

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 12 月 8 日 (08.12.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/116242 A1

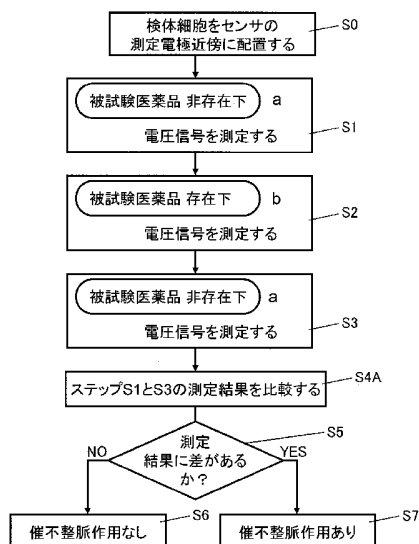
- (51) 国際特許分類: C12Q 1/02, C12M
1/34, G01N 27/30 // 33/15
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/009938
- (22) 国際出願日: 2005 年 5 月 31 日 (31.05.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-162457 2004 年 5 月 31 日 (31.05.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 松下電器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5718501 大阪府門真市

- 大字門真 1006 番地 Osaka (JP). 国立大学法人 千葉大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 尾崎 亘彦 (OZAKI, Nobuhiko). 岡 弘章 (OKA, Hiroaki). 中谷 晴昭 (NAKAYA, Haruaki).
- (74) 代理人: 角田 嘉宏, 外 (SUMIDA, Yoshihiro et al.); 〒6500031 兵庫県神戸市中央区東町 1 2 3 番地の 1 貿易ビル 3 階 有古特許事務所 Hyogo (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

/ 続葉有 /

(54) Title: MEDICINE SAFETY TESTING METHOD AND MEDICINE SAFETY TESTING SYSTEM

(54) 発明の名称: 医薬品安全性試験方法及び医薬品安全性試験システム



S0... PLACE SAMPLE CELL NEAR MEASUREMENT ELECTRODE OF SENSOR
 S1... MEASURE VOLTAGE SIGNAL
 a... IN A STATE WHERE MEDICINE UNDER TEST IS ABSENT
 S2... MEASURE VOLTAGE SIGNAL
 b... IN A STATE WHERE MEDICINE UNDER TEST IS PRESENT
 S3... MEASURE VOLTAGE SIGNAL
 S4A... COMPARE MEASUREMENT RESULTS AT STEPS S1 AND S3
 S5... ANY DIFFERENCE BETWEEN MEASUREMENT RESULTS?
 S6... THERE IS NO ARRHYTHMOGENIC EFFECT
 S7... THERE IS ARRHYTHMOGENIC EFFECT

の電気応答を測定する工程を含み、前記工程 A 及び前記工程 C で測定された電圧信号を比較し、その結果に基づいて、被試験医薬品の危険性を判断する。

(57) Abstract: A medicine safety testing method and system for testing the safety of a medicine in a measurement state simulating an invivo environment with high reliability of risk evaluation of the medicine. In the method, a cell composed of an HERG ion channel and its homologue is used, and a sensor having measurement electrodes is used. The method comprises (A) a step of measuring the electrical responses of the sensors in contact with a control solution not containing the medicine under test, (B) a step of measuring the electrical responses of the sensors in contact with a measurement solution containing the medicine, and (C) a step of again measuring the electrical responses of the sensors in contact with the control solution not containing the medicine after step B1. The voltage signals measured at steps A and C are compared, and the risk of the medicine is judged from the comparison result.

(57) 要約: 生体環境を模した測定状態で、医薬品の危険性評価の信頼性が高い、医薬品安全性試験方法及びシステムを提供することを目的とする。本発明の医薬品安全性試験方法は、HERG イオンチャネル及びその相同物で構成される細胞を用い、複数の測定電極を持つセンサを使用する医薬品安全性試験方法であって、A) 被試験医薬品を含まない対照溶液に接した状態で前記センサの電気応答を測定する工程、B) 前記被試験医薬品を含む測定溶液に接した状態で前記センサの電気応答を測定する工程、C) 工程 B 1 の後、再び前記被試験医薬品を含まない前記対照溶液に接した状態で前記センサ

/ 続葉有 /

WO 2005/116242 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

医薬品安全性試験方法及び医薬品安全性試験システム

技術分野

- [0001] 本発明は、不整脈を引き起こすHERGチャネルを含む検体細胞に対する被試験医薬品の危険性を判断する、医薬品安全性試験方法及び医薬品安全性試験システムに関するものである。

背景技術

- [0002] 近年、医薬品による催不整脈作用が大きな問題となっている。この催不整脈作用は、薬物誘発性QT延長症候群(又は、後天性QT延長症候群)と呼ばれ、薬物が心筋細胞上のイオンチャネルに作用し、心電図においてQT間隔を延長させ、重篤な不整脈を引き起こす。薬物によるQT延長は、頻度は低いが、時にはtorsades de pointes型の心室頻拍や突然死といった重篤な副作用を誘発する。例えば、抗ヒスタミン薬であるテルフェナジン、アステミゾールは遅延整流性カリウムイオンチャネルを阻害し活動電位を延長することが知られており、心室頻拍や突然死が報告されている。
- [0003] 国際的な医薬品承認審査資料の調和を目的とする日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH)においても、「安全性薬理試験ガイドライン」の中に、「再分極と伝達異常に対する手法を含むin vivo、in vitro、ex vivoの評価も考慮すべきである」との記載が盛り込まれた。安全性の高い医薬品の開発のためには、開発段階で効果的な催不整脈作用検出法を適用することが必要とされている。
- [0004] QT延長を引き起こす標的イオンチャネルは、遅延整流性のカリウムチャネルであると言われている。心筋細胞などの野生型細胞には、遅延整流性のカリウムチャネル以外にも様々なイオンチャネルが内在している。このため、現在最も感度が高く、信頼性の高い評価方法は、代表的な遅延整流性のカリウムチャネルであるHERG (Human Enter-a-gogo-Related Gene) チャネルを、アフリカツメガエルの卵母細胞などの宿主細胞、HEK293、CHOなどの哺乳類培養細胞に遺伝子導入技術により強制的に発現させた系を検体細胞として、パッチクランプ法で電気生理学的評価を行う方法である。なかでも、アフリカツメガエルの卵母細胞に導入されたHERGイオンチャ

ネルは薬剤感受性が低くなるため、特に、哺乳類培養細胞に発現させた系がより信頼性の高い評価手法となりえる。

- [0005] つまり、危険性を有する医薬品候補化合物は、HERGイオンチャネルを拮抗する。例えば、心筋細胞ならHERGチャネルが拮抗されたことにより、カリウムイオンの出入りが阻害され、再分極が起こらなくなる。この一連の動作が、薬物によるQT延長を発生するメカニズムである。この危険性を有する医薬品候補化合物に共通する特徴は、一度HERGチャネルに拮抗すると、HERGチャネルのイオンの出入り口である孔（ポア）にはまり込み、抜けなくなるオープンチャネル型拮抗薬である。
- [0006] 新規医薬品の開発の初期段階で安全性試験を実施し、医薬品の選別を開発前に行うことは、開発投資コスト、開発時間、リソースの効率面などから望ましい。そのためには、大量の医薬品開発候補化合物に対し試験を実施する必要がある。この用途には、測定の迅速性、大量処理能力がより重視される。ところが、パッチクランプ手法は、電極の調製及びその操作などに熟練した技術を要し、一つの試料の測定に多くの時間を要するので、この目的には適していない。
- [0007] そのため、貫通孔を持った平面パッチクランプセンサを用い、HERGイオンチャネルを通過する電流を得、安全性を試験するセンサが既に開示されている（例えば、特許文献1、特許文献2、非特許文献2参照）。
- [0008] これら特許文献1から特許文献4に開示される平面パッチクランプセンサは、いずれも、生体内塩濃度組成に近い溶液中で被検体細胞を平面基板に設けた貫通孔へと誘導し、配置し、負圧により細胞を貫通孔へと密着（ギガシール）させた後、貫通孔と接する領域の細胞膜を更なる負圧吸引をもって破ることにより、細胞膜を通過する電流を膜の両側に配置した不分極性の電極（代表的には銀―塩化銀電極）、つまり、測定電極と参照電極にて測定するものである。
- [0009] 測定では、細胞膜内外の電位差を、人工的にある設定値で保持した際のイオンチャネルを通過する電流が測定される。ここで、標的チャネルのひとつであるHERGイオンチャネルを持った細胞を使った、従来の試験方法の具体的なプロトコールの一例を示す。
- [0010] 測定電極側に細胞内と塩濃度や浸透圧を人工的に調製した擬似電極内液を充た

し、参照電極側に細胞外と塩濃度や浸透圧を人工的に調製した擬似電極外液を満たして、これらの2種類を使用する。まず、測定電極のフィードバック機構を利用し、細胞内の電位を人工的に-80mVに保持する。そして、-80mVから+20mVまでステップ状に細胞内の電位を人工的に上昇させ、1.5秒間その電位で保持した後、+20mVから-50mVへと再度ステップ状に細胞内の電位を人工的に下降させる。その下降させた際に流れる外向き電流の大きさがHERGチャネルを流れるイオンの流れとして扱え、上記電流ピーク値を指標に被試験医薬品の安全性が判断される。

[0011] 具体的には、医薬品の危険性は、危険性を有する候補薬剤の非存在下で、細胞内外の電圧を過渡的に変化させたときの膜を外向きに流れる電流を測定し、候補薬剤存在下で、繰り返し細胞内外の電圧を過渡的に変化させたときの同外向電流の減少を持って、QT延長を判断する。

[0012] しかし、このような評価方法として用いられる短時間間隔でのステップ状の大きな電位変動は、生体環境では起こりえない。つまり、急激な電圧増減を使用する人工的な電位差プロトコールと、人工的成分が加えられた擬似内液を用いた状態での測定は、細胞本来の応答を測定しているとは必ずしも言えない。

[0013] なお、非特許文献3によれば、カルシウムキレート剤等の人工的成分が加えられた擬似細胞内液を用いた測定は、QT延長に対する寄与が小さいL型カルシウムチャネル電流の増強が前面に出て、QT延長を引き起こす支配的な要因である遅延整流性カリウムチャネルの電流が減少したと報告されている。これは、細胞本来の細胞内溶液中には様々な細胞内情報伝達を担う生体分子が存在しているが、擬似内液は、それらを忠実に再現できないことによるものである。

[0014] パッチクランプ方式の測定に際してホールセル状態を得るために、貫通孔と接する領域の細胞膜を破碎する必要がある。膜がきれいに破けない場合には、測定効率の減少とともに、漏れ電流による測定感度低下を引き起こす。しかも、細胞にも傷害を与えるという副次的な短所もあるが、もっと重要なことは、膜の破碎により細胞内機能性物質の流出が起こり、細胞本来の応答の消失をきたす。

[0015] また、特許文献2及び非特許文献2においては、アンフォテンシン β などの造孔性の化学物質を使用して、細胞内機能性物質の流出を抑える改善を行っている。

[0016] しかしながら、測定状態がIn vitroで、さらにHERGイオンチャネル発現系を用いた理想測定系であるという仮定があり、さらに突然死をも引き起こす医薬品の除外という目的から考えると、人工的な電位刺激プロトコルを用いた測定状態での評価をするのは大きな問題となる。

[0017] そこで、これら特許文献1から特許文献4に開示される平面パッチクランプセンサと異なる測定原理で細胞上のイオンチャネルの化学物質識別能を判定する平面基板センサが既に開示されている(特許文献5)。

[0018] この特許文献5に開示される平面基板センサは、平面パッチクランプセンサと同様に、貫通孔を持つ。貫通孔は、微細加工技術で一括加工することにより一つの基板に多数作製できる。言い換えれば、パッチクランプに比べ、多数の細胞の同時並列測定が可能である。平面パッチクランプセンサとの違いは、電極が分極性電極である金電極からなることである。そして、被検体細胞を細胞外に配置した電極の電位変化で測定する原理に基づく。このため、細胞膜を破碎することなく、よって、人工的に調整した細胞内液を使用することがない。言い換えれば、平面パッチクランプセンサに比べ、より生体環境に近い測定条件で試験を実施できる。

特許文献1:国際公開第01/25769号パンフレット

特許文献2:米国特許第6488829号明細書

特許文献3:国際公開第01/59447号パンフレット

特許文献4:国際公開第99/31503号パンフレット

特許文献5:国際公開第02/055653号パンフレット

非特許文献1:細胞の分子生物学、第三版、Garland Publishing Inc.,New York, 1994,日本語版、中村桂子ら監訳、181～182頁、1995年、教育社

非特許文献2:ASSAY and Drug Development Technologies, Vol.1,Number 1-2, pp127-135, 2003

非特許文献3:Pflugers Arch,Vol. 417, pp185-193,1990

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0019] しかしながら、前記のセンサ構成では、HERGチャネルを拮抗するオープンチャネ

ル型の拮抗剤を特定することができない。

- [0020] 従来例として挙げられる特許文献1から特許文献4に開示される平面パッチクランプセンサでは、医薬品の危険性は、以下の工程で判断される。第一に、危険性を有する候補薬剤の非存在下で、細胞内外の電圧を過渡的に変化させる。つまり、細胞内を強制的に脱分極させてHERGイオンチャネルを開けた時に外向きに流れる電流を測定する。第二に、候補薬剤存在下で、細胞内外の電圧を過渡的に変化させる。つまり、同様に、細胞内を強制的に脱分極させてHERGイオンチャネルを開けた時に観測される同外向電流を測定する。危険性を有する候補薬剤の非存在下と候補薬剤存在下での外向電流の減少をもって、危険性候補薬剤がHERGチャネルを拮抗する度合いを判断する。第三に、候補薬剤存在下で電圧印加を繰り返し、細胞内外の電圧を繰り返し変化させる。つまり、同様に、HERGイオンチャネルを何度も開けた時に観測される同外向電流を測定する。外向電流が変化しないことで、HERGイオンチャネルのポアに不可逆的にはまり込み、脱離しない、オープンチャネル型の拮抗剤であると判断できる。
- [0021] 一方、特許文献5に開示した前述のセンサ構成では、細胞膜を破碎せず、細胞外に配した電極によって、細胞外の電位変化を測定するため、より生体環境に近い測定条件で試験を実施できるという長所を持つものの、外部から人工的に電氣的な刺激を印加し、強制的にHERGイオンチャネルを開くという操作を行うことはできない。つまり、危険性を有する候補薬剤存在下で、細胞内電位の変化に起因する電極電位は測定できるものの、その変化がオープンチャネル型拮抗剤に依るものか否かは判断できない。
- [0022] 以上に見られるように、平面基板センサでは、HERGイオンチャネルを持つ被検体細胞を使って、不整脈を引き起こす危険性を有する被試験化合物を判別することができなかった。
- [0023] 本発明は、前記従来課題を解決するもので、外部から電気信号を新たに印加することなく、生体環境を模した測定状態で、不整脈を引き起こす危険性を有するオープンチャネル型HERGチャネル拮抗剤を判別する医薬品の安全性試験方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0024] 上述した従来技術の課題を解決するために、本発明の医薬品安全性試験方法は、測定電極を持つセンサを使用して、被試験医薬品の、HERGイオンチャネル又はその相同物を含む検体細胞に対する危険性を試験する医薬品安全性試験方法であって、

O) 被試験医薬品を含まない対照溶液中に、HERGイオンチャネル又はその相同物を含む検体細胞を保持し、前記検体細胞近傍に前記測定電極を配置する工程と、

A) 前記対照溶液に接した状態で、前記測定電極によって電圧信号を測定する工程と、

B) 工程Aの後、前記対照溶液を、前記被試験医薬品を含む測定溶液に置換し、前記測定電極によって電圧信号を測定する工程と、

C) 工程Bの後、前記測定溶液を、再び前記対照溶液に置換し、前記測定電極によって電圧信号を測定する工程と、

D) 前記工程Aと前記工程Cで測定された電圧信号を比較し、その結果に基づいて、前記被試験医薬品の危険性を判定することを特徴とする。

[0025] 危険性を内在する被試験医薬品を本発明の医薬品評価方法を用いて評価すれば、QT延長を起こしていることに相当する測定電極での応答及び応答時間が、被試験医薬品非存在下に比べ延長される。また、再び被試験医薬品非存在下に戻した時は、測定電極での応答及び応答時間が延長されたまま保持される。この応答の形式により、被試験医薬品が不可逆的にイオンチャネル孔(ポア)に入ることに相当するオープンチャネル拮抗剤か否かが判別できる。また、標的生体構成要素を人工的に刺激する処理を経ることなく、より生体環境に近い測定条件で試験を実施できる。つまり、信頼性の高い安全性試験を実施することができる。

[0026] 前記工程Dは、前記工程Aによって測定された電圧値 $a1$ 、及び前記工程Cによって測定された電圧値 $c1$ から $c1/a1$ を算出し、

$c1/a1$ が予め設定された設定値を超えるときは危険性ありと判断し、 $c1/a1$ が前記設定値以下であるときは危険性なしと判断する工程であっても良い。

- [0027] 前記医薬品安全性試験方法において、E)前記工程Aの前に、前記検体細胞に含まれるイオンチャネルであって、前記HERGイオンチャネル以外の少なくとも1種類以上のイオンチャネルを不活性化する化学物質を加える工程を含んでいても良い。
- [0028] 前記医薬品安全性試験方法において、所定の時間間隔で、前記工程Bと前記工程Cとを少なくとも2回以上繰り返しても良い。また、この繰り返しのにおいて、1回目に、前記測定溶液として第1の被試験医薬品が含まれる第1の測定溶液を用い、2回目に、前記測定溶液として第2の被試験医薬品が含まれる第2の測定溶液を用いることもできる。この場合、前記第1の被試験医薬品と前記第2の被試験医薬品が異なる医薬品であっても良い。また、前記第一の被試験医薬品と前記第2の被試験医薬品が同一であり、第1の測定溶液に含まれる第1の被試験医薬品の濃度と、第2の測定溶液に含まれる第2の被試験医薬品の濃度とが異なっても良い。
- [0029] 前記第1の測定溶液又は前記第2の測定溶液のどちらか一方の代わりに、陽性対照試薬又は陰性対照試薬を含む第3の測定溶液を用い、
前記工程Dにおいて、更に、前記第1の測定溶液又は前記第2の測定溶液を用いて前記工程A及び前記工程Cで測定された電圧信号の比($c1/a1$)と、前記第3の測定溶液を用いて前記工程A及び前記工程Cで測定された電圧信号の比($c1'/a1'$)を対比することによって、医薬品の危険性を判定しても良い。
- [0030] 前記医薬品安全性試験方法において、前記検体細胞は、例えばHERGイオンチャネルを定常発現させた細胞株であり得る。
- [0031] 前記医薬品安全性試験方法において、F)前記工程A及び前記工程Cの前に、所定時間、前記検体細胞を第一の対照溶液に接触させた後、前記検体細胞が接する前記第一の対照溶液を第二の対照溶液に換える工程があっても良い。また、G)前記工程Bの前に、所定時間、前記検体細胞を第一の測定溶液に接触させた後、前記検体細胞が接する前記第一の測定溶液を第二の測定溶液に換える工程を含み、前記第二の対照溶液及び前記第二の測定溶液が、それぞれ前記第一の対照溶液及び前記第一の測定溶液と、前記試験医薬品以外の共通に含まれる少なくとも一つのイオン濃度が異なるものであっても良い。
- [0032] 前記医薬品安全性試験方法において、前記電圧信号が、予め設定したサンプル

時間毎の電圧信号の振幅の偏差値を計算する単位偏差値の集合の統計値であっても良い。

[0033] 前記統計値が、前記単位偏差値の分布の平均値であっても良い。また、前記統計値が、前記単位偏差値の分布の分散値であっても良い。

[0034] 前記工程Bにおいて、前記検体細胞が被試験医薬品を含む測定溶液に接した状態で測定された電圧信号は、予め設定したサンプル電圧閾値を超えた後に検出した電圧信号であることが好ましい。

[0035] さらに、本発明は、

HERGイオンチャネル又はその相同物を含む検体細胞を含む溶液を満たすことが可能な凹部を有する基板と、

前記凹部に設けられ、かつ、前記検体細胞の近傍に配置可能な1以上の測定電極と、

前記溶液に浸し、前記測定電極と隔離するように設けられた参照電極とを有するセンサと、

前記測定電極と前記参照電極との間の電圧を測定する電圧測定装置と、

前記凹部に対し複数種類の前記溶液を注入及び排出する溶液注入排出装置と、制御装置と、を備え、

前記制御装置は、前記溶液注入排出装置を制御して前記凹部に第1の種類の前記溶液としての被試験医薬品を含まない対照溶液を前記凹部に満たし、この状態a2で前記電圧測定装置によって前記測定電極と前記参照電極との間の電圧を測定し、

その後、前記溶液注入排出装置を制御して前記凹部から前記対照溶液を排出し、かつ前記凹部に第2の種類の前記溶液としての被試験医薬品を含む測定溶液を満たし、この状態b2で前記電圧測定装置によって前記測定電極と前記参照電極との間の電圧を測定し、

その後、前記溶液注入排出装置を制御して前記凹部から前記測定溶液を排出し、かつ前記凹部に前記対照溶液を再び満たし、この状態c2で前記電圧測定装置によって前記測定電極と前記参照電極との間の電圧を測定し、

前記状態a2で測定された前記電圧と前記状態c2で測定された前記電圧とを比較し、
前記比較結果に基づいて前記被試験医薬品の安全性を判定する、医薬品安全性試験システムである。

[0036] 上記医薬品安全性試験システムは、前記各測定電極の近傍に前記検体細胞が複数配置されている構成であつても良い。

[0037] また、上記医薬品安全性試験システムは、前記センサが、前記基板を厚み方向に貫通する貫通孔を有し、前記貫通孔近傍に前記測定電極が配置されている構成であつても良い。

発明の効果

[0038] 本発明の医薬品安全性試験方法及び医薬品安全性システムによれば、HERGチャネルに外部から人工的に電気信号を新たに印加する処理を経ることなく、QT延長を起こしていることに相当する測定電極での応答及び応答時間が医薬品非存在下にくらべ不可逆的に延長される、危険性を内在するオープンチャネル型候補医薬品を評価できる。

[0039] また、本発明の医薬品安全性試験方法及び医薬品安全性試験システムによれば、細胞膜を破碎することなく、かつ、人工的に調整した細胞内液を使用することなく、1液系で測定できるので、より生体環境に近い測定条件で試験を実施できる。この両者の効果により、従来の方法に比べ、本発明の医薬品安全性試験方法は、より信頼性の高い試験となることができる。また、外部印加用電気回路等を省略でき、装置を簡便に構成することができる。さらに、装置の生産性、製造性の向上にも貢献する。

[0040] 本発明の上記目的、他の目的、特徴及び利点は、添付図面参照の下、以下の好適な実施態様の詳細な説明から明らかにされる。

図面の簡単な説明

[0041] [図1-A]図1-Aは、実施の形態1における医薬品安全性試験方法を示すフローチャートであつて、ステップS1とステップS3の測定結果を比較する場合のフローチャートである。

[図1-B]図1-Bは、実施の形態1における医薬品安全性試験方法を示すフローチャ

ートであって、ステップS2とステップS3の測定結果を比較する場合のフローチャートである。

[図2]図2は、実施の形態1における医薬品安全性試験センサを模式的に示す断面図である。

[図3]図3は、図2に示すセンサの上面図である。

[図4]図4は、実施の形態1における医薬品安全性試験方法の準備工程(ステップS0)を示すフローチャートである。

[図5]図5は、実施の形態1の別の実施の形態における医薬品安全性試験方法の工程を示すフローチャートである。

[図6-A]図6-Aは、実施の形態1に示した医薬品安全性試験システムを模式的に示す構成図であって、ウェル内溶液置換装置及びウェル内溶液排出装置を有する医薬品安全性試験システムの構成図である。

[図6-B]図6-Bは、実施の形態1に示した医薬品安全性試験システムを模式的に示す構成図であって、ウェル内溶液置換装置を有する医薬品安全性試験システムの構成図である。

[図6-C]図6-Cは、実施の形態1に示した医薬品安全性試験システムを模式的に示す構成図であって、ウェル内溶液置換装置及びウェル内溶液排出装置のいずれも有しない医薬品安全性試験システムの構成図である。

[図7-A]図7-Aは、本発明の医薬品安全性試験方法の工程を示すフローチャートであって、実施の形態2における医薬品安全性試験方法の工程を示すフローチャートである。

[図7-B]図7-Bは、本発明の医薬品安全性試験方法の工程を示すフローチャートであって、実施の形態3における医薬品安全性試験方法の工程を示すフローチャートである。

[図7-C]図7-Cは、本発明の医薬品安全性試験方法の工程を示すフローチャートであって、実施の形態4における医薬品安全性試験方法の工程を示すフローチャートである。

[図8]図8は、実施の形態5における医薬品安全性試験方法の工程を示すフローチャ

ートである。

[図9]図9は、実施の形態6における医薬品安全性試験センサの構造を示す部分断面図である。

[図10]図10は、実施の形態6の医薬品安全性試験センサの構造を模式的に示す図（全体の斜視図）である。

[図11]図11は、実施の形態6の医薬品安全性試験センサのセンサ基板の詳細構造を示す部分断面図である。

[図12]図12は、実施の形態6の医薬品安全性試験センサのセンサ基板の詳細構造を示す下面図である。

[図13]図13は、実施の形態6に示した医薬品安全性試験システムの構成図である。

[図14]図14は、実施例1の実験プロトコール1におけるセンサ120電極電圧時系列波形の測定結果を示す図である。

[図15]図15は、実施例1の実験プロトコール2におけるセンサ120電極電圧時系列波形の測定結果を示す図である。

[図16]図16は、実施例1の薬剤溶液2に関する電圧ヒストグラムピーク値Jの変化量の測定結果を示す図である。

[図17]図17は、実施例1の対照溶液2に関する電圧ヒストグラムピーク値Jの変化量の測定結果を示す図である。

[図18]図18は、実施例1の薬剤溶液2に関する電圧ヒストグラム分散値Kの変化量における測定結果を示す図である。

[図19]図19は、実施例1の対照溶液2に関する電圧ヒストグラム分散値Kの変化量における測定結果を示す図である。

[図20]図20は、実施例1における電圧振幅値の変化の統計量の測定結果を示す図である。

[図21]図21は、実施例2におけるセンサ120電極電圧時系列波形の測定結果を示す図である。

[図22]図22は、実施例2における電圧ヒストグラムピーク値Jの変化量の測定結果を示す図である。

[図23]図23は、実施例2における電圧ヒストグラム分散値Kの変化量の測定結果を示す図である。

[図24]図24は、実施例3における電圧振幅値の変化の統計量の測定結果を示す図である。

[図25]図25は、実施の形態1に示したセンサ基板の製造方法における工程1を示す断面図である。

[図26]図26は、実施の形態1に示したセンサ基板の製造方法における工程2を示す断面図である。

[図27]図27は、実施の形態1に示したセンサ基板の製造方法における工程3を示す断面図である。

[図28]図28は、実施の形態1に示したセンサ基板の製造方法における工程4を示す断面図である。

[図29]図29は、実施の形態1に示したセンサ基板の製造方法における工程5を示す断面図である。

[図30]図30は、実施の形態1に示したセンサ基板の製造方法における工程6を示す断面図である。

符号の説明

[0042] 1 検体細胞

51 測定溶液

52 第一の溶液

101 基板

102 測定電極

103 参照電極

104 ウェル(第一のウェル)

105 リード線(測定電極102側)

106 絶縁膜

107 外部接続部(測定電極102側)

108 リード線(参照電極103側)

- 109 外部接続部(参照電極103側)
- 111 電極接点ピン
- 112 第二のウェル
- 113 交換口
- 114 チューブ
- 115 開口
- 116 微小くぼみ
- 117 貫通孔
- 118 底面基板
- 119 溶液保持部
- 120 医薬品安全性試験センサ
- 121 センサ設置台
- 122 センサ基板(小片基板)
- 131 ウェル形成体
- 131a 開口
- 140 基板
- 141 ベース
- 142 中間層
- 143 薄板
- 144 レジスト膜(ベース側)
- 145 レジスト膜(薄板側)
- 145a パターン
- 146 保護膜
- 150 医薬品安全性試験システム
- 151 遮蔽箱
- 152 第一の増幅部
- 153 第二の増幅部
- 155 計算処理部(コンピュータ)

156 測定環境調節装置

157a ウェル内溶液置換装置

157b ウェル内溶液排出装置

158 溶液切替装置

159 注入管

160 排出管

L1 測定溶液溜め

L2 陽性対照試薬溶液溜め

L3 試験医薬品A溶液溜め

L4 試験医薬品B溶液溜め

L5 第二の溶液53溜め

L6 第二の溶液54溜め

P 検体細胞1導入装置

発明を実施するための最良の形態

[0043] 以下、本発明の好ましい実施の形態を、図面を参照しながら説明する。

[0044] (実施の形態1)

図1A及び図1Bは、本発明の実施の形態1における医薬品安全性試験方法の工程を示すフローチャートである。以下、本実施の形態を、図1A及び図1Bを参照しつつ説明する。

[0045] 本発明の医薬品安全性試験方法は、医薬品安全性試験センサの測定電極の近傍に検体細胞を用意(ステップS0)した後、測定電極からの電気信号に基づく電圧信号であって、検体細胞が接する溶液が、被試験医薬品が存在しない対照溶液である場合における検体細胞のHERGチャネルの情報を含む電圧信号を測定する工程(ステップS1、ここでの電圧信号をaとする)と、検体細胞が接する溶液が、被試験医薬品が存在する測定溶液である場合における検体細胞のHERGチャネルの情報を含む電圧信号を測定する工程(ステップS2、ここでの電圧信号をbとする)と、検体細胞が接する溶液を再び被試験医薬品が存在しない対照溶液に戻した場合における検体細胞のHERGチャネルの情報を含む電圧信号を測定する工程(ステップS3、ここ

での電圧信号をcとする)と、ステップS1とステップS3の電圧信号を比較する工程(ステップS4A)、又はステップS2とS3の電圧信号を比較する工程(ステップS4B)と、かかる電圧信号の比較結果に基づいて、被試験医薬品の危険性を判断する工程(ステップS5、S6及びS7、並びにステップS8、S9及びS10)からなる。

[0046] ステップS1において検体細胞が接する対照溶液と、ステップS3において検体細胞が接する対照溶液とは、成分が同じものである。ステップS2において検体細胞が接する測定溶液と、ステップS1又はS3において検体細胞が接する対照溶液とは、被試験医薬品が存在するか否かのみが異なるものであるとする。また、ステップS1又はS3において、検体細胞が接する対照溶液は、測定溶液の被試験医薬品に換えて陽性対照試薬又は陰性対照試薬を添加したものであっても良い。

[0047] ここで、ステップS2において、被試験医薬品がHERGチャネルを拮抗すると、上述したようにカリウムイオンの出入りが阻害され、再分極が起こらなくなるため、電圧信号は $a < b$ となる。一方、被試験医薬品がオープンチャネル型の拮抗剤でなければ、ステップS3において、被試験医薬品がHERGチャネルから離れるため、電圧信号は $b > c$ となるが、オープンチャネル型の拮抗剤であれば $b \approx c$ となる。

[0048] すなわち、ステップS4Aにおける電圧信号の比較とは、例えば、(1)電圧信号a及びcの差 $[a - c]$ を検出し、その値が一定の基準値以下になるか否か判定すること、(2)電圧信号aと電圧信号cの比 $[c / a]$ を検出し、その値が一定の基準値以下になるか否か判定することをいう。同様に、ステップS4Bにおける電圧信号の比較とは、例えば、(1)電圧信号b及びcの差 $[b - c]$ を検出し、その値が一定の基準値以上になるか否か判定すること、電圧信号bとcの比 $[c / b]$ を検出し、その値が一定の基準値を超えるか否か判定することをいう。

[0049] 図1Aは、ステップS4AでステップS1とS3の測定結果を比較する場合のフローチャートを示す。図1Aに示すフローチャートでは、ステップS4Aの比較結果に基づき、ステップS5～S7において被試験医薬品の安全性を評価する。ステップS4Aでa及びcを比較した結果、ステップS5において測定結果(電圧信号)に差がない(例えば、 $[c / a]$ が一定値以下である)と判断された場合、その被試験医薬品は、HERGチャネルを拮抗するオープンチャネル型の拮抗剤ではないために、「催不整脈作用なし」と

判定される(ステップS6)。

[0050] ステップS5において、測定結果(電圧信号)に差がある(例えば、 $[c/a]$ が一定値を超える)と判断された場合、その被試験医薬品は、HERGチャネルを拮抗するオープンチャネル型の拮抗剤であることになり、「催不整脈作用あり」と判定される(ステップS7)。

[0051] 一方、図1Bは、ステップS4BでステップS2とS3の測定結果を比較する場合のフローチャートを示す。図1Bに示すフローチャートでは、ステップS4Bの比較結果に基づき、ステップS8～S10において被試験医薬品の安全性を評価する。ステップS4Bでb及びcを比較した結果、ステップS8において測定結果(電圧信号)に差がある(例えば、 $[c/b]$ が一定の基準値以下である)と判断された場合、その被試験医薬品は、「催不整脈作用なし」と判定される(ステップS9)。

[0052] ステップS8において、測定結果(電圧信号)に差がない(例えば、 $[c/b]$ が一定の基準値未満である)と判断された場合、その被試験医薬品は、HERGチャネルを拮抗するオープンチャネル型の拮抗剤であることになり、「催不整脈作用あり」と判定される(ステップS10)。

[0053] [医薬品安全性試験システムのセンサ]

次に、本発明の医薬品安全性試験システムに用いるセンサの構造を説明する。図2は、本実施の形態の医薬品安全性試験システムに用いるセンサの構造を模式的に示す断面図である。また、図3は、図2に示すセンサの上面図である。本実施の形態のセンサ120は、基板101と、基板101の上に構築された溶液保持部119とからなる。溶液保持部119は、測定溶液51を保持するための複数のウェル104と、参照電極103を備える。

[0054] 基板101の上面には、複数の島状の測定電極102が所定の位置に形成されている。また、基板101の上面には、縁部に位置するように各測定電極102に対応させて外部接続部107が形成され、この外部接続部107とその対応する測定電極102とを接続するようにリード線105が形成されている。そして、基板101の上面の、測定電極102及び外部接続部107が形成された部分を除く部分を覆うように絶縁膜106が形成されている。絶縁膜106の測定電極102の周囲に位置する部分は測定電極10

2に向けてすり鉢状に窪んで凹部106aを形成している。絶縁膜106上には膜状のウェル形成体131が形成されている。

[0055] ウェル形成体131には、各測定電極102の上面とその周囲の凹部106aを含む絶縁膜106の上に位置するように開口131aがそれぞれ形成されていて、各測定電極102の上面及びその周囲の絶縁膜106とこの開口131aの内周面とで囲まれた空間がウェル104を構成している。この開口131aの縁部及び内周面に沿うように鍍付き筒状の参照電極103が形成されている。また、ウェル形成体131の上面の縁部には、各ウェル104に対応させて外部接続部109が形成され、この外部接続部109がウェル形成体131の上面に形成されたリード線108によってその対応するウェル104の参照電極103に接続されている。そして測定時には、外部接続部107に第1の増幅部152が接続され、外部接続部109は接地される。

[0056] 電位測定時に、検体細胞1は、測定電極102の近傍に配置される。測定電極102からの電位信号は、リード線105、外部接続部107、第一の増幅部152を介して、参照電極103の電位を基準として測定される(以下、測定電極102からの電位信号と、参照電極103からの電位信号の差を、測定電極102からの電圧信号ともいう)。

[0057] 参照電極103の電位はリード線108、外部接続部109を介して検出される。これにより、測定電極102近傍に配置された検体細胞1に起因する電圧信号が測定電極102にて測定される(上述の工程B)。

[0058] なお、電位測定時には、図2に示したように、測定電極102の近傍に検体細胞1が配置されるが、図3では、細胞は省略して、センサ120の構成のみを表示する。センサ120の詳細な構成及び作成方法については後述する。

[0059] [検体細胞]

本発明の医薬品安全性試験に用いられる検体細胞は、HERGチャネルを有する。検体細胞は、HERGチャネルを予め内在した細胞、HERGチャネルを後から導入した細胞のいずれであっても良い。

[0060] ここで、HERGチャネルとは、細胞内及び細胞膜上に存在する生体構成要素であって、人体に対する危険性を有する被試験医薬品が作用する対象を指す。本発明の医薬品安全性試験が適用できるHERGチャネルの作用は、危険性を有する被試

験医薬品に対して、活性化される場合と、不活性化される場合の、どちらであっても良い。以下では、具体的にHERGチャネルが不活性化される時に危険性が増大する場合にのみ記述するが、それだけに限定されない。

[0061] そのようなHERGチャネルとしては、細胞膜上に存在するイオンチャネル、細胞内に存在する情報伝達物質、代謝産物等の各種タンパク質、核酸類と、それらの改変物などが挙げられる。特に、本発明の主要な応用例である、薬物誘発性QT延長症候群を例にとると、HERGチャネルには、HERGイオンチャネルや遅延整流性カリウムイオンチャネル、先天性QT延長症候群の原因遺伝子LQTなどが挙げられる。また、前述のHERGチャネルを予め内在した検体細胞としては、モルモット乳頭筋標本やイヌPurkinje線維の細胞、モルモット心筋細胞、モルモット心房筋細胞などが挙げられ、後からHERGチャネルを導入される宿主細胞として利用可能な検体細胞は、HEK293、CHO、アフリカツメガエルの卵母細胞などが挙げられる。

[0062] HERGチャネルの導入は、HERGチャネルを発現する遺伝子を当業者に公知の遺伝子導入技術を用いて導入することができる。実験毎にベクターなどのHERGチャネル発現遺伝子を導入する一過性発現細胞、HERGチャネル発現遺伝子を定常的に発現するように改変された定常発現細胞の両方を用いることができるが、定常発現細胞はHERGチャネルの発現が定常的に起こっているため、測定誤差の観点から優れているため、定常発現細胞を用いることが望ましい。

[0063] [準備工程の詳細]

図4は、測定に先だって、HERGイオンチャネルを含む検体細胞を、医薬品安全試験センサの測定電極の近傍に用意する準備工程(工程O、図1のステップS0)の詳細を示すフローチャートである。この準備工程は、実線で示すように、センサ120のウェル104に溶液を満たす工程(ステップS21)、ウェル104に満たされている溶液を、所望の検体細胞1を所定の量だけ懸濁させた細胞懸濁液に置換する工程(ステップS23)からなる。このような工程により、測定電極102の近傍に検体細胞を配置することができる。

[0064] なお、図4に点線矢印で示すように、準備工程(ステップS0)を、ステップS21、測定電極102の近傍及び基板101表面の領域に固定化剤を固定化する工程(ステッ

プS22)、ステップS23、細胞を培養する工程(ステップS24)の順に遂行する工程としてもよい。

- [0065] 本発明の医薬品安全性試験方法に用いる溶液とは、20mM～400mMの塩化ナトリウムを主成分とする生理食塩水溶液、及び種々の栄養素、成長因子、抗生物質などを含有する培養液、所定の化学物質、化合物、薬剤を溶解させた緩衝溶液などを指す。溶液は、予め脱気されているものを使用すると好ましい。また、溶液は、例えば、4℃から40℃の範囲内に温度設定されているものを用いることができる。
- [0066] なお、固定化剤とは、細胞の固定化を容易及び／又は強固にする材料のことをいう。固定化剤の固定化は、センサ120の作製途中である、ウェル104を設置する前に行っても良い。
- [0067] 細胞を固定化する固定化剤の固定化材料としては、通常、誘電体を用いられる。誘電体としては、強塩基性もしくは強酸性官能基を持つ高分子が好適に用いられる。具体的には、ポリエチレンイミン(PEI)、ポリオルニチン(PO)、ポリリジン(PL)等の正荷電性ポリマーが好適に用いられる。正に荷電したこれらのポリマーは、負に荷電した細胞を引き付ける効果も併せ持つ。同様に、細胞接着能を併せ持つ材料は、ビグアニド基、もしくはカルバモイルグアニジド基を持つ高分子が上げられる。具体的にはアリルビグアニド-co-アリルアミン(PAB)、アリル-N-カルバモイルグアニジノ-co-アリルアミン(PAC)が好適に用いられる。また、マトリクス材料を用いることができる。マトリクス材料として、細胞接着性のタンパク質が好適に用いられ、かかるタンパク質としてはコラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン等が挙げられる。
- [0068] 固定化剤による被覆は、上記固定化材料を所定の濃度で溶解させた固定化溶液を、測定電極102上に曝し、所定時間経過後、測定電極102の表面から固定化溶液を取り除き、表面を洗浄液で少なくとも1回以上洗浄し、乾燥することにより行うことができる。又は、上記固定化溶液を、測定電極102の上面だけにスポットし、被覆する方法であっても良い。
- [0069] 培養液内に播種された細胞は、培養が進行すると同時に、付着性細胞が、固定化剤が固定化されている場合はこれを介して、測定電極102上に強固に固定化される

。

[0070] [測定開始以降の工程の詳細]

上述した準備工程(図1のステップS0)の後、ステップS1(工程A)として、センサ120の測定電極102において検体細胞1が発する電圧信号が、被試験医薬品との対照として、被試験医薬品だけを省いた対照溶液に対して測定される。

[0071] 次に、ステップS1の後、ステップS2(工程B)として、センサ120の測定電極102において検体細胞1が発する電圧信号が、被試験医薬品を所定の濃度で含有する測定溶液に対して測定される。

[0072] 次に、ステップS2の後、ステップS3(工程C)として、センサ120の測定電極102において検体細胞1が発する電圧信号が、再び対照溶液に戻した時に測定される。例えば、検体細胞1のHERGチャンネルが通常時に常時活性化している場合においては、そのまま測定電極102で電圧信号を測定するだけで良い。あるいは、例えば、検体細胞1のHERGチャンネルが通常時に不活化している場合においては、検体細胞1のHERGチャンネルを活性化するために、検体細胞には刺激が与えられる。

[0073] なお、刺激を与える場合の試験方法については、実施の形態5に詳述する。また、工程Aにおいて、電圧信号を検出する回数は任意であり、各測定溶液及び各対照溶液に対して複数回測定しうる。

[0074] 次に、ステップS4として、ステップS1において測定された測定電極102の電圧信号と、ステップS3において測定された測定電極102の電圧信号の測定結果を比較するか、又はステップS2において測定された測定電極102の電圧信号と、ステップS3において測定された測定電極102の電圧信号の測定結果を比較する。なお、両方の測定結果を比較しても良い。具体的な比較方法の一例は、上述した通りである。

[0075] ここで、ステップS1で測定された測定電極102の電圧信号と、ステップS2で測定された測定電極102の電圧信号とを比較することによって、被試験医薬品が与える検体細胞1のチャンネルへの拮抗影響を抽出することができる。

[0076] また、ステップS2において測定された測定電極102の電圧信号と、ステップS3において測定された測定電極102の電圧信号と比較することによって、被試験医薬品が与える検体細胞1のチャンネルへの拮抗形式を抽出することができる。

- [0077] 対照溶液としては、上述した被試験医薬品が非存在の対照溶液の他に、陽性対照試薬又は陰性対照試薬存在下の対照溶液を、代わりに、もしくは、さらに、適用できる。
- [0078] ステップS4Aにおける電圧信号の比較は、一つのウェル104内の溶液を交換することによって実現される(方法 α)が、ステップS1～S3に示した測定溶液及び対照溶液のそれぞれが入った異なるウェル104の測定電極102の電圧信号を、直接比較することによっても実現することができる(方法 β)。方法 α は、特に同じ細胞からの信号を測定することになり、信頼性の高い測定が実施でき、また、方法 β は、溶液を交換することがないため、高い処理速度で電圧信号差を検出することができる。
- [0079] 最後に、ステップS5として、ステップS4Aにおける電圧信号の比較結果に基づいて、被試験医薬品の危険性を判定する。なお、ステップS4Aにおける電圧信号の比較は、電圧信号の振幅値を比較して評価することが望ましい。ステップS4Bについても同様である。
- [0080] なお、以下においては、全て図1Aに示すフローチャートの例、すなわち、ステップS1(工程A)とステップS3(工程C)の電圧信号の差を比較することによって、被試験医薬品の安全性を評価する方法及びシステムについて説明する。
- [0081] HERGチャネルの拮抗形式は特徴的であるため、上述したように、ステップS4Aで計算される、ステップS1及びステップS3における電圧信号の振幅の差で判定できる。催不整脈作用を有する拮抗剤(被試験医薬品)は、チャネルの孔(ポア)に拮抗剤が不可逆的にはまり込む、オープンチャネルブロッカー型である。このため、チャネル閉塞率に依存して、電圧信号の振幅値が変化する。よって、具体的には、電圧信号の振幅を、イオンチャネル開閉が現れる小区間に切り出して、小区間での電圧信号の振幅の標準偏差値を、その小区間の代表値として度数分布化させることによって、容易に被試験医薬品の危険性を定量的に解析できる。つまり、測定用電極102の電圧信号の振幅値が大きいほど、度数分布のピーク値が大きくなり、電圧信号の振幅値がばらつくほど、度数分布の半値幅は大きくなる。
- [0082] また、別の電圧信号の差の解析方法としては、予め設定した設定電圧閾値をまたぐゼロクロス時間を指標として評価しても良い。つまり、設定電圧閾値より大きい電圧信

号を出している時間は、危険要素が活性化された時間を示すので、上記の時間が長いということは、被試験医薬品の危険性が増す。前述の小区間で区切って度数分布化する解析法で解析する全体の時間は、上記のゼロクロス時間と等しく設定しても良い。

[0083] いずれの解析方法においても、測定電極の電圧信号を測定する本発明の医薬品安全性試験方法及びシステムにおいては、被試験医薬品の危険度が増大すると、電圧信号が増大する方向に表れるため、最低検知感度を高くすることができ、信頼性の高い安全性試験を実施することができるという特徴も備える。

[0084] 図5に、図1Aに示すフローチャートに、さらに異なる工程を付加した医薬品安全性試験方法のフローチャートを示す。図5に示した方法においては、ステップS1(工程A)の前に、検体細胞1のHERGチャネルの活動に由来する電圧信号をさらに大きく測定するために、予め、同様に活性化している非HERGチャネルを不活化させる工程(ステップS11)を持つ。これは、例えば、非HERGチャネルだけを選択的に拮抗する拮抗剤を溶液に混合させておくことにより実現される。かかる構成により、HERGチャネルの活性化電圧信号だけを測定することができ、目的の電圧信号を感度良く検出するために有効である。

[0085] [センサの詳細構成と作製方法]

本実施の形態に示された医薬品安全性試験方法に用いられるセンサ120の構成は、上述したように、図2及び図3に示した。ここで、図2及び図3を参照しつつ、さらにその構成を詳述し、また、センサ120の作成方法も説明する。

[0086] 測定電極102の数は、特に限定されず、各ウェル104に一つであっても、複数であっても良い。各ウェル104に一つの測定電極102が配置される場合には、一つのセンサ120上に多くのウェル104を集積化することができ、本発明の医薬品安全性試験を並列的に処理する能力が向上し、短時間で多数の試験を実施できる。また、各ウェル104に複数の測定電極102が配置される場合には、複数の測定データによる統計処理が可能となるので、各ウェル104で実施される試験の確度が向上し、高い信頼性を実現することができる。さらに、一つの測定電極102は、一つの細胞からの電位信号、及び複数の細胞の電位信号の集合を測定しても良い。

- [0087] 測定電極102からの電位信号を伝えるリード線105を被覆し、絶縁するために絶縁層を設けても良い。絶縁層の材料としては、ポリイミド(PI)樹脂、エポキシ樹脂などの樹脂が挙げられる。好ましくは、ネガティブフォトセンシティブポリイミド(NPI)などの感光性樹脂が用いられる。感光性樹脂を用いる場合、まず、センサ部上面全体に感光性樹脂を塗布し、その後、フォトエッチングによるパターン形成を利用して、測定電極102上及びリード線105の外部接続部107の上に形成された絶縁層を取り除くことにより、該電極102及び外部接続部107を露出させ、任意の領域に絶縁層を形成することが可能となる。生産効率の点から、上述した方法により、絶縁層を形成することが好ましい。
- [0088] 溶液保持部119は、ウェル104を複数有し、その内部に測定溶液51(ウェル104内部には、測定溶液及び対照溶液が添加されうるが、以下においては両者を区別することなく単に測定溶液ともいう)を蓄えることができる。また、参照電極103を有し、測定溶液51を介して測定電極102と電氣的に導通する。
- [0089] 図示していないが、各ウェル104に測定溶液51の導入及び置換を実現するために、注入管が溶液保持部119の近傍に配置されても良い。注入管は、各ウェル104に測定溶液51を導入する目的を達成するのであれば、どのような形態でも取りうる。一例を挙げれば、ウェル形成体131に流路を形成し、この流路を通じて測定溶液51を測定電極102に向けて流しても良いし、ウェル形成体131に注入管の外径とほぼ等しい穴を電極102に向けて掘り、そこに注入管を差し込み固定しても構わない。
- [0090] 好適には、注入管は、溶液保持部119の上面に配置され、複数の各ウェル104に測定溶液51が導入できるように移動機構を併設することが望ましい。また、必要に応じて、測定溶液51を交換するための排出管を備えても良い。かかる構成により、細胞1の培養に際しては、ウェル104内で培養液51にて長期培養することができ、また、測定に際しては、被試験医薬品剤不存在の測定溶液51と被試験医薬品剤存在の測定溶液51を交換することができるようになるため、医薬品安全性試験を迅速に測定することができる。
- [0091] 参照電極103は、ウェル104内で測定溶液51と一部分を接触し、かつ、測定電極102と直接導通しないように配置される。参照電極103は、ノイズを低減するために

その面積を十分大きくする必要がある。具体的には、参照電極103の面積の合計は、すべての測定電極102の面積の合計に対して5倍以上大きい構成となるように形成されているのが望ましい。参照電極103の最表面は、金、白金、銀―塩化銀などの材料で作製されたものであるが、図2に示すように、ウェル104と一体化して、細胞が固定される部分とその近傍を除いた面に形成させても良い。この場合、参照電極103は、ウェル104毎に個別に用意しても良いし、全面に形成させても良い。

[0092] かかる構成は、複数の測定電極102を有するセンサ120を実現すること、参照電極103面積を大きくすることが容易であり、かつ、薄膜形成化技術を用いることでセンサ120の効率的な生産の面からも望ましい。また、参照電極103は、上記にこだわらず、棒状電極をウェル104内の測定溶液51に浸すなど任意の形であり得る。

[0093] 次に、センサ120の作製方法の一例を示す。まず、電極材料を基板101上に蒸着した後、フォトリソを用いてエッチングすることにより、電極102と、対応するリード線105及び外部接続部107を1セットとして、かかるセットを複数セット有する所望のパターンを形成する。その後、電極102上及び外部接続部107を除く上記パターンの上面と基板101の上面とを絶縁層で被覆する。そして、基板を所定角の小片基板101に切り出す。電極102のパターンは、予め前記パターンを形成させたステンシルマスクを通じて蒸着するマスク法や、リフトオフ法によって形成しても良い。このように形成された小片基板101の上面に、当業者に既知の方法で凹部106aを作製し、参照電極103を形成した溶液保持部119(ウェル形成体131)を接着し、センサ120を得る。

[0094] [医薬品安全性試験システム(1)]

図6-Aは、本実施の形態の医薬品安全性試験システムの一例を模式的に示すブロック図である。図6-Aに示すように、医薬品安全性試験システム150Aは、医薬品安全性試験センサ120と、少なくともセンサ120を静電的に遮蔽する遮蔽箱151と、センサ120上の測定電極102と参照電極103間の電圧信号を増幅処理する第一の増幅部152と、第一の増幅部152で増幅された電圧信号のうち、所定の周波数帯域だけの信号成分を更に増幅処理する第二の増幅部153、第二の増幅部153で増幅された電圧信号をデータ処理する計算処理部155と、測定環境調節装置156と、複

数の測定溶液又は薬剤溶液をウェル104内に導入及び置換するためのウェル内溶液置換装置157aと、ウェル104内の測定溶液又は薬剤溶液を排出するウェル内溶液排出装置157bと、溶液切替装置158とを有している。

[0095] このような構成とすることにより、簡易なシステムで、多数の医薬品候補薬剤の危険性を迅速に検出するシステムを提供することができる。

[0096] 医薬品安全性試験センサ120において、センサ120内の参照電極103に対する測定電極102の電位信号は、測定電極102のリード線105を通じて、第一の増幅部152へと出力される。第一の増幅部152は、電位信号を高感度に増幅し、第二の増幅部153へと出力する。第二の増幅部153は、A/D変換等を経て、計算処理部155へと電位信号を出力する。最後に、計算処理部155は、入力した電圧信号を所定の手順で比較することにより、センサ120内の被試験医薬品の安全性を判定する。すなわち、医薬品安全性試験システム150Aにおいて、ウェル内溶液置換装置157aの溶液注入及び排出によって提供される様々な薬剤に対する、標的生体構成成分の危険要素に起因する電位信号の変化を、細胞外に配置された電極102の電位変化として測定し得る。

[0097] 医薬品安全性試験システム150Aは、医薬品安全性試験センサ120からの出力を処理するため、適切な測定用ソフトウェアを備えた計算処理部155によって一体として構成される。計算処理部155は、例えば、コンピュータによって構成され、測定用ソフトウェアは、コンピュータの記憶部に格納されていて、当該コンピュータの画面上に、信号処理・測定条件などを設定し得るパラメータ設定画面、細胞から検出された電位変化を記録し、リアルタイムで表示し得る記録画面、及び記録されたデータを解析し得るデータ解析画面などを与える。

[0098] また、ウェル内溶液置換装置157a及びウェル内溶液排出装置157bは、計算処理部150に電氣的に接続され、制御されている。計算処理部155は、溶液切替装置158に、所定のタイミングと手順でウェル内溶液置換装置157a内の溶液をセンサ120のウェル104に注入するように制御信号を送る。さらに、計算処理部155は、ウェル内溶液排出装置157bに、所定のタイミングと手順でウェル104内の溶液を排出するように制御信号を送る。このように構成されているため、予め設定した所定のタイミン

グ、測定手順で各溶液の交換を自動的に行うことができる。

[0099] 遮蔽箱151は、センサ120を静電遮蔽するよう設置される。遮蔽箱151は、センサ120のみならず、第一の増幅部152も一体として静電遮蔽することが望ましい。かかる構成により、測定電極102で観測される電位信号がよりノイズに対して強くなる。また、遮蔽箱151によりセンサ120は外環境から遮光されるので、光感受性の薬剤溶液を測定に用いる場合であっても、光分解を防ぐことができ、長期にわたる測定の安定性と、測定の再現性を向上させることができる。特に、上方からウェル104内の測定溶液51をバッチ的に置換する方式では、遮蔽箱151の上方に位置する部分に開口が必要となるため、参照電極103をセンサ120上面の全面に形成させ、上記参照電極103を遮蔽箱151に接続することが好ましい。このように構成すると、信号が微小であってもS/N比を高くすることができ、より高感度に検出することが可能となる。

[0100] 測定環境調節装置156は、防振台の上に置かれ、さらに、ファラデーカゴ等の遮蔽箱で覆い、二重に静電遮蔽されている。

[0101] なお、医薬品安全性試験システム150Aでは、センサ120で測定された出力信号は、第一の増幅部152によって初段増幅され、第二の増幅部153によって、さらに増幅され、周波数帯域を制限された後、A/D変換器を介して計算処理部155であるコンピュータ(計算部)に入力される。このような構成とすることにより、センサ120に近い位置に第一の増幅部152を配置することができるので、医薬品安全性試験システム150Aは、外来ノイズに強いという特徴を有する。

[0102] さらに、医薬品安全性試験システム150Aは、所望の測定電極102からの電気信号を選択的に第一の増幅器に送るための回路選択器(図示せず)を備える。この回路選択器は、例えば、マルチプレクサで構成される。かかる回路選択器を備えることにより、電極の数が増えても、必ずしも第一の増幅器の数を増やす必要がなく、生産性の面から有用である。

[0103] ウェル内溶液置換装置157aは、ここでは、ウェル104の上面から所定の量の溶液を注入する装置である。また、ウェル形成体131に固定され、各ウェル104から放射状に伸びて配置された注入管159に、薬剤種類の数だけ溶液切替装置158を備える。また、ウェル内溶液排出装置157bは、ウェル104に注入された溶液を、各ウェル

104に接続された排出管160を通じて排出する装置である。これら二つの装置を有する構成により、医薬品安全性試験システム150Aは、センサ120の細胞保持部近傍の溶液だけを迅速に置換できる。このため、複数種類の薬剤に対する、細胞の薬理特性を簡便に、かつ、精度良く検出することが可能である。

[0104] 図6-Aに示した、ウェル内溶液置換装置157aにつながる各要素は、測定溶液溜め(L1)、陽性対照薬剤溶液溜め(L2)、被試験医薬品剤A溶液溜め(L3)、被試験医薬品B溶液溜め(L4)を例示しているが、これらに限定されるものではなく、各要素を増やすことにより、複数種類の薬剤溶液を同時に判定することができる。

[0105] さらに、医薬品安全性試験システム150Aは、センサ120を所定の温度、ガス濃度、湿度に保つための測定環境調節装置(図示せず)を備える。このため、細胞の播種から培養、そして測定までを一連のシステム上で行うことができ、移動に伴う滅菌などの煩雑な操作を経る必要がなく、全自動化による大量かつ効率的な測定及び判定を実施することができる。

[0106] 図6-Bは、本実施の形態の医薬品安全性試験システムの別の構成例を模式的に示すブロック図である。図6-Bに示す医薬品安全性試験システム150Bは、ウェル内溶液排出装置157b及び排出管160を有しない点でのみ、図6-Aに示す医薬品安全性システム150Aと異なる。以下、この相違点についてだけ説明する。

[0107] 本構成例による医薬品安全性試験システム150Bでは、ウェル内溶液置換装置157aがウェル104に溶液を予め設定した所定のタイミング、測定手順で注入し、必要な電圧信号を測定した後、ウェル140内の溶液を順次排出する。なお、ウェル内溶液置換装置157aは、溶液の注入のみ行い、使用者がウェル104内の溶液を、ピペティングやアスピレータ等を用いて排出するように構成しても良い。この場合、ウェル104内の溶液を排出した後、ウェル内溶液置換装置157aを再び作動させ、測定を続行する。このような構成としても、医薬品安全性システム150Aと同じ医薬品安全性評価機能を発揮できる。

[0108] 図6-Cは、本実施の形態の医薬品安全性試験システムのさらに別の構成例を模式的に示すブロック図である。図6-Cに示す医薬品安全性試験システム150Cは、ウェル内溶液置換装置157a、ウェル内溶液排出装置157b、溶液切換装置158、注

入管159及び排出管160を有しない点でのみ、図6-Aに示す医薬品安全性システム150Aと異なる。以下、この相違点についてだけ説明する。

- [0109] 本構成例による医薬品安全性試験システム150Cでは、使用者がウェル104に所定のタイミング、測定手順で、溶液をピペッティング等の手段で注入し、必要な電圧信号を測定した後、ウェル104内の溶液を、マイクロチューブとアスピレータ等を用いて排出する。そして、別の溶液をピペッティング等の手段で注入し、電圧を測定する。このように、ウェル104への溶液の注入、溶液の排出、溶液の切換を全て手動としても、医薬品安全性システム150Aと同じ医薬品安全性評価機能を発揮できる。

- [0110] (実施の形態2)

図7-Aは、本発明の実施の形態2の医薬品安全性試験方法の工程を示すフローチャートである。本実施の形態と実施の形態1との違いは、ステップS12を含むことのみであるので、以下、本実施の形態については、この相違点だけ説明する。

- [0111] ステップS12は、検体細胞1が測定溶液と接した状態で電圧信号を測定する工程(ステップS2)と、測定溶液を対照溶液に再び交換した状態で電圧信号を測定する工程(ステップS3)を繰り返す工程である。ステップS12によると、被試験医薬品の頻度刺激特性を知ることができる。一般に、危険要素が示す拮抗応答は、被試験医薬品によって、被試験医薬品が繰り返し与えられる時に増強する型と、減衰する型と、変わらない型の3種類が存在する。上記の頻度刺激情報は、被試験医薬品を実際に医薬品として長期間慢性的に人体に処方する際に、人体に対する危険性が発生するか否かの貴重な判断材料を提供する。なお、ステップS2及びステップS3において、電圧信号を検出する回数は任意であり、各被試験医薬品に対して複数回測定しうる。

- [0112] ここで、ステップS12では、ステップS2とステップS3を所定回数繰り返すまでは、ステップS21からステップS2に戻る。そして、ステップS2とステップS3を所定回数繰り返せば、ステップS21からステップS4Aへと進み、ステップS12は終了する。

- [0113] なお、ステップS4Aにおける測定結果の比較は、所定回数ごとのステップS2とステップS3の測定値を用いてもよいし、全ての測定値の平均値を用いても良い。前者の場合、CとAの差が所定回数ごとにどのように変化するか分かる。変化が回数を追う

毎に増加すると、被試験医薬品を実際に医薬品として長期間慢性的に人体に処方する際に、蓄積効果により人体に対する危険性が発生する可能性がある判断できる。

[0114] (実施の形態3)

図7-Bは、本発明の実施の形態3の医薬品安全性試験方法の工程を示すフローチャートである。本実施の形態と実施の形態2との違いは、ステップS12がステップS13に代わることのみであるので、この相違点だけ説明する。

[0115] ステップS13は、ステップS12と同じく、検体細胞1が測定溶液51と接した状態で電圧信号を測定する工程(ステップS2)と再び対照溶液に戻した状態で電圧信号を測定する工程(ステップS3)を繰り返す工程である。そして、ステップS13では、ステップS2とステップS3において、同じ検体細胞1に対し、種類の異なる被試験医薬品を含む溶液に交換して電圧測定を行う。

[0116] ここで、ステップS13では、ステップS2とステップS3を所定回数繰り返すまでは、被試験医薬品の種類を変更した測定溶液に交換し(ステップS22, S23)、その後、ステップS2に戻る。ステップS2とステップS3を所定回数繰り返せば、ステップS4Aへと進み、ステップS13は終了する。

[0117] ステップS13によると、被試験医薬品の複合作用特性を知ることができる。一般に、危険要素が示す拮抗応答は、単独の被試験医薬品によって起こる型と、複数種の被試験医薬品が順番に作用して起こる型が存在する。上記の複合作用特性情報は、被試験医薬品を実際に医薬品として人体に処方する際に、人体に対する危険性が発生するか否かの貴重な判断材料を提供する。

[0118] なお、ステップS4Aにおける測定結果の比較は、所定回数ごとのステップS2とステップS3の測定値を用いてもよいし、ステップS2とステップS3を所定回数繰り返した最終の測定値を用いても良い。後者の場合、初回の回数の測定値に差がなく、最終の測定値に差があるなら、単独の被試験医薬品ではなく、複数の被試験医薬品の組合せによって初めて、催不整脈作用を示すという情報が得られる。

[0119] (実施の形態4)

図7-Cは、本発明の実施の形態4の医薬品安全性試験方法の工程を示すフロー

チャートである。本実施の形態と実施の形態2との違いは、ステップS12がステップS14に代わることのみであるので、この相違点だけ説明する。

[0120] ステップS14は、ステップS12と同じく、検体細胞1が測定溶液51と接した状態で電圧信号を測定する工程(ステップS2)と再び対照溶液に戻した状態で電圧信号を測定する工程(ステップS3)を繰り返す工程である。そして、ステップS14では、ステップS2とステップS3が、同じ検体細胞1に対し、濃度の異なる同一被試験医薬品を含む溶液に交換して電圧測定を行う。通常は、濃度の薄い被試験医薬品から濃度の濃い被試験医薬品へと進める。これにより、どの濃度で催不整脈作用が起こり始めるかといった危険濃度を知ることができる。

[0121] ここで、ステップS14では、ステップS2とステップS3を所定回数繰り返すまでは、被試験医薬品の濃度が異なる測定溶液に交換し(ステップS24, S25)、その後、ステップS2に戻る。ステップS2とステップS3を所定回数繰り返せば、ステップS4Aへと進み、ステップS14は終了する。

[0122] なお、ステップS4Aにおける測定結果の比較は、所定回数ごとのステップS2とステップS3の測定値を用いてもよいし、全ての測定値の平均値を用いても良い。

[0123] ステップS14によると、被試験医薬品の濃度依存性を算出することができる。上記の情報は、被試験医薬品を実際に医薬品として人体に処方する際の安全処方量を算出するための貴重な判断材料を提供する。

[0124] (実施の形態5)

図8は、本発明の実施の形態5の医薬品安全性試験方法のフローチャートを示す図である。本実施の形態と実施の形態2との違いは、ステップS1及びステップS3の前に、検体細胞1が接する対照溶液を、測定溶液と対照溶液の中に共通に含まれるイオンの濃度を異ならせた対照溶液に交換する工程(それぞれ、ステップS15及びステップS17)と、ステップS2の前に、検体細胞が接する測定溶液を、ステップS15でイオン濃度を異ならせた対照溶液と同じイオン濃度の測定溶液に交換する工程(ステップS16)を有することのみであるので、この相違点だけ説明する。

[0125] ステップS11の次に、測定溶液と対照溶液の中に共通に含まれるイオンの濃度を異ならせた対照溶液をウェルに注入し(ステップS15)、この対照溶液について電圧

信号を測定する(ステップS1)。次に、ステップS1終了後、ウェル内の対照溶液を、イオン濃度が異なる測定溶液に交換し、(ステップS16)、この測定溶液について電圧信号を測定する(ステップS2)。さらに、ステップS2終了後、ウェル内の測定溶液を、イオン濃度が異なる対照溶液に再び交換し(ステップS17)、この対照溶液について電圧信号を測定する(ステップS3)。

[0126] そして、ステップS16, S2, S17, S3を所定回数繰り返す。そして、これらを所定回数繰り返せば、ステップS4Aへと進み、ステップS18(図7-AのステップS12に相当する)は終了する。

[0127] 本実施の形態における細胞への刺激は、溶液のイオン濃度を変化させることによる溶液刺激であり、電極を介する細胞への電氣的刺激とは区別できる。つまり、本発明の医薬品安全性試験方法の効果の一つである、電氣的刺激なしでの測定ができることは実現され、高感度な測定ができるという効果は十分に得られる。

[0128] HERGチャネルは、電位感受性カリウムイオンチャネルに分類されるが、活性化膜電位の閾値が静止膜電位付近にあり、浅い膜電位を持つ検体細胞では、平常時にもわずかに活性化しているため、活性化刺激は必要ないことが本発明者らによって発見された。平常時に不活化しているチャネルの例を具体的に挙げれば、受容体作動型イオンチャネル、GTP結合タンパク、酵素や、高い閾値を持つ電位感受性イオンチャネルの一部に見られる。受容体作動型イオンチャネル、GTP結合タンパク、酵素等のチャネルを活性化させる刺激は、受容体に結合する化学物質である。

[0129] このため、このチャネルを活性化させた時のセンサ応答は、具体的には、活性化物質を所定の濃度溶解させた活性化溶液をウェルに投入することによって実現することができる。また、電位感受性イオンチャネルを活性化させる場合は、溶液のイオン組成を変化させる溶液刺激が電氣的刺激と同様の効果を持つということが本発明者らによって確認されている。

[0130] 例えば、モルモット乳頭筋に存在する遅延整流性カリウムイオンチャネルは、電位感受性イオンチャネルに分類される。これらのイオンチャネルを活性化する際に溶液刺激を適用する場合には、溶液の成分中に占めるカリウムイオン濃度を上昇させることにより実現される。細胞の細胞内電位は、ネルンストの式に示されるように、細胞内

外におけるカリウムイオン濃度の比によって決定されるため、細胞外に存在する溶液のカリウムイオン濃度を、例えば、2mMから40mMに上昇させることにより、細胞内電位は上昇し、遅延整流性カリウムイオンチャネルが活性化される。

[0131] 本発明の医薬品安全性試験方法は、電位感受性イオンチャネルをHERGチャネルとする場合は、溶液刺激も適応できるが、溶液刺激は、一例として挙げたように、低カリウム濃度溶液から高カリウム濃度溶液への置換によるため、活性化応答速度が溶液拡散で律速されるため遅い。

[0132] なお、ステップS1において、電圧信号を検出する回数は任意であり、各被試験医薬品に対して複数回測定しうる。同じ大きさの溶液刺激を用い、同じタイミングで加えても良く、あるいは、刺激間隔を変化させ、複数回その応答を測定しても良い。異なるイオン濃度の刺激を用いても良い。

[0133] 例えば、同じイオン濃度の刺激を同じタイミングで注入したときの応答を複数回測定する場合は、各々の応答の差を平均、偏差などの統計的に処理できることにより、突発的な外乱の印加による擬陽性成分を除去できることに貢献し、応答の差をより信頼性高く検出することが可能となる。

[0134] （実施の形態6）

本発明の実施の形態6は、本発明の医薬品安全性試験システムに使用される医薬品安全性試験センサに関する。以下、本実施の形態の医薬品安全性試験センサについて、図9から図12を参照しながら説明する。

[0135] 本実施の形態に示した医薬品安全性試験に用いられるセンサの構成を表す模式図を、図9から図12に示す。本実施の形態のセンサと実施の形態1に用いられるセンサとの違いは、電極近傍に貫通孔を有することが大きな違いであるので、この相違点を中心に説明する。

[0136] 本実施の形態のセンサは、測定電極の近傍に細胞を配置しやすいよう、貫通孔を持っている。貫通孔を持った本実施の形態の好適例であるセンサ全体の斜視図を、図10に示す。また、センサ基板が接続された構成がより分かるよう、図10に示す任意の3つのウェル付近を拡大表示した部分断面図を、図9に示す。また、貫通孔を持ったセンサ基板の構造がより分かるよう、図9に示す一つのセンサ基板とウェル底面近

傍を拡大した部分断面図を、図11に示す。同じく、一つのセンサ基板の下面図を、図12に示す。図9から図12において、図2及び図3と同一又は相当する部分には同一符号を付してその説明を省略する。

[0137] なお、図10では、センサ右下付近のウェル104のみ、センサ基板122がウェル底面に固定されているように示されているが、これは、センサ基板122の取り付け状態を説明するために、便宜上この部分のウェル104についてのみ、センサ基板122を図示したに過ぎずない。また、図10及び図11では、参照電極と検体細胞等の一部構成を省略して示す。また、図9では、真ん中のセンサ基板だけにチューブ114が接続されているように示されているが、他のセンサ基板にも同様に接続されている。

[0138] 本実施の形態のセンサ120は、図10に示すように、多数の円柱状のウェル104が格子のノードに位置するように多数形成された溶液保持部119と、貫通孔117を有するセンサ基板122とを備えている。センサ基板122の取り付け方法は、センサ基板122の上面に測定溶液52が溜まるのであれば任意でありうるが、好適には、図9に示すように、各ウェル(以下、第一のウェルという)104の底面に開口104aを設け、この開口104aに貫通孔117が位置するようにして溶液保持部119の下面にセンサ基板122が取り付けられる。測定溶液52は、センサ基板122の上面に接するように、第一のウェル104内に満たされる。なお、本実施の形態では、センサ120を安定的に設置するため、図9及び図10に示すように、センサ120を受けるためのセンサ設置台121が設けられる。もちろん、センサ設置第121を省略することもできる。

[0139] 本実施の形態のセンサ120においては、センサ基板122(細胞固定化器)に、図11に示すように、その一部に細胞保持部である微小くぼみ116が形成されている。また、センサ基板122には、微小くぼみ116と貫通孔117を介して連通する、第二の溶液を保持するための第二のウェル112が形成されている。溶液保持部119は、実施の形態1で説明したように、板状のウェル形成体131と参照電極103とを備える。センサ設置台121には、電極接点ピン111が所定の位置に立設されており、その上にセンサ120が載置されている。

[0140] センサ基板122は、図11に示すように、基板101を備えている。基板101の上面の所定位置には、1以上の半球形の微小くぼみ116が形成されている。基板101の下

面の、微小くぼみ116が形成された領域の下方に位置する領域に、凹部からなる第二のウェル112が形成されている。そして、微小くぼみ116と第二のウェル112とを連通するように、基板101の厚み方向に貫通孔117が形成されている。また、基板101の下面には、第二のウェル112からその端面に至るように溝からなる交換口113が形成されている。そして、第二のウェル112の内面に膜状の測定電極102が形成されている。

[0141] 一方、基板101の下面の縁部(端部)には膜状の外部接続部107が形成されている。そして、基板101の下面に測定電極102と外部接続部107とを接続するようにリード線105が形成されている。そして、外部接続部107を除きかつ基板101の下面と測定電極102とリード線105とを覆うように絶縁膜106が形成されている。測定電極102及び絶縁膜106には貫通孔117に連通するように貫通孔が形成されている。

[0142] そして、この絶縁膜が形成された基板101の下面に底面基板118が配設されている。底面基板118は、基板101の外部接続部107が露出するように配設されている。この底面基板118により第二のウェル112の開口が閉鎖されている。また、この底面基板118に溝状の交換口113の開放面が閉鎖されている。また、交換口113の外部側の端にチューブ114が接続されている。

[0143] そして、図9に示すように、センサ基板122の外部接続部107が電極接点ピン111に当接するようにして、センサ120がセンサ設置台121に載置されている。

[0144] 本実施の形態では、センサ基板122は、貫通孔117上部に設けられた微小くぼみ116により、生体試料である検体細胞1を密着して保持することができる。この結果、検体細胞1は、測定電極102近傍に配置され、検体細胞1からの電位信号が測定電極102にて測定される。

[0145] このように、貫通孔117の上に微小くぼみ116を形成することにより、検体細胞1を容易にセンサ基板122上に捕捉することができる。また、貫通孔117の下方から検体細胞1を吸引することや、貫通孔117の上方から検体細胞1を加圧することにより、検体細胞1の固定化をさらに容易にすることもできる。

[0146] 測定電極102は、センサ基板122に形成された少なくとも一つの貫通孔117の孔内及び／又は基板122上面における貫通孔117の孔周囲に形成されることが好まし

い。

- [0147] センサ基板122上に形成する貫通孔117の数及び位置関係は任意であり、図11及び図12に示した数に限定されないが、貫通孔117は、一つの測定電極102に対して複数形成されている構成とすることが望ましい。具体的には、一つの測定電極102に対し、1個以上2000個以下が望ましい。このような構成とすれば、検体細胞1の生存率に影響されない測定が可能となる。センサ基板122上における貫通孔117同士の位置関係は、例えば、図12に示したように、格子のノードに位置するように配置し得る。その場合、複数の貫通孔117に保持された検体細胞1に起因する電気信号が、一つの電気信号として一つの測定電極102から検出されることになる。本実施の形態のセンサ120は、複数の検体細胞1の応答を同時に検出する薬品スクリーニング等において特に有用である。
- [0148] 貫通孔117の形状は、検体細胞1を保持しうるものであれば、特に限定されない。例えば、上面開口部が下面開口部より大きい円筒状であっても良いが、図11に示したように、円筒状の貫通孔117の上部に微小くぼみ116を形成した形状は、微小くぼみ116の曲率によって、検体細胞1をより確実に貫通孔117との境界に密着及び保持しうるため、非常に望ましい。
- [0149] 微小くぼみ116は、目的の検体細胞1に依存した任意の大きさを採用することができ、目的の検体細胞1を保持しうる大きさであれば、特に制限されない。具体的な微小くぼみ116のサイズは、センサ基板122上面と同じ平面における直径が2～500 μm の範囲であることが好ましく、10～100 μm の範囲であることがより好ましい。例えば、生体試料として用いる検体細胞1の長径が略30 μm の場合、開口部上面の直径が略20 μm であることが好ましい。
- [0150] 貫通孔117は、吸引によって測定溶液が通過し、かつ、検体細胞1が通過しない大きさであれば良い。貫通孔117の直径は、1～125 μm の範囲であることが好ましく、直径が2～25 μm の範囲であることがより好ましい。例えば、貫通孔117の直径は、微小くぼみ116の直径が略20 μm である場合には、略5 μm であることが好ましい。貫通孔117の長さは、任意である。
- [0151] 第二のウェル112には、第二の溶液が蓄えられている。第二のウェル112は、その

底面(底面基板118)に開口部がない。このため、第二のウェル112に蓄えられた第二の溶液は、第二のウェル112内に重力によって保持され、貫通孔117及び貫通孔117近傍の電極102部から離れることがないため、安定な電圧測定が可能となる。

[0152] さらに、第二のウェル112には、第二の溶液を別の第三の溶液に交換するための交換口113を側面部に有している。かかる構成により、必要に応じて、ナイスタチンなどの小孔形成物質を第二のウェル112と接する部分の検体細胞1と接触させることができる。

[0153] 以下、本実施の形態の医薬品安全性試験センサの作成方法について説明する。図9と図10に示す医薬品安全性試験センサは、図11と図12に示すセンサ基板の作製工程、上部溶液保持部材の作製工程、及びセンサ基板と上部材の接着工程の3つの工程により形成される。

[0154] まず、医薬品安全性試験センサ120のセンサ基板122の作製方法について、図25から図30を参照しながら説明する。

[0155] センサ基板122を製造するには、まず、図25に示すように、シリコンからなるベース141と、二酸化シリコンからなる中間層142と、シリコンからなる薄板143で構成される基板140を用意し(工程1)、次に、ベース141と薄板143の両側にレジスト膜144とレジスト膜145を積層させる。そして、ベース側のレジスト膜144を、所定のパターンを有するようにパターンニングしてレジストマスクとする。なお、上記のような基板140は、SOI基板と呼ばれ、半導体デバイスを作製する際に良く用いられ、入手は容易であるのでこの基板の製造方法については省略する。

[0156] 次に、図26に示すように、ベース141部分のエッチングを行い、第二のウェル112と下方が開放された溝状の交換口113を形成する(工程2)。このときのエッチング方法はドライエッチング、ウェットエッチングなど通常の方法を用いる。

[0157] 次に、図27に示すように、薄板143側のレジスト膜145を、所定位置に開口145aを有するようにパターンニングしてレジストマスクとする(工程3)。

[0158] 次に、図28に示すように、ドライエッチングによって、薄板143側からエッチングを行う(工程4)。このとき、エッチングガスとしてはエッチングを促進するガスのみを用いる。このため、エッチングを促進するガスにはSF₆、CF₄、XeF₂などを用いることがで

きる。これらはシリコンのエッチングを深さ方向だけでなく、横方向へのエッチングも促進する作用があるからである。実験ではXeF₂を用いて効果を確認している。これによって、エッチングされた部分の形状は、図28に示すようにレジスト膜145の開口145aを中心とする半球形となり、この半球形の部分からなる微小くぼみ116が形成される。また、レジスト膜145(レジストマスク)は、XeF₂によってはほとんどエッチングされないで、図28に示すように、最初の形状を保っている。

- [0159] 次に、図29に示すように、再び薄板143側から、ドライエッチングを行って、微小くぼみ116の底面に薄板113を貫通する貫通孔117を形成する(工程5)。
- [0160] このときのエッチング法は、ドライエッチングによる方法が最適であり、ドライエッチングの際にはエッチングを促進するガスと、エッチングを抑制するガスを用いる。エッチングを促進するガスとしては、XeF₂、CF₄、SF₆などがある。また、エッチングを抑制するガスとしてはCHF₃、C₄F₈などがある。これらのガスを混合してエッチングすることで、エッチングされた壁面にCF₂のポリマーである保護膜が形成されるので、ドライエッチングによる微小貫通孔の形成をレジストマスクの下方のみに進行させることが可能となるので、微小くぼみ116及び貫通孔117が連結して形成される。
- [0161] ここで、エッチングが下方のみに進行する仕組みを少し詳しく説明する。まず、エッチングを促進するガスによってエッチングを少しだけ行った後、エッチングを抑制するガスによって保護膜を少しだけ形成する工程を繰り返すことで、ほぼ垂直なエッチング形状とすることができるのである。この工程では、エッチングを促進するガスによるドライエッチングの際に、外部コイルによる誘導結合法によって生成されたプラズマ中で、高周波を基板140(正確には薄板143)に加えることで、基板140にマイナスのバイアス電圧が発生する。このことにより、プラズマ中のプラスイオンであるSF₅⁺やCF₃⁺が基板140に向かって衝突するのでドライエッチングは垂直下方方向に進むことになる。
- [0162] ドライエッチングを抑制させる際には、基板に高周波を加えなければ、基板140にバイアス電圧が全く発生しないので、保護膜の材料となるCF₂⁺が偏向を受けなくなり、基板140のドライエッチング穴の壁面へ均一な保護膜の形成ができることになる。実験ではエッチングを促進するガスとしてSF₆、抑制するガスとしてC₄F₈を用いて確

認している。

- [0163] これらガスを用いると、上述したようなそれぞれの作用によって、貫通孔117の形成をレジストマスクの下方のみに進行させることが可能となる。さらに同時にエッチングを抑制するガスを用いることにより、貫通孔117の側面には保護膜146が形成される。
- [0164] 次に、二酸化シリコンよりなる中間層142の第二のウェル112に露出している部分をベース141側からドライエッチング、ウエットエッチングなどの通常のエッチング方法によりエッチングする。その後、図30に示すように、基板140のベース141側から通常の薄膜形成工程とパターニング工程により、金を主体とする測定電極102を形成する(工程6)。ここでは、例えば、電極をパターニングする方法としては、電極材料を基板上に蒸着した後、フォトリソを用いてエッチングすることにより、測定電極102、及び対応するリード線105及び外部接続部107を1セットとしてかかるセットを複数セット有する所望のパターンを形成する。電極のパターン形成は、その他に、予め電極パターンを形成させたステンシルマスクを通じて蒸着するマスク法や、リフトオフ法も適応できる。
- [0165] その後、基板140の下面の外部接続部107を除く(従って測定電極102及びリード線105を含む)部分を絶縁膜106(図11参照)で被覆する。
- [0166] 最後に、平らな底面基板118をベース側より接着剤にて貼り付け、センサ基板122を得る。なお、センサ基板122は必ずしもこの構成に従う必要はなく、例えば、ベースに交換口を作製せず、底面基板118に交換口を第二のウェル112に連通するように形成し、その底面基板118を基板140の下面に貼り付けても良い。
- [0167] 底面基板118は、交換口113の溶液が漏れず、測定電極102がリード線105を介して接続される外部接続部107が露出していれば、特に形状は問わないが、図11及び図12に示したように、外部接続部107のみを切り欠いた平板形状とすることが好ましい。
- [0168] その後、ウエハをダイシングし、所定角の小片に切り出し、一つの小片を上記センサ基板122とする。一つの小片には、電極102、リード線105、及び外部接続部107が1セット形成されているようにする。このように、センサ基板122は、一つのウエハ上

に複数作成し、その後、ダイシングすることで所定角の小片に切り出し、一つの薄片をセンサ基板とすることが、生産性の観点から望ましい。

[0169] なお、必要であれば、シリコンの表面に、熱酸化膜を通常の熱酸化工程によって形成する。この工程は、シリコンの表面抵抗を極力あげたい場合に用いれば良く、それほど高い表面抵抗を必要としないのであれば、シリコンの表面に自然に形成される自然酸化膜だけで十分である。

[0170] 次に、別途作成する樹脂よりなる第一のウェル104が多数設けられた板状の容器であるウェル形成体131と参照電極103とを備える溶液保持部119の底面に、センサ基板122の薄板143側を接着剤などで貼り付ける。なお、溶液保持部119のウェル形成体131の製造方法についてはプレス成形、光造形、切削加工など通常の手段が用いられる。これらの方法を用いればウェル形成体131に、凹部からなるウェル104と該凹部の底面の開口104aとを所定の形状となるよう設けることは特に困難なことではないのでここでは説明を省略する。特に、ウェル形成体131は、例えば、商用として販売されているSBS規格に準ずる多穴プレート(96穴、384穴等)等を開口部のみ加工することによって実現することもできる。これらは、製造コストの面からも有用である。

[0171] その後、センサ基板122の交換口113にチューブ114を接続する。

[0172] このようにして、本実施の形態で使用されるセンサが製造される。

[0173] なお、センサ基板122の第二のウェル112の形成において、それぞれの第二のウェル112と交換口113は、必ずしも一体形成されている必要はない。一例を示すと、第二のウェル112が設けられた底面基板118と、各第二のウェル112に交換口が連通したセンサ基板122から構成されている方が、生産性の面からは望ましい。

[0174] 底面基板118の材料としては、絶縁材料が望ましい。例えば、好適には、PDMS(ポリジメチルシロキサン)が用いられる。かかる材料は、微細加工に優れ、軟質で粘着力もあるため、センサ基板122に接続が容易で、流路漏れは起こらない。

[0175] 溶液保持部119の参照電極、及び第二のウェル112の測定電極102の作製工程は、蒸着、スパッタなどの金属堆積法、電解・無電解めっき等を用いることができる。金属堆積法を用いて参照電極103及び測定電極102を作製する場合には、溶液保

持部119を堆積装置の回転ステージに対して傾斜させて取り付ける処置を施すことで、容易に第一のウェル104及び第二のウェル112の側壁にターゲット金属を堆積させることができる。

[0176] [医薬品安全性試験システム(2)]

本実施の形態に示すセンサを用いた医薬品安全性試験システムのブロック図を図13に示す。本実施の形態の医薬品安全性試験システム(2)と、実施の形態1に示した医薬品安全性試験システム(1)との違いは、溶液貯留部へ第二の溶液を注入及び交換する装置を備えることであるので、以下、図13を参照しながら、その相違点を説明する。

[0177] 本実施の形態の医薬品安全性試験システムは、第二のウェル112内の溶液を置換するための第二ウェル内溶液置換装置157cを備える。また、注入する溶液として、第二の溶液(図13中L5)と第三の溶液(図13中L6)を切り換えるための流路切替装置158cを備える。

[0178] 流路切替装置158cは、計算処理部155に電気的に接続されており、計算処理部155は、所定のタイミングと手順で溶液の切替を行うように流路切替装置158cに制御信号を送る。このように構成すると、センサ120を設置した状態で、第二の溶液を第三の溶液に、逆に第三の溶液を第二の溶液に置換することができる。

[0179] さらに、第二ウェル内溶液置換装置157cは、検体細胞を貫通孔に誘導する装置(図13中P)も併せ持つため、センサ120をシステムに取り付けた状態で、検体細胞の貫通孔への誘導と薬理応答測定が行える。

[0180] 細胞を誘導する装置Pとしては、例えば、貫通孔内の溶液を負圧により吸引することを挙げることができる。図13に示した、第二ウェル内溶液置換装置157cにつながる各要素は、第二の溶液溜め(L5)、第三の溶液溜め(L6)、細胞誘導用吸引装置(P)を表している。

[0181] さらに、測定環境調節装置156は、センサ120の第一のウェル中の溶液と、第二のウェル112中の溶液とを異なる所望の温度で、それぞれ調整する機能を備える。

実施例

[0182] 以下、本発明の医薬品安全性試験方法及びシステムの実施例を、具体的に説明

する。なお、これらの実施例は、本発明を限定するものではない。

[0183] (実施例1)

実施例1として、図9から図12に示す、実施の形態5の医薬品安全性試験センサ120を試作した。そして、このセンサ120を用いて、細胞の応答を測定する実験を行った。

[0184] [医薬品安全性試験センサの作製]

まず、図9に示すセンサ基板及び溶液保持部の作成方法について説明する。

[0185] 図9から図12を参照して、センサ基板122の作製には、基板材料に4インチSOIウエハを用いた。基板101の裏面(下面)をエッチング後、基板表面(上面)は、実施の形態5で説明したガスを用いたドライエッチングにより貫通孔117群を形成させた。次に、中間層である酸化シリコン層を除去し、表面と裏面とを貫通させた。裏面の上面に、真空蒸着法あるいはスパッタ法を用いて、電極をパターンニング形成した。電極材料には金を用いた。その後、30mm角の小片にダイシングし、小片化した。これにより30mm角の基板に1個の測定電極102が形成され、その電極102に貫通孔117がおよそ100個形成されたセンサ基板122を得た。

[0186] 実施例1のセンサのウェル形成体131には、SBS規格に準ずる96穴プレートのウェルを用いた。各第一のウェル104の底面に上面直径5mm、下面直径1mmのテーパ形状の穴を開ける工程を経て開口104aを設け、センサ基板122を薄板側から取り付け付けた。なお、接続した場所は、上述したセンサ基板122の貫通孔117群に対応する位置とした。各第一のウェル104の容量は、約250 μ Lである。電極面から電極接点ピン111が接触できるよう、配線(図示せず)を取り、参照電極103を、その先端が第一のウェル104中に浸すことができるように固定化した。この参照電極13には、 ϕ 0.5mm金線を用いた。

[0187] センサ基板122には、さらに測定電極102側にスリット構造113を形成させた。裏面には、このスリット構造からなる幅1mm、高さ360 μ mの流路113が形成されている。その両端に交換口を設け、外径360 μ m、内径150 μ mのPEEK製チューブ114を取り付けた。

[0188] 検体細胞は、遺伝子改変技術により HERG(Human Enter-a-gogo-Related Gene)

チャンネルを発現させたヒト腎臓胚細胞HEK-293(以下、HERG細胞)を用いた。HERGチャンネルは、QT延長を引き起こす標的イオンチャンネルであり、上記細胞を検体細胞として用い、医薬品安全性試験を行った。本実施例では、HERGチャンネル及び検体細胞に、HERGイオンチャンネル及びHERG発現細胞を用いて説明する。

[0189] センサ120の第一のウェル104内を培養液で満たし、その後、HERG細胞を各第一のウェル104内に100000個播種した。培養液は、DMEM+10重量%FBSを用いた。検体細胞を裏面から吸引し、貫通孔に誘導した後、37℃、CO₂濃度5%に調整保持したインキュベータ内で培養した。所定時間、細胞を培養させ、その後、実施例1のセンサをインキュベータから取り出し、医薬品安全性試験システムに設置し、医薬品の安全性を試験する実験を行った。

[0190] 本実施例では、HERGに対して選択的に拮抗する作用が既知であるE-4031 (Sigma社 M5060) を被試験医薬品として用いた。E-4031は、HERGチャンネルを選択的に拮抗するため、後天性QT延長を引き起こすことが知られている。

[0191] センサ応答の測定に先立ち、第一のウェル104に残存する培養液を対照溶液に置換させた。これにより、大気中でも安定して測定を行うことができる。対照溶液の組成は、ハンクス液を基本とし、HEPESにて緩衝作用を持たせてある。溶液のpHは、7.4に設定してある。

[0192] 次に、実施例1のセンサ120に、速やかにナスタチンを含む裏面对照液(第二の溶液)を交換口113に注入する。ナスタチンの最終濃度は、240 μ g/mLに調製して含有させている。裏面对照液の組成は、塩化カリウムをベースとし、EGTAによってCaイオンをキレートした緩衝溶液を用いている。そして、溶液のpHは、10mM HEPESによって7.2に保つように調製した。

[0193] 次に、実施例1の医薬品安全性センサ120を用いて、HERGイオンチャンネルの電圧センサ応答を測定した。その内の被試験医薬品の交換時期の前後における電圧時系列データを、約40秒間切り出して、図14に表示する。実験は、下記に示す測定プロトコール1に従い、溶液を同じウェルで交換した。図中白抜き四角又は黒四角で表した時間だけ対照溶液1及び薬剤溶液1(E-4031 1 μ M含有の対照溶液1)を滴下した。

[0194] < 実験プロトコール1 >

(A1) 0-15秒 対照溶液1(上記ハックス液)

(B1) 15-30秒 薬剤溶液1

(C1) 30-40秒 対照溶液1

つまり、上述した被試験医薬品非存在であるハックス対照溶液を第一のウェル104に投入した状態で、電圧測定を時間0秒から開始した(図14中A1の状態、時間0~15秒)。その後、15秒後(G1時)、上記対照溶液1から、薬剤溶液1(E-4031 1 μ Mを含有するハックス液)に置換した(図14中B1の状態、時間15~30秒)。すると、E-4031の注入に伴い電圧振幅の増大が認められた(図14中E1)。実験では、さらに、時間30秒(H1時)にて、再び対照溶液1に戻した(図14中C1の状態)が、その後、電圧振幅の増大は収まらなかった。これは、パッチクランプで測定したデータと整合する。

[0195] ここで、状態A1における電圧信号の振幅は、薬剤溶液1と検体細胞を接触させることにより、状態B1における電圧信号の振幅にまで増大している。これは、E-4031がHERGイオンチャネルに拮抗した結果である。次に、状態C1における電圧信号の振幅は、状態B1における電圧信号の振幅とほぼ同じであるが、この現象は、E-4031が不可逆的にHERGイオンチャネルに拮抗しているため、対照溶液に戻した後も電圧信号の振幅が、元の状態A1のレベルに戻らないためである。

[0196] この図14のように、状態A1及び状態C1の電圧信号の振幅を比較した結果、電圧信号の振幅に差があると判断される場合には、被試験医薬品は、不可逆的にHERGイオンチャネルに拮抗しているため、「催不整脈作用あり」と判定することができる。電圧信号の振幅の比較は、例えば、図14のようなグラフを測定者が見て行うこともできるし、電圧信号の振幅を測定した測定機器が、状態A1及び状態C1における電圧信号の振幅の差が、一定の基準値以下又は基準値以上であるか否かを判定することに行うこともできる。

[0197] なお、上述したように、状態B1及び状態C1の電圧信号の振幅を比較した結果、電圧信号の振幅に差がないと判断される場合に、不可逆的にHERGイオンチャネルに拮抗しているため、「催不整脈作用あり」と判定することもできる。

[0198] ここで、プロトコール1と同様にして、可逆的にHERGイオンチャネルに拮抗する被

試験医薬品の薬剤溶液を検体細胞と接触させた場合には、図21に示すような実験結果が得られる。図21において、A3は対照溶液1、B3は可逆的にHERGイオンチャンネルに拮抗する被試験医薬品の薬剤溶液、C3は再び対照溶液1を、それぞれウェル104に投入した状態を表している。

[0199] 薬剤溶液をウェル104に投入する(図21中B3の状態)と、電圧信号の振幅はA3の状態よりも増大するが、薬剤溶液を対照溶液に戻す(図21中C3の状態)と、電圧信号の振幅は、元の状態A3とほぼ同じレベルに減少する。この場合、電圧信号の振幅が減少していることがわかるため、被試験医薬品のHERGイオンチャンネルに対する拮抗が、可逆的であること判断でき、催不整脈作用がないと判定される。

[0200] なお、薬剤溶液中の被試験医薬品の濃度が低い場合には、A1(又はA3)とC1(又はC3)の電圧信号の振幅の変化が小さくなる。このため、被試験医薬品の催不整脈作用は小さく、危険性は少ないと判断することができる。また、被試験薬剤溶液が催不整脈作用を持たない場合には、A1(又はA3)とC1(又はC3)の電圧信号の振幅の変化はないため、危険性はないと判断することができる。つまり、対照溶液の電圧信号との振幅の比較を行うだけで、被試験医薬品を含む薬剤溶液の電圧信号を測定する工程を省略しても、危険性を判断することができる。

[0201] なお、今回の実験では、HERGイオンチャンネルを活性化するための刺激は必要なかった。HERGはゆるやかな電位感受性イオンチャンネルであるが、静止膜電位下においてもわずかに開いているためである。

[0202] 上記の対照実験として、同様に、薬剤溶液中の成分であるE-4031を含有しない対照溶液に対して、HERG細胞を用いて、同じセンサにて同じプロトコールで測定を実施した。そのプロトコールで観測された電圧時系列データを約40秒間切り出して、図15に表示する。実験は、具体的には、下記に示す実験の測定プロトコール2に従い、溶液を同じウェル104で交換した。図中白抜き四角又は黒四角で表した時間だけ対照溶液1及び対照溶液2(対照溶液1と同組成)を滴下した。

[0203] <実験プロトコール2>

(A2) 0-15秒 対照溶液1(上記ハックス液)

(B2) 15-30秒 対照溶液2

(C2) 30-40秒 対照溶液1

つまり、上述した被試験医薬品非存在であるハanks対照溶液を第一のウェル104に投入した状態で、電圧測定を時間0秒から開始した(図15中A2の状態、時間0~15秒)。その後、15秒後(G2時)、上記対照溶液1から、対照溶液2(対照溶液1と同組成であるハanks液)に置換した(図15中B2の状態、時間15~30秒)。対照溶液1から2への交換においても電圧信号の振幅の増大は認められなかった(図15中E2)。実験では、さらに、時間30秒(H2時)にて、再び対照溶液1に戻した(図15中C2の状態)。ここでも、電圧信号の振幅の増大は認められなかった。

[0204] 上記2つの実験により、対照溶液の交換では電圧信号の振幅に変化が見られず、薬剤溶液1に対してのみ、不可逆的な電圧信号の振幅の増大が認められた。つまり、プロトコール1において観測された電圧信号の振幅の増大E1は、流路を切り替えることによる溶液変動の擬陽性ではなく、活性化していたHERGイオンチャネルが薬剤溶液1に含まれるE-4031により拮抗された薬理応答を、センサで検出した結果であることが明らかとなった。なお、HERGチャネルを発現していない細胞に関しても、同じセンサにて同じプロトコールで測定を実施し、E-4031によって拮抗されないことは確認した(図示しない)。

[0205] 実験プロトコール1と実験プロトコール2の実験結果から、被試験医薬品の危険性を判断するための設定値(閾値)としては、 $c/a=2$ 程度に設定すればよい。しかし、適切な閾値は、実験条件や危険度の判定レベルによっても異なる。一般的には、 c/a が1.2~5程度、より望ましくは、1.5 ~ 2.5程度に設定するのがよい。

[0206] [解法アルゴリズム]

実施例1では、対照溶液注入時の電圧信号の振幅値は約 $2\mu V_{p-p}$ となり、薬剤溶液注入時の電圧信号の振幅値は、最大 $8\mu V_{p-p}$ と、約4倍となった。そこで、これらの電圧信号の振幅増大効果を定量的、かつ、自動的に評価するために、以下の解析アルゴリズムを開発した。

[0207] すなわち、電圧閾値を設け、この電圧閾値を越えるか否かで、定常状態から拮抗剤注入による危険性上昇状態に遷移する変化開始時間(図14では、G1時)を感知する。変化開始時間から後の10秒間の電圧時系列データ(図14では、時間15~25

秒の電圧振幅)を危険性上昇状態とし、また、変化開始時間から前の10秒間の電圧時系列データ(図14では時間5～15秒の電圧振幅)も定常状態として同様に切り出し、統計的に解析する。ここでは、電圧閾値を $\pm 3 \mu V$ に設定した。さらに、薬剤溶液1から対照溶液1へ戻した後の10秒間の電圧時系列データ(図14では、時間25～35秒の電圧振幅)も同様に切り出す。

- [0208] まず、上記の方法によって自動的に切り出されたそれぞれの状態の時系列データに対し、ある小区間Yごとに標準偏差SD1を求める。それぞれのSD1の度数分布を求め、分布のピーク値と分散(半値幅)を統計値として比較し、それぞれの増加率を、被試験医薬品の安全性を判定する指標とした。同様の解析区間、解析方法を図15に示される対照溶液2に対する電圧時系列データに関しても、同様に解析を行った。その結果を、図16から図20に示す。
- [0209] また、図21に示される薬剤溶液2に対する電圧時系列データに関しても、同様に解析を行った。その結果を、図22から図24に示す。
- [0210] 薬剤溶液1(E-4031)に関して、状態A1、状態B1及び状態C1の各ヒストグラムのピーク値Jの大きさを比較した結果を図16に示し、同分散値Kの大きさを比較した結果を図18に示す。また、対照となる対照溶液2に関して、状態A2、状態B2及び状態C2の各ヒストグラムのピーク値Jの大きさを比較した結果を図17に示し、同分散値Kの大きさを比較した結果を、図19に示す。図16から図19において求められた薬剤溶液1(又は、対照溶液2)と対照溶液1のピーク値Jと同分散値Kに関して、状態AからBへの変化率、及び状態Aから状態Cへの変化率を求めた結果を図20に示す。
- [0211] ここで、ヒストグラム統計値のピーク値J及び分散値Kにおける状態Aから状態Cへの変化率は、状態Aのピーク値J(又は分散値K)を100%とした時の百分率、つまり、状態Aのピーク値Jaと状態Cのピーク値Jcによって Jc/Ja で算出される。個々の小区間Yは、イオンチャネルの開閉頻度が数msec程度だということを考慮し、10 msecとした。この処理により、熱雑音などホワイトなノイズ成分は極力減じることができ、イオンチャネルに起因する成分だけの比較がより鮮明に行える。さらに、本実施例で医薬品の安全性を判断する指標として用いた、ヒストグラム統計値のピーク値J及び分散値Kは、いずれも、医薬品安全性試験の観点から見ると危険な状態(状態B1)に遷移すると

、増加する指標である。一方、危険性の存在しない化学物質しか含まれていない溶液に対しては、増加しなかった。本センサは、危険な状態に遷移すると増加する側に出力するため、危険状態を認識する最小分解能を減少指標型出力に比べて大きく設定できる。

[0212] また、本実施例で医薬品の安全性を判断する指標として用いたヒストグラム統計値のピーク値J及び分散値Kは、状態C1に遷移しても、いずれの指標も状態B1に比べやや減少する傾向を見せるものの、薬剤溶液を導入する前の状態A1に比べ有意に増加したままであった(図16及び図18)。一方、危険性の存在しない化学物質しか含まれていない溶液に対しては、増加しなかった(図17及び図19)。

[0213] 危険性の存在する薬剤溶液の、状態Aに対する状態Cの変化率は、ピーク値Jで236.1%、分散値Kで236.2%となり、いずれも2倍強増加した。ピーク値Jで200%以上(状態Cのピーク値Jcと状態Cのピーク値Jaで算出されるJc/Jaが2以上)の変化率は、有意な差として認識された。同様に、ピーク値Kで200%以上(状態Cのピーク値Kcと状態Cのピーク値Kaで算出されるKc/Kaが2以上)の変化率も、有意な差として認識された。

[0214] 一方、危険性の存在しない化学物質しか含まれていない溶液の状態Aを100%とした時の状態Cの変化率は、ピーク値Jで70.1%、分散値Kで70.1%となり、いずれもわずかに減少するも、増加しなかった。

[0215] さらに、オープンチャネル型ではない拮抗剤として別のイオンチャネル、具体的にはω-コノトキシンGVIAを持つ細胞に対して、統計値のピーク値J及び分散値Kは、薬剤溶液に対する指標の増大が起こり(状態B3)、対照溶液に戻すと元のレベルに戻った(状態C3)(図22及び図23) 状態Aに対する状態Cの変化率は、ピーク値Jで7.3%、分散値Kで70.2%となり、いずれもわずかに減少するも、増加しなかった。(実施例2に詳述する。)本解析方法は、危険性の判別だけでなく、オープンチャネル型拮抗剤など拮抗の形式まで判定ができ、信頼性も高いことがいえる。

[0216] (実施例2)

実施例2は、実施の形態1にかかる医薬品安全センサの一例である。本実施例が

実施例1と違う点の一つは、センサが貫通孔を持たない構造であり、溶液刺激を入れてチャネルを積極的に活性化するため、一つの細胞から出される信号を高感度取得しうることである。

[0217] [医薬品安全性試験センサの作製]

まず、本実施例に用いる医薬品安全性試験センサ120の作成方法を以下に説明する。

[0218] 図2及び図を参照して、センサ120は、センサ基板101とウェル形成体131から構成される。まず、センサ基板101は、4インチSiウエハを用い、その上にフォトリソをスパインコートする。6行6列の格子状の各ノードには直径5 μ mの円形の測定電極102が位置し、かつ、電極102の中心間距離は20 μ mである。そして、各電極102から放射状に広がるリード線105を有するパターンを複数、Siウエハの所定の位置に露光し、現像した。次に、ウエハの全面に真空蒸着法により金薄膜を堆積させた。その後、リフトオフにより、Siウエハ上に金電極のパターニングが完了する。

[0219] そして、リード線105部のみに専用現像液を要する絶縁材料であるネガティブ感光性ポリイミド樹脂UR-8300(東レ社製)で被覆した後、ダイシングし、40mm角の小片に切り出した。各小片は、中心に6行6列で直径5 μ mの円形の測定電極102が露出し、電極102から引き出されたリード線105が、四方周囲に配置された配線引出し端子(外部接続部107)に連通した構成であった。このように作製した各小片を、センサ基板と101した。次に、ウェル形成体131を作製した。ウェル104を構成する凹部は切削加工により作製し、その後、このウェル形成体131をセンサ基板101の測定電極102が形成された表面側に配設した。

[0220] 次に、本実施例の医薬品安全性試験方法を以下に説明する。

[0221] 検体細胞には、モルモット乳頭筋細胞をモルモットから急性単離して使用した。モルモット乳頭筋細胞に存在する遅延整流性カリウムチャネルK_rが、被試験医薬品の標的生体構成要素となる。

[0222] まず、作製したセンサ120の測定電極102を含めた細胞播種予定の表面に生体親和性を持たせるための表面改質を行った。具体的には、細胞接着性タンパク質であるコラーゲン(Sigma社、P-4511)を固定化材として測定電極102の表面を含むセンサ

基板101上に所定の方法で1時間被覆した(37℃雰囲気下)。その後、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)で数回リンスした。

- [0223] 単離した細胞を遠心操作により濃縮した後に培養液に再懸濁した細胞懸濁液を、センサ120の測定電極102上に 1×10^5 細胞/cm²の濃度で播種し、所定の時間の間、37℃、CO₂濃度5%下にて培養した。
- [0224] その後、測定時に、ハンクス液を基本とし、HEPESにて緩衝作用を持たせた対照溶液に置換した。溶液は、基本的に上記の他、2種類とした。まず、第一に、上述した対照溶液1である。陽性対照薬及び被試験医薬品は、上記対照溶液に所定の濃度溶かして使用した。第二に、上述した対照溶液1と組成が同じで、対照溶液1の特定のイオン濃度のみを高く設定した高イオン濃度対照溶液である。なお、細胞に対しては、破碎及び造孔などの操作はしていない。
- [0225] 測定に際しては、陽性対照薬として、テルフェナジン(Sigma社、T9652)を使用した。また、被試験試薬には、今回 ω -コトキシシンGVIA(Sigma社、C9915)を1 μ Mの濃度で対照溶液1に混合して使用した。 ω -コトキシシンGVIAは、電位依存性のカルシウムチャンネルを特異的に阻害すること、さらに筋肉に存在するチャンネルには反応せず、神経シナプスに存在する前述チャンネルを阻害することが知られているので、モルモット乳頭筋細胞が持つ遅延整流性カリウムイオンチャンネルには感応しないことが予想される。対照溶液1には、NaClが137mM、KClが4mMのイオン濃度で含まれるが、高イオン濃度対照溶液のKClを80mMに設定し、これによる浸透圧の上昇を避ける目的で、NaClを61mMに下げた。つまり、溶液から高イオン濃度対照溶液に置換することによって、間接的に細胞内電位を上昇させることができる。
- [0226] 本実施例が実施例1と違う点の一つは、溶液を対照溶液から高イオン濃度対照溶液に置換することによって、積極的に溶液刺激を起こし、標的生体構成成分を一定の量、活性化させることである。なお、実験結果を図24に示す。
- [0227] 陽性対照薬であるテルフェナジン0.3 μ Mの電圧応答は、不可逆的に増大した。一方、試験試薬である ω -コトキシシンGVIA 1 μ Mの濃度では電圧応答は、変化しなかった。
- [0228] このように、標的生体構成要素である遅延整流性カリウムチャンネルの拮抗効果を、

刺激に対する電極電圧応答の変化時間として検出することができ、これにより、被試験試薬であるω-コノトキシンはQT延長を起こす危険性はないと判断することができた。

- [0229] 上記説明から、当業者にとっては、本発明の多くの改良や他の実施形態が明らかである。従って、上記説明は、例示としてのみ解釈されるべきであり、本発明を実行する最良の形態を当業者に教示する目的で提供されたものである。本発明の精神を逸脱することなく、その構造及び／又は機能の詳細を実質的に変更できる。

産業上の利用可能性

- [0230] 本発明の医薬品安全性試験方法及びシステムは、HERGチャンネルに外部から人工的に電気信号を新たに印加する処理を経ることなく、QT延長を起こしていることに相当する測定電極での応答及び、応答時間が医薬品非存在下に比べ不可逆的に延長される、危険性を内在するオープンチャンネル型候補医薬品の評価方法として有用である。
- [0231] また、本発明の医薬品安全性試験方法及びシステムは、細胞膜を破碎することなく、かつ、人工的に調整した細胞内液を使用することなく、1液系で測定できるので、より生体環境に近い測定条件で試験を実施できる。この両者の効果により、従来の方法に比べ、本発明の医薬品安全性試験方法は、より信頼性の高い試験となることができる。また、外部印加用電気回路等を省略でき、装置を簡便に構成することができる。装置の生産性、製造性に貢献する。
- [0232] また、本発明の医薬品安全性試験システムは、危険要素を内在する標的生体構成要素で構成される検体細胞の被試験医薬品に対する電圧応答差を指標として、被試験医薬品の危険性を判断するハイスループット医薬品安全性試験システムであり、例えば、新薬開発初期段階に人体に危険性を有する候補化合物を除外する高速薬品スクリーニング装置等に有用である。
- [0233] さらに、本発明の医薬品安全性試験方法及びシステムは、先天性及び後天性のQT延長症候群の迅速な診断手法等の用途にも応用することができる。

請求の範囲

- [1] 測定電極を持つセンサを使用して、被試験医薬品の、HERGイオンチャネル又はその相同物を含む検体細胞に対する危険性を試験する医薬品安全性試験方法であって、
- O) 被試験医薬品を含まない対照溶液中に、HERGイオンチャネル又はその相同物を含む検体細胞を保持し、前記検体細胞近傍に前記測定電極を配置する工程と、
- A) 前記対照溶液に接した状態で、前記測定電極によって電圧信号を測定する工程と、
- B) 工程Aの後、前記対照溶液を、前記被試験医薬品を含む測定溶液に置換し、前記測定電極によって電圧信号を測定する工程と、
- C) 工程Bの後、前記測定溶液を、再び前記対照溶液に置換し、前記測定電極によって電圧信号を測定する工程と、
- D) 前記工程Aと前記工程Cで測定された電圧信号を比較し、その結果に基づいて、前記被試験医薬品の危険性を判定する工程を含む医薬品安全性試験方法。
- [2] 前記工程Dは、前記工程Aによって測定された電圧値a1、及び前記工程Cによって測定された電圧値c1から $c1/a1$ を算出し、
- $c1/a1$ が予め設定された設定値を超えるときは危険性ありと判定し、 $c1/a1$ が前記設定値以下であるときは危険性なしと判定する工程である、請求項1に記載の医薬品安全性試験方法。
- [3] 前記工程Aの前に、前記検体細胞に含まれるイオンチャネルであって、HERGイオンチャネル以外の少なくとも1種類以上のイオンチャネルを不活性化する化学物質を加える工程E、を含む請求項1に記載の医薬品安全性試験方法。
- [4] 所定の時間間隔で、前記工程B及び前記工程Cを2回以上繰り返す請求項1に記載の医薬品安全性試験方法。
- [5] 前記工程B及び前記工程Cを少なくとも2回以上くり返す場合において、
- 1回目に、前記測定溶液として第1の被試験医薬品が含まれる第1の測定溶液を用

い、

2回目に、前記測定溶液として第2の被試験医薬品が含まれる第2の測定溶液を用いる請求項4に記載の医薬品安全性試験方法。

[6] 前記第1の被試験医薬品と、前記第2の被試験医薬品が異なる医薬品である請求項5に記載の医薬品安全性試験方法。

[7] 前記第1と第2の被試験医薬品が同一であり、第1の測定溶液に含まれる第1の被試験医薬品の濃度と、第2の測定溶液に含まれる第2の被試験医薬品の濃度が異なる請求項5に記載の医薬品安全性試験方法。

[8] 前記第1の測定溶液又は前記第2の測定溶液のどちらか一方の代わりに、陽性対照試薬又は陰性対照試薬を含む第3の測定溶液を用い、

前記工程Dにおいて、更に、前記第1の測定溶液又は前記第2の測定溶液を用いて前記工程A及び前記工程Cで測定された電圧信号の比($c1/a1$)と、前記第3の測定溶液を用いて前記工程A及び前記工程Cで測定された電圧信号の比($c1'/a1'$)とを対比することによって、医薬品の危険性を判定する請求項5に記載の医薬品安全性試験方法。

[9] 前記検体細胞がHERGイオンチャネルを定常発現させた細胞株である、請求項1に記載の医薬品安全性試験方法。

[10] 前記工程A及び前記工程Cの前に、所定時間、前記検体細胞を第一の対照溶液に接触させた後、前記検体細胞が接する前記第一の対照溶液を第二の対照溶液に換える工程Fと、

前記工程Bの前に、所定時間、前記検体細胞を第一の測定溶液に接触させた後、前記検体細胞が接する前記第一の測定溶液を第二の測定溶液に換える工程Gとを含み、

前記第二の対照溶液及び前記第二の測定溶液が、それぞれ前記第一の対照溶液及び前記第一の測定溶液と比較して、共通して含まれるイオン濃度が異なる請求項1に記載の医薬品安全性試験方法。

[11] 前記電圧信号が、予め設定したサンプル時間毎の電圧信号の振幅の偏差値を計算する単位偏差値の集合の統計値を表す、請求項1に記載の医薬品安全性試験方

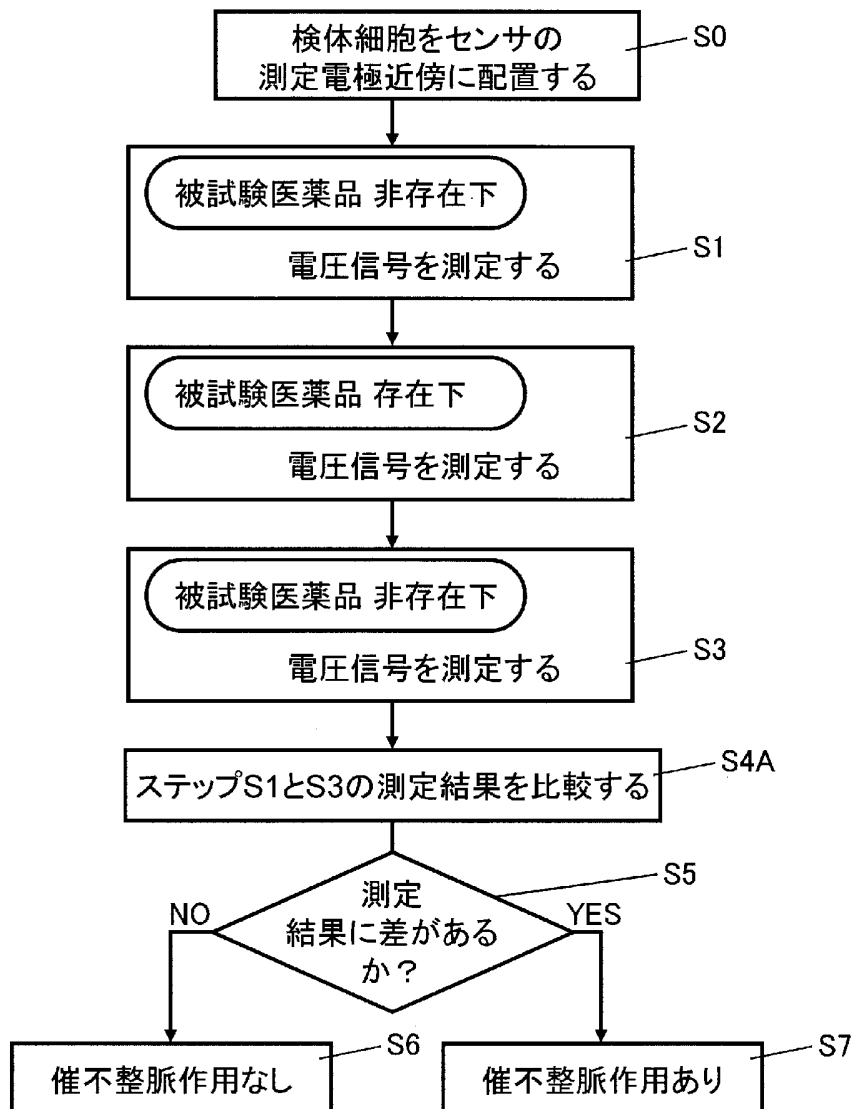
法。

- [12] 前記統計値が、前記単位偏差値の分布の平均値である、請求項11に記載の医薬品安全性試験方法。
- [13] 前記統計値が、前記単位偏差値の分布の分散値である、請求項11に記載の医薬品安全性試験方法。
- [14] 前記検体細胞が被試験医薬品を含む測定溶液に接した状態で測定された電圧信号が、予め設定したサンプル電圧閾値を超えた後に検出した電圧信号である、請求項1に記載の医薬品安全性試験方法。
- [15] HERGイオンチャネル又はその相同物を含む検体細胞を含む溶液を満たすことが可能な凹部を有する基板と、
前記凹部に設けられ、かつ、前記検体細胞の近傍に配置可能な1以上の測定電極と、
前記溶液に浸し、前記測定電極と離隔するように設けられた参照電極とを有するセンサと、
前記測定電極と前記参照電極との間の電圧を測定する電圧測定装置と、
前記凹部に対し複数種類の前記溶液を注入及び排出する溶液注入排出装置と、
制御装置と、を備え、
前記制御装置は、前記溶液注入排出装置を制御して前記凹部に第1の種類の前記溶液としての被試験医薬品を含まない対照溶液を前記凹部に満たし、この状態a2で前記電圧測定装置によって前記測定電極と前記参照電極との間の電圧を測定し、
その後、前記溶液注入排出装置を制御して前記凹部から前記対照溶液を排出し、かつ前記凹部に第2の種類の前記溶液としての被試験医薬品を含む測定溶液を満たし、この状態b2で前記電圧測定装置によって前記測定電極と前記参照電極との間の電圧を測定し、
その後、前記溶液注入排出装置を制御して前記凹部から前記測定溶液を排出し、かつ前記凹部に前記対照溶液を再び満たし、この状態c2で前記電圧測定装置によって前記測定電極と前記参照電極との間の電圧を測定し、

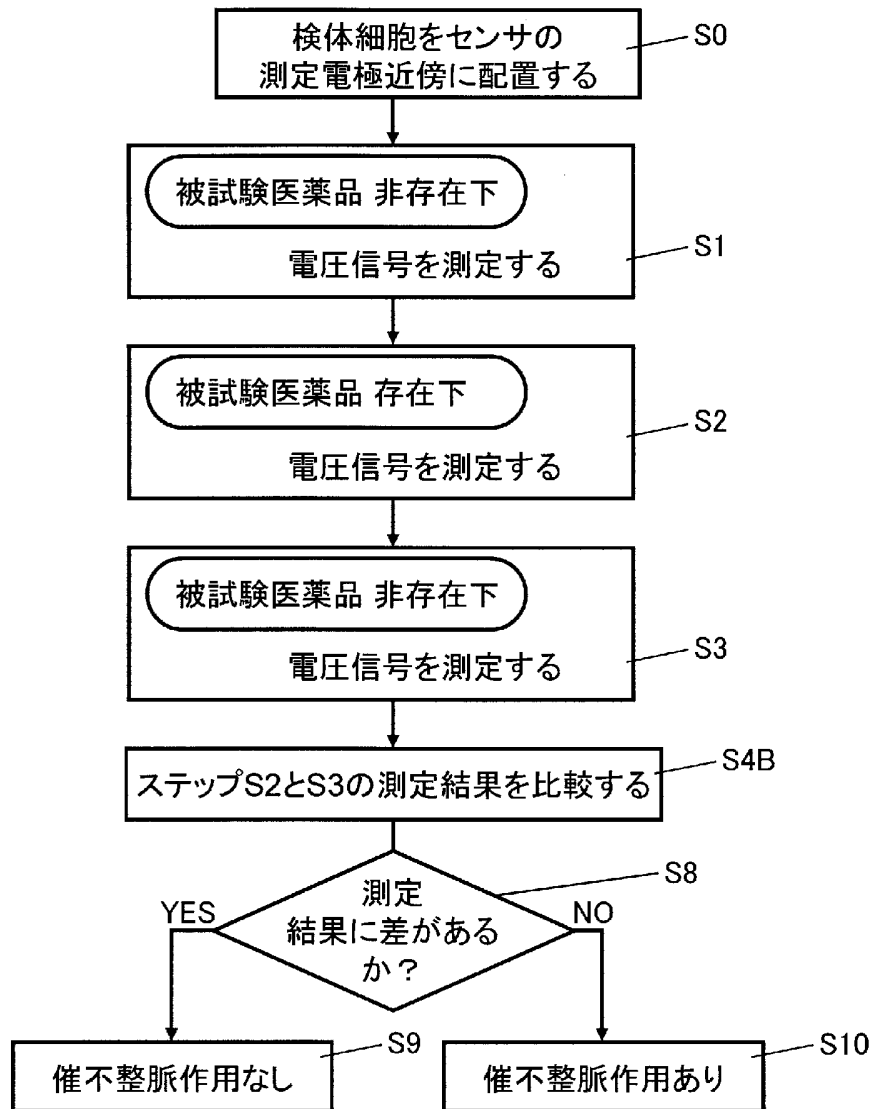
前記状態a2で測定された前記電圧と前記状態c2で測定された前記電圧とを比較し、
前記比較結果に基づいて前記被試験医薬品の安全性を判定する、医薬品安全性試験システム。

- [16] 前記各測定電極の近傍に前記検体細胞が複数配置されている、請求項15に記載の医薬品安全性試験システム。
- [17] 前記センサが、前記基板を厚み方向に貫通する貫通孔を有し、該貫通孔近傍に前記測定電極が配置されている、請求項15に記載の医薬品安全性試験システム。

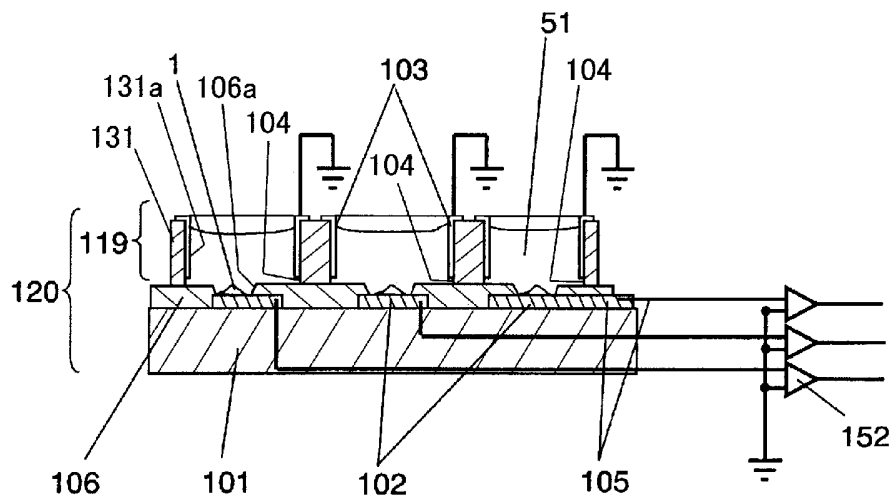
[図1-A]



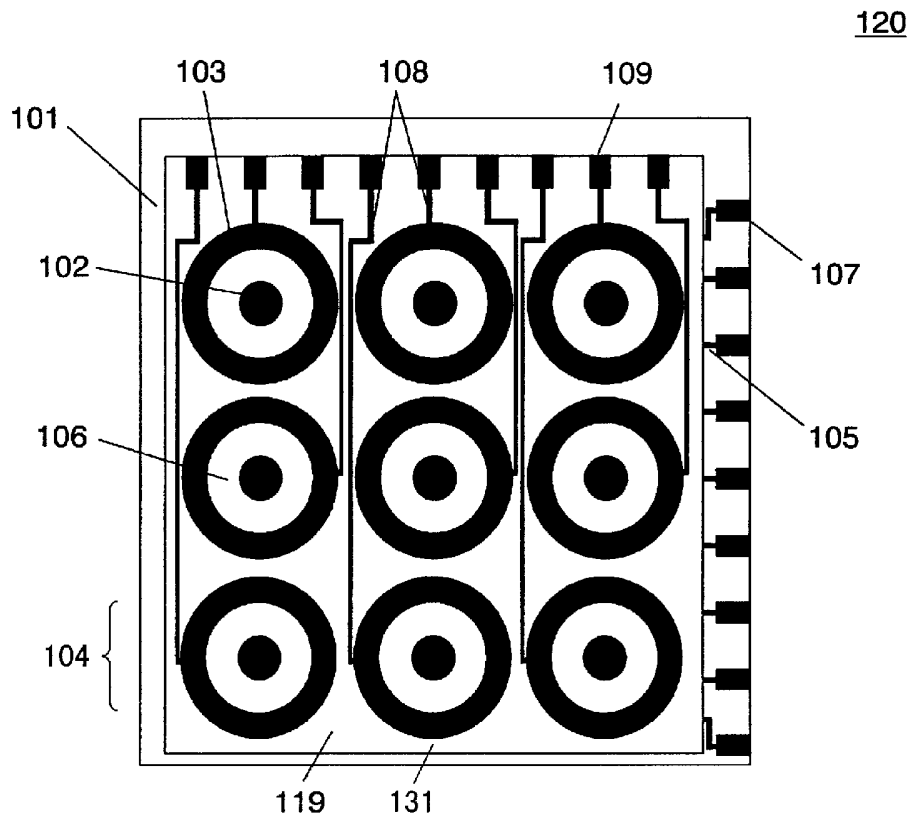
[図1-B]



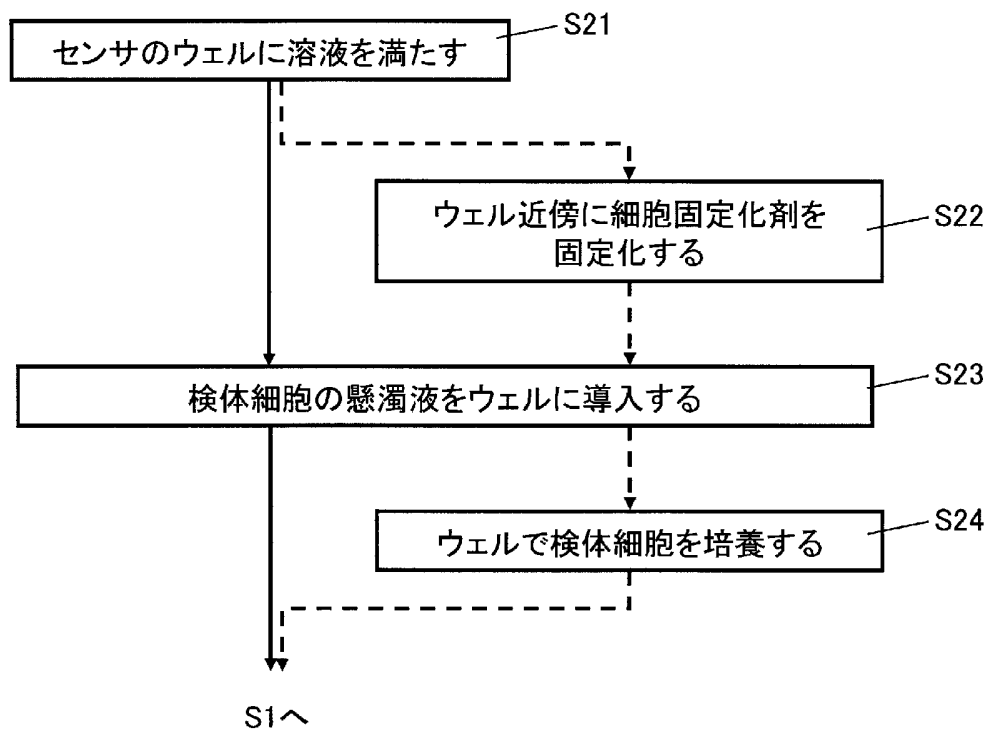
[図2]



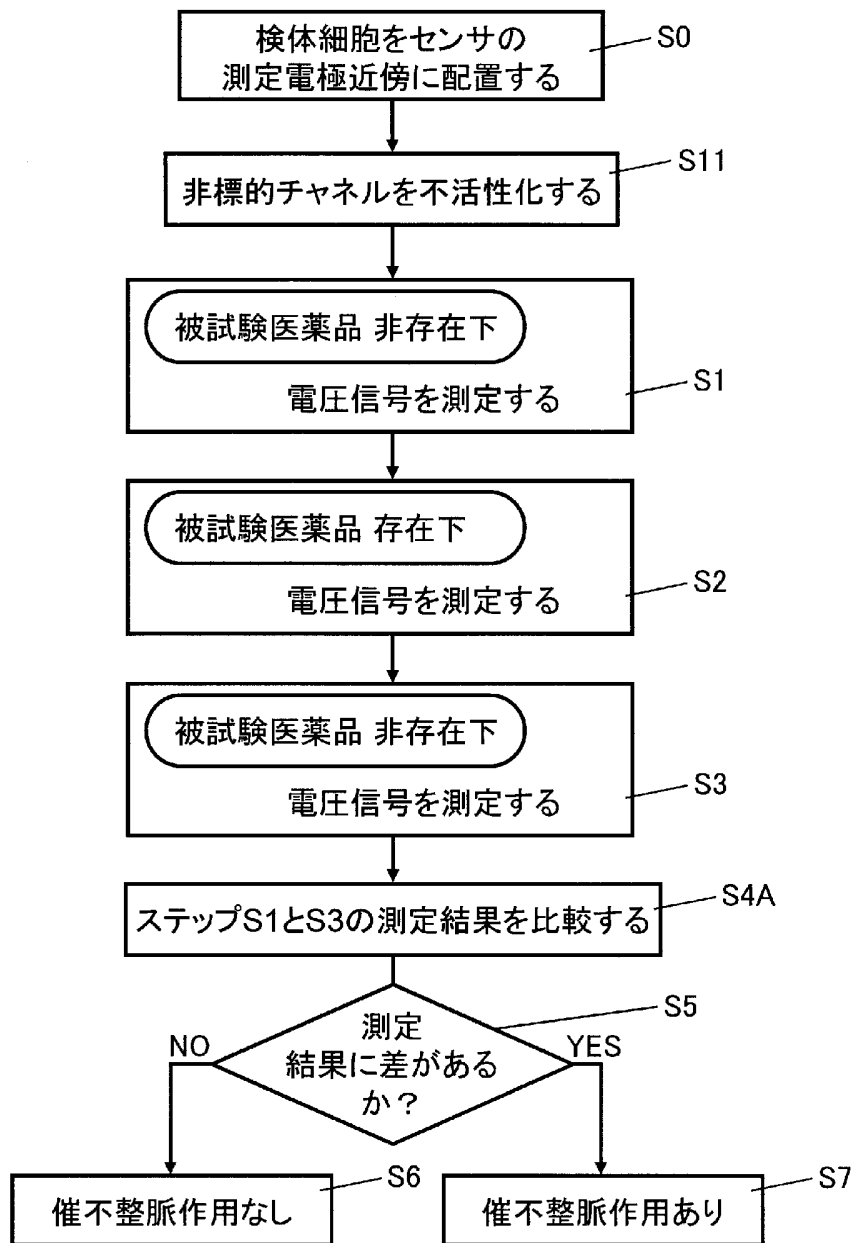
[図3]



[図4]



[図5]



ウェル内溶液置換装置 157a

医薬品安全性試験システム 150A

157b

ウェル内溶液 排出手段

160

158

120

104

159

131

第一の 増幅部 152

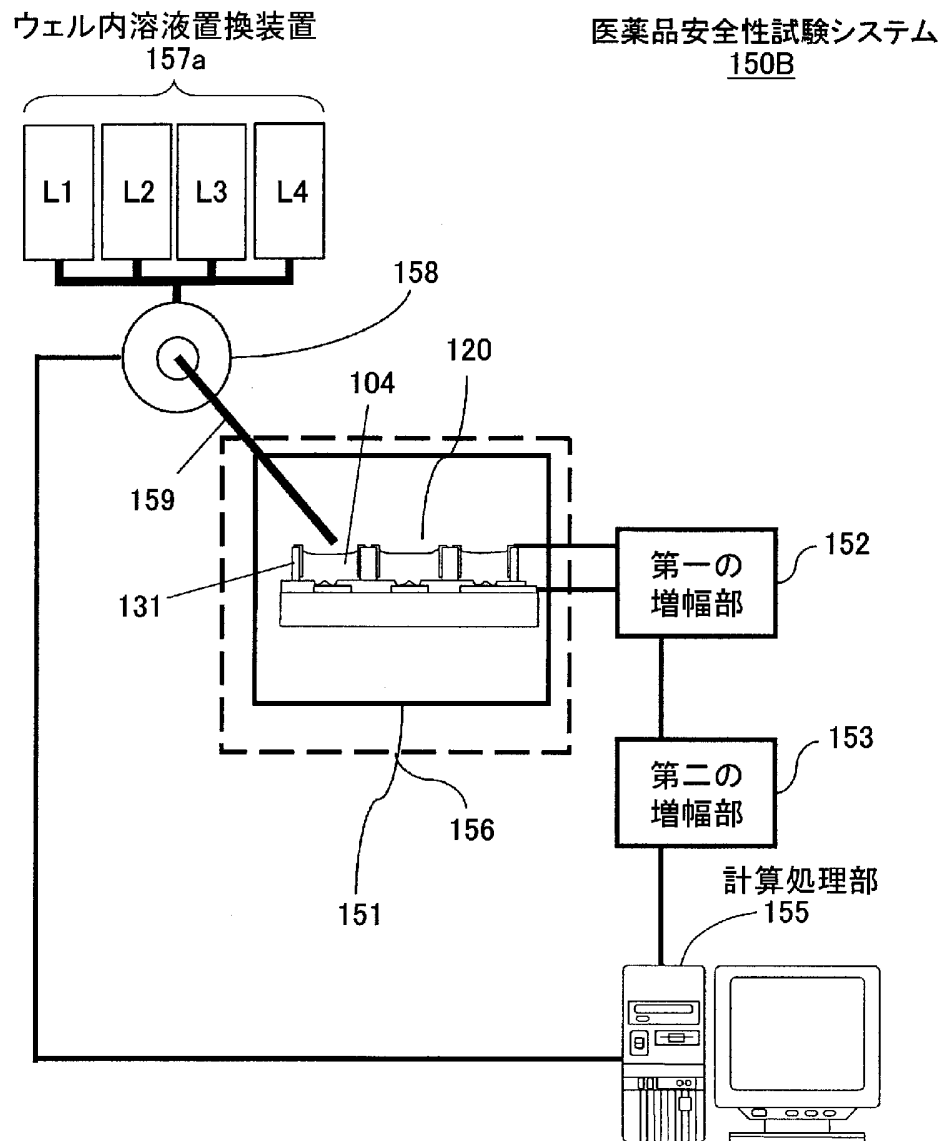
第二の 増幅部 153

計算処理部 155

151

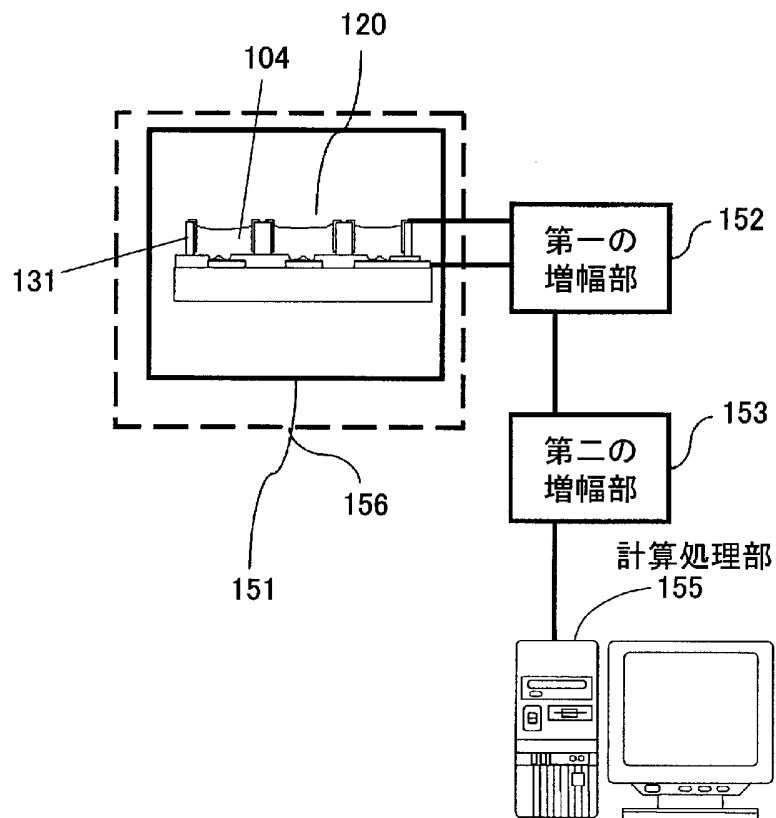
156

[図6-B]

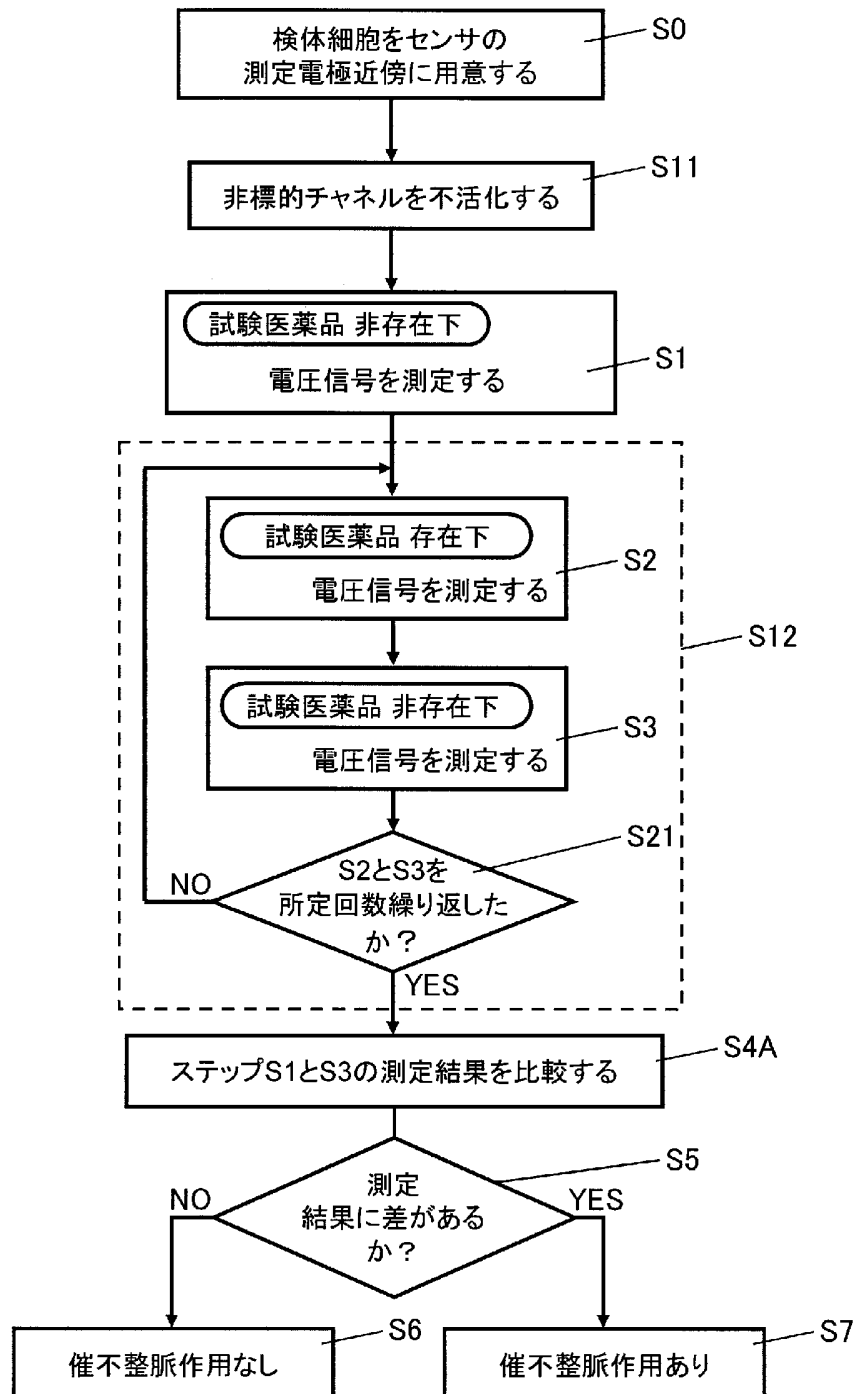


[図6-C]

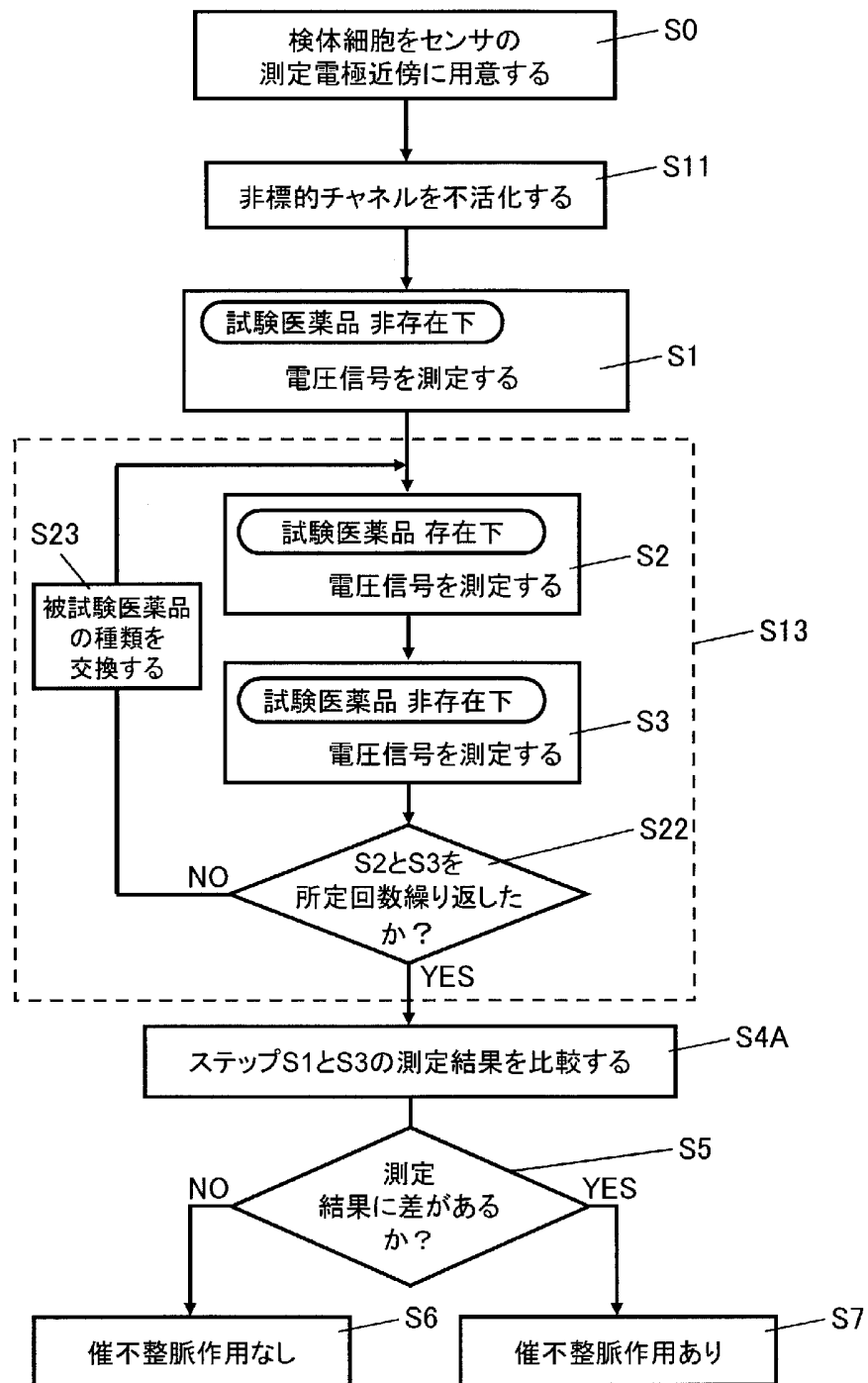
医薬品安全性試験システム
150C



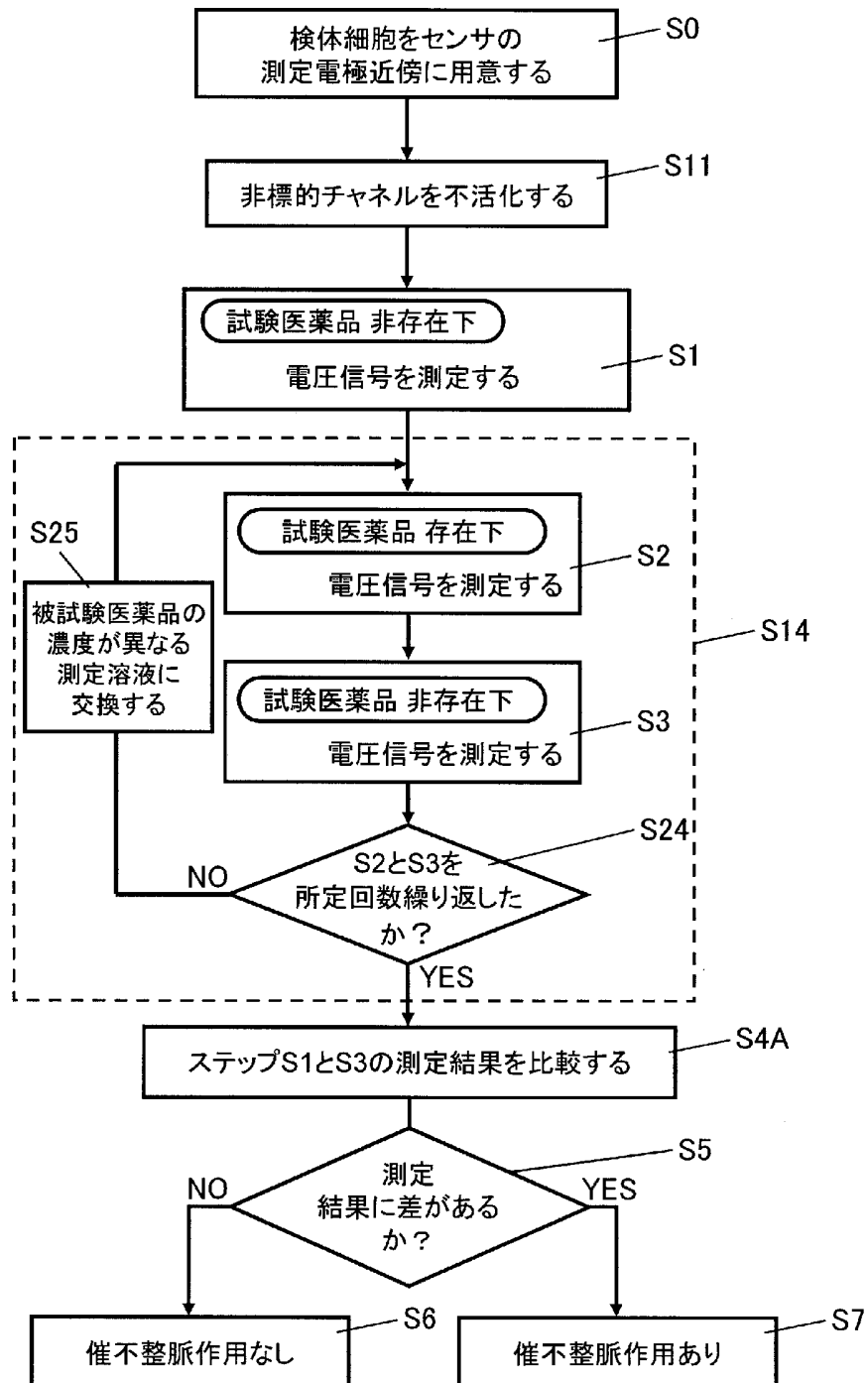
[図7-A]



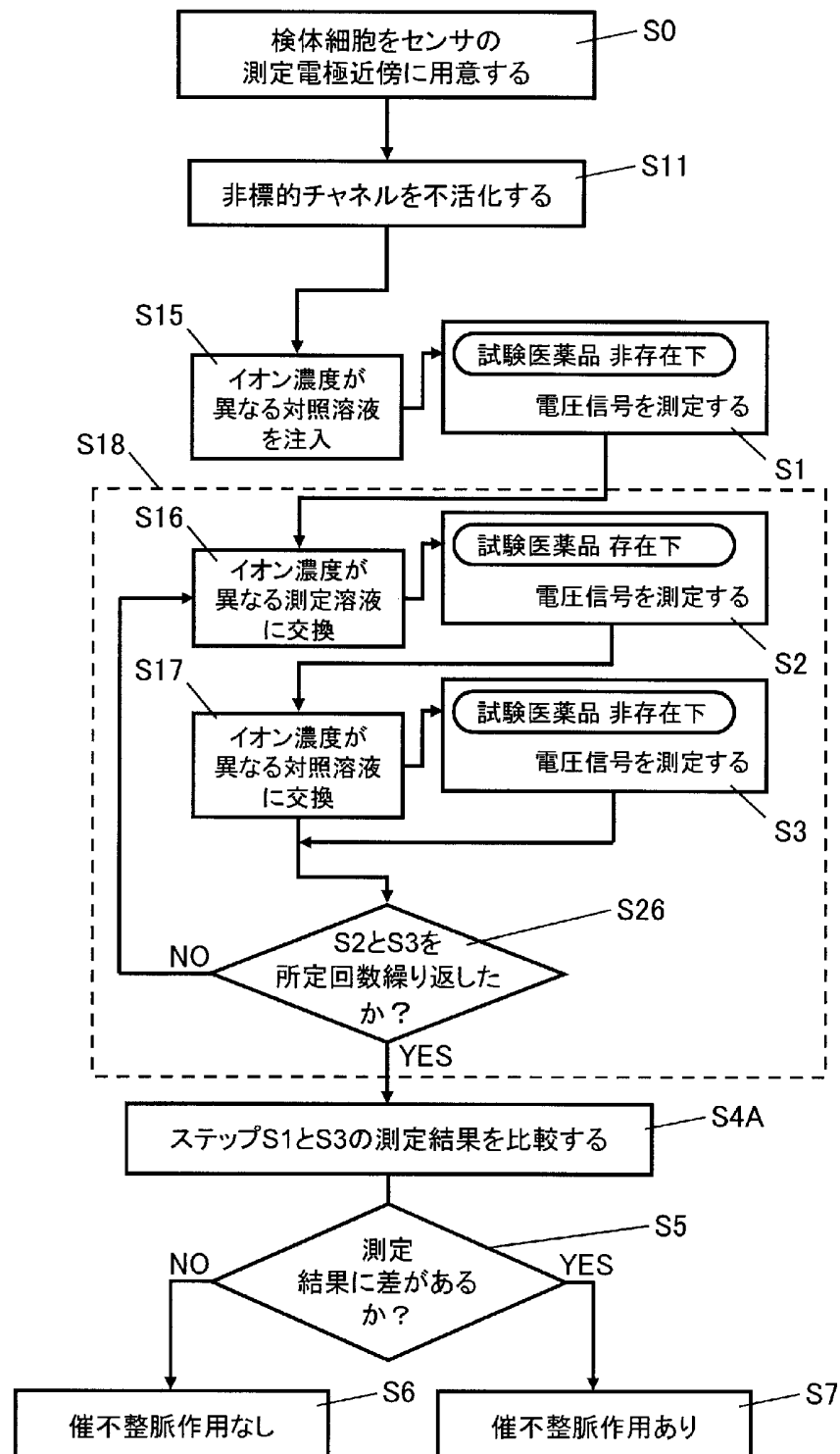
[図7-B]



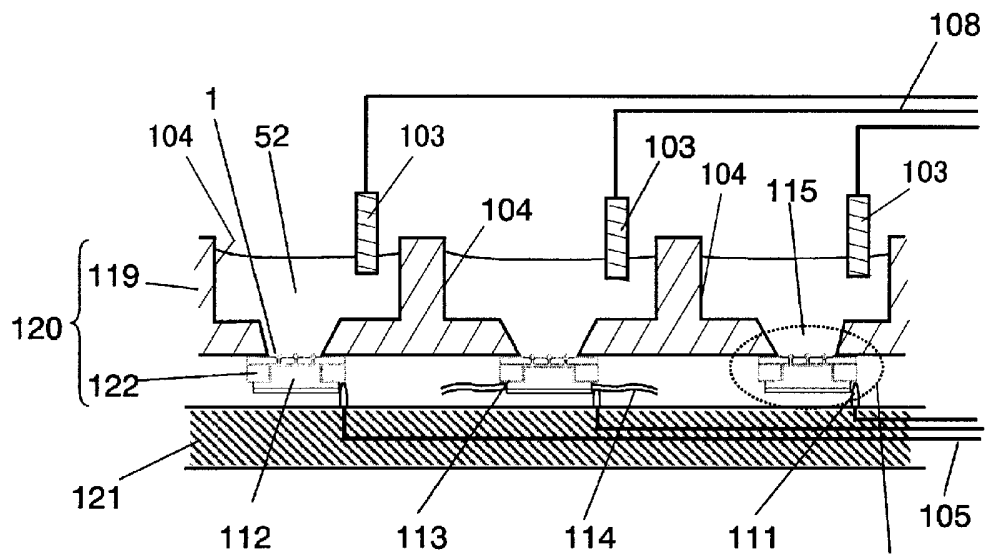
[図7-C]



[図8]



[図9]

図11、図12に
部分拡大図

[図10]

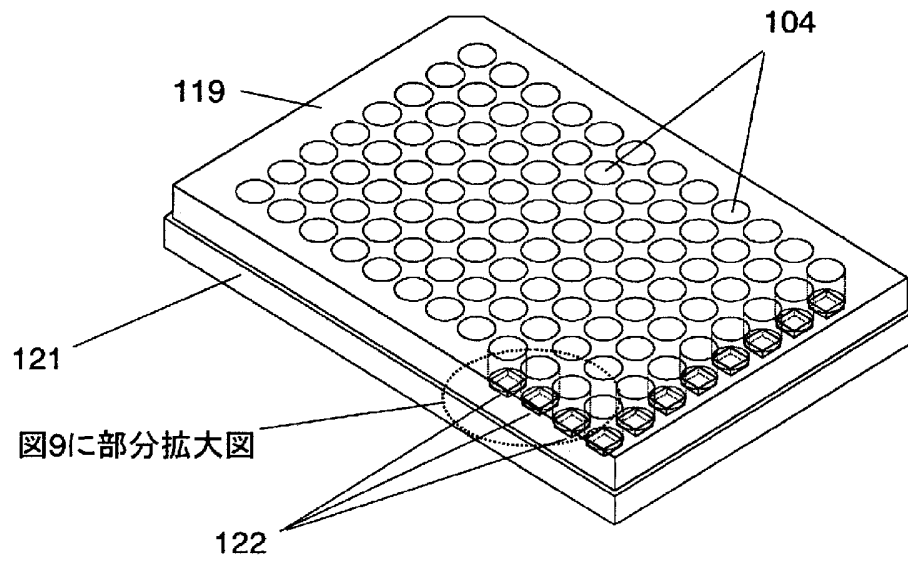
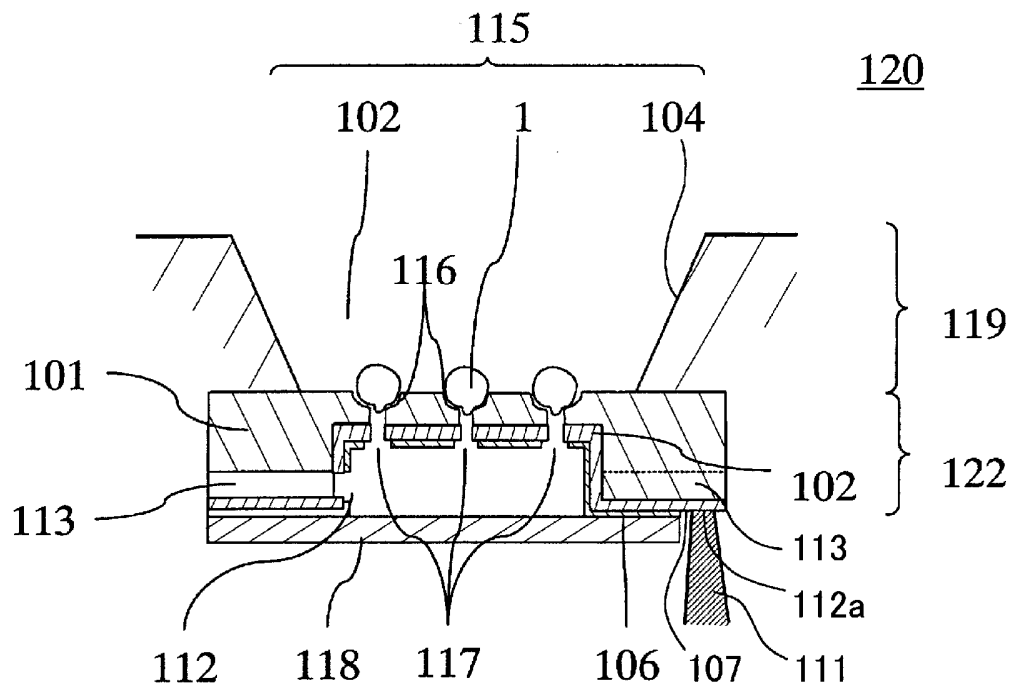
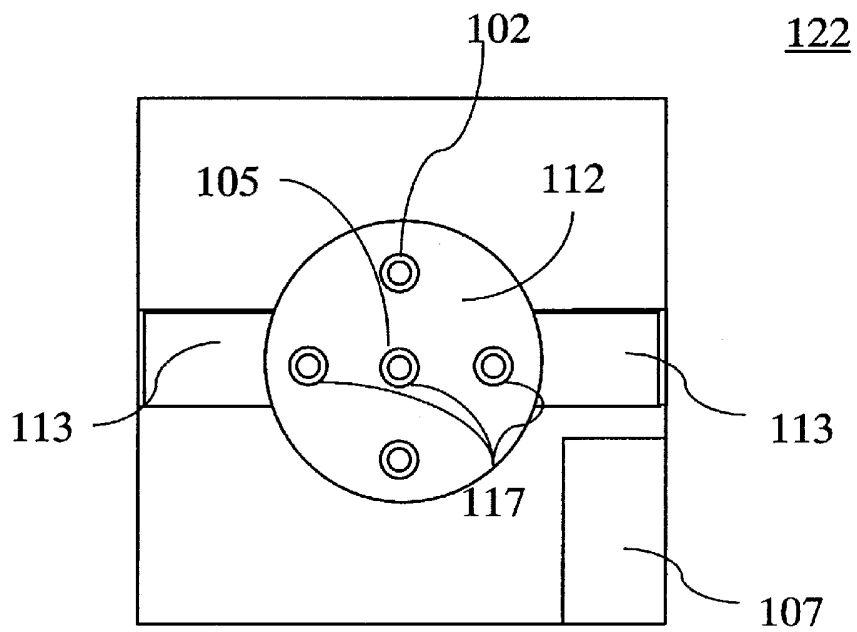


図9に部分拡大図

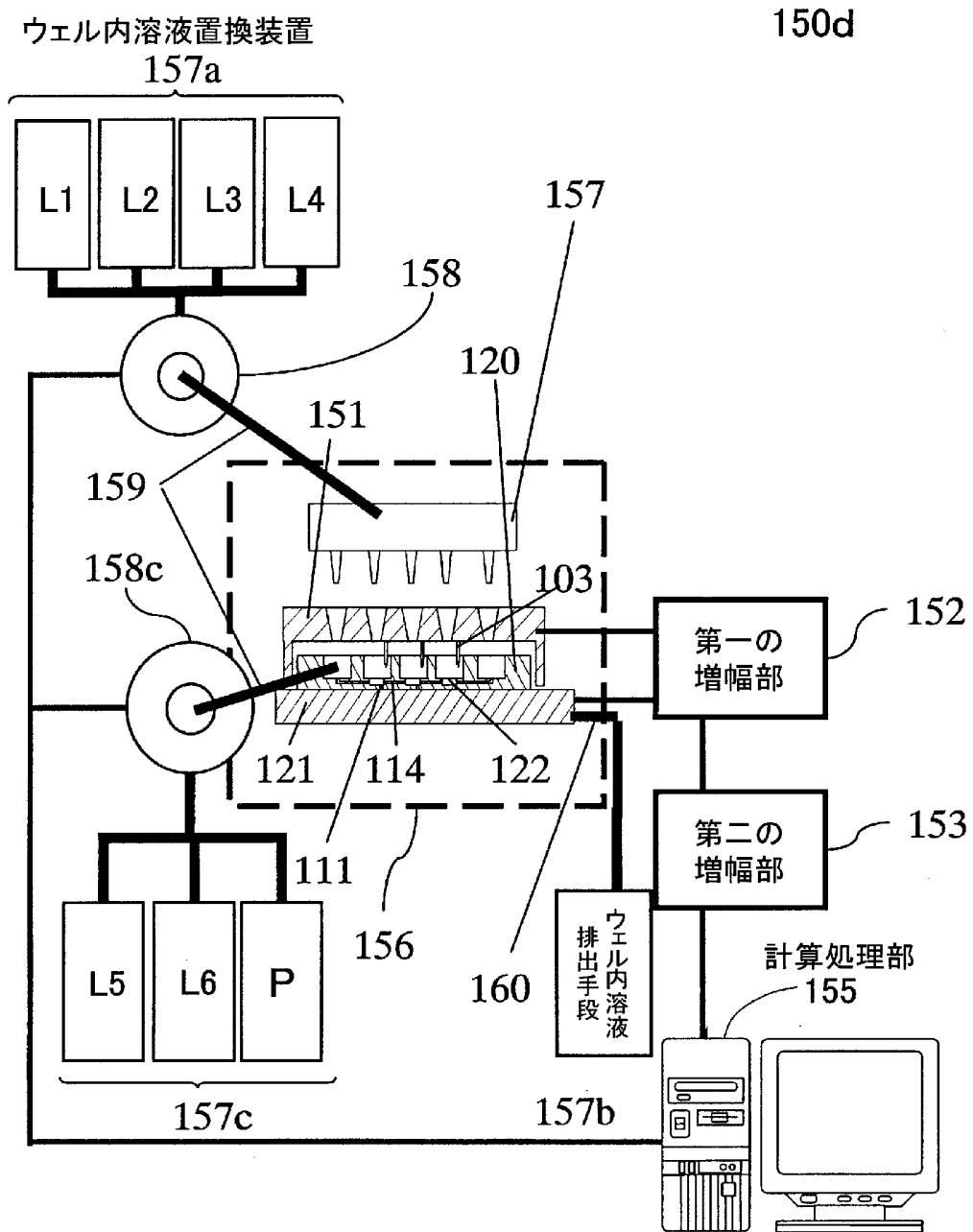
[図11]



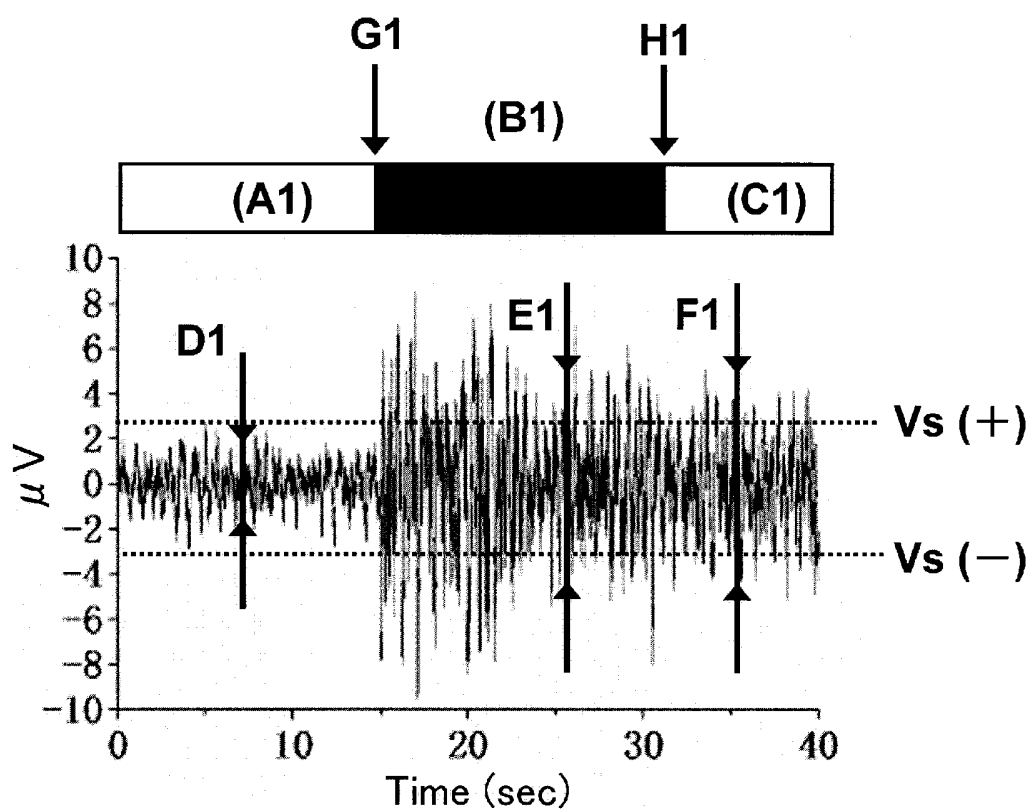
[図12]



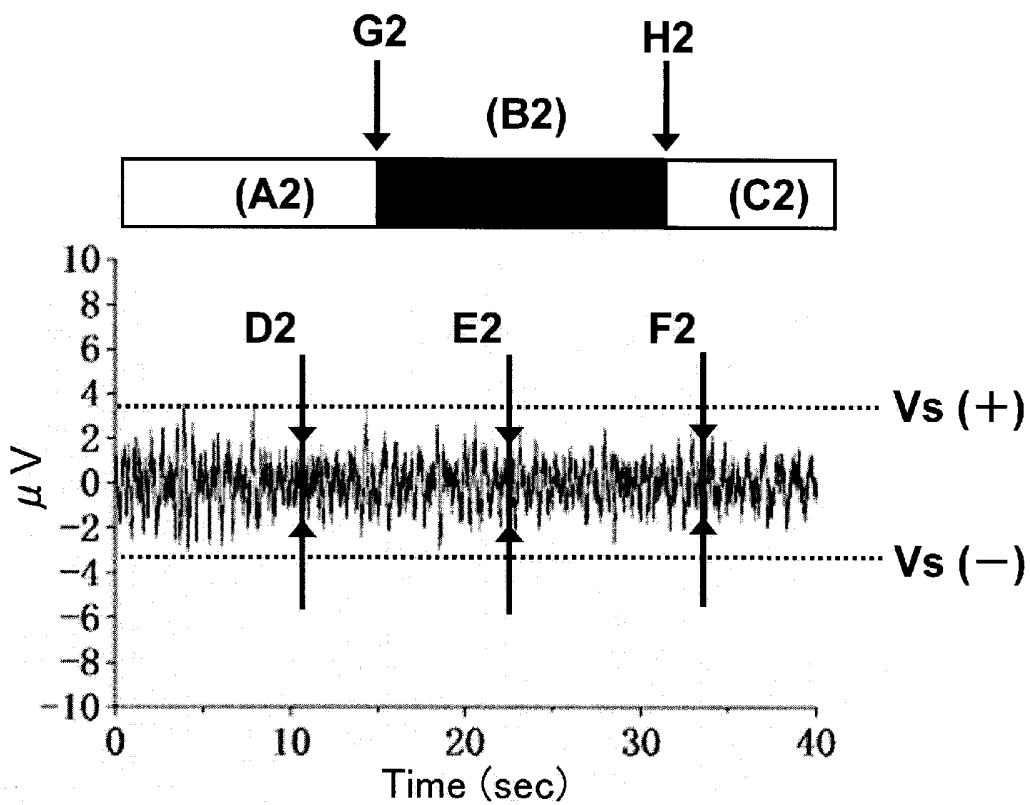
[図13]



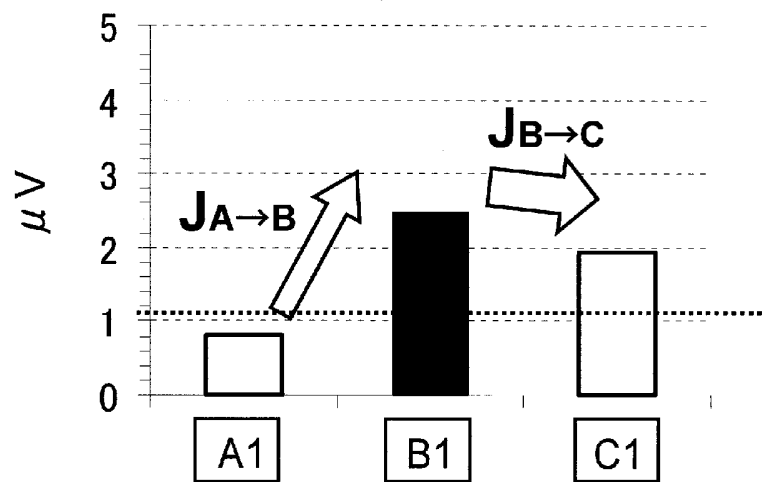
[図14]



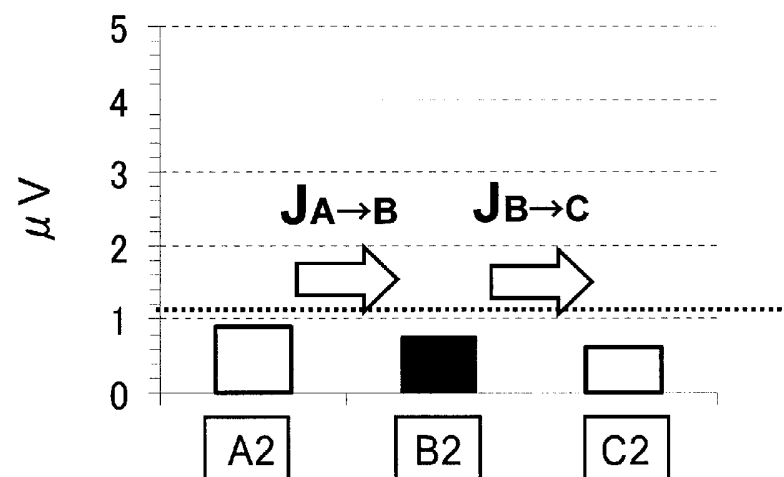
[図15]



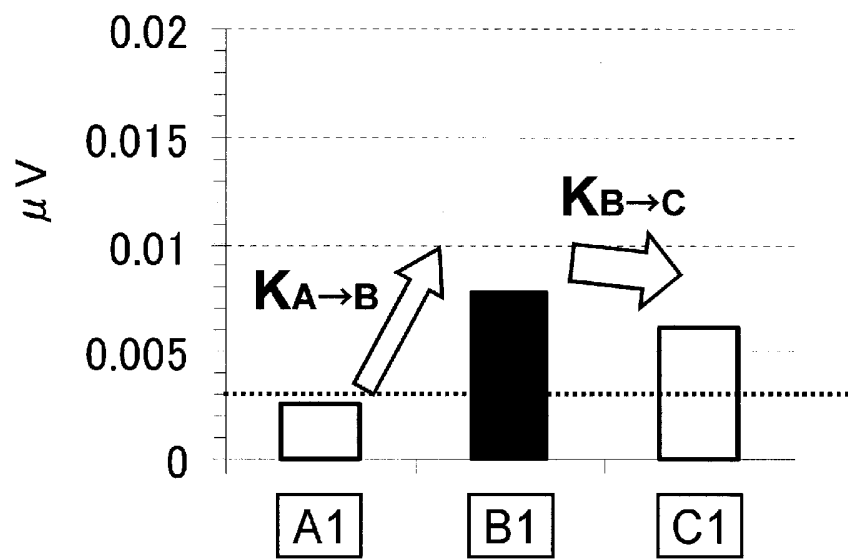
[図16]



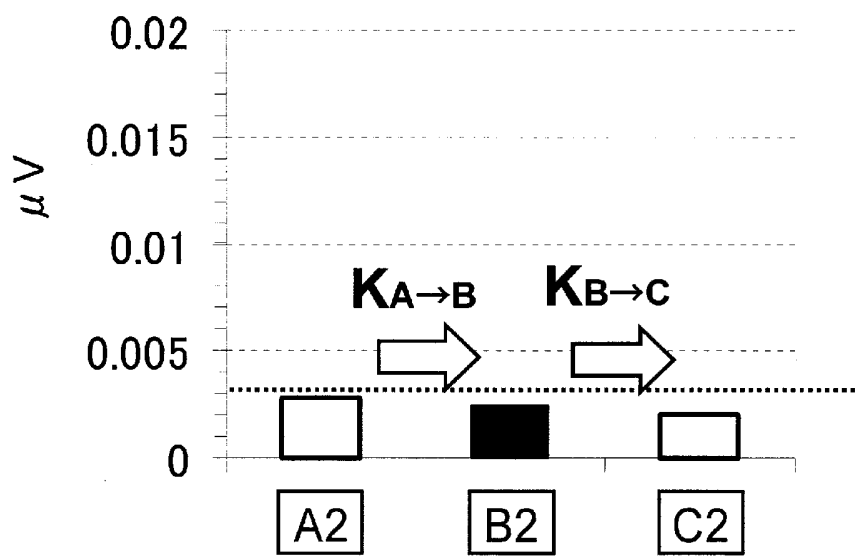
[図17]



[図18]



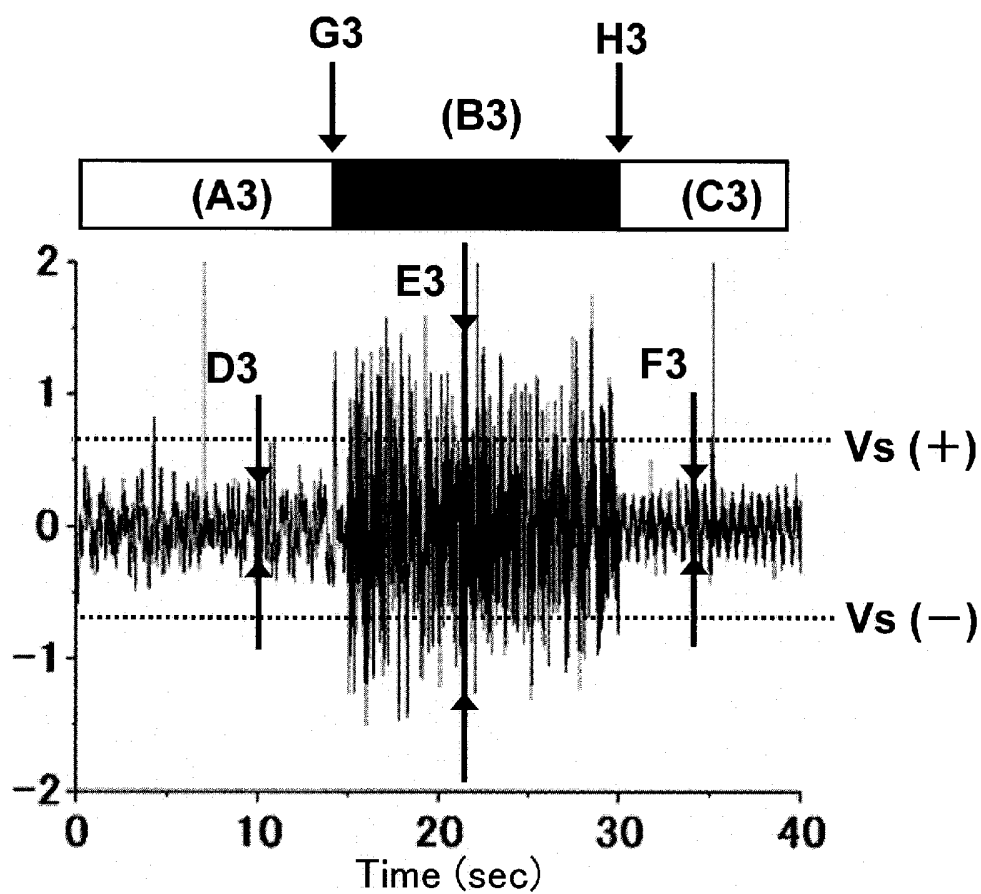
[図19]



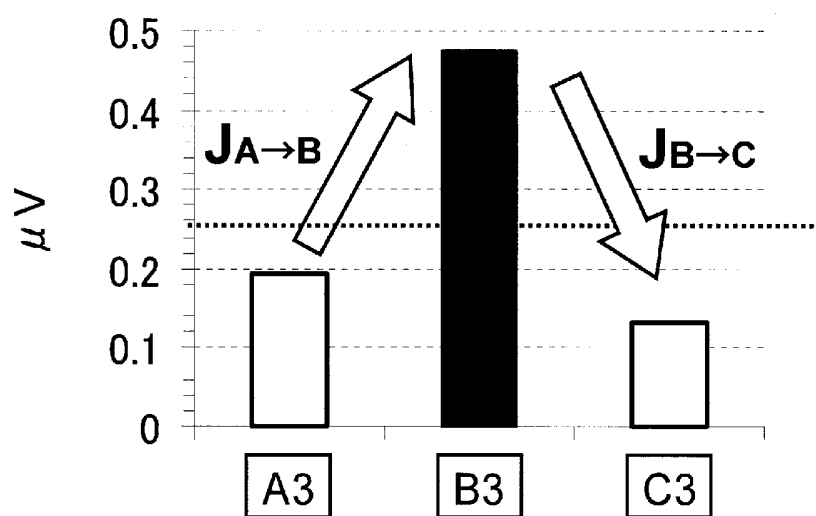
[図20]

	薬剤溶液1		対照溶液2	
	ピーク値 J	分散値 K	ピーク値 J	分散値 K
試験時 変化率 B/A (%)	299.3	299.6	86.8	86.8
終了時 変化率 C/A (%)	236.1	236.2	70.1	70.1

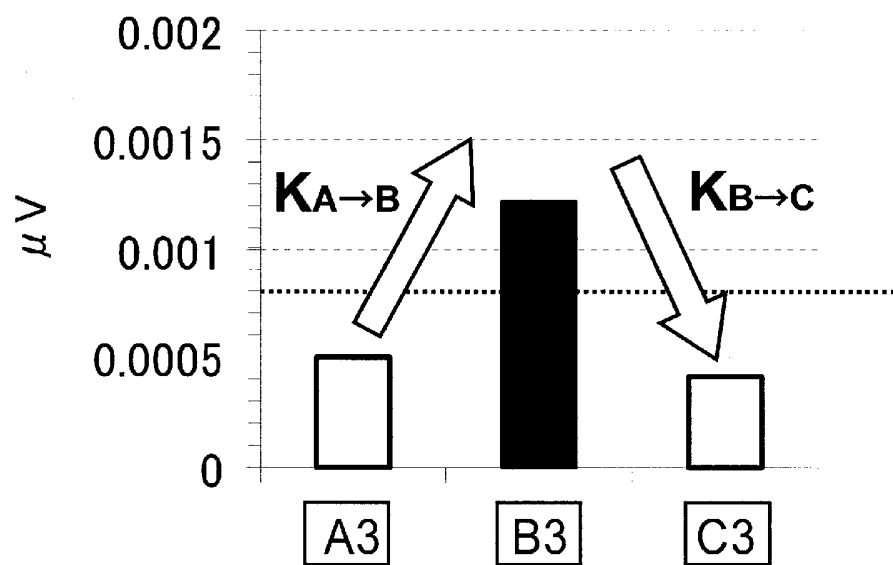
[図21]



[図22]



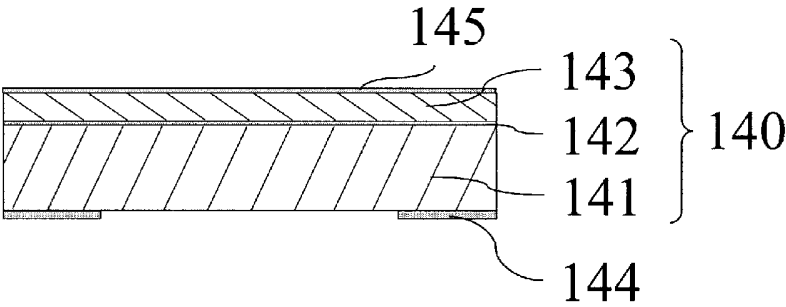
[図23]



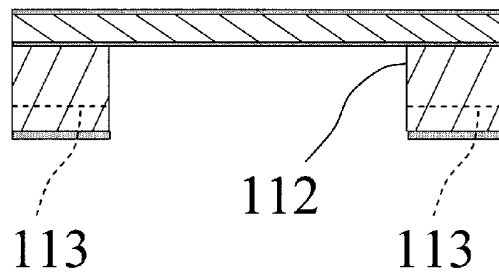
[図24]

	陽性対照薬 (テルフェナジン)		試験溶液 (ω-コノトキシングVIA)	
	ピーク値 J	分散値 K	ピーク値 J	分散値 K
試験時 変化率 A→B (%)	490.2	503.4	243.7	243.2
終了時 変化率 A→C (%)	467.8	474.5	67.3	70.2

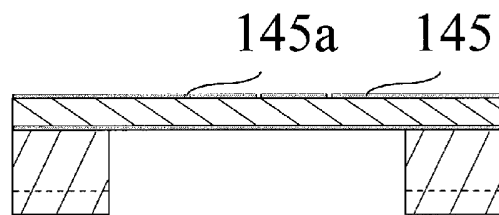
[図25]



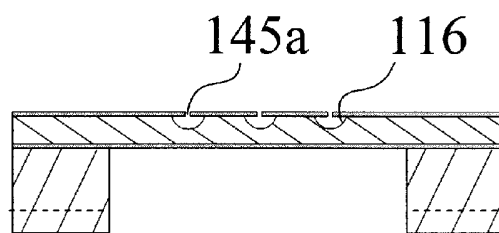
[図26]



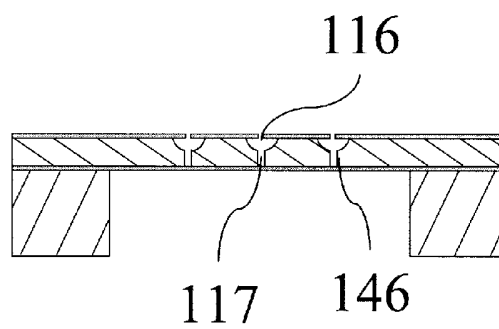
[図27]



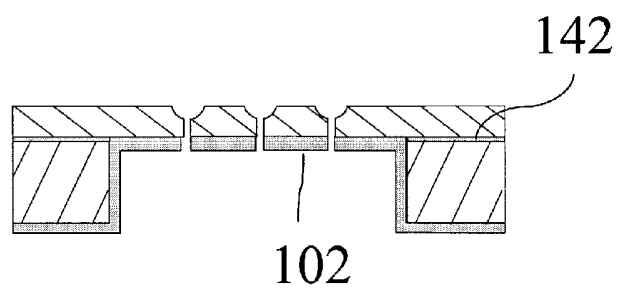
[図28]



[図29]



[図30]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/009938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12Q1/02, C12M1/34, G01N27/30//G01N33/15

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.⁷ C12Q1/02, C12M1/34, G01N27/30, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Haruaki NAKATANI, "QT Encho Yakubutsu no Saibo Denki Yakurigakuteki Hyokaho", Folia Pharmacologica Japonica (2003), Vol.121, No.6, pages 384 to 392	1-17
A	Motohiko CHACHIN, "HERG Chennel Hatsugenkei o Mochiita Iyakuhin no Saifuseimyaku Sayo Kenshutsuho", Folia Pharmacologica Japonica (2003), Vol.119, No.6, pages 345 to 351	1-17
A	Kenji TSUJIMAE, "HERG Channel to KCNQ1/KCNE1 Channel", Igaku no Ayumi (2002), Vol.201, No.13, pages 1011 to 1016	1-17

☐ 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

23 August, 2005 (23.08.05)

Date of mailing of the international search report

06 September, 2005 (06.09.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12Q1/02, C12M1/34, G01N27/30 // G01N33/15

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))

Int.Cl.⁷ C12Q1/02, C12M1/34, G01N27/30, G01N33/15

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

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

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 請求の範囲の番号
A	中谷晴昭, QT 延長薬物の細胞電気薬理学的評価法, 日本薬理学雑誌 (2003), Vol. 121, No. 6, p. 384-392	1-17
A	茶珍元彦, HERG チャネル発現系を用いた医薬品の催不整脈作用検 出法, 日本薬理学雑誌 (2003), Vol. 119, No. 6, p. 345-351	1-17
A	辻前賢司, HERG チャネルと KCNQ1/KCNE1 チャネル, 医学のあゆみ (2002), Vol. 201, No. 13, p. 1011-1016	1-17

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矛盾するものではなく、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

23. 08. 2005

国際調査報告の発送日

06. 9. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

9453