

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6087264号
(P6087264)

(45) 発行日 平成29年3月1日(2017.3.1)

(24) 登録日 平成29年2月10日(2017.2.10)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 M	1/00	(2006.01)	C 12 M	1/00	C
C 12 M	1/34	(2006.01)	C 12 M	1/34	Z
C 12 Q	1/02	(2006.01)	C 12 Q	1/02	
G 01 N	33/15	(2006.01)	G 01 N	33/15	Z
G 01 N	33/50	(2006.01)	G 01 N	33/50	Z

請求項の数 18 (全 24 頁)

(21) 出願番号

特願2013-246906 (P2013-246906)

(22) 出願日

平成25年11月29日 (2013.11.29)

(65) 公開番号

特開2015-105842 (P2015-105842A)

(43) 公開日

平成27年6月8日 (2015.6.8)

審査請求日

平成28年7月25日 (2016.7.25)

早期審査対象出願

(73) 特許権者

501387839
株式会社日立ハイテクノロジーズ
東京都港区西新橋一丁目24番14号

(74) 代理人

100100310

弁理士 井上 学

(74) 代理人

100098660

弁理士 戸田 裕二

(74) 代理人

100091720

弁理士 岩崎 重美

(72) 発明者

高橋 亮介
東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内

(72) 発明者

神田 勝弘

東京都港区西新橋1丁目24番14号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】成分分析装置、薬効分析装置、及び分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肝細胞を保持する複数の容器を保持する保持部と、
 前記複数の容器内の温度を調整する温度調整部と、
 前記複数の容器内の成分を測定し、当該測定した前記成分を解析する分析部と、
 を備え、
 前記複数の容器は、少なくとも前記第1容器、前記第2容器、及び第3容器であって、
 前記第1容器内及び前記第2容器は、夫々第1バッファ液を保持し、
 前記第3容器内に、前記肝細胞の毛細胆管が崩壊することを促す第2バッファ液が保持され、

前記温度調整部は、
 前記第1容器内及び前記第3容器内の第1温度よりも、前記第2容器内の第2温度の方が
 低くなるように調整し、
 前記分析部は、
 前記第1容器内の肝細胞から、前記第1容器内の前記第1バッファ液へ排出された成分の
 量と、
 前記第2容器内の肝細胞から、前記第2容器内の前記第1バッファ液へ排出された前記成
 分の量と、
 前記第3容器内の肝細胞から、前記第3容器内の前記第2バッファ液へ排出された前記成
 分の量と、

10

20

を測定し、

前記肝細胞のトランスポータを介して排出される前記成分の量と、

前記肝細胞の毛細胆管を介して排出される前記成分の量と、

前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記成分の量と、

を解析することを特徴とする成分分析装置。

【請求項 2】

前記複数の容器内の液体を供給または回収する送液部をさらに有し、

前記送液部は、

前記複数の容器に前記成分を含む成分溶液を供給し、

前記成分溶液を回収した後、第3バッファ液を前記複数の容器内に供給し、

10

前記第3バッファ液を回収した後、前記第1容器及び前記第2容器に前記第1バッファ液を供給し、前記第3容器に前記第2バッファ液を供給し、

前記分析部は、

前記複数の培養容器の何れかに保持された前記肝細胞から、前記第3バッファ液内へ排出された成分の量を測定することを特徴とする請求項1記載の成分分析装置。

【請求項 3】

前記第3バッファ液と前記第1バッファ液は、同一種のバッファ液であることを特徴とする請求項2記載の成分分析装置。

【請求項 4】

前記温度調整部は、

20

前記第1温度よりも、前記第3バッファ液を保持しているときの前記複数の容器内のうち少なくとも一つの容器内の温度の方が低くなるように温度を調整することを特徴とする請求項2記載の成分分析装置。

【請求項 5】

前記分析部は、

前記第3容器内の肝細胞内に残留している前記成分の量と、

前記第1容器または前記第2容器のうち少なくとも一つの容器内の肝細胞に残留している成分の量と、

を測定し、

前記肝細胞の毛細胆管以外に残留する前記成分の量を解析することを特徴とする請求項1記載の成分分析装置。

30

【請求項 6】

薬剤を吸収した肝細胞を保持する複数の容器を保持する保持部と、

前記複数の容器内の液体を供給する送液部と、

前記複数の容器内の温度を調整する温度調整部と、

前記複数の容器内の薬剤の量を測定し、当該測定した薬剤を解析する分析部と、

を備え、

前記複数の容器は、第1容器、第2容器及び第3容器であって、

前記送液部は、

前記第1容器及び前記第2容器に、第1バッファ液を供給し、

40

前記第3容器に、前記肝細胞の毛細胆管から前記薬剤が排出されることを促す第2バッファ液を供給し、

前記温度調整部は、

前記第1容器内及び前記第3容器内の温度よりも、前記第2容器内の温度の方が低くなるように温度を調整し、

前記分析部は、

前記第1容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、

前記第2容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、

前記第3容器内の肝細胞から前記第2バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、

前記肝細胞のトランスポータから排出される前記薬剤の量と、

50

前記肝細胞の毛細胆管から排出される前記薬剤の量と、
前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記薬剤の量と、
を夫々解析することを特徴とする薬剤成分分析装置。

【請求項 7】

薬剤を吸収した肝細胞を保持する複数の容器を保持する保持部と、
前記複数の容器内の液体を供給または排出する送液部と、
前記複数の容器内の温度を調整する温度調整部と、
前記複数の容器内の薬剤の量を測定し、当該測定した薬剤を解析する分析部と、
を備え、
前記送液部は、

10

前記複数の容器に、前記薬剤を供給し、
前記薬剤を前記複数の容器から排出した後、前処理用バッファ液を供給し、
前記前処理用バッファ液を前記複数の容器から回収した後、前記複数の培養容器のうち、
前記第1容器及び前記第2容器に、第1バッファ液を供給し、
前記第3容器に、前記肝細胞の毛細胆管から前記薬剤が排出されることを促す第2バッファ液を供給し、
前記温度調整部は、
前記第1容器内及び前記第3容器内の第1温度よりも、前記第2容器内の第2温度の方が
低くなるように温度を調整し、
前記分析部は、

20

前記複数の容器内の肝細胞から前記前処理用バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、
前記第1容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、
前記第2容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、
前記第3容器内の肝細胞から前記第2バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、
前記肝細胞を前処理する段階で前記肝細胞から排出される前記薬剤の量と、
前記肝細胞のトランスポータから排出される前記薬剤の量と、
前記肝細胞の毛細胆管から排出される前記薬剤の量と、
前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記薬剤の量と、
を夫々解析することを特徴とする薬剤成分分析装置。

【請求項 8】

30

前記前処理用バッファ液と前記第1バッファ液は、同一種のバッファ液であることを特徴とする請求項7記載の薬剤成分分析装置。

【請求項 9】

前記温度調整部は、

前記前処理用バッファ液を保持しているときの、前記複数の容器内のうち少なくとも一つの容器内の温度よりも、前記第1温度の方が高くなるように温度を調整することを特徴とする請求項7記載の薬剤成分分析装置。

【請求項 10】

前記分析部は、

前記第3容器内の肝細胞内に残留している前記薬剤の量と、

40

前記第1容器または前記第2容器のうち少なくとも一つの容器内の肝細胞に残留している薬剤の量と、
を測定し、

前記肝細胞の毛細胆管以外に残留する前記薬剤の量を解析することを特徴とする請求項6
から9のいずれか1項に記載の薬剤成分分析装置。

【請求項 11】

肝細胞を保持する第1容器及び第3容器内の温度よりも、前記肝細胞を保持する第2容器
内の温度の方が低くなるように温度を調整する温調工程と、
前記第1容器内の肝細胞から、前記第1容器内の前記第1バッファ液へ排出された成分の
量と、前記第2容器内の肝細胞から、前記第2容器内の前記第1バッファ液へ排出された

50

成分の量と、前記第3容器内の肝細胞から、前記第3容器内の前記肝細胞の毛細胆管が崩壊することを促す第2バッファ液へ排出された成分の量と、
を測定する測定工程と、

前記測定工程によって測定した結果に基づいて、
前記肝細胞のトランスポータを介して排出される前記成分の量と、

前記肝細胞の毛細胆管を介して排出される前記成分の量と、

前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記成分の量と、
を夫々解析する解析工程と、を有することを特徴とする成分分析方法。

【請求項12】

前記温調工程よりも前に、

10

少なくとも前記第1容器、前記第2容器、及び前記第3容器を含む複数の容器内の液体を
供給または回収する送液工程をさらに有し、

前記送液工程において、

前記複数の容器に前記成分を含む成分溶液を供給し、

前記成分溶液を回収した後、第3バッファ液を前記複数の容器内に供給し、

前記第3バッファ液を回収した後、前記第1容器及び前記第2容器に前記第1バッファ液
を供給し、前記第3容器に前記第2バッファ液を供給し、

前記測定工程において、

前記複数の培養容器の少なくとも一つに保持された前記肝細胞から、前記第3バッファ液
内へ排出された成分の量を解析することを特徴とする請求項11記載の成分分方法。

20

【請求項13】

前記第3バッファ液と前記第1バッファ液は、同一種のバッファ液であることを特徴とする
請求項12記載の成分分析方法。

【請求項14】

前記温調工程よりも前に、

前記第1温度よりも、前記前記第3バッファ液を保持しているときの前記複数の容器内の
うち少なくとも一つの容器内の温度の方が低くなるように温度を調整する前処理温調工程
を有することを特徴とする請求項12記載の成分分析方法。

【請求項15】

薬剤を吸収した肝細胞を保持する複数の容器に、液体を供給する送液工程と、

30

前記複数の容器内の温度を調整する温調工程と、

前記複数の容器内の薬剤の量を測定する測定工程と、

前記測定工程において測定した薬剤を解析する解析工程と、

を備え、

前記複数の容器は、第1容器、第2容器及び第3容器であって、

前記送液工程において

前記第1容器及び前記第2容器に、第1バッファ液を供給し、前記第3容器に、前記肝細
胞の毛細胆管から前記薬剤が排出されることを促す第2バッファ液を供給し、
前記温調工程において、

前記第1容器内及び前記第3容器内の温度よりも、前記第2容器内の温度の方が低くなる
ように温度を調整し、

40

前記計測工程において、

前記第1容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、

前記第2容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、

前記第3容器内の肝細胞から前記第2バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、

前記第3容器内の肝細胞内に残留している前記薬剤の量と、前記第1容器または前記第2
容器のうち少なくとも一つの容器内の肝細胞に残留している薬剤の量と、

を測定し、

前記解析工程において、

前記肝細胞のトランスポータから排出される前記薬剤の量と、

50

前記肝細胞の毛細胆管から排出される前記薬剤の量と、
 前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記薬剤の量と、
 前記肝細胞の毛細胆管以外に残留する前記薬剤の量と、
 を夫々解析することを特徴とする薬剤成分分析方法。

【請求項 16】

薬剤を吸収した肝細胞を保持する複数の容器内の液体を供給または排出する送液工程と、
 前記複数の容器内の温度を調整する温調工程と、
 前記複数の容器内の薬剤の量を測定する測定工程と、
 前記測定工程によって測定した薬剤を解析する解析工程と、
 を備え、

10

前記送液工程において、

前記複数の容器に、前記薬剤を供給し、

前記薬剤を前記複数の容器から排出した後、前処理用バッファ液を供給し、

前記前処理用バッファ液を前記複数の容器から回収した後、前記複数の培養容器のうち、
 前記第1容器及び前記第2容器に、第1バッファ液を供給し、

前記第3容器に、前記肝細胞の毛細胆管から前記薬剤が排出されることを促す第2バッファ液を供給し、

前記温調工程において、

前記第1容器内及び前記第3容器内の第1温度よりも、前記第2容器内の第2温度の方が
 低くなるように温度を調整し、

20

前記測定工程において、

前記複数の容器内の肝細胞から前記前処理用バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、
 前記第1容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、

前記第2容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、

前記第3容器内の肝細胞から前記第2バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、

前記第3容器内の肝細胞内に残留している前記薬剤の量と、前記第1容器または前記第2容器のうち少なくとも一つの容器内の肝細胞に残留している薬剤の量と、

を測定し、

前記解析工程において、

前記肝細胞を前処理する段階で前記肝細胞から排出される前記薬剤の量と、

30

前記肝細胞のトランスポータから排出される前記薬剤の量と、

前記肝細胞の毛細胆管から排出される前記薬剤の量と、

前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記薬剤の量と、

前記肝細胞の毛細胆管以外に残留する前記薬剤の量と、

を夫々解析することを特徴とする薬剤成分分析方法。

【請求項 17】

前記前処理用バッファ液と前記第1バッファ液は、同一種のバッファ液であることを特徴
 とする請求項16記載の成分分析方法。

【請求項 18】

前記温調工程より前に、

40

前記前処理用バッファ液を保持しているときの、前記複数の容器内のうち少なくとも一つの容器内の温度よりも、前記第1温度の方が高くなるように温度を調整する前処理温調工程を有することを特徴とする請求項16記載の薬剤成分分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新薬開発に有用な、薬物の取り込み、代謝、排泄といった薬物動態の全体像の
 in vitro(生体外)での評価に関する。

【背景技術】

【0002】

50

新薬開発工程においては、ヒトの体内に投与し、効能を検証する臨床試験（「ヒト臨床試験」）を行うことが薬事法上必然となるが、ヒト臨床試験や動物実験試験は、莫大な開発費を要する。近年、これら開発費が最大の原因となって、新薬開発全体のコストが増大している。その原因の一つとして、開発工程前期の非臨床動物実験では薬効不良や毒性を検出できなかった薬剤候補について、開発工程後期のヒト臨床試験で初めて薬効不良や毒性が発見され、それまでの開発コストや、ヒト臨床試験にかけたコストが無駄になることに因るところが大きい。

【0003】

これらの背景から、ヒト臨床試験の通過率を向上させ、新薬開発コストの削減を図るために、薬効を示し、かつ毒性を発現しない新薬候補物質を早期に絞り込むことが重要となる。そこで、多くの製薬企業から、創薬初期段階に、ヒト細胞の特性と相関の低い動物実験のみで薬剤候補を絞り込むのではなく、ヒト細胞を用いて、投与薬物のヒト体内での薬物動態を良好に予測することが可能な *in vitro*（生体外）評価系が望まれている。しかしながら、細胞を利用して、投与された医薬品候補化合物の取込み、代謝、胆管・血管排泄といった、薬物動態の全体像を把握、解析する手法は確立されていない。

10

【0004】

薬剤が体内で薬効を発揮するためには、一旦肝臓に取り込まれた薬剤が、代謝産物になるか、あるいは代謝を受けずに元々の化合物（親化合物）のまま、血管側に排出された後に、再び血流に乗って再循環し、目的の臓器・器官にたどり着く必要がある。したがって、*in vitro*試験系においても、投与後に血管側に排出される医薬品候補化合物の再循環分を測定し、新薬開発において最も重要な指標の一つである薬効を評価できれば、非常に有用な薬物動態評価法となりえる。加えて、胆管排泄後に尿や便として体外に排泄される、細胞から胆管に排泄される分（消失分）、細胞内貯留分を含んだ薬物動態全体像を把握することにより、各画分への分配比率が求めることができるようになる。

20

【0005】

特許文献1及び特許文献2には、これまでに培養細胞に薬剤を投与し、細胞の胆管から排泄される分（消失分）を評価する手法が開示されている。この評価方法は、投与薬剤が毒性や薬効を発揮せずに胆管に排泄され、その後、尿や便として体外に排泄される薬剤消失分の評価を行うものである。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2012-65659

【特許文献2】特開平8-503610

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従来技術はあくまでも胆管排泄量、つまりは薬効のなかった成分の量を評価する方法であり、体外消失分を評価する方法であった。しかし、薬効のある成分の情報を得るために血管側に排泄される成分の量を直接的に評価することが望ましいが、従来技術では血管に排泄される成分の量を解析する方法は確立されていなかった。さらには、薬物動態の一部を評価できるのではなく、投与薬剤の血管（Basal/Basolateral）側排出画分、管腔（Apical）側排出画分、細胞内貯留画分をといった、投与薬剤が細胞のどこから排泄され、どこに貯留しているのか、細分化して定量することにより、*in vitro*での薬物動態全体像を提供し、より精度の高い薬効評価を行うことができるが、このような評価方法についても確立されていなかった。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

例えば、前記複数の容器内の温度を調整する温度調整部と、前記複数の容器内の成分を測定し、当該測定した前記成分を解析する分析部と、を備え、前記複数の容器は、少なく

50

とも第1容器、第2容器であって、前記第1容器内及び前記第2容器は、夫々第1バッファ液を保持し、前記温度調整部は、前記第1容器内の温度と、前記第2容器内の温度とが異なる温度となるように調整し、

前記分析部は、前記第1容器内の細胞から、前記第1容器内の前記第1バッファ液へ排出された成分の量と、前記第2容器内の細胞から、前記第1容器内の前記第1バッファ液へ排出された成分の量と、を測定し、前記細胞のトランスポータを介して排出される前記成分の量を解析することを特徴とする成分分析装置である。

【発明の効果】

【0009】

本発明を適用することによって、細胞の血管側に排泄された薬剤等の成分を直接的に評価することができる。さらに、医薬品候補化合物（親化合物および、代謝産物）のトランスポータ経由および、拡散経由での血管（Basal/Basolateral）側排出画分と管腔（Apical）側排出画分、細胞内残留画分を定量し、投与された医薬品候補化合物の総量および、各画分への分配比率を判定することによって、投与された医薬品候補化合物の動態を評価することが可能となり、膨大な数の医薬品候補化合物の中から、薬効を発揮する薬剤候補を *in vitro*でのスクリーニング精度を向上させることができる。結果として、医薬品候補化合物の早期の絞り込みを可能とし、無駄な動物実験や、無用なヒト臨床試験を減少させることができる。製薬企業にとって重荷となっている新薬開発コスト低減に貢献する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】培養プレート

【図2】サンプル調製フロー

【図3】工程4、5、6の定量対象および薬物分布イメージ図

【図4】各画分の定義とCDFの結果

【図5】CDFの分配比率

【図6】Rhodamine 123の分配比率

【図7】自動計測装置構成図

【図8】サンプル調製部上面図

【図9】サンプル調製部正面図

【図10(a)】自動計測装置動作フローチャート

【図10(b)】自動計測装置動作フローチャート

【図11】チップヘッドおよびチップ

【発明を実施するための形態】

【実施例1】

【0011】

本実施例では、上述の薬効評価のための成分分析方法について図2の工程0～6に則して説明する。また、工程4～6については、図3を用いて詳述する。

【0012】

尚、以下の複数の実施例においては、薬効成分の評価方法に基づいて説明するが、あくまでも本願発明を説明するための一例であって、薬剤以外の化学物質、さらには薬物代謝物の評価にも本願発明の成分分析方法を適用できることは言うまでもない。また、本実施例にて示す、バッファ液や温度、時間等の具体的な条件は、あくまでも一例であって、技術思想として同様の効果を有するのであれば別の条件を適用してもよいことは言うまでもない。

【0013】

本実施例においては、試験区1～3の、少なくとも3つの試験区を用いた場合について説明する。各試験区には、細胞を保持する保持領域が存在するが、これら保持領域は、各試験区ごとに別々の容器を用いてもよいし、複数の保持領域を有する一つの容器内を区切って、各試験区を設定してもよい。

【0014】

10

20

30

40

50

<工程 0 : 肝細胞の調製と培養>

本工程では、まず薬剤の効果を検証するための肝細胞の調製・培養を行う。以下一例を示す。

【0015】

肝細胞の調製は、*in situ*コラゲナーゼかん流法にしたがった。詳しくは以下の通りである。ラット(5~6週齢)を、ペントバルビタール麻酔下で開腹し、門脈にカテーテルを挿入して前かん流液(Ca²⁺とMg²⁺不含、EGTAを含むハンクス液)を注入する。肝臓からの脱血が十分になされたことを確認した後にかん流を止める。かん流液をコラゲナーゼ溶液に換えて、かん流を行う。本実施例では0.05%コラゲナーゼ含むハンクス液を用いてかん流を行うが、この限りではない。細胞間組織がコラゲナーゼにより消化されたことを確認した後、かん流を止める。肝臓を切り離し、冷したハンクス液中で細切りし、ピペッティングにより細胞まで分散する。等張パーコール液を使用して500G、5分の遠心分離で傷害のある肝細胞を除去する。得られた肝細胞の生存率はトリパンブルー排除法で計測し、生存率85%以上の肝細胞を培養に使用する。ここでは、生存率85%以上の肝細胞を培養に使用するが、必ずしも当該条件に限られるものではないことは言うまでもない。また、肝細胞の調製は必ずしも*in situ*コラゲナーゼかん流法に限られるものではない。用いる肝細胞もラット由来のものに限らないし、ラットの系統も限定されない。本実施例では肝細胞を利用したが、これに限らない。

10

【0016】

前述の通り*in situ*コラゲナーゼかん流法により調製した肝細胞を培地に懸濁し、市販のコラーゲンコート培養ディッシュに肝細胞を 5×10^5 cells/mLの密度で培地に懸濁し播種する。播種密度、培地、培養プレート001は特に限定されない。培養プレートを図1に示す。ここでは24個の培養領域(ウェル、002)を含む24ウェル培養プレートを示したが、これに限らず所定の細胞を保持できる容器であれば他の形状の容器を用いても良い。播種後、CO₂インキュベータを用いて5%CO₂、37°の条件下で培養を開始する。18時間以上経過した後に、最初の培地交換を行う。播種後18時間目以降の培養に用いる培地は特に限定されるものではないが、本実施例では、培地(10%FCS+)からFCSを除いた培地(以下、培地(FCS-))にマトリigelを添加した培地を用いた。以降24時間毎に培地(FCS-)を用いて培地交換を行う。後述するように、工程5で3種類の異なる条件下での試験(試験区1、2、3:工程5で詳述)を行うため、この時点で同条件の培養プレートを独立に3プレート用意する。工程0から4、および工程5においては、3種類の試験区とも同一の試験操作を行う。

20

【0017】

<工程1: 肝細胞のコンディショニング>

本工程では、工程0にて培養した細胞を、薬剤評価に適したコンディショニングに整える。以下一例を示す。

【0018】

工程0によって4日間培養した細胞の培養上清を除去し、バッファとしてハンクス液を400·L添加し、37°で10分インキュベーションする(図2工程1)。バッファの種類と量は特に限定されるものではない。

30

【0019】

工程1の操作は2回繰り返すのが望ましい。このように工程0の培養にて使用した培地から、バッファ液(例えばハンクス液)へ細胞が馴染む成分を置換させることにより、以下の工程で正確な測定・解析を行うための下地を整えることができる。ただし、工程1を何度繰り返すかは、使用するバッファ液の種類や細胞の種類によって、任意に変更してもよいことは言うまでもない。

【0020】

<工程2: 薬液投与>

本工程では、評価を行う薬液を細胞に投与する。以下一例を示す。

【0021】

40

50

バッファを除去後、10・MのCDF（蛍光試薬）200・Lをウェルに添加し、37で30分間インキュベーションし、その後に4で5分間保持した（図2工程2）。試薬の種類、濃度、量は特に限定されるものではない。CDFは蛍光を発するため、モデル試薬としてプレートリーダで簡単に定量できる。また、投与量を200μLとしたが、これはウェル内の細胞全体が試薬に浸る量として選択した。CDFの濃度は細胞の蛍光アッセイとして従来用いられている濃度であれば良い。プレートリーダで検出するための試薬量としても本濃度を適用することが望ましい。インキュベーションの時間は30分としたが、これは薬剤の取り込みと排出がほぼ平衡状態になるまでの時間が30分であるという予備検討の結果をもとに採用した。投与された薬剤の細胞外への漏出を防ぐ目的で、30分インキュベーション後にプレート温度を4にした。容器内の温度を低くすることにより、細胞は薬剤を外部へ排出すること抑制する現象を生じさせるからである。

【0022】

このように薬剤の温度を所定の温度以下にすることにより、薬剤は細胞内へ留まり、細胞外へ漏出する現象を抑制することができる。本実施例では4としたが、投与された薬剤が細胞外へ漏出することを抑制できる温度であればこれに限られるものではない。また、投与された薬剤が細胞外へ漏出することを抑制できる、例えばインヒビターを投与するような方法があれば、温度を下げる方法に限らない。いずれにせよ、工程1で設定したプレート温度よりも、工程2における温度の方が低い温度となる。工程1でのコンディショニングでは工程2とは逆に、細胞内が薬剤を吸収・排出する現象が活性化する温度（例えば37）の方が望ましいからである。

【0023】

薬剤投与のタイミングは、本実施例に限定されるものではない。例えば、薬剤投与を試験日の前日もしくは数日前から行う場合もある。この場合は、工程0の段階で薬剤を投与し、工程1、2は省略してもよい。

【0024】

<工程3：細胞洗浄>

本工程では、工程3によって細胞内に含まれた薬液以外を洗い流す。以下一例を説明する。

【0025】

次に、プレートを4に保持したまま、氷冷したハンクス液400μLを用いて3回洗浄した（図2工程3）。4の目的は上記と同様である。培養時の培地の量が400μLであり、ウェル内壁に残留している培地成分を除去する目的で、洗浄ハンクス液の量を400μLとした。一般的な生化学アッセイでの洗浄回数は3回が通例となっており、踏襲した。各条件は限定されない。これにより、測定対象となる薬液以外を除去し、後の工程における薬効評価の精度をより向上させることが可能となる。

【0026】

<工程4：血管側排出画分回収>

薬効を評価する一つの指標として、投与した薬剤が、細胞内に長時間留まりやすいものであるか、または短期間しか留まりにくいものであるかを分析することが有効である。そこで本工程では、上記指標のためのデータを取得するべく、後述の工程5にて各試験区内の細胞を評価する前に、薬剤が細胞内から所定時間以内に漏出させる。以下一例を示す。

【0027】

まず、前処理用のバッファ液（例えばハンクス液）を投与し、37で30分間インキュベーションし、薬剤を含むハンクス液（上清）を回収した（図2工程4）。バッファ液は、工程5にて使用するバッファ液と同一種のものを使用してもよいし、別の種類のものを使用してもよい。工程3までにより肝細胞（図3、101）内に貯留させた薬剤を、ハンクス液中に、第一血管側排出、つまりは受動拡散経由（図2工程4、（1）'）および、トランスポータ（TP）経由（図2工程4、（2）'およびイメージ図中102）で排出させるため、37に維持した。後述の通り、工程5においても血管側排出が行われるため、区別するため、工程4における血管側排出を第一血管側排出、工程5における血管側排

10

20

30

40

50

出を第二血管側排出と定義した。本質的には、ともに細胞内から血管側 (Basal/Basolateral) (上清) に排出される工程である。トランスポータは細胞膜上に発現している物質輸送を担う膜タンパク質である。細胞内外での能動的な物質輸送を担う。また、受動拡散は、トランスポータ経由以外による細胞外への排出であり、細胞膜からの漏出等を含む。工程 4 でハンクス液に排出された薬剤を血管側排出画分と定義したのは、ハンクス液に面している細胞上面部分は、ベーサル (Basal) / バソラテラル (Basolateral) 面 (図 3、104) に相当し、生体内では血管に面している部分と想定されるためである。

【0028】

次に説明する工程 5 では、異なる 3 種類の操作で薬剤の回収を行う工程 (試験区 1、2、3) となるが、工程 5 の前に、工程 4 にて上述のように第一血管側排出画分 (ハンクス液に排出された薬剤) を取得しておくことにより、薬剤が細胞に留まりやすいものかどうかを検証する指標を取得することができる。
10

【0029】

尚、血管側排出各分を把握するのに用いるハンクス液は、どの試験区のハンクス液を用いてもよい。例えば、後述の試験区 1 ~ 3 すべてのハンクス液について評価してもよいし、一部のみ用いても良い。

【0030】

また、工程 3 や 4 は本発明による分析をより詳細に実施し高精度の評価を行うための工程であって、本発明をスキップして工程 5 の作業を行うことも可能であることは言うまでもない。上記工程 0 ~ 4 は、図 2 に示すように、少なくとも試験区 1 ~ 3 において行われるものである。工程 5 では、本発明で求める複数の指標データを後述の解析によって取得するべく、試験区 1 ~ 3 夫々について、別条件で処理を行う。以下一例を示す。
20

【0031】

<工程 5、試験区 1 : 37 崩壊系による上清の回収>

試験区 1 では、図 3 の試験区 1 にて示すように、細胞からバッファ液 (例えばハンクス (-) 液) に、胆管側排出 (3) と、第二血管側排出 (つまりは拡散 (1) とトランスポータ (TP) (2) からの排出)との合算分を排出させる。ハンクス (-) 液は、カルシウムイオンやマグネシウムイオンを含まないハンクス液のことであり、本試験区のような細胞間接着あえてを強化しない場合等に用いる。細胞間接着を積極的に解除する目的としては、以下述べるように E G T A のようなキレーターを用いる。次に、1 mM の E G T A を含むハンクス (-) 液を 200 μL 添加した。E G T A は細胞間接着分子の接着に関与している Ca²⁺、Mg²⁺ の作用を抑えるキレート作用を持ち、細胞間接着を解除するための試薬である。これにより培養過程において形成された胆管を崩壊させる。37 で 30 分間インキュベーションした後に、上清を回収した。キレート作用を持つ試薬であれば E G T A に限定されない。E G T A を含むバッファの種類、量、およびインキュベーション温度と時間は特に限定されない。工程 5 の試験区 1 では、工程 4 が終了した段階で細胞内に貯留している薬剤 (図 3 工程 5、およびイメージ図 (1)、(2))、および胆管に排出されている薬剤 (図 3 工程 5 およびイメージ図 (3)) がすべて上清中に排出され、回収される (図 3 工程 5、試験区 1)。工程 5 で (3) を胆管側排出画分と定義したのは、細胞間接着部分に形成される間隙周囲の細胞膜部分は、アピカル (Apical) 面 (図 3、105) に相当し、かつ間隙は毛細胆管 (図 3、103) に想定されるためである。工程 5 試験区 1 では、温度は 37 に維持されているため、細胞内から血管側に排出される画分には受動拡散経由 (図 3 工程 5、(1))、およびトランスポータ経由 (図 3 工程 5、(2)) が含まれる。
30

【0032】

<工程 5、試験区 2 : 37 維持系による上清の回収>

試験区 2 は、試験区 1 のように胆管を崩壊させず、図 3 に言う第二血管側排出 (拡散 (1) とトランスポータ (2)) のみを排出させる。

【0033】

ハンクス液は 200 μL 添加した。試験区 2 は、試験区 1 とは異なり、E G T A 等のキ
40

50

レート剤を含まないため、細胞間接着は維持されたままであり、したがって、毛細胆管の崩壊も誘起されない試験区である。37で30分間インキュベーションした後に、上清を回収した。工程5の試験区2では、工程4が終了した段階で細胞内に貯留している薬剤(図3工程5、およびイメージ図(1)、(2))が上清中に排出され、回収される(図3工程5、試験区2)。これまでの説明にしたがい、上清中に排出される薬剤は、第二血管側排出画分と定義される。工程5試験区2では、温度は37に維持されているため、細胞内から血管側に排出される画分には受動拡散経由(図3工程5、(1))、およびトランスポータ経由(図3工程5、(2))が含まれる。

【0034】

工程5の試験区1と試験区2から、回収した薬剤の量を定量的に解析することにより、
10 例えば、試験区1で回収した薬剤量を定量化した値から、試験区2で回収した薬剤量を定量化した値を減算することにより、胆管側排出(3)の薬剤量と、第二血管側排出の薬剤量を夫々算出することができる。

【0035】

<工程5、試験区3：4 維持系による上清の回収>

試験区3は、後述のように試験区1,2よりも低い温度条件とすることで、第二血管側排出のうち、トランスポータ(1)から排出される薬剤を抑制し、拡散(2)による排出分のみを排出させる。

【0036】

ハンクス液を200μL添加し、4で30分間インキュベーションした後に、上清を回収した。同じ維持系の工程5試験区2とは試験温度が異なる。これは、4にすることにより、トランスポータ経由の血管側排出を抑制させるためである。工程5試験区3において、トランスポータ活性を抑制させる低温4の試験区を採用することにより、受動拡散経由の排出量のみを定量し(図3工程5、(1))、工程5試験区2との比較においてトランスポータ経由による血管側薬剤排出量を算出(定量)することが可能となる。各薬剤には細胞内外を移動するための特異的なトランスポータが存在する。したがって、受動拡散経由の排出量を排除し、トランスポータ経由での排出量を定量できることは、各薬剤に特異的には排出量を定量できることを意味する。バッファの種類、量、およびインキュベーション温度と時間は特に限定されない。上述同様に、工程5の試験区2と試験区3から、回収薬剤を定量することにより、トランスポータ経由の排出画分を算出することができる。尚、本実施例では試験区1,2,3を用いて排出画分を夫々算出する例について示したが、試験区の数は必ず3つである必要はない。例えば、胆管側排出(3)と、第二血管側排出((1)+(2))のみを分離したいのであれば、試験区1および2のみを実施すればよいし、第二血管側排出において、拡散(1)とトランスポータ(2)を単に分離したいのであれば、試験区2,3のみを実施すればよい。また、必要に応じて、別途4の崩壊系を設けることにより、毛細胆管側への排出のうち、トランスポータ経由の排出を抑制し、拡散による排出分のみを測定することができる。これにより、例えば、この4崩壊系と試験区3との比較から、拡散による毛細胆管側への排出とトランスポータ経由による毛細胆管側への排出分を切り分けて評価することが可能となる。

【0037】

上述した試験区1～3夫々における工程は、どの順番で行ってもよいし、各工程を並行して実施してもよい。

【0038】

<工程6：胆管画分、細胞内画分の回収>

再び工程6では3試験区とも共通の操作に戻る。工程6では、細胞内残留画分の定量を行うための薬剤の回収を行う。蛍光薬剤等をプレートリーダ等を用いて定量を行う場合には、1%の界面活性剤を含むハンクス液を例えれば200μL添加し、懸濁し、全量を回収することが望ましい(図2工程6)。これにより、細胞膜を破碎し、細胞内に残留する薬剤を排出させることが可能となる。得られたサンプルを培養プレートに移し、プレートリーダを用いて蛍光計測を行った。プランク測定用にハンクス液のみを添加したウェルを準

10

20

30

40

50

備する。励起波長 484 nm、吸収波長 519 nm で蛍光強度を測定する。

【0039】

また、薬剤を質量分析 (LCMS) 装置等を用いて定量する場合には、水添加による低張化、有機溶剤処理等により、細胞内残留分抽出後にメタノール等の有機溶剤を用いて懸濁し、全量を回収する (図2工程6)。その後、LCMS装置を用い、後述のように薬剤の定量を行う。

【0040】

<測定結果をもとにした各画分への分配比率の決定、およびスコア付け>

上記工程により得られた薬剤量を反映した蛍光強度をもとに、各画分への分配比率を計算する。ここでは、工程5、6の総和 (図3、B# + C# = (1) + (2) + (3) + (4)) を薬剤量 100% とする。この場合を「パターン1」とする。10

【0041】

蛍光量測定により求めた6種類の値 (B1、B2、B3、C1、C2、C3) から、図4のパターン1に示すような各区分への分配比率が求められる。これらの値から、

- ・拡散のみによる第二血管側排出画分 (Extracellular Efflux by Diffusion、ExEfx-Dif) は B3、

- ・トランスポータ経由のみによる第二血管側排出画分 (Extracellular Efflux by Transporter、ExEfx-TP) は B2 - B3、

- ・胆管側排出画分 (Bile Canaliculi Efflux、BCEfx) は B1 - B2、20

- ・細胞内残留画分 (Cell) は C1

に対応づけられる。この結果をもとに、図5のパターン1のような円グラフが描画でき、各画分への分配比率の全体像を視覚的に理解することが可能となる。

【0042】

さらに、定量結果をもとに、以下のような薬剤固有のスコア付けが可能になる。本実施例では、算出したCDFのスコアの一例を示す。算出されるスコアはこれらに限らない。

【0043】

トランスポータ経由での血管側排出を評価するスコアは、

- ・第二血管側排出薬剤量に対するトランスポータ経由で排出された薬剤量の割合 (Ratio of Extracellular Efflux by Diffusion、RexEMTP) として (B2 - B3) / B2 によって求められる。30

【0044】

胆管への排泄を評価するスコアは、

- ・細胞内に取り込まれた全薬剤量に対する胆管排泄薬剤量の割合 (Biliary Retention Drug、BiRD) として (B1 - B2) / (C1 + C2)、

または、別法の、

- ・細胞内に残留している薬剤量に対する胆管排泄薬剤量の割合として (C2 - C1) / C2、あるいは (B1 - B2) / C1

等によって求められる。

【0045】

<異なる薬剤間の分配比率およびスコアの比較>

CDFをRhodamine123に変えて上記と同様の操作により、図6に示す結果 (パターン1)を得ることができる。CDFの結果を示す図5 (パターン1)とは明らかに異なる分配比率を検出できることが分かる。40

【0046】

また、例えば、CDFの血管側排出薬剤量に対するトランスポータ経由で排出された薬剤量の割合 (RexEMTP) と、細胞内に取り込まれた全薬剤量に対する胆管排泄薬剤量の割合 (BiRD) は、それぞれ、41.08、18.58であるのに対し、Rhodamine123のそれらは、52.52、4.92となり、CDFはRhodamine123に比べて胆管に排泄されやすく、血管側には排出されにくい性質を保持した薬剤であることがわかる。以上のように、本発明により、それぞれの化合物がどのような薬物動態を示すかを評価することが50

可能になる。

【実施例 2】

【0047】

実施例 2 では、測定結果をもとにした各画分への分配比率の決定、およびスコア付けについて、実施例 1 とは異なる方法を用いた場合について説明する。

【0048】

本実施例では、図 3 に記載の S # (工程 4 に相当) の定量値を利用することにより、実施例 1 のパターン 1 で示した各画分への分配比率に加えて、投与薬物が細胞内に留まりやすいのか、留まりにくいのかの情報も与えることができ、より精密な評価をすることが可能となる。すなわち、工程 4、5、6 の総和 (図 3、S # + B # + C # = (1)' + (2)' + (1) + (2) + (3) + (4)) を 100% の投与薬物量とする。この場合を「パターン 2」とする。したがって、工程 4、5、6 の各試験区により求められる 9 種類 (S 1、S 2、S 3、B 1、B 2、B 3、C 1、C 2、C 3) を評価指標として用いることができる。

【0049】

蛍光量測定により求めた 9 種類の値から、図 4 のパターン 2 に示すような各区分への分配比率が求められる。これらの値から、

- ・第一血管側排出画分 (Sup 画分) は S 1 (S 2 S 3)、
- ・拡散のみによる第二血管側排出画分 (Extracellular Efflux by Diffusion、ExEfx-Dif) は B 3、
- ・トランスポータ経由のみによる第二血管側排出画分 (Extracellular Efflux by Transporter、ExEfx-TP) は B 2 - B 3、
- ・胆管側排出画分 (Bile Canaliculi Efflux、BCEfx) は B 1 - B 2、
- ・細胞内残留画分 (Cell) は C 1

に対応づけられる。この結果をもとに、図 5 のパターン 2 のような円グラフが描画でき、各画分への分配比率全体像を視覚的に理解することが可能となる。実施例 2 で示した方法を用いることにより、細胞内に留まりやすいか留まりにくいかの指標となる Sup 画分が、CDF では 70.82 であるのに対し、Rhodamine 123 では 39.29 (図 6、パターン 2) となり、CDF が血管側に排出されやすい傾向にあることがわかる。このことは、実施例 1 の細胞内残留画分評価に一致する。

【0050】

さらに、定量結果をもとに、薬剤固有のスコア付けが可能になるが、これは実施例 1 に記載の通りである。

【実施例 3】

【0051】

実施例 3 では、実施例 1 および 2 で述べてきた一連の工程を自動化を実現する装置の一例について述べる。尚、後述する装置の動作の目的、各構成の役割等について、上記実施例 1, 2 と重複する場合は、記載を省略する場合がある。

【0052】

実施例 1 ~ 2 で示した試験区 1 ~ 3 の夫々に設定される細胞を保持する領域について、後述する装置構成においては、「試験区 1 用ウェル」「試験区 2 用ウェル」「試験区 3 用ウェル」等の表現を用いて説明するが、これらは、例えば上述の「ウェル培養プレート」の複数の容器を夫々の試験区ごとに設定してもよいし、一つのウェル培養プレートの中の複数のウェルを区切って、区切った領域ごとに、例えば「第 1 容器」「第 2 容器」「第 3 容器」等として設定してもよい。

【0053】

特に試験区 1 用ウェルと試験区 2 用ウェルは、ほぼ同じ温度調整を行うため、ひとつのウェル培養プレート内を区切って設定した方が精度や速度の観点から効率的に評価することが可能となる。

【0054】

10

20

30

40

50

尚、後述の装置動作について各試験区用ウェル（容器）の交換作業については、自動で交換しても手作業で交換してもよい。当該容器の交換や設置作業については、以下省略して説明することとする。

【0055】

本装置は、図7に示すように、培養部106、サンプル調製部107（含む入力部107A）、分析部108、および表示部109により構成される。さらにサンプル調製部107は、後述する各容器（プレート）内の温度を調整する温度調整部107Bと、液体を容器に供給または回収可能な送液部107C等を有している。分析部108は、薬剤等の成分の量を測定する測定部108Aと、測定部から取得した薬剤等の成分の量から、トランスポータ経由、胆管経由、細胞内残存、トランスポータと胆管以外から排出される分（拡散）の夫々の量を解析する解析部108Bを有する。上記装置構成は一例であり、例えば解析部のみ別の装置に実行させ、当該別の装置に測定部から取得した情報を送信する等の構成としてもよいことは言うまでもない。10

【0056】

また、サンプル調製部の詳細構成を図8、および9に示す。サンプル調製部では、これまで実施例1-2で述べてきたように、分析対象となる各画分を自動調製することが目的となる。各構成要素の説明は、後述のフローチャートにしたがって述べる。

【0057】

自動計測装置動作フローチャートは図10に示す。図10のフローチャートは一例にすぎず、実施例1<工程2>に記載の通り、薬剤投与のタイミングが異なる場合は、この限りではない。本実施例においては、細胞を保持する容器について、複数の細胞保持領域（ウェル）を有するプレートを一例として用いて説明するが、容器はプレートに限られるものではなく、細胞を保持できるものであれば良いことは言うまでもない。20

【0058】

<培養部からサンプル調製部への移送>

まず、肝細胞が培養部106において培養される（図7、10）（図10(a)サブ工程1）。その後、培養された肝細胞を保持したプレートはサンプル調製部の第一温調機能付きプレートホルダ210上、および第二温調機能付きプレートホルダ（211）上に移送される（図7、10）（図10(a)サブ工程2）。

【0059】

<サンプル調製：実施例1、2の工程1に相当>

送液部107Cに設置されている、液体を吸引するための吸引ノズルが付加された吸引ヘッド205が、上記プレートホルダ上の、除去すべき培地が満たされた培養プレート001のウェル002に移動し、ウェルから培地を吸引して全量除去する（図10サブ工程3）。除去された培地は、廃液槽206に廃棄回収される。30

【0060】

次に、液体301を保持するチップ302を、吸引ノズルに取り付けられたチップヘッド204に、複数のチップが保管されているチップラック207から装着する。チップヘッドが常温薬液ラック209に移動し、バッファを吸引する（図10サブ工程4）。目的のウェルに移動し、バッファを添加した後（図10(a)サブ工程5）、チップヘッドがダストボックス214に移動し、チップを廃棄する。コンタミネーション等を防ぐため、取替え可能なチップをここでは利用するが、その限りではない。40

【0061】

吸引ヘッドは、バッファで満たされているウェルに移動し、バッファの除去を行う（図10(a)サブ工程6）。除去された培地は、廃液槽206に廃棄回収される。この工程を合計2回繰り返す（洗浄工程）（図10(a)サブ工程7）。

【0062】

次に、チップヘッド204にチップラック207内のチップを装着し、チップヘッドが常温薬液ラック209に移動し、バッファを吸引する（図9サブ工程8）。目的のウェルに移動し、バッファを添加した後、チップヘッドがダストボックス214に移動し、チッ50

プを廃棄する。37で10分間待機する(コンディショニング)(図10(a)サブ工程9)。その後、吸引ヘッド205が、バッファで満たされているウェルに移動し、バッファを全量除去する(図9(a)サブ工程10)。

【0063】

<サンプル調製：実施例1、2の工程2に相当>

チップヘッド204にチップラック207内のチップを装着し、チップヘッドが常温薬液ラック209に移動し、薬液を吸引する(図10(a)サブ工程11)。目的のウェルに移動し、薬液を添加した後(図10(a)サブ工程12)、チップヘッド204がダストボックス214に移動し、チップを廃棄する。37で30分間待機する(図10(a)サブ工程12)。その後、容器を保持する容器保持部の一構成例である、第一温調機能付きプレートホルダ210、および第二温調機能付きプレートホルダ211が37から4に変化した後(図10(a)サブ工程13)、吸引ヘッド205が、薬液で満たされているウェルに移動し、薬液を全量除去する(図10(a)サブ工程14)。

尚、本実施例における温度調整部は、プレートフォルダに温調機能を搭載する説明としたが、温度調節部が容器保持部と別離して存在しても良いことは言うまでもない。

【0064】

<サンプル調製：実施例1、2の工程3に相当>

チップヘッド204にチップラック207内のチップを装着し、チップヘッドが冷蔵薬液ラック208に移動し、バッファを吸引する(図10(a)サブ工程15)。冷蔵した薬液を用いるのは、トランスポータ活性のような能動的な生命現象を停止させるためであることは前述の通りである。冷蔵薬液ラック208はこの目的のため、薬液、バッファ等を低温に保持するためのものである。目的のウェルに移動し、バッファを添加した後(図10(a)サブ工程16)、チップヘッド204がダストボックス214に移動し、チップを廃棄する。吸引ヘッドがバッファで満たされているウェルに移動し、バッファを除去する(図10(a)サブ工程17)。除去された培地は、廃液槽206に廃棄される。この工程を合計3回繰り返す(洗浄工程)(図10(a)サブ工程18)。

【0065】

<サンプル調製：実施例1、2の工程4に相当>

第一温調機能付きプレートホルダ210、および第二温調機能付きプレートホルダ211が4から37に変化した後(図10(a)サブ工程19)、チップヘッド204にチップラック207内のチップを装着し、チップヘッドが冷蔵薬液ラック208に移動し、バッファを吸引する(図10(a)サブ工程20)。目的のウェルに移動し、バッファを添加した後(図10(a)サブ工程21)、チップヘッド204がダストボックス214に移動し、チップを廃棄する。37で30分間待機する(図10(a)サブ工程20)。その後、第一温調機能付きプレートホルダ210、および第二温調機能付きプレートホルダ211が37から4に変化した後(図10(a)サブ工程22)、チップヘッド204にチップラック207内のチップを装着し、薬剤を含むバッファで満たされたウェルに移動し、薬剤を含むバッファ(上清)を吸引し、第一プレートホルダ212、および第二プレートホルダ213上の回収用の回収プレートに分注する(回収)(図10(a)サブ工程23)。

【0066】

<サンプル調製：実施例1、2の工程5に相当>

第一温調付きプレートホルダ210が4から37に変化した後(図10(a)サブ工程24)、チップヘッド204にチップラック207内のチップを装着し、チップヘッドが常温薬液ラック(209)に移動し、EGAを含むバッファを吸引する(図10(a)サブ工程24)。第一プレートホルダ212上の試験区1用のウェルに移動し、EGAを含むバッファを添加した後(図10(b)サブ工程25)、チップヘッド204がダストボックス214に移動し、チップを廃棄する。37で30分間待機する(図10(b)サブ工程26)。

【0067】

10

20

30

40

50

チップヘッド 204 にチップラック 207 内のチップを装着し、チップヘッドが常温薬液ラック 209 に移動し、バッファを吸引する（図 10(b) サブ工程 27）。第一プレートホルダ 212 上の試験区 2 用のウェルに移動し、バッファを添加した後（図 10(b) サブ工程 28）、チップヘッド 204 がダストボックス 214 に移動し、チップを廃棄する。37 で 30 分間待機する（図 10(b) サブ工程 28）。

【0068】

チップヘッド 204 にチップラック 207 内のチップを装着し、チップヘッドが冷蔵薬液ラック 209 に移動し、バッファを吸引する（図 10(b) サブ工程 29）。

【0069】

第二プレートホルダ 213 上の試験区 3 用のウェルに移動し、バッファを添加した後（図 10(b) サブ工程 30）、チップヘッド 204 がダストボックス 214 に移動し、チップを廃棄する。4 で 30 分間待機する（図 10(b) サブ工程 30）。

【0070】

チップヘッド 204 にチップラック 207 内のチップを装着し、薬剤を含む E G T A バッファで満たされたウェルに移動し、薬剤を含む E G T A バッファ（上清）を吸引し、第一プレートホルダ 212 上の回収用の回収プレートに分注（回収）する（図 10(b) サブ工程 31）。

【0071】

チップヘッド 204 にチップラック 207 内のチップを装着し、薬剤を含むバッファで満たされたウェルに移動し、薬剤を含むバッファ（上清）を吸引し、第一プレートホルダ 212 上の回収用の回収プレートに分注（回収）する（図 10(b) サブ工程 32）。

【0072】

チップヘッド 204 にチップラック 207 内のチップを装着し、薬剤を含む E G T A バッファで満たされたウェルに移動し、薬剤を含むバッファ（上清）を吸引し、第一プレートホルダ 213 上の回収用の回収プレートに分注する（回収）する（図 10(b) サブ工程 33）。

【0073】

第一温調機能付きプレートホルダ 210、および第二温調機能付きプレートホルダ 211 がともに室温に変化した後（図 10(b) サブ工程 34）、チップヘッド 204 にチップラック 207 内のチップを装着し、チップヘッドが常温薬液ラック 209 に移動し、1% Triton X-100 あるいは、純水/メタノールを吸引する（図 10(b) サブ工程 35）。第一温調機能付きプレートホルダ（210）、および第二温調機能付きプレートホルダ 211 上の試験区 1、2、3 用のウェルに移動し、1% Triton X-100 あるいは、純水/メタノールを添加した後（図 10(b) サブ工程 36）、チップヘッド 204 がダストボックス 214 に移動し、チップを廃棄する。

【0074】

チップヘッド 204 にチップラック 207 内のチップを装着し、上記試薬で満たされたウェルに移動し、細胞懸濁液を全量吸引し、第一プレートホルダ 212 および、第二プレートホルダ 213 上の回収用の回収プレートに分注する（回収）（図 10(b) サブ工程 37）。

【0075】

上記装置の動作は、実施例 1、2 の試験区 1～3 の夫々工程における動作を順次実施した場合について述べたが、各工程は順番で行ってもよいし、各工程を並行して実施してもよい。

【0076】

<サンプル調製部から測定部への移送>

培養プレートの回収された薬剤は、測定部に移送される（図 10(b) サブ工程 38）。測定部において、プレートリーダ、あるいは L C M S による薬剤の測定がおこなわれる（図 10(b) サブ工程 39）。

【0077】

10

20

30

40

50

<解析部による分配比率とスコアの算出および結果の表示>

測定結果から各画分への分配比率とスコアを算出する(図10(b)サブ工程40)。その後、得られた算出値を表示部に表示する(図10(b)サブ工程41)。

【0078】

以上、実施例1～3にて説明した構成について、あくまで一例として挙げると、例えば以下のようになる。

【0079】

<構成1>

所定の細胞を保持する複数の容器を保持する保持部と、前記複数の容器内の温度を調整する温度調整部と、前記複数の容器内の成分を測定し、当該測定した前記成分を解析する分析部と、を備え、10

前記複数の容器は、少なくとも第1容器、第2容器であって、前記第1容器内及び前記第2容器は、夫々第1バッファ液を保持し、前記温度調整部は、前記第1容器内の温度と、前記第2容器内の温度とが異なる温度となるように調整し、前記分析部は、前記第1容器内の細胞から、前記第1容器内の前記第1バッファ液へ排出された成分の量と、前記第2容器内の細胞から、前記第2容器内の前記第1バッファ液へ排出された成分の量と、を測定し、前記細胞のトランスポータを介して排出される前記成分の量を解析することを特徴とする成分分析装置である。

【0080】

<構成2>

前記所定の細胞は肝細胞であって、前記複数の容器は、少なくとも前記第1容器、前記第2容器、及び第3容器であって、前記第3容器内に、所定の物質が添加された第2バッファ液が保持され、20

前記温度調整部は、前記第1容器内及び前記第3容器内の第1温度よりも、前記第2容器内の第2温度の方が低くなるように調整し、前記分析部は、前記第1容器内の肝細胞から、前記第1容器内の前記第1バッファ液へ排出された成分の量と、前記第2容器内の肝細胞から、前記第2容器内の前記第1バッファ液へ排出された前記成分の量と、前記第3容器内の肝細胞から、前記第3容器内の前記第2バッファ液へ排出された前記成分の量と、を測定し、前記肝細胞のトランスポータを介して排出される前記成分の量と、前記肝細胞の毛細胆管を介して排出される前記成分の量と、前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記成分の量と、を解析することを特徴とする構成1記載の成分分析装置である。30

【0081】

<構成2>

前記複数の容器内の液体を供給または回収する送液部をさらに有し、前記送液部は、前記複数の容器に前記成分を含む成分溶液を供給し、前記成分溶液を回収した後、第3バッファ液を前記複数の容器内に供給し、前記第3バッファ液を回収した後、前記第1容器及び前記第2容器に前記第1バッファ液を供給し、前記第3容器に前記第2バッファ液を供給し、前記分析部は、前記複数の培養容器の何れかに保持された前記肝細胞から、前記第3バッファ液内へ排出された成分の量を測定することを特徴とする構成2記載の成分分析装置である。40

【0082】

<構成4>

前記第3バッファ液と前記第1バッファ液は、同一種のバッファ液であることを特徴とする構成3記載の成分分析装置である。

【0083】

<構成5>

前記温度調整部は、前記第1温度よりも、前記第3バッファ液を保持しているときの前記複数の容器内のうち少なくとも一つの容器内の温度の方が低くなるように温度を調整することを特徴とする請構成3記載の成分分析装置である。50

【0084】

<構成6>

前記分析部は、前記第3容器内の肝細胞内に残留している前記成分の量と、前記第1容器または前記第2容器のうち少なくとも一つの容器内の肝細胞に残留している成分の量と、を測定し、前記肝細胞の毛細胆管以外に残留する前記成分の量を解析することを特徴とする請求項1記載の成分分析装置である。

【0085】

<構成7>

薬剤を吸収した肝細胞を保持する複数の容器を保持する保持部と、前記複数の容器内の液体を供給する送液部と、前記複数の容器内の温度を調整する温度調整部と、前記複数の容器内の薬剤の量を測定し、当該測定した薬剤を解析する分析部と、を備え、前記複数の容器は、第1容器、第2容器及び第3容器であって、前記送液部は、前記第1容器及び前記第2容器に、第1バッファ液を供給し、前記第3容器に、前記肝細胞の毛細胆管から前記薬剤が排出されることを促す第2バッファ液を供給し、前記温度調整部は、前記第1容器内及び前記第3容器内の温度よりも、前記第2容器内の温度の方が低くなるように温度を調整し、前記分析部は、前記第1容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第2容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第3容器内の肝細胞から前記第2バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、

前記肝細胞のトランスポータから排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞の毛細胆管から排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記成分の量と、を夫々解析することを特徴とする薬剤成分分析装置である。

【0086】

<構成8>

薬剤を吸収した肝細胞を保持する複数の容器を保持する保持部と、前記複数の容器内の液体を供給または排出する送液部と、前記複数の容器内の温度を調整する温度調整部と、前記複数の容器内の薬剤の量を測定し、当該測定した薬剤を解析する分析部と、を備え、前記送液部は、前記複数の容器に、前記薬剤を供給し、前記薬剤を前記複数の容器から排出した後、前処理用バッファ液を供給し、前記前処理用バッファ液を前記複数の容器から回収した後、前記複数の培養容器のうち、前記第1容器及び前記第2容器に、第1バッファ液を供給し、前記第3容器に、前記肝細胞の毛細胆管から前記薬剤が排出されることを促す第2バッファ液を供給し、前記温度調整部は、前記第1容器内及び前記第3容器内の第1温度よりも、前記第2容器内の第2温度の方が低くなるように温度を調整し、

前記分析部は、前記複数の容器内の肝細胞から前記前処理用バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第1容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第2容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第3容器内の肝細胞から前記第2バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記肝細胞を前処理する段階で前記肝細胞から排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞のトランスポータから排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞の毛細胆管から排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記薬剤の量と、を夫々解析することを特徴とする薬剤成分分析装置である。

【0087】

<構成9>

前記前処理用バッファ液と前記第1バッファ液は、同一種のバッファ液であることを特徴とする構成8記載の薬剤成分分析装置である。

【0088】

<構成10>

前記温度調整部は、前記前処理用バッファ液を保持しているときの、前記複数の容器内のうち少なくとも一つの容器内の温度よりも、前記第1温度の方が高くなるように温度を調整することを特徴とする構成8記載の薬剤成分分析装置である。

10

20

30

40

50

【0089】

<構成11>

前記分析部は、前記第3容器内の肝細胞内に残留している前記成分の量と、前記第1容器または前記第2容器のうち少なくとも一つの容器内の肝細胞に残留している成分の量と、を測定し、前記肝細胞の毛細胆管以外に残留する前記成分の量を解析することを特徴とする構成7から10迄の記載の薬剤成分分析装置である。

【0090】

<構成12>

所定の細胞を保持する第1容器内の温度よりも、前記所定の細胞を保持する第2容器内の温度の方が低くなるように温度を調整する温調工程と、前記第1容器内の細胞から、前記第1容器内の前記第1バッファ液へ排出された成分の量と、前記第2容器内の細胞から、前記第2容器内の前記第1バッファ液へ排出された成分の量と、を測定する測定工程と、前記測定工程によって測定した結果に基づいて、前記細胞のトランスポータを介して排出される前記成分の量を解析する解析工程と、を有することを特徴とする成分分析方法である。

10

【0091】

<構成13>

前記細胞は肝細胞であって、前記肝細胞が保持された前記第3容器内に、所定の物質が添加された第2バッファ液が保持されており、前記温調工程において、前記第1容器内及び前記第3容器内の第1温度よりも、前記第2容器内の第2温度の方が低くなるように調整し、前記測定工程において、前記第1容器内の肝細胞から、前記第1容器内の前記第1バッファ液へ排出された成分の量と、前記第2容器内の肝細胞から、前記第2容器内の前記第1バッファ液へ排出された前記成分の量と、前記第3容器内の肝細胞から、前記第3容器内の前記第2バッファ液へ排出された前記成分の量と、を測定し、前記解析工程において、前記肝細胞のトランスポータを介して排出される前記成分の量と、前記肝細胞の毛細胆管を介して排出される前記成分の量と、前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記成分の量と、を夫々解析することを特徴とする構成12記載の成分分析方法である。

20

【0092】

<構成14>

30

前記温調工程よりも前に、少なくとも前記第1容器、前記第2容器、及び前記第3容器を含む複数の容器内の液体を供給または回収する送液工程をさらに有し、前記送液工程において、前記複数の容器に前記成分を含む成分溶液を供給し、前記成分溶液を回収した後、第3バッファ液を前記複数の容器内に供給し、前記第3バッファ液を回収した後、前記第1容器及び前記第2容器に前記第1バッファ液を供給し、前記第3容器に前記第2バッファ液を供給し、前記測定工程において、前記複数の培養容器の少なくとも一つに保持された前記肝細胞から、前記第3バッファ液内へ排出された成分の量を解析することを特徴とする構成13記載の成分分方法である。

【0093】

<構成15>

40

前記第3バッファ液と前記第1バッファ液は、同一種のバッファ液であることを特徴とする構成14記載の成分分析方法である。

【0094】

<構成16>

前記温調工程よりも前に、前記第1温度よりも、前記前記第3バッファ液を保持しているときの前記複数の容器内のうち少なくとも一つの容器内の温度の方が低くなるように温度を調整する前処理温調工程を有することを特徴とする構成14記載の成分分析方法である。

【0095】

<構成17>

50

薬剤を吸収した肝細胞を保持する複数の容器に、液体を供給する送液工程と、前記複数の容器内の温度を調整する温調工程と、前記複数の容器内の薬剤の量を測定する測定工程と、前記測定工程において測定した薬剤を解析する解析工程と、を備え、前記複数の容器は、第1容器、第2容器及び第3容器であって、前記送液工程において前記第1容器及び前記第2容器に、第1バッファ液を供給し、前記第3容器に、前記肝細胞の毛細胆管から前記薬剤が排出されることを促す第2バッファ液を供給し、前記温調工程において、前記第1容器内及び前記第3容器内の温度よりも、前記第2容器内の温度の方が低くなるように温度を調整し、前記計測工程において、前記第1容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第2容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第3容器内の肝細胞から前記第2バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第3容器内の肝細胞内に残留している前記成分の量と、前記第1容器または前記第2容器のうち少なくとも一つの容器内の肝細胞に残留している成分の量と、を測定し、前記解析工程において、前記肝細胞のトランスポータから排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞の毛細胆管から排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞の毛細胆管以外に残留する前記成分の量と、を夫々解析することを特徴とする薬剤成分分析方法である。
10

【0096】

<構成18>

薬剤を吸収した肝細胞を保持する複数の容器内の液体を供給または排出する送液工程と、前記複数の容器内の温度を調整する温調工程と、前記複数の容器内の薬剤の量を測定する測定工程と、前記測定工程によって測定した薬剤を解析する解析工程と、を備え、前記送液工程において、前記複数の容器に、前記薬剤を供給し、前記薬剤を前記複数の容器から排出した後、前処理用バッファ液を供給し、前記前処理用バッファ液を前記複数の容器から回収した後、前記複数の培養容器のうち、前記第1容器及び前記第2容器に、第1バッファ液を供給し、前記第3容器に、前記肝細胞の毛細胆管から前記薬剤が排出されることを促す第2バッファ液を供給し、前記温調工程において、前記第1容器内及び前記第3容器内の第1温度よりも、前記第2容器内の第2温度の方が低くなるように温度を調整し、前記測定工程において、前記複数の容器内の肝細胞から前記前処理用バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第1容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第2容器内の肝細胞から前記第1バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第3容器内の肝細胞から前記第2バッファ液内に排出された前記薬剤の量と、前記第3容器内の肝細胞内に残留している前記成分の量と、前記第1容器または前記第2容器のうち少なくとも一つの容器内の肝細胞に残留している成分の量と、を測定し、前記解析工程において、前記肝細胞を前処理する段階で前記肝細胞から排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞のトランスポータから排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞の毛細胆管から排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞のトランスポータ及び毛細胆管以外から排出される前記薬剤の量と、前記肝細胞の毛細胆管以外に残留する前記成分の量と、を夫々解析することを特徴とする薬剤成分分析方法である。
20
30

【0097】

<構成19>

前記前処理用バッファ液と前記第1バッファ液は、同一種のバッファ液であることを特徴とする構成18記載の成分分析方法である。

【0098】

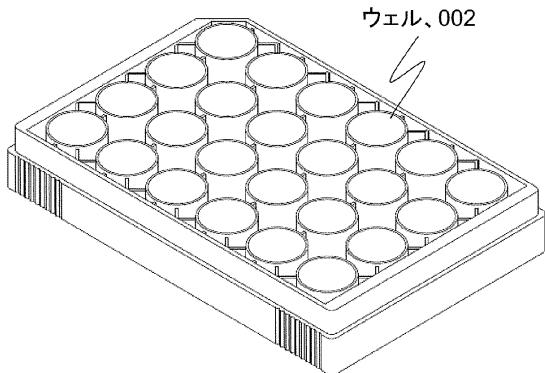
<構成20>

前記温調工程より前に、前記前処理用バッファ液を保持しているときの、前記複数の容器内のうち少なくとも一つの容器内の温度よりも、前記第1温度の方が高くなるように温度を調整する前処理温調工程を有することを特徴とする請求項18記載の薬剤成分分析方法である。
40

【図1】

図1

培養プレート、001



【図2】

図2

	工程0	工程1	工程2	工程3	工程4	工程5	工程6
プレート温度	37°C	37°C	37°C→4°C	4°C	37°C→4°C	(試験区ごとに異なる)	室温
【試験区1】 37°C崩壊系						EGTAを含むハンクス液を添加し、30分経過後に上清を回収。 (蛍光測定)1% Triton-X-100溶液を添加し、セルライゼーターを全量回収。	
【試験区2】 37°C維持系	培養		ハンクス液で2回細胞洗浄後、ハンクス液で10分コンディショニング。その後、ハンクス液を除く。	薬液投与し30分経過後、ブレードを4°Cにして薬液を除く。	氷冷したハンクス液で3回洗浄する。	ハンクス液を添加し、30分間経過後に、ブレードを4°Cにし、上清を回収。	ハンクス液を添加し、(LC/MS解析)メタノールを添加してセルライゼーターを全量回収。
【試験区3】 4°C維持系						ハンクス液を添加し30分経過後に上清を回収。	

【図3】

図3

	工程4	工程5	工程6	イメージ図
【試験区1】 37°C崩壊系	S1 血管側排出 I 括散(1)+TP(2)	S1 胆管側排出(3) + 血管側排出 II 括散(1)+TP(2)	S1 細胞内残留(4)	
【試験区2】 37°C維持系	S2 血管側排出 I 括散(1)+TP(2)	S2 血管側排出 II 括散(1)+TP(2)	S2 細胞内残留(4) + 胆管側排出(3)	
【試験区3】 4°C維持系	S3 血管側排出 I 括散(1)+TP(2)	S3 血管側排出 II 括散(1)	S3 細胞内残留(4) + 胆管側排出(3)	

ウェルは異なるが実験内容は同一 (S1=S2=S3) 相対値算出のために実測必要

$$\text{パターン1} \quad S1 + S2 = (1) + (2) + (3) + (4) \Rightarrow 100\%$$

$$\text{パターン2} \quad S1 + S2 + S3 = (1)' + (2)' + (1) + (2) + (3) + (4) \Rightarrow 100\%$$

【図4】

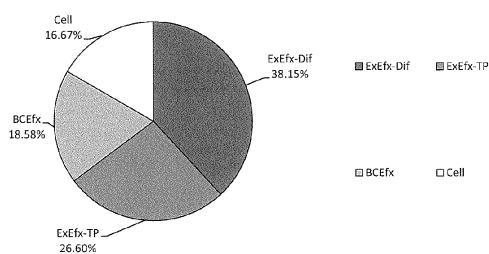
図4

工程	定義	パターン1	パターン2	画分	対応付け
4	第一血管側排出画分 (1)' + (2)'			70.82	Sup S1
5	胆管側排出・第二血管側排出画分 (1)+(2)+(3)			24.32	B1
	第二血管側排出画分 (1)+(2)			18.90	B2
	第二血管側排出画分(括散のみ) (1)	38.15	11.13	ExEfx-Dif	B3
	第二血管側排出画分(TP経由のみ) (2)	26.60	7.76	ExEfx-TP	B2-B3
	胆管側排出画分 (3)	18.58	5.42	BCEfx	B1-B2
6	細胞内残留画分 (4)	16.67	4.86	Cell C1	
	胆管側排出画分・細胞内残留画分 (3)+(4)	30.88	9.01		C2
Total		100.00	100.00		

【図5】

図5

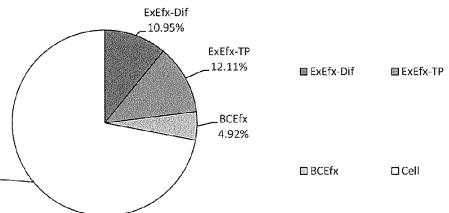
パターン1の円グラフ: 10 uM CDF



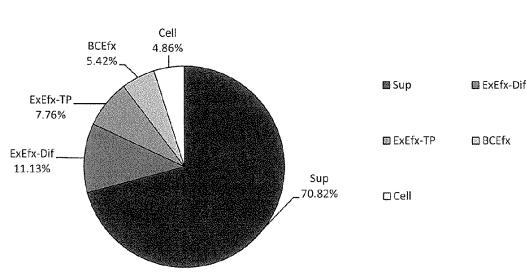
【図6】

図6

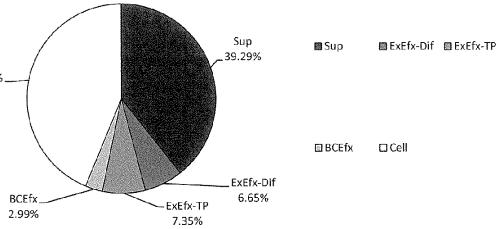
パターン1の円グラフ: 10 uM Rhodamine 123



パターン2の円グラフ: 10 uM CDF

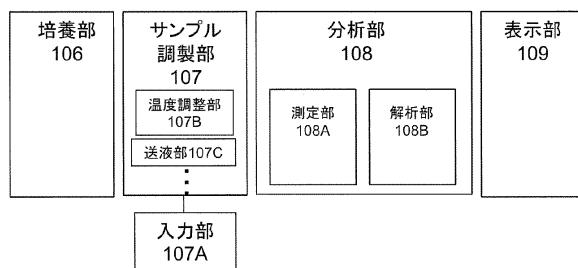


パターン2の円グラフ: 10 uM Rhodamine 123



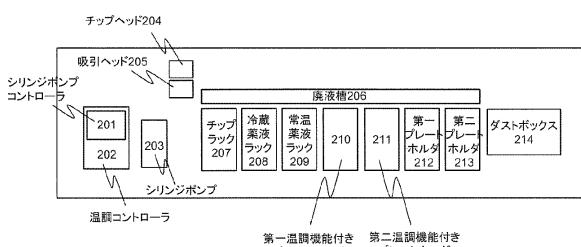
【図7】

図7

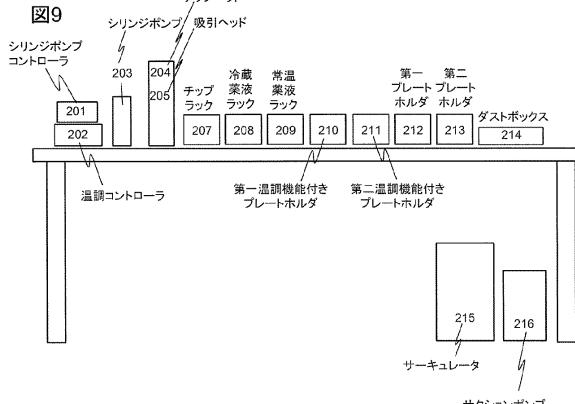


【図8】

図8



【図9】



【図10(a)】

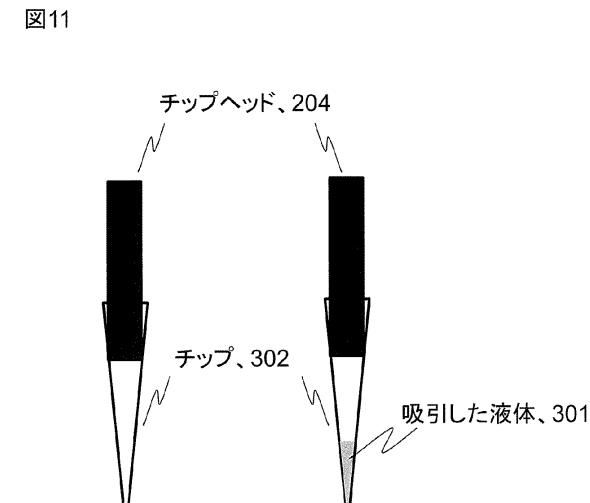
図10(a)

工程番号	サブ工程番号	操作	プレート温度
0	1	細胞の培養	37°C
-	2	細胞が保持された培養プレートを培養部からサンプル調製部に移動し、サンプル調製部にプレートをセット	37°C
1	3	セットされた培養プレートから培地を除去	37°C
1	4	薬液ラックからバッファを吸引	37°C
1	5	培養プレートの各ウェルにバッファを添加	37°C
1	6	培養プレートの各ウェルからバッファを除去	37°C
1	7	4-6を計2回繰り返す	37°C
1	8	薬液ラックからバッファを吸引	37°C
1	9	培養プレートにバッファを添加し、10分間コンディショニング	37°C
1	10	培養プレートの各ウェルからバッファを除去	37°C
2	11	薬液ラックから薬液を吸引	37°C
2	12	培養プレートに薬液を添加し、30分間インキュベーション	37°C
2	13	培養プレートフォルダを37°Cから4°Cに変化	37°C→4°C
2	14	培養プレートの各ウェルから薬液を除去	4°C
3	15	薬液ラックから4°Cに調整したバッファを吸引	4°C
3	16	培養プレートの各ウェルにバッファを添加	4°C
3	17	培養プレートの各ウェルからバッファを除去	4°C
3	18	13-15を計3回繰り返す	4°C
-	19	培養プレートフォルダを4°Cから37°Cに変化	4°C→37°C
4	20	薬液ラックからバッファを吸引	37°C
4	21	培養プレートにバッファを添加し、30分間インキュベーション	37°C
4	22	培養プレートフォルダを37°Cから4°Cに変化	37°C→4°C
4	23	培養プレートの各ウェルから上清を、別のマルチウェルプレートに回収	4°C
-	24	培養プレートフォルダを4°Cから37°Cに変化	4°C→37°C

【図10(b)】

工程番号	サブ工程番号	操作	プレート温度
5	25	【試験区1用のウェル】 薬液ラックからEGTAを含むバッファを吸引	37°C
5	26	【試験区1用のウェル】 培養プレートにEGTAを含むバッファを添加し、30分間インキュベーション	37°C
5	27	【試験区2用のウェル】 薬液ラックからバッファを吸引	37°C
5	28	【試験区2用のウェル】 培養プレートにバッファを添加し、30分間インキュベーション	37°C
5	29	【試験区3用のウェル】 薬液ラックからバッファを吸引	4°C
5	30	【試験区3用のウェル】 培養プレートにバッファを添加し、30分間インキュベーション	4°C
5	31	【試験区1用のウェル】 試験区1用のウェルから上清を、別のマルチウェルプレートに回収	37°C
5	32	【試験区2用のウェル】 試験区2用のウェルから上清を、別のマルチウェルプレートに回収	37°C
5	33	【試験区3用のウェル】 試験区1用のウェルから上清を、別のマルチウェルプレートに回収	4°C
-	34	培養プレートフォルダを37°C/4°Cから室温に変化	37°C/4°C →室温
6	35	薬液ラックから1%TritonX-100、あるいは純水/メタノールを吸引	室温
6	36	1%TritonX-100、あるいは純水/メタノールを添加	室温
6	37	細胞懸濁液を全量回収	室温
-	38	薬液を回収したプレートを測定部に移動	-
-	39	プレートリーダあるいはLCMSによる測定	-
-	40	計測結果から各画分分配比率およびスコアを算出	-
-	41	算出値を表示部に表示	-

【図11】



フロントページの続き

(72)発明者 清水 祐輔

東京都港区西新橋1丁目24番14号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内

(72)発明者 市川 久詞

東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内

審査官 森井 文緒

(56)参考文献 特表2003-502016(JP,A)

国際公開第2012/121261(WO,A1)

米国特許出願公開第2001/0019846(US,A1)

吉田健太ほか, Sandwich培養肝細胞を用いた薬物の胆汁排泄に関するトランスポーターの寄与率の算定, 薬理と治療, 2009年, vol.37, suppl.1, S53-S58, 全体、図2、S-54右欄 - S-55左欄、I対象と手法

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 M 1 / 00 - 3 / 00

C 12 Q 1 / 02

G 01 N

P u b M e d

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

W P I D S / W P I X (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)