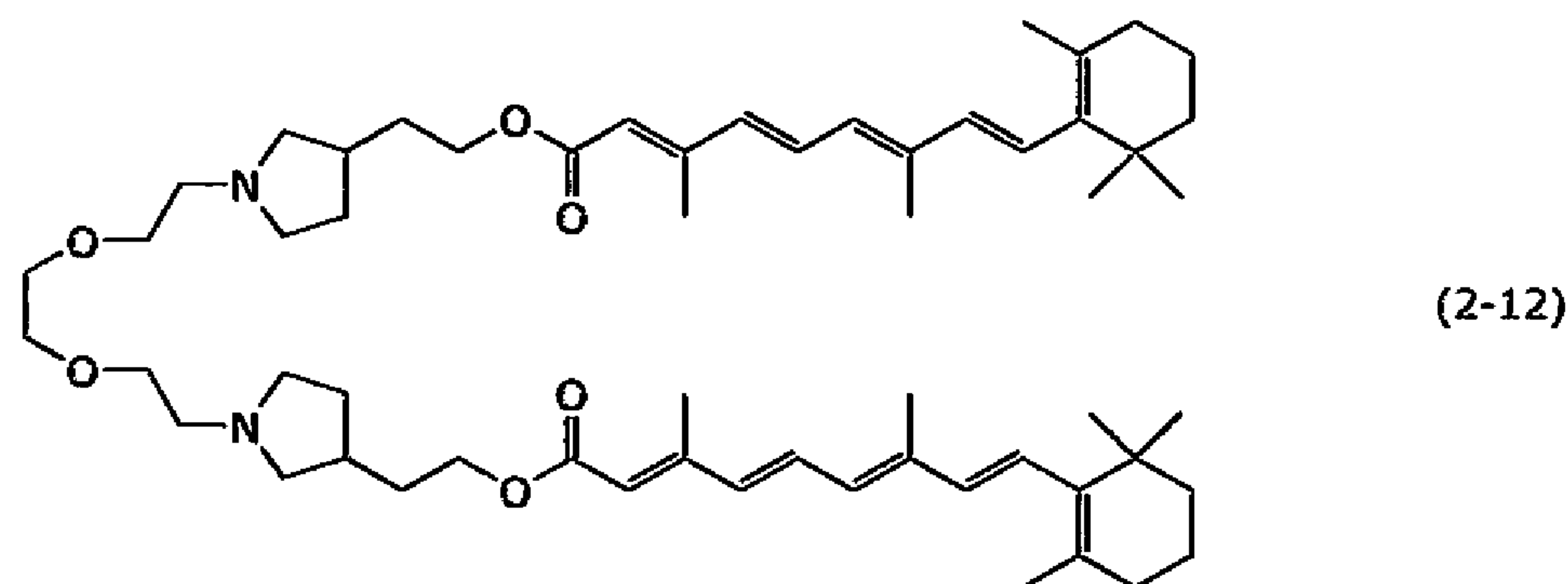
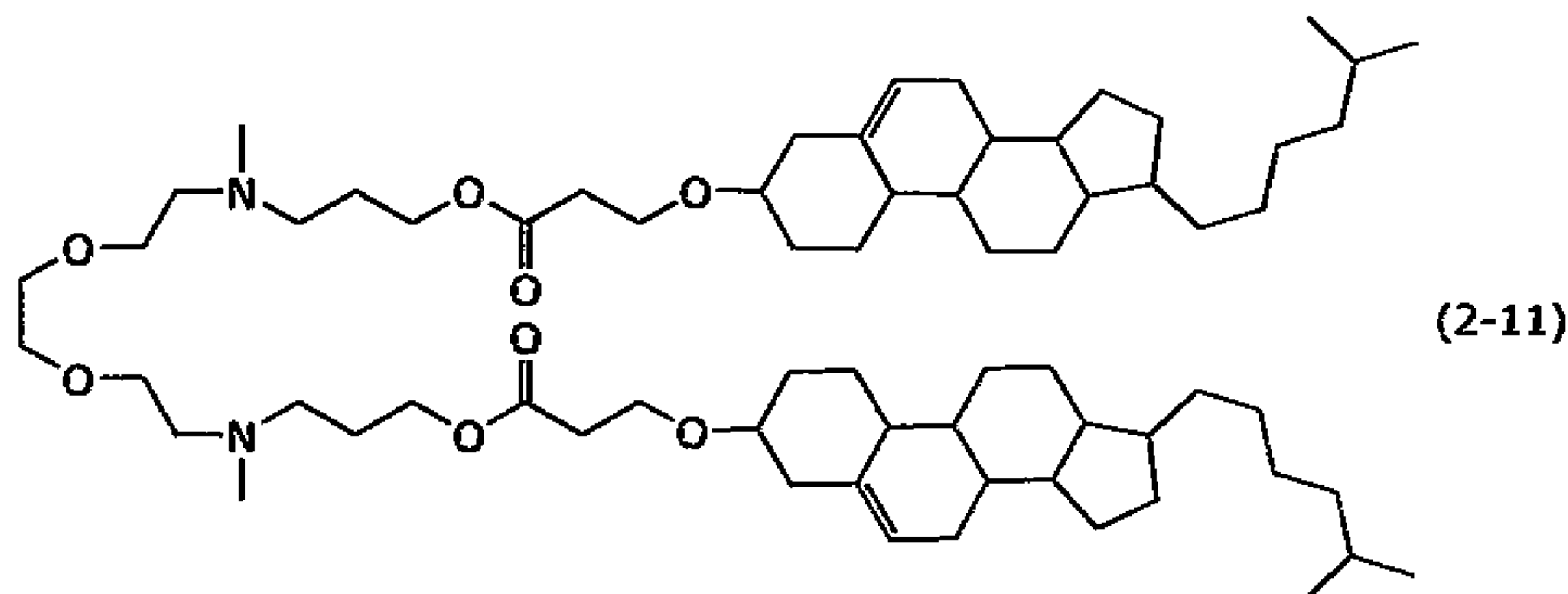
(つづき)



(つづく)

[化2-3]

(つづき)



[0033] 脂質膜2に含まれる脂質分子2bの全体に対して100%近くがベース脂質であってもよいが、第1の脂質化合物及び／又は第2の脂質化合物が脂質分子2bの全体に対して約20%～約70%（モル比）で含まれることが好ましい。

[0034] 脂質膜2は、例えば、PEG修飾した脂質、特にポリエチレングリコール（PEG）ジミリスチルグリセロール（DMG-PEG）、オメガーアミノ（オリゴエチレングリコール）アルカン酸モノマーから誘導されるポリアミドオリゴマー（例えば、米国特許第6,320,017号に記載のもの）、モノシアロガングリオシドを更に含むことが好ましい。このような脂質は、脂質分子2b全体に対して約1%～約5%（モル比）で含まれることが好ましい。

[0035] 脂質膜2は、脂質粒子1の生体適合性を調整するための相対的に生体適合性の高い脂質、脂質膜2に配位子を結合させる官能基を有する脂質、コレス

テロール等の内包物の漏出を抑制するための脂質等の脂質を含んでもよい。

[0036] 特に、上記式（１－０１）を有する第１の脂質化合物及び／又は式（２－０１）を有する第２の脂質化合物を用いる場合、乳がん細胞に第１核酸３が導入されやすいため更に好ましい。例えば、脂質粒子１は、式（１－０１）の化合物と、式（２－０１）の化合物と、ＤＯＴＡＰと、ＤＯＰＥと、コレステロールと、ＤＭＧ－ＰＥＧとを含む場合、乳がん細胞への導入効率が特に優れているため好ましい。例えば、これらの成分を３７：１５：１０．５：１０．５：３０：２（モル比）で含むことがより好ましい。

[0037] 第１核酸３は、例えば、図３に示すように第１レポーター発現ユニットＵ１を含む。第１レポーター発現ユニットＵ１は、例えば、プロモーター配列５とレポーター遺伝子６と転写終結配列７とを含む。

[0038] プロモーター配列５は、乳がん細胞の薬剤への感受性を決定するためのマーカー遺伝子のプロモーター配列である。

[0039] マーカー遺伝子は、本方法で調査される薬剤の種類に対応して選択される。マーカー遺伝子は、例えば、薬剤に対して感受性を有する乳がん細胞と、感受性が無い乳がん細胞とで発現量に差がある遺伝子である。或いは、マーカー遺伝子は、乳がん細胞中において、選択された薬剤の存在によって発現量が増加する遺伝子であってもよい。発現量が増加するとは、発現量が増加することと発現量が減少することとの両方を含む。

[0040] 例えば、当該マーカー遺伝子として、薬剤の感受性予測マーカー、治療効果予測マーカー又は薬剤選択マーカー等として本分野で知られる遺伝子を用いることも可能である。

[0041] 例えば、薬剤がアントラサイクリン系薬剤である場合、マーカー遺伝子としてＴＯＰ２Ａ、ＲＡＲＡ、ＣＤＣ６、ＴＨＲＡ、ＧＳＤＭ１、ＰＳＭＤ３、ＣＳＦ３、ＭＥＤ２４、ＳＮＯＲＤ１２４、ＮＲ１Ｄ１、ＴＲＮＡＳＴＯＰ－ＵＣＡ、ＭＳＬ－１、ＣＡＳＣ３、ＲＡＰＧＥＦＬ１、ＷＩＰＦ２、ＬＯＣ１００１３１８２１、ＧＪＤ３、ＬＯＣ３９０７９１、ＬＯＣ７２８２０７、ＩＧＦＢＰ４、ＴＮＳ４、ＣＣＲ７又はＳＭＡＲＣＥ１等を用いるこ

とができる。

[0042] 例えば、薬剤がアロマターゼ阻害剤である場合、マーカー遺伝子として、STC2、SLC39A6、CA12、ESR1、PDZK1、NPY1R、CD2、MAPT、QDPR、AZGP1、ABAT、ADCY1、CD3D、NAT1、MRPS30、DNAJC12、SCUBE2、KCNE4、DHA、ATP5J2、VDAC2、DARS、UCP2、UBE2Z、AK2、WIPF2、APPBP2又はTRIM2等を用いることができる。

[0043] しかしながら、マーカー遺伝子は上記のものに限定されるものではない。

[0044] 或いは、薬剤に対して感受性を有する乳がん細胞と感受性が無い乳がん細胞とにおいて発現量に差がある遺伝子、或いは乳がん細胞に薬剤を添加したときに発現量が増加する遺伝子を調査し、それをマーカー遺伝子として用いてもよい。

[0045] プロモーター配列5として、マーカー遺伝子のプロモーター配列の全長を用いてもよいし、そのプロモーター活性に影響を与えない限り、その一部や改変した配列を用いてもよい。プロモーター配列5は脂質粒子1内での安定性や、内包量の観点からより短いことが好ましい。

[0046] 例えば、マーカー遺伝子としてスタニオカルチン2（STC2）を用いる場合、プロモーター配列として下記表1の配列（配列番号1）を用いることが好ましい。

[表1]

表1 STC2プロモーター配列(配列番号1)

TAAAGTTGCCTTTCAAGCTCTGGCCTCCGGGCACGCGATGCTCCGCGGCGGGCTGACTCAG
GGCTGCCTTGGGCCTCCCTGCCACCCTCCTGGAAATGATGCAAGTCCTGACTGTCACCTGG
ATCCCTGCAGCCCAGCCTGGAATGCGTCTGGATTAGGGGAAAGACGAGAAACGACACTCCA
GGTGTTCACGGCCCCACCAAAGCGGGAAGATAGGGCAGTTGCTCAGACCAAATACTGTATC
TAGTGCTTCTGCTCCTATCTTCAATCGTGGGGTTCTTTTAAATGCAAAGTGTCACAAGGCC
AGGAATTCCCATGTGTGCTCAGTTGGCCCACAGCATCATTGTGCCTAGGAAACTGCTTCAA
TTTATCAAGTCCTCTGGGCTGGGAATCTCACTGAATTCCAAACGGCGGAAAGAGGAAACTT
TCCCAACCCGATGTGGGTGTGACGCGAGCCAGGGGCCCCAGGGACACTGTCCCAGAGCACA
CCGTCCCCCTTTAACAGCAACTGGAGCTTGGATTGCTCTTATATTGTACAGTCCTTTCGA
CCATTGCCCTGGAGCACCCGCGACACGCGCACGCATCTCCGGCCGCGCTCACACACACTCAT
ACACACGCACGCAAACGCGTGGCCGCCGCCAGGTCGGCAACTTTGTCCGGCGCTCCCAGCG
GCGCTCGGCTTCCTCCTGTAGTAGTTGAGCGCAGGCCCCGCCTCCCGGCCGTGTTGTCAA
AGGGCCGGGGTCTCGGATTGGTCCAGCCGCCGGGACAACACCTGCTCGACTCCTTCATTCA
AGTGACACCAGAGCTTCCAGGGATATTTGAGGCACCATCCCTGCCATTGCCGGGCACTCGC
GGCGCTGCTAACGGCCTGGTCACATGCTCTCCGGAGAGCTACGGGAGGGCGCTGGGTAACC
TCTATCCGAGCCGCGGCCGCGAGGAGGAGGGAAAAGGCGAGCAAAAAGGAAGAGTGGGAGG
AGGAGGGGAAGCGGCGAAGGAGGAAGAGGAGGAGGAGGAAGAGGGGAGCACAAAGGATCCA
GGTCTCCCGACGGGAGGTTAATACCAAGA

- [0047] 例えば、マーカー遺伝子としてトポイソメラーゼ2アルファ（TOP2A）を用いる場合、プロモーター配列として下記表2の配列（配列番号2）を用いることが好ましい。

[表2]

表2 TOP2Aプロモーター配列 (配列番号2)

TGCAAAGCCTTTCTACATCCTTCCACTATATGGAACCCCCAAACCACAACCTGTGGCACTTT
 TATTTTAATTATTTTATTATTTATTTATTTATGTATTTATCTCTTGAGGTGGCCTCGCTC
 TGTCACCTCAGGCTGGAGTGCAGTGGAGCAATCACGGTTCAAGGCGCCTCGATCTCCGATCC
 CCGGGGCTCAAGCGATCCTCCCTCCTCAGCCTCCGGAGCTGGAGTTACAGGTGTGCGATGC
 CTCGCCTGGCTATTTTTTTTTCCTTTTGGGTAGAGACGGGGTCTCGCTATGTTGCCCAGGC
 TGGTCTCCAACCTCCTAGGCTCCAGCGATCCTCCCGCCTCGGCCTCCCAATGTGCTGCGAAT
 ACAGACTCCAGCCACCGCACACAGCCTACTTTTATTTCTTTGAAAAATGAATTCGAGGGTA
 AAGGGGGCGGGGTTGAGGCAGATGCCAGAATCTGTTTCGCTTCAACCAAGCAGCCAGGCTGC
 CTGTCCAGAAAGCCGGCACTCAGTTTCCTCAGGAAAACGAAGCTAAGGCTCCCATTCCCCT
 CGCTAACAAACGTCAGAACAGAGGACAGTTTTTAGATTTTCAGGGATCTTAAATAGATTGGCA
 GTTCCTGGAGAATAAACATCCTTTGCTTTTCTCCTGCACACTTTTGCTCAGGCCACCCCT
 TCCCGCTTCCAAAGCCCATCTCTTCCAAGCTTTCCGCACGAGAAAACAAGTGAGCCCTTCT
 CATTGGCCAGATTCCCTGTCAATCTCTCCGCTATGACGCCGAGTGGTGCTTTTGAAGCCT
 CTCTAGTCCCGCCTCCCTAACCTGATTGGTTTATTCAAACAAACCCCGGCCAACTCAGCCG
 TTCATAGGTGGATATAAAAGGCAAGCTACGATTGGTTCTTCTGGACGGAGACGGTGAGAGC
 GAGTCAGGGATTGGCTGGTCTGCTTCGGGCGGGCTAAAGGAAGGTTCAAGTGGAGCTCTCC
 TAACCGACGCGCGTCTGTGGAGAAGCGGCTTGGTCGGGGGTGGTCTCGTGGGGTCCTGCCT
 GTTTAGTCGCTTTCAGGGTTCTTGAG

[0048] レポーター遺伝子6は、プロモーター配列5の下流に機能可能に連結されている。機能可能に連結されているとは、レポーター遺伝子6がプロモーター配列5のプロモーター活性によりレポータータンパク質を発現することを意味する。

[0049] レポーター遺伝子6として、レポーターアッセイにおいて一般的に用いられる遺伝子を用いることができる。レポーター遺伝子6は、検出可能な信号を生ずるレポータータンパク質をコードする遺伝子であり、例えば、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子若しくはNanoLuc（登録商標）ルシフェラーゼ遺伝子などの発光酵素タンパク質をコードした遺伝子、又は緑色蛍光タンパク質遺伝子、青色蛍光タンパク質遺伝子若しくは赤色蛍光タンパク質遺伝子等の蛍光蛋白質をコードする遺伝子等であることが好ましい。或いは、レポーター遺伝子6は、アンピシリン耐性

遺伝子又はカナマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子；キサンチンオキシダーゼ遺伝子若しくは一酸化窒素合成酵素遺伝子などの活性酸素生成酵素をコードした遺伝子； β -ガラクトシダーゼ遺伝子若しくはクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子等の発色酵素タンパク質をコードする遺伝子；又は重金属結合タンパク質をコードする遺伝子等であってもよい。

[0050] 転写終結配列 7 は、例えば、レポーター遺伝子 6 の転写を終結ポリ（A）配列を含む配列であってもよく、例えば、ポリ（A）付加シグナル配列であり得る。ポリ（A）付加シグナル配列は、例えば、シアミン・ウイルス（SV）40 のポリ（A）付加シグナル配列、ウシ成長ホルモン遺伝子のポリ（A）付加シグナル配列、これらの配列を転写終結の機能が維持される限りにおいて改変した配列又は人工的に合成されたポリ（A）付加シグナル配列などを用いることができる。

[0051] 第 1 核酸 3 は、例えば環状の二本鎖 DNA である。第 1 核酸 3 はベクターであってもよい。環状である場合、第 1 核酸 3 は脂質粒子 1 中で安定して存在させることが可能であり、第 1 核酸 3 の分解や破損が防止される。又は第 1 核酸 3 は直鎖状の核酸であってもよい。直鎖状である場合、第 1 核酸 3 のサイズが環状の場合と比較して小さくすることができるため、脂質膜 2 内により多く内包させることが可能である。

[0052] 第 1 核酸 3 は、上記の配列に加え、更なる配列を含んでもよい。例えば、第 1 核酸 3 がベクターである場合、第 1 核酸 3 自身の複製をするための複製開始配列及び複製開始に関与する複製開始タンパク質をコードする遺伝子を発現するための配列等を含んでもよい。

[0053] 核酸凝縮ペプチド 4 は、例えば、カチオン性のペプチドである。好ましい核酸凝縮ペプチド 4 は、例えば、カチオン性のアミノ酸を全体の 45% 以上含むペプチドである。より好ましい核酸凝縮ペプチド 4 は、一方の端に R R R R R（第 1 のアミノ酸配列）を有し、他方の端が配列 R Q R Q R（第 2 のアミノ酸配列）を有する。そして、両アミノ酸配列の間に、R R R R R R

又は R Q R Q R からなる中間配列を 0 個又は 1 個以上含む。また、第 1 のアミノ酸配列、第 2 のアミノ酸配列及び中間配列のうち、隣り合う 2 つの配列の間に 2 つ以上の中性アミノ酸を含む。中性アミノ酸は、例えば、G 又は Y である。

[0054] 上記核酸凝縮ペプチド 4 は、好ましくは、以下のアミノ酸配列を有する。

[0055] R Q R Q R Y Y R Q R Q R G G R R R R R R (配列番号 3)

R Q R Q R G G R R R R R R (配列番号 4)。

[0056] 或いは、核酸凝縮ペプチド 4 は、一方の端に R R R R R R (第 3 のアミノ酸配列) を有し、他方の端に R R R R R R (第 4 のアミノ酸配列) を有する。そして、両アミノ酸配列の間に、R R R R R R 又は R Q R Q R からなる中間配列を 0 個又は 1 個以上含む。また、第 3 のアミノ酸配列、第 4 のアミノ酸配列及び中間配列のうち、隣り合う 2 つの配列の間に 2 つ以上の中性アミノ酸を含む。

[0057] このような核酸凝縮ペプチド 4 は、好ましくは、以下のアミノ酸配列を有する。

[0058] R R R R R R Y Y R Q R Q R G G R R R R R R (配列番号 5)。

[0059] 更に、次のようなアミノ酸配列を有する核酸凝縮ペプチド 4 を上記の何れかの核酸凝縮ペプチド 4 と組み合わせて用いることもできる。

[0060] G N Q S S N F G P M K G G N F G G R S S G P Y G G G G Q Y F A K P
R N Q G G Y

(M 9) (配列番号 6)

核酸凝縮ペプチド 4 を用いる場合、第 1 核酸 3 が凝縮され、より多くの第 1 核酸 3 を脂質膜 2 内に内包することが可能であり、また脂質粒子 1 のサイズを小さくすることができる。その結果、乳がん細胞への第 1 核酸 3 の導入効率が高まる。核酸凝縮ペプチド 4 を用いることが好ましいが、用いる核酸の種類等によっては核酸凝縮ペプチド 4 を用いなくともよい。

[0061] 脂質粒子 1 は、第 1 核酸 3 の他に、更なる成分を内包していてもよい。例えば、レチノイン酸、環状アデノシンーリン酸 (c A M P) 又はアスコルビ

ン酸等の細胞内での核酸の発現を調節する化合物；ペプチド、ポリペプチド、サイトカイン、増殖因子、アポトーシス因子、分化誘発因子、他の細胞表面受容体及びそのリガンド等を内包することも可能である。

[0062] 脂質粒子 1 は、次のように製造することができる。例えば、まず第 1 核酸 3 を核酸凝縮ペプチド 4 と攪拌混合することによって第 1 核酸 3 を凝縮する。次いで、脂質膜 2 の材料である脂質を含む溶液に、第 1 核酸 3 等の脂質膜に内包されるべき成分を含む水性緩衝液を添加し、攪拌して懸濁する。又は、小分子を脂質粒子等に封入する際に用いられる公知の方法、例えば、バンガム法、有機溶媒抽出法、界面活性剤除去法、凍結融解法等を用いて作製することができる。第 1 核酸 3 の内包量の確認は、例えば、市販の DNA 及び RNA 定量キット等を用いて行うことができる。

[0063] 脂質粒子 1 の平均粒子径は、例えば約 50 nm～約 300 nm であり、好ましくは約 50 nm～約 200 nm である。例えば、超音波処理によって粒子径を小さくすることができる。また、ポリカーボネート膜やセラミック膜を透過させて、脂質粒子 1 のサイズを調整することも可能である。脂質粒子 1 の平均粒子径は、例えば動的光散乱法を用いたゼータサイザーによって測定することができる。

[0064] 脂質粒子 1 は、例えば適切な溶媒中に含められて組成物として用意されてもよい。溶媒は、例えば、水、生理食塩水のような食塩水、グリシン水溶液又は緩衝液等である。或いは、脂質粒子 1 は乾燥した状態で提供されてもよい。

[0065] 以上に説明した脂質粒子 1 と乳がん細胞群とを接触させる（接触工程 S 1）。例えば、接触工程 S 1 は、適切な溶媒に懸濁されるか又は培地上に播種された乳がん細胞群に脂質粒子 1 を添加することにより行われる。或いは、接触工程 S 1 は、脂質粒子 1 が内側表面に付着又は固定された容器等に乳がん細胞群を添加する方法により行われてもよい。

[0066] 次に、乳がん細胞群を培養する（培養工程 S 2）。培養は、乳がん細胞群が乳がんとしての性質を維持し、且つ乳がん細胞群の生存に有利な条件で行

われ得る。培養は、例えば、固体培地又は液体培地等の適切な培地を用いて、ディッシュ上又はチューブ内などで行われる。培養条件は、 $30\sim 37^{\circ}\text{C}$ 、 $2\sim 5\%$ の CO_2 雰囲気下で行うことが好ましい。培養時間は、 $2\sim 72$ 時間であることが好ましい。

[0067] 上記接触工程 S 1 及び培養工程 S 2 を行うことによって、培養工程 S 2 の間にエンドサイトーシス等により脂質粒子 1 が乳がん細胞群に含まれる乳がん細胞に取り込まれ、細胞内に第 1 核酸 3 が放出される。実施形態に従う脂質粒子 1 によれば、効率よく簡便に第 1 核酸 3 を乳がん細胞に導入することが可能である。

[0068] その後、乳がん細胞内に存在するマーカー遺伝子のプロモーターの強度に応じて第 1 核酸 3 のプロモーター配列 5 が活性化され、その下流にあるレポーター遺伝子 6 が発現する。したがって、第 1 核酸 3 により、乳がん細胞のマーカー遺伝子のプロモーターの強度がレポータータンパク質の量、即ち、そこから生ずる信号量に反映される。ここで、マーカー遺伝子のプロモーターの強度とは、マーカー遺伝子の発現頻度をいい、プロモーター強度が強いとは、遺伝子の転写量、発現量が多いこと、マーカー遺伝子の発現が誘導される速度が速いこと（初期遺伝子等）を含む。反対に、プロモーター強度が弱いとは、遺伝子の転写量、発現量が少ない又は無いこと、マーカー遺伝子の発現が誘導される速度が遅いこと（後期遺伝子等）を含む。

[0069] 1 つの乳がん細胞群中には薬剤感受性の有無又は程度が異なる複数種の乳がん細胞が含まれ得る。例えば、乳がん細胞群中で薬剤感受性予測マーカー遺伝子が発現している乳がん細胞においては、レポータータンパク質からの信号が得られる。反対に薬剤感受性予測マーカー遺伝子が発現していない乳がん細胞においてはレポータータンパク質からの信号が得られない。また、マーカー遺伝子のプロモーターの強度が高い乳がん細胞においてはより多くの信号が得られる。

[0070] 培養時間は、上記のように $2\sim 72$ 時間であることが好ましいが、所望の信号量（レポータータンパク質の発現量）が得られるまで培養を行うことが

好ましい。培養時間を長くするほどより多くのレポータータンパク質が生成して信号量が増加し得るが、その後信号量が減衰する場合もある。例えば、培養時間は、用いるマーカー遺伝子の種類に応じて選択される。例えば、プロモーター強度が高い遺伝子（初期遺伝子等）の場合、培養時間は2～4時間でよい場合もある。反対に、プロモーター強度が低い遺伝子（後期遺伝子等）の場合、24～72時間培養を行うことが好ましい。

[0071] 培養により、例えば、採取した試料に含まれる乳がん細胞以外の細胞、例えば、血球、線維芽細胞、脂肪細胞等を死滅させて除去してもよい。また、培養により乳がん細胞が増殖してもよい。培養で増加した乳がん細胞も脂質粒子1と接触して第1核酸3が導入されるか、又は第1核酸3が導入された乳がん細胞が増殖した場合には、分裂時に第1核酸3も複製されて分裂した各細胞に含まれ得る。

[0072] 検出工程S3において、乳がん細胞群に含まれる各乳がん細胞において、レポータータンパク質からの信号を個別に検出する。

[0073] レポーター遺伝子6が発光酵素タンパク質をコードした遺伝子である場合、検出の前に乳がん細胞群に当該発光酵素タンパク質の基質を添加し、レポータータンパク質（発光酵素タンパク質）により基質が代謝されて得られた代謝物からの蛍光が信号となり得る。レポーター遺伝子が蛍光タンパク質をコードした遺伝子である場合は、レポータータンパク質自体からの蛍光が信号となり得る。

[0074] 例えば、次の計数工程S4において信号が得られた細胞の数を数えるために、信号は各乳がん細胞において検出し、信号の有無又は量を乳がん細胞毎に個別に決定することが好ましい。

[0075] このような信号の検出は、細胞毎に信号の有無を検出できる光学センサ、顕微鏡、カメラ又はセルソーター等の検出装置を用いて行われることが好ましい。

[0076] 検出工程S3は培養工程S2後に行ってもよいが、培養を行いながら経時的に行うことが好ましい。それによって、マーカー遺伝子の種類に従う適切

な培養時間が不明である場合も、信号量が最大となったときの信号を用いることができる。その結果、後の計数工程において正確に信号が得られた細胞数を計測することが可能である。経時的とは、連続的であってもよいし、間欠的であってもよい。

[0077] 次に検出工程 S 3 の結果から、薬剤感受性を有する乳がん細胞の数を計測する。例えば、発現量が薬剤の感受性と正の相関にあるマーカー遺伝子を用いる場合、信号が得られた細胞（以下、「信号発生細胞」とも称する）は、プロモーター活性が高いとみなして薬剤への感受性を有する細胞（以下、「薬剤感受性細胞」とも称する）と決定し、その数を計測すればよい。又は、信号が閾値以上得られた細胞を信号発生細胞とみなして、薬剤感受性細胞として計測してもよい。閾値は、例えば、薬剤感受性の有無が既知である乳がん細胞に第 1 核酸 3 を導入して得られた信号量に従って決定することができる。

[0078] 反対に、発現量が薬剤の感受性と負の相関にあるマーカー遺伝子を用いる場合、信号が得られない細胞又は得られた信号量が閾値以下である細胞（以下、「信号非発生細胞」とも称する）を薬剤感受性細胞として計測することができる。

[0079] 細胞の計数は、得られた顕微鏡画像や映像から目視で行ってもよいし、画像処理ソフトなどを用いて行ってもよい。又は、後述する複数のセンサ素子を有する光学センサやセルソーター等を用いて自動的に行ってもよい。

[0080] 更に、乳がん細胞群に含まれる全乳がん細胞数を計測してもよい。例えば、全乳がん細胞数を用いて、薬剤感受性細胞の存在率、即ち、乳がん細胞群中の全乳がん細胞数に対する薬剤感受性細胞の数の割合を算出してもよい。

[0081] レポーター遺伝子が薬剤耐性遺伝子である場合は、例えば、まず乳がん細胞群に含まれる全細胞数を計測しておき、次に乳がん細胞群を薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤で処理し、生存して残った乳がん細胞を信号として検出し、その数を計測すればよい。検出及び細胞数の計測は、光学センサ、顕微鏡、カメラ又はセルソーター等の検出装置を用いて行うことができる。

[0082] 検出工程 S 3 及び計数工程 S 4 では、必ずしも乳がん細胞群全体において信号発生細胞数を検出及び計数する必要はない。例えば、乳がん細胞群の一部についてそこに含まれる全細胞数と信号発生細胞数とを計数し、その値を代表値とし、乳がん細胞群全体の結果として用いてもよい。例えば、乳がん細胞群の一部を撮影した画像や、乳がん細胞群の一部を含む顕微鏡の視野等を用いて検出工程 S 3 及び計数工程 S 4 を行ってもよい。例えば、一部から得られた結果から、乳がん細胞群の単位数当たりの信号発生細胞数を算出して用いてもよい。また、乳がん細胞群の複数の一部について検出工程 S 3 及び計数工程 S 4 を行い、その結果の平均値を当該乳がん細胞群における結果として用いてもよい。

[0083] 上記工程 S 1 ～ S 4 によって薬剤感受性細胞の数又はその存在率を得ることができる。これらの情報は、例えば、対象から採取された乳がん細胞群又は対象中に存在する乳がんの薬剤感受性を決定するために使用することができる。

[0084] 更なる実施形態に従う方法は、図 4 に示すように、計数工程 S 4 の結果から、乳がん細胞群の薬剤への感受性の有無又は程度を決定する決定工程 S 5 を更に含み得る。この工程において「乳がん細胞群」は、工程 S 1 で使用された、対象の体内から体外へ取り出された状態の乳がん細胞群であり得る。

[0085] 例えば、乳がん細胞群中の薬剤感受性細胞数がより多いほど、乳がん細胞群の薬剤への感受性が高いと決定することができる。反対に、乳がん細胞群中に薬剤感受性細胞が少ないか、又は存在しないとき、乳がん細胞群の薬剤への感受性が低いと決定することができる。

[0086] 薬剤感受性細胞の存在率を算出した場合は、当該存在率が高いほど乳がん細胞群の薬剤への感受性が高いと決定することができる。或いは、存在率に閾値を設けて、存在率が閾値より高い場合に乳がん細胞群は薬剤への感受性を有すると決定してもよい。閾値は、薬剤の種類やマーカー遺伝子の種類に応じて決定されるものであり限定されるものではないが、例えば、薬剤感受性細胞の存在率が 10% 以上であるとき乳がん細胞群が薬剤への感受性を有

する決定することができる。

[0087] 決定工程 S 5 においては、本方法実施時点又は乳がん細胞群採取時点での乳がん細胞群の薬剤感受性の有無又は程度を決定してもよいし、乳がん細胞群の将来の薬剤感受性の有無又は程度を決定してもよい。例えば、得られた信号が微弱であっても薬剤感受性細胞数が閾値以上である場合には、将来薬剤感受性を有する可能性があるとして決定してもよい。「将来」は、例えば、乳がん細胞群が得られた対象の体内に存在する乳がんのその後、又は方法後に生存に適切な状態で維持された乳がん細胞群のその後を含む。本明細書において、「決定」するとは、本方法実施時点での又は乳がん細胞群採取時点での乳がん細胞群の薬剤感受性の決定と、将来の薬剤感受性の決定（即ち、予測）を含む。

[0088] また、検出工程 S 3 において信号の強度を更に測定し、強度の情報を乳がん細胞群の薬剤感受性の程度の決定に用いてもよい。例えば、薬剤感受性細胞が同じ数であるが、得られた信号の強度が異なる場合には、信号の強度がより強い細胞群の方が薬剤感受性が高いと判断され得る。

[0089] 以上に説明した実施形態の方法によれば、脂質粒子 1 を用いて第 1 核酸を効率よく乳がん細胞群に導入し、また生きた乳がん細胞群において薬剤感受性細胞の数（存在率）を指標とするため、乳がん細胞群の薬剤への感受性をより正確に決定することができる。

[0090] また、実施形態の方法によれば、偽陰性及び偽陽性を防止して正確に決定することができる。その理由の一例について図 5 を用いて説明する。

[0091] 例えば、図 5 の（a）に示す 3 種類の細胞群、即ち、
細胞群 A：マーカー遺伝子の発現量が多い細胞 8 a を 4 個、マーカー遺伝子を発現しない細胞 8 c を 5 個含む、
細胞群 B：マーカー遺伝子の発現量が少ない細胞 8 b を 4 個、細胞 8 c を 5 個含む、
細胞群 C：マーカー遺伝子の発現量が多い細胞 8 a を 1 個、細胞 8 c を 9 個含む

を用いる場合、培養する前（培養0時間）においては、図5の（b）に示すように、細胞群全体としてのマーカー遺伝子発現量は、細胞群Aは高く、細胞群B、Cでは低くなり得る。このことから、従来のような、培養を行わず且つ細胞数を数えないPCR法やマイクロアレイ法を用いた場合では、細胞群Bは、マーカー遺伝子を発現する細胞数が細胞群Aと同じであるのにも関わらず陰性と判定される場合がある（偽陰性）。また、細胞群Bと細胞群Cとを比較した場合、細胞群Cはマーカー遺伝子を発現する細胞数が少ないにも関わらずマーカー遺伝子を発現量は細胞群Bと同等の結果となり、薬剤感受性の決定結果が細胞群Bと同じと判定される場合がある（偽陽性）。

[0092] 一方で、実施形態の方法によれば、第1核酸を用いて生きた乳がん細胞のプロモーター活性を検出し、更に培養工程S2を行うことにより、培養期間中にレポータータンパク質が発現し続ける。培養後ではマーカー遺伝子の発現は増強された信号として検出できるため、図5の（c）に示すように細胞群Bにおける細胞8bも細胞8aと同様に信号発生細胞9として検出することができる。その結果、図5の（d）に示すように信号発生細胞の数は、細胞群Bは細胞群Aと同様に薬剤への感受性が有る又は感受性が高いと判定することができる。一方で信号が得られた細胞の少ない細胞群Cを薬剤感受性が無い又は低いと判定することができる。

[0093] 細胞群Cのようにマーカー遺伝子を多く発現する細胞が僅かに存在するよりも、細胞群Bのように微弱にマーカー遺伝子を発現する細胞数が多い方が、乳がん細胞群全体としての薬剤に対する感受性が高い場合が多い。例えば、マーカー遺伝子の発現量の少ない細胞8bが、将来発現量の多い細胞8aになり得ることも考えられる。また例えば、細胞群Cにおける細胞8aは外れ値、異常値であることも考えられる。

[0094] したがって、実施形態の方法によれば、細胞群Bのように少なくともマーカー遺伝子が発現している細胞を多く含む乳がん細胞群を偽陰性とせず陽性として検出し、細胞群Cのようにマーカー遺伝子が発現している細胞数が少ない乳がん細胞群を偽陽性とせず陰性として検出することができる。そのた

め、正確に薬剤感受性を決定することが可能である。乳がん細胞群に含まれる細胞数やマーカー遺伝子の発現量は、図5に示すものに限定されるものではない。

[0095] 以上のことから、第1実施形態の方法によれば、偽陰性及び偽陽性を防止し、正確に乳がん細胞群の薬剤感受性を決定することが可能である。

[0096] 更なる実施形態によれば、乳がん細胞群として対象由来の乳がん細胞群を用いる場合、第1実施形態の方法で得られた乳がん細胞群（培養細胞）の薬剤感受性の決定結果は、対象の体内に存在する乳がんの薬剤への感受性の決定を補助するために用いられ得る。

[0097] ・第2実施形態

第2実施形態によれば、対象の体内に存在する乳がんの薬剤への感受性を決定、例えば、診断する方法が提供される。この方法は、図6に示すように、上記工程S1～S5に加え、決定工程S5（ここでは、「第1決定工程S5」と称する）の結果から、当該対象の体内に存在している乳がんの薬剤への感受性の有無又は程度を決定する第2決定工程S6を含む。

[0098] この方法において使用される乳がん細胞群は、当該対象から採取したものである。例えば、この乳がん細胞群における結果を対象の体内の乳がんの代表値とみなすことができる。

[0099] 従って、例えば、第1決定工程S5で乳がん細胞群に特定の薬剤への感受性がある又は感受性が高いと決定した場合、第2決定工程S6において当該対象の体内の乳がんにおいても同様に当該薬剤への感受性がある又は高いと決定することができる。反対に、第1決定工程S5で乳がん細胞群に特定の薬剤への感受性が無い又は感受性が低いと決定した場合、第2決定工程S6において当該対象の体内の乳がんにおいても同様に当該薬剤への感受性が無い又は低いと決定することができる。

[0100] 第2実施形態の方法も偽陰性及び偽陽性を防止し、正確に対象の体内の乳がんの薬剤への感受性を決定することが可能である。

[0101] 更なる実施形態において、第1決定工程S5及び／又は第2決定工程S6

の結果に応じて、対象へ投与する薬剤を選択してもよい。この方法は、例えば、図7に示すように、第1決定工程S5又は第2決定工程S6の後に、対象へ投与する薬剤を選択する第3決定工程S7を含む。

[0102] 第3決定工程S7は、例えば、第1決定工程S5又は第2決定工程S6で決定された乳がん細胞群又は対象の乳がんの特定の薬剤への感受性の有無又は感受性の高さの程度から、当該薬剤を当該対象に投与するか否かを決定すること、他の薬剤を当該対象に投与するか否かを決定すること、又はそれらの薬剤の投与計画を決定すること等を含む。

[0103] 実施形態の方法によれば、より正確に適切な薬剤を選択することが可能である。本方法によれば、偽陰性及び偽陽性を防止できるため、対象に対して不適切な薬剤を選択することが防止される。

[0104] 更なる実施形態において、第2決定工程S6は、計数工程S4の後、第1決定工程S5を行わずに行われてもよい。即ち、計数工程S4において得られた薬剤感受性細胞の数及び存在率から、対象の体内の乳がんの薬剤感受性を決定してもよい。

[0105] ・第3実施形態

第3実施形態において、複数種類のプロモーター配列を用いた方法が提供される。第3実施形態の方法によれば、複数種類のプロモーター配列について同時に発現レベルを調査することができる。例えば、(i) 複数種類のプロモーター配列として、互いに異なる複数の薬剤にそれぞれ対応する複数の感受性予測マーカー遺伝子のプロモーター配列を選択することにより、1つの乳がん細胞群について複数の薬剤への感受性を決定することができる。或いは、(ii) 複数種類のプロモーター配列として、1種の薬剤に対応する複数種類の感受性予測マーカー遺伝子のプロモーター配列を選択することにより、当該1種の薬剤への感受性を更に正確に決定することも可能である。

[0106] 第3実施形態に用いる第1核酸は、乳がん細胞の薬剤への感受性を決定するための第1～第nのマーカー遺伝子の各プロモーター配列（以下、「前記第1～第nのプロモーター配列」と称する）と、第1～第nのプロモーター

配列の下流にそれぞれ機能可能に連結された第1～第nのレポーター遺伝子とを有する。第1～第nのプロモーター配列は互いに異なり、第1～第nのレポーター遺伝子は互いに異なり、nは2以上の自然数である。

[0107] このような第1核酸の一例について図8を用いて説明する。例えば、第1核酸30は、2つのレポーター遺伝子発現ユニットを有する。第1レポーター発現ユニットU1は、第1プロモーター配列31と、第1レポーター遺伝子32と、第1転写終結配列33とを含む。第2レポーター発現ユニットU2は、第2プロモーター配列34と、第2レポーター遺伝子35と、第2転写終結配列36とを含む。

[0108] 第1プロモーター配列31及び第2プロモーター配列34は、互いに異なるマーカー遺伝子のプロモーター配列をそれぞれ含む。ここで、第1プロモーター配列31及び第2プロモーター配列34は、互いに異なる2つの薬剤の感受性をそれぞれ決定するためのマーカー遺伝子のプロモーター配列（上記（i）に対応）であってもよいし、同じ薬剤の感受性を決定するための、互いに異なる2つのマーカー遺伝子のプロモーター配列（上記（i i）に対応）であってもよい。例えば、薬剤及びマーカー遺伝子は、第1実施形態に列挙したものから選択され得る。

[0109] 第1レポーター遺伝子32及び第2レポーター遺伝子35は、互いに異なる種類のレポーター遺伝子であり、そこから発現するレポータータンパク質の信号は互いに異なるものであることが好ましい。これらのレポーター遺伝子は、第1実施形態で列挙したものから選択され得る。例えば、蛍光の波長が互いに異なる蛍光タンパク質遺伝子又は代謝物の発する蛍光の波長が互いに異なる発光酵素タンパク質遺伝子等を用いることが好ましい。

[0110] 第1転写終結配列33及び第2転写終結配列36は、それぞれ上記の何れかの転写終結配列から選択され、互いに同じ配列からなってもよいし、異なる配列からなってもよい。

[0111] この例において第1核酸30に含ませるレポーター発現ユニットの種類は、図8に示すように2種に限られるものではなく、3種以上を含んだ第1核

酸を用いてもよい。また、各レポーター発現ユニットの向き（5'側から3'側へ向かうか又は3'側から5'側へ向かうか）は、全てのユニットで同じである必要はなく、何れかが異なる向きで配置されてもよい。

[0112] 更なる実施形態において、第1核酸は、異なるレポーター遺伝子発現ユニットをそれぞれ含む複数のサブ核酸を含んでもよい。例えば、図9に示すように、第1レポーター発現ユニットU1を含む第1サブ核酸37aと、第2レポーター発現ユニットU2を含む第2サブ核酸37bとを用いてもよい。

[0113] 第1サブ核酸37a及び第2サブ核酸37bは、同じ脂質膜2に内包されて1種の脂質粒子1として調製されてもよい。その場合、各サブ核酸を核酸凝縮ペプチドで一度に凝縮して脂質膜2に内包してもよいし、別々に凝縮して脂質膜2に内包してもよい。或いは、第1サブ核酸37a及び第2サブ核酸37bは、別々の脂質膜2に内包されて2種の脂質粒子1として別々に調製されてもよい。

[0114] この例においても用いる複数のプロモーター配列の種類は図9に示すように2種に限られるものではなく、3種以上を用いてもよい。

[0115] また、本実施形態においても核酸の形態は図8、図9に示すように環状である必要はなく、直鎖状の核酸であってもよい。

[0116] 第3実施形態に係る方法は、例えば、図10に示すように、以下の工程を含む。

[0117] (S11) 脂質膜と、脂質膜に内包された第1核酸とを含む脂質粒子を乳がん細胞群に接触させる接触工程、

(S12) 乳がん細胞群を培養する培養工程、

(S13) 乳がん細胞群に含まれる各乳がん細胞において、第1～第nのレポーター遺伝子からそれぞれ発現する第1～第nのレポータータンパク質からの第1～第nの信号の有無又は量をそれぞれ検出する検出工程、及び

(S14) 検出工程の結果から、特性を有する乳がん細胞の数を第1～第nの信号毎に個別に計測する計数工程。

[0118] 接触工程S11は、第1核酸として複数のプロモーター配列を含むものを

用いることを除いて、上記接触工程 S 1 と同様に行うことができる。別々の脂質膜 2 に内包された第 1 サブ核酸 3 7 a 及び第 2 サブ核酸 3 7 b のような第 1 核酸を用いる場合は、乳がん細胞群に同時又は順次それぞれを内包する脂質粒子を接触させればよい。その時、培養時間を調節したり検出工程 S 1 3 を行う適切な時間を合わせたりするために、プロモーター強度が弱いマーカー遺伝子のプロモーター配列を含むサブ核酸をより早く導入し、プロモーター強度が強いマーカー遺伝子のプロモーター配列を含むサブ核酸をより遅く導入してもよい。

[0119] 培養工程 S 1 2 は、上記培養工程 S 2 と同様に行うことができる。

[0120] 検出工程 S 1 3 においては、各乳がん細胞から第 1 ～第 n の信号を個別に検出する。第 1 ～第 n の信号はそれぞれ上記検出工程 S 3 と同様の方法で検出する。例えば、信号が光学的信号である場合は、波長の異なる複数の光を検出することができる顕微鏡、光学センサ、カメラ等が用いられ得る。

[0121] 計数工程 S 1 4 は、第 1 ～第 n の信号毎に、計数工程 S 4 と同様の方法で薬剤感受性細胞の数を計測すればよい。

[0122] 例えば、培養を行いながら各信号を経時的に検出し、各信号において信号量が最大となるときの薬剤感受性細胞数を計測することが好ましい。その結果、複数のプロモーター配列の強度の差に従う最適な培養時間、検出時間の差に関わらず正確に細胞数を計測することができる。

[0123] 第 3 実施形態に係る方法は、図 1 1 に示すように、計数工程の結果から、乳がん細胞群の薬剤への感受性の有無又は程度を決定する決定工程（S 1 5）を更に含み得る。決定工程 S 1 5 においては、

（i）複数のプロモーター配列が複数種類の薬剤にそれぞれ対応するものである場合、第 1 ～第 n の信号の個別の検出によって得られた各薬剤感受性細胞の数又はその存在率から、上記決定工程 S 5 と同様に、複数種類の薬剤への感受性の有無又は程度を個別に決定する。それによって、複数の薬剤について同時に感受性を決定することができる。

[0124] （i i）複数のプロモーター配列が 1 種の薬剤に対応する複数のマーカー遺

伝子である場合、第 1 ～ 第 n の信号の個別の検出によって得られた各薬剤感受性細胞の数又はその存在率から、総合的に当該薬剤への感受性を決定してもよい。例えば、各信号における薬剤感受性細胞数の平均値から上記決定工程 S 5 と同様の方法で感受性を決定してもよい。それによって、1 種の薬剤に対する感受性をより正確に決定することができる。

[0125] 以上の工程により、複数のプロモーター配列を用いて乳がん細胞群の薬剤感受性を正確に決定することができる。

[0126] また、第 3 実施形態の方法は、第 2 の実施形態（例えば、図 6 及び図 7 に示す例）と同様に、対象の体内に存在する乳がんの薬剤への感受性を決定する第 2 決定工程、薬剤を選択する第 3 決定工程を更に含んでもよい。

[0127] ・第 4 実施形態

第 4 実施形態に係る方法は、腫瘍細胞の特性を決定する方法である。即ち、第 4 実施形態においては、第 1 実施形態に係る方法の乳がん細胞群に代えて他の腫瘍細胞群を用いてもよく、また第 1 実施形態に係る方法の薬剤への感受性に代えて、腫瘍細胞の他の特性を決定してもよい。

[0128] 第 4 実施形態に係る方法は、図 1 2 に示すように、例えば、次の工程を含む。

[0129] (S 2 1) 脂質膜と、脂質膜に内包された第 1 核酸とを含む脂質粒子を腫瘍細胞群に接触させる接触工程（第 1 核酸は、腫瘍細胞の特性を決定するためのマーカー遺伝子のプロモーター配列と、プロモーター配列の下流に機能可能に連結されたレポーター遺伝子とを有する）、

(S 2 2) 腫瘍細胞群を培養する培養工程、

(S 2 3) 腫瘍細胞群に含まれる各腫瘍細胞において、レポーター遺伝子から発現するレポータータンパク質からの信号の有無又は量を検出する検出工程、及び

(S 2 4) 検出工程の結果から、特性を有する腫瘍細胞の数を計測する計数工程。

[0130] 他の腫瘍とは、動物の体内に形成される何れかの悪性腫瘍であり、肺がん

、食道がん、胃がん、大腸がん、胆管がん、膵臓がん、肝臓がん、膀胱がん、卵巣がん、前立腺がん、脳腫瘍、肉腫、子宮体がん、子宮肉腫及び造血器悪性腫瘍等を含むが、これらに限定されるものではない。

[0131] 他の特性とは、例えば、腫瘍細胞の予後、転移性又は浸潤性等である。また、腫瘍細胞の特性とは、健常細胞が将来腫瘍細胞になるか否かも含む。

[0132] この例において、第1核酸3のプロモーター配列5として、所望の腫瘍における、所望の特性を決定するためのマーカー遺伝子のプロモーター配列を用いる。それらは、当分野で知られた所望の腫瘍に関するマーカー遺伝子、例えば、予後マーカー遺伝子、転移性マーカー遺伝子、浸潤性マーカー遺伝子又は腫瘍細胞マーカー遺伝子等のプロモーター配列であり得る。

[0133] レポーター遺伝子6及び転写終結配列7として、例えば、第1実施形態において列挙した何れかのものを用いることができる。

[0134] 脂質膜2の材料として、第1実施形態において説明したベース脂質、第1の脂質化合物、第2の脂質化合物及び／又は他の脂質を含むものを用いることができる。

[0135] 第4実施形態に従う方法の工程S21～S25は、上記工程S1～S5とそれぞれ同様に行うことができる。ただし、第1実施形態の方法の乳がん細胞群に代えて所望の腫瘍細胞群を用い、薬剤への感受性に代えて当該腫瘍細胞の他の特性を決定するマーカー遺伝子のプロモーター配列を含む第1核酸を用い、決定工程S25において所望の特性を決定する。

[0136] 第4実施形態に係る方法は、図13に示すように、計数工程の結果から、腫瘍細胞群の特性を決定する決定工程（S25）を更に含み得る。決定工程S25における腫瘍細胞の各特性の決定は、マーカー遺伝子の種類にしたがって当業者の知識にしたがって行うことが可能である。

[0137] 第4実施形態によれば、偽陰性及び偽陽性を防止して腫瘍細胞の特性をより正確に決定することができる。

[0138] また、第4実施形態の方法は、第2実施形態と同様の方法で、対象の体内に存在する腫瘍の特性を決定する工程を更に含んでもよい。また、第3実施

形態と同様の方法で、複数のプロモーター配列を用いて本方法を行ってもよい。

[0139] ・第5実施形態

(細胞培養検出デバイス)

第5実施形態において、上記第1～第4実施形態における培養工程、検出工程及び計数工程を行うための細胞培養検出デバイスが提供される。図14に示すように、細胞培養検出デバイス10は、例えば、試料収容部11と、光学センサ12とを備える。

[0140] 試料収容部11は、例えば、底部13と、底部13の周縁から立設する壁部14とを備え、上部が開放された液密な容器の形状を有する。底部13及び壁部14は、光透過性材料からなる。光透過性材料は、例えば、可視光、紫外線、赤外線、蛍光、又は化学、生物若しくは化学生物発光などの光を透過する材料であり得る。そのような材料の例は、例えば、ガラス、二酸化ケイ素、ポリスチレン又はポリジメチルシロキサン(PDMS)などを含む。

[0141] 或いは、例えば、試料収容部11として、市販のガラス、二酸化ケイ素、ポリスチレン又はポリジメチルシロキサン(PDMS)製のシャーレ、ディッシュ若しくはマルチウェルプレート等が使用されてもよい。

[0142] 試料収容部11の底部13上に細胞群15及び培地16等を収容し、細胞群15の培養を行うことができる。

[0143] 光学センサ12は、基板17上にマトリックス状に並ぶ複数のセンサ素子18を備える。センサ素子18は、マトリックス状に複数並ぶことによって全体として光学的信号を二次元的に検出できるセンサ面18aを形成している。

[0144] 図15に図14のA-A'に沿って切断した断面における3つのセンサ素子18の拡大図を示す。センサ素子18は、基板17の試料収容部11側の表面上に埋め込まれたセンシング部19を備える。センシング部19は、例えば、光学的信号を電気的信号に変換することで光を検知する受光素子であり、公知の何れかのものを使用することができる。センシング部19は、例

えば、フォトダイオードである。センシング部 19 の光学的信号を受け取るセンシング面 19 a が基板 17 の表面に露出している。

[0145] センシング部 19 のセンシング面 19 a 上には、例えば配線層 20 が設けられていてもよい。配線層 20 には、センシング部 19 で検知された光学的情報を伝達する一層又は複数層の配線 22 が配置されている。複数の配線 22 は、例えば、導体材料のビア 23 により互いに電氣的に接続されている。

[0146] 配線 22 及びビア 23 は、光透過層 21 内に設けられることによって所望の位置に固定されている。光透過層 21 は、例えば、 SiO_2 等の光透過性の材料からなる。配線 22 及びビア 23 は、光学センサ 12 を平面視したとき、試料収容部 11 からの光が光透過層 21 を介してセンシング部 19 まで到達するのを妨害しないような位置、例えば、隣り合う 2 つのセンシング部 19 の間に設けられる。

[0147] また配線 22 及びビア 23 は遮光部材としての役割を有し、センシング部 19 に、隣り合う他のセンサ素子 18 で検出されるべき光が侵入するのを防止して、検出の感度を向上させる。

[0148] 光透過層 21 の基板 17 と反対側の表面には、更に保護層 24 が設けられていてもよい。保護層 24 は、光透過層 21 の表面を保護するための部材であり、窒化シリコン膜などの光透過性の材料からなる。

[0149] なお、図 14 において隣り合うセンサ素子 18 の境界線として描写された実線は、センサ素子 18 の配列を表現するために便宜上描写されたものであり、必ずしもこれらの実線の部分にセンサ素子 18 を区画する部材を備えなくてもよい。

[0150] 当該光学センサ 12 は、例えば次のように半導体プロセスによって形成され得る。まず、基板 17 上のセンシング部 19 が形成される場所に、不純物を打ち込むことによりセンシング部 19 を形成する。続いてその上に、光透過層 21 を堆積する。配線 22 は、光透過層 21 を堆積する際に、その途中の所望の位置にビア 23 で接続しながら形成され得る。保護層 24 は、例えば CVD 法により光透過層 21 の表面に堆積することによって形成され得る。

。

- [0151] 各センサ素子 18 の、センサ面 18 a と平行な面における面積は、例えば、 $500\text{ nm} \times 500\text{ nm} \sim 10\text{ }\mu\text{ m} \times 10\text{ }\mu\text{ m}$ であり得る。光学センサ 12 に含まれるセンサ素子 18 の数は、約 100 個～1 億個であり得る。センサ素子 18 の数及び大きさは、例えば、試料収容部 11 に収容される細胞群 15 に含まれる細胞の大きさ、又は取得される画像の所望の解像度などによって決定され得、上記に限定されるものではない。センサ素子 18 の数及び大きさは、例えば、1 つの細胞からの光学的情報を 1 つのセンサ素子 18 で検出できるように調整されることが好ましい。
- [0152] 光学センサ 12 の厚さは、数 $\mu\text{ m}$ 、例えば、 $1\text{ }\mu\text{ m} \sim 4\text{ }\mu\text{ m}$ であり得るが、この範囲に限定されるものではない。
- [0153] 光学センサ 12 として、マトリックス状に並んだ複数のセンサ素子を備える市販の光学センサを使用してもよく、例えば、公知の何れかの CMOS センサを使用することも可能である。
- [0154] 試料収容部 11 は、光学センサ 12 のセンサ面 18 a 上に配置され、センサ面 18 a と底部 13 とが対向している。センサ面 18 a と底部 13 との間には間隙が設けられてもよく、センサ面 18 a と底部 13 との間の距離は、例えば、 $0 \sim 100\text{ }\mu\text{ m}$ とすることが好ましい。
- [0155] 本細胞培養検出デバイス 10 を用いて培養工程、検出工程及び計数工程を行う場合、まず、試料収容部 11 に培地 16 と、脂質粒子 1 と接触させた細胞群 15 とを収容する。次に細胞培養検出デバイス 10 を所望の培養条件に設定したインキュベータ等に入れて細胞群 15 を培養する（培養工程）。
- [0156] 検出工程及び計数工程は、例えば、図 14 に示すように光照射装置 25 により細胞群 15 に光を照射して行う。
- [0157] 光照射装置 25 に備えられた光源 26 は、例えば、赤色光、緑色光、青色光、白色光などの可視光、紫外光及び赤外光、並びにこれらの中から選択される 2 つ以上の組み合わせなどの光を発する光源である。光源 26 は、例えば、有機 EL、LED 又はレーザーなどである。

- [0158] 光照射装置 25 は、細胞培養検出デバイス 10 に固定されていてもよいし、固定されず別体として用意されてもよい。
- [0159] 光源 26 から照射する光の種類は、レポータータンパク質の種類に応じて選択される。例えば、レポータータンパク質が蛍光タンパク質である場合、光は、それ自体から生じる蛍光の励起光である。レポータータンパク質が発光酵素タンパク質である場合、発光酵素タンパク質の代謝物から生じる蛍光の励起光である。又は、光は明視野観察を行うための光であってもよい。
- [0160] 光は、例えば、図 14 に示すように底部 13 と平行な向きで照射することが好ましい。その結果、光は壁部 14 を介して細胞群 15 に照射され、細胞群 15 に当たって散乱する。生じた散乱光のうち、下方に散乱した光を光学センサ 12 で検出する。このような照射によれば、試料収容部 11 の上部等から光を照射した場合と比較してノイズとなる光が生じにくく、高感度な検出が可能である。
- [0161] 光学センサ 12 は、複数のセンサ素子 18 によって試料収容部 11 に収容された細胞群 15 からの光学的情報を二次元的な位置情報と結びつけて得ることができる。例えば、信号が得られたセンサ素子 18 の位置及び数から、所望の細胞の数を計測することができる。例えば、全てのセンサ素子 18 から得られた検出結果から画像又は映像を作成してもよい。
- [0162] 例えば、光学的信号が蛍光である場合は、明視野条件において検出を行って細胞群 15 に含まれる全細胞数を計測し、次に暗視野条件で励起光を照射して光学的信号を検出し、信号発生細胞の数を計測する。レポーター遺伝子 6 が発光酵素タンパク質遺伝子である場合、検出工程に先立ち試料収容部 11 に酵素の基質を添加する工程を更に含む。或いは、レポーター遺伝子 6 が薬剤耐性遺伝子である場合は、まず明視野条件における検出を行って細胞群 15 に含まれる全細胞数を計測し、対応する薬剤を試料収容部 11 に添加して、明視野条件で検出を行って残った細胞の数を計測する。
- [0163] 検出工程及び計数工程は培養後に行ってもよいが、細胞培養検出デバイス 10 によれば試料収容部 11 で細胞を培養しながら簡単に経時的な検出を行

うことができる。

[0164] 以上に説明した細胞培養検出デバイス 10 を用いれば、培養工程中の経時的検出を簡単に行うことができ、また細胞の生存に適切な環境で細胞を維持しながら信号を検出することができるため、腫瘍細胞の特性をより正確に決定することが可能である。

[0165] 更なる実施形態において、光学センサ 12 は、複数種類のセンサ素子 18 を含んでもよい。複数種類のセンサ素子 18 は、例えば、図 15 に示すセンサ素子 18 のような第 1 センサ素子、表面又は内部に所望の波長の光を検出するためのフィルターを更に備える第 2 センサ素子、及び／又は第 2 センサ素子とは異なる波長の光を検出するためのフィルターを備える第 3 センサ素子等である。このような種類の異なるセンサ素子 18 を 1 種ずつ含むセンサ素子の集まりを含む 1 つの基本ブロックが二次元領域にマトリックス状に並んだ光学センサを用いてもよい。

[0166] また更なる実施形態において、試料収容部 11 は底部 13 を備えなくともよい。この例においては、光学センサ 12 のセンサ面 18 a 上に直接細胞群 15 を収容し、細胞群 15 が培養され得る。このような細胞培養検出デバイス 10 は、センサ面 18 a 上から立設する壁部 14 を備え得る。

[0167] この場合、センサ面 18 a と細胞群 15 とが接触しているため、光学的信号を検出するセンサ素子の他に細胞群 15 由来の電気的信号を検出する電気センサ素子又は細胞群 15 由来の化学物質や pH 等の化学的信号を検出する化学センサ素子等を更に含む上記基本ブロックを備える光学センサ 12 を用いてもよい。このような光学センサ 12 を用いることにより、例えば、レポータータンパク質からの電気的信号や化学的信号が得られた信号発生細胞の個数を計測することが可能である。

[0168] (キット)

更なる実施形態によれば、腫瘍細胞の特性を決定するためのキットが提供される。キットは、例えば、細胞培養検出デバイス 10 と脂質粒子 1 とを含む。

- [0169] 細胞培養検出デバイス 10 は、上記の何れかのものであればよい。
- [0170] 脂質粒子 1 は、上記の何れかのものであり、腫瘍細胞の特性を決定するための試薬として提供される。脂質粒子 1 は、例えば、適切な溶媒とともに容器に収容されて提供される。
- [0171] 当該試薬は、脂質粒子 1 の他に保管安定性を向上させる物質を更にも含む。保管安定性を向上させる物質は、限定されるものではないが、例えば、アルブミン、リポタンパク、アポリポタンパク、グロブリン等の糖タンパク等：pH 調整剤、緩衝化剤、張度調整剤等；フリーラジカルによるダメージを抑制する、 α -トコフェロールのような脂肪親和性フリーラジカルクエンチャー；脂質の過酸化損傷を抑制し、貯蔵安定性を改良するためのフェリオキサミンのような水溶性キレーター等の脂質保護剤等である。
- [0172] 試薬は、一般的な方法によって滅菌されていてもよい。また、試薬は、液体として提供されてもよいし、それを乾燥した粉末として提供されてもよい。粉末の試薬は、例えば、適切な液体に溶解することにより使用可能となる。
- [0173] 試薬中に含まれる脂質粒子 1 の濃度は、限定されるものではないが、0.01～30 質量%、好ましくは 0.05～10 質量%であることが好ましい。濃度は、目的に応じて適切に選択される。
- [0174] キットは、更に、レポータータンパク質からの信号を検出するための試薬を含んでもよい。例えば、当該試薬は、前記発光酵素タンパク質の基質又は薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤等を含む。
- [0175] (細胞特性決定システム)
- 更なる実施形態において、細胞特性決定システムが提供される。図 16 に示すように、細胞特性決定システム 100 は、例えば、細胞培養検出デバイス 10 と、光照射装置 25 と、処理装置 101 とを備える。処理装置 101 は、入力部 103 と、記憶部 40 と、プロセッサ 50 と、表示部 60 と、出力部 70 とを備える。入力部 103 と、記憶部 40 と、プロセッサ 50 と、表示部 60 と、出力部 70 とは、バス 102 を介して電氣的に接続されている。

る。

- [0176] 細胞培養検出デバイス 10 は、上に説明した通りである。細胞培養検出デバイス 10 は、細胞特性決定システム 100 に取り外し可能に取り付けることができる。細胞特性決定システム 100 に取り付けられると、光学センサ 12 が入力部 103 と電氣的に接続される。例えば、細胞培養検出デバイス 10 は光学センサ 12 の各センサ素子 18 と接続された図示しない複数のパッドを備え、各パッドと入力部 103 とが電氣的に接続される。
- [0177] 光照射装置 25 は、上に説明した通りである。光照射装置 25 に備えられた光源 26 は、試料収容部 11 に光を照射するように配置されている。
- [0178] 入力部 103 は、光学センサ 12 と電氣的に接続しており、光学センサ 12 から測定データを受信する。
- [0179] 記憶部 40 には、光学センサ 12 から得られた明視野測定データ 41 及び蛍光測定データ 42、明視野測定データ 41 及び蛍光測定データ 42 から全細胞数及び信号発生細胞数の個数をそれぞれ計測するための個数演算式 43、全粒子個数データ 44、信号発生細胞個数データ 45、各個数データから信号発生細胞の存在率を算出するための存在率演算式 46、信号発生細胞の存在率 47、存在率 47 から細胞特性を決定するための特性決定演算式 48、特性決定結果 49 及び／又はプログラム P 等が格納される。
- [0180] プログラム P には、光学センサ 12 で得られた明視野測定データ 41 及び蛍光測定データ 42 から所望の特性を有する腫瘍細胞の個数を計測し、腫瘍細胞の特性を評価する機能等を実現するためのプログラムが含まれる。プログラム P は、更に、光源 26 からの光のオンオフを制御するためのプログラム等を含んでもよい。
- [0181] プロセッサ 50 は、データ管理部 51、個数演算部 52、存在率演算部 53、評価部 54 及び光照射管理部 55 等を備える。データ管理部 51 は、入力部 103 経由で受信した測定データを記憶部 40 に格納する。個数演算部 52 は、例えば、プログラム P に基づいて個数演算式 43 を用いて明視野測定データ 41 から全粒子の個数を計測し、蛍光測定データ 42 から信号発生

細胞の個数を計測する。存在率演算部 53 は、例えば、プログラム P に基づいて存在率演算式 46 を用いて全粒子個数データ 44 及び信号発生細胞の個数データ 45 から信号発生細胞の存在率を算出する。評価部 53 は、例えば、プログラム P に基づいて特性決定演算式 48 を用いて存在率 47 から細胞特性を決定する。光照射管理部 55 は、プログラム P に基づいて出力部 70 を介して光照射装置 25 の光源 26 のオンオフを制御する。プロセッサ 50 は、例えば CPU である。

[0182] 表示部 60 は、ディスプレイ又はプリンター等を備え得る。

[0183] 出力部 70 は、光照射装置 25 と電氣的に接続されており、光照射管理部 55 からの命令を光照射装置 25 に出力する。

[0184] また細胞特性決定システム 100 は、細胞特性決定システム 100 の各操作の開始又は停止、及びパラメーターを入力するボタン、キーボード及びタッチパネル等を備えてもよい。これらは、例えば入力部 103 と電氣的に接続されている。

[0185] また、細胞特性決定システム 100 は、図示しない培養部を備えてもよい。培養部は、チャンバを備える。この場合、チャンバには、環境条件、例えば、温度、光条件、二酸化炭素濃度及び酸素濃度等を測定する各種環境センサと、チャンバ内のこれらの環境条件を調節するヒーター、照明及びガスポンプ等の設備が設けられている。プロセッサ 50 は環境センサの測定結果から、プログラムに基づいてチャンバ内の環境条件が培養工程に適切となるように出力部を介して上記各設備を制御する条件変更部を含み得る。例えば、細胞培養検出デバイス 10 をチャンバ内に取り付けると、チャンバ内で培養工程を行うことができ、また光学センサ 12 と入力部 103 とが電氣的に接続され得る。また、その場合光源 26 はチャンバ内に備えられ、試料収容部 11 に所望の方向から光を照射するように配置されてもよい。

[0186] 次に、細胞特性決定システム 100 を用いた方法について説明する。

[0187] まず、試料収容部 11 に培地 16 と細胞群 15 を収容し、培養工程を行う。培養工程後の細胞培養検出デバイス 10 を細胞特性決定システム 100 に

取り付ける。細胞特性決定システム 100 が培養部を含む場合は、細胞群 15 及び培地 16 を収容した細胞培養検出デバイス 10 を培養部に取り付けて培養工程を行ってもよい。

[0188] 次に、光照射管理部 55 が出力部 70 を介して光源 26 のスイッチオンを命令し、光源 26 から試料収容部 11 に光が照射される。そして、光学センサ 12 によって検出が行われ、明視野測定データ 41 及び蛍光測定データ 42 が得られる。各データは、データ管理部 51 によって入力部 103 を介して記憶部 40 に格納される。この時、全てのセンサ素子 18 の位置情報と結びつけられた各測定データが記憶部 40 に格納される。

[0189] 次に、プロセッサ 50 の個数演算部 52 において、記憶部 40 から明視野測定データ 41 及び個数演算式 43 が取り出され個数演算式 43 に基づいて全脂質粒子の個数が算出される。全粒子個数データ 44 は記憶部 40 に格納される。また、記憶部 40 から蛍光測定データ 42 及び個数演算式 43 が取り出され、個数演算式 43 に基づいて信号発生細胞の個数が算出される。信号発生細胞個数データ 45 は記憶部 40 に格納される。

[0190] 次に、プロセッサ 50 の存在率演算部 53 において、記憶部 40 から全粒子個数データ 44、信号発生細胞の個数データ 45 及び存在率演算式 46 が取り出され、信号発生細胞の存在率 47 が算出される。存在率 47 は、記憶部 40 に格納される。例えば、表示部 60 に存在率 47 が表示されてもよい。

[0191] 次に、プロセッサ 50 の評価部 53 において、記憶部から存在率 47 及び特性決定演算式 48 が取り出され、細胞特性が決定される。その結果は、特性決定結果 49 として記憶部 40 に格納され、また表示部 60 に表示される。

[0192] 例えば、特性決定演算式は、細胞の種類、マーカー遺伝子の種類、決定したい細胞特性によって異なり、これらの何れかの組み合わせに対応した複数の演算式が記憶部 40 に格納されていてもよい。例えば、入力部から操作者により入力された細胞の種類、マーカー遺伝子の種類、及び／又は決定した

い細胞特性に基づいて、特性決定演算式が選択され、それに基づいて細胞特性が決定されてもよい。

[0193] 上記各手順は、プログラムPにより自動的に行われてもよいし、本装置の操作者の入力等に従って行われてもよい。

[0194] 本システムによる方法の実行が終了した後、細胞培養検出デバイス10は細胞特性決定システム100から取り外され得る。

[0195] 本システムは、必ずしも細胞培養検出デバイス10を含む必要はなく、備え付けの試料収容部及び／又は光学センサを含む構成としてもよい。

[0196] 実施形態の細胞特性決定システムによれば、正確に腫瘍細胞の特性を決定することが可能である。

[0197] [例]

例1. レポーターベクターの作製

アンピシリン耐性遺伝子配列、C o l E 1 o r i g i n 配列、S V 4 0 o r i g i n 配列、S V 4 0 ポリA配列、N a n o L u c 遺伝子、B G H ポリA配列を含む基礎ベクターを用意した。基礎ベクターのN a n o L u c 遺伝子上流にあるS a c I サイト及びX h o I サイトで制限酵素処理を行って直線化し、0.8%アガロース電気泳動を行い、精製した。

[0198] H u m a n G e n o m i c D N A (N o v a g e n 社) を鋳型としてS T C 2 遺伝子のプロモーター配列を増幅するためのプライマーセット(表3に示す配列番号7、8)及びT O P 2 A 遺伝子のプロモーター配列を増幅するためのプライマーセット(表3に示す配列番号9、10)を用いてP C R 法(表4の条件)によってそれぞれ増幅した。増幅により、S T C 2 プロモーター配列(表1に示す配列番号1)及びT O P 2 A プロモーター配列(表2に示す配列番号2)がそれぞれ得られた。これらの増幅産物を0.8%アガロース電気泳動によって精製した。

[表3]

表3

プライマー名	配列	配列番号
STC2用 フォワードプライマー	TATCGATAGGTACCGAGCTCTAAAGTTGCCTTTCAAGCTCTGGC	7
STC2用 リバースプライマー	GATCGCAGATCTCGAGTCTTGGTATTAACCTCCCGTCGGG	8
Top2A用 フォワードプライマー	TATCGATAGGTACCGAGCTCTGCAAAGCCTTTCTACATCCTTCC	9
Top2A用 リバースプライマー	GATCGCAGATCTCGAGCTCAAGAACCCTGAAAGCGACTAA	10

[表4]

表4

温度	時間	35 cycle
98°C	3min	
98°C	10sec	
60°C	15sec	
68°C	1min	
68°C	10min	
4°C	∞	

[0199] InFusion (Takara社) を用いて、上記の直線化した基礎ベクターの ScaI/XhoI サイトに精製したプロモーター配列をそれぞれ連結し、STC2 レポーターベクター (図17) 及びTOP2A レポーターベクター (図18) を得た。

[0200] 例2. レポーターベクターを内包する脂質粒子の調製

STC2 レポーターベクターを含むDNA溶液、及びTOP2A レポーターベクターを含むDNA溶液にカチオン性ペプチドをそれぞれ加え、DNA-ペプチド凝縮体を形成した。

[0201] エタノール溶解脂質溶液 (FFT10/SST04/DOTAP/DOP E/コレステロール/PEG-DMG=37/15/10.5/10.5/30/2mol) を調製し、それに上記DNA-ペプチド凝集体をそれぞれ添加した。更に10mMのHEPES (pH7.3) を静かに添加した後、

遠心式限外ろ過で洗浄及び濃縮して、STC2レポーターベクター内包脂質粒子及びTOP2Aレポーターベクター内包脂質粒子を得た。各脂質粒子のDNA内包量は、Quant-iT（登録商標）PicoGreen dsDNA Assay Kit（サーモフィッシャー・サイエンティフィック製）で測定した。

[0202] 例3. レポーターベクターの細胞株への導入

・ヒト乳腺腫瘍由来細胞株への導入

タモキシフェン感受性のヒト乳腺腫瘍由来細胞株（MCF-7）、及びドキソルビシン感受性のヒト乳腺腫瘍由来細胞株（MDA-MB-231）を、カルチャーフラスコにおいて10%牛胎児血清（FBS）を添加した培地（MCF-7：MEM（GIBCO）、MDA-MB-231：DMEM（GIBCO））を用いて37℃、5%CO₂雰囲気下で付着培養した。

[0203] 培養後、培地を取り除き、PBSで洗浄した後、0.25%のTrypsin-EDTA処理により細胞を剥がした後、10%FBSを添加した培地に細胞を懸濁し、Trypsinを不活性化した。遠心で細胞を回収した後、 2.0×10^5 細胞/mLとなるように10%FBSを添加した培地に細胞を懸濁して、96ウェル培養ディッシュ（サーモフィッシャー・サイエンティフィック製）に、 4.0×10^4 細胞/ウェルとなるように、細胞懸濁液を200μLずつ加えた。この96ウェル培養ディッシュを2つ用意し、例2で作製した各レポーターベクター内包脂質粒子を、DNAが0.2μg/ウェルとなるようにそれぞれウェルに添加して、37℃、5%CO₂雰囲気下で培養した。

[0204] ・ヒト正常乳腺上皮細胞への導入

ヒト正常乳腺上皮細胞（HMEC）を、カルチャーフラスコで、Mammary Life（Lifeline Cell Technology社）を用いて37℃、5%CO₂雰囲気下で付着培養した。培養後、培地を取り除き、PBSで洗浄した後、0.25%のTrypsin-EDTA処理により細胞を剥がした後、Mammary Lifeに細胞を懸濁し、Try

p s i n を不活性化した。遠心で細胞を回収した後、 2.0×10^5 細胞/mL となるように M a m m a r y L i f e に細胞を懸濁して、96 ウェル培養ディッシュ（サーモフィッシャー・サイエンティフィック製）に、 4.0×10^4 細胞/ウェルとなるように、細胞懸濁液を $200 \mu\text{L}$ ずつ加えた。この96 ウェル培養ディッシュを2つ用意し、例2で作製した各レポーターベクター内包脂質粒子を、DNAが $0.2 \mu\text{g}$ /ウェルとなるようにそれぞれウェルに添加して、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 雰囲気下で培養した。

[0205] ・ N a n o L u c 発現量の測定（N a n o L u c 発光アッセイ）

プロモーターベクター内包脂質粒子と乳がん細胞とを混合してから24時間後、培養プレートインキュベータから取り出し、培地を取り除いた後、細胞をPBSで洗浄し、G l o L y s i s B u f f e r（P r o m e g a 社）を $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 加えて、 -80°C で30分間凍結させた。室温で融解させた後、細胞溶解液を 1.5 mL 遠心チューブに回収した。 15000 rpm で10分間遠心分離し、細胞残渣を沈殿させ、上清 $25 \mu\text{L}$ を96 ウェルプレート（B l a c k、N u n c）に分注した。ここにルシフェラーゼ基質溶液（N a n o G l o L u c i f e r a s e A s s a y S y s t e m, P r o m e g a 社）を $25 \mu\text{L}$ 添加し、混合した後、ルミノメーター（M i t h r a s L B 9 4 0、B e r t h o l d 社）を用いて、0.1秒当たりの1ウェルのあたりの発光量を測定した。

[0206] ・ プロモーター活性の比較結果

図19に、S T C 2 プロモーターベクター内包脂質粒子を導入した各乳がん細胞の N a n o L u c 発光強度（R L U）の測定結果を示す。タモキシフェン感受性乳がん細胞株である M C F - 7 の発光強度は約 $27 \times 10^5 \text{ R L U}$ であり、M D A - M B - 2 3 1（約 $0.5 \times 10^5 \text{ R L U}$ ）及び H M E C（約 $1 \times 10^5 \text{ R L U}$ ）と比較して明らかに高かった。この結果から S T C 2 プロモーターベクター内包粒子により、乳がん細胞のタモキシフェンへの感受性を決定できることが明らかとなった。

[0207] 図20に、T O P 2 A プロモーターベクター内包脂質粒子を導入した各乳

がん細胞の NanoLuc 発光強度の測定結果を示す。ドキソルビン感受性乳がん細胞株である MDA-MB-231 の発光強度は約 7.0×10^5 RLU であり、MCF-7 (約 3.5×10^5 RLU) 及び HMEC (約 0.6×10^5 RLU) と比較して明らかに高かった。この結果から TOP2A プロモーターベクター内包粒子により、乳がん細胞のドキソルビンへの感受性を決定できることが明らかとなった。

[0208] 例 4. レポーターベクターの患者乳がん検体細胞への導入

・検体細胞の調製及び DNA 内包脂質粒子による核酸の導入

乳がん罹患したヒトから外科的手術によって取り出された腫瘍の一部を乳がん検体として用いた（検体は、倫理委員会の承認を受けた臨床研究の実験計画に基づき、同意を得られた患者から摘出された手術検体の一部であり、適切な管理下で実験に使用した）。検体は、タモキシフェンへの感受性のある乳がん検体 A、ドキソルビンへの感受性のある乳がん検体 B、タモキシフェン及びドキソルビンのどちらにも感受性の無い検体 C であった。採取された後、MACS Tissue Storage Solution (Miltenyi Biotec 社) を入れたサンプル瓶中に保管し、4℃で運搬した。検体の細胞分散には、MACS Tissue Dissociation Kits (Miltenyi Biotec 社) を用いた。1%の BSA を含む RPMI 4.8 ml に対し、Kit に付属している酵素 H を $100 \mu\text{L}$ (Kit プロトコルの 1/2 量)、酵素 R を $20 \mu\text{L}$ (Kit プロトコルの 1/5 量) 加え、gentle MACS C Tube (Miltenyi Biotec 社) に検体とともに入れ、検体をはさみで細切した。これを gentle MACS-Oct Dissociator with heaters (Miltenyi Biotec) にセットし、乳がん検体用に設定したプログラム（表 5）を用いて細胞を分散した。

[表5]

表5

回転数	時間
+200rpm	8''
-200rpm	2''
+200rpm	2''
-200rpm	2''
+200rpm	10''
-200rpm	2''
+200rpm	7''
+20rpm	15'
+300rpm	13''
-300rpm	15''
+500rpm	15''
-500rpm	15''

[0209] 処理終了後の検体細胞分散液をセルストレイナー（ポアサイズ $70\mu\text{m}$ のナイロンフィルター、商品名：BD Falcon（登録商標））に通して遠心チューブに回収し、遠心した（ 300g 、5分、 4°C ）。上清を取り除いた後、赤血球を取り除くために溶血処理を行った。溶血処理は、 5ml の溶血バッファー（BD Pharm Lyse Lysing Buffer を滅菌水で $1/10$ 希釈したもの）に細胞を懸濁し、 37°C で2分間処理することによって行った。次いで再び遠心し（ 300g 、5分、 4°C ）、細胞を回収した。沈殿物を Mammary Life（Lifeline Cell Technology 社）に懸濁して、細胞数を計測した。細胞数の計測は、 $10\mu\text{L}$ の細胞液と $0.4\text{w/v}\%$ の Trypan Blue Solution（和光純薬工業製、販売元コード：207-17081）を $1:1$ で混合し、自動細胞計測装置 Countess（登録商標、Life Technologies 社）で計測し、細胞径 $5\sim 60\mu\text{m}$ の生細胞数が 5000 細胞／ウェル（ $15\mu\text{L}$ ／ウェル）となるように NanoCulture dish に播種した。

[0210] NanoCulture dish には、NanoCulture Dish MS パターン高接着、 35mm （NCD-HS35-5、ORGAN

O GENIX社) をコーティングしたものを用いた。コーティングは、NanoCulture dishに、3mmΦ、厚み2mmのガasketを置き、PBSでiMatrix-511 (ニッピ製、製品コード: 892011) を1/60希釈した溶液、及びAdhesamine (和光純薬工業製、販売元コード: 010-23201) を1/10希釈した溶液を15μL入れ、37℃で1時間静置することによって行った。各ウェルへの細胞の播種は、コーティング溶液を取り除いた後に行い、次いで37℃、5%CO₂の条件で培養した。この細胞培養物を2つ作成した。15分後、例2で作製した各プロモーターベクター内包脂質粒子をDNAが0.14μg/ウェルとなるようにウェルにそれぞれ添加して、37℃、5%CO₂雰囲気中で培養した。

[0211] ・ NanoLuc発現量の測定 (NanoLuc発光アッセイ)

レポーターベクター内包脂質粒子添加の24時間後、NanoCulture dishをインキュベータから取り出し、発光基質 (Nano-Glo Luciferase Assay Substrate、Promega社) を1/1000希釈となるように培地に加え、高感度冷却CCDカメラ (ImageM EX、浜松ホトニクス製) を装着した発光顕微鏡 (LuminoView LV200、Olympus製) を用いて細胞を観察し、明視野と暗視野の写真撮影した。画像処理は、MetaMorph (Molecular Device) を用いて行った。

[0212] ・ 検体細胞におけるSTC2/TOP2Aプロモーターの活性評価

図21、図22に示す通り、STC2プロモーターベクター内包脂質粒子によるNanoLuc発光細胞の写真では、タモキシフェン感受性のある検体Aで発光細胞が明らかに多く、例えば図21、図22に示す視野中では肉眼で約60個観察された。一方、検体Bでは発光細胞が2個、検体Cでは3個観察され、明らかに少なかった。図21及び図22は、それぞれJPG形式及びビットマップ形式の同一の写真である。

[0213] TOP2Aプロモーターベクター内包脂質粒子によるNanoLuc発光

細胞の写真においては、ドキソルビシン感受性の検体Bでは発光細胞数が明らかに多く、例えば図21、図22に示す視野中には肉眼で約70個観察された。一方で検体Aでは発光細胞2個、検体Cでは4個観察され、明らかに少なかった。

[0214] 以上の結果から、STC2プロモーターベクター内包脂質粒子及びTOP2Aプロモーターベクター内包脂質粒子を用いることによって生きた乳がん細胞で薬剤の感受性を測定することが可能であることが明らかとなった。

[0215] 例5. リアルタイムPCR法との比較

・プロモーターベクター内包脂質粒子使用した薬剤感受性の決定

例4の検体A、B、Cとは別の乳がん検体D、Eを用いて、例4と同様の方法によってSTC2プロモーターベクター内包脂質粒子を細胞に導入し、明視野及び暗視野での写真を撮影した。写真の画像処理を行うことによって発光が観察された細胞数を計測した。画像処理は、MetaMorph (Molecular Device) を用いて行った。次いで発光細胞の存在率をSTC2陽性細胞数／CMV陽性細胞数として算出した。

[0216] ・リアルタイムPCR法を用いた薬剤感受性の決定

例4で使用した細胞から、RNAを抽出した。RNA抽出は、RNeasy Mini Kit (Qiagen) で行い、操作は添付のマニュアルに従った。抽出されたRNA溶液は、分光光度計で260nmの吸光度を測定してRNA量を算出した。次いで、First-Strand cDNA synthesis kit (GE Healthcare社) を使用して逆転写PCRを行った。操作は添付のマニュアルに従って行った。各サンプルの全RNAが100ngになるように調製しcDNAを合成した。

[0217] cDNAから、Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystem社) とTaqMan probe Hs01063215__m1を用いて、StepOnePlus装置 (Applied Biosystems社) でSTC2の発現を検出した。PCRの増幅条件は、50℃2分間、95℃10分間の後、95℃15秒

間、60℃1分間を1サイクルとして、22サイクルまで測定し、増幅の有無を濁度によって測定した。

[0218] ・結果の比較

表6にプロモーターベクター内包脂質粒子使用した方法における発光細胞の存在率と、リアルタイムPCR法におけるSTC2の増幅産物の有無とを示す。

[表6]

表6

	リアルタイムPCRによる 増幅の有無	プロモーターベクター 内包脂質粒子による陽性細胞率
検体D	×	6.50%
検体E	○	5.70%

[0219] 検体D、検体Eともにプロモーターベクター内包脂質粒子使用した方法ではSTC2遺伝子の発現を検出できたが、PCR法では検体EのSTC2増幅産物が検出されたが、検体Dでは発現が検出されなかった。

[0220] 以上の結果から、実施形態に従うプロモーターベクター内包脂質粒子使用した方法ではPCR法を用いるよりも正確に乳がん細胞の薬剤感受性についての情報が得られることが示された。

[0221] 本発明の幾つかの実施形態を説明したが、これらの実施形態は、例として提示したものであり、発明の範囲を限定することは意図していない。これら新規な実施形態は、その他の様々な形態で実施されることが可能であり、発明の要旨を逸脱しない範囲で種々の省略、置き換え、変更を行うことができる。これらの実施形態やその変形は、発明の範囲や要旨に含まれるとともに、特許請求の範囲に記載された発明とその均等の範囲に含まれる。

符号の説明

[0222] 1…脂質粒子、2…脂質膜、3…第1核酸、5…プロモーター配列、6…レポーター遺伝子、9…信号発生細胞、10…細胞培養検出デバイス、11…試料収容部、12…光学センサ、13…底部、15…細胞群、

17…基板、18…センサ素子、19…センシング部、
30…第1核酸、31…第1プロモーター配列、32…第1レポーター遺伝子、
33…第1転写終結配列、34…第2プロモーター配列、35…第2レポーター遺伝子
36…第2転写終結配列

請求の範囲

- [請求項1] 腫瘍細胞群の特性を決定する方法であって、
脂質膜と、前記脂質膜に内包された第1核酸とを含む脂質粒子を前記腫瘍細胞群に接触させる接触工程（前記第1核酸は、前記特性を決定するためのマーカー遺伝子のプロモーター配列と、前記プロモーター配列の下流に機能可能に連結されたレポーター遺伝子とを有する）、
前記腫瘍細胞群を培養する培養工程、
前記腫瘍細胞群に含まれる各腫瘍細胞の、前記レポーター遺伝子から発現するレポータータンパク質からの信号の有無又は量を検出する検出工程、
前記検出工程の結果から、前記特性を有する前記腫瘍細胞の数を計測する計数工程
を含む方法。
- [請求項2] 前記計数工程の結果から、前記腫瘍細胞群の前記特性の有無又は程度を決定する第1決定工程を更に含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記腫瘍細胞群は、対象の体内の腫瘍から採取されたものであり、
前記計数工程の結果から、前記対象の体内における前記腫瘍の前記特性の有無又は程度を決定する第2決定工程を更に含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 前記腫瘍細胞群は、対象の体内の腫瘍から採取されたものであり、
前記第1決定工程の結果から、前記対象の体内における前記腫瘍の前記特性の有無又は程度を決定する第2決定工程を更に含む、請求項2に記載の方法。
- [請求項5] 前記第1決定工程の結果及び／又は前記第2決定工程の結果に基づいて、前記対象に投与するための薬剤を選択する第3決定工程を更に含む請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 前記計数工程は、前記腫瘍細胞群に含まれる全腫瘍細胞の数を計測

することを更に含み、

前記第 1 決定工程は、前記全腫瘍細胞の数及び前記特性を有する前記腫瘍細胞の数から前記特性を有する前記腫瘍細胞の存在率を算出し、前記存在率から、前記腫瘍細胞群の特性の有無又は程度を決定することを含む、

請求項 2、4 又は 5 の何れか 1 項に記載の方法。

[請求項7]

前記第 1 核酸は、前記特性を決定するための第 1 ～第 n のマーカー遺伝子の各プロモーター配列（以下、「前記第 1 ～第 n のプロモーター配列」と称する）と、前記第 1 ～第 n のプロモーター配列の下流にそれぞれ機能可能に連結された第 1 ～第 n のレポーター遺伝子とを有し、前記第 1 ～第 n のプロモーター配列は互いに異なり、前記第 1 ～第 n のレポーター遺伝子は互いに異なり、前記 n は 2 以上の自然数であり、

前記検出工程は、前記第 1 ～第 n のレポーター遺伝子からそれぞれ発現する第 1 ～第 n のレポータータンパク質からの第 1 ～第 n の信号をそれぞれ検出することを含み、

前記計数工程は、前記特性を有する前記腫瘍細胞の数を第 1 ～第 n の信号毎に個別に計測することを含む、

請求項 1 ～ 6 の何れか 1 項に記載の方法。

[請求項8]

前記特性は、薬剤への感受性、予後、転移性又は浸潤性である、請求項 1 ～ 7 の何れか 1 項に記載の方法。

[請求項9]

前記腫瘍細胞は乳がん細胞であり、前記特性は薬剤への感受性である、請求項 8 に記載の方法。

[請求項10]

前記薬剤はアントラサイクリン系薬剤、微小管作用薬、アルキル化薬、代謝拮抗薬、白金錯体、アロマターゼ阻害剤、LH-RH アゴニスト製剤、抗エストロゲン薬、黄体ホルモン薬又は分子標的薬である、請求項 9 に記載の方法。

[請求項11]

前記薬剤はアントラサイクリン系薬剤であり、前記マーカー遺伝子

はTOP2A、RARA、CDC6、THRA、GSDM1、PSMD3、CSF3、MED24、SNORD124、NR1D1、TRANSTOP-UCA、MSL-1、CASC3、RAPGEFL1、WIPF2、LOC100131821、GJD3、LOC390791、LOC728207、IGFBP4、TNS4、CCR7又はSMARCE1である、請求項10に記載の方法。

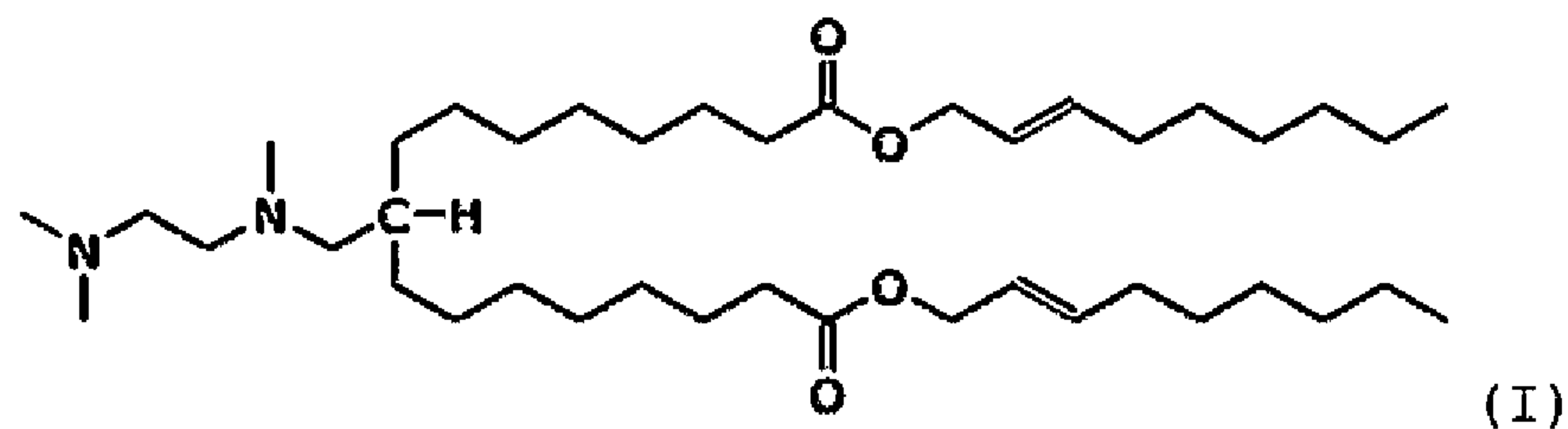
[請求項12]

前記薬剤はアロマターゼ阻害剤であり、前記マーカ遺伝子はSTC2、SLC39A6、CA12、ESR1、PDZK1、NPY1R、CD2、MAPT、QDPR、AZGP1、ABAT、ADCY1、CD3D、NAT1、MRPS30、DNAJC12、SCUBE2、KCNE4、DHA、ATP5J2、VDAC2、DARS、UCP2、UBE2Z、AK2、WIPF2、APPBP2又はTRIM2である、請求項10に記載の方法。

[請求項13]

前記脂質膜は、式(I)の脂質：

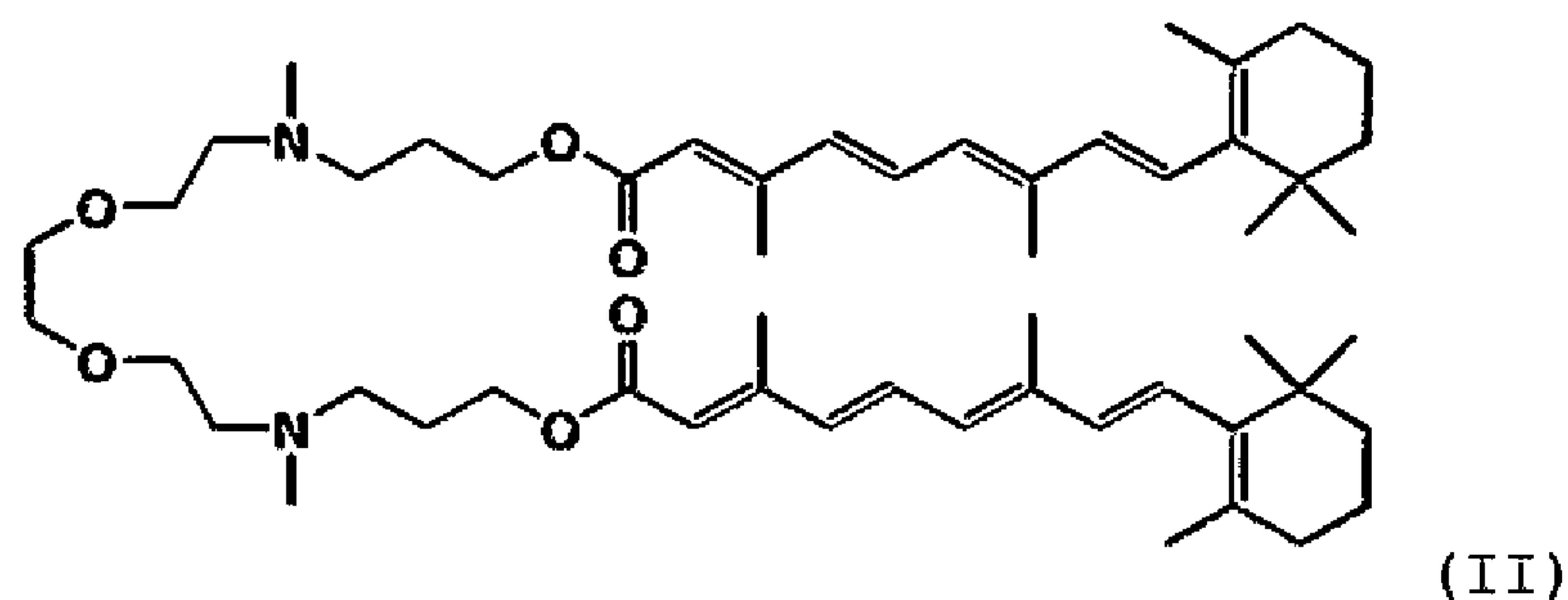
[化1]



及び／又は

式(II)の脂質：

[化2]



を含む、請求項 9 ～ 12 の何れか 1 項に記載の方法。

[請求項14] 前記検出工程における信号の検出は経時的に行われる、請求項 1 ～ 13 の何れか 1 項に記載の方法。

[請求項15] 少なくとも前記検出工程は、細胞培養検出デバイスを用いて行われ、

前記細胞培養検出デバイスは、二次元領域にマトリックス状に並ぶ複数のセンサ素子と、前記複数のセンサ素子と対向する光透過性の底部を有する試料収容部とを備える、

請求項 1 ～ 14 の何れか 1 項に記載の方法。

[請求項16] 腫瘍細胞群の特性を決定するためのキットであって、

脂質膜と、前記脂質膜に内包された第 1 核酸とを含む脂質粒子（前記第 1 核酸は、前記特性を決定するためのマーカー遺伝子のプロモーター配列と、前記プロモーター配列の下流に機能可能に連結されたレポーター遺伝子とを有する）、及び

二次元領域にマトリックス状に並ぶ複数のセンサ素子と、前記複数のセンサ素子と対向する光透過性の底部を有する試料収容部とを備える細胞培養検出デバイスと、

を含むキット。

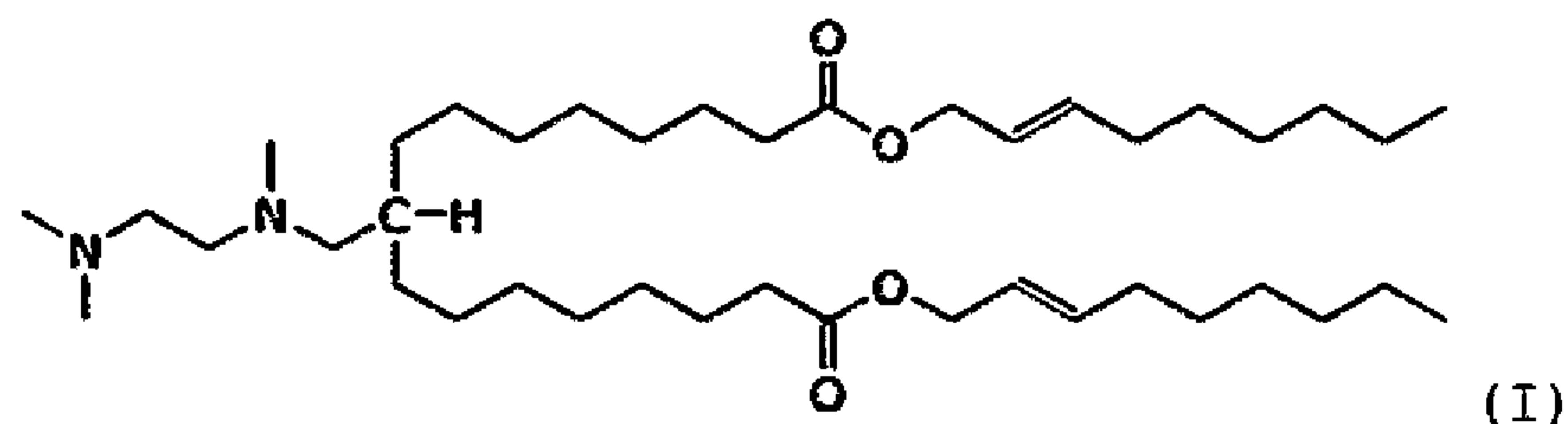
[請求項17] 前記レポーター遺伝子から発現するレポータータンパク質からの信号を検出するための試薬を更に含む請求項 16 に記載のキット。

[請求項18] 前記第 1 核酸は、前記特性を決定するための第 1 ～ 第 n のマーカー遺伝子の各プロモーター配列（以下、「前記第 1 ～ 第 n のプロモーター配列」と称する）と、前記第 1 ～ 第 n のプロモーター配列の下流にそれぞれ機能可能に連結された第 1 ～ 第 n のレポーター遺伝子とを有し、前記第 1 ～ 第 n のプロモーター配列は互いに異なり、前記第 1 ～ 第 n のレポーター遺伝子は互いに異なり、前記 n は 2 以上の自然数である、

請求項 16 又は 17 に記載のキット。

- [請求項19] 前記特性は、薬剤への感受性、予後、転移性又は浸潤性である、請求項16～18の何れか1項に記載のキット。
- [請求項20] 前記腫瘍細胞は乳がん細胞であり、前記特性は薬剤への感受性である、請求項19に記載のキット。
- [請求項21] 前記薬剤はアントラサイクリン系薬剤、微小管作用薬、アルキル化薬、代謝拮抗薬、白金錯体、アロマターゼ阻害剤、LH-RHアゴニスト製剤、抗エストロゲン薬、黄体ホルモン薬又は分子標的薬である、請求項20に記載のキット。
- [請求項22] 前記薬剤はアントラサイクリン系薬剤であり、前記マーカ―遺伝子はTOP2A、RARA、CDC6、THRA、GSDM1、PSMD3、CSF3、MED24、SNORD124、NR1D1、TRANSTOP-UCA、MSL-1、CASC3、RAPGEFL1、WIPF2、LOC100131821、GJD3、LOC390791、LOC728207、IGFBP4、TNS4、CCR7又はSMARCE1である、請求項21に記載のキット。
- [請求項23] 前記薬剤はアロマターゼ阻害剤であり、前記マーカ―遺伝子はSTC2、SLC39A6、CA12、ESR1、PDZK1、NPY1R、CD2、MAPT、QDPR、AZGP1、ABAT、ADCY1、CD3D、NAT1、MRPS30、DNAJC12、SCUBE2、KCNE4、DHA、ATP5J2、VDAC2、DARS、UCP2、UBE2Z、AK2、WIPF2、APPBP2又はTRIM2である、請求項21に記載のキット。
- [請求項24] 前記脂質膜は、式(I)の脂質：

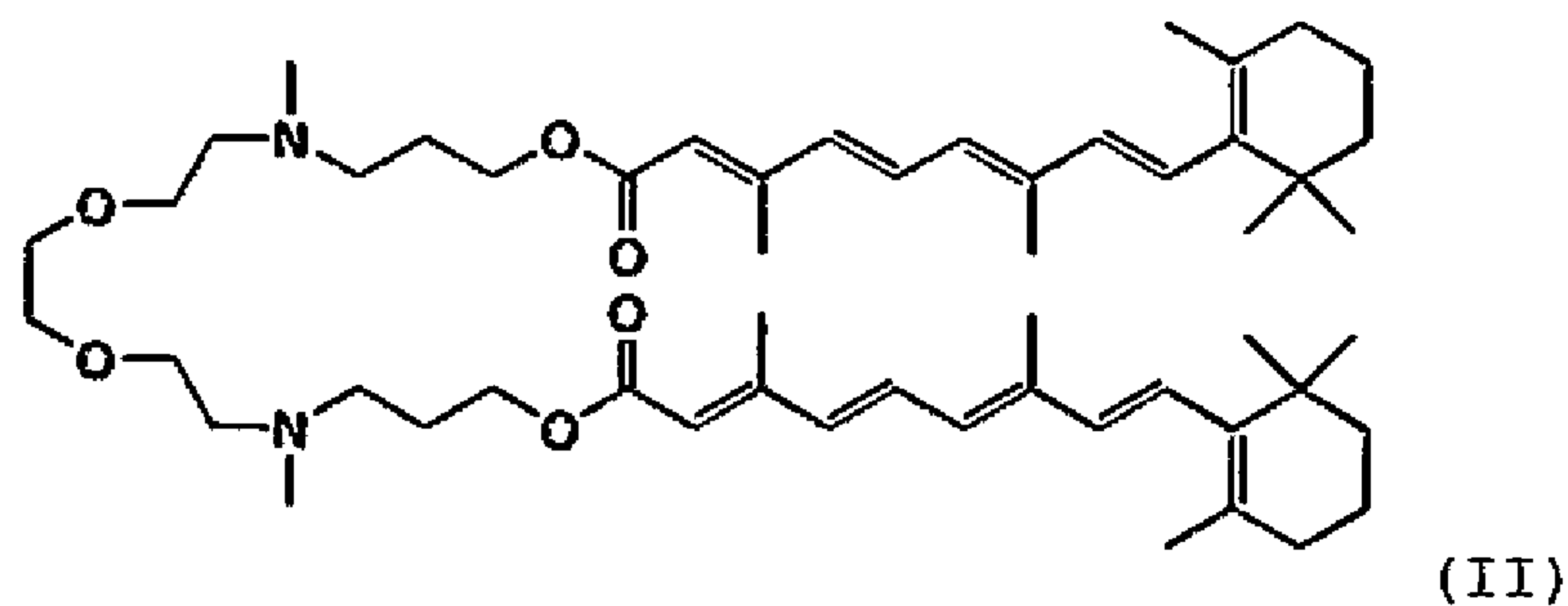
[化3]



及び／又は

式（ⅠⅠ）の脂質：

[化4]

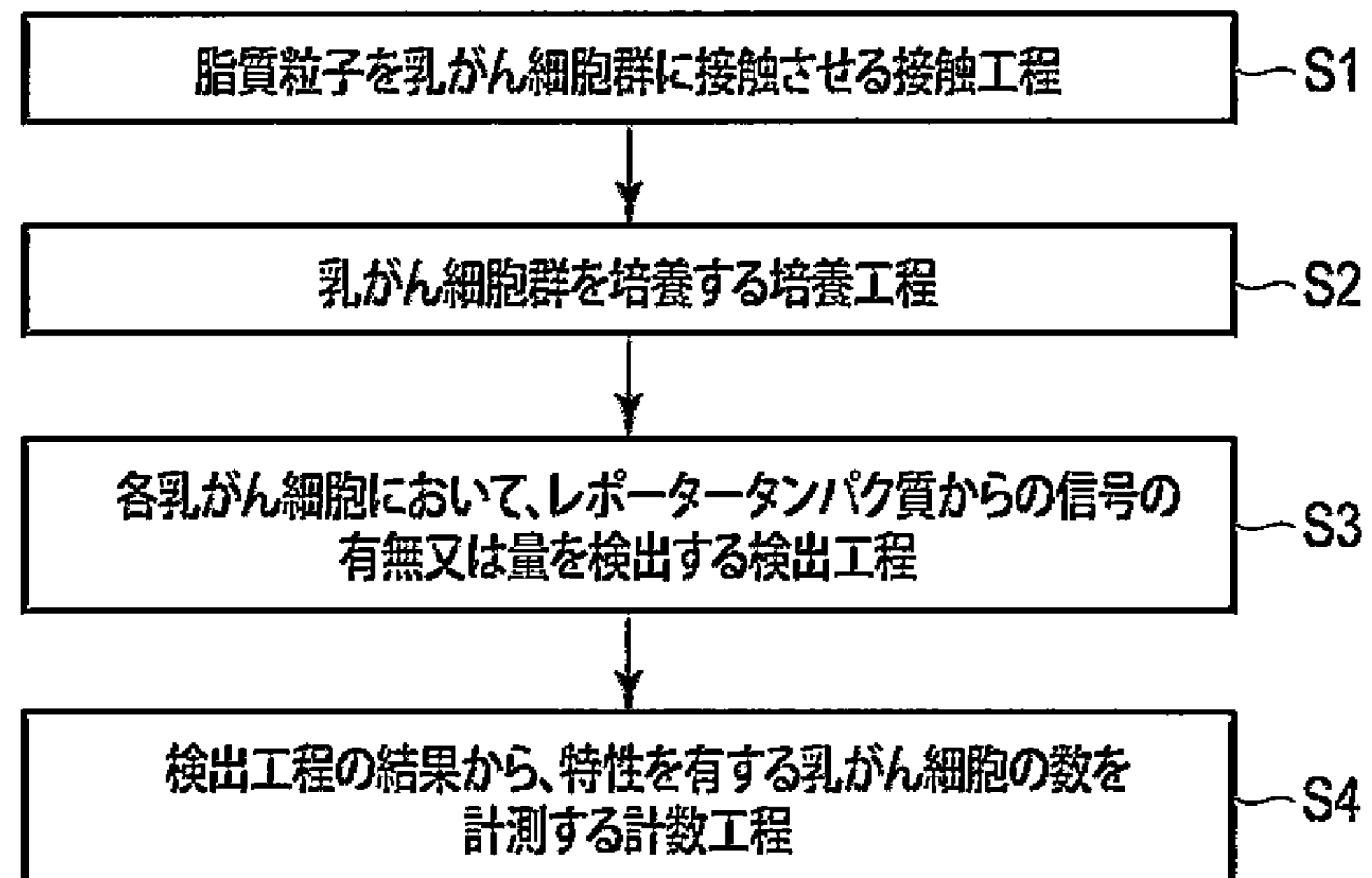


を含む、請求項 20～23 の何れか 1 項に記載のキット。

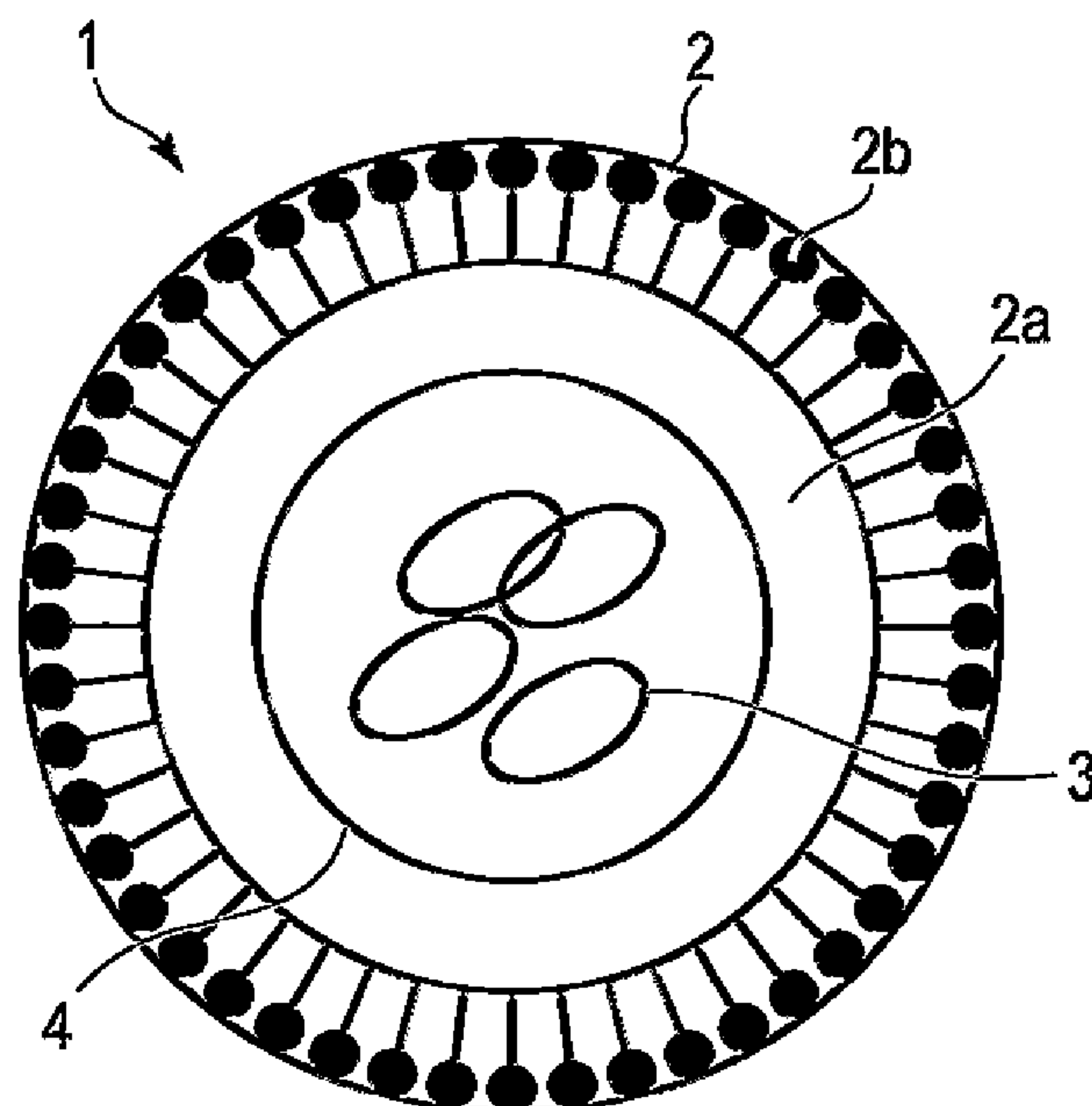
[請求項25] 請求項 16 に記載のキットを用いて得られた、腫瘍細胞群に含まれる各腫瘍細胞の前記レポーター遺伝子から発現するレポータータンパク質からの信号の有無又は量から、前記特性を有する前記腫瘍細胞を計数し、前記計数の結果から前記腫瘍細胞の前記特性を決定する機能を実現するためのプログラム。

[請求項26] 前記腫瘍細胞は乳がん細胞であり、前記特性は薬剤への感受性である、請求項 25 に記載のプログラム。

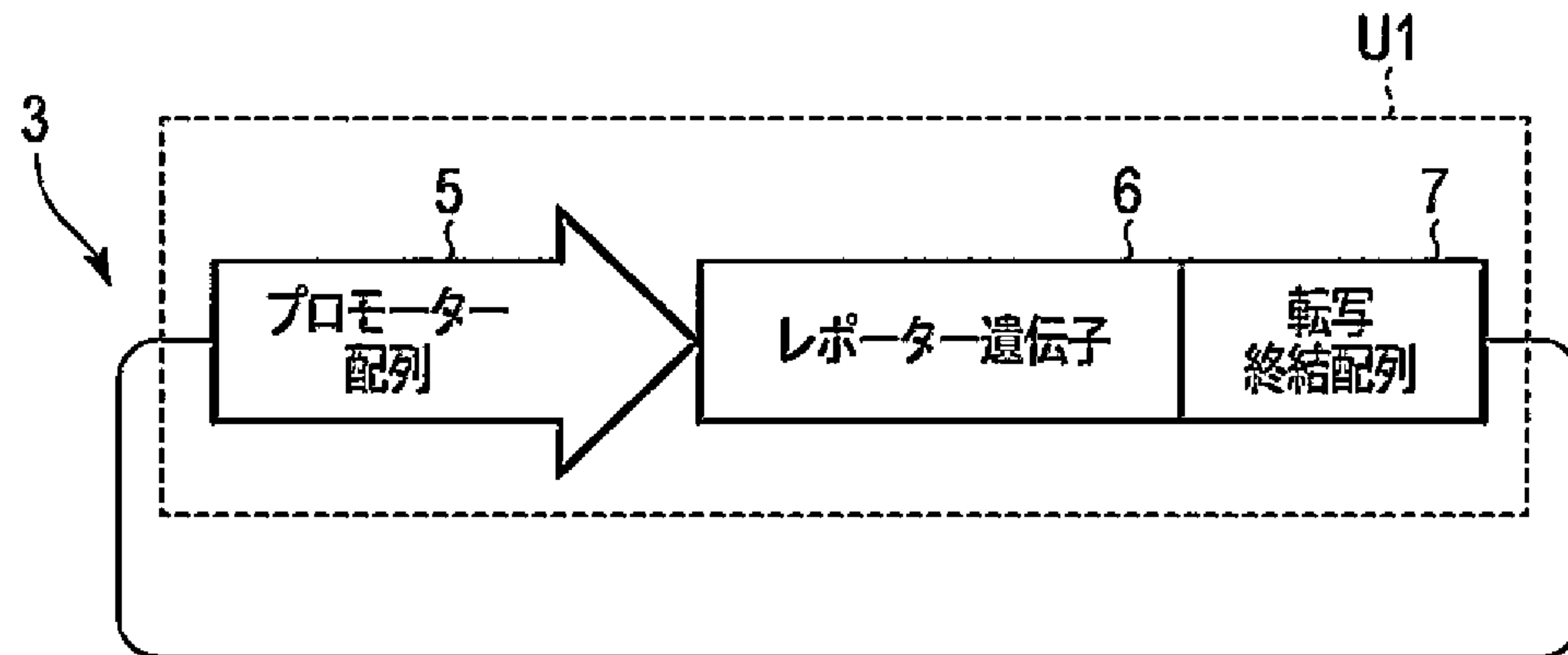
[図1]



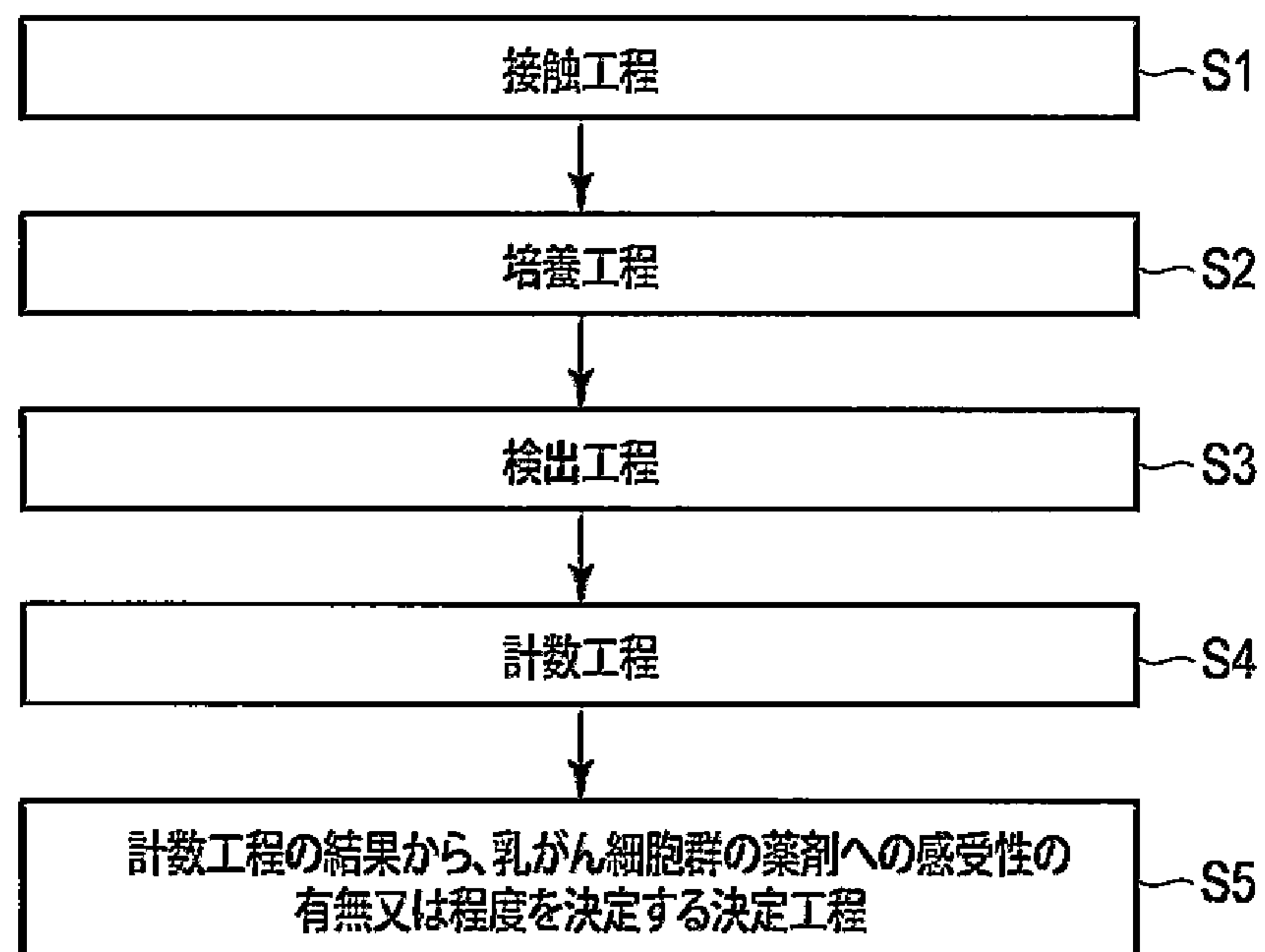
[図2]



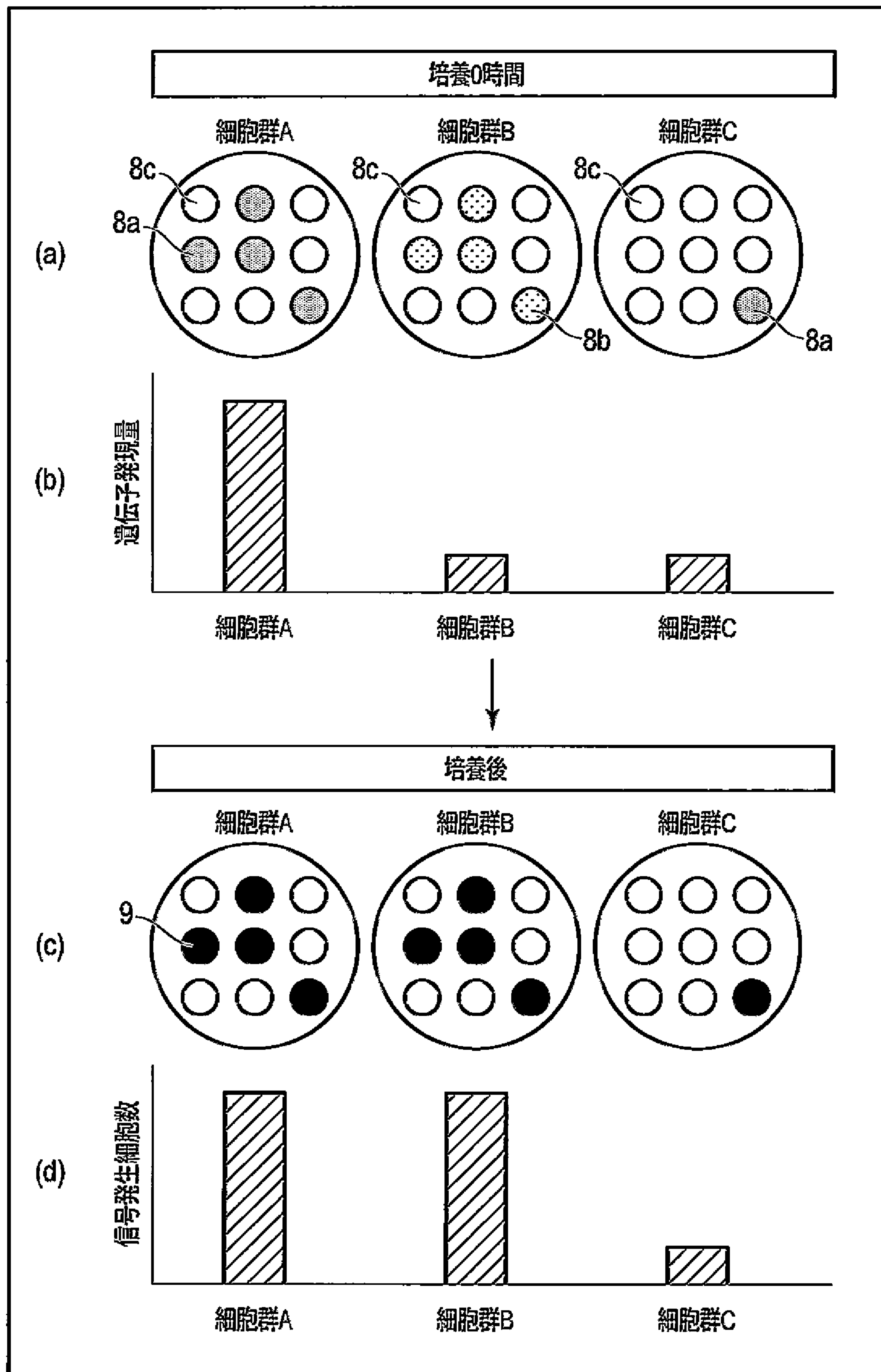
[図3]



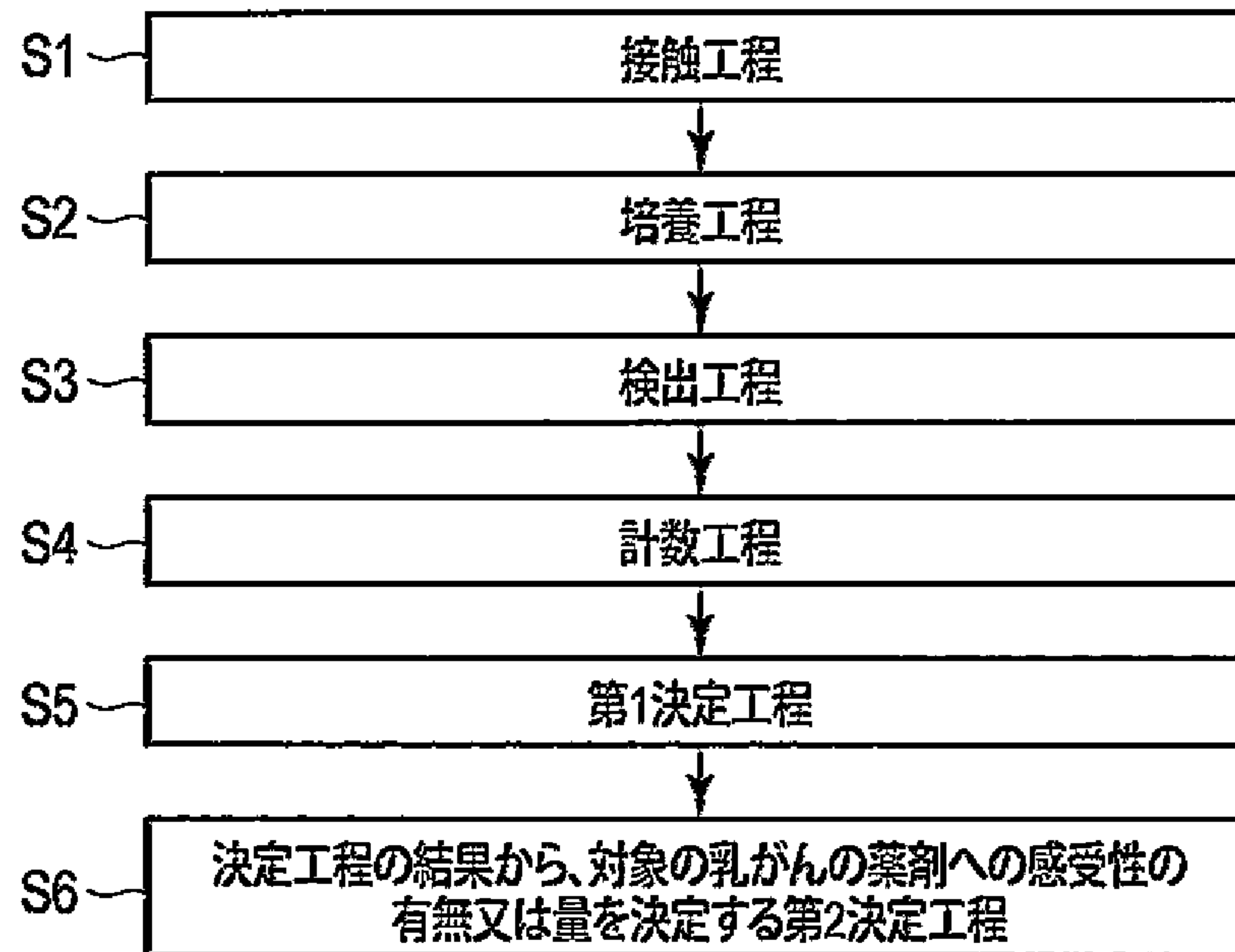
[図4]



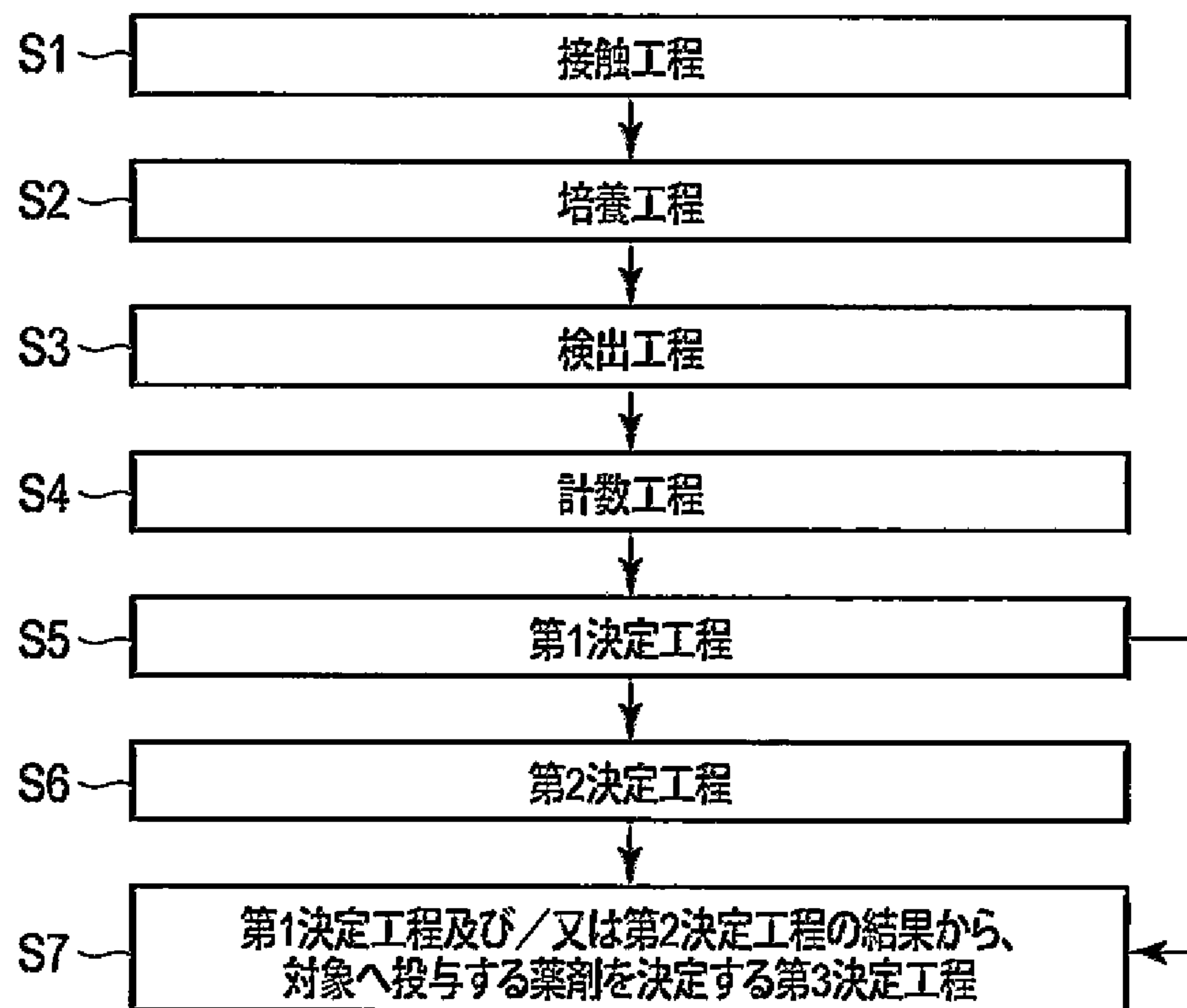
[図5]



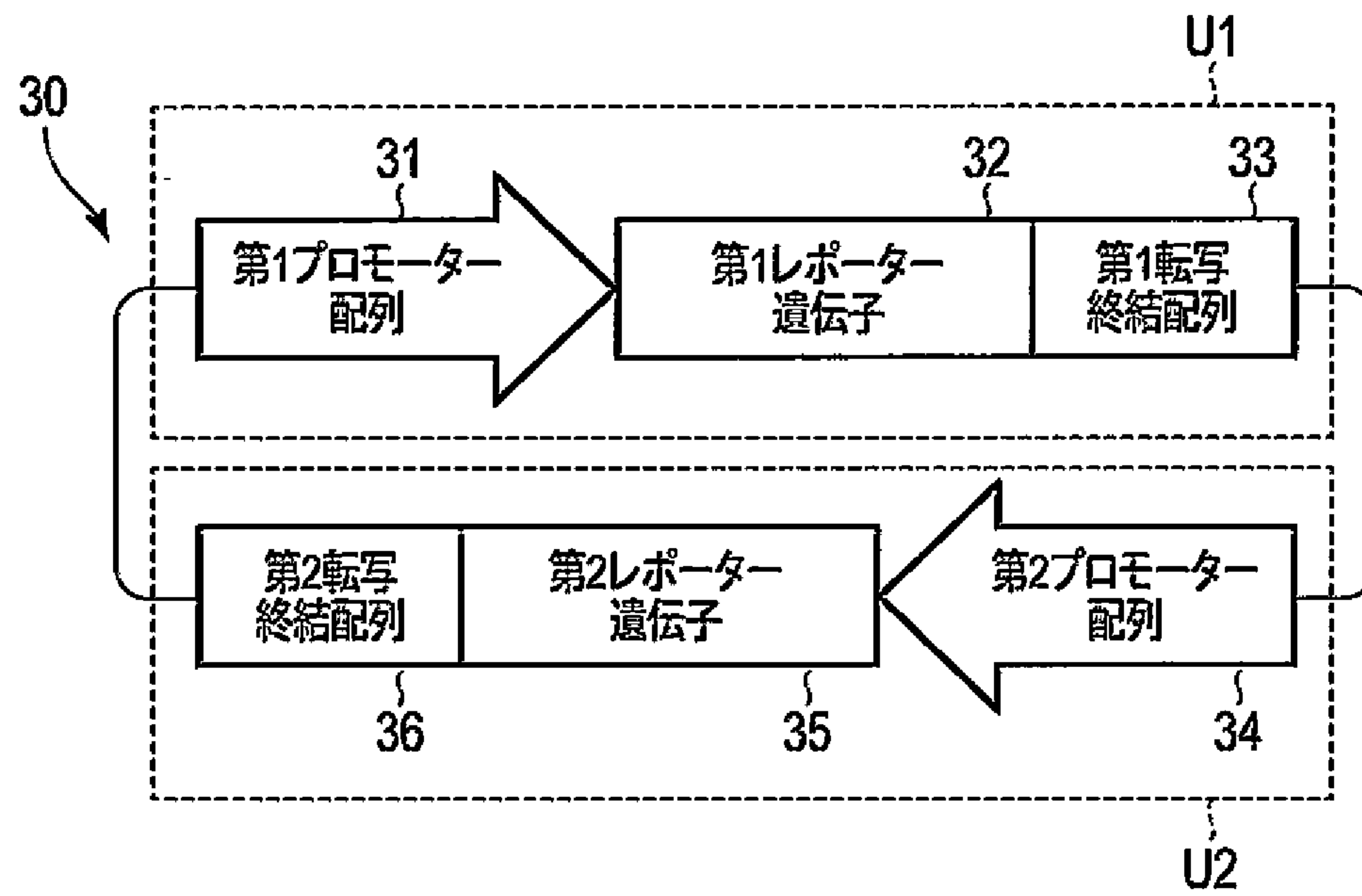
[図6]



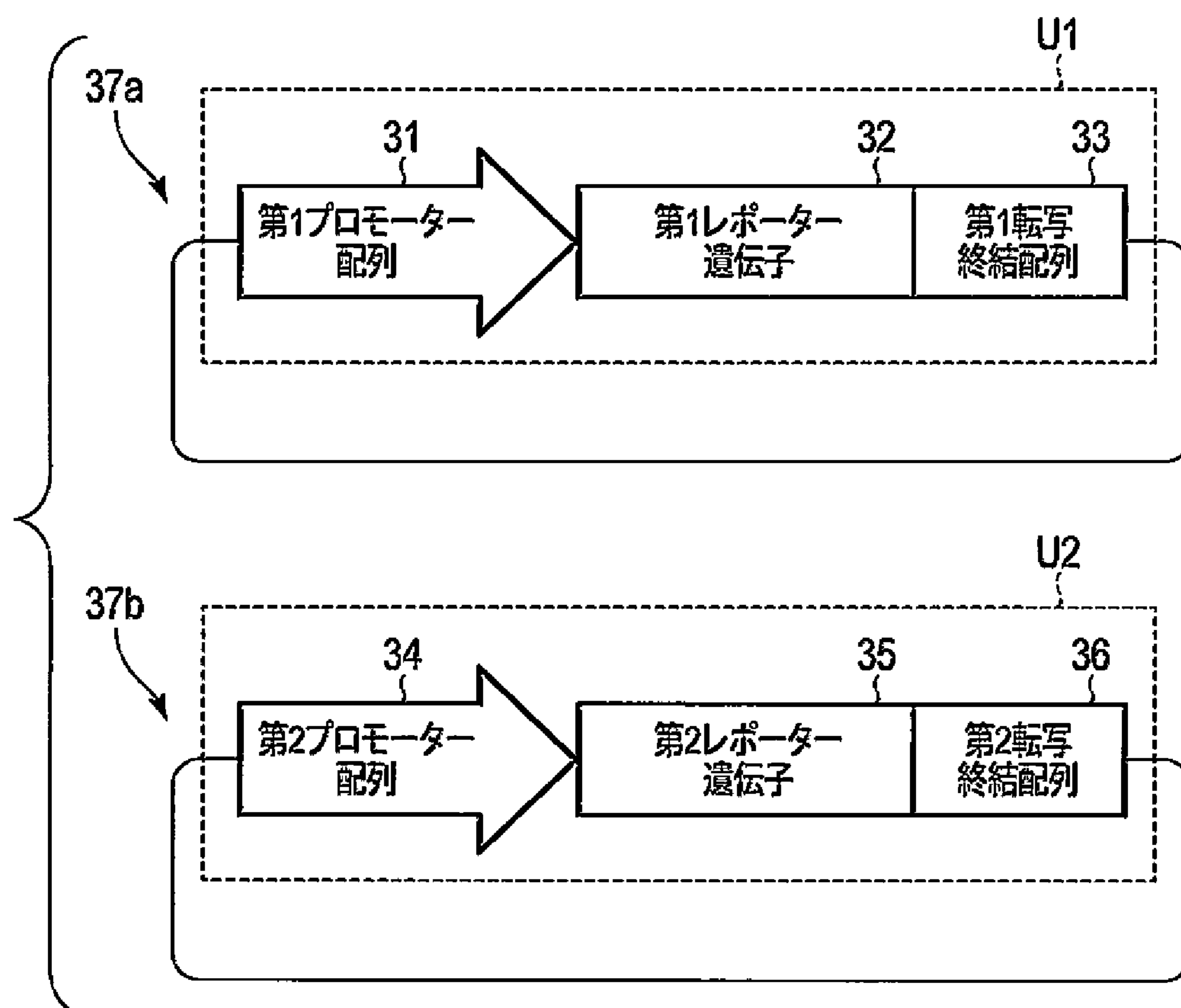
[図7]



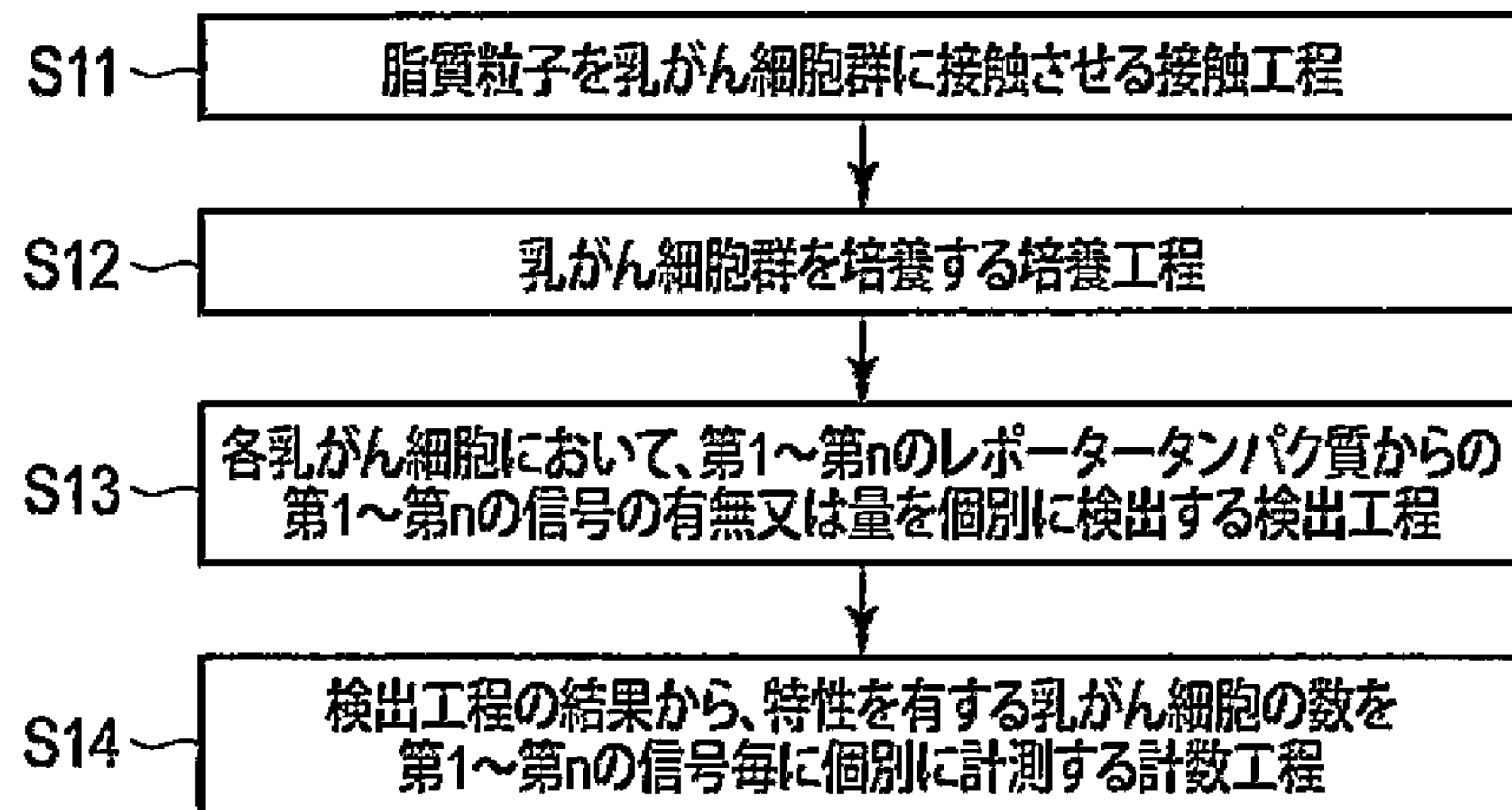
[図8]



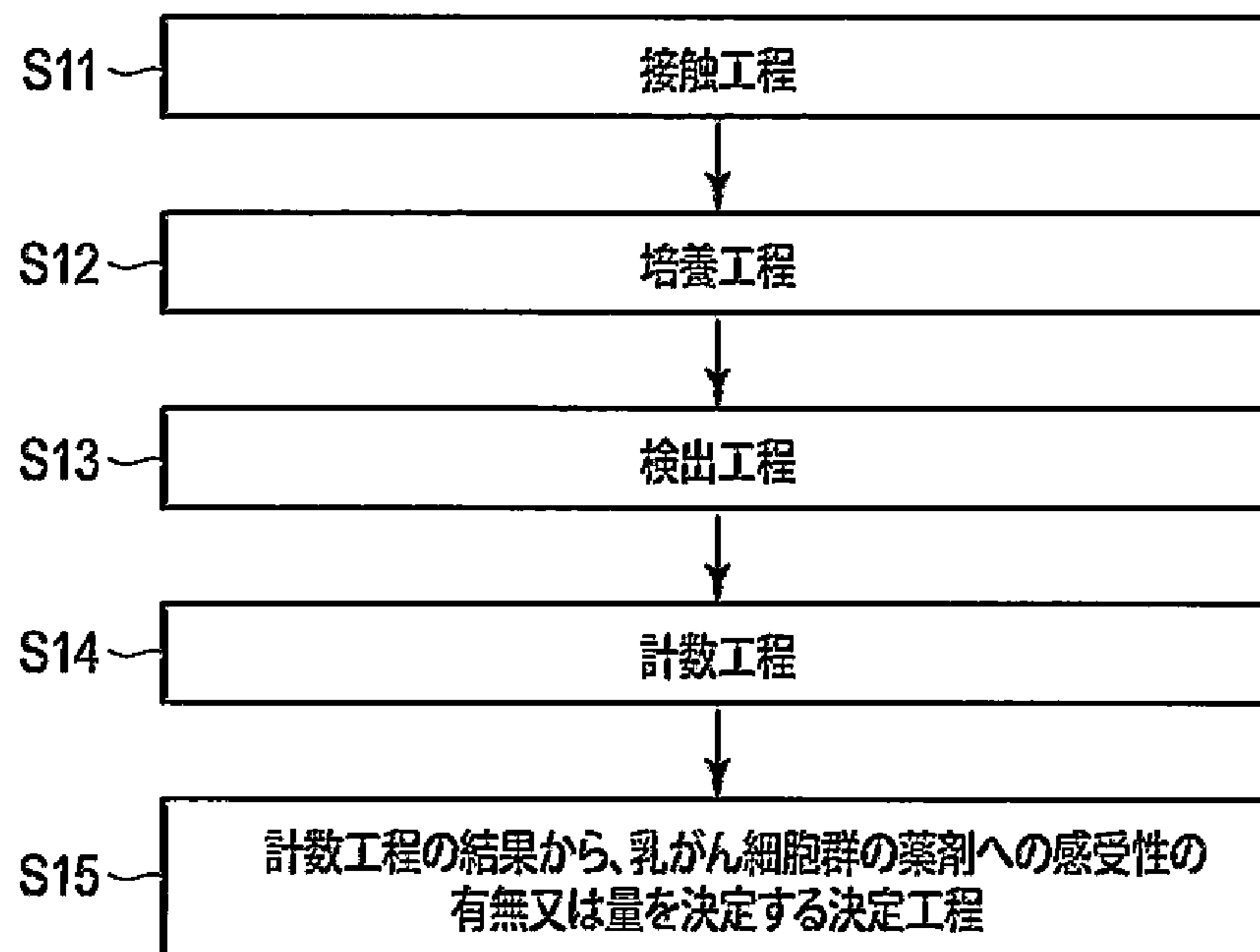
[図9]



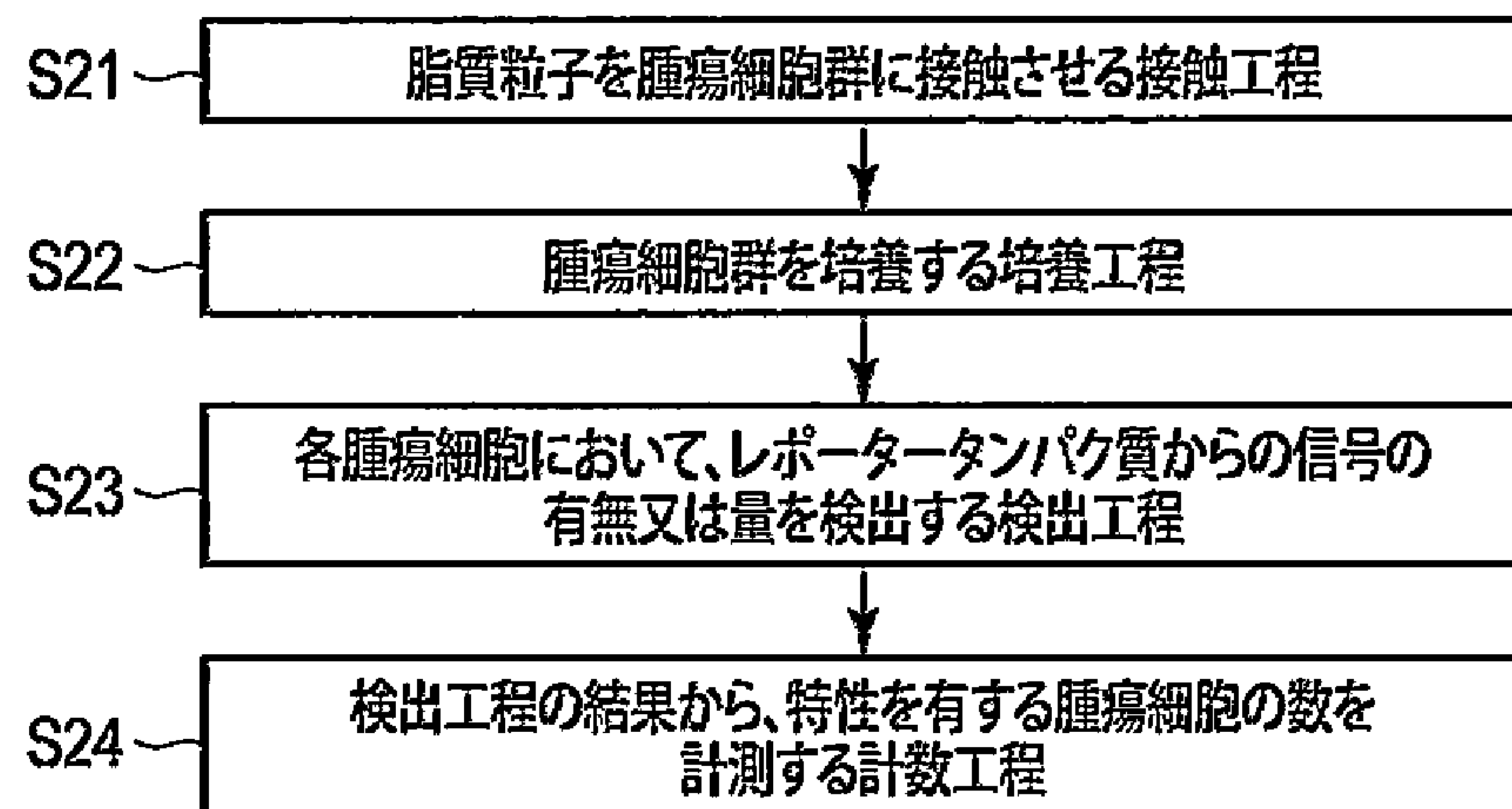
[図10]



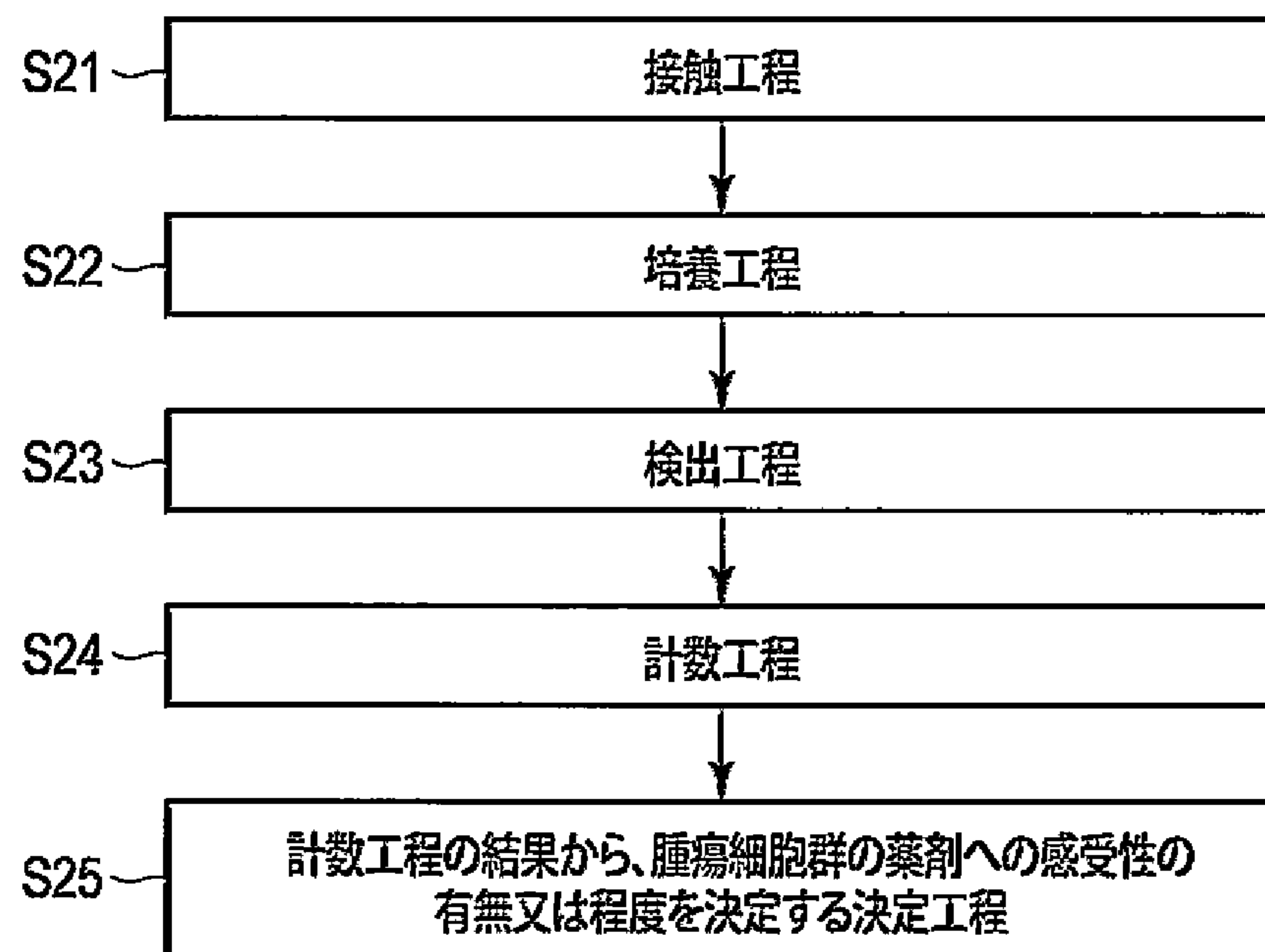
[図11]



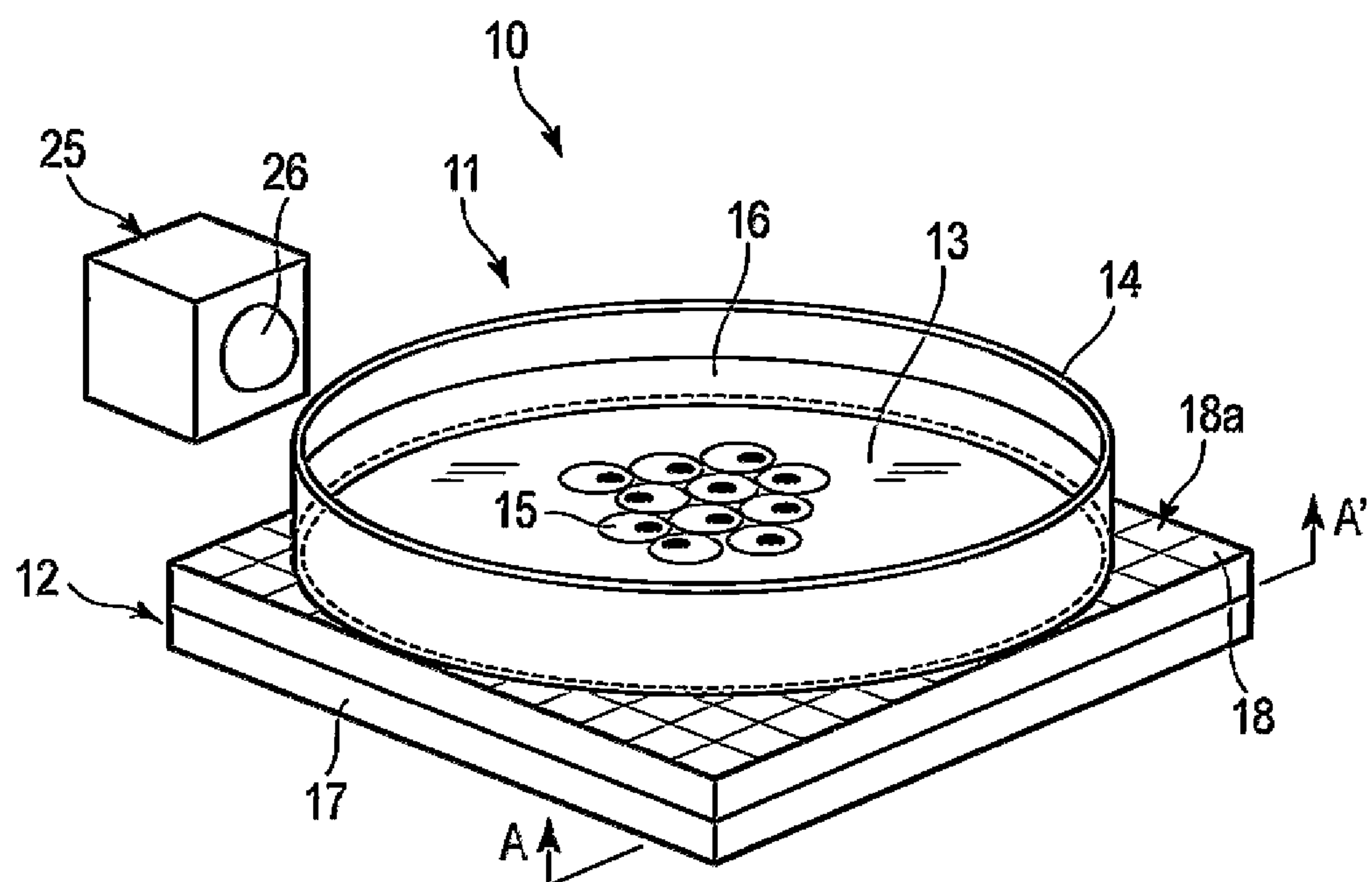
[図12]



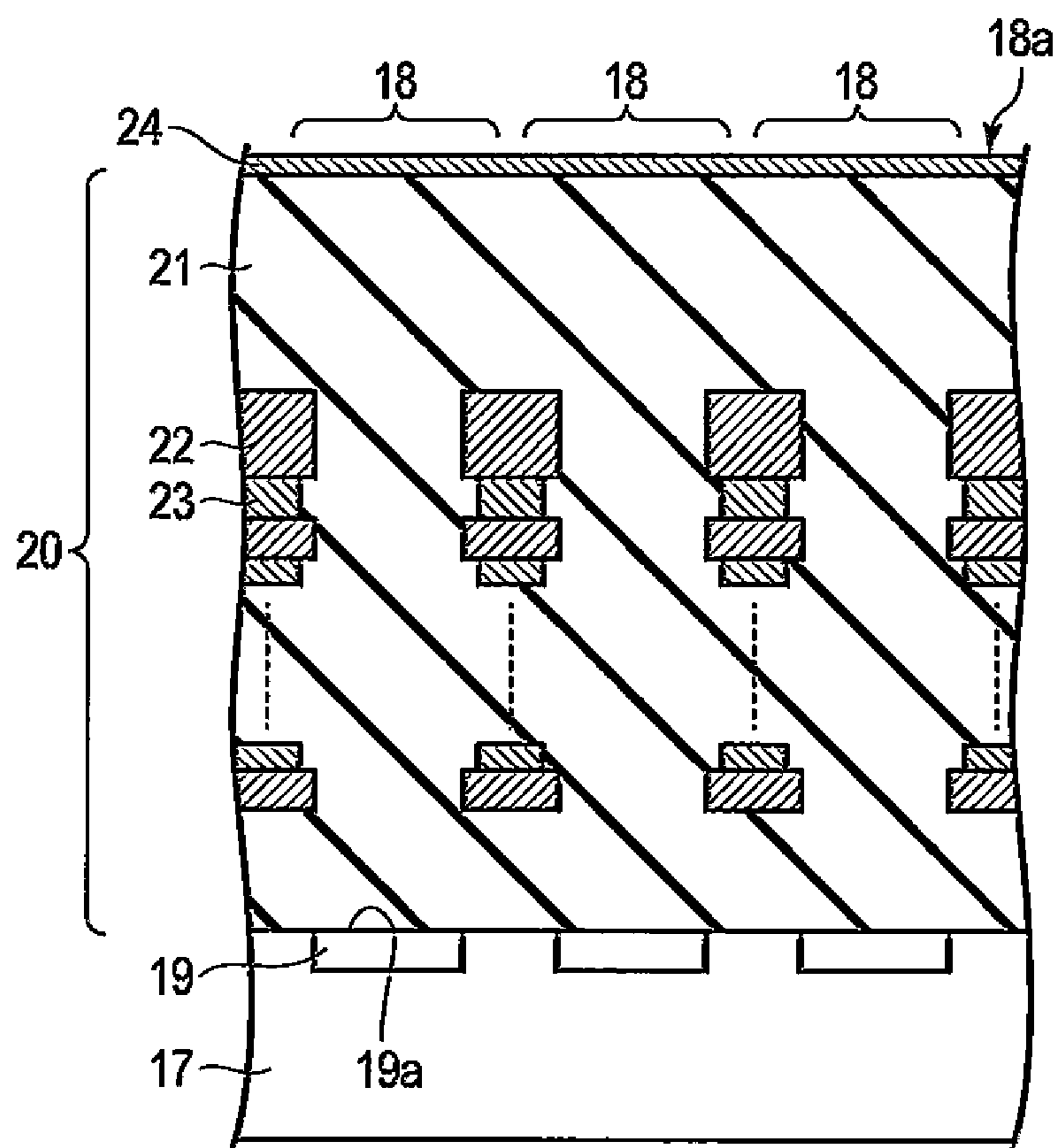
[図13]



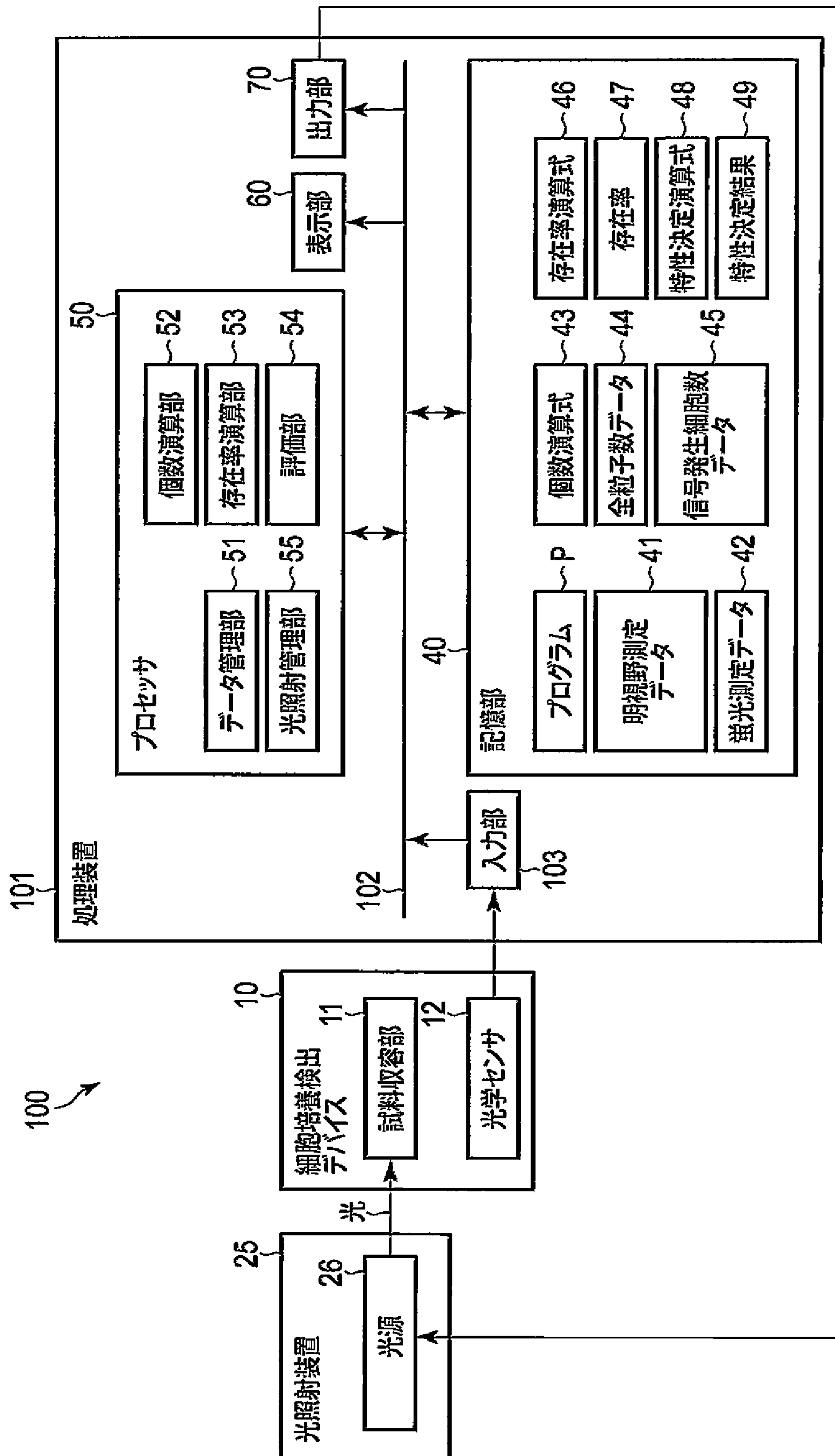
[図14]



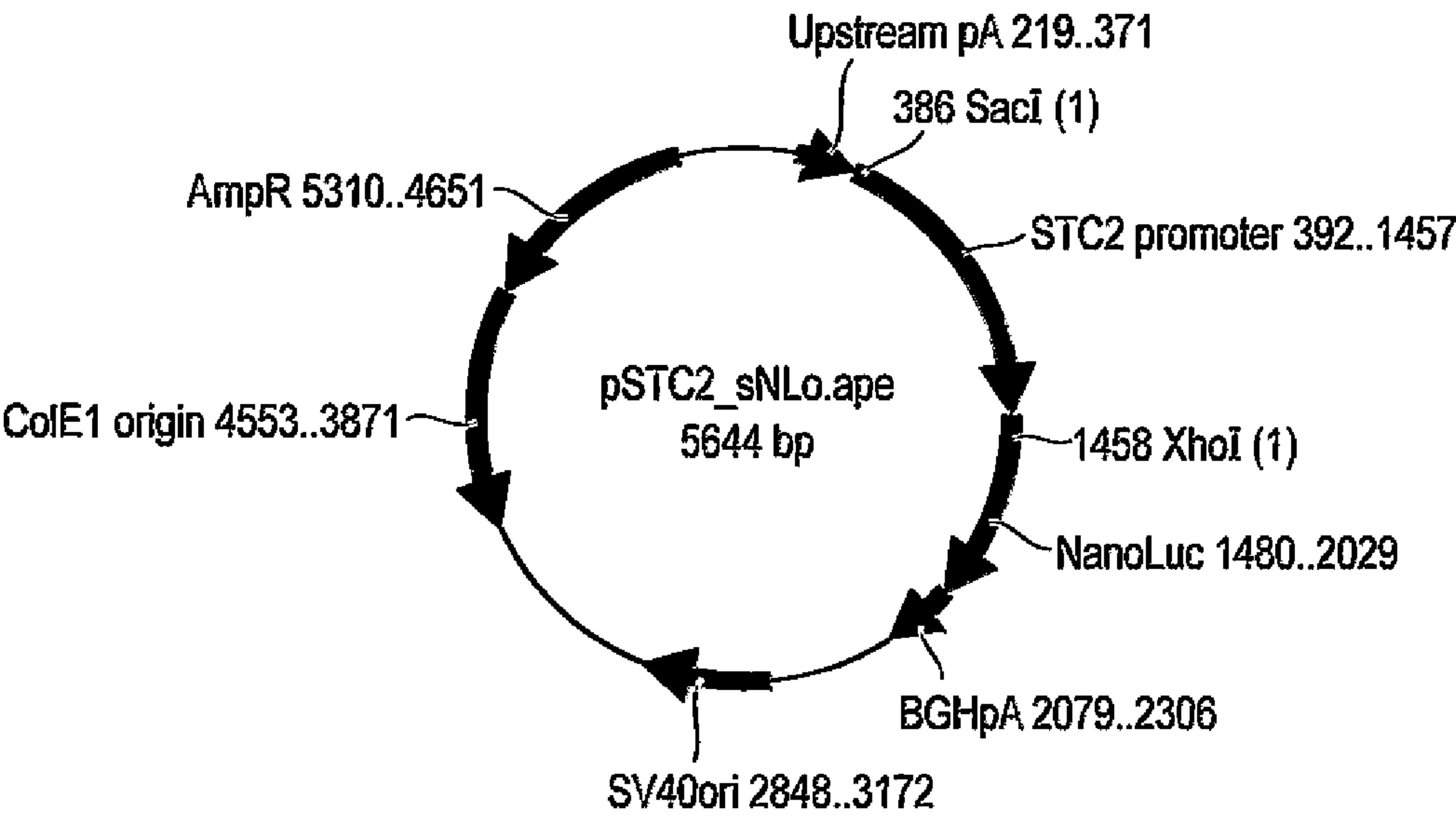
[図15]



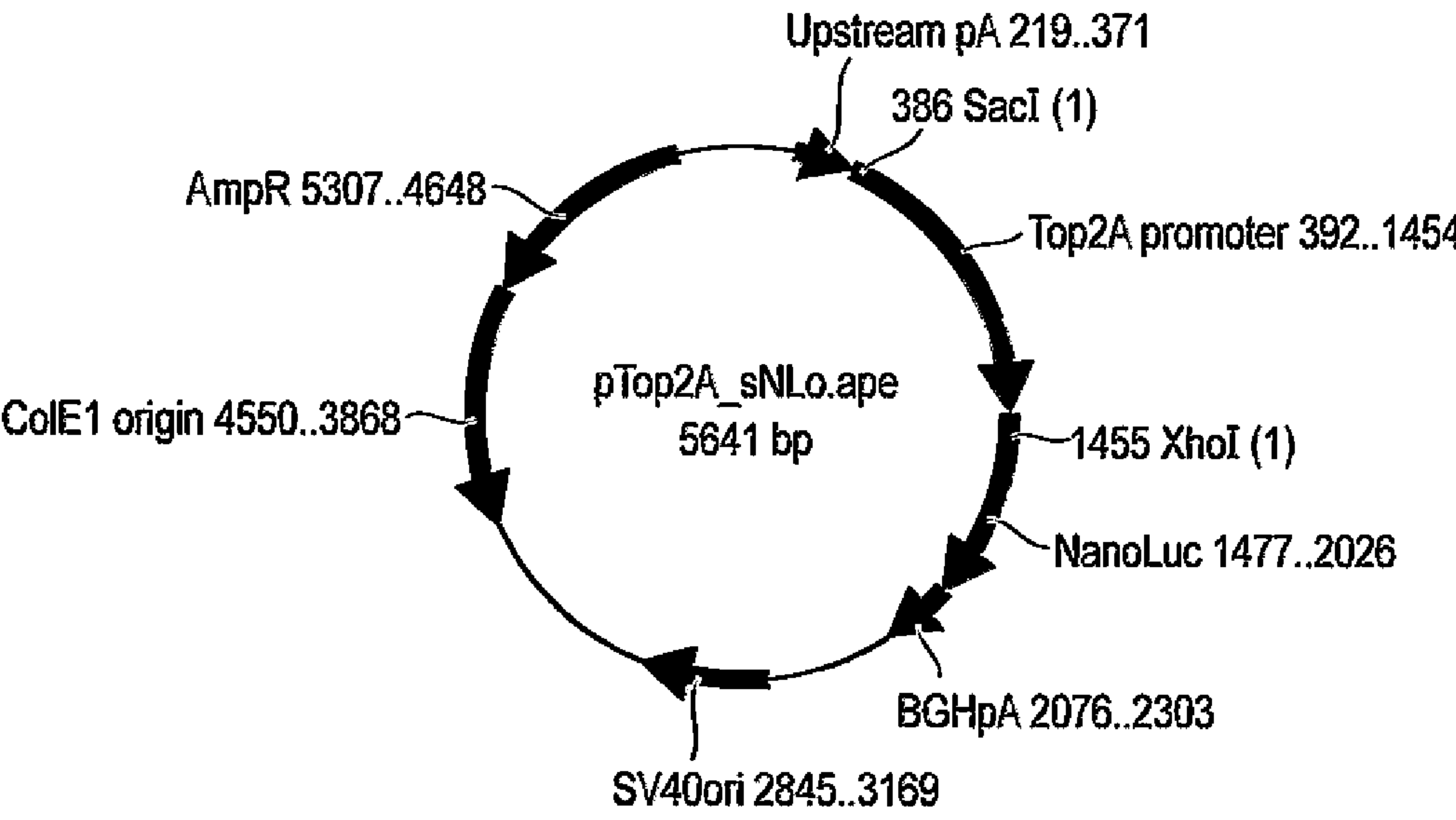
[図16]



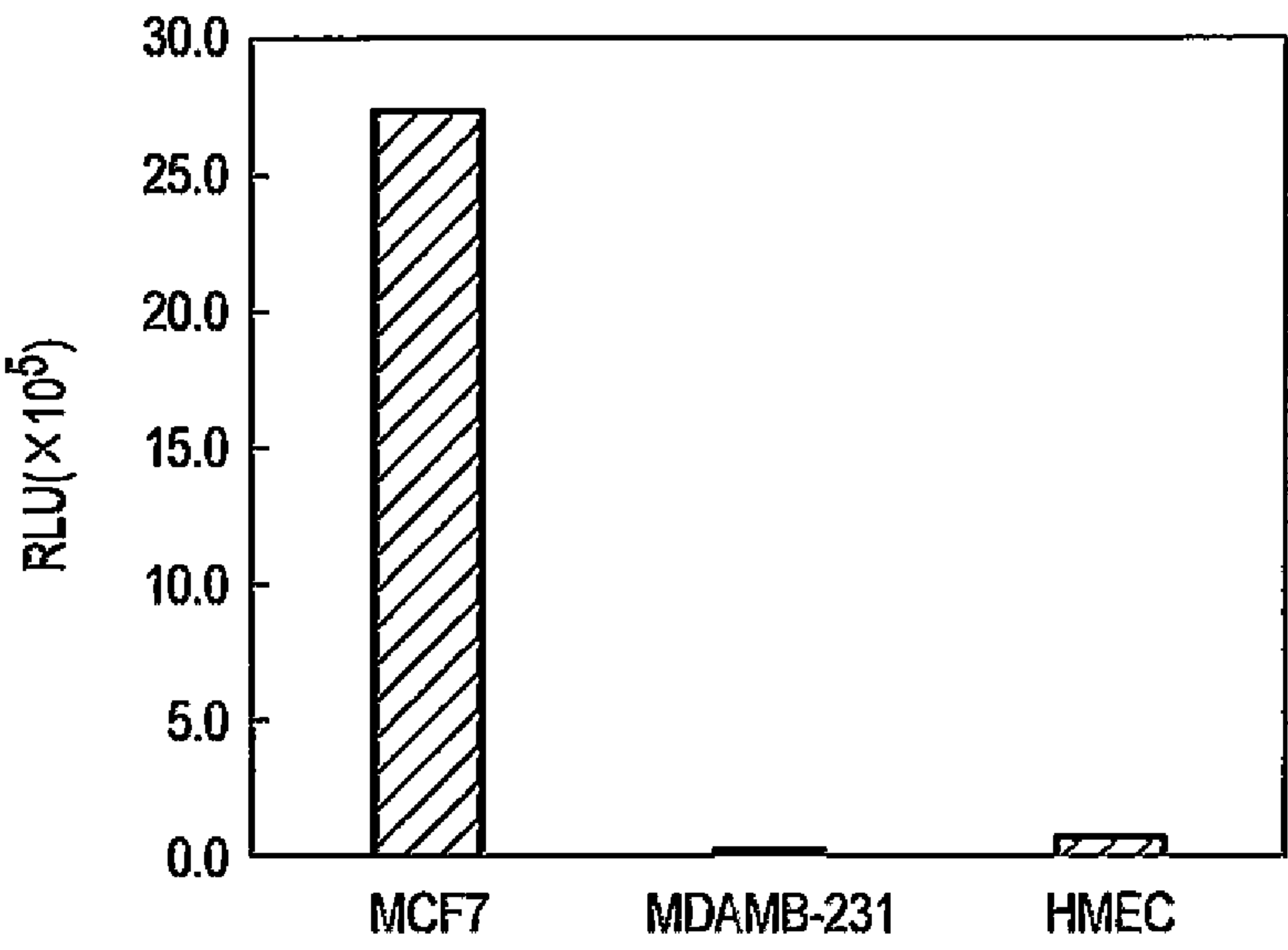
[図17]



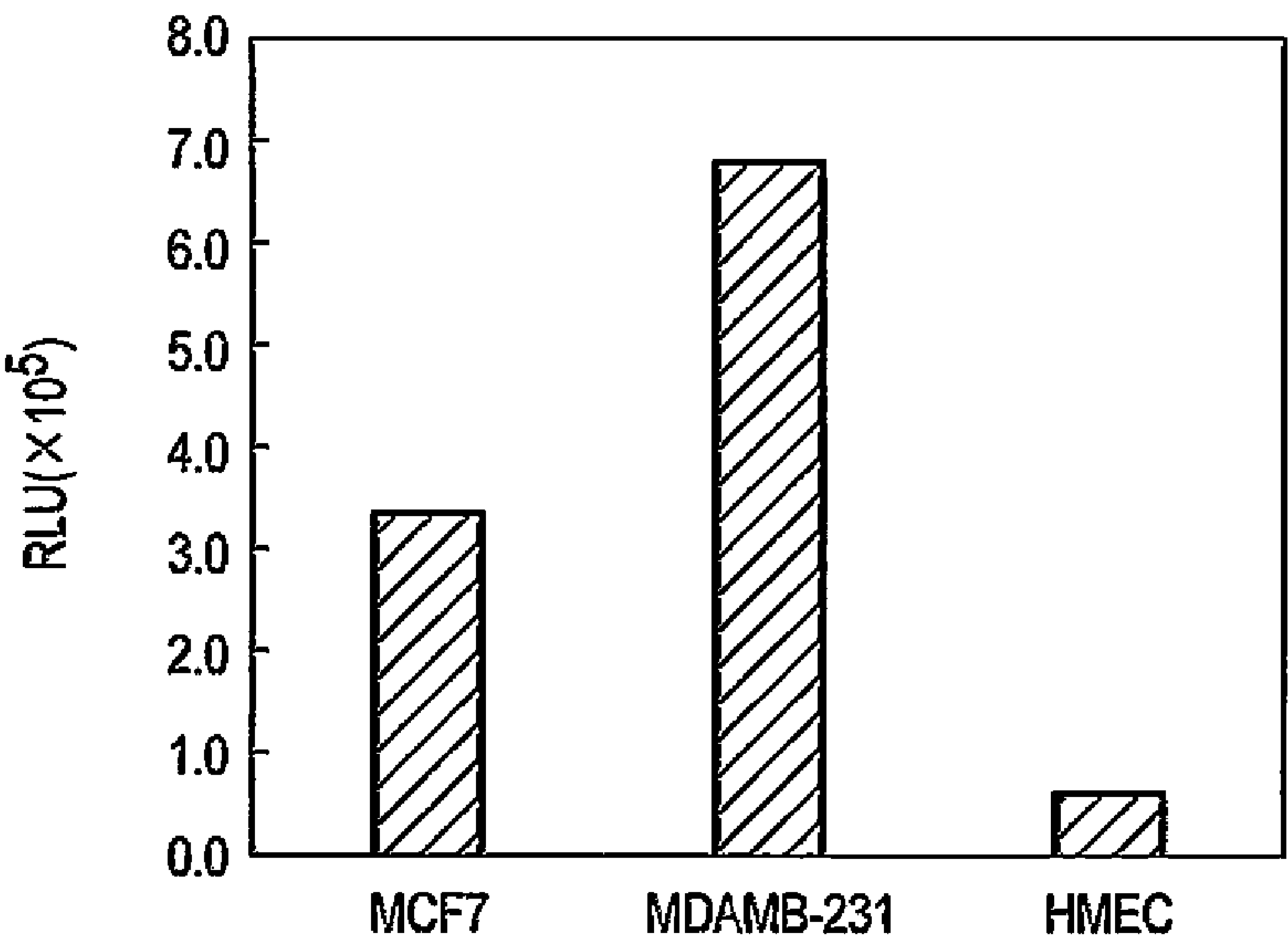
[図18]



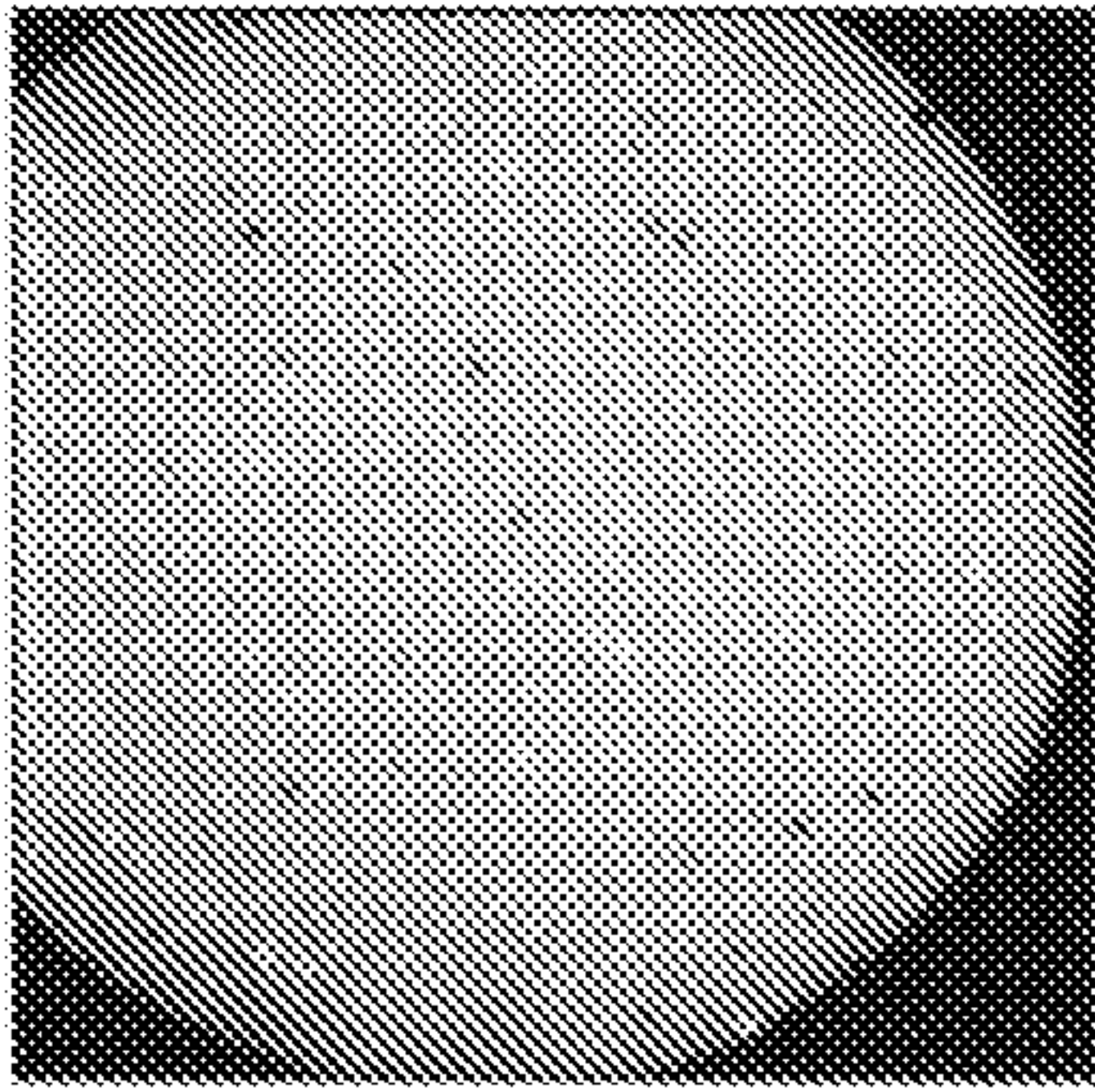
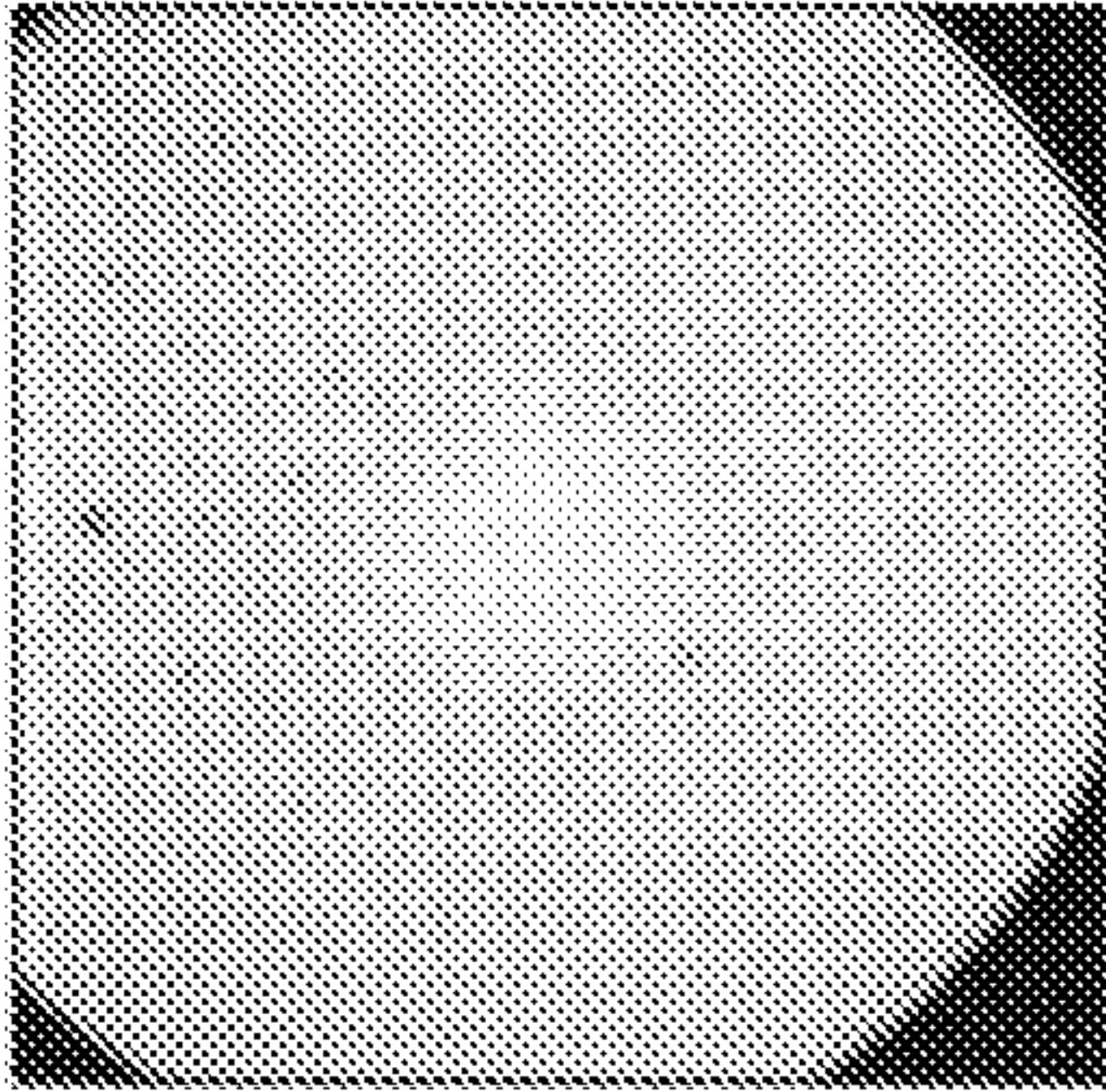
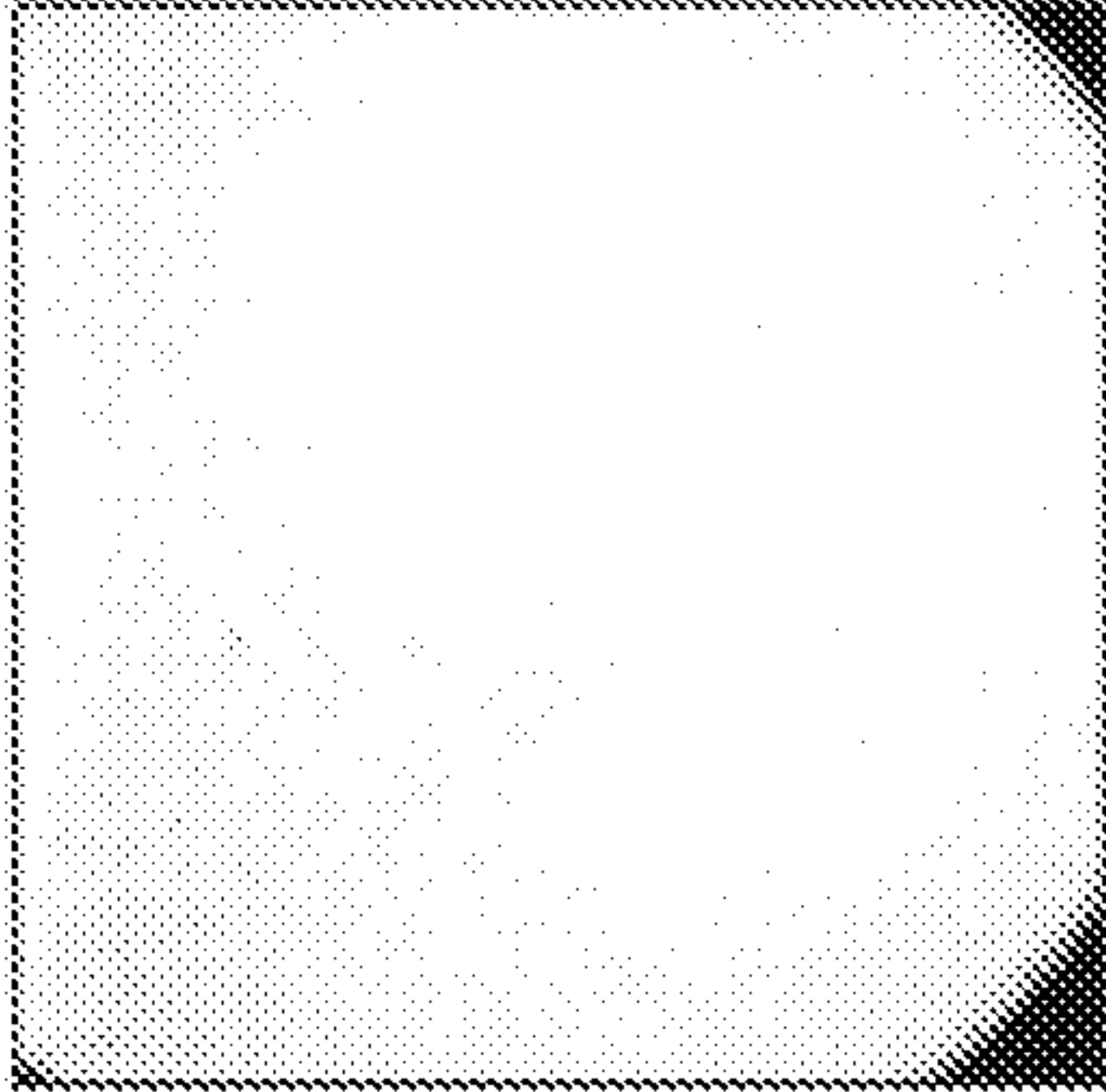
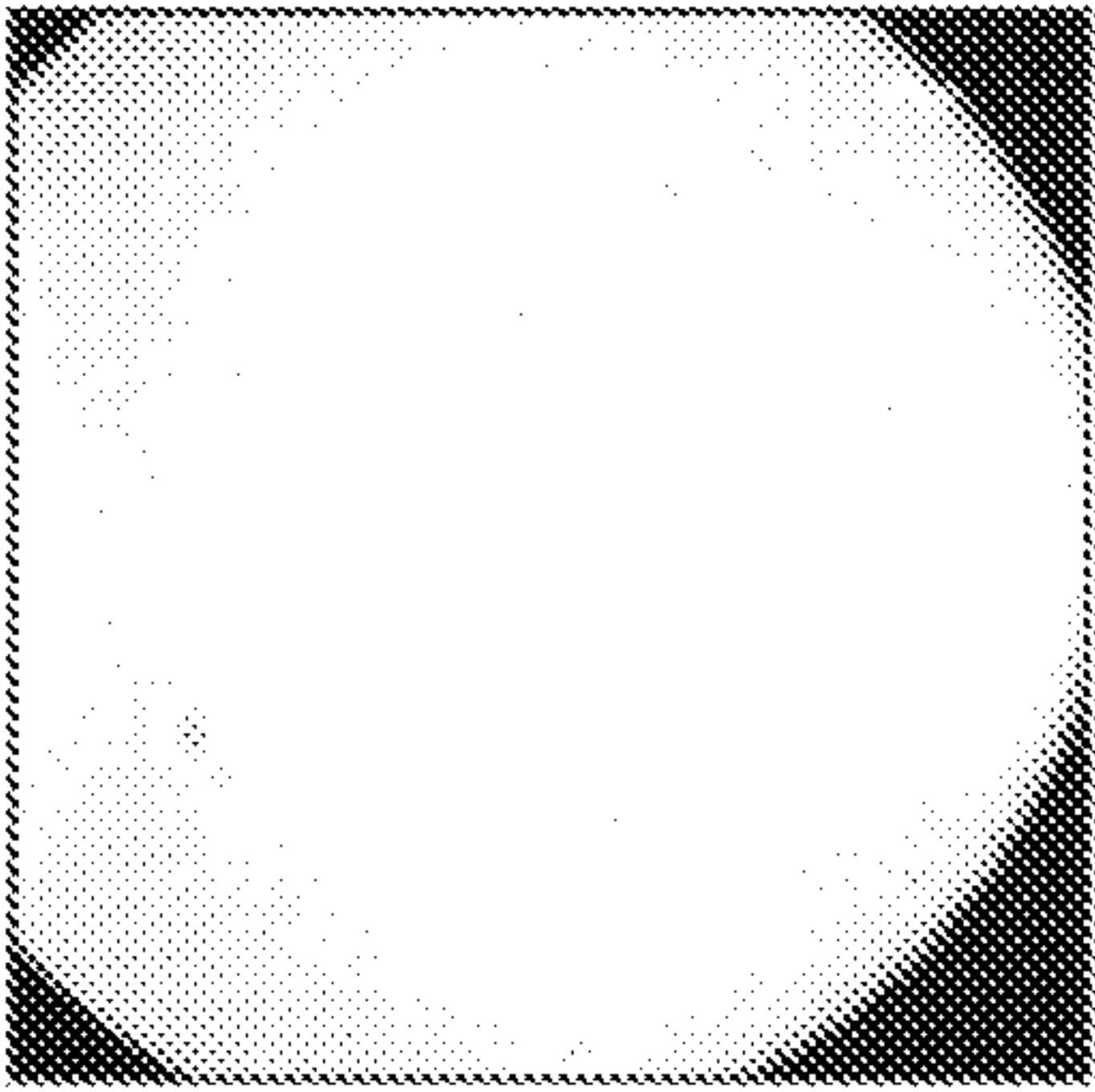
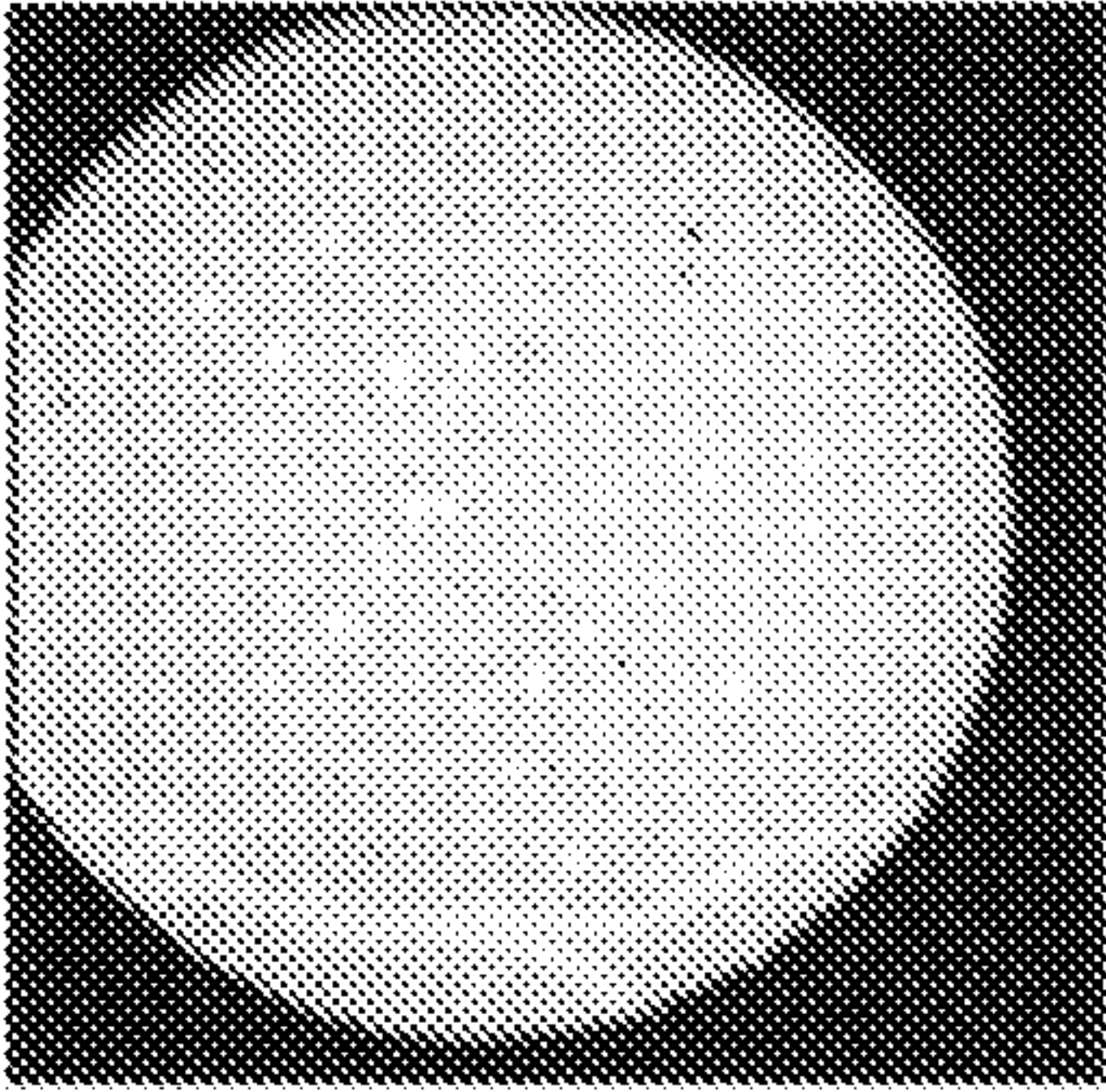
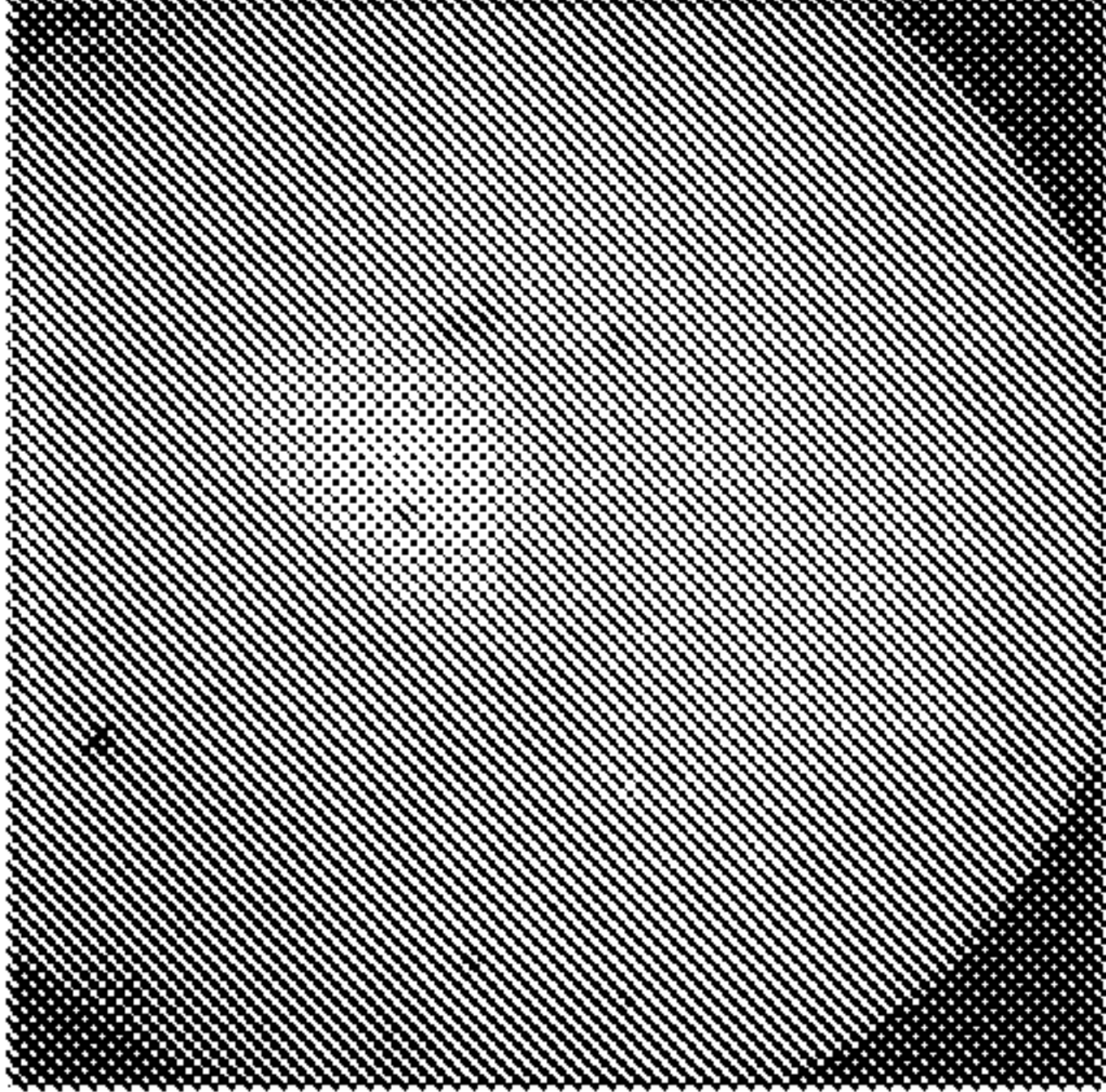
[図19]



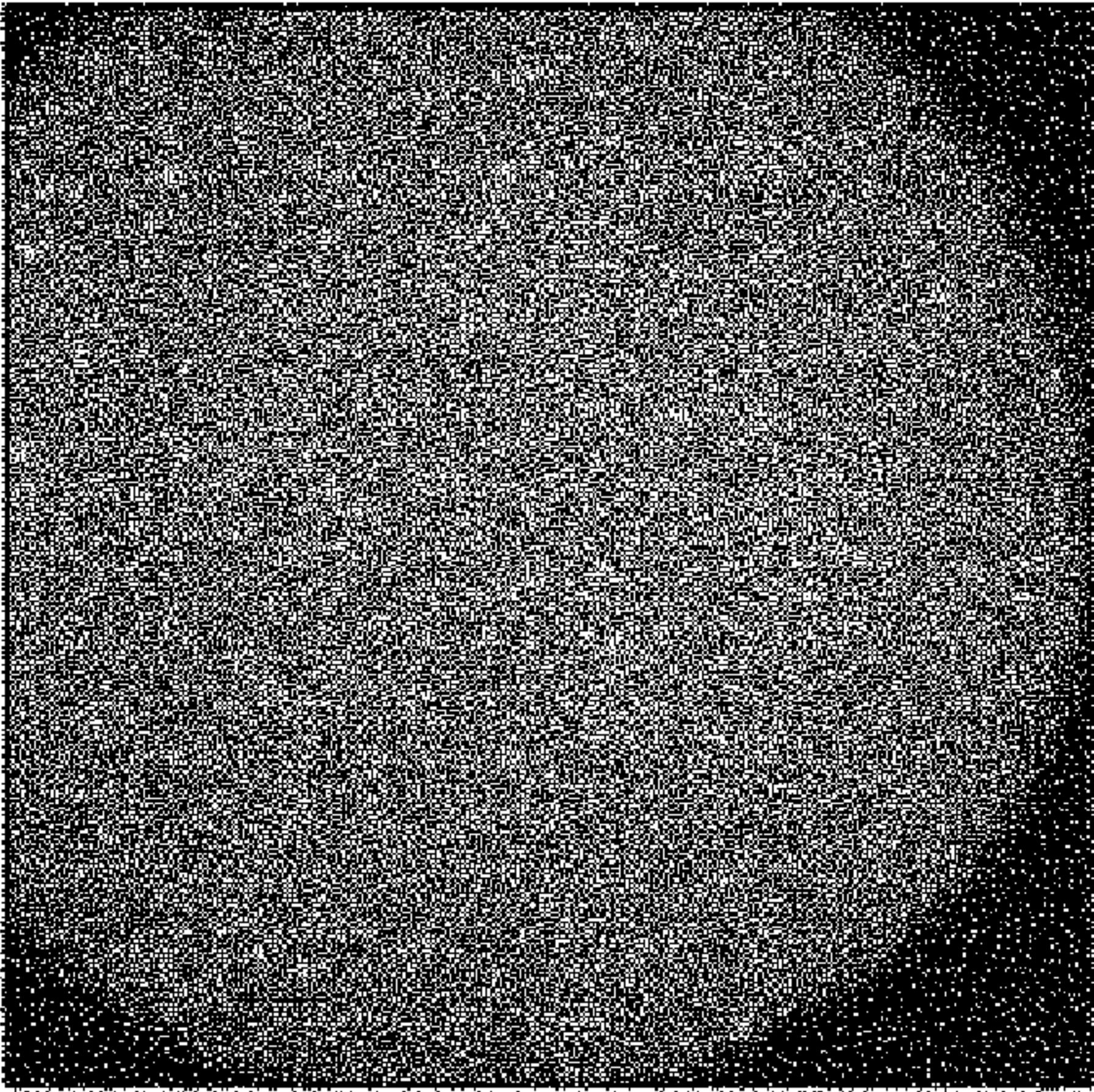
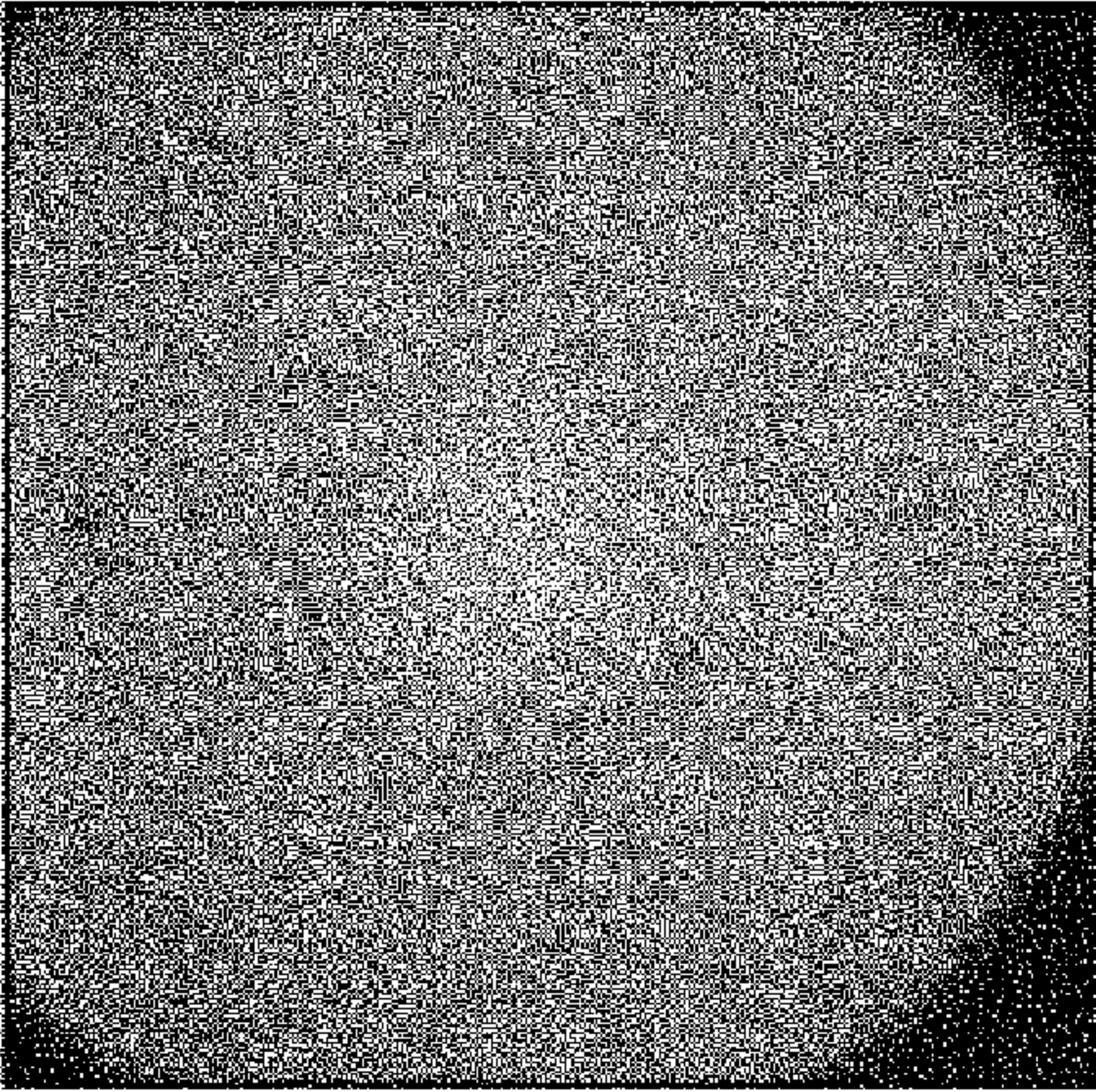
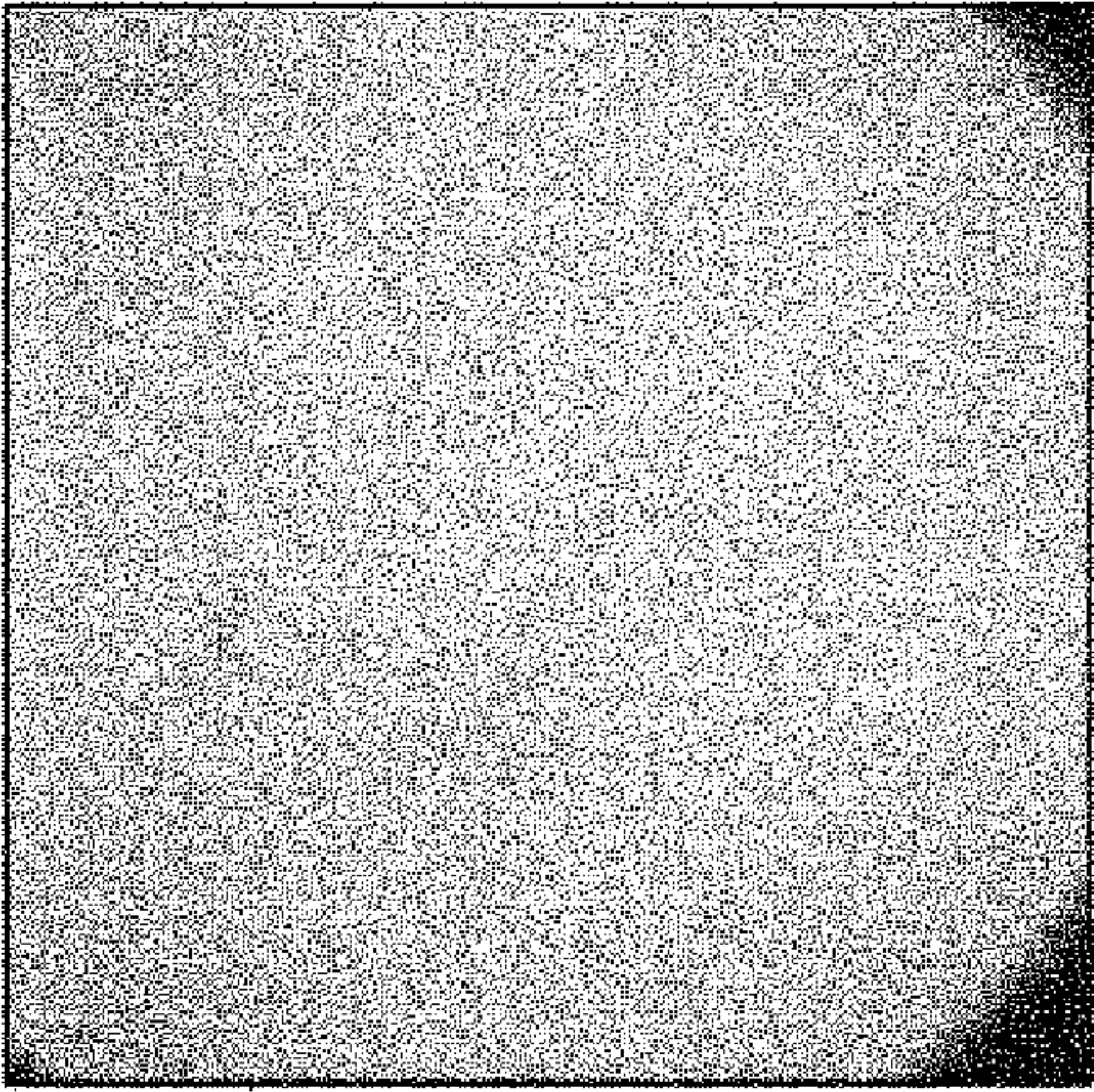
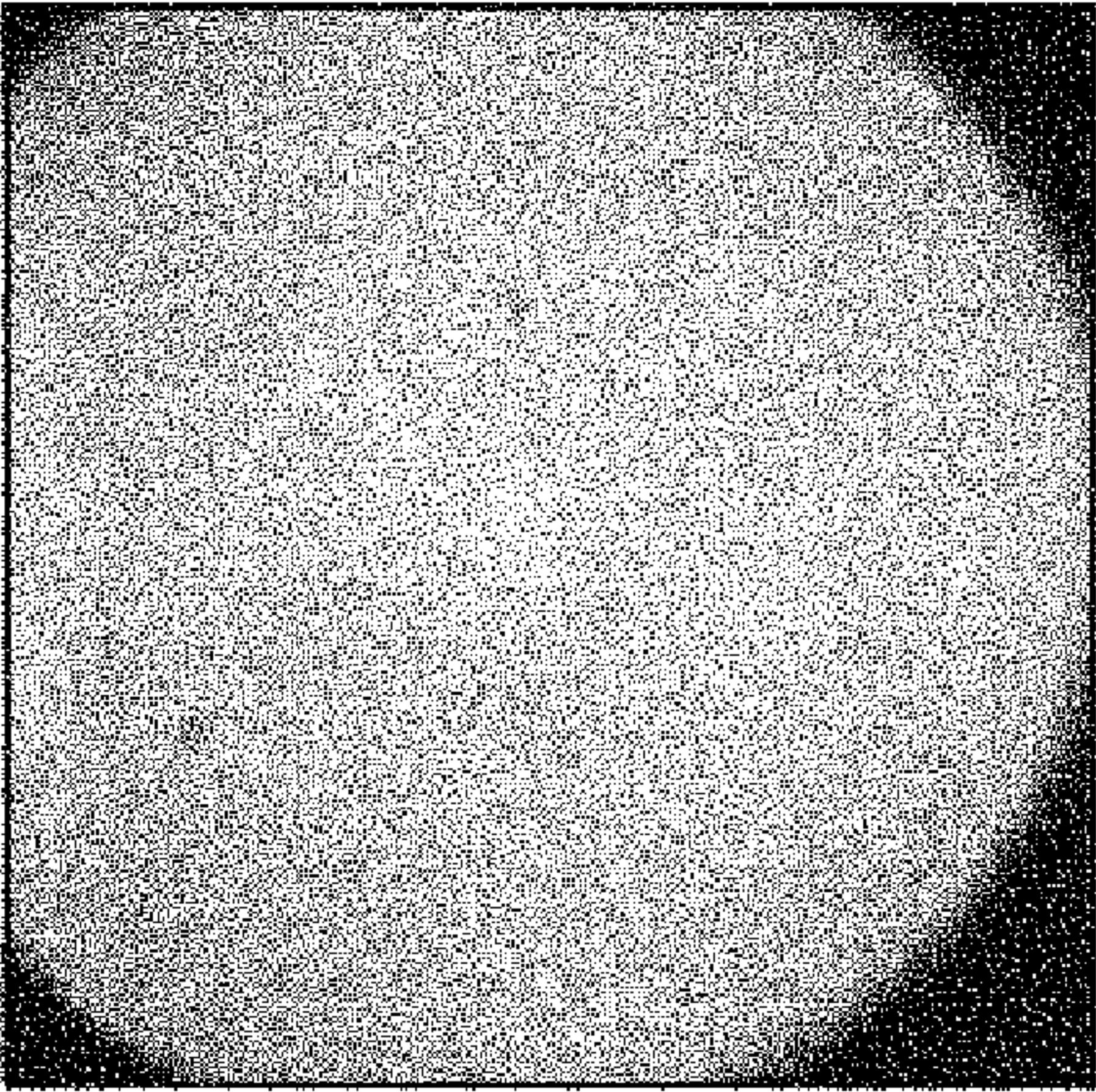
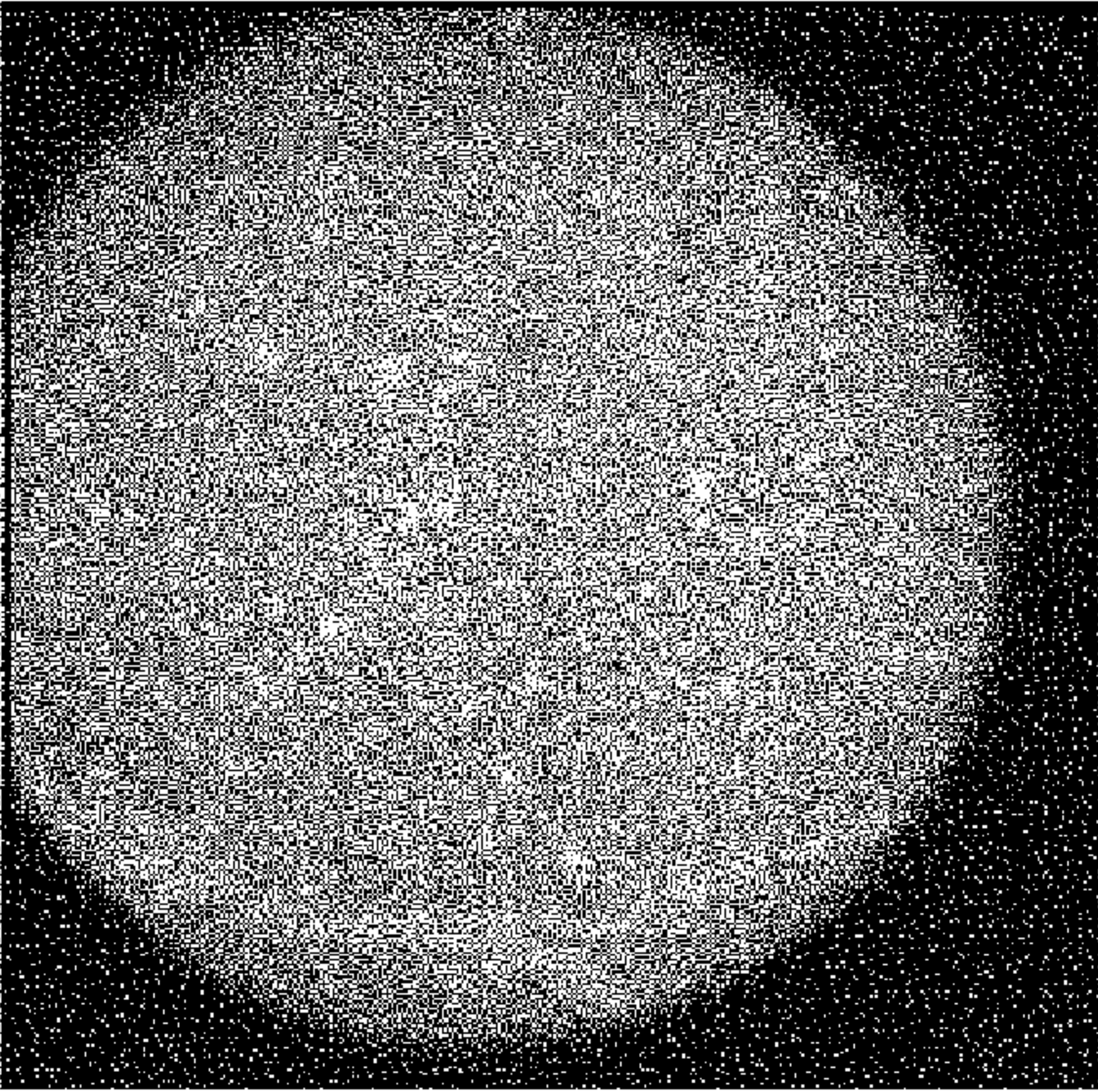
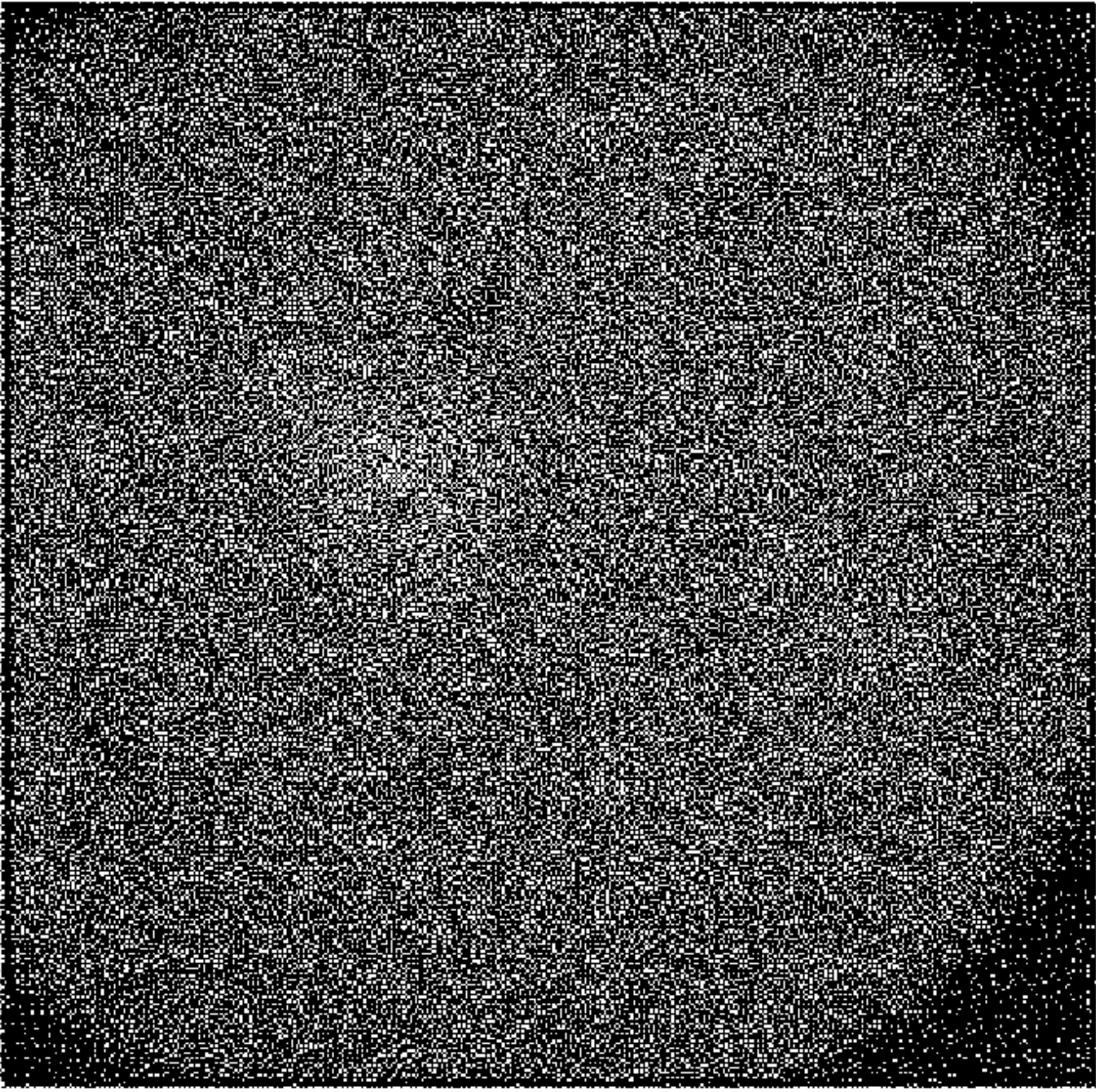
[図20]



[図21]

検体	A	B	C
薬剤感受性	タモキシフェン感受性あり	ドキシルピシン感受性あり	どちらも感受性なし
STC2			
TFO2A			

[図22]

検体	A	B	C
薬剤感受性	タモキシフェン感受性あり	ドキシルピシン感受性あり	どちらも感受性なし
STC2			
TPO2A			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/042047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/6897(2018.01)i FI: C12Q1/6897ZZNA, C12M1/34D 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) Int.Cl. C12M1/00-3/10, C12Q1/00-3/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020 Registered utility model specifications of Japan 1996-2020 Published registered utility model applications of Japan 1994-2020 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2005-525779 A (BAYER AG) 02.09.2005 (2005-09-02), claims, paragraphs [0003], [0035], [0039], [0045], examples	1-8 1-26
Y	JP 2017-127227 A (TOSHIBA MEDICAL SYSTEMS CORP.) 27.07.2017 (2017-07-27), claims, paragraphs [0014], [0101], [0102], examples	1-26
Y	JP 2013-42721 A (TOSHIBA CORPORATION) 04.03.2013 (2013-03-04), claims, paragraphs [0016], [0026], examples	1-26
Y	JP 2015-512507 A (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 27.04.2015 (2015-04-27), claims, paragraph [0094]	1-26
Y	US 2018/0305771 A1 (UNIVERSITE LAVAL) 25.10.2018 (2018-10-25), examples	1-26
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 14.01.2020		Date of mailing of the international search report 21.01.2020
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/042047

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/176079 A1 (TOSHIBA CORPORATION) 19.09.2019 (2019-09-19), claims	1-26
Y	JP 5-505457 A (IMAGE RESEARCH LTD.) 12.08.1993 (1993-08-12), claims	1-26
Y	JP 2015-29461 A (FUJITA, Katsumasa) 16.02.2015 (2015-02-16), claims	1-26
Y	JP 2017-166910 A (TOSHIBA CORPORATION) 21.09.2017 (2017-09-21), claims	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2019/042047

JP 2005-525779 A	02.09.2005	US 2004/0219543 A1 claims, paragraphs [0003], [0043], [0050], [0056], examples US 2010/0099108 A1 WO 2002/079507 A2 EP 1385994 A2 DE 10133930 A DE 10160271 A AU 2002244757 A
JP 2017-127227 A	27.07.2017	US 2017/0204469 A1 claims, paragraphs [0025], [0114], [0115] EP 3196308 A1
JP 2013-42721 A	04.03.2013	US 2013/0230872 A1 claims, paragraphs [0028], [0037], examples US 2015/0203853 A1 EP 2562258 A1 CN 102952819 A CN 104894249 A
JP 2015-512507 A	27.04.2015	US 2015/0005397 A1 claims, paragraph [0094] US 2018/0100204 A1 WO 2013/138650 A1 EP 2825889 A1 AU 2013231972 A CA 2865642 A CN 104204805 A CN 107267554 A IN 6898DEN2014 A
US 2018/0305771 A1	25.10.2018	CA 2964605 A1
WO 2019/176079 A1	19.09.2019	(Family: none)
JP 5-505457 A	12.08.1993	US 5347122 A claims JP 3452566 B2 GB 8927754 A GB 8927754 A0 WO 1991/009300 A1 EP 504197 A1 DE 69028925 C DE 69028925 T AU 6879591 A AT 144324 E AT 144324 T AU 651801 B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2019/042047

JP 2015-29461 A	16.02.2015	(Family: none)
JP 2017-166910 A	21.09.2017	US 2017/0268982 A1 claims

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2019/042047
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/34(2006.01)i; C12Q 1/6897(2018.01)i FI: C12Q1/6897 Z ZNA; C12M1/34 D		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12M1/00-3/10; C12Q1/00-3/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2020年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2020年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2020年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2005-525779 A (パイエル アクチェンゲゼルシャフト) 02.09.2005 (2005 - 09 - 02) 特許請求の範囲、 [0003]、[0035]、[0039]、[0045]、 実施例	1-8
Y		1-26
Y	JP 2017-127227 A (東芝メディカルシステムズ株式会社) 27.07.2017 (2017 - 07 - 27) 特許請求の範囲、 [0014]、[0101] - [0102]、実施例	1-26
Y	JP 2013-42721 A (株式会社東芝) 04.03.2013 (2013 - 03 - 04) 特許請求の範囲、 [0016]、[0026]、実施例	1-26
Y	JP 2015-512507 A (ソーク インスティテュート フォー バイオリジカル スタディー ズ) 27.04.2015 (2015 - 04 - 27) 特許請求の範囲、 [0094]	1-26
Y	US 2018/0305771 A1 (UNIVERSITE LAVAL) 25.10.2018 (2018 - 10 - 25) Examples	1-26
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献		“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵 触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引 用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性 又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献 との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな いと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献
国際調査を完了した日 14.01.2020	国際調査報告の発送日 21.01.2020	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 竹内 祐樹 4N 5082 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2019/176079 A1 (株式会社東芝) 19.09.2019 (2019 - 09 - 19) 請求の範囲	1-26
Y	JP 5-505457 A (イメージ・リサーチ・リミテッド) 12.08.1993 (1993 - 08 - 12) 請求の範囲	1-26
Y	JP 2015-29461 A (藤田 克昌) 16.02.2015 (2015 - 02 - 16) 特許請求の範囲	1-26
Y	JP 2017-166910 A (株式会社東芝) 21.09.2017 (2017 - 09 - 21) 特許請求の範囲	1-26

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表

☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式

☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表

☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))

☐ 紙形式又はイメージファイル形式（PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号）
2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2005-525779	A	02.09.2005	US 2004/0219543 A1	
				Claims, [0003], [0043],	
				[0050], [0056], Examples	
				US 2010/0099108 A1	
				WO 2002/079507 A2	
				EP 1385994 A2	
				DE 10133930 A	
				DE 10160271 A	
				AU 2002244757 A	
JP	2017-127227	A	27.07.2017	US 2017/0204469 A1	
				Claims, [0025], [0114]-[0115]	
				EP 3196308 A1	
JP	2013-42721	A	04.03.2013	US 2013/0230872 A1	
				Claims, [0028], [0037],	
				Examples	
				US 2015/0203853 A1	
				EP 2562258 A1	
				CN 102952819 A	
				CN 104894249 A	
JP	2015-512507	A	27.04.2015	US 2015/0005397 A1	
				Claims, [0094]	
				US 2018/0100204 A1	
				WO 2013/138650 A1	
				EP 2825889 A1	
				AU 2013231972 A	
				CA 2865642 A	
				CN 104204805 A	
				CN 107267554 A	
				IN 6898DEN2014 A	
US	2018/0305771	A1	25.10.2018	CA 2964605 A1	
WO	2019/176079	A1	19.09.2019	(ファミリーなし)	
JP	5-505457	A	12.08.1993	US 5347122 A	
				Claims	
				JP 3452566 B2	
				GB 8927754 A	
				GB 8927754 A0	
				WO 1991/009300 A1	
				EP 504197 A1	
				DE 69028925 C	
				DE 69028925 T	
				AU 6879591 A	
				AT 144324 E	
				AT 144324 T	
				AU 651801 B	
JP	2015-29461	A	16.02.2015	(ファミリーなし)	
JP	2017-166910	A	21.09.2017	US 2017/0268982 A1	
				Claims	