

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年7月20日(20.07.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/136229 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/02 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)
C12N 5/077 (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/000252

(22) 国際出願日: 2023年1月10日(10.01.2023)

(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 2022-002556 2022年1月11日(11.01.2022) JP
特願 2022-104613 2022年6月29日(29.06.2022) JP

(71) 出願人: 三井化学株式会社 (MITSUI CHEMICALS, INC.) [JP/JP]; 〒1057122 東京都港区東新橋一丁目5番2号 Tokyo (JP). 株式会社マイオリッジ (MYORIDGE CO. LTD.) [JP/JP]; 〒6068305 京都府京都市左京区吉田

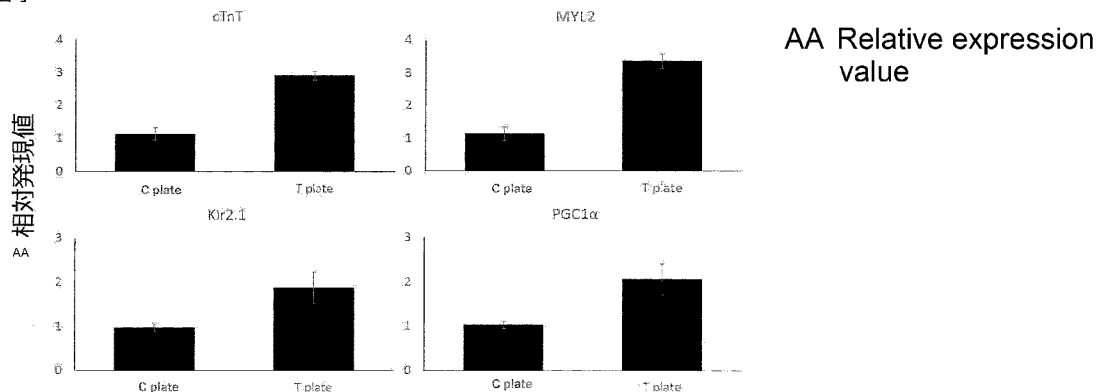
河原町14番地 公益財団法人京都技術科学センター本館B5号室 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 矢内 久陽 (YANAI Hisaaki); 〒2970017 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). ▲高▼橋 淳 (TAKAHASHI Jun); 〒2970017 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 西條 任信 (SAIJO Yoshinobu); 〒2970017 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 角田 徹 (SUMITA Toru); 〒2970017 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 江刺 家勝弘 (ESASHIKA Katsuhiko); 〒2990265 千葉県袖ヶ浦市長浦580-32 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 宮廻 寛 (MIYASAKO Hiroshi); 〒2970017 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 石田 賢太郎 (ISHIDA Kentaro); 〒6068305 京都府京都市左京区吉田河原町14番地 公益財団法人京都技術科学センター本館B5号室 Kyoto (JP). 田中 有香 (TANAKA Yuka); 〒6068305 京都府京都市左京

(54) Title: METHOD FOR EVALUATING ACTION OF DRUG ON CARDIOMYOCYTES

(54) 発明の名称: 薬剤の、心筋細胞に対する作用を評価する方法

[図1]



(57) Abstract: One aspect of the present invention relates to a method for evaluating an action on cardiomyocytes, the method for evaluating the action of a drug on cardiomyocytes comprising a step (A) for seeding cardiomyocytes on the culture surface of a culture vessel, a step (B) for culturing the cardiomyocytes obtained in step (A), a step (D) for exposing the cultured cardiomyocytes to the drug, and a step (E) for analyzing and evaluating indicators of cell function of the cardiomyocytes obtained in step (D), at least part of the culture surface of the culture vessel being formed from a base material containing a 4-methyl-1-pentene polymer.

区吉田河原町 1 4 番地 公益財団法人京都技術
科学センター本館 B 5 号室 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人エスエス国際特許事務所 (SSINPAT PATENT FIRM); 〒1410031 東京都品川区西五反田七丁目 1 3 番 6 号 五反田山崎ビル 6 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

(57) 要約: 本発明の一態様は、心筋細胞に対する作用を評価する方法に関し、該方法は、薬剤の、心筋細胞に対する作用を評価する方法であって、培養容器の培養面に心筋細胞を播種する工程 (A)、前記工程 (A) で得られた心筋細胞を培養する工程 (B)、前記培養された心筋細胞を前記薬剤に曝露させる工程 (D)、及び前記工程 (D) で得られた心筋細胞の細胞機能の指標を分析して評価する工程 (E) を含み、前記培養容器の培養面の少なくとも一部が 4-メチル-1-ペンテン重合体を含む基材から形成されている、方法。

明 細 書

発明の名称： 薬剤の、心筋細胞に対する作用を評価する方法

技術分野

[0001] 本発明の一態様は、薬剤の、心筋細胞に対する作用を評価する方法に関する。

背景技術

[0002] 新薬の候補薬剤は、*in vitro*試験系により、期待される作用（主作用）の有無を評価され、効果の高いものだけが次の開発過程に進む。そのため、*in vitro*試験系は、薬剤の濃度が低くてもその作用を検出でき、また偽陽性の検出が少ないことが重要である。

臨床開発まで進んだ薬剤は、深刻な副作用が見つかり、新薬としての開発が中止となり得る。心毒性（特に、致死性の不整脈）は、肝毒性及び神経毒性と共に最も深刻な副作用である。また、上市された薬剤の中でも、循環器薬領域の薬剤ばかりではなく、抗アレルギー薬、消化器治療薬、抗菌薬などが、心毒性の発生により市場から撤退していることも少なくない。従って、創薬の初期段階において、薬剤の主作用を検出するだけでなく、心毒性も評価することが必要とされている。

[0003] 近年、人工多能性幹細胞（iPS細胞）から分化誘導したヒト心筋細胞を用いて、薬剤の主作用及び心毒性を評価する手法が開発されている。例えば、非特許文献1は、iPS細胞から分化誘導した心筋細胞を、トリプシン溶液で処理した後、心筋細胞用の培養液に播種し、培養することで、拍動するシート状の心筋細胞を作成し、得られたシート状の心筋細胞を一定の濃度範囲の薬剤に曝露し、心筋細胞の電気生理学的変化を細胞外電位記録によって測定することを開示する。また、特許文献1には、心筋細胞に対する酸素供給量を高めるための構成により、心筋細胞への酸素供給速度を高めて行う、心筋細胞の薬剤応答性試験方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2019/131806号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Pharmacol Toxicol Methods. 2017 Mar-Apr; 84:111-127. doi:10.1016/j.vascn.2016.12.003. Epub, 2016, Dec 10.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明者らは、創薬の初期段階において安全性の高い化合物を効率よく選択するためには、薬剤の主作用を検出するだけでなく、心毒性を精度良く評価し得る *in vitro* 試験系の構築が重要な課題であると考えた。

従来の *in vitro* 試験系では、薬剤によっては、心筋細胞に対する作用を評価できないことがあった。例えば、ある種の薬剤は、薬剤の濃度が低いとその作用が検出されず、また、薬剤の濃度が高いと心筋細胞の拍動が停止してしまい、*in vitro* 試験系では検出が難しかった。ペプリジルの催不整脈作用がこの例である。また、薬剤の濃度を高くしないと、心筋細胞に対する作用を検出できない等、感度が十分に高くない場合もあった。さらに、非特異的な作用も検出してしまうなど、偽陽性を多く検出する場合もあった。

本発明の一態様は、薬剤の、心筋細胞に対する作用を精度良く評価することができる方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した。その結果、以下の構成を有することにより上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明の態様は、例えば以下の〔1〕～〔17〕に関する。

〔１〕 薬剤の、心筋細胞に対する作用を評価する方法であって、
培養容器の培養面に心筋細胞を播種する工程（Ａ）、
前記工程（Ａ）で得られた心筋細胞を培養する工程（Ｂ）、
前記培養された心筋細胞を前記薬剤に曝露させる工程（Ｄ）、及び
前記工程（Ｄ）で得られた心筋細胞の細胞機能の指標を分析して評価する
工程（Ｅ）を含み、

前記培養容器の培養面の少なくとも一部が４－メチルー１－ペンテン重合
体を含む基材から形成されている、方法。

〔２〕 前記工程（Ｂ）で得られた心筋細胞をさらに培養する工程（Ｃ）を
含み、

前記工程（Ｃ）及び（Ｄ）が、遊離脂肪酸１～１００ μ ｇ／ｍＬを含有す
る培地（ β ）中で行われる、〔１〕に記載の方法。

〔３〕 前記培地（ β ）が、更に、リゾホスファチジルコリン１～１００ μ
ｇ／ｍＬ、トリアシルグリセリド１～１００ μ ｇ／ｍＬ、ホスファチジルコ
リン１～１００ μ ｇ／ｍＬ、ホスファチジン酸１～１００ μ ｇ／ｍＬ、コレ
ステロール０．１～１０ μ ｇ／ｍＬ、及びスフィンゴミエリン０．１～１０
 μ ｇ／ｍＬから選ばれる少なくとも１種を含有する、〔２〕に記載の方法。

〔４〕 前記工程（Ａ）及び（Ｂ）が、代替血清を含有する無血清培地（ α
）中で行われる、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の方法。

〔５〕 前記４－メチルー１－ペンテン重合体が、４－メチルー１－ペンテ
ンとエチレン及び炭素数３～２０の α －オレフィン（４－メチルー１－ペン
テンを除く）から選ばれる少なくとも１種のオレフィンとの共重合体である
、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の方法。

〔６〕 前記培養容器の培養面全体が、４－メチルー１－ペンテン重合体を
含む基材から形成されている、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の方法。

〔７〕 前記培養面が、ラミニンを含むコーティング剤でコートされている
、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の方法。

〔８〕 前記心筋細胞が、人工多能性幹細胞を分化させた心筋細胞である、

〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の方法。

〔９〕 前記心筋細胞が、人工多能性幹細胞をプロテインフリー心筋分化誘導（ＰＦＣＤ）法により分化させた心筋細胞である、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の方法。

〔１０〕 前記作用が、心毒性である、〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の方法。

〔１１〕 前記心毒性が、催不整脈作用である、〔１０〕に記載の方法。

〔１２〕 前記心毒性が、心筋傷害作用である、〔１０〕に記載の方法。

〔１３〕 前記細胞機能の指標が、ミトコンドリア機能の指標である、〔１２〕に記載の方法。

〔１４〕 前記細胞機能の指標が、カルシウムイオン波形である、〔１〕～〔１１〕のいずれかに記載の方法。

〔１５〕 前記工程（Ｅ）において、早期後脱分極（ＥＡＤ）を検出する、〔１〕～〔１１〕、〔１４〕のいずれかに記載の方法。

〔１６〕 前記作用が、頻脈作用又は徐脈作用である、〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の方法。

〔１７〕 前記細胞機能の指標が、カルシウムイオン波形である、〔１６〕に記載の方法。

発明の効果

[0008] 本発明の一態様によれば、薬剤の、心筋細胞に対する作用を精度良く評価することができる。より具体的には、本発明の一態様によれば、低濃度でも薬剤の作用を評価することができる。また、本発明の一態様によれば偽陽性を減らすことができる。本発明の一態様によれば、ｉＰＳ細胞由来の心筋細胞等を用いた従来の *in vitro* 試験系では検出が難しいとされていた薬剤の作用を検出できる。

図面の簡単な説明

[0009] [図１]図１は、Ｃプレート又はＴプレートを用いた場合における、*cTnT*、*MYL2*、*Kir2.1*、*PGC1 α* の発現量を比較した結果を示す。

[図2]図2は、0.1% DMSOを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図3]図3は、1 μ Mベプリジルを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。図中の矢印は、EAD様波形を示す。

[図4]図4は、図3のカルシウムイオン波形におけるEAD様波形を拡大して示す。

[図5]図5は、2 μ Mベプリジルを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図6]図6は、4 μ Mベプリジルを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図7A]図7Aは、Tプレートに11.1 μ Mペンタミジンを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。添加前 (p r e)、添加10分後 (10 m i n)、添加24時間後 (24 h)、添加48時間後 (48 h) の結果を示す。

[図7B]図7Bは、Cプレートに11.1 μ Mペンタミジンを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。添加前 (p r e)、添加10分後 (10 m i n)、添加24時間後 (24 h)、添加48時間後 (48 h) の結果を示す。

[図8A]図8Aは、Tプレートに33.3 μ Mペンタミジンを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。添加前 (p r e)、添加10分後 (10 m i n)、添加24時間後 (24 h)、添加48時間後 (48 h) の結果を示す。

す。

[図8B]図8Bは、Cプレートに33.3 μ Mペンタミジンを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。添加前(p r e)、添加10分後(10 m i n)、添加24時間後(24 h)、添加48時間後(48 h)の結果を示す。

[図9A]図9Aは、Tプレートに100 μ Mペンタミジンを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。添加前(p r e)、添加10分後(10 m i n)、添加24時間後(24 h)、添加48時間後(48 h)の結果を示す。

[図9B]図9Bは、Cプレートに100 μ Mペンタミジンを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。添加前(p r e)、添加10分後(10 m i n)、添加24時間後(24 h)、添加48時間後(48 h)の結果を示す。

[図10]図10は、20 nMイソプロテレノールを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図11]図11は、100 nMイソプロテレノールを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図12]図12は、500 nMイソプロテレノールを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図13]図13は、Gプレート、Tプレート、Vプレートを用いて、心筋細胞を顕微鏡で観察した写真である。上段は明視野で観察した写真であり、下段は蛍光顕微鏡でGCaMPの蛍光を観察した写真である。上限、下段共に、

対物倍率は4倍である。

[図14]図14は、Tプレートを用いて、0.1%DMSOを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図15]図15は、Gプレートを用いて、0.1%DMSOを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図16]図16は、Tプレートを用いて、0.06 μ Mベプリジルを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図17]図17は、Gプレートを用いて、0.06 μ Mベプリジルを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図18]図18は、Tプレートを用いて、0.25 μ Mベプリジルを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図19]図19は、Gプレートを用いて、0.25 μ Mベプリジルを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図20]図20は、Tプレートを用いて、1 μ Mベプリジルを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図21]図21は、Gプレートを用いて、1 μ Mベプリジルを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図22]図22は、Tプレートを用いて、4 μ Mベプリジルを添加した場合のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図23]図23は、Gプレートを用いて、4 μ Mベプリジルを添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図24]図24は、ベラパミルを終濃度10 nMで添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図25]図25は、ベラパミルを終濃度100 nMで添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図26]図26は、CAD30、CAD80を説明する概念図である。

[図27]図27は、ベラパミルを60 nM～4 μ Mで添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図28]図28Aは、ベラパミルを60 nM～4 μ Mで添加した場合のCAD30、図28Bは、ベラパミルを添加した場合のCAD80を示すグラフである。

[図29]図29は、E-4031を1 nM～1000 nMで添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図30]図30Aは、E-4031を1 nM～1000 nMで添加した場合のCAD30、図30Bは、E-4031を添加した場合のCAD80を示すグラフである。

[図31]図31は、ベプリジルを60 nM～4 μ Mで添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図32]図32Aは、ベプリジルを60 nM～4 μ Mで添加した場合のCAD30、図32Bは、ベプリジルを60 nM～4 μ Mで添加した場合のCAD80を示すグラフである。

[図33]図33は、ベプリジルを312 nM～20 μ Mで添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図34]図34Aは、ベプリジルを312 nM～20 μ Mで添加した場合のCAD30、図34Bは、ベプリジルを312 nM～20 μ Mで添加した場合のCAD80を示すグラフである。

[図35]図35は、リスペリドンで1 nM～1 μ Mで添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図36]図36Aは、リスペリドンで1 nM～1 μ Mで添加した場合のCAD30、図36Bは、リスペリドンで1 nM～1 μ Mで添加した場合のCAD80を示すグラフである。

[図37]図37は、リスペリドンで60 nM～4 μ Mで添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図38]図38Aは、リスペリドンで60 nM～4 μ Mで添加した場合のCAD30、図38Bは、リスペリドンで60 nM～4 μ Mで添加した場合のCAD80を示すグラフである。

[図39]図39は、テルフェナジンを0.25 nM～16 nMで添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図40]図40Aは、テルフェナジンを0.25 nM～16 nMで添加した場合のCAD30、図40Bは、テルフェナジンを添加した場合のCAD80を示すグラフである。

[図41]図41は、ラノラジンを10 nM～10000 nMで添加した場合の心筋細胞のカルシウムイオン波形を示す。撮影時間は20秒、フレーム率は14.23フレーム/秒である。

[図42]図42Aは、ラノラジンを10 nM～10000 nMで添加した場合

のCAD30、図42Bは、ラノラジンを添加した場合のCAD80を示すグラフである。

[0010] なお、図2～図6、図10～12、図14～図25、図27、図29、図31、図33、図35、図37、図39、図41において、左側の縦軸はIntensity、右側の縦軸はMovement、横軸はTime (frame)であり、グラフはFluorescenceを示す。また、図7～図9において、縦軸はIntensity、横軸はTime (frame)であり、グラフはFluorescenceを示す。また、図28、図30、図32、図34、図36、図38、図40、図42において、Aの縦軸はCAD30、Bの縦軸はCAD80を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 次に本発明について具体的に説明する。

本発明の一態様は、薬剤の、心筋細胞に対する作用を評価する方法であって、培養容器の培養面に心筋細胞を播種する工程（A）、前記工程（A）で得られた心筋細胞を培養する工程（B）、前記培養された心筋細胞を前記薬剤に曝露させる工程（D）、及び前記工程（D）で得られた心筋細胞の細胞機能の指標を分析して評価する工程（E）を含み、前記培養容器の培養面の少なくとも一部が4-メチルー1-ペンテン重合体を含む基材から形成されている。

培養面の少なくとも一部が4-メチルー1-ペンテン重合体を含む基材から形成されている培養容器を培養容器（X）と称する。

[0012] [薬剤の、心筋細胞に対する作用を評価する方法]

本発明の一態様における薬剤は、特に制限されないが、心筋細胞への作用が既知の物質であってもよく、例えば、イソプロテレノール、ペンタミジン、ベプリジル、ベラパミル、E-4031、テルフェナジン、アステミゾール、クロマノール293b、メキシレチン、ニフェジピン、プロプラノール、ミルリノン、非特許文献1に記載の薬剤などである。本発明の一態様である方法により、心筋細胞に対する作用を精度良く評価することができること

から、これらの中でも、イソプロテレノール、ペンタミジン、ベプリジル、ベラパミル、E-4031が好ましい。

[0013] イソプロテレノールは、非選択的 β 作動薬で、頻脈効果、強心効果を有する。ペンタミジンは、抗菌薬の1つであるが、不整脈を誘発する作用を有する。ベプリジルは、狭心症の治療に用いられるカルシウム拮抗薬の一つであるが、副作用としてtorsade de pointes (TdP)といわれる致死性の心室性不整脈及びQT延長を誘発することが知られている。ミルリノンは、ホスホジエステラーゼIII阻害剤で、同じく頻脈効果、強心効果を有する。ベラパミルは、L型カルシウムチャネル阻害剤である。E-4031は、hERG型カリウムチャネル阻害剤である。テルフェナジンは、抗アレルギー薬で、QT延長を引き起こすことが知られている。アステミゾールは、抗アレルギー薬で、QT延長を引き起こすことが知られている。クロマノール293bは、電位依存性カリウムチャネルKCNQ1阻害剤である。メキシレチンは、電位依存性ナトリウムチャネル阻害剤である。ニフェジピンは、L型カルシウムチャネル阻害剤である。プロプラノールは、 β 遮断薬で、徐脈効果を有する。

[0014] Ksenia B. et. al.、International Multisite Study of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Drug Proarrhythmic Potential Assessment、Cell Reports 24、2018 September 25、3582-3592（以下、「文献A」という）には、iPS細胞を分化させたヒト心筋細胞を用いて、薬剤の催不整脈作用を評価する方法について、多施設において国際的な検証試験が行われた結果が報告されている。本発明の一態様における薬剤としては、例えば、文献Aにおいて評価された28の薬剤、すなわち、イブチリド、d-ソタロール、アジミリド、ドフェチリド、キニジン、ジソピラミド、バンデタニブ、ベプリジル、ドンペリドン、オンダンセトロン、アステミゾール

、シサプリド、ピモジド、クラリスロマイシン、リスペリドン、テルフェナジン、クロルプロマジン、クロザピン、ラノラジン、メトプロロール、メキシレチン、ロラタジン、タモキシフェン、ニトレンジピン、ニフェジピン、ジルチアゼム、ベラパミルを用いることもできる。これらの中でも、iPS細胞を分化させた心筋細胞を用いた、従来の催不整脈モデルではリスクレベルの予測が困難である薬剤が好ましく、臨床的なTdPのリスクレベルが高リスク又は中リスクであるのに、iPS細胞を分化させた心筋細胞を用いた、従来の催不整脈モデルではTdPのリスクレベルが低く予測されてしまう薬剤、臨床的なTdPのリスクレベルは低リスクであるのに、iPS細胞を分化させた心筋細胞を用いた、従来の催不整脈モデルではTdPのリスクレベルが高く予測されてしまう薬剤がより好ましく、ベプリジル、リスペリドン、テルフェナジン、ラノラジンがさらに好ましい。

[0015] 薬剤は、心筋細胞への作用が未知の物質であってもよく、例えば、新薬候補物質、心毒性を有することが疑われる物質、又は心筋細胞への主作用が期待される候補物質である。

薬剤は、低分子医薬品に包含される低分子化合物であってもよいし、高分子医薬品に包含される、タンパク質、抗体、核酸、多糖などの高分子化合物であってもよい。薬剤は、新規な物質でも公知の物質でもよい。

[0016] 薬剤の作用とは、薬剤の有する主作用及び副作用を包含する。

薬剤の、心筋細胞に対する主作用とは、該薬剤が有する薬理作用の中で、本来期待される作用であり、例えば、徐脈作用（陰性変時作用）、頻脈作用（陽性変時作用）、強心作用（陽性変力作用）、弱心作用（陰性変力作用）である。薬剤の、心筋細胞に対する主作用は、本発明の方法により、薬剤が低濃度であっても検出できることから、好ましくは頻脈作用又は徐脈作用である。

[0017] 薬剤の、心筋細胞に対する副作用とは、該薬剤が有する、治療に関係がない、又は治療の妨げとなる薬理作用のことである。心筋細胞に対する副作用としては、例えば、心毒性が挙げられ、心毒性としては、催不整脈作用、及

び心筋傷害作用等が挙げられる。催不整脈作用は、既にある不整脈を悪化させる、又は新たな不整脈を起こす作用であり、例えば、QT延長、早期後脱分極（EAD）、遅延後脱分極（DAD）、トルサード・ド・ポワント（TdP）、トリガードアクティビティ不整脈、及びリエントリー不整脈を引き起こす作用が挙げられる。心筋傷害作用は、不可逆的心筋障害であっても、可逆的心筋障害であってもよい。

[0018] 本発明の一態様である方法により、精度良く検出できることから、前記副作用は、好ましくは催不整脈作用、さらに好ましくはQT延長、早期後脱分極（EAD）を引き起こす作用である。

本発明の一態様である方法により、精度良く検出できることから、前記副作用は、好ましくは心筋傷害作用であり、より好ましくはミトコンドリア毒性である。

[0019] 本発明の一態様である方法は、創薬プロセスにおいて、医薬品の安全性及び有効性を評価するために利用することができる。すなわち、心筋細胞への作用が未知の物質を薬剤として用いると、低濃度であっても該物質の主作用又は副作用を評価することができ、また、偽陽性を検出しにくい。さらに、後の*in vivo*試験で心毒性が問題となるであろう物質を、より早い段階の*in vitro*試験系において、心毒性が予測される物質として検出することができる。また、心筋細胞への作用が既知の物質を薬剤として用いると、低濃度であっても該物質の既知の主作用又は副作用を確認し、又は、該物質の新たな主作用又は副作用を評価することができ、また、偽陽性を検出しにくい。特に、*in vivo*で心毒性が報告されている又は疑いがある物質を薬剤として用いると、*in vivo*試験よりも簡便に心毒性を検出でき、また心毒性を生じるメカニズムの解析を行うことができる。

[0020] [心筋細胞]

心筋細胞は、多能性幹細胞を分化させた心筋細胞であってもよいし、生物の心臓から単離された初代培養心筋細胞であってもよい。また、市販されている多能性幹細胞を分化させた心筋細胞、例えば、FUJIFILM Ce

llular Dynamics社のiCell Cardiomyocytes、タカラバイオ社のMiraCell Cardiomyocytes v2、Axogenesis社のCor. 4U、マイオリッジ社のCarmyA、REPROCELL社のReproCardio2などであってもよい。

[0021] 多能性幹細胞とは、あらゆる組織の細胞へと分化する能力（分化多能性）を有する幹細胞の総称である。多能性幹細胞としては、例えば、胚性幹細胞（embryonic stem cell：ES細胞）、胚性癌腫細胞（embryonic carcinoma cell：EC細胞）、栄養芽幹細胞（trophoblast stem cell：TS細胞）、エピブラスト幹細胞（epiblast stem cell：EpiS細胞）、胚性生殖細胞（embryonic germ cell：EG細胞）、多能性生殖細胞（multipotent germline stem cell：mGS細胞）、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：iPS細胞）、Muse細胞（Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell）等が挙げられる。多能性幹細胞は、好ましくは、ES細胞又はiPS細胞である。

[0022] 心筋細胞は、好ましくは、多能性幹細胞を分化させた心筋細胞であり、より好ましくは、人工多能性幹細胞を分化させた心筋細胞であり、さらに好ましくは、人工多能性幹細胞を分化させた成熟心筋細胞である。人工多能性幹細胞を分化させた心筋細胞は、公知の心筋細胞分化誘導法で作製することができ、例えばプロテインフリー心筋分化誘導（PFCD）法を用いることができる（国際公開第2015/182765号を参照）。

心筋細胞は、好ましくは、人工多能性幹細胞をプロテインフリー心筋分化誘導（PFCD）法により分化させた心筋細胞である。

[0023] 人工多能性幹細胞を分化させた成熟心筋細胞は、当該技術分野で、人工多能性幹細胞を分化させた未熟心筋細胞と対比して使用される用語であり、人

工多能性幹細胞を分化させた未熟心筋細胞と比べて、高いイオンチャネル機能を有する。

人工多能性幹細胞を分化させた成熟心筋細胞は、例えば、人工多能性幹細胞の分化誘導を開始してから14日以上、好ましくは20日以上、より好ましくは30日以上経過した細胞である。ここで、人工多能性幹細胞の分化誘導を開始した日は、未分化状態で維持された人工多能性幹細胞を、分化状態に移行させるための処理に晒した日であり、この日を0日目とする。また、成熟心筋細胞は、分化状態を維持したまま長期間培養することが可能であるため、分化誘導を開始してからの日数の上限は特に限定されず、成熟心筋細胞を、分化状態を維持したまま長期間培養ないし保管してもよい。例えば、成熟心筋細胞は、人工多能性幹細胞の分化誘導を開始してから365日以上経過した細胞であっても問題ない。人工多能性幹細胞を分化させた成熟心筋細胞は、好ましくは、プロテインフリー心筋分化誘導（PFC D）法により人工多能性幹細胞の分化誘導を開始してから30日以上経過した細胞をいう。

人工多能性幹細胞を分化させた成熟心筋細胞は、人工多能性幹細胞を分化させた未熟心筋細胞に比べて、生物の心臓から単離された心筋細胞に性質が近いため、好ましい。

[0024] 心筋細胞の由来は特に制限されず、哺乳類、鳥類、両生類、爬虫類、魚類等の由来であってもよいが、好ましくは、哺乳類由来であり、より好ましくはヒト、サル、マウス、ラット、ブタ、イヌ、ヒツジ、ネコ、ヤギ由来であり、さらに好ましくはヒト由来である。

[0025] 心筋細胞は、正常な心筋細胞であってもよいし、遺伝子変異を含む心筋細胞又は疾患モデル心筋細胞であってもよい。

心筋細胞は、センサータンパク質等を一過性に又は恒常的に発現するように、各種の遺伝子を導入してもよい。心筋細胞は、センサータンパク質を一過性に又は恒常的に発現していると、細胞機能の指標を蛍光又は化学発光により検出できるため好ましい。

センサータンパク質としては、例えば、GCaMP、cameleon、pericam、G-GECO、B-GECO、R-GECO、GEX-GECO、GEM-GECO、CEPIA等のカルシウムセンサー；mito-MaLion、MaLionB、MaLionG、MaLionR、ATeam等のATPセンサー；MARIO等のマグネシウムセンサー；Green Glifon、Red Glifon等のグルコースセンサー、Green Lindoblum等の乳酸センサー；Green Pegassos等のピルビン酸センサー等が挙げられる。センサータンパク質は好ましくはカルシウムセンサー又はATPセンサーであり、より好ましくはカルシウムセンサーであり、さらに好ましくはGCaMPである。

[0026] 心筋細胞は、単一細胞の形態で用いてもよいし、心筋細胞塊の形態で用いてもよく、心筋細胞シートの形態で用いてもよい。

[0027] 心筋細胞は、培養容器（X）では酸素を効率的に供給できるので、接着性の心筋細胞、浮遊性の心筋細胞のいずれであってよいが、好ましくは接着性の心筋細胞である。

[0028] [培養容器（X）]

培養容器（X）は、培養容器の培養面の少なくとも一部が4-メチルー1-ペンテン重合体を含む基材から形成されている。

[0029] 本発明の一態様において、培養容器とは、細胞の培養に用いられる容器全てを意味する。前記培養容器としては、公知の各種の培養容器を用いることができ、形状及び大きさは特に制限されない。前記培養容器としては、例えば、ディッシュ、フラスコ、プレート、ボトル、バッグ、チューブ等が挙げられる。前記培養容器は通常、インキュベーター、大量培養装置、又は灌流培養装置などの装置内で用いられる。

ここで培養面とは、細胞を培養する際に、培地及び／又は細胞が接触している面、若しくは培地及び／又は細胞が接触する予定の面を意味する。

[0030] 培養容器（X）において、「前記培養容器の培養面の少なくとも一部が4-メチルー1-ペンテン重合体を含む基材から形成されている」とは、培養

面の少なくとも一部の範囲が4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材から形成されていることを意味し、培養面の全ての範囲が4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材から形成されていてもよい。

[0031] 培養容器(X)は、培地を保持あるいは貯留するため、底面が培養面を含む培養容器であることが好ましい。培養容器(X)が、ディッシュ、フラスコ又はプレートの場合、底面が培養面を含むので、これらの底面、側面、上面のうち、少なくとも、底面の一部又は全部は、4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材から形成されている。少なくとも、底面の一部又は全部が4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材から形成されていると、前記4－メチルー1－ペンテン重合体を介して培地中に酸素を効率的に供給でき、培地中にある細胞を効率的に増殖及び分化させやすくなる。また、細胞の機能を保持したまま、細胞を高密度で培養しやすくなる。

[0032] 培養容器(X)は、培養面全体が4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材から形成されていることが好ましい。すなわち、培養容器(X)が、ディッシュ、フラスコ又はプレートの場合、底面の内側が培養面であるので、これらの底面、側面、上面のうち、底面の全部が4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材から形成されていることが好ましい。

[0033] 4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材の厚さは特に限定されないが、好ましくは20 μ m～400 μ m、より好ましくは20 μ m～300 μ m、さらに好ましくは20 μ m～200 μ mである。4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材の厚さは、培養容器の形態に応じて適宜選ばれるが、前記範囲に調整することで細胞が増殖及び分化する上で必要な適度な培地中の酸素濃度が得られやすく、また、培養容器としての強度も十分に得やすい。

[0034] 培養容器(X)は、少なくとも1つのウェルを有する培養容器であることが好ましく、少なくとも1つのウェルを有するプレートであることがさらに好ましく、6ウェル、12ウェル、24ウェル、48ウェル、96ウェル、384ウェル、1536ウェル等のウェルを有するプレートであることがさらに好ましい。一般にウェルのようなくぼみ形状を底面に有する培養容器は

、底面の複雑な形状を安定させるために底面を厚くする必要があり、細胞への酸素供給が充分に行われ難い。しかし、底面が4-メチルー1-ペンテン重合体を含む基材から形成されていると、1ウェル、6ウェル、12ウェル、24ウェル、48ウェル、96ウェル、384ウェル、1536ウェル等のウェルを有するプレートであっても、形状が安定しており、細胞への酸素供給も充分である。

[0035] 培養容器(X)の底面の形状は特に制限されず、平底、丸底(U底)、平底(F底)、円錐底(V底)、平底+カーブエッジ等が挙げられる。丸底(U底)、平底(F底)、円錐底(V底)、平底+カーブエッジ等に加工作業するには、一般の射出成形又はプレス成形で一度に加工作業してもよいし、フィルム又はシートを作成しておき、真空成形又は圧空成形などで2次加工を行い作成することも可能である。底面の形状は培養の目的に応じて選択されるが、細胞を2次元培養する際には、平底であることが通常は望ましく、3次元培養する際には丸底(U底)又は円錐底(V底)であることが通常は望ましい。

[0036] 培養容器(X)の培養面以外の部分は、4-メチルー1-ペンテン重合体を含む基材以外の材料で構成してもよい。前記材料は特に制限されず、公知の材料を用いることができる。かかる材料としては、例えば、ポリスチレン(P S)、ポリジメチルシロキサン(P D M S)、熱硬化性樹脂、環状オレフィンポリマー、環状オレフィンコポリマー、ガラス等が挙げられる。

[0037] 培養容器(X)は、少なくともその培養面を、天然高分子材料、合成高分子材料、又は無機材料を含むコーティング剤でコートしてもよい。コートは公知の方法により行うことができる。

コートされた培養容器(X)は、心筋細胞の接着性、増殖性がより優れる。これは、培養面にコートされている成分が、細胞の足場となるためと考えられる。したがって、心筋細胞を付着させて培養する際には、培養容器(X)の培養面は、天然高分子材料、合成高分子材料、又は無機材料を含むコーティング剤でコートされていることが好ましい。

[0038] 前記天然高分子材料、合成高分子材料、又は無機材料は特に制限されないが、天然高分子材料として、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸等のグリコサミノグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、フィブリノーゲン、オステオポンチン、テネイシン、ビトロネクチン、トロンボスポンジン、アガロース、エラスチン、ケラチン、キトサン、フィブリン、フィブロイン、糖類；合成高分子材料として、ポリグルコール酸、ポリ乳酸、ポリエチレングリコール、ポリカプロラクトン、合成ペプチド類、合成タンパク質類、ポリヒドロキシエチルメタクリラート、ポリエチレンイミン；無機材料として、 β -リン酸三カルシウム、炭酸カルシウムなどが挙げられる。

[0039] 前記天然高分子材料、合成高分子材料、又は無機材料は、ガラス化等の加工をしてから用いてもよい。ガラス化等の加工の例としては、従来の細胞外マトリックス成分等のハイドロゲルをガラス化した後に再水和して得られるビトリゲル、コラーゲンから作製された高密度のコラーゲン繊維網で構成されるコラーゲンビトリゲル等が挙げられる。

[0040] 心筋細胞の接着性及び心筋細胞の増殖性を向上させる、心筋細胞の機能をより長期に維持させるなどの観点から、コーティング剤は、好ましくは、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ポリリジン等のタンパク質、又はペプチドを含み、より好ましくは、ラミニン、コラーゲン、ポリリジンを含み、さらに好ましくは、ラミニンを含む。すなわち、培養容器（X）の培養面が、ラミニンを含むコーティング剤でコートされていることが好ましい。

コーティング剤は、上記の成分を、1種単独でもよいし、2種以上を組み合わせて含んでもよい。

[0041] コーティング剤は、そのままコートに用いてもよいが、水、PBS、培地等の溶媒で希釈してから、コートに用いることができる。心筋細胞の接着性の観点から、コーティング剤は、好ましくは、水、PBS、培地等の溶媒で希釈してからコートに用い、より好ましくは培地で希釈してからコートに用いる。コート剤の希釈に用いる培地は特に制限されず、工程（A）に用いる

培地と同じであってもよく、異なる培地であってもよい。コート剤の希釈に用いる培地は、好ましくは動物血清及び代替血清を含まない培地であり、さらに好ましくはDMEMであり、特に好ましくは実施例において後述する特製基礎培地である。

[0042] コーティング剤は、コートに用いた後、培養容器（X）から除去してもよく、培養容器（X）中に残してもよいが、心筋細胞の接着性の観点から、培養容器（X）中に残すことが好ましい。

[0043] 培養容器（X）は、少なくともその培養面の表面を加工してもよい。表面の加工としては、例えば、凹凸構造の形成加工、親水化処理、疎水化処理等の表面改質処理が挙げられる。

[0044] 表面改質処理に用いる方法は特に限定されないが、例えばコロナ処理、プラズマ処理、オゾン処理、紫外線処理等の親水化処理；エステル化、シリル化、フッ化等の疎水化処理；表面グラフト重合、化学蒸着、エッチング、又は、ヒドロキシシル基、アミノ基、スルホン基、チオール基、カルボキシシル基等の特定の官能基付加；シランカップリング、チタンカップリング、ジルコニウムカップリング等の特定の官能基による処理；酸化剤等による表面粗化；ラビング、サンドブラスト等の物理的処理等が挙げられる。これらの表面改質処理は、単独で行ってもよいし、2種以上を組み合わせてもよい。なお、表面改質処理を行う場合には、少なくとも培養面に行うことが好ましい。

[0045] 培養容器（X）は、少なくともその培養面を親水化処理することが好ましく、コロナ処理、又はプラズマ処理することがより好ましい。培養容器（X）の表面を親水化処理することで、培養容器（X）の表面の濡れ性が上がり、培養容器（X）と心筋細胞との接着性が良くなり、培養容器（X）の表面で心筋細胞が均一に増殖できる。また、培養容器（X）の表面を親水化処理することで、培養容器（X）の培養面上にコーティング剤をコートしやすくなる。特に、培養容器（X）の培養面上に均一にコーティング剤を積載し、密着させやすくなり、また、積載処理後においても、生理食塩水による洗浄

又は、細胞培養の環境において、コーティング剤の成分が剥がれず、安定な初期状態を保って細胞培養に用いることができる。

プラズマ処理を行う場合には、同伴させるガスとして、窒素、水素、ヘリウム、酸素、アルゴンなどが用いられ、好ましくは、窒素、ヘリウム、アルゴンから選択される少なくとも一種のガスが選ばれる。

[0046] 培養容器（X）は、コンタミネーション防止のために、消毒又は滅菌処理を施してもよい。消毒又は滅菌処理の方法としては、特に制限されず、流通蒸気法、煮沸法、間歇法、紫外線法等の物理的消毒法；オゾン等の気体、エタノール等の消毒薬を用いる化学的消毒法；高圧蒸気法、乾熱法等の加熱滅菌法；ガンマ線法、電子線法、高周波法等の照射滅菌法；酸化エチレンガス法、過酸化水素ガスプラズマ法等のガス滅菌法等が挙げられる。中でも操作が簡便で、十分に滅菌が行えることから、エタノール消毒法、高圧蒸気滅菌法、ガンマ線滅菌法、電子線滅菌法、又は酸化エチレンガス滅菌法が好ましい。これらの消毒又は滅菌処理は、1種単独で行ってもよいし、2種以上を組み合わせてもよい。

[0047] 培養容器（X）の培養面は、水接触角が好ましくは 50° 以上、より好ましくは 55° 以上、さらに好ましくは 60° 以上である。また、培養容器（X）の培養面は、水接触角が好ましくは 100° 以下、より好ましくは 90° 以下、さらに好ましくは 84° 以下である。

[0048] 培養容器（X）の培養面の水接触角を上記上限以下、又は上記下限以上に調整することで、例えば心筋細胞が培養面に接着しやすくなり、培養面で均一に増殖しやすい。また、培養容器（X）の培養面上に均一に天然高分子材料、合成高分子材料、又は無機材料をコートし、密着させやすくなり、また、コート後においても、生理食塩水による洗浄又は、細胞培養の環境において、天然高分子材料、合成高分子材料、又は無機材料が剥がれず、安定な初期状態を保って細胞培養に用いることができる。

[0049] 水接触角の測定方法は特に制限されず、公知の方法を用いることができるが、好ましくは静滴法である。水接触角は、例えば、日本工業規格 J I S -

R 3 2 5 7（基板ガラス表面のぬれ性試験方法）に準じて、 $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 、 $50 \pm 10\%$ の恒温恒湿条件下で水滴の形状を球形とみなせる $4\mu\text{L}$ 以下の容量の水滴を、培養容器（X）と同一の材料を用いて作成された測定サンプルの表面に滴下し、静滴法により、測定サンプル表面に水滴が接触した直後から1分以内の測定サンプルと水滴の接触界面の角度を計測する方法で測定することができる。

[0050] 培養容器（X）の製造方法は、特に制限されず、製造に用いる機器も制限されない。培養容器（X）の全部が4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材から形成される場合には、例えば、4－メチルー1－ペンテン重合体を含むフィルム又はシートを形成し、必要に応じてそのフィルム又はシートを成形して所望の形状として培養容器（X）を作製することができる。また、培養容器（X）は、押出成形、溶液キャスト成形、射出成形、ブロー成形等の方法により、直接成形することによっても得られる。培養容器（X）の一部が4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材から形成される場合には、例えば、4－メチルー1－ペンテン重合体を含むフィルム又はシートを形成し、該フィルム又はシートと、その他の基材とを、適宜接合することにより培養容器（X）を得ることができる。接合する方法としては特に制限はなく4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材と、その他の基材とを一体で形成してもよく、接着剤又は粘着剤を介して密着させてもよい。

[0051] 前記フィルム又はシートを形成する方法としては、具体的には、例えば、通常のインフレーション法、T－ダイ押出法などが採用される。製造は通常加温して行う。T－ダイ押出法を採用する場合、押出温度は $100^{\circ}\text{C} \sim 400^{\circ}\text{C}$ が好ましく、 $200^{\circ}\text{C} \sim 300^{\circ}\text{C}$ が特に好ましい。また、ロール温度は $45^{\circ}\text{C} \sim 75^{\circ}\text{C}$ が好ましく、 $55^{\circ}\text{C} \sim 65^{\circ}\text{C}$ が特に好ましい。

[0052] また、前記フィルム又はシートは4－メチルー1－ペンテン重合体を溶剤に溶解し、樹脂又は金属上に流し、レベリングしながらゆっくりと乾かしフィルム化（シート化）する溶液キャスト法で製造してもよい。用いられる溶剤は特に制限ないが、シクロヘキサン、ヘキサン、デカン、トルエンなどの

炭化水素溶剤を用いてもよい。また、溶剤は、前記4-メチル-1-ペンテン重合体の溶解性及び乾燥効率を考慮して2種類以上を混合してもよい。テーブルコート、スピンコート、ディップコート、ダイコート、スプレーコート、バーコート、ロールコート、カーテンフローコートなどの方法でポリマー溶液を塗布し、乾燥、剥離することでフィルム又はシートに加工することができる。

[0053] [4-メチル-1-ペンテン重合体]

本発明の一態様においては、4-メチル-1-ペンテン単独重合体、及び4-メチル-1-ペンテンと他のモノマーとの共重合体を総称して「4-メチル-1-ペンテン重合体」と称する。

[0054] 4-メチル-1-ペンテン重合体の一例である、4-メチル-1-ペンテンと、他のモノマーとの共重合体としては、ランダム共重合体、交互共重合体、ブロック共重合体、グラフト共重合体のいずれであってもよい。4-メチル-1-ペンテンと、他のモノマーとの共重合体としては、4-メチル-1-ペンテンと、エチレン及び炭素数3～20の α -オレフィン（4-メチル-1-ペンテンを除く）から選ばれる少なくとも1種のオレフィンとの共重合体が、強度が高く、基材として用いても破れにくく割れにくく、撓みも少ないため好ましい。

[0055] 4-メチル-1-ペンテン重合体としては、4-メチル-1-ペンテン単独重合体並びに、4-メチル-1-ペンテンと、エチレン及び炭素数3～20の α -オレフィン（4-メチル-1-ペンテンを除く）から選ばれる少なくとも1種のオレフィンとの共重合体から選択される少なくとも1種の重合体であることが好ましく、4-メチル-1-ペンテンと、エチレン及び炭素数3～20の α -オレフィン（4-メチル-1-ペンテンを除く）から選ばれる少なくとも1種のオレフィンとの共重合体であることがより好ましい。

[0056] 前記オレフィンとしては、例えば、エチレン、プロピレン、1-ブテン、1-ヘキセン、1-ヘプテン、1-オクテン、1-デセン、1-テトラデセン、1-ヘキサデセン、1-ヘプタデセン、1-オクタデセン、1-エイコ

センが挙げられる。前記オレフィンは、基材に必要な物性に応じて適宜選択することができる。例えば、前記オレフィンとしては、適度な酸素透過度と、優れた剛性という観点からは、炭素数8～18の α -オレフィンが好ましく、1-オクテン、1-デセン、1-ドデセン、1-テトラデセン、1-ヘキサデセン、1-ヘプタデセン及び1-オクタデセンから選ばれる少なくとも1種がより好ましい。オレフィンの炭素数が上記範囲にあると、重合体の加工性がより良好になり、クラック又は端部の割れによる基材の外観不良が生じにくくなる傾向にある。また、基材の不良品発生率が低くなる。

[0057] 前記オレフィンは、1種又は2種以上を用いることができる。異なる2種以上のオレフィンを組み合わせる場合には、材料の強度の観点から、該オレフィンの炭素数は2以上が好ましく、炭素数10以上がより好ましい。異なる2種以上の α -オレフィンを組み合わせる場合には、1-テトラデセン及び1-ヘキサデセンから選ばれる少なくとも1種と、1-ヘプタデセン及び1-オクタデセンから選ばれる少なくとも1種とを組み合わせることが特に好ましい。

[0058] 前記4-メチルー1-ペンテン重合体における4-メチルー1-ペンテンに由来する構成単位の含有量は、好ましくは60～100モル%、より好ましくは80～99.5モル%、さらに好ましくは85～98モル%である。

また、4-メチルー1-ペンテン重合体が、4-メチルー1-ペンテンと、エチレン及び炭素数3～20の α -オレフィン（4-メチルー1-ペンテンを除く）から選ばれる少なくとも1種のオレフィンとの共重合体である場合は、その共重合体におけるエチレン及び炭素数3～20の α -オレフィン（4-メチルー1-ペンテンを除く）から選ばれる少なくとも1種のオレフィンに由来する構成単位の含有量は、好ましくは0.1～40モル%、より好ましくは0.5～20モル%、さらに好ましくは2～15モル%である。なお、これら構成単位の含有量は、4-メチルー1-ペンテン重合体中の全繰返し構成単位量を100モル%とする。構成単位の含有量が上記範囲内にあると、加工性に優れ均質な培養面が得られ、また基材の靱性と強度のバラ

ンスが良いため、撓みも少なくなる。

[0059] 前記4-メチルー1-ペンテン重合体は、本発明の効果を損なわない範囲で、4-メチルー1-ペンテンに由来する構成単位及び前記エチレン及び炭素数3～20の α -オレフィンに由来する構成単位以外の構成単位（以下「その他の構成単位」ともいう）を有してもよい。その他の構成単位の含有量は、例えば0～10.0モル%である。前記4-メチルー1-ペンテン重合体がその他の構成単位を有する場合、その他の構成単位は、1種でも2種以上であってもよい。

[0060] その他の構成単位の由来となるモノマーとしては、例えば、環状オレフィン、芳香族ビニル化合物、共役ジエン、非共役ポリエン、官能ビニル化合物、水酸基含有オレフィン、ハロゲン化オレフィンが挙げられる。環状オレフィン、芳香族ビニル化合物、共役ジエン、非共役ポリエン、官能ビニル化合物、水酸基含有オレフィン及びハロゲン化オレフィンとしては、例えば、特開2013-169685号公報の段落[0035]～[0041]に記載の化合物を用いることができる。

[0061] 前記4-メチルー1-ペンテン重合体は、1種単独で用いてもよく、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0062] 4-メチルー1-ペンテン重合体としては市販品を使用することもできる。具体的には、三井化学（株）製のTPX MX001、MX002、MX004、MX0020、MX021、MX321、RT18、RT31又はDX845（いずれも登録商標）などが挙げられる。また、その他のメーカー製でも上記の要件を満たす4-メチルー1-ペンテン重合体であれば、好ましく使用できる。これらの市販品は1種単独で使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用することもできる。

[0063] 4-メチルー1-ペンテン重合体は、通常、融点200℃～240℃であり耐熱性が高い。また加水分解を起こさず、耐水性、耐沸水性、耐スチーム性が優れているため、4-メチルー1-ペンテン重合体を含む基材は高圧蒸気滅菌処理が可能である。4-メチルー1-ペンテン重合体は、また可視光

線透過率が高く（通常90%以上）、自家蛍光を発しない特徴を有するので、4-メチルー1-ペンテン重合体を含む基材から形成される培養容器は心筋細胞の観察がしやすい。さらに、ほとんどの薬品に優れた耐薬品性を示し、薬剤を収着しにくいため、心筋細胞を維持するための物質の効果を妨げず、また、作用を評価する薬剤の濃度も変化しにくい。4-メチルー1-ペンテン重合体は、ヒートシールが可能であり、自材同士の熱融着のみならず他の材料との熱接着も容易である。また、熱成形が可能であるため、任意の形状の培養容器に成形することが容易であり、例えばインプリント法又はインサート法を用いた成形も容易である。

[0064] 4-メチルー1-ペンテン重合体の、標準ポリスチレンを基準物質としたゲルパーミュエーションクロマトグラフィー（GPC）により測定される、重量平均分子量（ M_w ）は、好ましくは10000～2000000、より好ましくは20000～1000000、さらに好ましくは30000～500000である。ここで、GPC測定の際の試料濃度は、例えば1.0～5.0 mg/mlとすることができる。また、4-メチルー1-ペンテン重合体の分子量分布（ M_w/M_n ）は、好ましくは1.0～30、より好ましくは1.1～25、さらに好ましくは1.1～20である。GPCで用いられる溶剤は、オルトジクロロベンゼンが好ましい。また、測定条件の一例としては、後述する実施例に示した条件が挙げられるが、該測定条件に限定されるものではない。

[0065] 重量平均分子量（ M_w ）を上記上限以下とすることにより、後述する4-メチルー1-ペンテン重合体の成形法において、溶融成形で作製したフィルムは、ゲル等の不具合の発生を抑制しやすく、表面が均一な製膜をしやすくなる。また、溶液キャスト法で作製する際は溶剤への溶解性をより良好にし、フィルムのゲル等の不具合を抑制しやすく、表面均一な製膜がしやすくなる。

[0066] また、重量平均分子量（ M_w ）を上記下限以上とすることにより、培養容器（X）は強度が十分となる傾向にある。さらに、分子量分布を上記の範囲

内とすることで、作製した培養容器表面のベタツキを抑えやすく、培養容器の靱性も充分となる傾向にあり、成形時の曲げ及び裁断時のクラックの発生などを抑制しやすくなる。

[0067] 前記4-メチル-1-ペンテン重合体の重量平均分子量 (M_w) 及び分子量分布 (M_w/M_n) は、4-メチル-1-ペンテン重合体として、2種以上を用いた場合には、それぞれの、 M_w 及び M_w/M_n が、上記範囲にあればよい。

[0068] 4-メチル-1-ペンテン重合体は、酸素透過係数が $100 \sim 2500 \text{ cm}^3 \times \text{mm} / (\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$ であることが好ましく、 $1000 \sim 2500 \text{ cm}^3 \times \text{mm} / (\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$ であるとより好ましい。酸素透過係数が前記範囲にあると、酸素透過性に優れるので、心筋細胞は良好な形態を保ち、培養期間に応じて効率良く増殖しやすく、また薬剤の作用を検出しやすい。

[0069] 酸素透過係数は、具体的には以下の方法で測定できる。4-メチル-1-ペンテン重合体で構成される基材から測定サンプルを作成し、差圧式ガス透過率測定法により、温度 23°C 、湿度 0% での酸素透過係数 [$\text{cm}^3 \times \text{mm} / (\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$] を測定する。測定に用いる機器は差圧式ガス透過率測定法を用いたものであれば特に制限されないが、例えば東洋精機製作所製の差圧式ガス透過率測定装置MT-C3が挙げられる。測定サンプルは、4-メチル-1-ペンテン重合体で構成される厚さ $50 \mu\text{m}$ の基材から $90 \times 90 \text{ mm}$ の試験片を切り出して作成し、測定部径は 70 mm (透過面積は 38.46 cm^2) とすると好ましい。酸素透過度が大きいため、予めサンプルにアルミニウムマスクを施し、実透過面積を 5.0 cm^2 とすることがより好ましい。測定サンプルは、微細加工、表面改質処理を行ったものでもよいし、行っていないものでもよいが、何も処理を行っていないものが好ましい。酸素透過係数を基材の厚さ (μm) で除した値を酸素透過度 [$\text{cm}^3 / (\text{m}^2 \times 24 \text{ h} \times \text{atm})$] とする。

[0070] 4-メチル-1-ペンテン重合体は以上のような優れた特性を有している

ので、少なくとも培養面が4-メチルー1-ペンテン重合体を含む基材で形成された培養容器は、培養に悪い影響を与えることも無く、また形状安定性、光透過性、成形加工性、酸素透過性が良好で、滅菌処理を行うことができ、心筋細胞を培養し、薬剤の作用を評価するために用いる培養容器として非常に優れている。

[0071] 前記4-メチルー1-ペンテン重合体を製造する方法は、4-メチルー1-ペンテン、オレフィン、その他のモノマーを重合させられれば、いずれの方法であってもよい。また、分子量又は分子量分布を制御するために連鎖移動剤、例えば水素を共存させてもよい。製造に用いる機器も制限されない。重合法は公知の方法でもよく、気相法、スラリー法、溶液法、バルク法であってもよい。好ましくはスラリー法、溶液法である。また、重合法は単段重合法、又は二段等の多段重合法で、分子量の異なる複数の重合体を重合系中にブレンドする方法であってもよい。単段、多段重合法の何れであっても、連鎖移動剤として水素を用いる場合には、一括投入しても、分割投入、例えば重合初期、中期、終期に投入してもよい。重合は常温で行ってもよく、必要に応じて加温してもよいが、重合の効率の観点から、20℃～80℃で行うことが好ましく、40℃～60℃で行うことが特に好ましい。製造に用いる触媒も制限されないが、重合の効率の観点から、例えば国際公開公報2006/054613に記載される固体状チタン触媒成分(I)又は、国際公開公報2014/050817に記載される遷移金属化合物(A)を含有するオレフィン重合用触媒(メタロセン触媒)を用いることが好ましい。

[0072] なお、4-メチルー1-ペンテン重合体を含む基材が、4-メチルー1-ペンテン重合体を含む組成物である場合には、組成物100質量%中に、4-メチルー1-ペンテン重合体が、好ましくは90質量%以上100質量%未満であり、より好ましくは95質量%以上100質量%未満であり、特に好ましくは99質量%以上100質量%未満である。組成物中の4-メチルー1-ペンテン重合体が90質量%以上であると、基材の酸素透過性、透明性、強度などがより向上する。

この場合、4-メチル-1-ペンテン重合体以外の成分としては、耐熱安定化剤、耐光安定化剤、加工助剤、可塑剤、酸化防止剤、滑剤、消泡剤、アンチブロック剤、着色剤、改質剤、抗菌剤、抗黴剤、防曇剤などの添加剤が挙げられる。

[0073] [工程 (A)]

工程 (A) は、培養容器 (X) の培養面に心筋細胞を播種する工程である。培養容器 (X) の培養面に心筋細胞を播種する方法は特に制限されず、例えば、培地に懸濁した心筋細胞をピペット等で培養容器 (X) 内に添加し、必要に応じて該培養容器 (X) を揺動させて培養容器 (X) 内に心筋細胞を均等に散らした後、インキュベーター内で静置する。

[0074] 心筋細胞を播種する密度は、前記心筋細胞を維持又は増殖させることができれば特に制限されないが、好ましくは $0.1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 10.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ であり、より好ましくは $0.3 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 5.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ であり、さらに好ましくは $0.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 3.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ である。

心筋細胞の播種密度が上記の範囲であると、心筋細胞が培養容器 (X) に接着しやすく、より効率よく増殖するため好ましい。

[0075] 工程 (A) で用いる培地は、心筋細胞が生存できる培地であれば特に制限されず、使用細胞種に合わせて適宜選択すればよい。播種に用いる培地は、例えば、任意の細胞培養基本培地、分化培地、初代培養専用培地等、具体的には、後述する無血清培地 (α)、後述する培地 (β)、イーグル細小必須培地 (EMEM)、ダルベッコ改イーグル培地 (DMEM)、 α -MEM、グラスゴーMEM (GMEM)、IMDM、RPMI 1640、ハムF-12、MCDB培地、ウィリアムス培地E、実施例において後述する特製維持培地、特製基礎培地、iCell心筋細胞維持用培地 (FUJIFILM CellularDynamics社製)、iCell心筋細胞解凍用培地 (FUJIFILM CellularDynamics社製)、及びこれらの混合培地等が挙げられる。これらの培地にさらに、血清、各種成長因子

、分化誘導因子、抗生物質、ホルモン、アミノ酸、糖、塩類、ミネラル、金属、ビタミン等を添加した培地を使用してもよい。

心筋細胞が培養容器（X）に接着しやすいことから、工程（A）で用いる培地は、好ましくは i C e l l 心筋細胞解凍用培地、実施例において後述する無血清培地（ α ）であり、より好ましくは無血清培地（ α ）である。

[0076] 工程（A）で用いる培地の量は特に制限されず、細胞種及び培地の種類に応じて適宜決定することができる。

培養条件は特に制限されず、公知の方法で行うことができるが、通常、温度は 25～40℃程度、二酸化炭素濃度 5%程度で培養する。

[0077] [無血清培地（ α ）]

無血清培地（ α ）は、動物血清を含有しないが、代替血清を含有する培地である。無血清培地（ α ）は、基礎培地に代替血清を添加することにより作製することができる。

前記代替血清とは、細胞培養の際に、細胞の生存に必要な栄養素として添加させる動物血清に代わる、血清代用品を意味し、Serum Protein Substitute (SPS)、Serum Substitute Supplement (SSS) 等と称されることもある。前記代替血清は特に限定されず、公知のものを使用することができる。市販の代替血清としては、Knockout Serum Replacement (ThermoFisher SCIENTIFIC 社製、NO. 10828028)、StemSure™ 血清代替品 (SSR、富士フイルム和光純薬株式会社製)、PL SOLUTION (PL Bioscience 社製)、PL MATRIX (PL Bioscience 社製)、Artificial Serum (株式会社細胞科学研究所社製) などが挙げられる。これらの中でも、Knockout Serum Replacement が好ましい。

無血清培地（ α ）における代替血清の含有量は、特に制限されないが、好ましくは 1～20% (v/v)、より好ましくは 5～15% (v/v)、さらに好ましくは 8～12% (v/v) である。

[0078] 前記基礎培地は、動物血清を含まない細胞培養用の培地であれば、特に制限されない。前記基礎培地としては、例えば、Grace培地、IPL-4培地、Schneider's培地、Opti-PRO™SFM培地、Opti-MEM™I培地、VP-SFM培地、CD293培地、293SFMII培地、CD-CHO培地、CHO-S-SFMII培地、FreeStyle™293培地、CD-CHO、AGT™培地、RPMI培地、DMEM培地、MEM培地、GMEM培地、Eagle's MEM培地、BME培地、DME培地、 α MEM培地、IMEM培地、ES培地、DM-160培地、Fishers培地、F12培地、WE培地、ASF103培地、ASF104培地、ASF301培地、TC-100培地、Sf-900II培地、Ex-cel1405培地、Express-Five培地、Drosophila培地、Ham's F-12K培地及びこれらの混合培地等が挙げられる。

心筋細胞が培養容器(X)に接着しやすいことから、前記基礎培地は、好ましくはDMEM培地、RPMI培地、MEM培地であり、より好ましくはDMEM培地である。

[0079] 無血清培地(α)は、好ましくは、Knockout Serum Replacementを含有する、DMEM培地、RPMI培地、又はMEM培地であり、より好ましくはKnockout Serum Replacementを含有するDMEM培地である。

[0080] 無血清培地(α)には、代替血清以外に各種成長因子、分化誘導因子、抗生物質、ホルモン、アミノ酸、糖、塩類、ミネラル、金属、ビタミン等を添加してもよい。

[0081] [工程(B)]

工程(B)は、工程(A)で播種した心筋細胞を培養する工程である。心筋細胞を培養する方法は特に制限されず、公知のプロトコルに従って行えばよい。

[0082] 工程(B)で培養に用いる培地についての詳細は、工程(A)に用いる培地と同様である。工程(B)で用いる培地は、工程(A)で用いる培地と同

じであっても、異なってもよいが、心筋細胞がより増殖しやすいことから、同じであることが好ましい。

[0083] 工程（B）で用いる培地の量は特に制限されず、細胞種及び培地の種類に応じて適宜決定することができる。

培地交換の頻度は、特に制限されないが、播種翌日に培地交換を行う以外は工程（B）での培養期間中は行わないことが好ましい。

培養条件は特に制限されず、公知の方法で行うことができるが、通常、温度は25～40℃程度、二酸化炭素濃度5%程度で培養する。

[0084] 工程（B）での培養期間は特に制限されないが、好ましくは6時間～3日間であり、より好ましくは10時間～2日間であり、さらに好ましくは12～36時間である。

工程（B）での培養期間の終期は、例えば、心筋細胞が培養容器（X）に十分に接着したかにより決めることができる。心筋細胞が培養容器（X）に十分に接着したかは、例えば、顕微鏡観察により評価することができる。

[0085] 工程（B）の培養は、培養容器（X）では酸素を効率的に供給できるので、接着培養、浮遊培養のいずれであってもよいが、好ましくは接着培養である。

[0086] 工程（A）及び（B）は、無血清培地（ α ）中で行われることが好ましい。工程（A）及び（B）が無血清培地（ α ）中に行われると、心筋細胞が培養容器（X）に接着しやすい。

[0087] [工程（C）]

工程（C）は、工程（B）で得られた心筋細胞をさらに培養する工程である。

本発明の一態様である方法は、好ましくは、工程（B）で培養した心筋細胞をさらに培養する工程（C）を含む。工程（C）を含むと、薬剤の作用を精度良く評価しやすい。

心筋細胞を培養する方法は特に制限されず、公知のプロトコルに従って行えばよい。

[0088] 工程（C）で培養に用いる培地は、心筋細胞が生存できる培地であれば特に制限されず、使用細胞種に合わせて適宜選択すればよい。培養に用いる培地は、例えば、任意の細胞培養基本培地、分化培地、初代培養専用培地等、具体的には、無血清培地（ α ）、後述する培地（ β ）、イーグル細小必須培地（EMEM）、ダルベッコ改イーグル培地（DMEM）、 α -MEM、グラスゴーMEM（GMEM）、IMDM、RPMI 1640、ハムF-12、MCDB培地、ウィリアムス培地E、CardioGro（フナコシ社製）、iCell心筋細胞維持用培地（Fujifilm Cellular Dynamics社製）、iCell心筋細胞解凍用培地（Fujifilm Cellular Dynamics社製）及びこれらの混合培地等が挙げられる。これらの培地に、さらに、血清、各種成長因子、分化誘導因子、抗生物質、ホルモン、アミノ酸、糖、塩類、ミネラル、金属、ビタミン等を添加した培地を使用してもよい。

心筋細胞がより効率よく増殖し、また、薬剤の作用を精度良く検出できることから、工程（C）で用いる培地は、好ましくはiCell心筋細胞維持用培地又は後述する培地（ β ）であり、より好ましくは後述する培地（ β ）である。

[0089] 工程（C）で培養に用いる培地は、工程（C）での培養期間の途中で変更し、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

心筋細胞がより効率よく増殖し、また、薬剤の作用を精度良く検出できることから、工程（C）での培養期間の少なくとも一部で培地（ β ）を用いることが好ましい。工程（C）で培養に用いる2種以上の培地のうち、培地（ β ）を用いる順序及び期間は制限されないが、培地（ β ）は、2番目以降に用いる培地として用いることが好ましい。培地（ β ）を用いて培養する期間は、工程（C）での培養期間の好ましくは30%以上、より好ましくは40%以上、さらに好ましくは50%以上、特に好ましくは60%以上である。

[0090] 工程（C）で用いる培地の量は特に制限されず、細胞種及び培地の種類に応じて適宜決定することができる。

培地交換の頻度は、特に制限されないが、毎日又は2、3日おきに行うことが好ましい。

培養条件は特に制限されず、公知の方法で行うことができるが、通常、温度は25～40℃程度、二酸化炭素濃度5%程度で培養する。

[0091] 工程(C)での培養期間は特に制限されないが、好ましくは3～30日間であり、より好ましくは7～20日間であり、さらに好ましくは10～16日間である。

工程(C)での培養期間の終期は、例えば、心筋細胞が十分に同期したか、より具体的には、心筋細胞が安定した拍動パターンを示すかにより決めることができる。心筋細胞が安定した拍動パターンを示すかは、例えば、カルシウムイオン波形により評価することができる。

[0092] [培地(β)]

培地(β)は、遊離脂肪酸1～100μg/mLを含有する培地である。培地(β)は、遊離脂肪酸1～100μg/mLを含有する培地であれば、その他の成分については特に制限されない。

[0093] 遊離脂肪酸とは、非エステル化脂肪酸の意味であり、脂肪酸の炭素数は制限されない。

遊離脂肪酸の脂肪酸の種類は制限されず、例えば、酢酸、酪酸、カプロン酸等の炭素数2～6の短鎖脂肪酸；カプリル酸、カプリン酸等の炭素数8～10の中鎖脂肪酸；ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸等の炭素数12～22の長鎖脂肪酸である。前記脂肪酸は飽和脂肪酸であっても不飽和脂肪酸であってもよい。

培地(β)は、上記の遊離脂肪酸を、1種単独でもよいし、2種以上を組み合わせて含んでもよい。

[0094] 培地(β)の遊離脂肪酸の含有量は、好ましくは1～70μg/mL、より好ましくは2～50μg/mL、さらに好ましくは10～50μg/mL

である。

培地（ β ）が、遊離脂肪酸を上記範囲内の量で含有すると、薬剤の作用をより精度良く評価することができる。

[0095] 培地（ β ）の遊離脂肪酸の含有量を測定する方法は特に制限されず、例えば共役酵素反応を利用した方法により遊離脂肪酸濃度を測定することができる。

[0096] 培地（ β ）は、好ましくは、更に、リゾホスファチジルコリン1～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、トリアシルグリセリド1～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ホスファチジルコリン1～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ホスファチジン酸1～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、コレステロール0.1～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及びスフィンゴミエリン0.1～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から選ばれる少なくとも1種を含有する。

リゾホスファチジルコリンの含有量は、より好ましくは1～50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは1～20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。トリアシルグリセリドの含有量は、より好ましくは1～50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは1～20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。ホスファチジルコリンの含有量は、より好ましくは1～50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは1～25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。ホスファチジン酸の含有量は、より好ましくは1～50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは1～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。コレステロールの含有量は、より好ましくは0.1～8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは0.1～5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。スフィンゴミエリンの含有量は、より好ましくは0.1～8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは0.1～5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

培地（ β ）が、上記の脂質を上記範囲内で含有すると、薬剤の作用をより精度良く評価することができる。

[0097] 培地（ β ）の上記脂質の含有量を測定する方法は特に制限されず、公知の方法により測定することができる。

[0098] [工程（D）]

工程（D）は、前記培養された心筋細胞を前記薬剤に曝露させる工程である。前記培養された心筋細胞とは、工程（C）がない場合には、工程（B）

で培養した心筋細胞であり、工程（C）がある場合には、工程（C）で培養した心筋細胞である。

心筋細胞を薬剤に曝露させる方法は特に制限されず、例えば、薬剤を直接培地中に添加してもよいし、薬剤を適当な溶媒に分散又は溶解させてから培地中に添加してもよい。

前記溶媒としては、特に制限されないが、例えば、水、エタノール、メタノール、DMSOが挙げられる。

薬剤の添加濃度は、薬剤の種類に応じて決定すればよい。本発明の一態様である方法は、薬剤の濃度が低くてもその作用を検出しやすいので、薬剤の添加濃度は、例えば、非特許文献1等に記載された公知の濃度を参考にし、その濃度よりも低い濃度とすることができる。薬剤は、培地中に、例えば0.001 nM～10 mMの範囲の終濃度となるように添加することができる。

[0099] 心筋細胞を薬剤に曝露させる期間は特に制限されず、薬剤が心筋細胞に対してその作用を発揮できればよく、心筋細胞又は薬剤の種類に応じて適宜決定することができる。

曝露させる期間は、好ましくは1秒～5日間であり、より好ましくは1分～3日間であり、さらに好ましくは5分～3日間である。

培養条件は特に制限されず、公知の方法で行うことができるが、通常、温度は25～40℃程度、二酸化炭素濃度5%程度で培養する。

[0100] 工程（D）で用いる培地についての詳細は、工程（C）がない場合には、工程（B）に用いる培地と同様であり、工程（C）がある場合には、工程（C）に用いる培地と同様である。工程（D）で用いる培地は、工程（C）で用いる培地又は工程（B）に用いる培地と同じであっても、異なってもよいが、薬剤の作用を精度良く評価できることから、同じであることが好ましい。

[0101] 本発明の一態様である方法は、好ましくは、工程（C）を含み、工程（C）及び（D）は、培地（β）中で行われる。工程（C）及び（D）が培地（

β) 中で行われると、薬剤の作用、特に心毒性をより精度良く評価することができ、催不整脈性、特にEAD様波形を検出しやすい。

工程(A)及び(B)は、無血清培地(α)中で行われ、かつ、工程(C)及び(D)は、培地(β)中で行われることがより好ましい。このような培地条件で行うと、心筋細胞が培養容器(X)に接着しやすく、さらに安定して、薬剤の作用、特に心毒性をより精度良く評価することができ、催不整脈性、特にEAD様波形を検出しやすい。

[0102] [工程(E)]

工程(E)は、工程(D)で薬剤に曝露させた心筋細胞の細胞機能の指標を分析して評価する工程である。

心筋細胞の細胞機能の指標は、心筋細胞の機能を示すものであれば特に制限されず、細胞の一般的な機能の指標であっても、心筋細胞に特異的な機能の指標であってもよい。心筋細胞の細胞機能の指標は、例えば、活動電位、遺伝子発現、収縮性、サルコメア長、ナトリウムイオン、カリウムイオン、又はカルシウムイオンの細胞内濃度又はその変化、拍動、細胞生存率、ミトコンドリア機能の指標、グルコース、ピルビン酸、乳酸、ATP等のエネルギー関連物質の濃度又はその変化が挙げられる。

測定が簡便であり、また、心筋細胞の拍動を引き起こすイオンの動きを解析できることから、心筋細胞の細胞機能の指標は、好ましくはカルシウムイオンの濃度又はその変化である。カルシウムイオンの細胞内濃度の変化は、カルシウムイオンの濃度変化を示す波形として検出することができる。すなわち、心筋細胞の細胞機能の指標は、好ましくはカルシウムイオン波形である。

[0103] 心筋細胞の細胞機能の指標を分析する方法は、特に制限されない。活動電位は、例えば多電極システムによる細胞外電位解析、MEA(Multi-electrode array)解析、ホールセルパッチクランプによる細胞内電位解析などにより分析することができる。遺伝子発現は、例えば、心筋細胞に特異的な遺伝子の発現をRT-PCR法により分析することができ

る。収縮性は、例えば、モーションアナライザーにより心筋細胞の辺縁の動きから偏位速度を測定することにより分析することができる。サルコメア長は、例えば、サルコメアに存在する α -actininをGFP標識して可視化することにより分析することができる。カルシウムイオンの細胞内濃度又はその変化は、例えば、カルシウムイメージング法により分析することができる。拍動は、例えば、モーションアナライザーにより分析することができる。細胞生存率は、例えば、テトラゾリウム化合物又はミトコンドリア膜電位依存的色素を用いた細胞生存アッセイ、ATP量の測定等により分析することができる。ミトコンドリア機能の指標は、例えば、ミトコンドリア毒性、例えば、ミトコンドリア膜透過性遷移(MPT)の指標となるswellingアッセイ、電子伝達系酵素複合体の活性測定等により分析することができる。グルコース、ピルビン酸、乳酸、ATP等のエネルギー関連物質の濃度又はその変化は、例えば、グルコース、ピルビン酸、乳酸、ATP等のイメージング法により分析することができる。

[0104] カルシウムイオン波形を分析することにより、例えば、QT延長、徐脈（陰性変時作用）、頻脈（陽性変時作用）、強心（陽性変力作用）、弱心（陰性変力作用）、早期後脱分極（EAD）、遅延後脱分極（DAD）、トルサード・ド・ポワント（TdP）、トリガードアクティビティ不整脈、又はリエントリー不整脈を検出することができる。

工程（E）においては、好ましくは、カルシウムイオン波形を分析することにより、早期後脱分極（EAD）を検出する。また、工程（E）においては、好ましくは、カルシウムイオン波形を分析することにより、頻脈又は徐脈を検出する。

[0105] [その他の工程：工程（F）]

本発明の一態様である方法は、工程（E）の後に、工程（E）で得られた分析結果を、薬剤の非存在下における分析結果と比較する工程（F）を含んでもよい。工程（F）は、換言すると、工程（E）で得られた薬剤の存在下及び非存在下における細胞機能の指標を比較し、薬剤が有する作用の高低を

判定する工程である。

判定の基準は、薬剤の存在下における細胞機能の指標が、薬剤の非存在下における細胞機能の指標と比較して高い又は低いこと、若しくは変化があることを利用する。

薬剤の非存在下とは、通常、薬剤の添加前、若しくは薬剤を分散又は溶解させる溶媒のみを添加する場合をいう。

実施例

[0106] 次に本発明について実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

[0107] [重量平均分子量 (M_w) 及び分子量分布 (M_w/M_n) の測定]

実施例に用いた 4-メチル-1-ペンテン重合体の重量平均分子量 (M_w)、及び、分子量分布 (M_w/M_n) をゲルパーミュエーションクロマトグラフィー (GPC) により測定した。

具体的には、下記の条件で、オルトジクロロベンゼンに溶解したポリマーの重量平均分子量 (M_w) 及び数平均分子量 (M_n) を、標準ポリスチレンによって分子量を校正して測定した。

- ・装置：ゲル浸透クロマトグラフ HLC-8321 GPC/HT 型 (東ソー社製)
- ・データ解析ソフト：Empower 3 (Waters 社製)
- ・検出器：示差屈折計
- ・直列連結カラム：TSK gel GMH6-HT (2 本)、及び、TSK gel GMH6-HTL (2 本)
- ・カラム温度：140℃
- ・流量：1.0 mL/分
- ・試料濃度：1.5 mg/mL

[0108] [製造例 1] 基材の製造

4-メチル-1-ペンテン重合体である TPX (登録商標) (三井化学株式会社製：分子量 (M_w) = 428000、分子量分布 (M_w/M_n) = 4

、1、4-メチル-1-ペンテンから導かれる構成単位の含有量が97.2モル%であり、炭素数16の α -オレフィンから導かれる構成単位の含有量と炭素数18の α -オレフィンから導かれる構成単位の含有量の合計が2.8モル%である)を使用し、基材層を押し出すフルフライト型のスクリーを備えたTダイ付き押出機へ投入し、押出し温度を270℃、ロール温度を60℃に設定し、ロール回転速度の条件を変えて押出し成形することで、厚さ50 μ mのフィルム1を得た。

[0109] 前記フィルム1を測定サンプルとして、東洋精機製作所製差圧式ガス透過率測定装置MT-C3を用いて温度23℃、湿度0%の環境下にて酸素透過係数 $[cm^3 \times mm / (m^2 \times 24h \times atm)]$ を測定した。測定部径は70mm(透過面積は38.46 cm^2)とした。酸素透過係数が大きいことが予想されたため、予めサンプルにアルミニウムマスクを施し、実透過面積を5.0 cm^2 とした。酸素透過係数は、1912 $cm^3 \times mm / (m^2 \times 24h \times atm)$ であった。

[0110] 前記フィルム1は常圧プラズマ表面処理装置(積水化学工業製)を用いて、チャンバー内を窒素の気流で満たしプラズマ処理した(処理速度2m/min、出力4.5kW、2往復)。

[0111] プラズマ処理済のフィルム1を測定サンプルとして、水接触角の測定を行った。水接触角の測定は、日本工業規格JIS-R3257(基板ガラス表面のぬれ性試験方法)に準じて行った。25 $\pm$ 5℃、50 $\pm$ 10%の恒温恒湿条件下で水滴の形状を球形とみなせる4 μ L以下の容量の水滴を、測定サンプルの表面に滴下し、静滴法により、測定サンプル表面に水滴が接触した直後から1分以内の測定サンプルと水滴の接触界面の角度を測定した。プラズマ処理済のフィルム1の水接触角は、60.3°であった。

[0112] [製造例2] 培養容器の作製

前記プラズマ処理済のフィルム1を8cm $\times$ 12cmサイズにカットし、ポリスチレン(PSとも称す)製96ウェル容器枠の底面に、医療用粘着剤(スリーエム製)を介して密着させて96ウェルの培養プレートを作製した

。その後、耐ガンマ線袋に梱包して10kGyのガンマ線を照射し滅菌した。これをTプレートとした。1ウェルの培養面積は約0.32cm²であった。

[0113] Tプレートの比較対照として、TCPS (Tissue Culture Polystyrene) 製96ウェルプレート (CellBIND、Corning社製、製品番号3300、「Cプレート」ともいう)、PDMS (Polydimethylsiloxane) 製96ウェルプレート (VECELL社製、製品番号V96WGPB、Vプレートともいう、酸素透過係数19121 [cm³×mm / (m²×24h×atm)]、底面厚さ350μm)、TCPS製96ウェルプレート (Greiner社製、製品番号655090、「Gプレート」ともいう) を用いた。

[0114] [培地・試薬の調製]

液体窒素中で凍結保存したヒトiPS細胞由来心筋細胞GCaMP導入株 (株式会社マイオリッジ製、製品番号G-011106) を用いた。この細胞は、ヒトiPS細胞をプロテインフリー心筋分化誘導 (PFCD) 法により分化誘導開始して37日目の心筋細胞であり、カルシウムセンサーとして、GCaMPを恒常的に発現するように遺伝子導入されている。

[0115] 使用試薬は以下の通りである。すべて冷蔵保存した。

・CDI維持培地 (iCell心筋細胞維持用培地、FUJIFILM CellularDynamics社製、557-33591)

・CDI解凍／播種用培地 (iCell心筋細胞解凍用培地、FUJIFILM CellularDynamics社製、550-33581)

[0116] ・特製維持培地 (Carmy A維持用培地UG、マイオリッジ社製、ME-01A00241、液体培地と付属サプリメントとに分けて供給され、液体培地と付属サプリメントとを混合してから使用する。培地(β)に該当する。)

リゾホスファチジルコリン11.3μg/mL、トリアシルグリセリド9.79μg/mL、ホスファチジルコリン5.29μg/mL、ホスファチ

ジン酸 $2.07 \mu\text{g/mL}$ 、コレステロール $0.88 \mu\text{g/mL}$ 、及びスフィンゴミエリン $0.80 \mu\text{g/mL}$ を含有する。また、遊離脂肪酸 $35.29 \mu\text{g/mL}$ を含有する。

・Carmy A 特製播種用培地 (Carmy A 播種用培地キットUG、マイオリッジ社製、ME-02A00211。無血清培地 (α) に該当する。)

・特製基礎培地 (Carmy A 播種用培地キットUG、マイオリッジ社製、ME-02A00211 に付属する無血清培地)

[0117] ・iMatrix-511 silk (製品番号387-10131、Nippi 社製)

・Culture Sure™ Y-27632 (製品番号034-24024、富士フイルム和光純薬社製、ロット番号KCG7025)

[0118] ・イソプロテレノール (Isoproterenol) (東京化成工業社製)

・ベプリジル (Bepridil) (キッセイ薬品工業社製)

・ペンタミジン (Pentamidine) (キッセイ薬品工業社製)

・E-4031 キッセイ薬品工業社製

・ベラパミル (Verapamil) キッセイ薬品工業社製

・リスペリドン (Risperidone) 富士フイルム和光純薬株式会社製

・テルフェナジン (Terfenadine) Sigma-Aldrich 社製

・ラノラジン (Ranolazine) 東京化成工業株式会社製

・DMSO (富士フイルム和光純薬社製)

[0119] [カルシウムトランジェント解析方法]

蛍光顕微鏡システムIX83 (オリンパス社製) を用いて、GCaMP 蛍光強度の変化をカルシウムトランジェントとして測定し、解析にはCarmy-Analyzerソフトウェア (マイオリッジ社製) を使用した。

[0120] [参考例1、2] 試験用プレートの材質の違いによる、心筋細胞特異的な遺

伝子発現量の変化

(方法)

試験用プレートとして、Cプレート（参考例1）、Tプレート（参考例2）を用いて、心筋細胞特異的な遺伝子発現量を比較した。

<培養スケジュール>

細胞培養は下記のスケジュールで行った。細胞起眠日をDay 0として以降の日を表す。

Day - 1 : 試薬調製及び準備

Day 0 : 凍結心筋細胞起眠、プレートのプレコート、試験用96ウェルプレートへの播種、培養

Day 1 ~ 5 : 1日おきに150 μ LのCD1維持培地で培地交換して培養

Day 7 ~ 13 : 1日おきに200 μ LのCD1維持培地で培地交換して培養

Day 14 : 遺伝子発現解析

[0121] <試験用プレートのiMatrix-511 silkコーティング方法>

PBS (-) 9 mLに70 μ LのiMatrix-511 silkを添加して希釈し、コーティング液とした。コーティング液を100 μ L/well（使用濃度1.21 μ g/cm²）で試験用96ウェルプレートに添加し、37℃インキュベーター中で1時間静置した。細胞を播種する前に、アスピレーションで除去した。

[0122] <凍結心筋細胞の起眠と播種>

CD1解凍/播種用培地にY-27632を終濃度10 μ Mになるように添加し、解凍用培地として用いた。使用時に37℃に加温してから使用した。

凍結心筋細胞を37℃のウォーターバスで解凍し、解凍用培地に懸濁した。300 $\times$ gで5分間遠心し、上清を除去した。解凍用培地で細胞を懸濁し、 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells/mLに調整後、細胞数をカウントし、iMatrix-511 silkコーティングした試験用96ウェルプレート

に 8×10^4 cells/well で細胞を播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ インキュベーター内に静置した。実験は triplicate で行った。

[0123] <RNA抽出とRT-qPCR>

cTnT、MYL2、Kir2.1、PGC1 α (PPARGC1A) 及び GAPDH を解析対象とした。

[0124] (1) 試薬及び機器

RNA抽出: miRNeasyMiniKit (製品番号217004、キアゲン社製)

cDNA合成: ReverTraAce (R) qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (製品番号FSQ-301、TOYOBO社製)

qPCR反応: PowerUp SYBRGreenMasterMix (製品番号A25776、ThermoFisher社製)

QuantStudio6 FlexReal-timePCRsystem (ThermoFisher社製)

Nanophotometer 分光光度計C40 (ワケンビーテック株式会社製)

[0125] (2) RNA抽出

心筋細胞の培養上清を除去した後、QIAzol (キアゲン社製) を添加し、懸濁して細胞を溶解し、溶解物をチューブに回収した。以降はmiRNeasyMiniKitに添付のプロトコルに従ってRNAを抽出し、Nanophotometer 分光光度計C40でRNA濃度を測定した。

[0126] (3) RT-qPCR

上記で抽出したRNA 253 ngを用いて、PowerUp SYBRGreenMasterMixに添付のプロトコルに従って逆転写反応を行いcDNAの合成を行った。その後、6 ngのcDNAを用いてスタンダード法にてqPCR反応を行った。検量線は $10 \text{ ng} / \mu\text{L}$ の各cDNAサンプルを $10 \mu\text{L}$ ずつ集め、そこから $1 / 10$ 希釈して5点作製した。

[0127] <遺伝子発現の評価>

細胞から抽出したRNAを用い、Quant Studio 6 Flex Real-time PCR systemにて遺伝子発現量の解析を行った。使用したプライマーの配列を表1に、PCRの条件を表2に示す。

[0128] [表1]

遺伝子名	方向	配列(5'-3')	配列番号
GAPDH	Fw	ATTGCCCTCAACGACCACTTTG	1
	Rv	TCTTCCTCTTGTGCTCTTGCTG	2
cTnT	Fw	GAAGGACCTGAATGAGTTGCAG	3
	Rv	ACGTCTCTCGATCCTGTCTTTG	4
PPARGC1A	Fw	TGTACTTTTGTGGACGCAAGC	5
	Rv	AGCAGGGTCAAAGTCATCTGAG	6
MYL2	Fw	AGGCTCCGGGTCCAATTAAC	7
	Rv	TTGCCTTCAGGGTCAAACAC	8
Kir2.1	Fw	TGGTTTGCTTTGGCTCACTC	9
	Rv	ACTCAGCTGACATCCAGAGAAC	10

[0129] [表2]

ステップ	温度	持続時間	サイクル数
UDG活性化	50℃	2分	ホールド
Dual Lock DNAポリメラーゼ	95℃	2分	ホールド
変性	95℃	15秒	40
アニーリング/伸長	60℃	1分	

[0130] (結果)

遺伝子発現量を解析した結果を図1に示す。遺伝子発現量は、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の遺伝子発現量を1とした場合の相対値とし、±SD (n=3) で示した。

Tプレートを用いた場合(参考例2)は、cTnT、MYL2、Kir2.1、及びPGC1 α (PPARGC1A) の発現量は、Cプレート(参考例1)よりも多かった。この結果から、Tプレートを用いて心筋細胞を培養すると、心筋細胞特異的な遺伝子の発現が上昇し、心筋細胞の機能を向上さ

せ得ることが明らかになった。

[0131] [実施例 1～9、比較例 1～9] 試験用プレートの材質の違いによる、薬剤応答性の変化（方法）

試験用プレートとして、Cプレート（比較例 1～9）、Tプレート（実施例 1～9）を用いて、薬剤を添加し、カルシウムトランジェントを解析した。

<培養スケジュール>

細胞培養は下記のスケジュールで行った。細胞起眠日を Day 0 として以降の日を表す。

Day - 1 : 試薬調製及び準備

Day 0 : 凍結心筋細胞起眠、プレートのプレコート、及び試験用 96 ウェルプレートへの播種（工程（A））、培養（工程（B））

Day 1 : CD1 維持培地で培地交換して培養（工程（C））

Day 4～13 : 2 日おきに特製維持培地で培地交換して培養（工程（C））

Day 14 : 特製維持培地を用いて、薬剤添加、及びカルシウムトランジェント解析（工程（D）、工程（E））

[0132] <試験用プレートの iMatrix-511 silk コーティング方法>

特製基礎培地 3 mL に 19.2 μ L の iMatrix-511 silk を添加して希釈し、コーティング液とした。コーティング液を 100 μ L/well（使用濃度 1 μ g/cm²）で試験用 96 ウェルプレートに添加し、37℃インキュベーター中で 1 時間静置した。コーティング液は除去せずに、コーティング液を残したまま、心筋細胞を播種した。

[0133] <凍結心筋細胞の起眠と播種>

Carmy A 特製播種用培地に Y-27632 を終濃度 10 μ M になるように添加し、特製解凍播種用培地として用いた。使用時に室温して使用した。

凍結心筋細胞を 37℃のウォーターバスで解凍し、特製解凍播種用培地に

懸濁した。300×gで5分間遠心し、上清を除去した。特製解凍播種用培地で細胞を懸濁し、 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ に調整後、細胞数をカウントし、iMatrix-511 silkコーティングした試験用96ウェルプレートに $6 \times 10^4 \text{ cells/well}$ （培地量200 μL ）で細胞を播種し、37℃、5%CO₂インキュベーター内に静置した。実験はtriplicateで行った。

[0134] <薬剤添加>

薬剤は、DMSOを終濃度0.1%、ベプリジルを終濃度1 μM 、2 μM 、4 μM 、ペンタミジンを終濃度11.1 μM 、33.3 μM 、100 μM 、イソプロテレノールを終濃度20 nM、100 nM、500 nMとなるように添加した。

Tプレートにおいて、ベプリジルを終濃度1 μM 、2 μM 、4 μM 、ペンタミジンを終濃度11.1 μM 、33.3 μM 、100 μM 、イソプロテレノールを終濃度20 nM、100 nM、500 nMとなるように添加したものをそれぞれ、実施例1～9とした。

Cプレートにおいて、ベプリジルを終濃度1 μM 、2 μM 、4 μM 、ペンタミジンを終濃度11.1 μM 、33.3 μM 、100 μM 、イソプロテレノールを終濃度20 nM、100 nM、500 nMとなるように添加したものをそれぞれ、比較例1～9とした。

[0135] (結果)

0.1%DMSOの結果を図2、1 μM ベプリジルの結果を図3、1 μM ベプリジルの結果のEAD様波形を拡大した結果を図4、2 μM ベプリジルの結果を図5、4 μM ベプリジルの結果を図6、11.1 μM ペンタミジンの結果を図7A、図7B、33.3 μM ペンタミジンの結果を図8A、図8B、100 μM ペンタミジンの結果を図9A、図9B、20 nMイソプロテレノールの結果を図10、100 nMイソプロテレノールの結果を図11、500 nMイソプロテレノールの結果を図12に示す。Preは薬剤添加前、Postは薬剤添加後を示す。

DMSO、ベプリジル、又はペンタミジンを添加した場合は、添加10分後の結果を示す。イソプロテレノールを添加した場合は、添加10分後、24時間後、48時間後の結果を示す。

[0136] 0.1%DMSOを添加しても、Tプレート、Cプレートのいずれの場合も、わずかに蛍光強度が増加したが、カルシウムイオン波形には影響しないことを確認した(図2)。

[0137] Tプレートにおいて、1 μ Mベプリジルを添加したところ(実施例1)、3ウェル中2ウェルで、微弱ではあるがEAD(早期後脱分極、early after depolarization)様波形が検出された(図3、図4)。Tプレートにおいてベプリジルの濃度を2 μ Mに増加させても(実施例2)、EAD様波形がより顕著に検出されることはなく(図5)、4 μ Mに増加させると(実施例3)、拍動様波形は検出されなくなった(図6)。一方、Cプレートにおいては、ベプリジルの濃度を1 μ M、2 μ M、4 μ Mと変化させても(比較例1~3)、EAD様波形は検出されなかった(図3、図4、図5、図6)。

[0138] ベプリジルは、狭心症の治療に用いられるカルシウム拮抗薬の一つであるが、副作用としてtorsadepointes(TdP)といわれる致死性の心室性不整脈を誘発することが知られている。しかし、その催不整脈作用はiPS細胞を分化させた心筋細胞等を用いたin vitroの試験系では検出が難しいとされている。しかし、実施例1においては、torsadepointes(TdP)のきっかけとなるEAD様波形を検出することができ、ベプリジルの催不整脈作用を検出できることが明らかになった。

[0139] 11. 1 μ Mペンタミジンを添加したところ、Tプレートでは(実施例4)、添加24時間後に不整脈が検出されたが(図7A)、Cプレートでは(比較例4)不整脈は検出されなかった(図7B)。ペンタミジンの濃度を33.3、100 μ Mとあげると、Tプレートにおいても不整脈は検出できなかった(実施例5、6、図8A、図9A)。Cプレートでは100 μ Mペン

タミジンを添加したところ（比較例 6）、10 分後に、急性の不整脈が検出された（図 9 B）。

[0140] ペンタミジンは、抗菌薬の 1 つであるが、不整脈を誘発する作用が知られており、その作用メカニズムは、hERG (human ether-a-go-go related gene) タンパク質の膜移行（トラフィッキング）阻害によるものとされている。そのため、ペンタミジンが、催不整脈作用を発現するためには、長時間曝露を必要とすることが知られている。

実施例 4 で不整脈が検出されたのがペンタミジン添加 24 時間後であることは、ペンタミジンの作用メカニズムを考慮すると合理的であるため、T プレートにおいては、ペンタミジンの hERG タンパク質の膜移行（トラフィッキング）阻害作用を検出できていると考えられる。一方、C プレート（比較例 6）で検出された急性の不整脈は、ペンタミジン添加 10 分後であったから、hERG タンパク質の膜移行（トラフィッキング）阻害作用とは異なる非特異的な作用の可能性が高い。T プレートでは、このような非特異的な作用が見られなかったことから、T プレートをを用いると、薬剤の作用を評価する際に偽陽性を減らすことができることが示唆された。

[0141] 20 nM イソプロテレノールを添加したところ、T プレート（実施例 7）では、頻脈化が安定して確認できた（図 10）。一方、C プレート（比較例 7）では頻脈化は確認できたものの、カルシウムイオン波形が乱れ、安定していなかった。100、500 nM とイソプロテレノールの濃度をあげた場合には、T プレート（実施例 8、9）においては頻脈化が安定して確認でき、C プレート（比較例 8、9）においても頻脈化のパターンが安定して確認できた（図 11、図 12）。

[0142] イソプロテレノールは、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 受容体アゴニストであり、心拍数増加作用（頻脈化作用）を有する。T プレートをを用いると、C プレートに比べ、イソプロテレノールが低濃度であっても、心拍数増加作用（頻脈化作用）を安定して検出することができた。T プレートをを用いると、C プレートに比べて、薬剤の作用をより高感度で評価できると考えられる。

[0143] [参考例3、4、5] 酸素透過性の高い試験用プレートの検討（方法）

酸素透過性の高いPDMS製の試験用プレートを用いて、心筋細胞培養への影響を検討した。試験用プレートとしてGプレート（TCPS製、参考例3）、Tプレート（参考例4）、Vプレート（PDMS製、参考例5）を用いた。

[0144] <培養スケジュール>

細胞培養は下記のスケジュールで行った。細胞起眠日をDay 0として以降の日を表す。

Day - 1 : 試薬調製及び準備

Day 0 : 特製解凍播種用培地を用いて、凍結心筋細胞起眠、プレートのプレコート、試験用96ウェルプレートへの播種、培養

Day 1 : 特製維持培地で培地交換して培養

Day 3 ~ 13 : 2日おきに特製維持培地で培地交換して培養

Day 6 : 顕微鏡観察

[0145] 試験用プレートのiMatrix-511silkコーティング、凍結心筋細胞の起眠と播種は、特製解凍播種用培地を用いたこと以外は、実施例1~9と同様にして行った。

播種6日後に顕微鏡を用いて明視野で細胞を観察し、写真を撮影した。また、蛍光顕微鏡でも観察して動画及び静止画を撮影した。

[0146] （結果）

播種6日後において細胞を観察した写真を図13に示す。左は、Gプレートを用いた参考例3、中央はTプレートを用いた参考例4、右はVプレートを用いた参考例5の写真である。Gプレートを用いた参考例3、Tプレートを用いた参考例4では、心筋細胞は試験用プレートに十分に接着していた。また、蛍光観察したところ、同期した拍動様波形が検出された。一方、Vプレートを用いた参考例5では、心筋細胞は試験用プレートに十分に接着しておらず、細胞塊が見られた。また、蛍光観察したところ、同期した拍動様波形は検出されなかった。

[0147] この結果から、試験用プレートが酸素透過性の高いPDMS製であっても、心筋細胞の培養、特に拍動様波形の検出は不可能であることが明らかになった。

[0148] [実施例10～17、比較例10～17] 培地の検討
(方法)

試験用プレートとしてTプレート又はGプレートを用い、播種1日目以降の培地として、特製維持培地又はCD1維持培地を用いて薬剤添加し、カルシウムトランジェントを解析した。

<培養スケジュール>

細胞培養は下記のスケジュールで行った。細胞起眠日をDay 0として以降の日を表す。

Day - 1 : 試薬調製及び準備

Day 0 : 特製基礎培地を用いて、プレートのプレコートをおこない、特製解凍播種用培地を用いて、凍結心筋細胞起眠、試験用96ウェルプレートへの播種(工程(A))、培養(工程(B))

Day 1 : 特製維持培地または、CD1維持培地で培地交換して培養(工程(C))

Day 3～13 : 2日おきに特製維持培地又はCD1維持培地で培地交換して培養(工程(C))

Day 14 : 培地交換、薬剤添加、カルシウムトランジェント解析(工程(D)、工程(E))

[0149] <培地>

試験用プレートのiMatrix-511silkコーティングは、特製基礎培地でおこなった。凍結心筋細胞の起眠と播種は、特製解凍播種用培地を用いて行った。

播種1日目以降の培地交換、薬剤添加、及びカルシウムトランジェント解析に用いる培地を特製維持培地又はCD1維持培地とした。

[0150] <薬剤添加>

薬剤は、DMSOを終濃度0.1%、ベプリジルを終濃度0.06 μ M、0.25 μ M、1 μ M、4 μ Mとなるようにそれぞれ添加した。

Tプレートにおいて、播種1日目以降の培地として特製維持培地を用いて、ベプリジルを終濃度0.06 μ M、0.25 μ M、1 μ M、4 μ Mとなるように添加したものをそれぞれ、実施例10～13、播種1日目以降の培地としてCD1維持培地を用いて、ベプリジルを終濃度0.06 μ M、0.25 μ M、1 μ M、4 μ Mとなるように添加したものをそれぞれ、実施例14～17とした。

Gプレートにおいて、播種1日目以降の培地として特製維持培地を用いて、ベプリジルを終濃度0.06 μ M、0.25 μ M、1 μ M、4 μ Mとなるように添加したものをそれぞれ、比較例10～13、播種1日目以降の培地としてCD1維持培地を用いて、ベプリジルを終濃度0.06 μ M、0.25 μ M、1 μ M、4 μ Mとなるように添加したものをそれぞれ、比較例14～17とした。

[0151] (結果)

結果を図14～図23に示す。「特製維持培地」とは、播種1日目以降の培地として特製維持培地を用いた場合、「CD1」とは播種1日目以降の培地としてCD1維持培地を用いた場合を示す。Preは薬剤添加前、Postは薬剤添加後を示す。

[0152] 0.1%DMSOを添加すると、Tプレートの場合、わずかに蛍光強度が増加したが、カルシウムイオン波形には影響しなかった(図14)が、Gプレートの場合、カルシウムイオン波形に乱れが観察された(図15の特製維持培地Postの一番下)。

Tプレートの方が、Gプレートよりも拍動様波形が安定しており、シグナルが増強されていた。また、Tプレートにおいて播種1日目以降の培地として特製維持培地を用いた場合、CD1維持培地を用いた場合よりもさらに拍動様波形が安定して検出され、シグナルが増強されていた。

[0153] Tプレートにおいて、ベプリジルを0.06 μ M又は0.25 μ M添加し

た場合（実施例 10、11、14、15）も、Gプレートにおいて、ベプリジルを $0.06\ \mu\text{M}$ 又は $0.25\ \mu\text{M}$ 添加した場合（比較例 10、11、14、15）も、カルシウムイオン波形の乱れは検出されなかった（図 16、図 17、図 18、図 19）。

[0154] Tプレートにおいて、播種 1 日目以降の培地として特製維持培地を用いた場合、ベプリジルを $1\ \mu\text{M}$ 添加すると（実施例 12）、微弱ではあるが EAD（早期後脱分極、early after depolarization）様波形が検出された（図 20）。Tプレートにおいて、播種 1 日目以降の培地としてCD1維持培地を用いた場合、ベプリジルを $1\ \mu\text{M}$ 添加すると（実施例 16）、EAD様波形は検出されなかったが、QT延長は検出された（図 20）。

Gプレートにおいて、播種 1 日目以降の培地として特製維持培地を用いた場合、ベプリジルを $1\ \mu\text{M}$ 添加すると（比較例 12）、ウェルによっても異なるが、カルシウムイオン波形が乱れ、拍動様波形は検出されなくなり、EAD様波形も、QT延長も検出されなかった。Gプレートにおいて、播種 1 日目以降の培地としてCD1維持培地を用いた場合、ベプリジルを $1\ \mu\text{M}$ 添加すると（比較例 16）、カルシウムイオン波形は安定していたが、EAD様波形も、QT延長も検出されなかった（図 21）。

[0155] Tプレートにおいてベプリジルの濃度を $4\ \mu\text{M}$ に増加させると（実施例 14、17）、培地の種類にかかわらず、拍動様波形は検出されなくなった（図 22）。Gプレートにおいても同様に、ベプリジルの濃度を $4\ \mu\text{M}$ に増加させると（比較例 14、17）、培地の種類にかかわらず、拍動様波形は検出されなくなった（図 23）。

[0156] [実施例 18～実施例 21] 薬剤添加直前における培地交換及びベラパミルの検討

試験用プレートとしてTプレートを用い、薬剤添加直前における培地交換の影響を検討した。また、試験用プレートとしてTプレートを用い、ベラパミルの、心筋細胞に対する作用を評価できるかを検討した。

(方法)

<試験スケジュール>

Day - 1 : 試薬調製及び準備

Day 0 : 特製基礎培地を用いて、Tプレートのプレコートをおこない、特製解凍播種用培地を用いて、凍結心筋細胞起眠、試験用96ウェルプレートへの播種(工程(A))、培養(工程(B))

Day 1 : 特製維持培地で培地交換して培養(工程(C))

Day 4 ~ 13 : 2日おきに特製維持培地で培地交換して培養(工程(C))

Day 14 : 培地交換、薬剤添加、カルシウムトランジェント解析(工程(D)、工程(E))

[0157] <Day 14の詳細>

<培地交換>

培地交換A: プレート内の特製維持培地を除去し、新しい特製維持培地を添加した。

培地交換B: プレート内の特製維持培地を除去し、新しい特製維持培地を添加して、すぐに除去した後、再度、新しい特製維持培地を添加した。

[0158] <薬剤添加>

培地交換AまたはBを行ったプレートに、培地交換の約30分後に薬剤(ベラパミル)を添加した。薬剤は、DMSOに溶解して10mMストックソリューションを作製し、10mMストックソリューションを目標とする最終濃度の10倍濃度となるように特製維持培地で希釈して、添加用薬剤液とした。添加用薬剤液は、測定培地量の10分の1量を測定培地中に添加した。例えば、終濃度10nMでベラパミルを添加する場合、10mMストックソリューションを特製維持培地で希釈して100nMの添加用薬剤液を作製し、測定培地150μLに対して、添加用薬剤液を15μL添加した。対照群にはDMSOを終濃度0.1%で添加した。

[0159] 培地交換AまたはBを行い、ベラパミルを終濃度10nMとなるように添

加したものをそれぞれ、実施例 18、19とした。

培地交換 A または B を行い、ベラパミルを終濃度 100 nM となるように添加したものをそれぞれ、実施例 20、21とした。

[0160] <カルシウムトランジェント解析>

薬剤添加の 10～30 分後にカルシウムトランジェント解析を行った。

[0161] (結果)

ベラパミルを終濃度 10 nM で添加した結果を図 24、ベラパミルを終濃度 100 nM で添加した結果を図 25 に示す。Pre は薬剤添加前、Post は薬剤添加後を示す。図 24 A は培地交換 A の Pre、図 24 B は培地交換 B の Pre、図 24 C は培地交換 A の Post、図 24 D は培地交換 B の Post の結果である。図 25 A は培地交換 A の Pre、図 25 B は培地交換 B の Pre、図 25 C は培地交換 A の Post、図 25 D は培地交換 B の Post の結果である。

[0162] 10 nM ベラパミルを添加したところ、培地交換 A および B のいずれの場合も波形の変化は見られなかった (図 24)。100 nM ベラパミルを添加したところ、培地交換 A および B のいずれの場合も、Pre に比べ Post では、Intensity が小さく変化、言い換えると、心筋細胞の収縮性が減弱しており、ベラパミルの弱心作用 (陰性変力作用) が検出された (図 25)。

[0163] ベラパミルは、カルシウムイオンチャネルブロッカーである。ベラパミルは、心筋細胞内のカルシウムイオン濃度を低下させ、心筋細胞の収縮性を減弱させる弱心作用 (陰性変力作用)、及び QT 短縮作用を有することが知られている。ベラパミルは、臨床的な TdP のリスクレベルが低リスクであり、iPS 細胞を分化させた心筋細胞を用いた、従来の催不整脈モデルでも TdP のリスクレベルが低く予測される薬剤である。

本発明の一態様である方法により、ベラパミルの弱心作用 (陰性変力作用) を検出することができた。

[0164] 培地交換 A と B による差は見られなかった。

[0165] [実施例 2 2～実施例 5 3] その他の薬剤の検討

次に、試験用プレートとして T プレートを用い、播種 1 日目以降の培地として特製維持培地を用いて、その他の薬剤の、心筋細胞に対する作用を評価できるかを検討した。

文献 A では、臨床的な T d P のリスクレベル（高リスク、中リスク、低リスクまたは無リスク）が知られている 2 8 の薬物について、電気生理学的反応の濃度依存性と変動要因を評価し、ヒト i P S 細胞を分化させた心筋細胞の *i n v i t r o* 催不整脈モデルとしての有用性を評価している。

臨床的な T d P のリスクレベルと、i P S 細胞を分化させた心筋細胞を用いた催不整脈モデルで推測されるリスクレベルとは、相関する薬剤が多いが、例外的な薬剤、すなわち、i P S 細胞を分化させた心筋細胞を用いた、従来の催不整脈モデルではリスクレベルの予測が困難である薬剤も存在している（文献 A F i g u r e 6）。そこで、i P S 細胞を分化させた心筋細胞を用いた、従来の催不整脈モデルではリスクレベルの予測が困難である薬剤の作用を、本発明の一態様である方法で評価した。

具体的には、臨床的な T d P のリスクレベルが高リスク又は中リスクであるのに、i P S 細胞を分化させた心筋細胞を用いた、従来の催不整脈モデルでは T d P のリスクレベルが低く予測されてしまう薬剤の代表例としてベプリジル、リスペリドン、テルフェナジンをを用いた。また、臨床的な T d P のリスクレベルは低リスクであるのに、i P S 細胞を分化させた心筋細胞を用いた、従来の催不整脈モデルでは T d P のリスクレベルが高く予測されてしまう薬剤の代表例としてラノラジンをを用いた。

[0166] (方法)

<試験スケジュール>

D a y - 1 : 試薬調製及び準備

D a y 0 : 特製基礎培地を用いて、T プレートのプレコートをおこない、特製解凍播種用培地を用いて、凍結心筋細胞起眠、試験用 9 6 ウェルプレートへの播種（工程（A））、培養（工程（B））

Day 1 : 特製維持培地で培地交換して培養 (工程 (C))

Day 4 ~ 13 : 2日おきに特製維持培地で培地交換して培養 (工程 (C))

Day 14 : 培地交換、薬剤添加、カルシウムトランジェント解析 (工程 (D)、工程 (E))

[0167] <薬剤添加>

実施例 18 ~ 21 と同様の方法で薬剤を添加した。

ベラパミルを終濃度 60 nM、250 nM、1000 nM、4000 nM となるように添加したものをそれぞれ、実施例 22、実施例 23、実施例 24、実施例 25 とした。

E-4031 を終濃度 1 nM、10 nM、100 nM、1000 nM となるように添加したものをそれぞれ、実施例 26、実施例 27、実施例 28、実施例 29 とした。

ベプリジルを終濃度 60 nM、250 nM、1 μ M、40 μ M となるように添加したものをそれぞれ、実施例 30、実施例 31、実施例 32、実施例 33 とした。

ベプリジルを終濃度 312 nM、1.25 μ M、5 μ M、20 μ M となるように添加したものをそれぞれ、実施例 34、実施例 35、実施例 36、実施例 37 とした。

リスペリドンを終濃度 1 nM、10 nM、0.1 μ M、1 μ M となるように添加したものをそれぞれ、実施例 38、実施例 39、実施例 40、実施例 41 とした。

リスペリドンを終濃度 60 nM、250 nM、1 μ M、4 μ M となるように添加したものをそれぞれ、実施例 42、実施例 43、実施例 44、実施例 45 とした。

テルフェナジンを終濃度 0.25 nM、1 nM、4 nM、16 nM となるように添加したものをそれぞれ、実施例 46、実施例 47、実施例 48、実施例 49 とした。

ラノラジンを終濃度 10 nM、100 nM、1000 nM、10000 nM となるように添加したものをそれぞれ、実施例 50、実施例 51、実施例 52、実施例 53 とした。

[0168] <カルシウムトランジェント解析>

実施例 18～21 と同様の方法でカルシウムトランジェント解析を行った。

[0169] <CAD30 及び CAD80>

カルシウムトランジェント解析で得られた波形から、CAD30 (CaD30、calcium transient duration at 30%) 及び CAD80 (CaD80、calcium transient duration at 80%) を算出した。Intensity のピークの最小値が測定された時間を t_0 とした。ピークの最小値を 0、ピーク最大値を 1 としたときの、ピーク最大値から 30% 減少した値 (0.7) が測定された時間までの t_0 からの経過時間を CAD30、80% 減少した値 (0.2) が測定された時間までの t_0 からの経過時間を CAD80 とした。概念図を図 26 に示す。

CAD30 及び CAD80 は、図 26 にその概念図を示す通り、QT 時間の指標となる値である。対照に比べて、CAD30 と CAD80 の両方、またはどちらか一方が延長している場合は QT 延長、CAD30 と CAD80 の両方、またはどちらか一方が短縮している場合は、QT 短縮しているといえる。

[0170] (結果)

結果を図 27～図 42 に示す。Pre は薬剤添加前、Post は薬剤添加後を示す。

(ベラパミルについて)

図 27 より、60 nM、250 nM ベラパミルでは Intensity が Pre と Post でほとんど変化がなかった。データは示していないが、対照群 (DMSO を添加) では、Pre に比べて Post で Intensity

yが増加したことを考慮すると、60 nM、250 nMベラパミルではIntensityの増加が抑制されたといえる。つまり、ベラパミルはIntensityを小さく、言い換えると、心筋細胞の収縮性を減弱させており、ベラパミルの弱心作用（陰性変力作用）が検出された。1000 nMでは、ベラパミルの弱心作用（陰性変力作用）がはっきりと検出された（図27）。図28より、1000 nM、4000 nM ベラパミルでは、Preに比べてPostでは、CAD30及びCAD80が減少した。すなわち、ベラパミルはQTを短縮した。また、これらの作用はベラパミルの濃度依存的であった。

本発明の一態様である方法により、ベラパミルの弱心作用（陰性変力作用）及びQT短縮作用を検出することができた。

[0171] (E-4031について)

E-4031はカリウムイオンチャネルブロッカーであり、EAD及びTdPを誘発することが知られている。E-4031は、臨床的なTdPのリスクレベルが高リスクであり、iPS細胞を分化させた心筋細胞を用いた、従来の催不整脈モデルでもTdPのリスクレベルが高く予測される薬剤である。

図29、図30より、10 nMからQT延長が観察され、100 nMにおいて、QT延長はより顕著であり、E-4031の催不整脈作用を濃度依存的に検出できた。

本発明の一態様である方法により、E-4031の催不整脈作用を検出することができた。

[0172] (ベプリジルについて)

ベプリジルは、元々は抗狭心症薬として承認されたカルシウム拮抗薬であるが、IV群に分類される抗不整脈薬（Vaughan Williams 分類による）でもある。ベプリジルは、カルシウムイオンチャネルだけでなく、ナトリウムイオンチャネル及びカリウムイオンチャネルも抑制する、いわゆるmulti-ion channel blocking作用を持つ。

ベプリジルは、カリウムイオンチャネル抑制作用に基づくQT延長及びtorsades de pointes (TdP) を誘発することが知られている。

図31、図32より、60 nM～4000 nMのベプリジル添加により、QT延長が検出されたが、濃度依存性は見られなかった。1 μMにおいては、EAD様波形が検出された。次に、ベプリジルの濃度範囲をより狭くして実験を行った。図33、図34より、312 nM、1250 nMのベプリジル添加により、QT延長が検出された。

本発明の一態様である方法により、ベプリジルの催不整脈作用を検出することができた。

[0173] (リスペリドンについて)

リスペリドンは、ドーパミン2受容体とセロトニン2A受容体の拮抗作用を有する非定型抗精神病薬であるが、QT延長を誘発することが知られている。

[0174] 図35、図36より、1 nM～1 μMのリスペリドン添加により、濃度依存的なQT延長が検出された。そこで、リスペリドンの濃度範囲を変更して実験を行った。図37、図39より、60 nM、250 nM、1000 nMのリスペリドン添加により、濃度依存的なQT延長が検出され、特に250 nMにおいては、EAD様波形も検出された(図37矢印)。

本発明の一態様である方法により、リスペリドンの催不整脈作用を検出することができた。

[0175] (テルフェナジンについて)

テルフェナジンは、ヒスタミンH1受容体拮抗薬であるが、QT延長、TdPを起こし、心停止を起こす報告が相次いだために市場から撤退した。現在では、テルフェナジンの活性代謝物であり、催不整脈作用のないフェキソフェナジンが後継の抗アレルギー薬として汎用されている。

[0176] 図39、図40より、0.25 nM～16 nMのテルフェナジン添加により、濃度依存的なQT延長は検出されなかった。しかし、4 nMにおいては

、異常波形が検出された（図39矢印）。

本発明の一態様である方法により、テルフェナジンの催不整脈作用を検出することができた。

[0177] （ラノラジンについて）

ラノラジンはナトリウムイオンチャネルブロッカーである。ラノラジンは、*in vivo*で不整脈を引き起こすリスクは低いが、*iPS*細胞を分化させた心筋細胞ではQT延長が検出され、催不整脈作用を有するものとして判定されてしまうことが知られている。すなわち、ラノラジンは、従来の*iPS*細胞を分化させた心筋細胞を用いた催不整脈モデルでは偽陽性として判定されることが知られている。

[0178] 図41、図42より、10nM～10000nMの広範囲の濃度でラノラジンを添加しても、波形の変化は見られず、QT延長は検出されなかった。

本発明の一態様である方法によれば、ラノラジンは催不整脈作用を有するものとは評価されなかった。すなわち、本発明の一態様である方法によれば、*iPS*細胞を分化させた心筋細胞を用いた従来の催不整脈モデルでは偽陽性として判定される薬剤であっても、正しく陰性として判定することができ、偽陽性を減らすことができる。

[0179] 実施例30～53より、本発明の一態様によれば、*iPS*細胞を分化させた心筋細胞等を用いた従来の*in vitro*試験系では検出が難しいとされていた薬剤の作用を検出できることが明らかになった。

[0180] ＜参照による援用＞

この出願は、2022年1月11日に日本国特許庁に出願された特願2022-002556号及び2022年6月29日に日本国特許庁に出願された特願2022-104613号を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

請求の範囲

- [請求項1] 薬剤の、心筋細胞に対する作用を評価する方法であって、
培養容器の培養面に心筋細胞を播種する工程（A）、
前記工程（A）で得られた心筋細胞を培養する工程（B）、
前記培養された心筋細胞を前記薬剤に曝露させる工程（D）、及び
前記工程（D）で得られた心筋細胞の細胞機能の指標を分析して評価する工程（E）を含み、
前記培養容器の培養面の少なくとも一部が4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材から形成されている、方法。
- [請求項2] 前記工程（B）で得られた心筋細胞をさらに培養する工程（C）を含み、
前記工程（C）及び（D）が、遊離脂肪酸1～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含有する培地（ β ）中で行われる、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記培地（ β ）が、更に、リゾホスファチジルコリン1～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、トリアシルグリセリド1～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ホスファチジルコリン1～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ホスファチジン酸1～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、コレステロール0.1～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及びスフィンゴミエリン0.1～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から選ばれる少なくとも1種を含有する、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記工程（A）及び（B）が、代替血清を含有する無血清培地（ α ）中で行われる、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項5] 前記4－メチルー1－ペンテン重合体が、4－メチルー1－ペンテンとエチレン及び炭素数3～20の α －オレフィン（4－メチルー1－ペンテンを除く）から選ばれる少なくとも1種のオレフィンとの共重合体である、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項6] 前記培養容器の培養面全体が、4－メチルー1－ペンテン重合体を含む基材から形成されている、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項7] 前記培養面が、ラミニンを含むコーティング剤でコートされている

、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

[請求項8] 前記心筋細胞が、人工多能性幹細胞を分化させた心筋細胞である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

[請求項9] 前記心筋細胞が、人工多能性幹細胞をプロテインフリー心筋分化誘導（P F C D）法により分化させた心筋細胞である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

[請求項10] 前記作用が、心毒性である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

[請求項11] 前記心毒性が、催不整脈作用である、請求項 1 0 に記載の方法。

[請求項12] 前記心毒性が、心筋傷害作用である、請求項 1 0 に記載の方法。

[請求項13] 前記細胞機能の指標が、ミトコンドリア機能の指標である、請求項 1 2 に記載の方法。

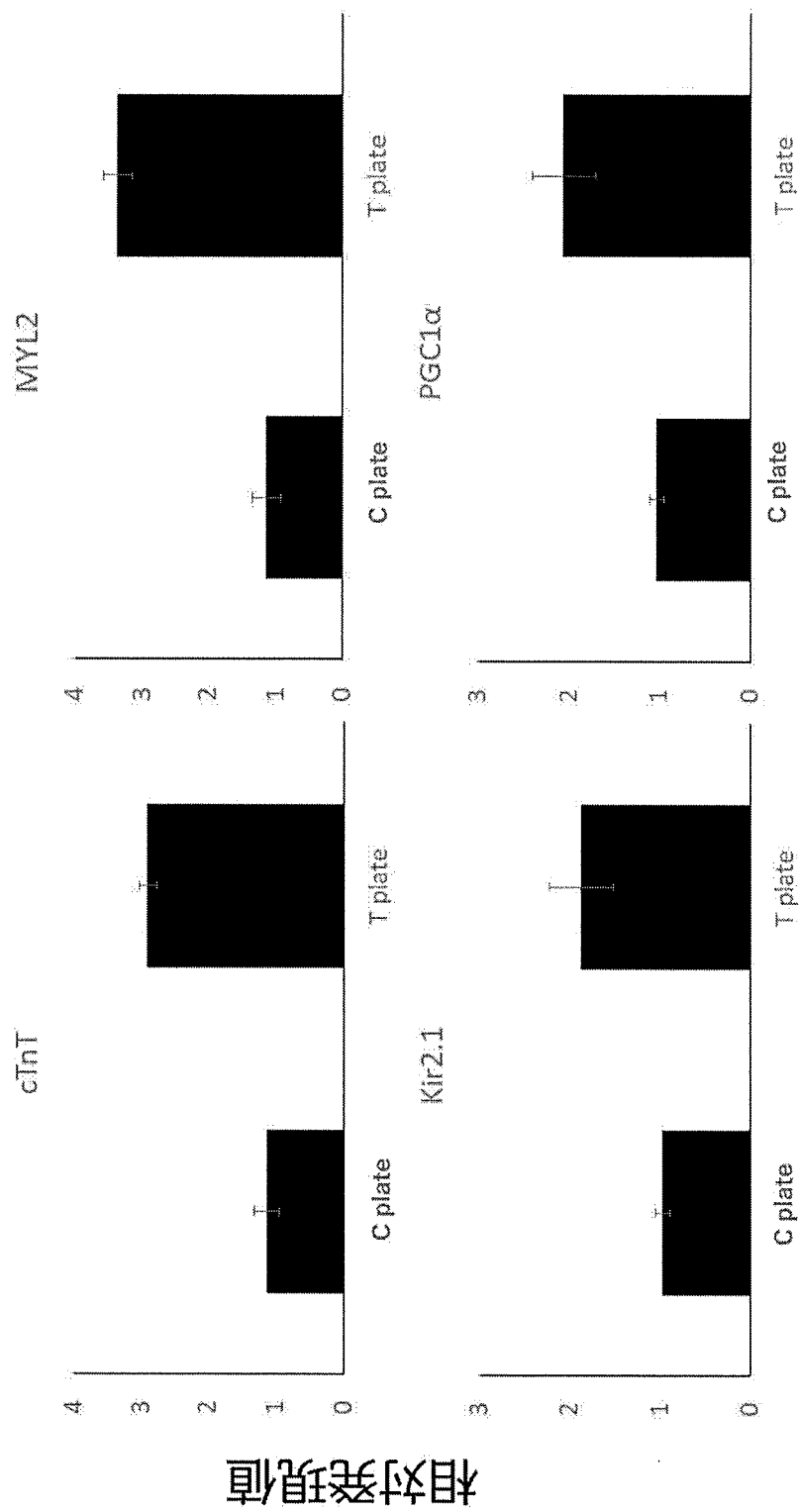
[請求項14] 前記細胞機能の指標が、カルシウムイオン波形である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

[請求項15] 前記工程（E）において、早期後脱分極（E A D）を検出する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

[請求項16] 前記作用が、頻脈作用又は徐脈作用である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

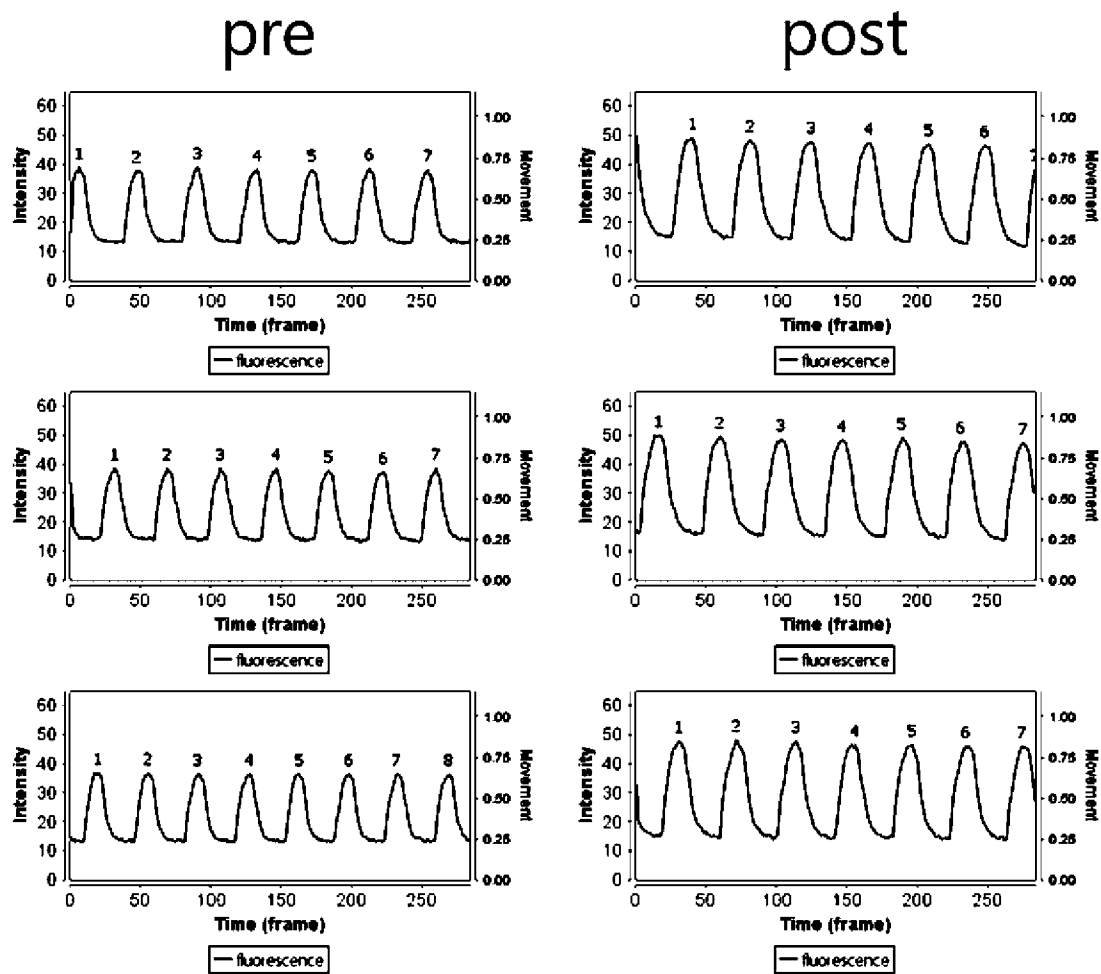
[請求項17] 前記細胞機能の指標が、カルシウムイオン波形である、請求項 1 6 に記載の方法。

[図1]



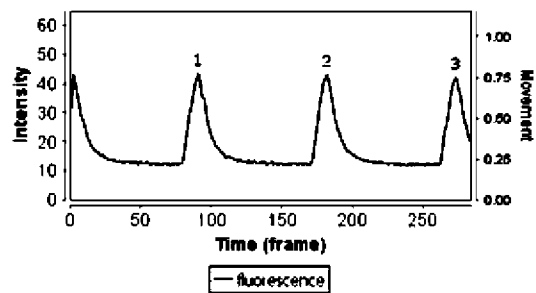
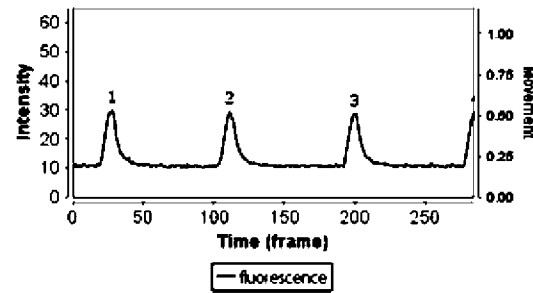
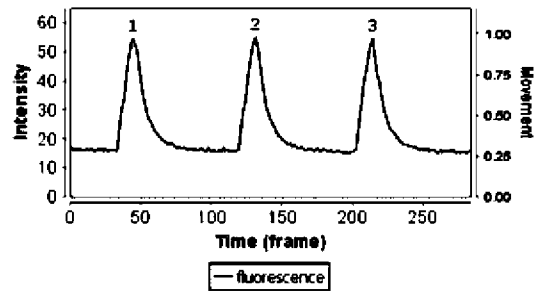
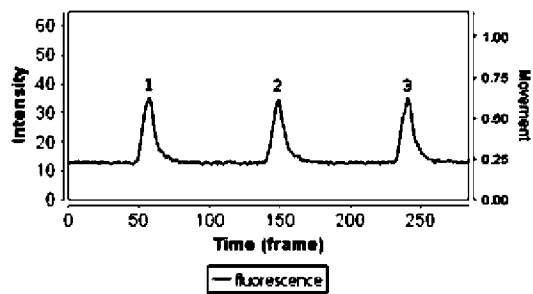
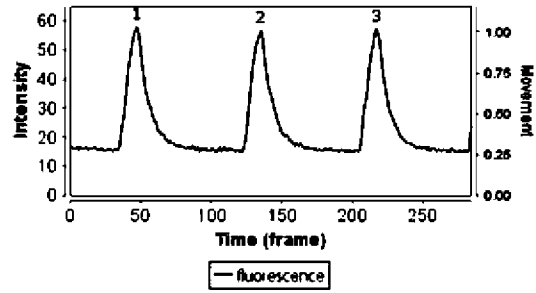
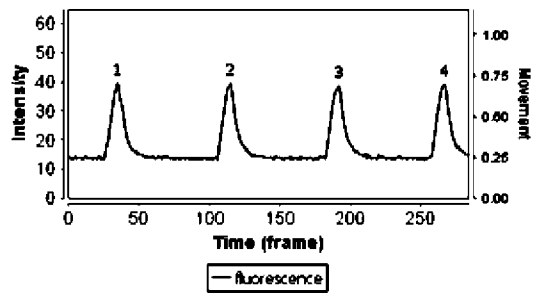
[図2-1]

Tプレート



Cプレート

post

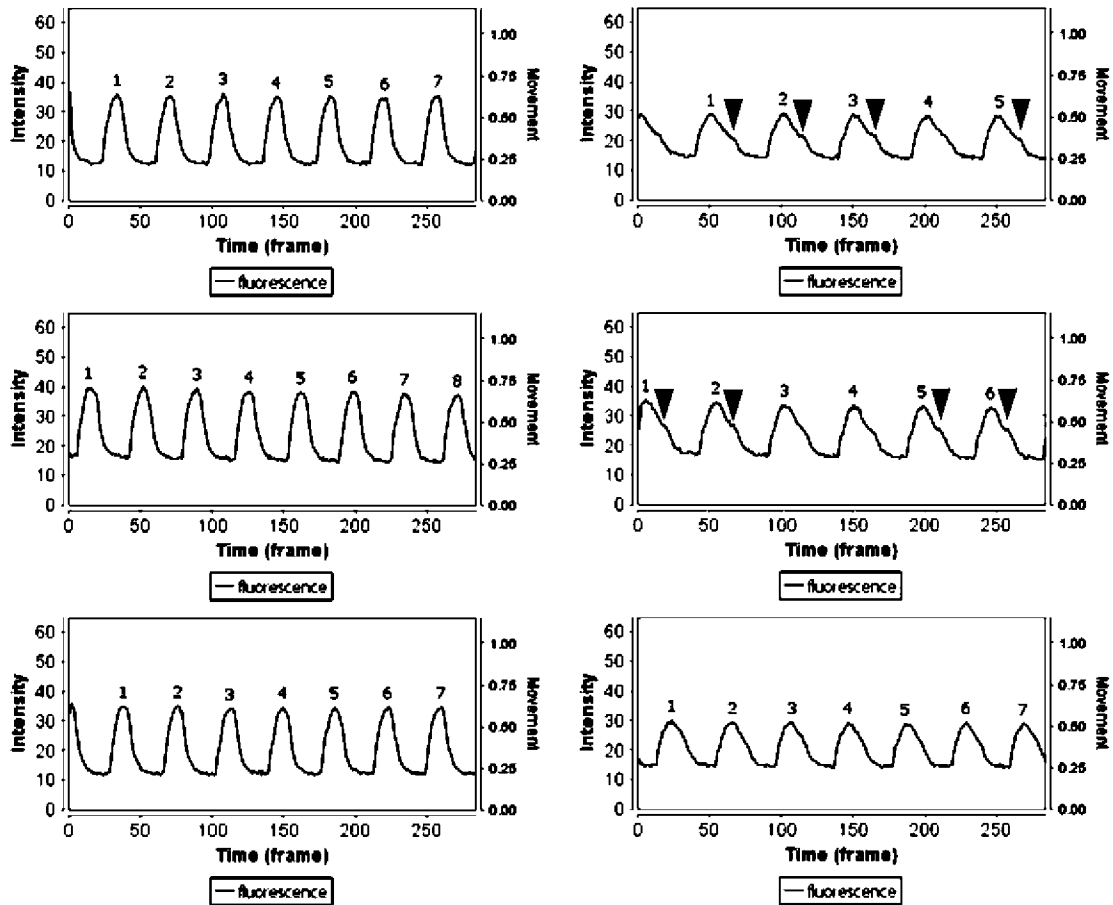


[図3-1]

Tプレート

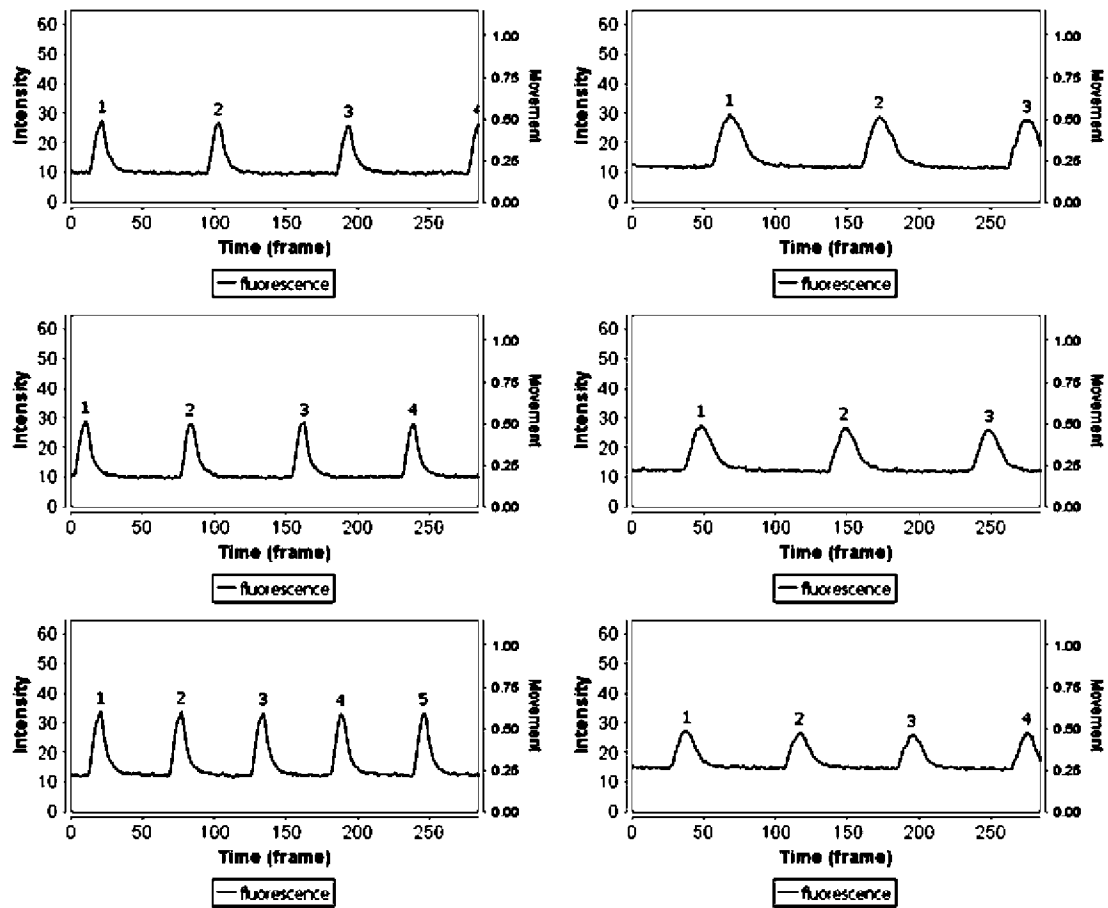
pre

post

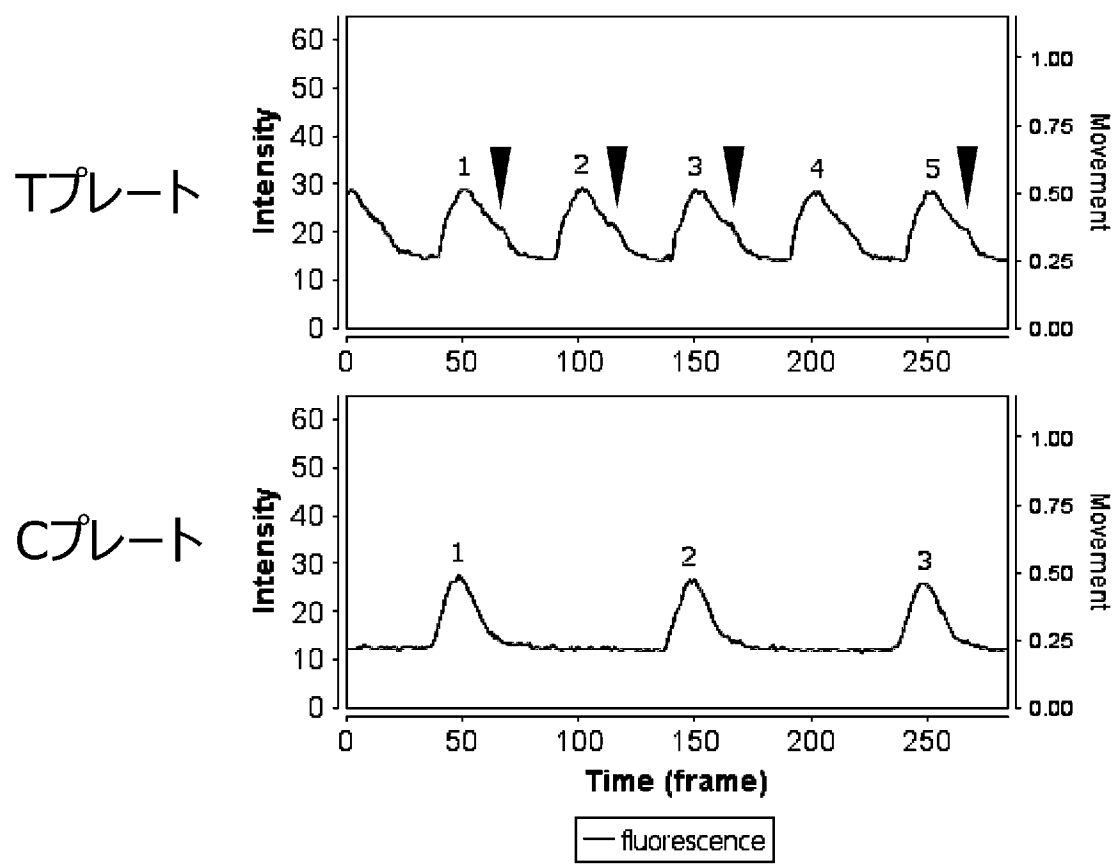


Cプレート

post



[図4]

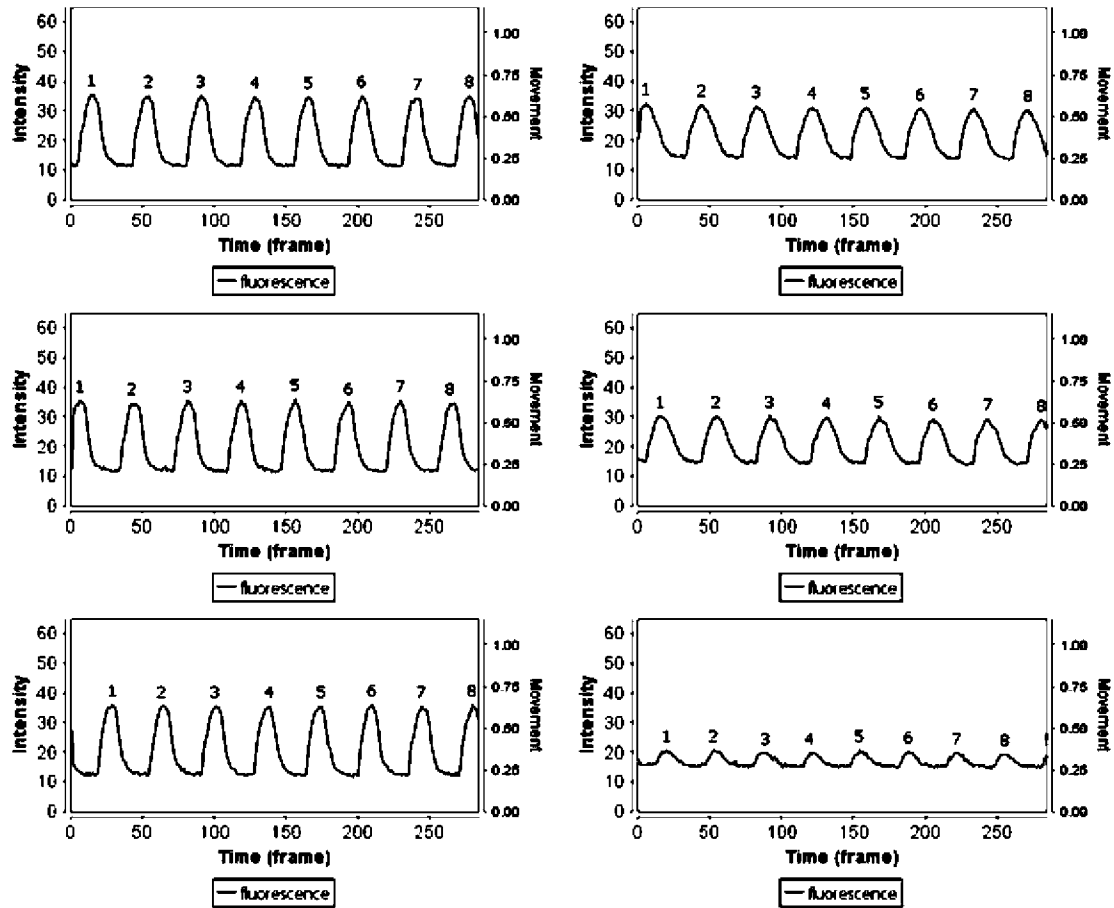


[図5-1]

Tプレート

pre

post

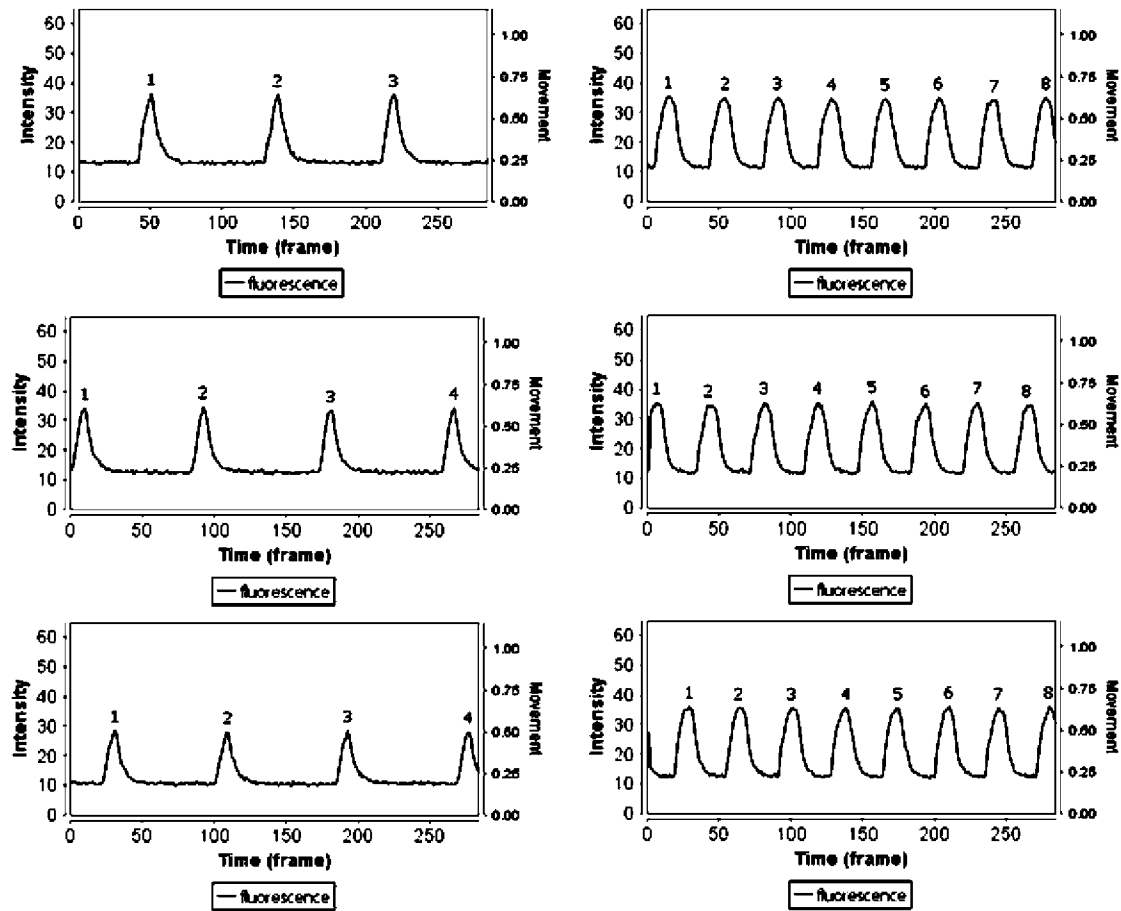


[図5-2]

Cプレート

pre

post

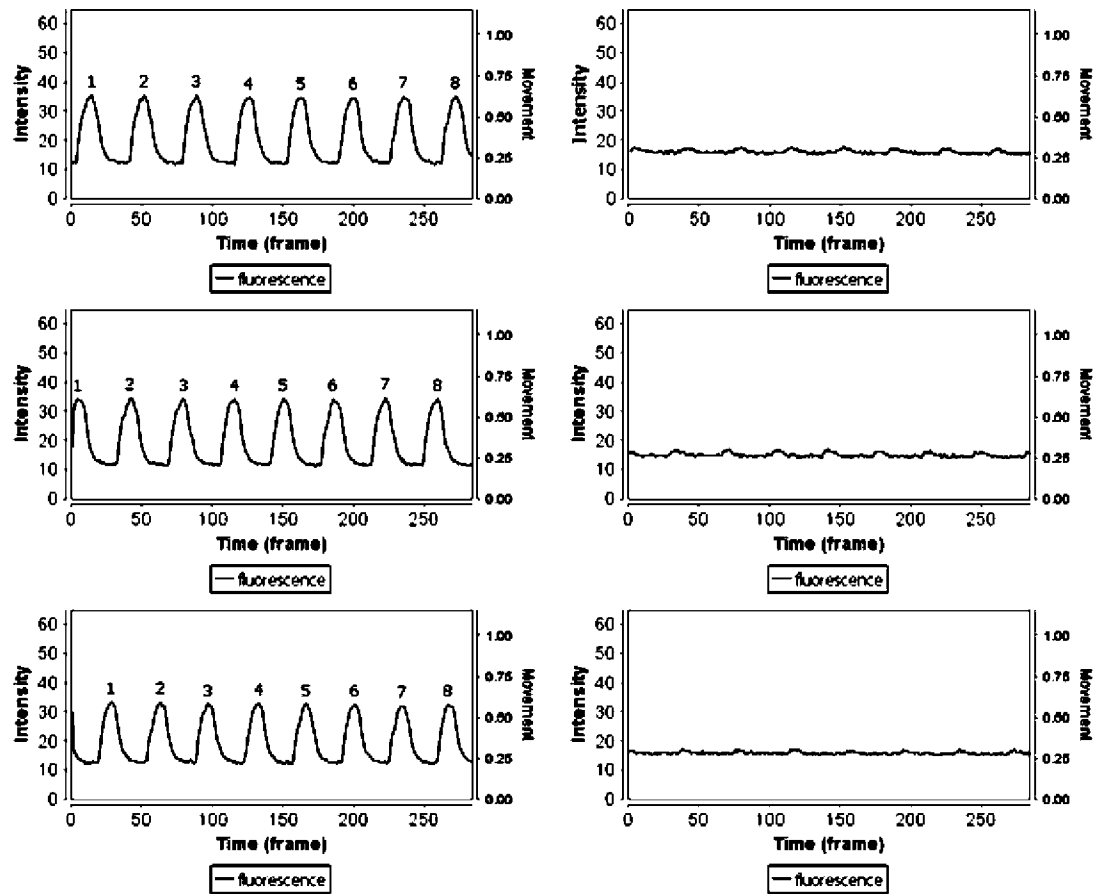


[図6-1]

Tプレート

pre

post

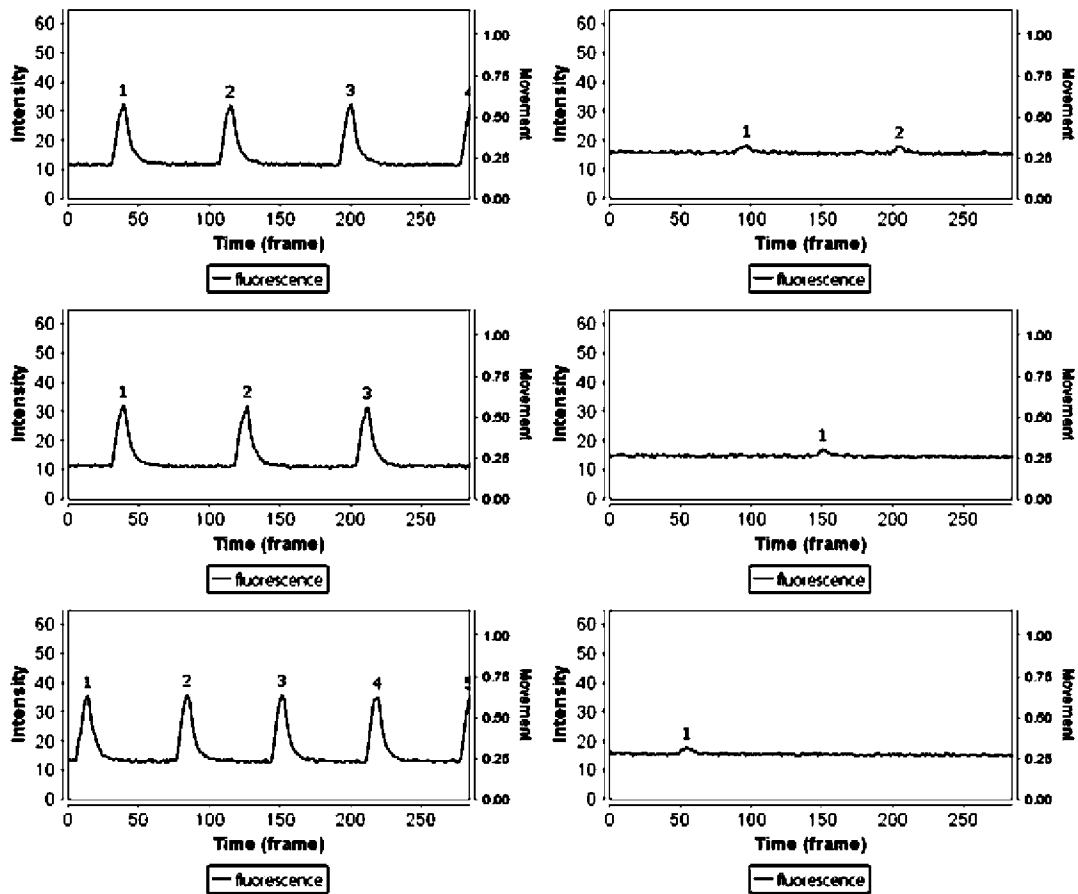


[図6-2]

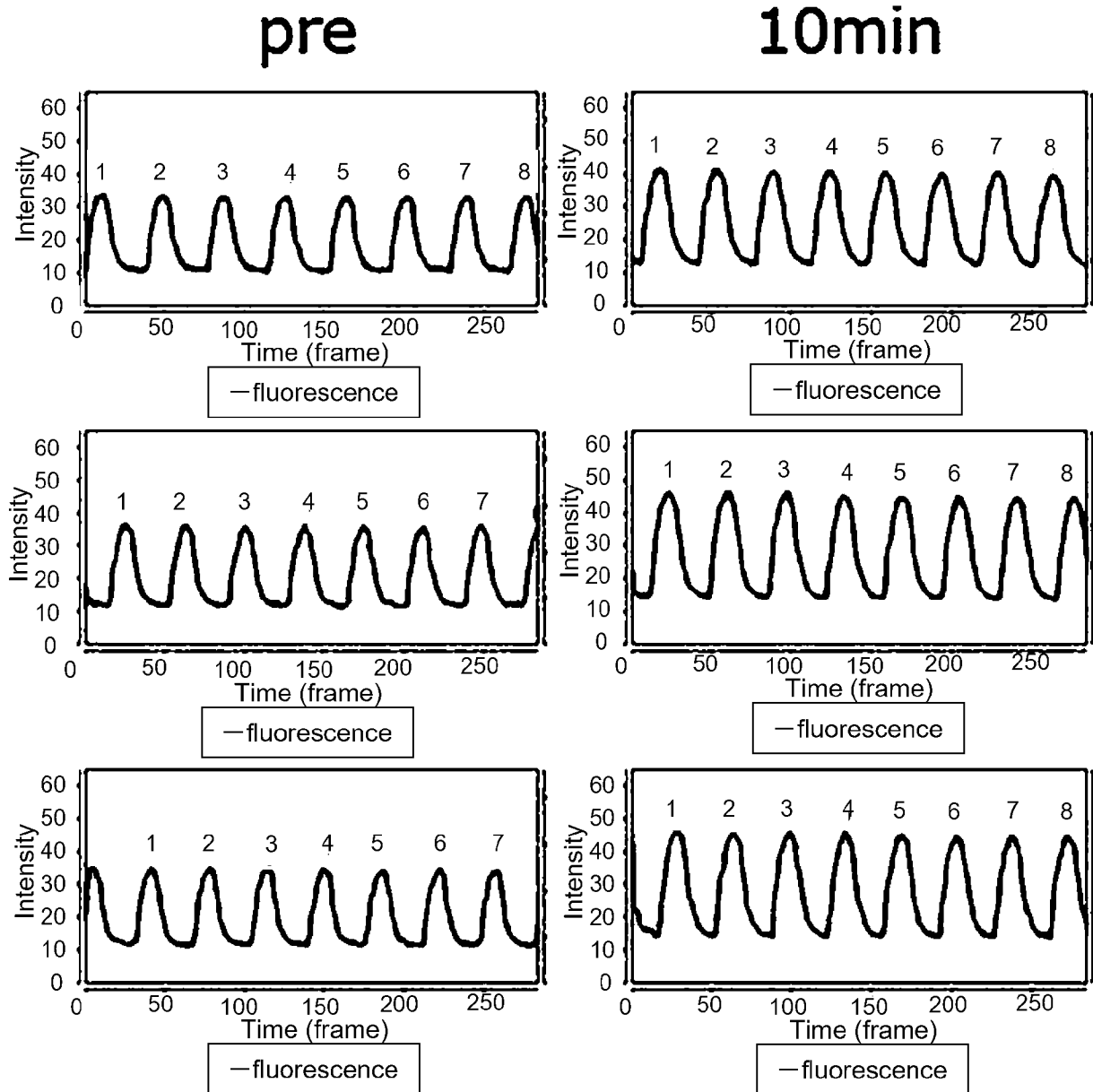
Cプレート

pre

post



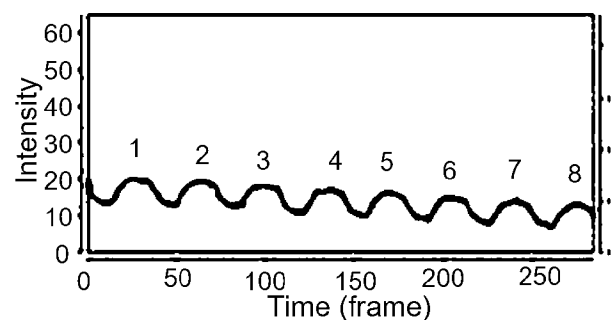
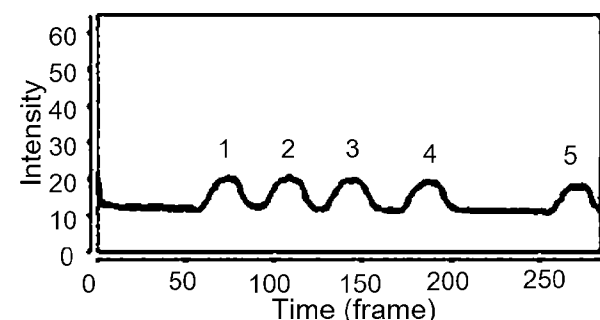
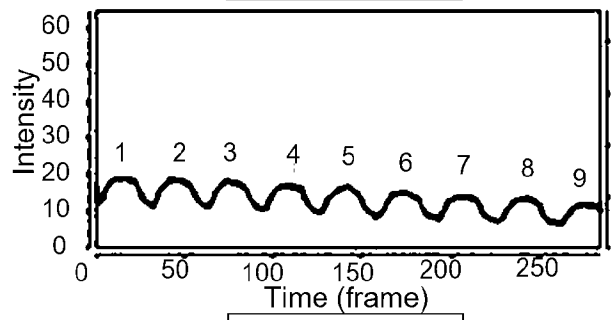
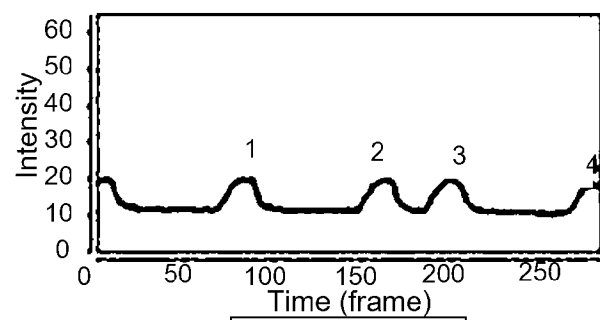
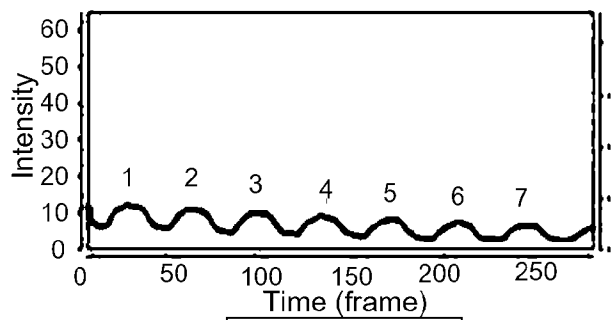
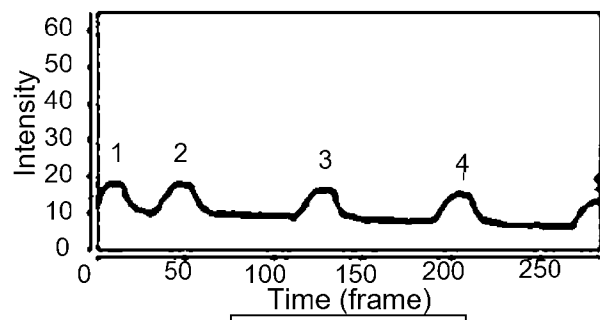
[図7A-1]



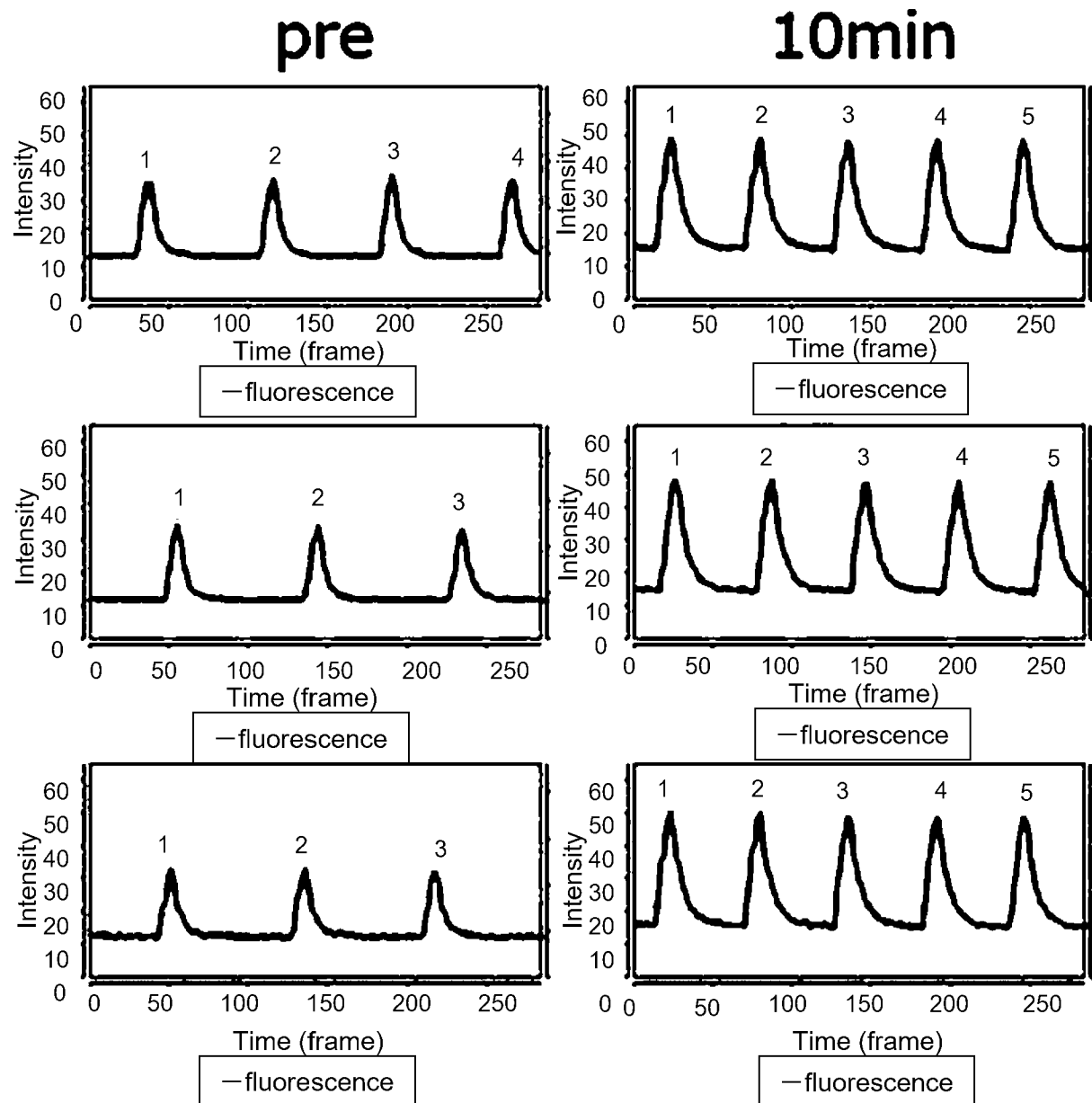
[図7A-2]

24h

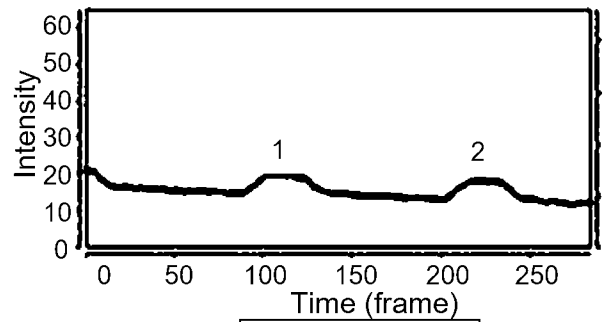
48h



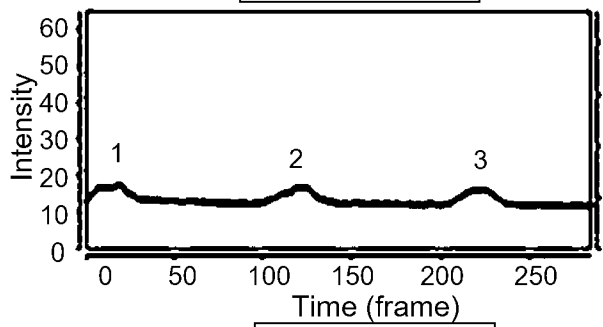
[図7B-1]



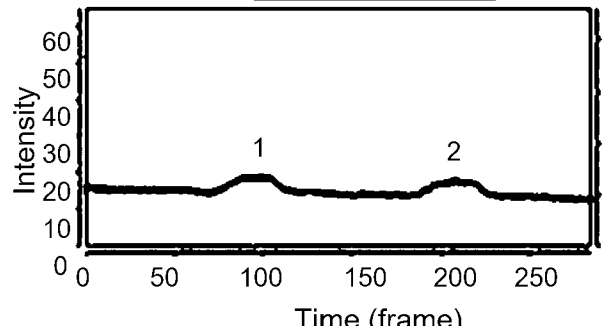
48h



—fluorescence

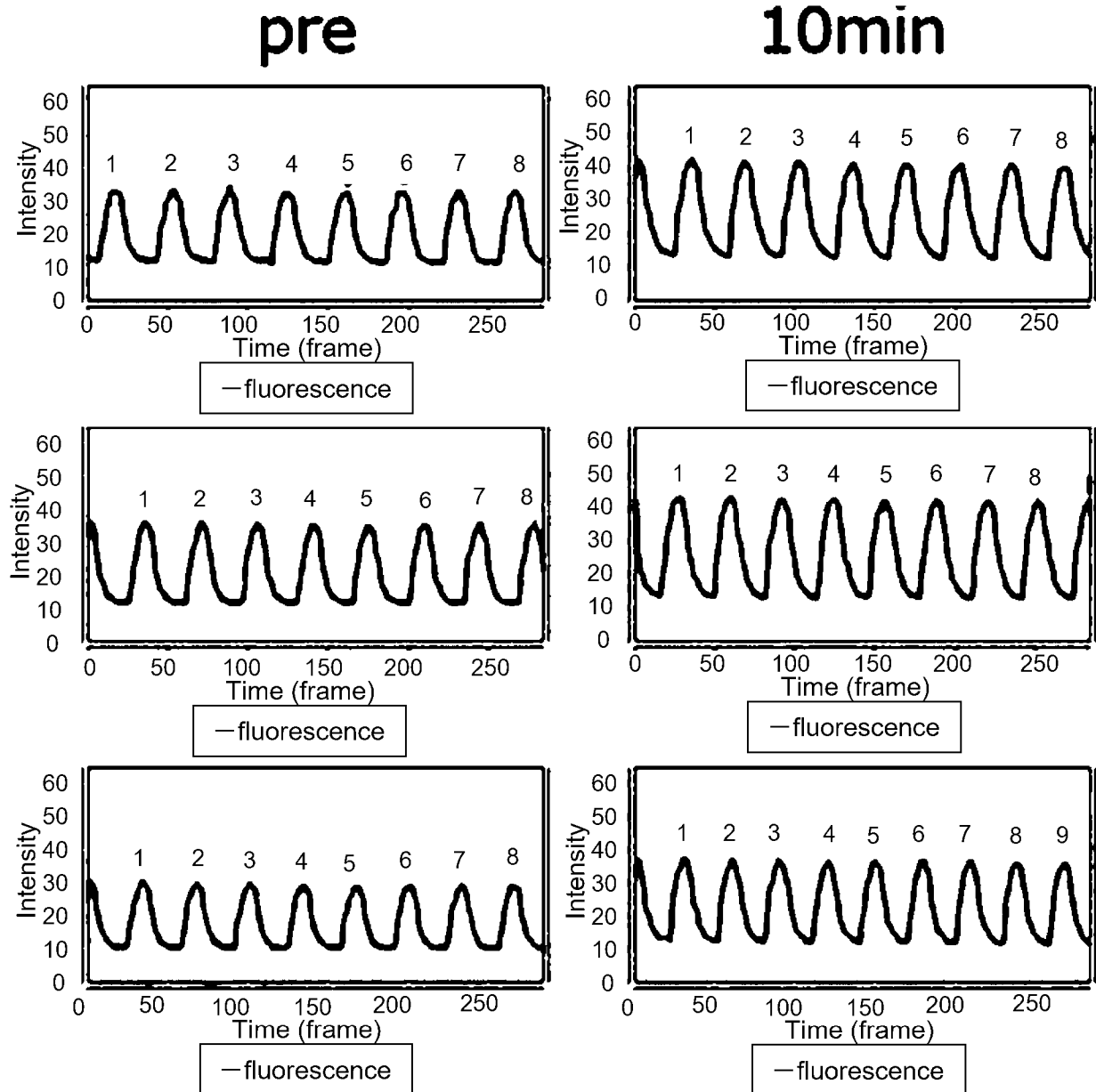


—fluorescence



—fluorescence

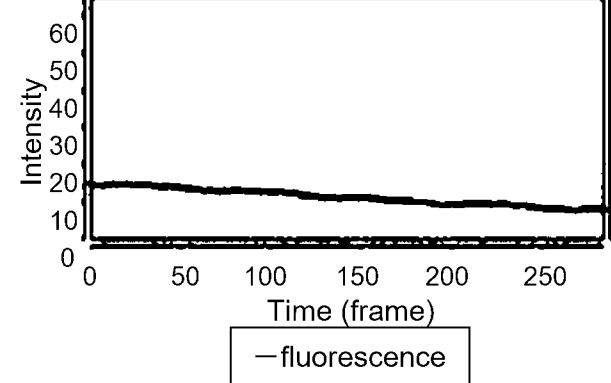
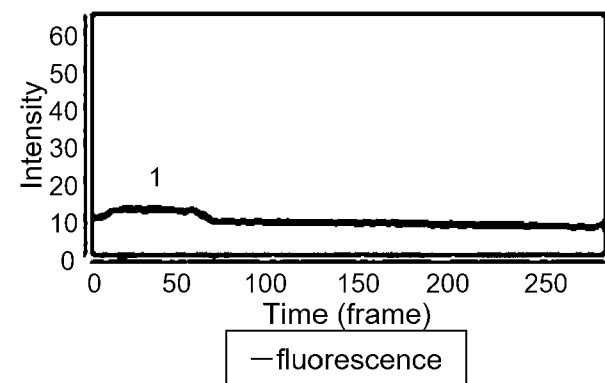
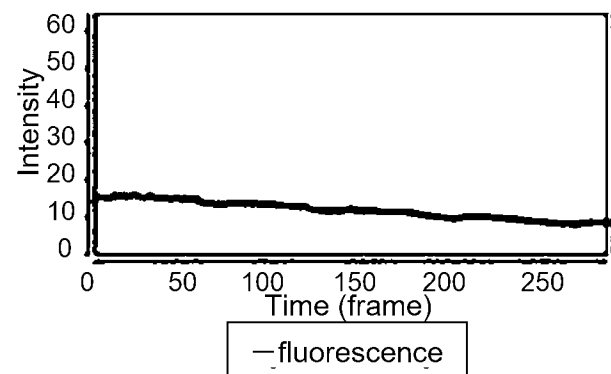
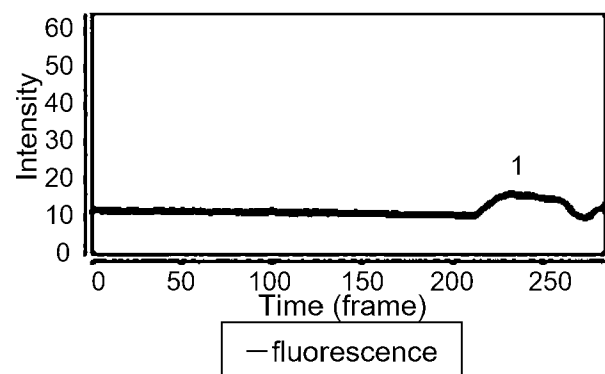
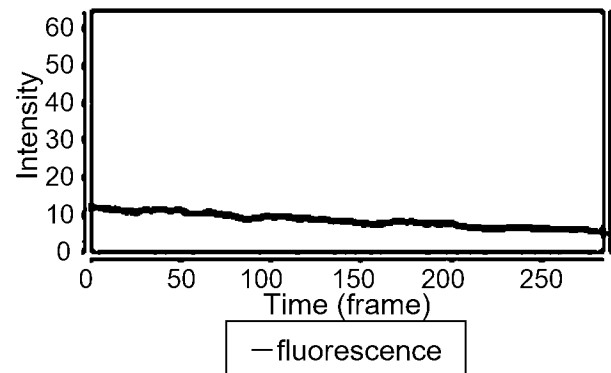
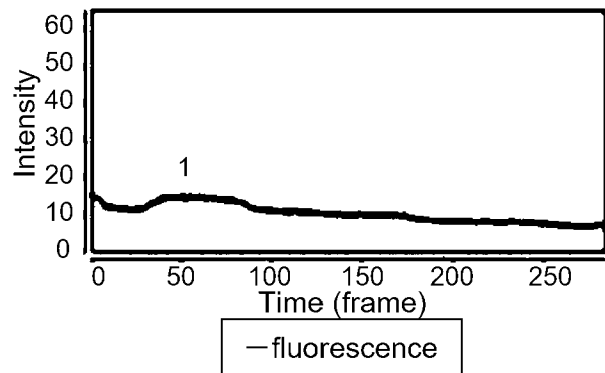
[図8A-1]



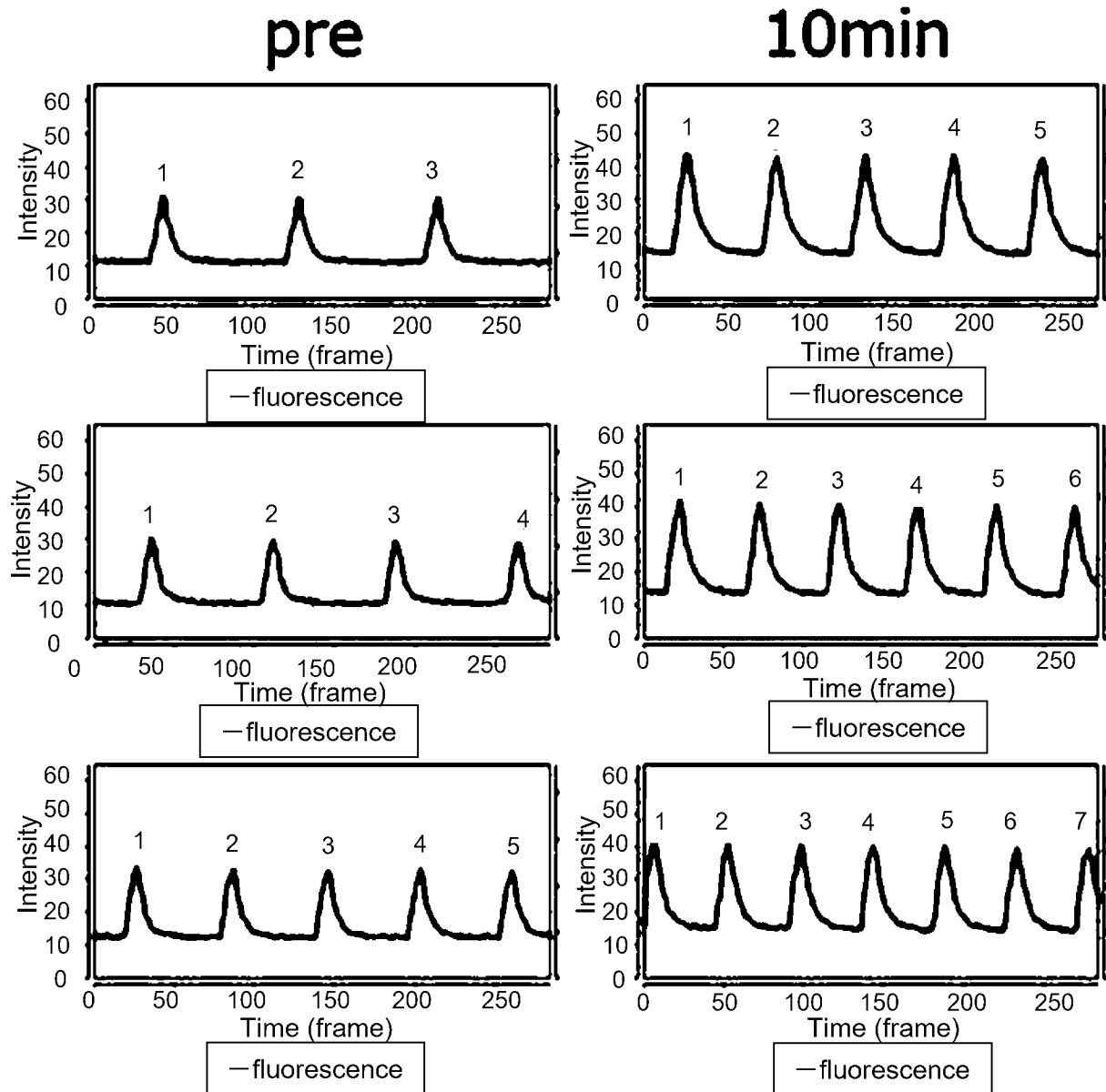
[図8A-2]

24h

48h

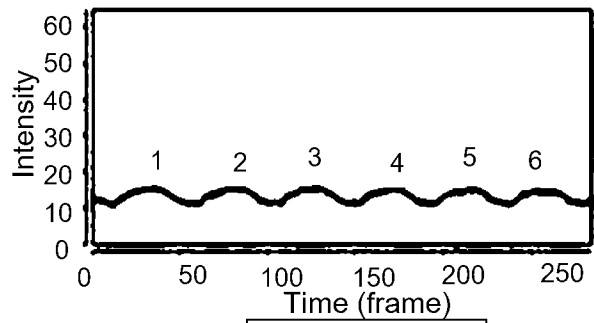


[図8B-1]

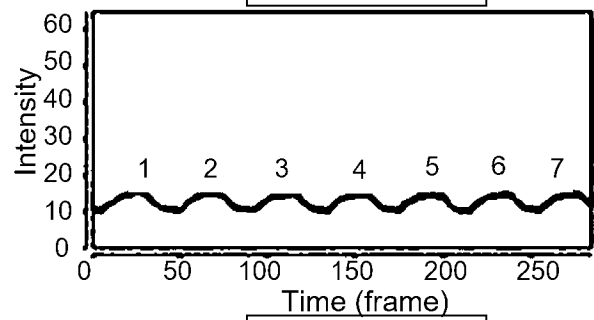


[図8B-2]

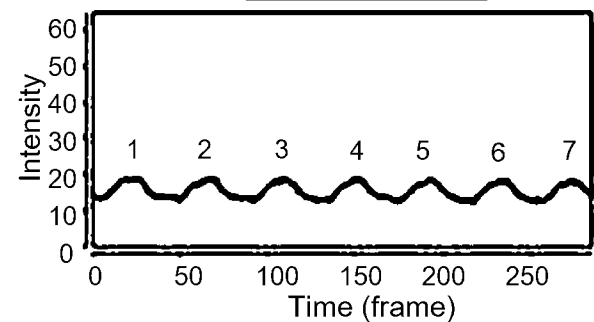
24h



—fluorescence

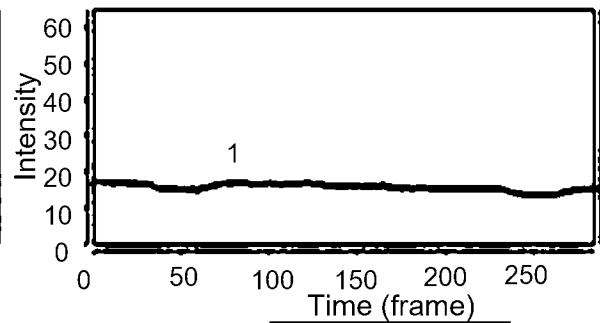


—fluorescence

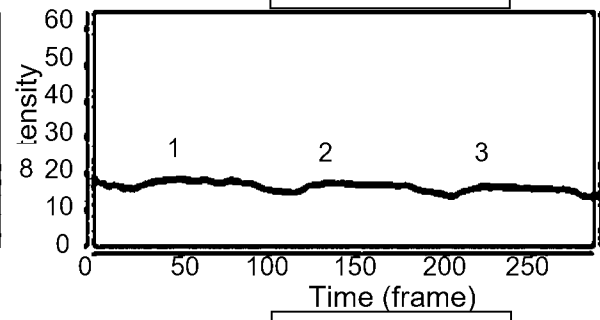


—fluorescence

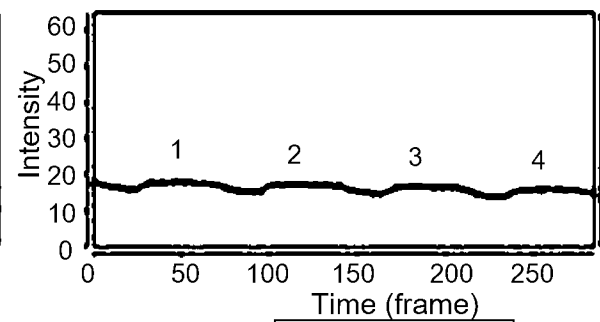
48h



—fluorescence

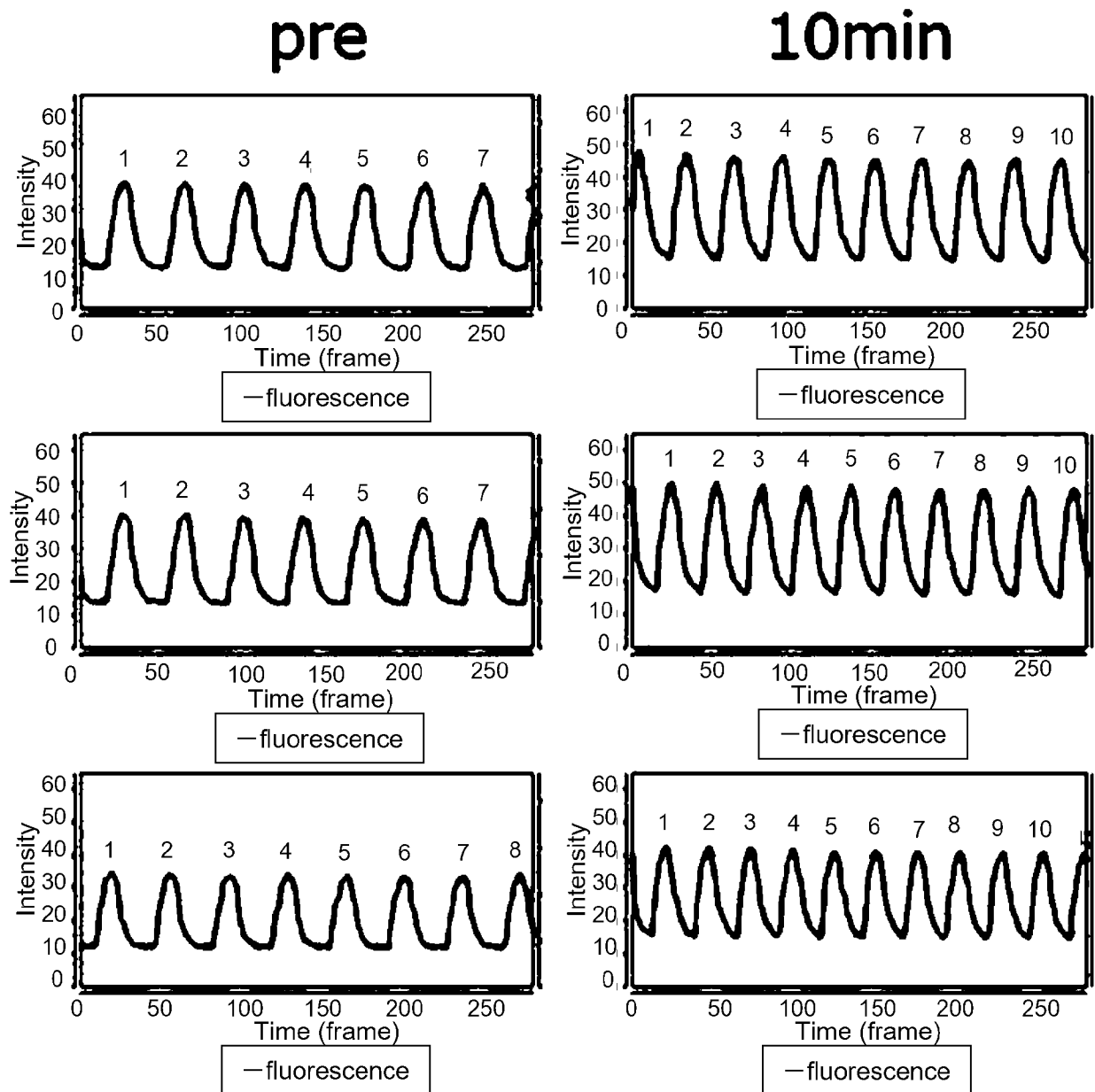


—fluorescence



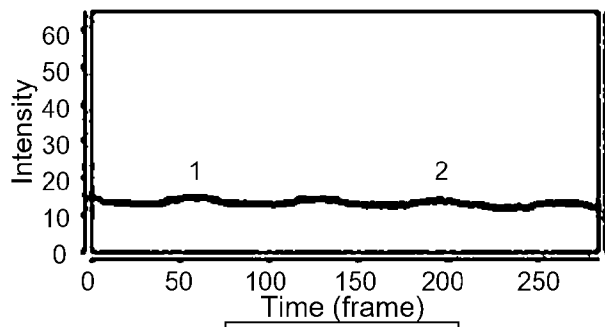
—fluorescence

[図9A-1]



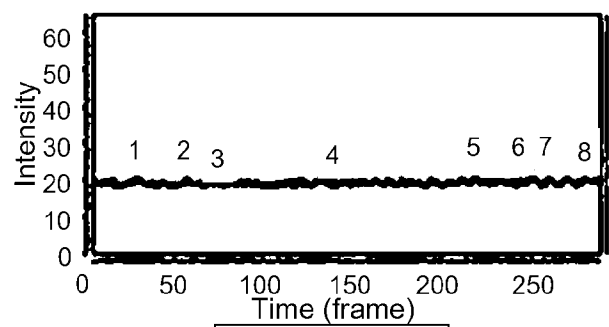
[図9A-2]

24h

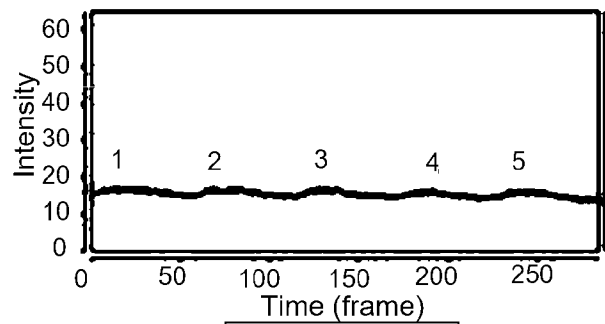


— fluorescence

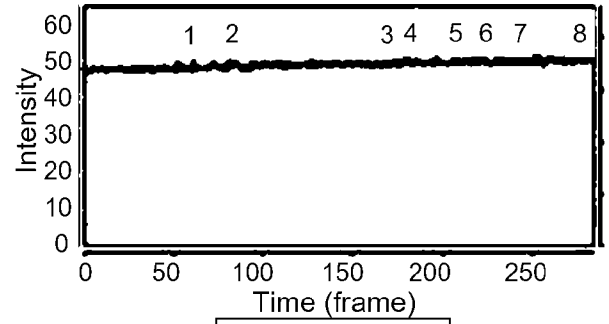
48h



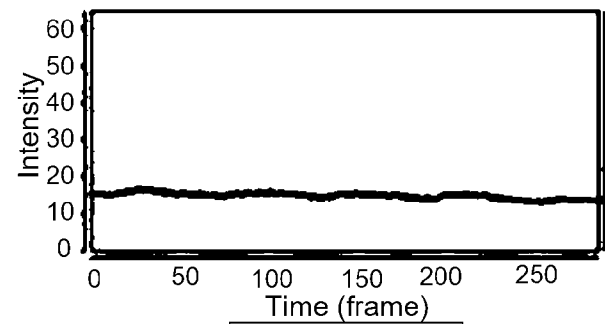
— fluorescence



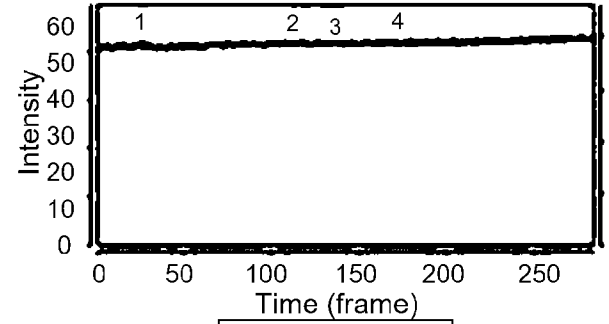
— fluorescence



— fluorescence

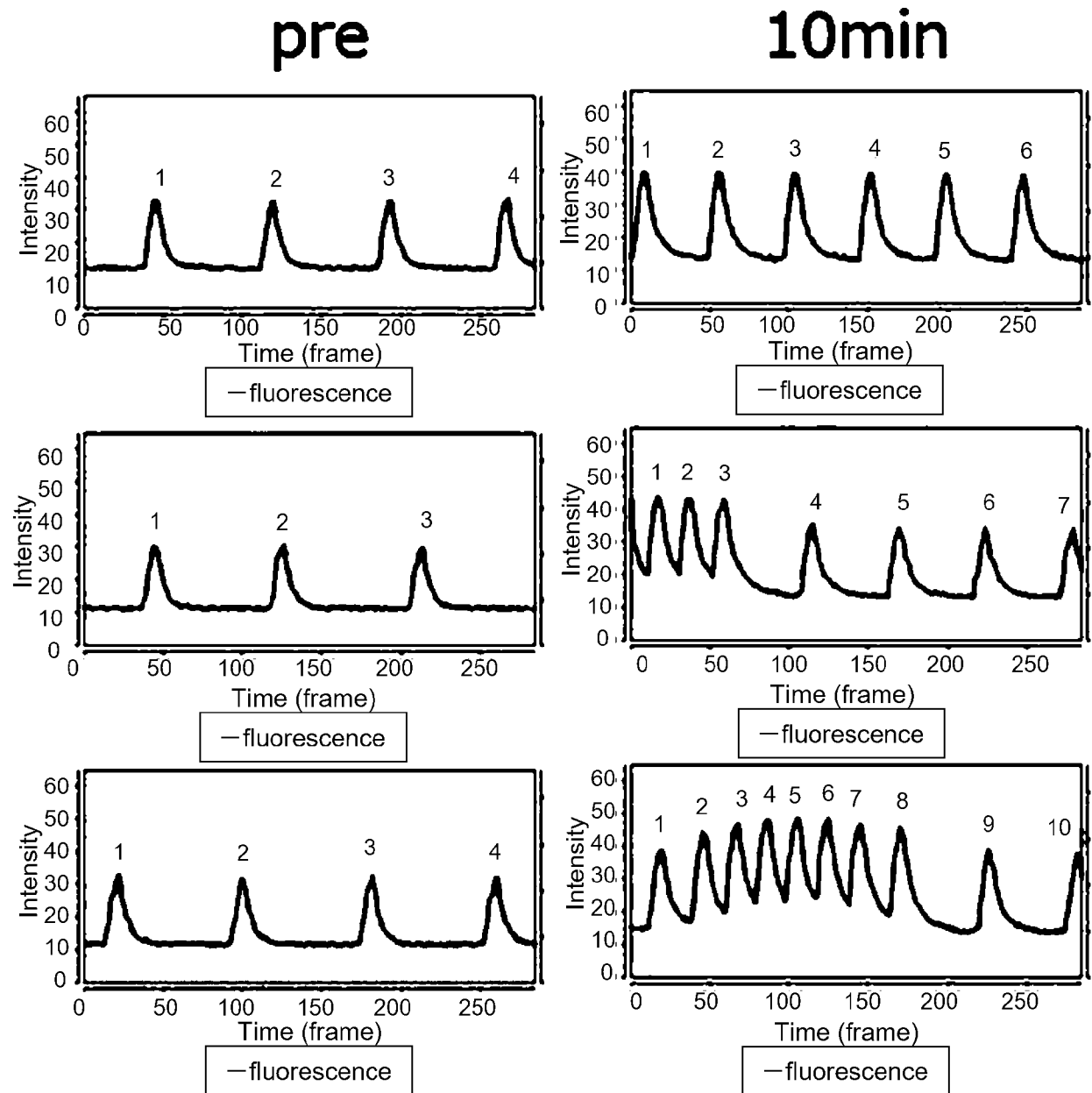


— fluorescence



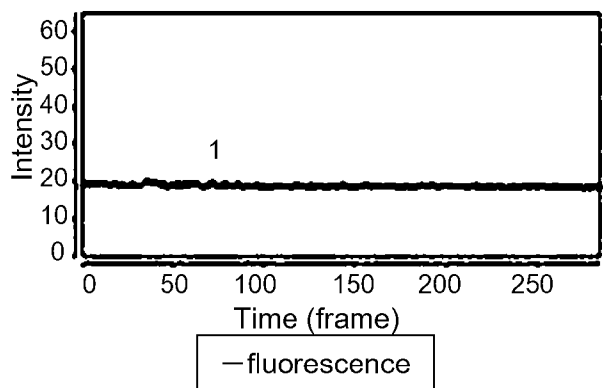
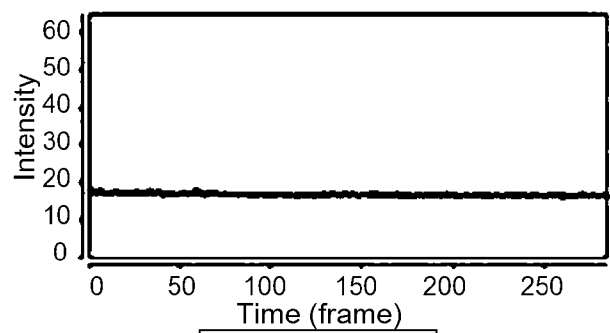
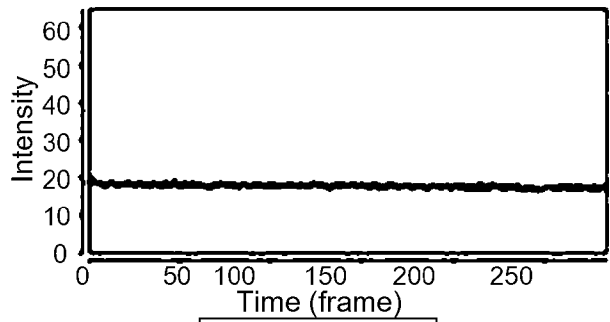
— fluorescence

[図9B-1]

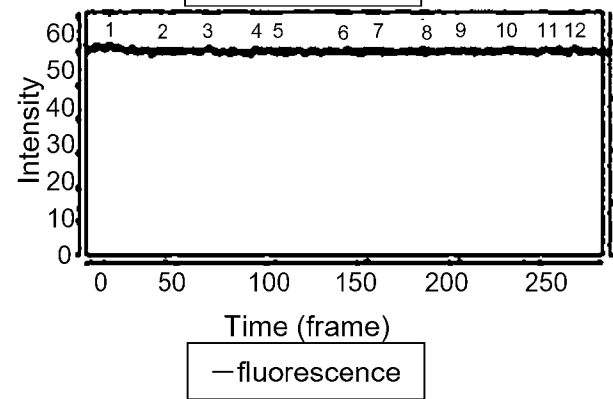
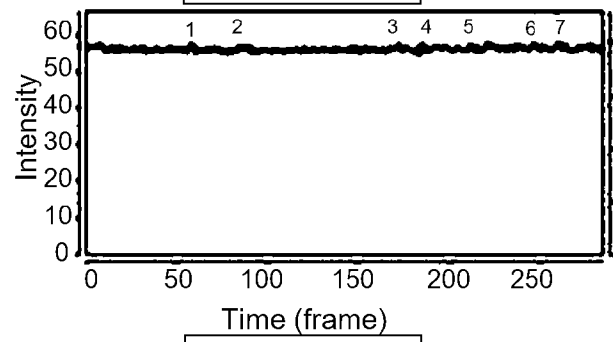
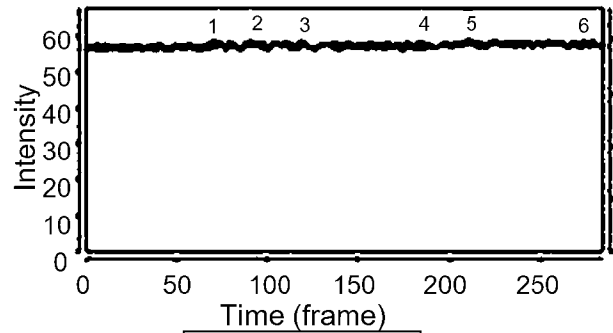


[図9B-2]

24h



48h

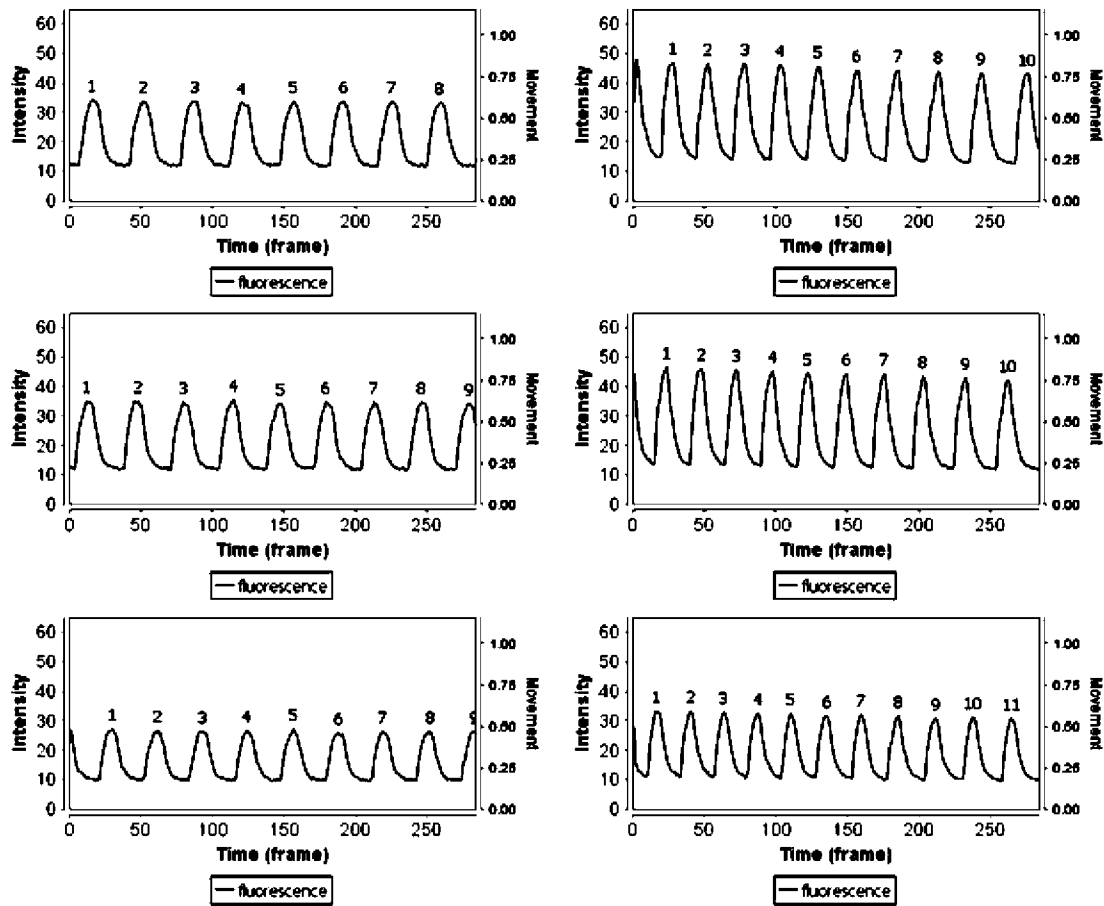


[図10-1]

Tプレート

pre

post

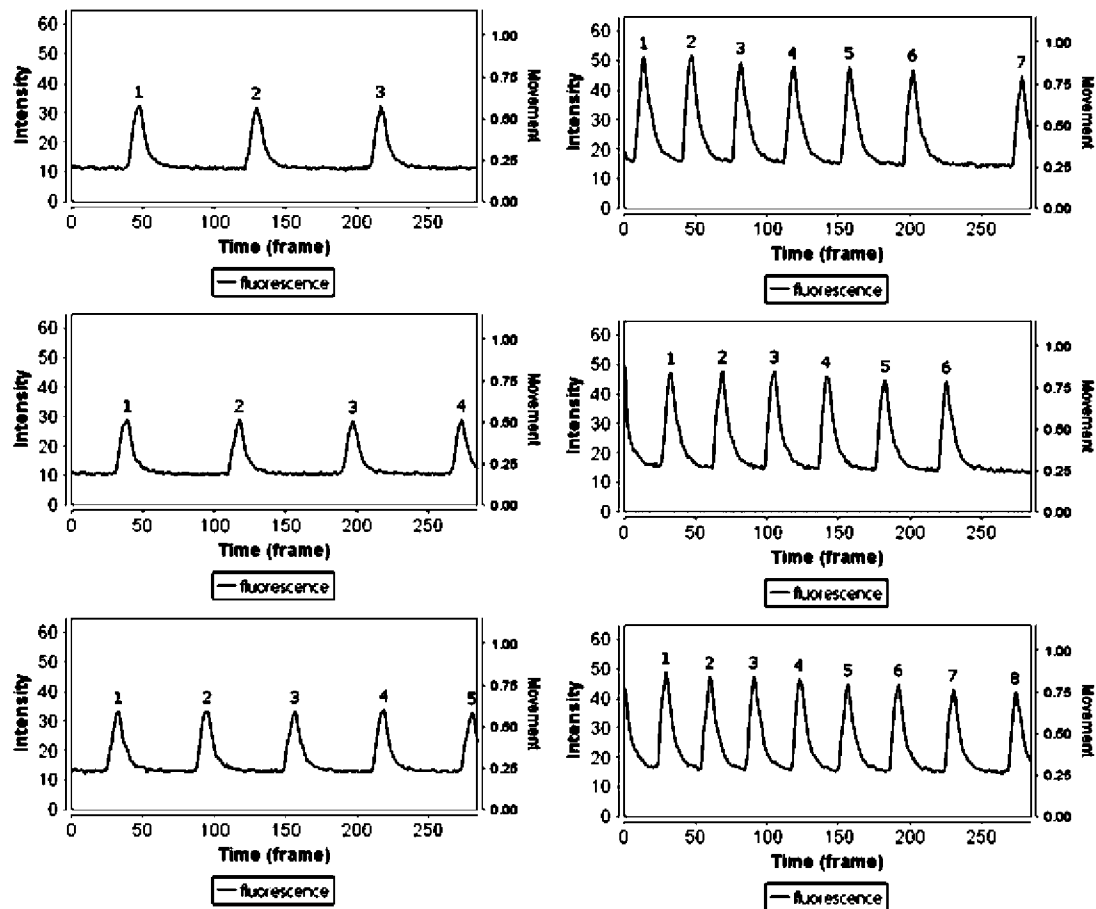


[図10-2]

Cプレート

pre

post

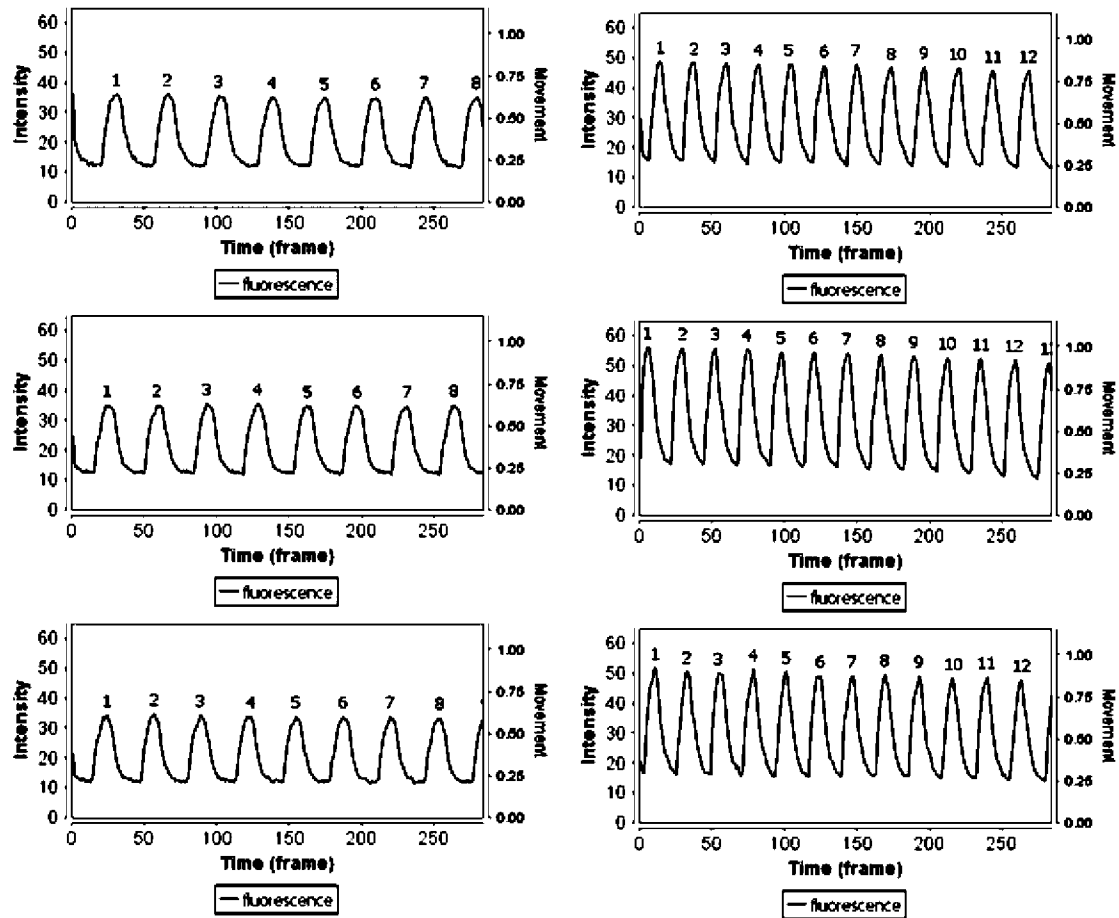


[図11-1]

Tプレート

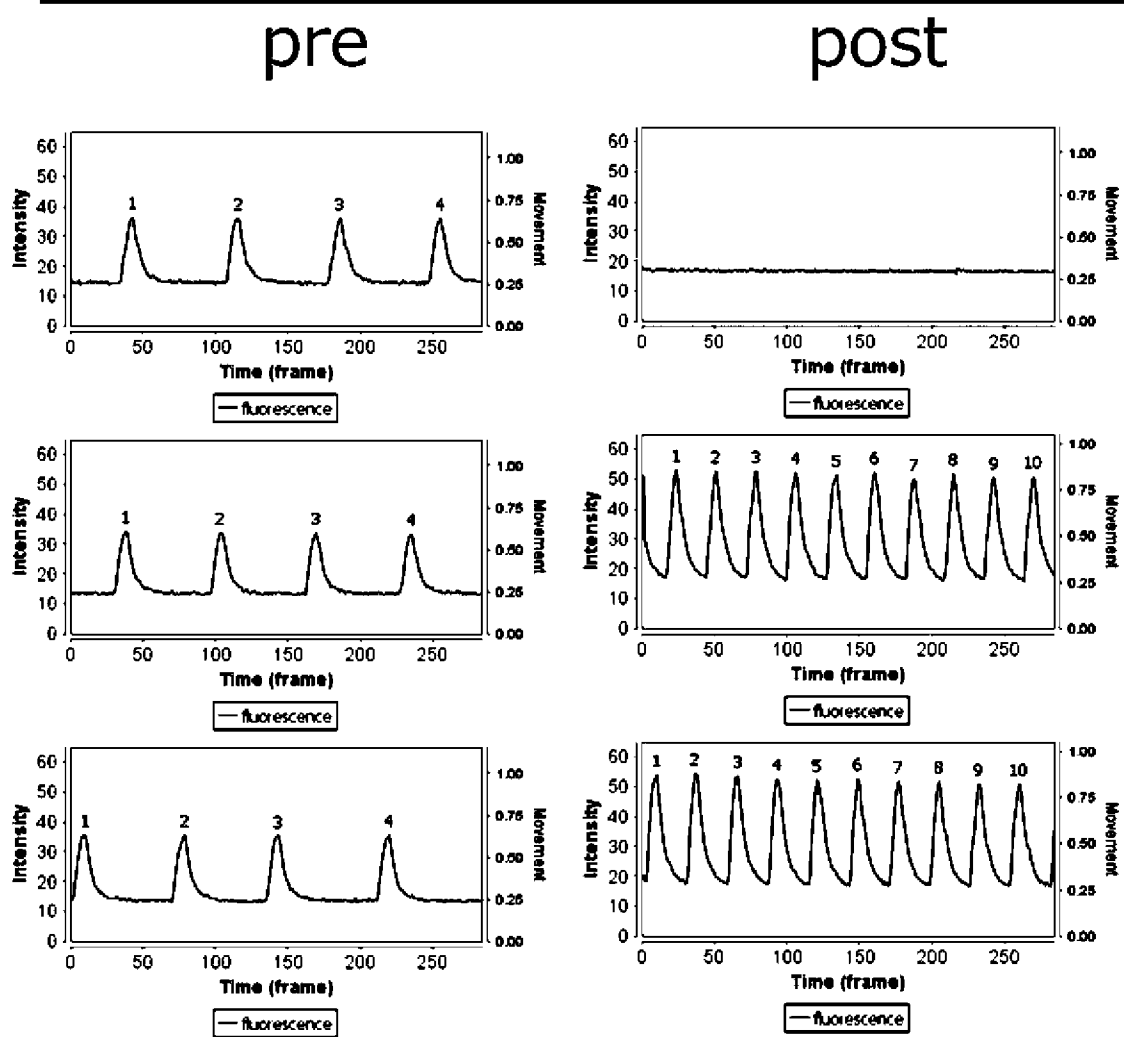
pre

post



[図11-2]

Cプレート

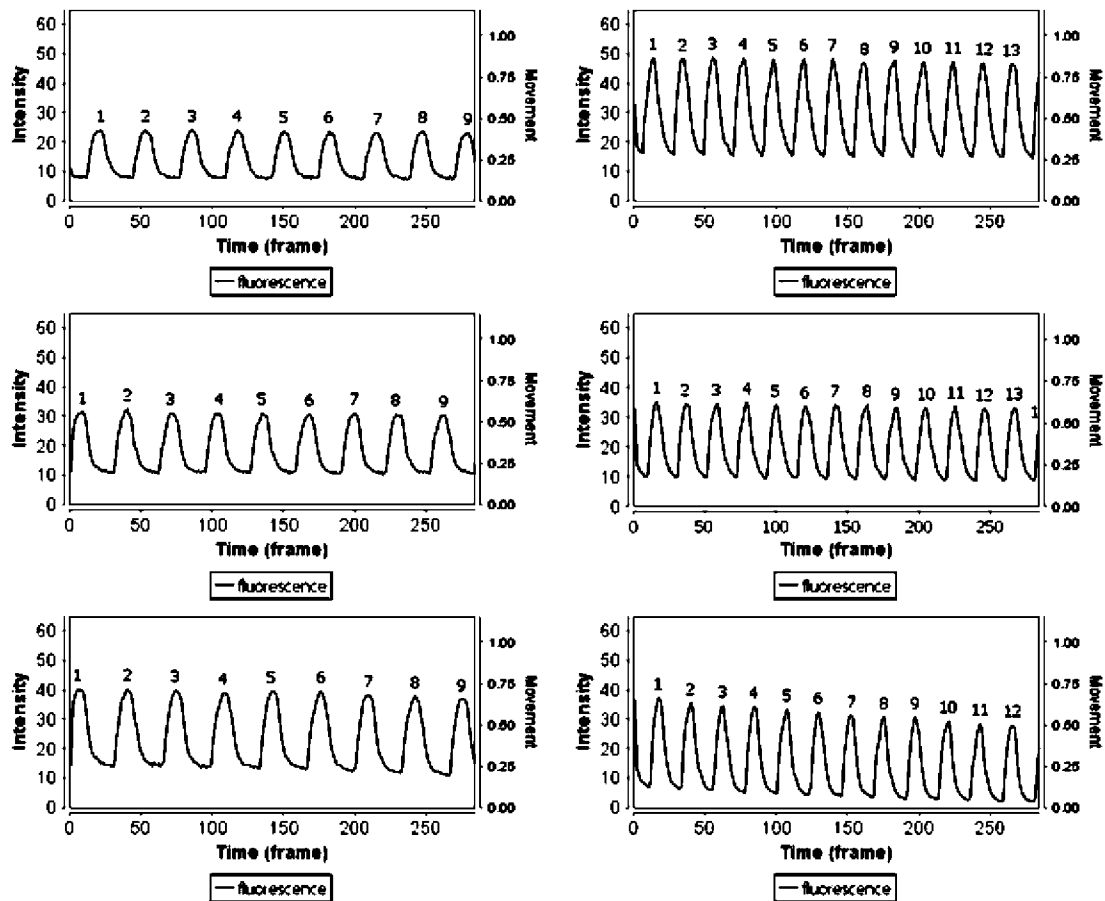


[図12-1]

Tプレート

pre

post

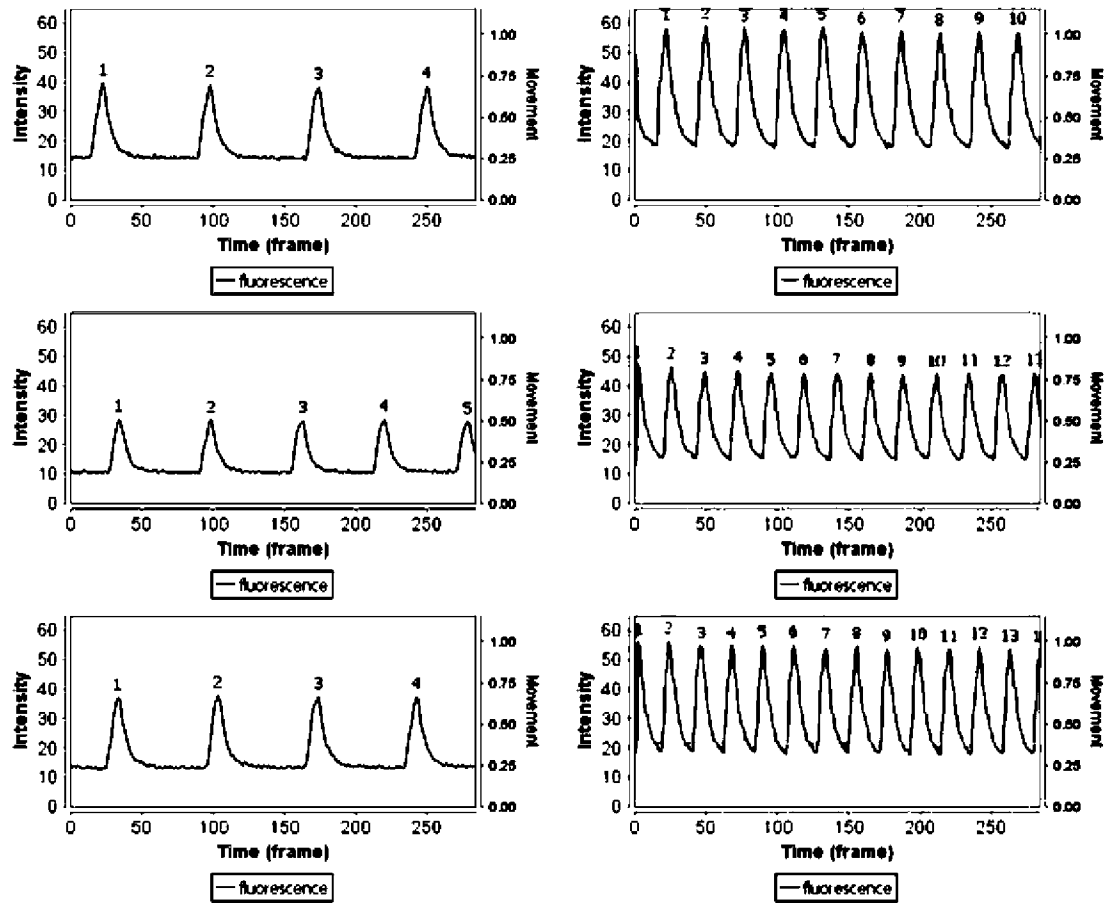


[図12-2]

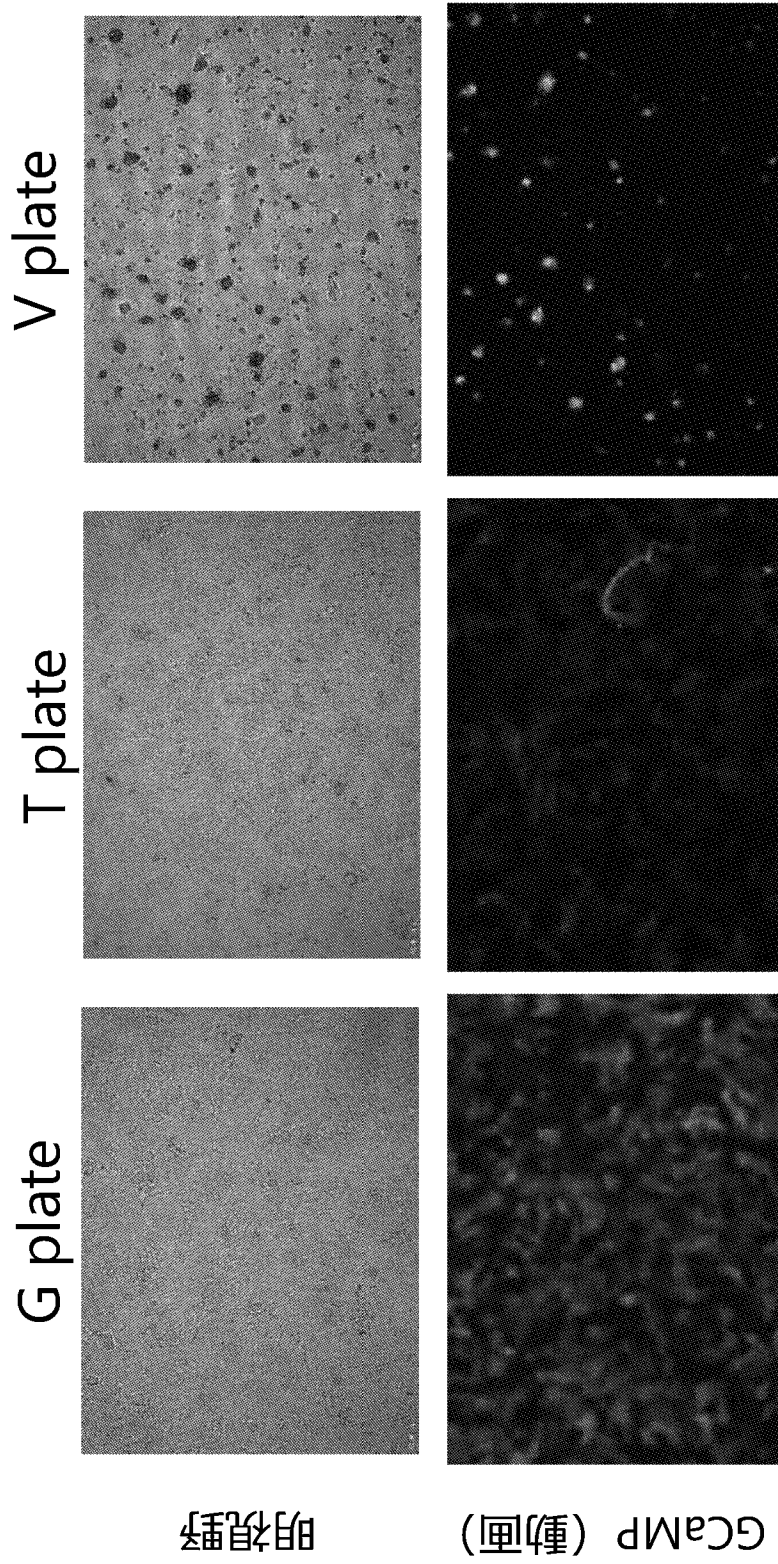
cプレート

pre

post



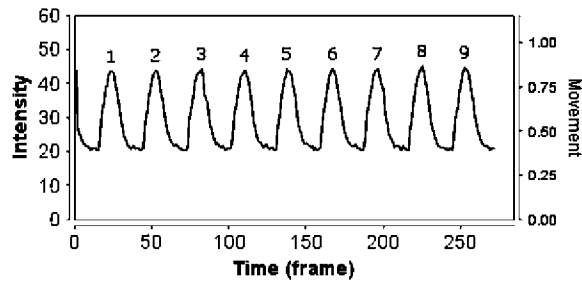
[図13]



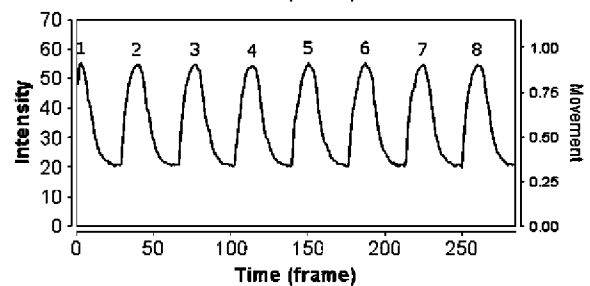
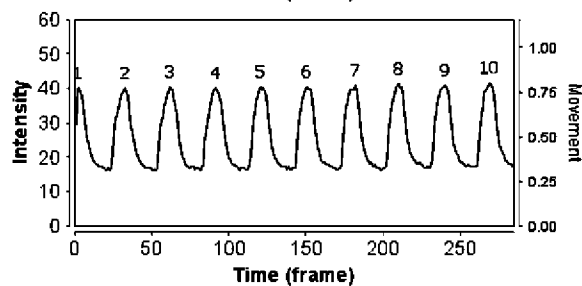
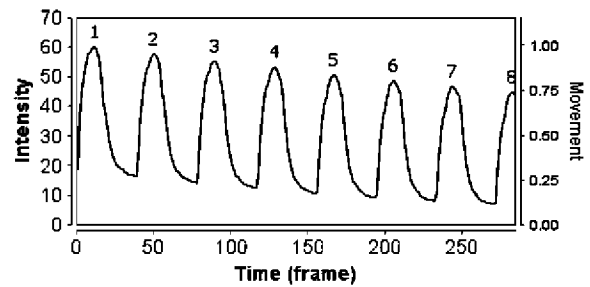
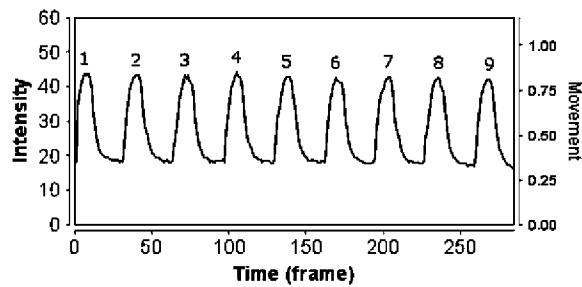
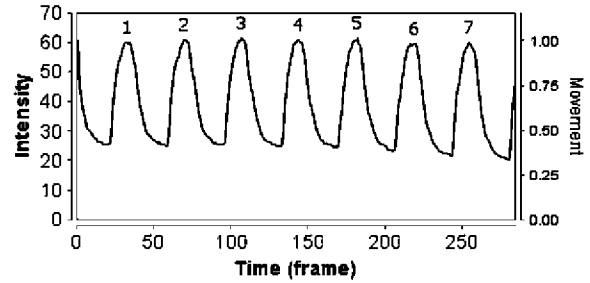
[図14-1]

特製維持培地

Pre



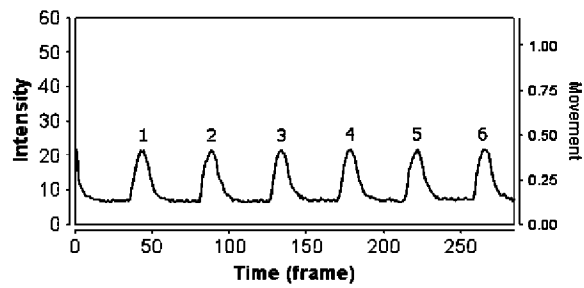
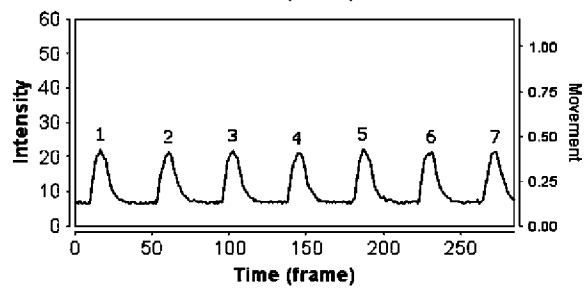
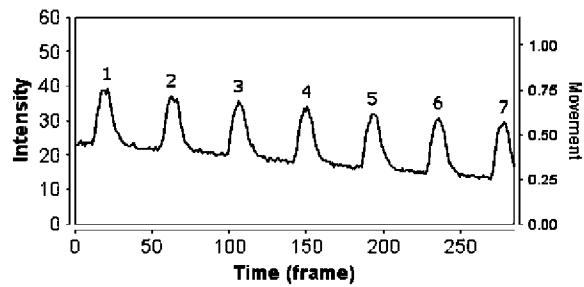
Post



[図14-2]

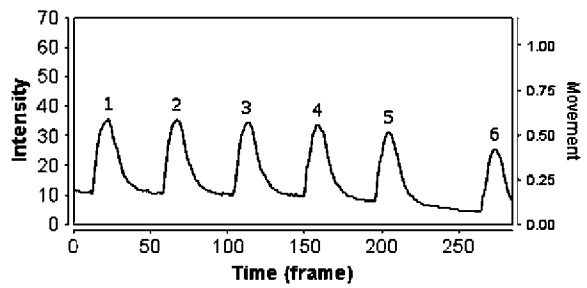
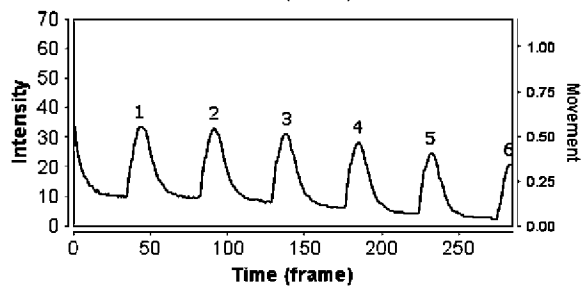
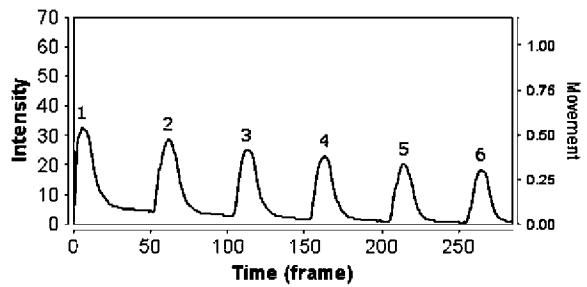
CDI

Pre



— fluorescence

Post

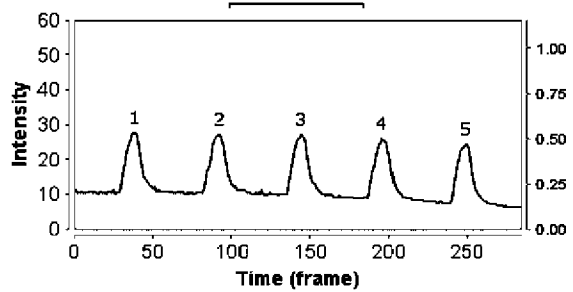
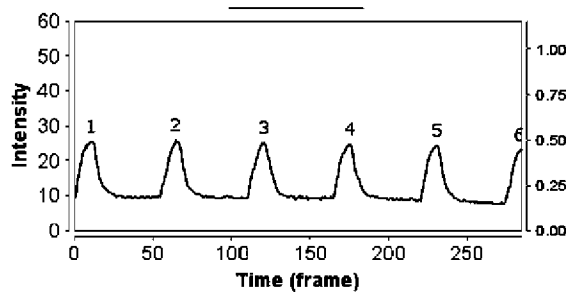
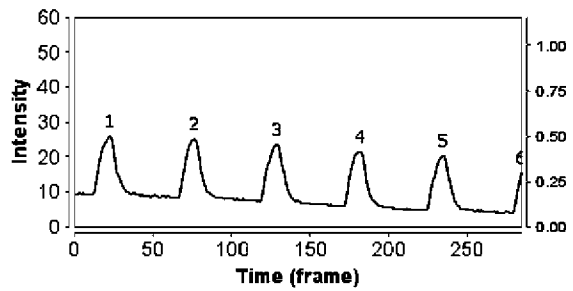


— fluorescence

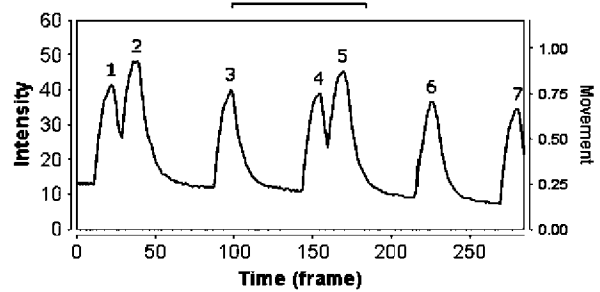
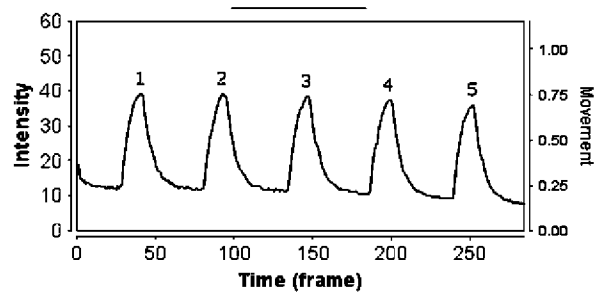
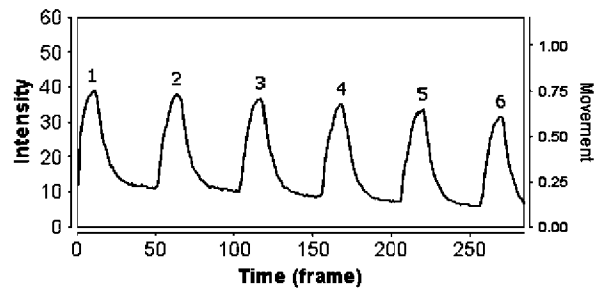
[図15-1]

特製維持培地

Pre



Post

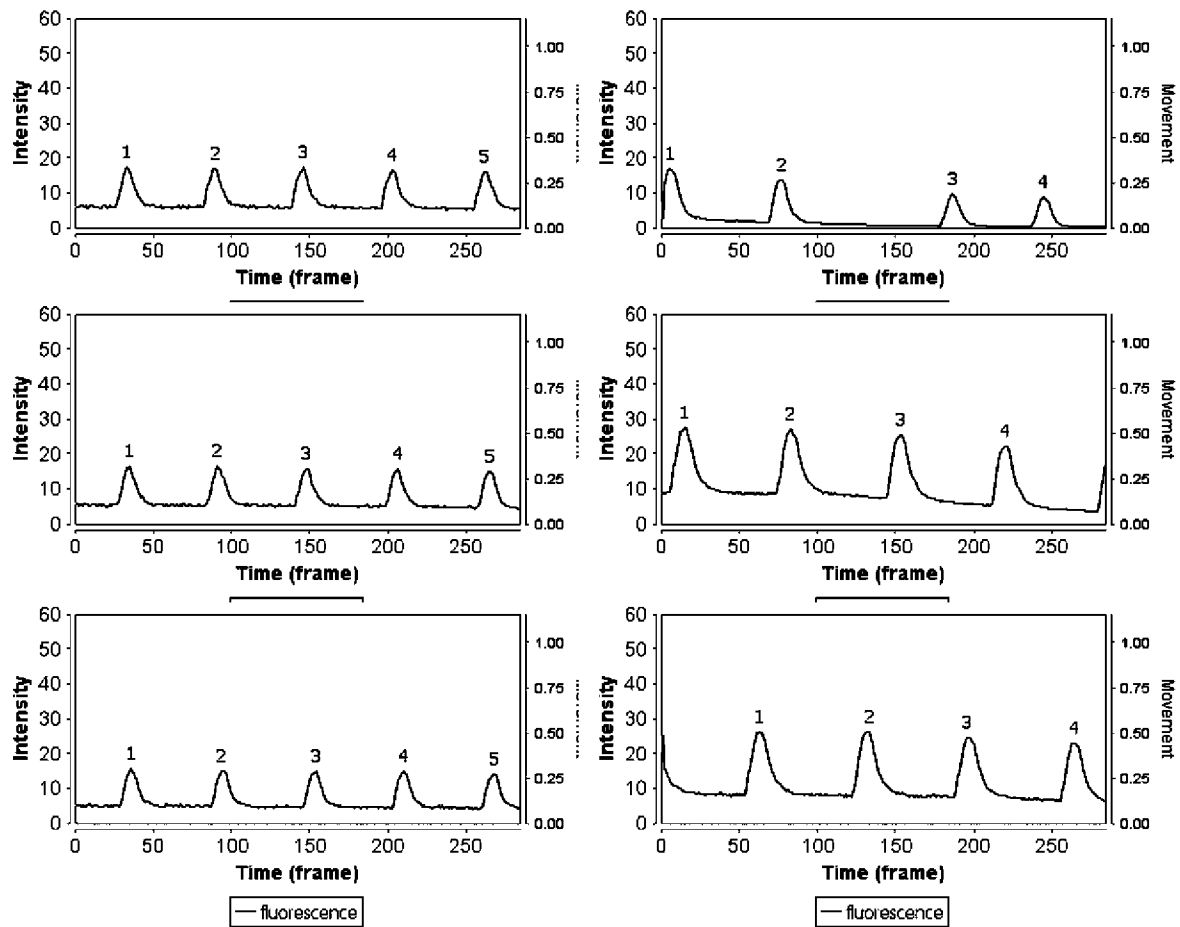


[図15-2]

CDI

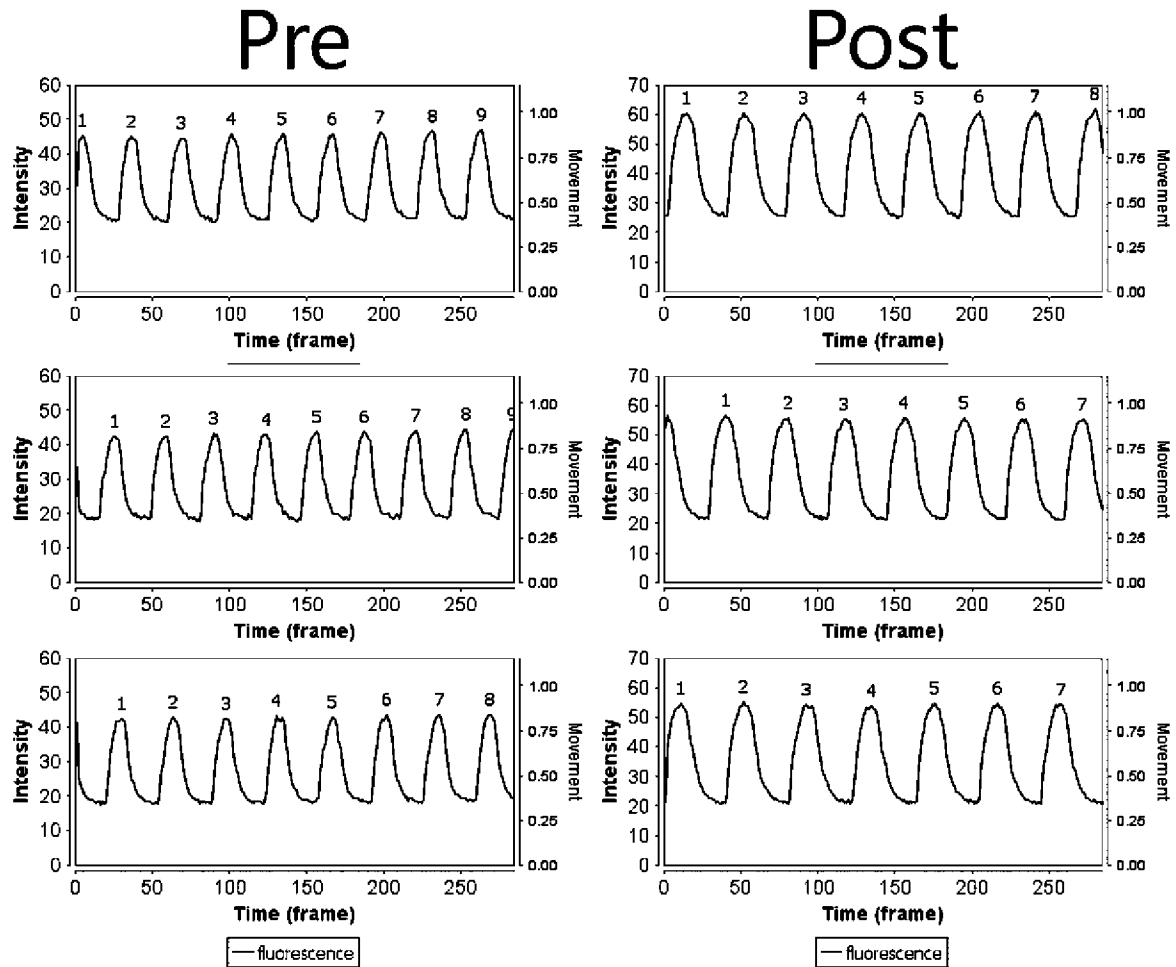
Pre

Post



[図16-1]

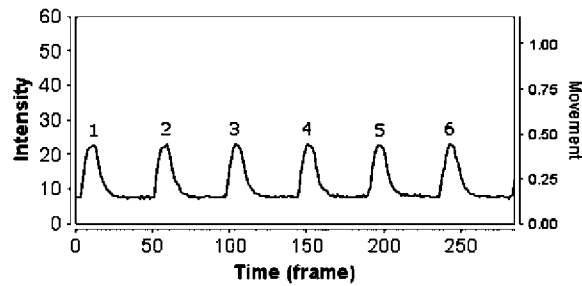
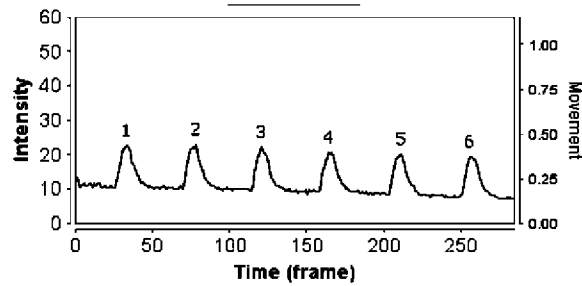
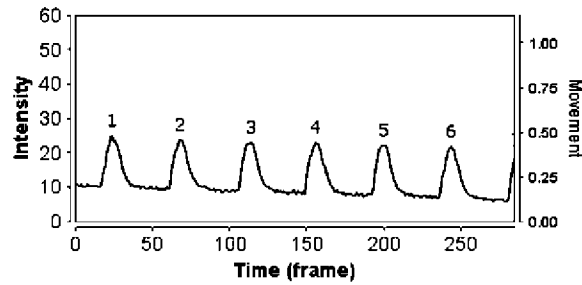
特製維持培地



[図16-2]

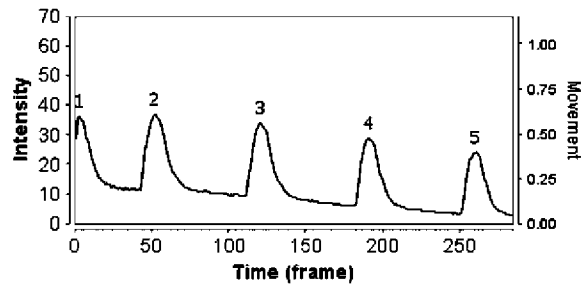
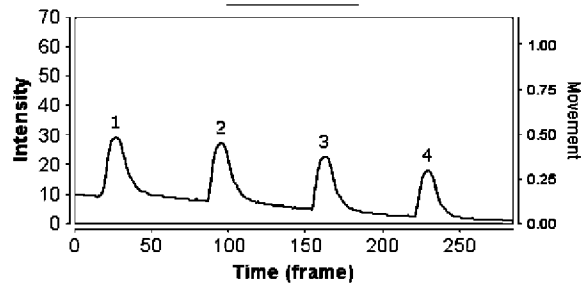
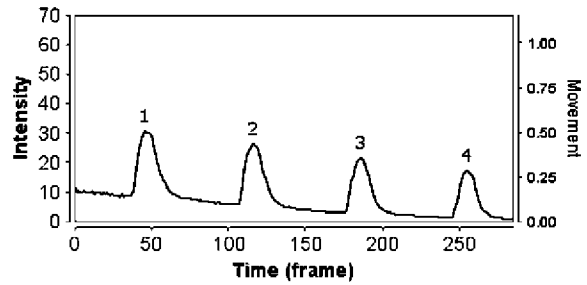
CDI

Pre



— fluorescence

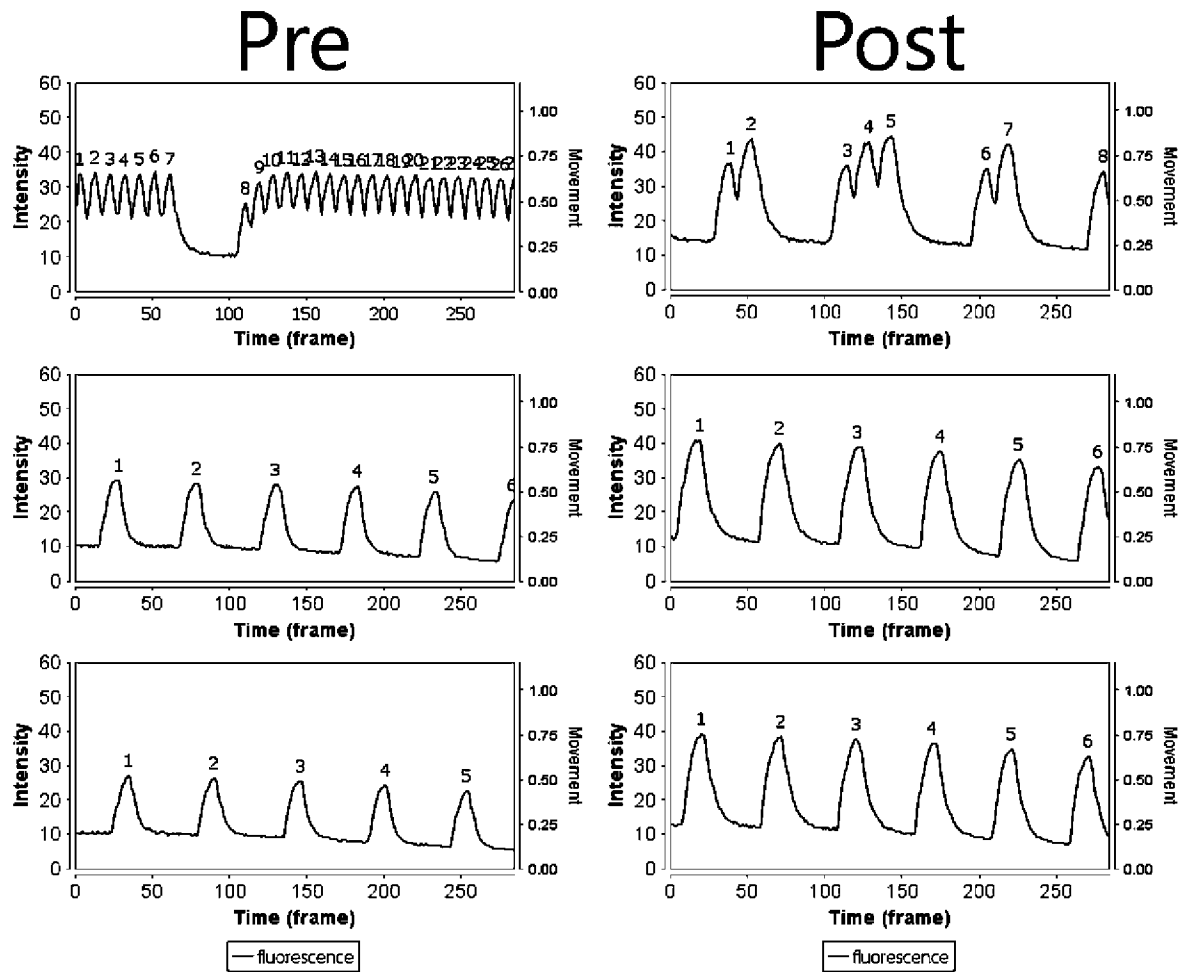
Post



— fluorescence

[図17-1]

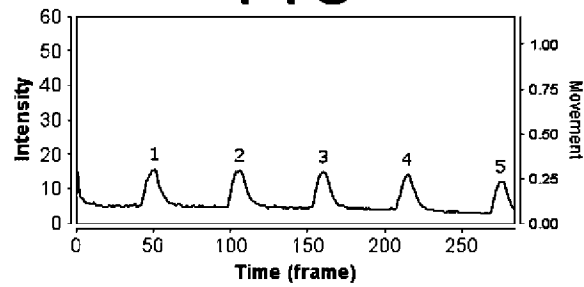
特製維持培地



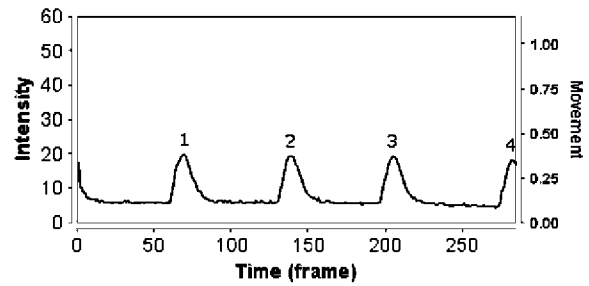
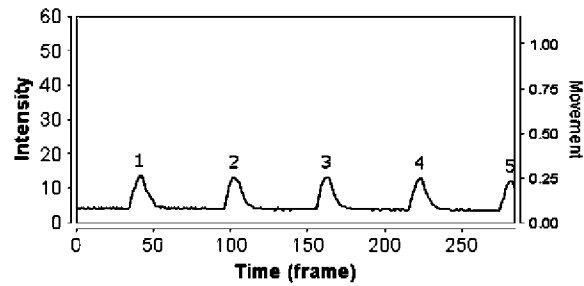
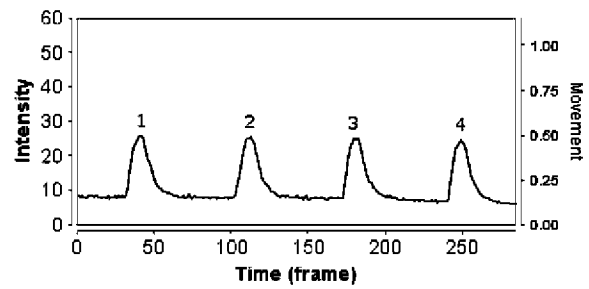
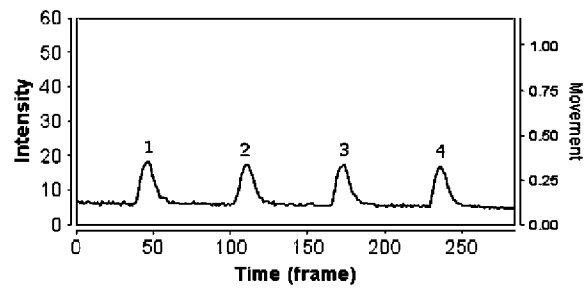
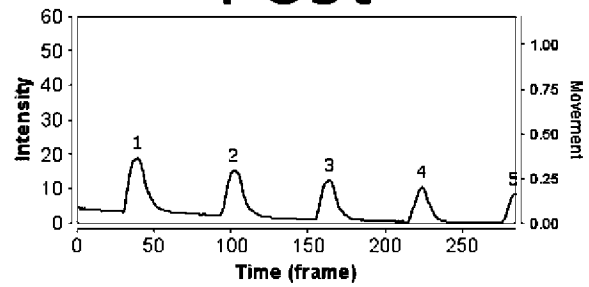
[図17-2]

CDI

Pre

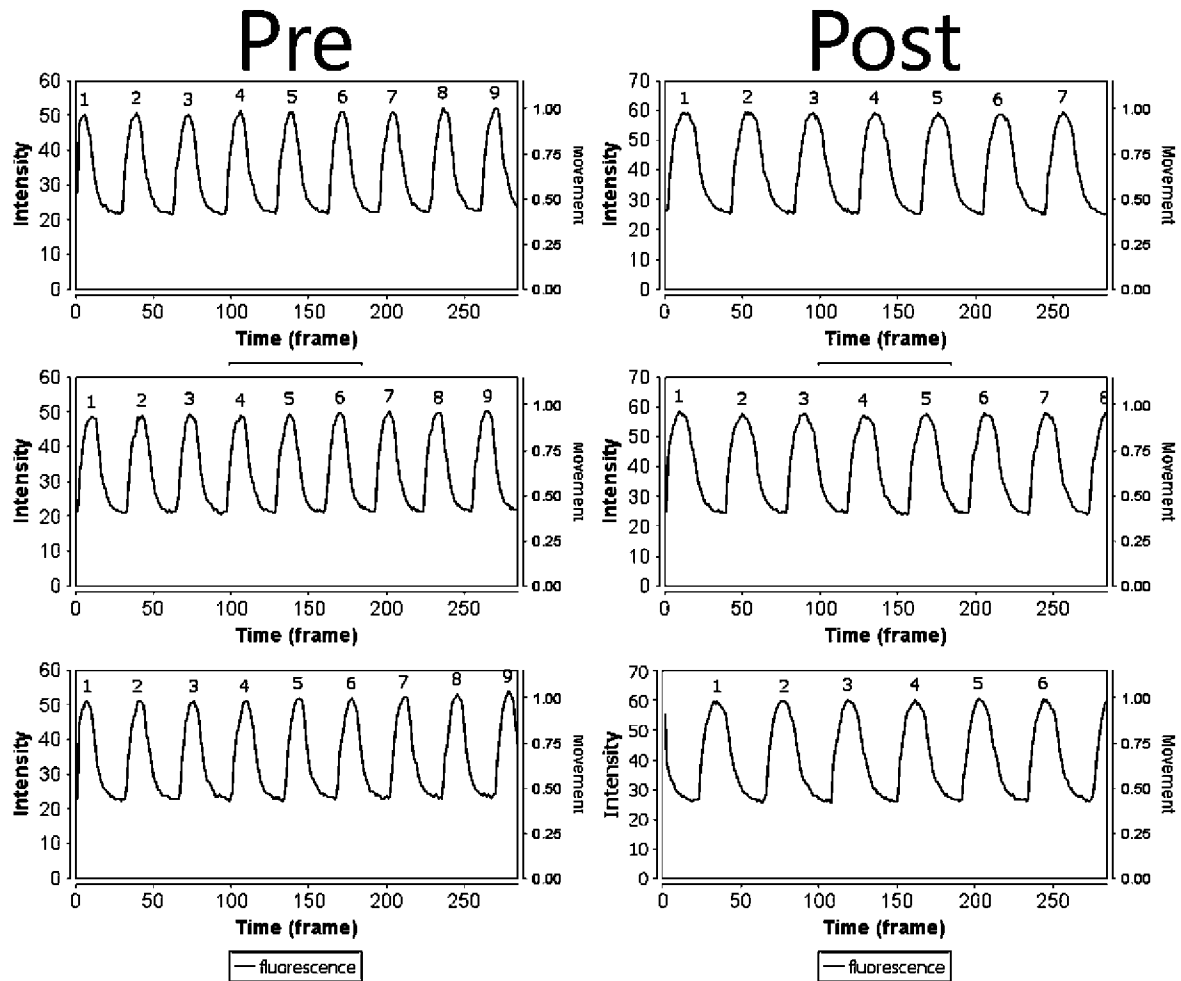


Post



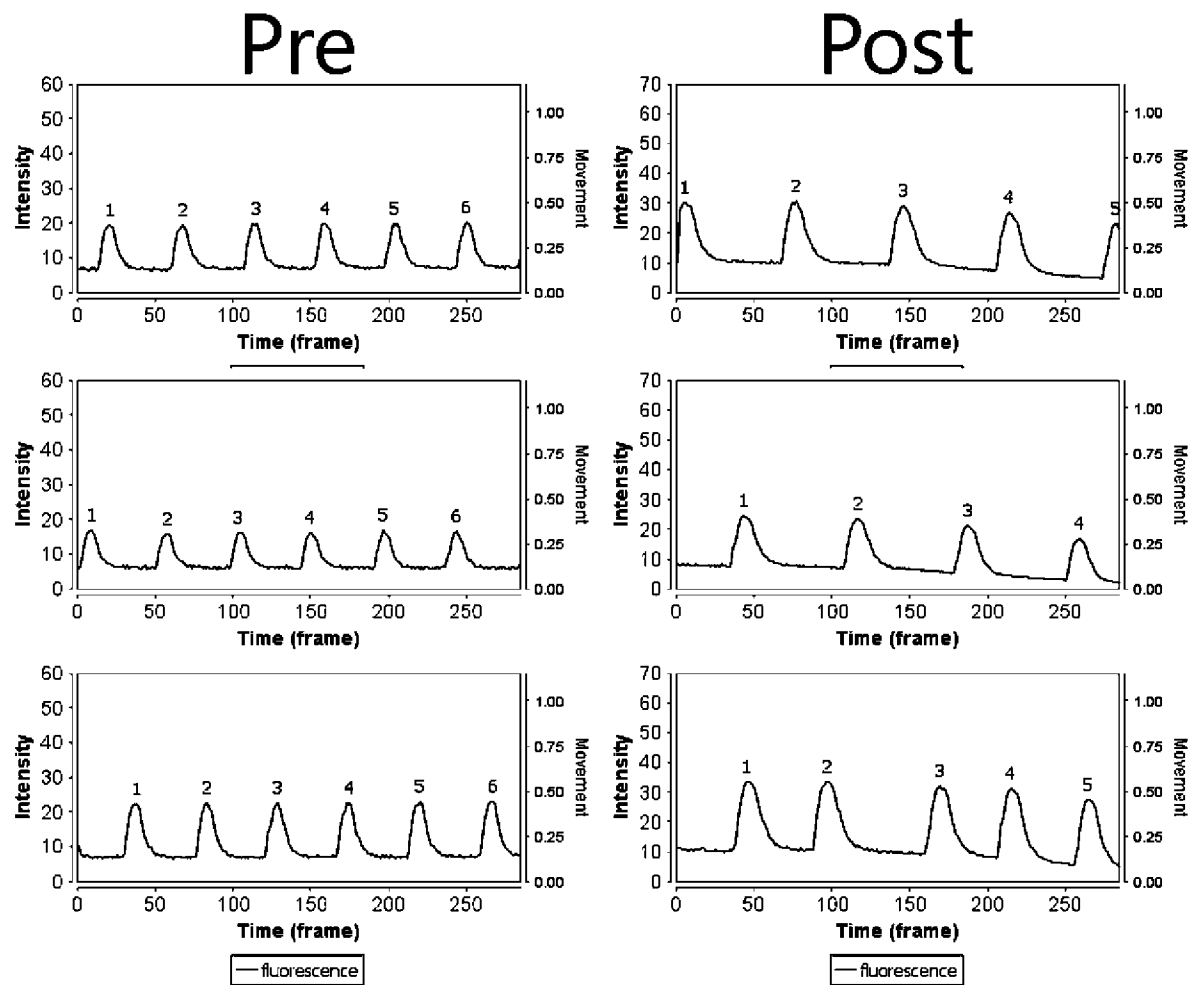
[図18-1]

特製維持培地



[図18-2]

CDI

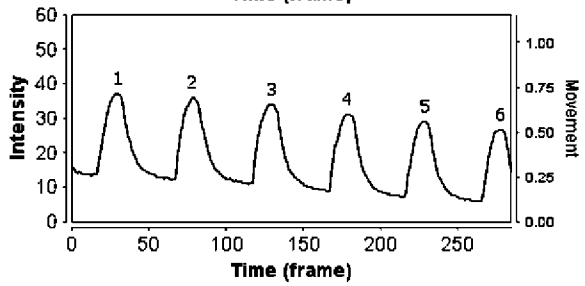
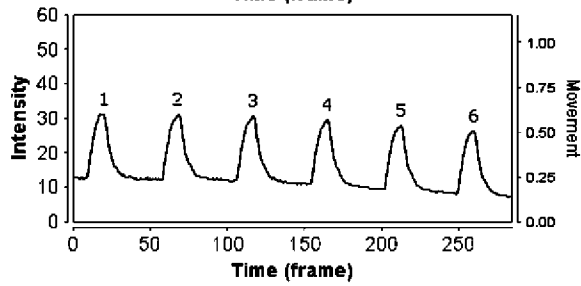
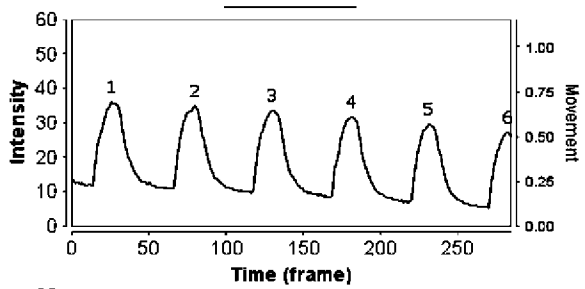
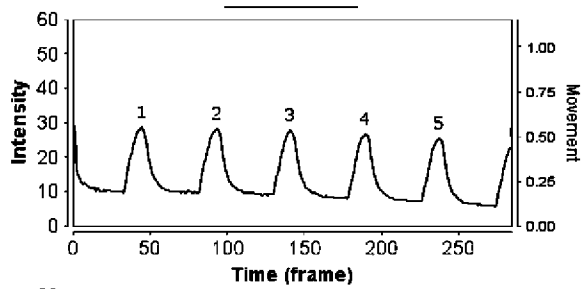
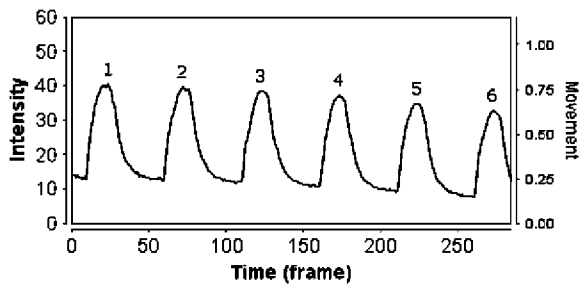
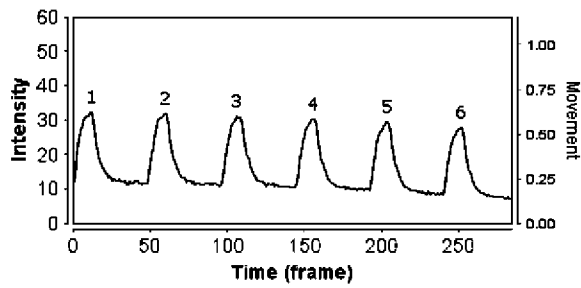


[図19-1]

特製維持培地

Pre

Post



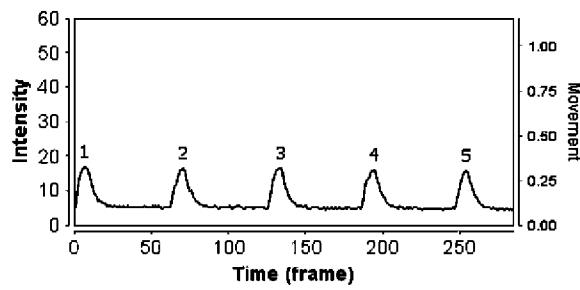
— fluorescence

— fluorescence

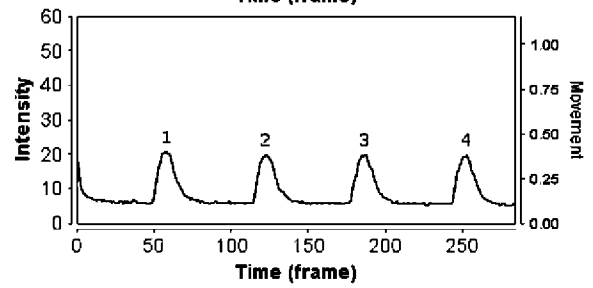
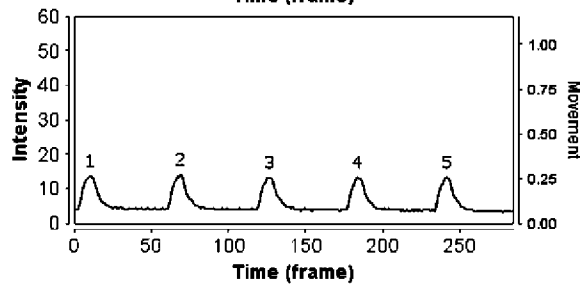
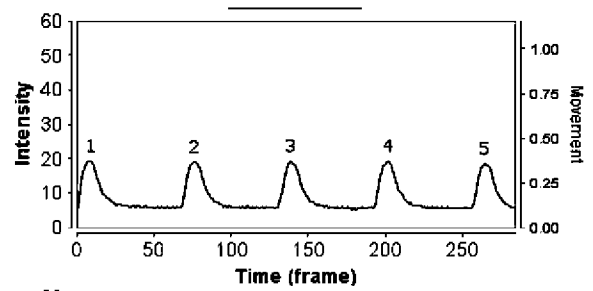
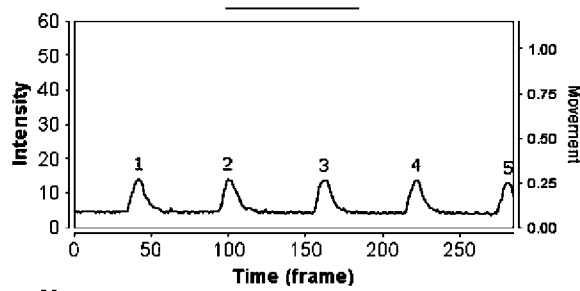
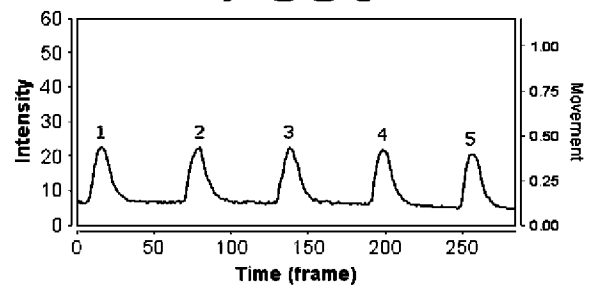
[図19-2]

CDI

Pre



Post

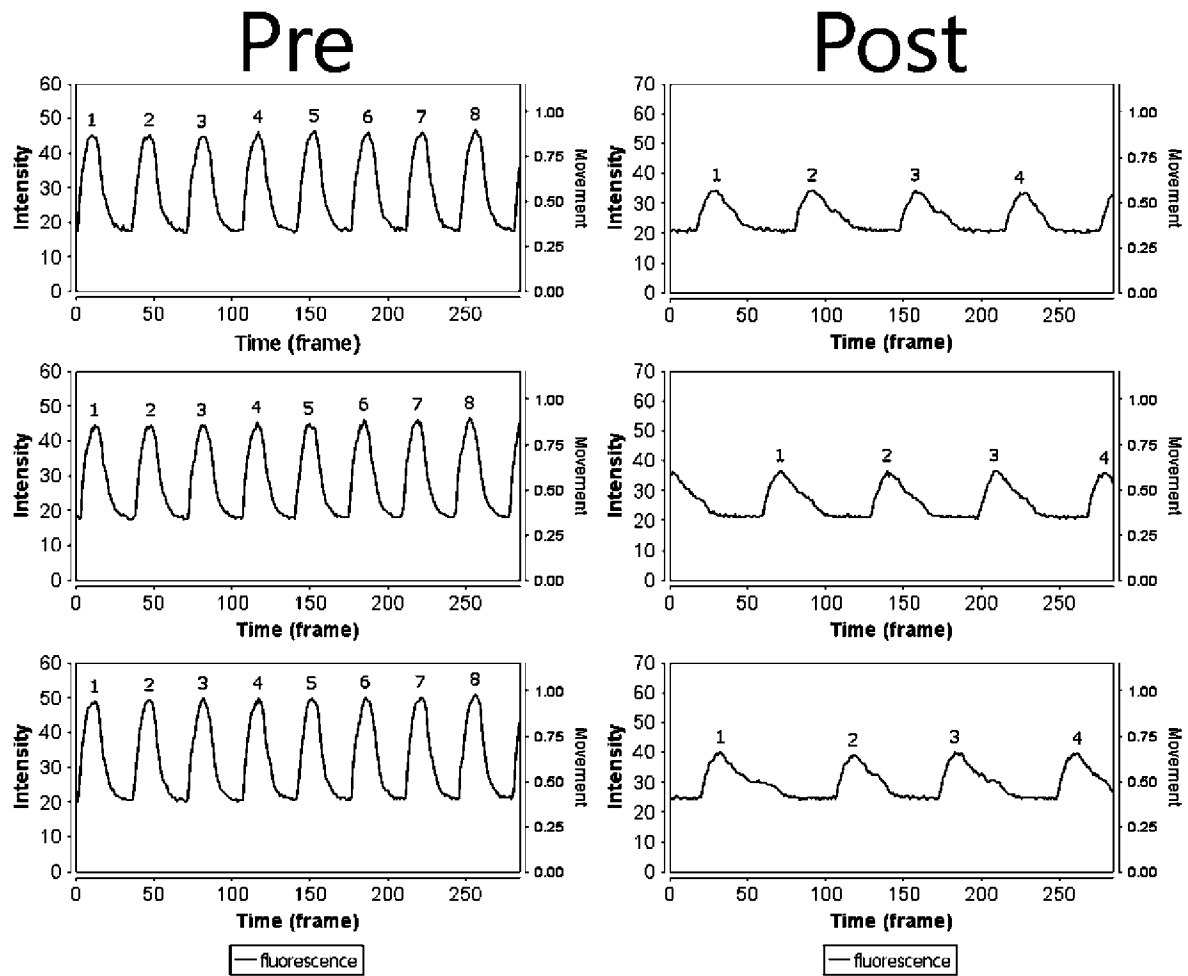


— fluorescence

— fluorescence

[図20-1]

特製維持培地

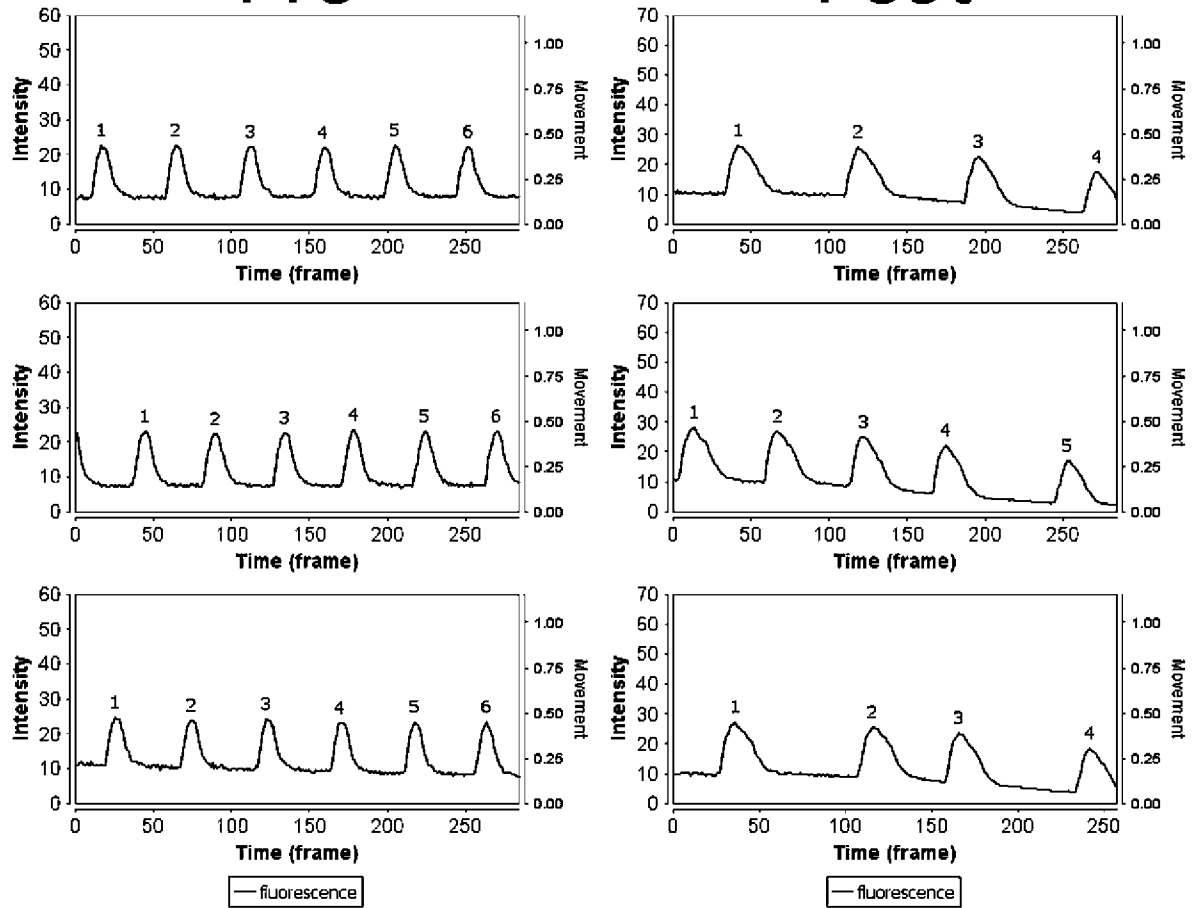


[図20-2]

CDI

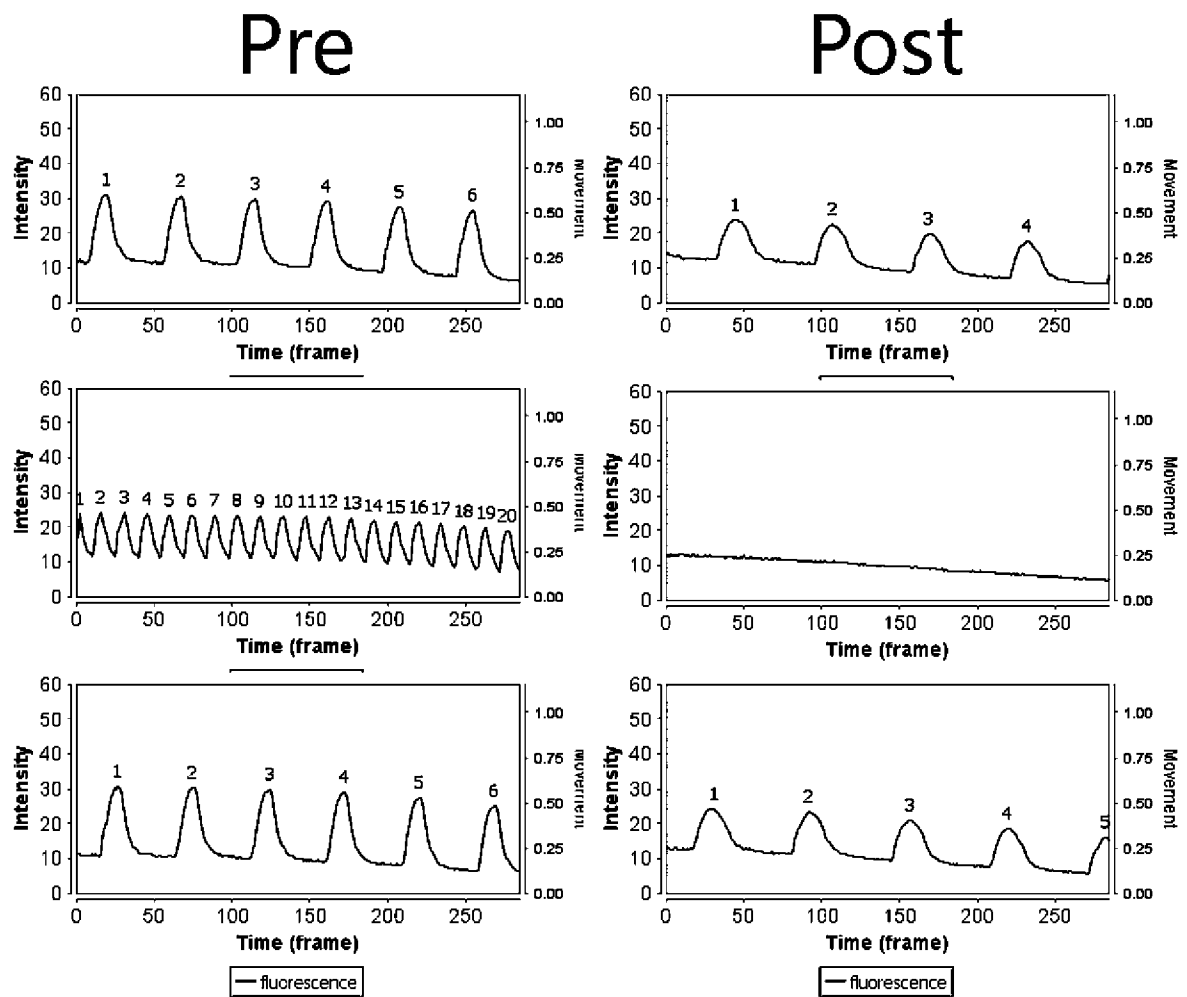
Pre

Post



[図21-1]

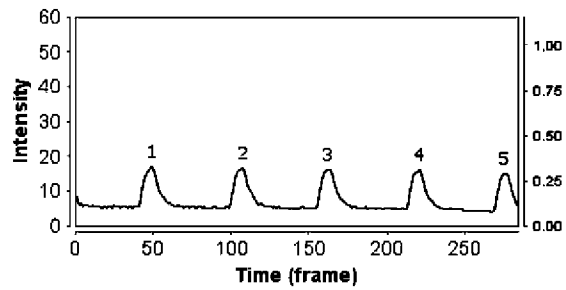
特製維持培地



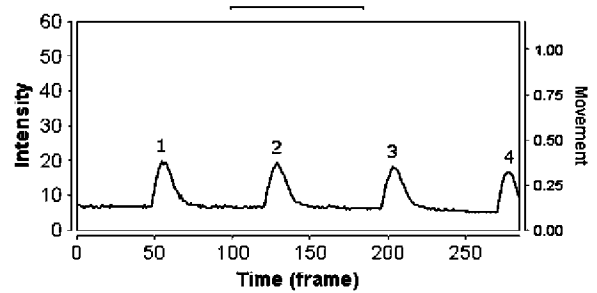
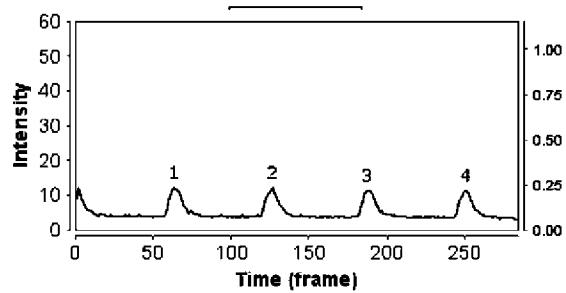
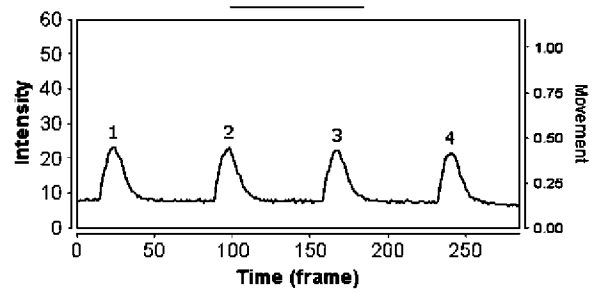
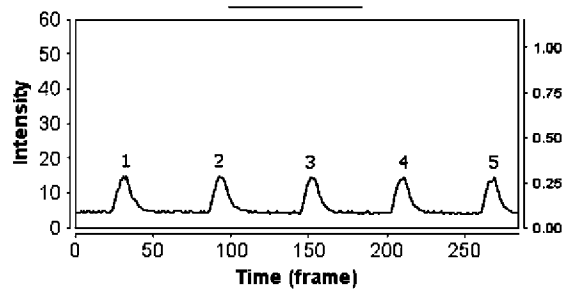
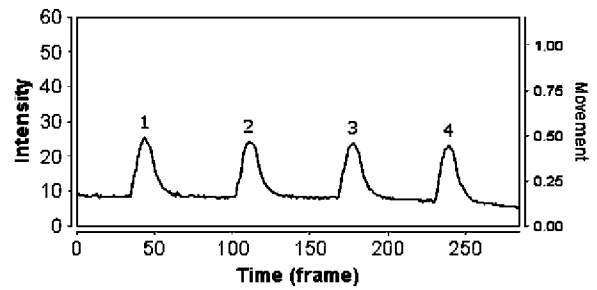
[図21-2]

CDI

Pre

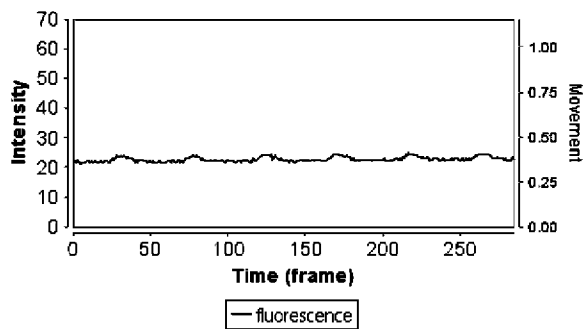
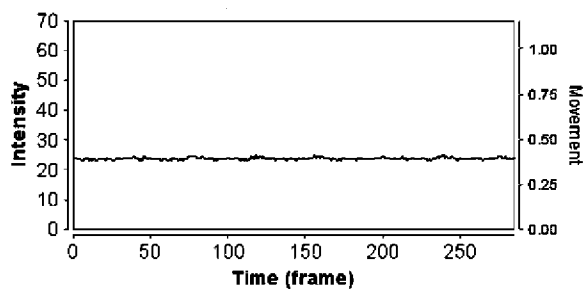
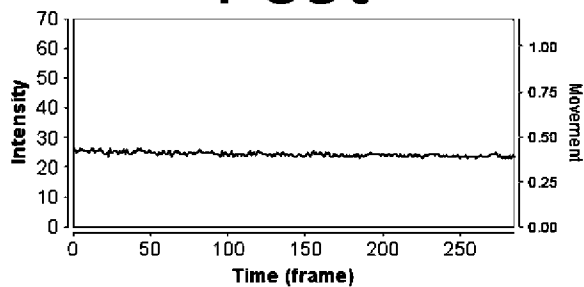


Post



特製維持培地

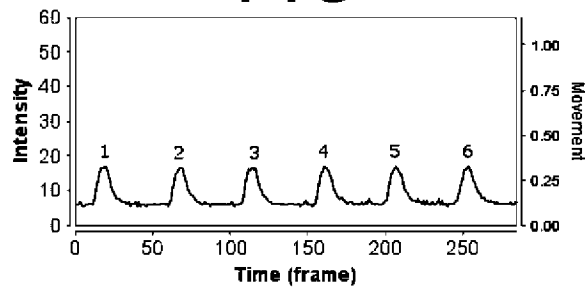
Post



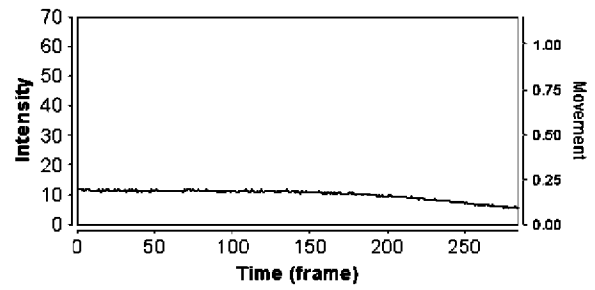
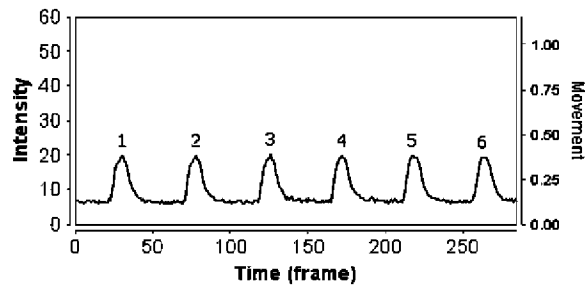
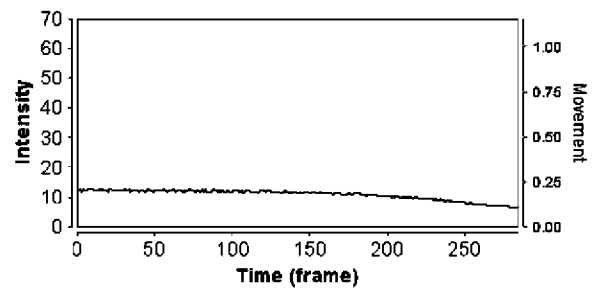
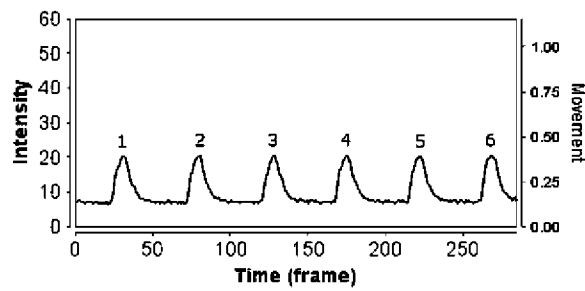
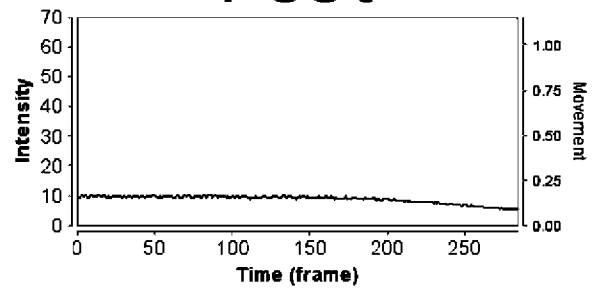
[図22-2]

CDI

Pre



Post

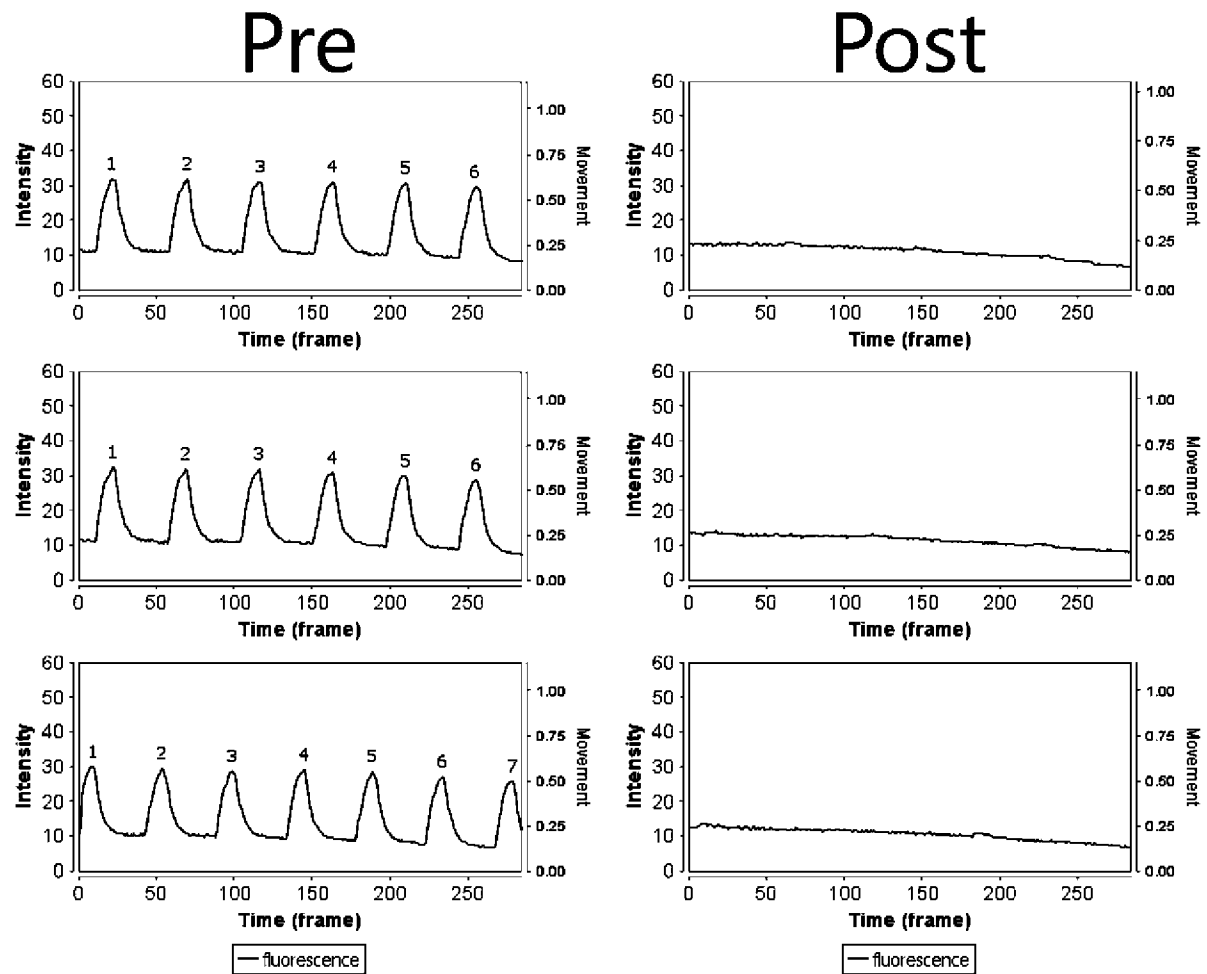


— fluorescence

— fluorescence

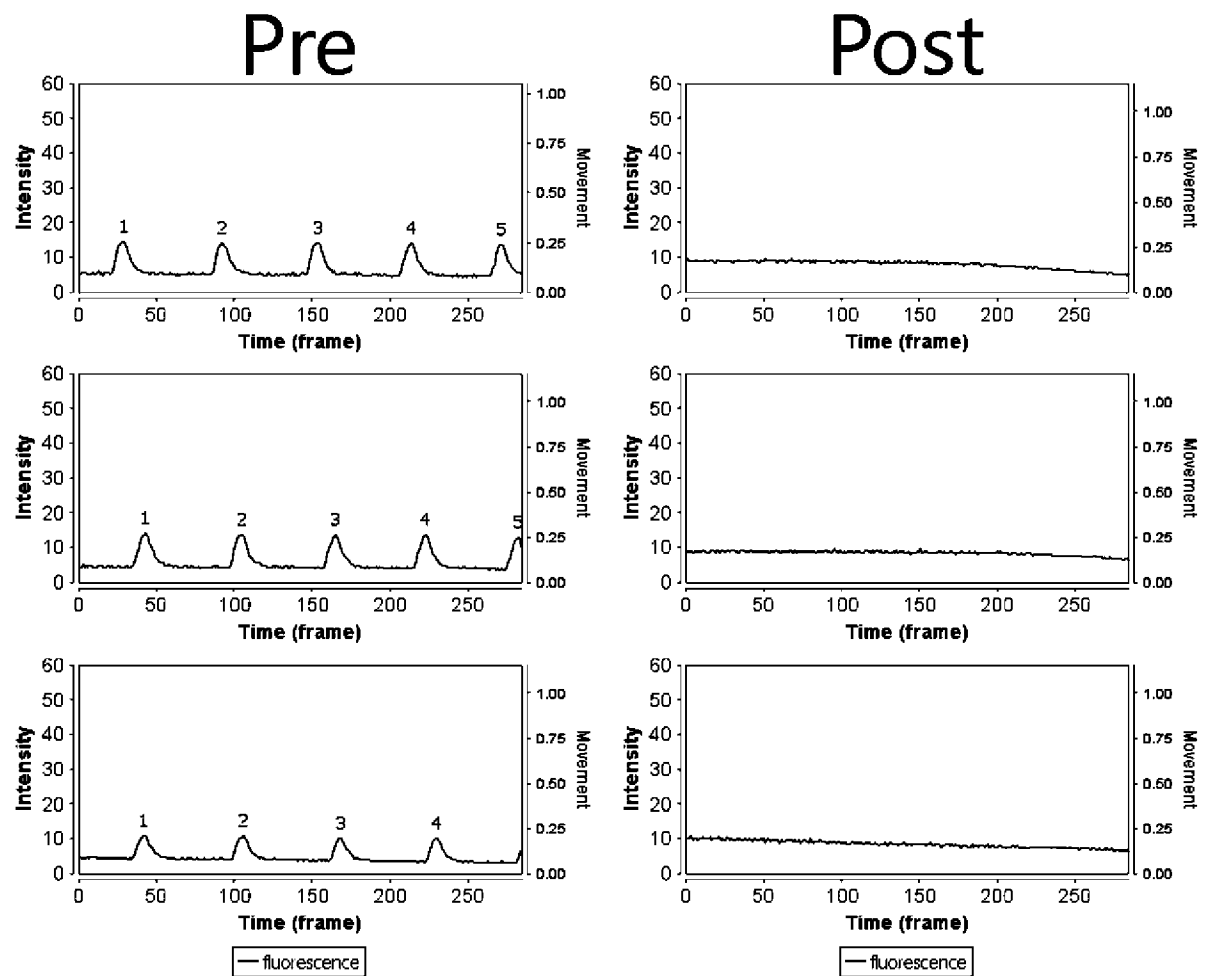
[図23-1]

特製維持培地

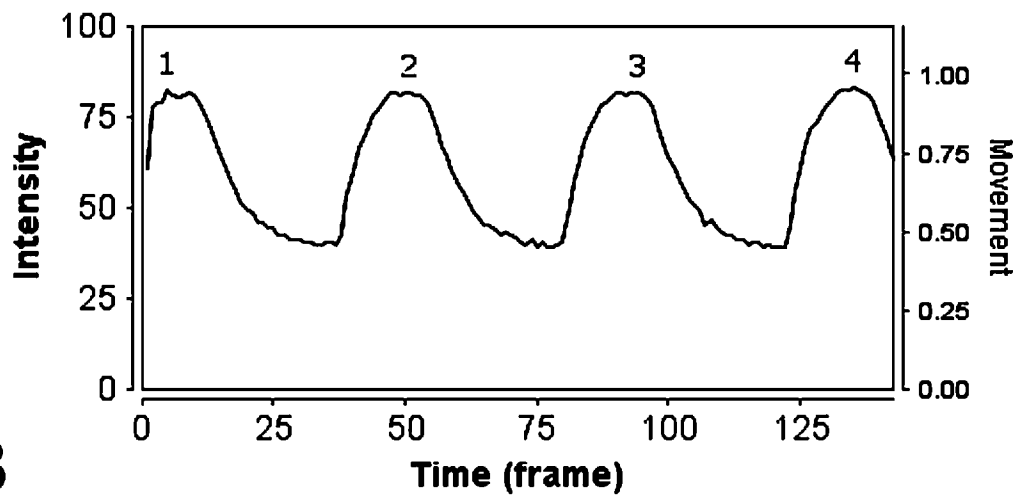
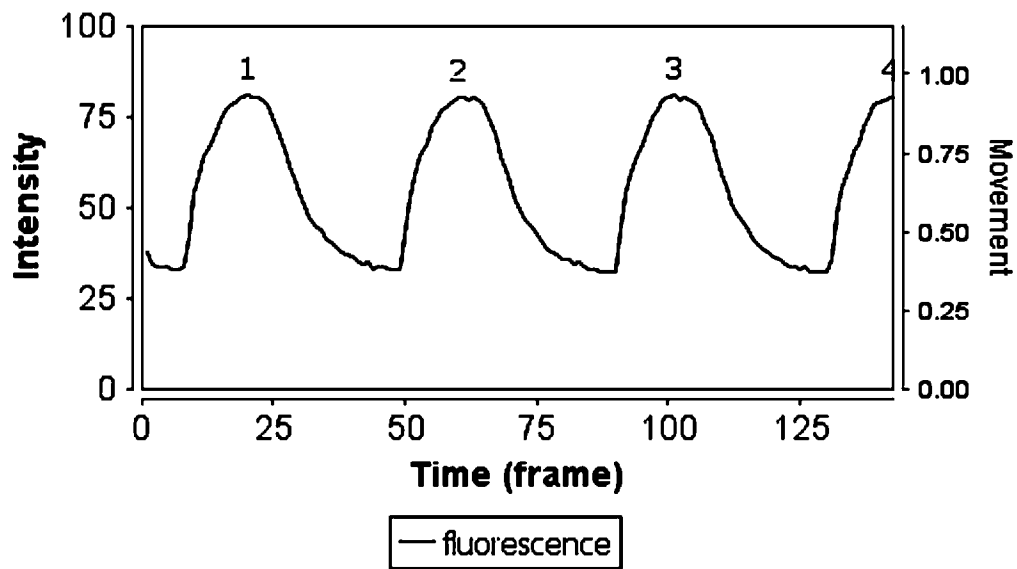


[図23-2]

CDI



[図24-1]

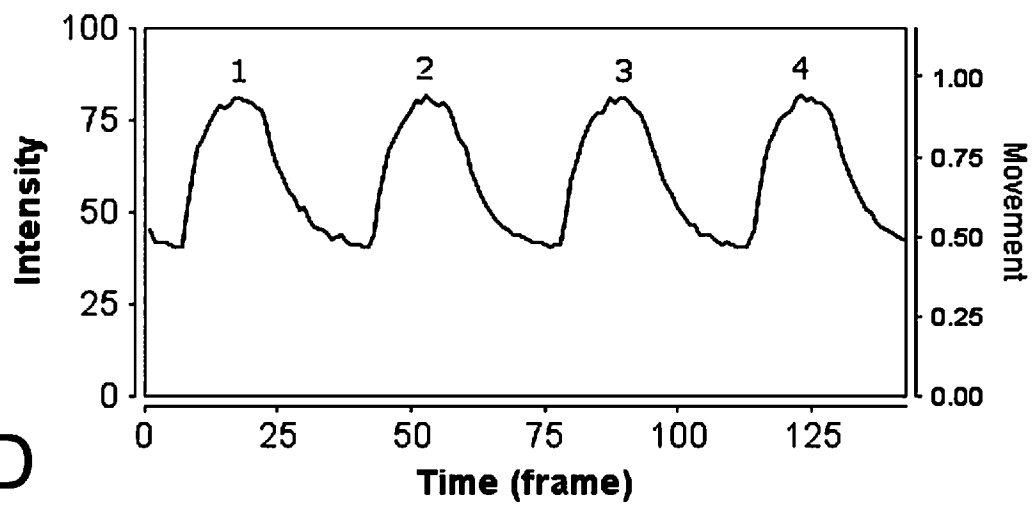
A pre**B**

[図24-2]

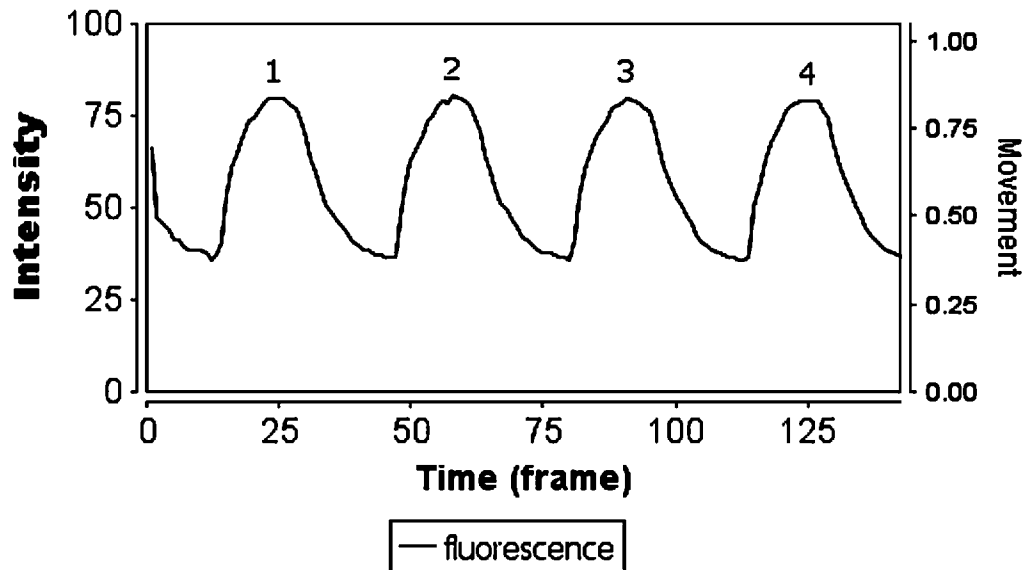
Verapamil 10nM

C

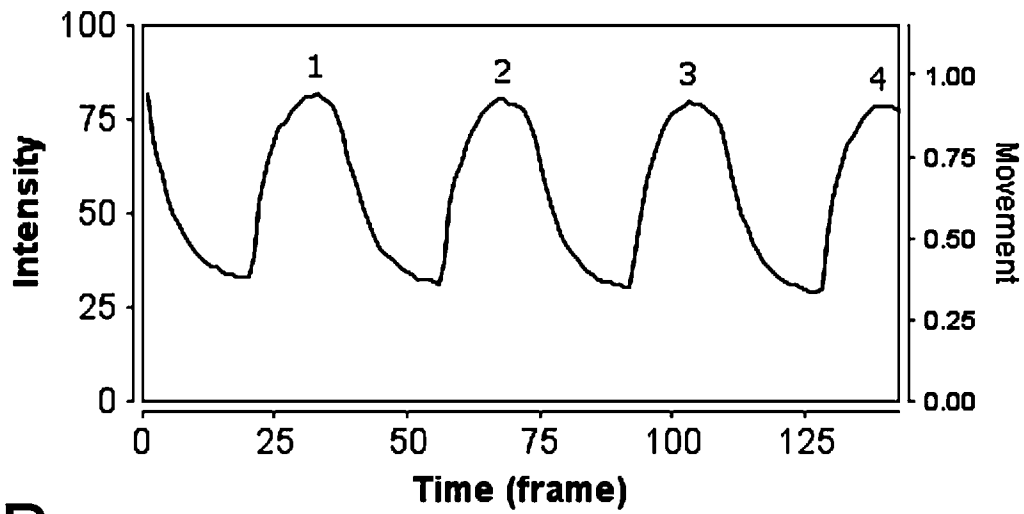
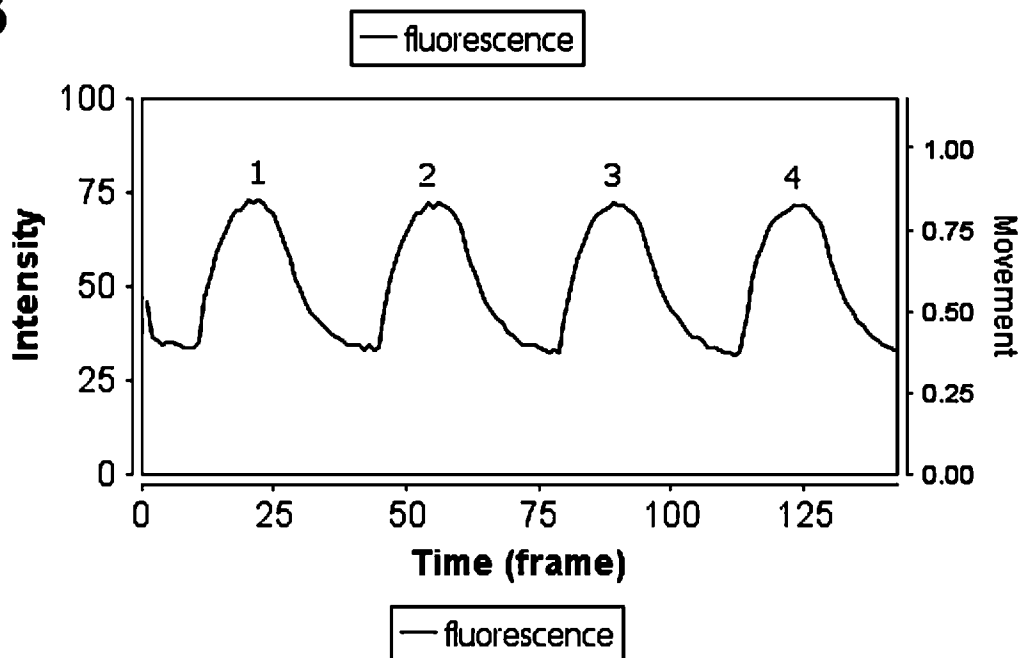
post



D



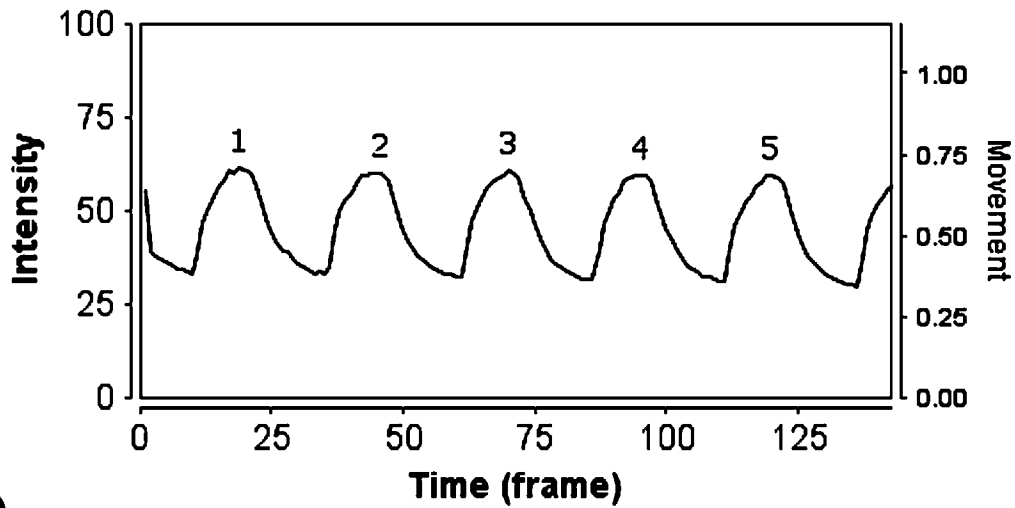
[図25-1]

A pre**B**

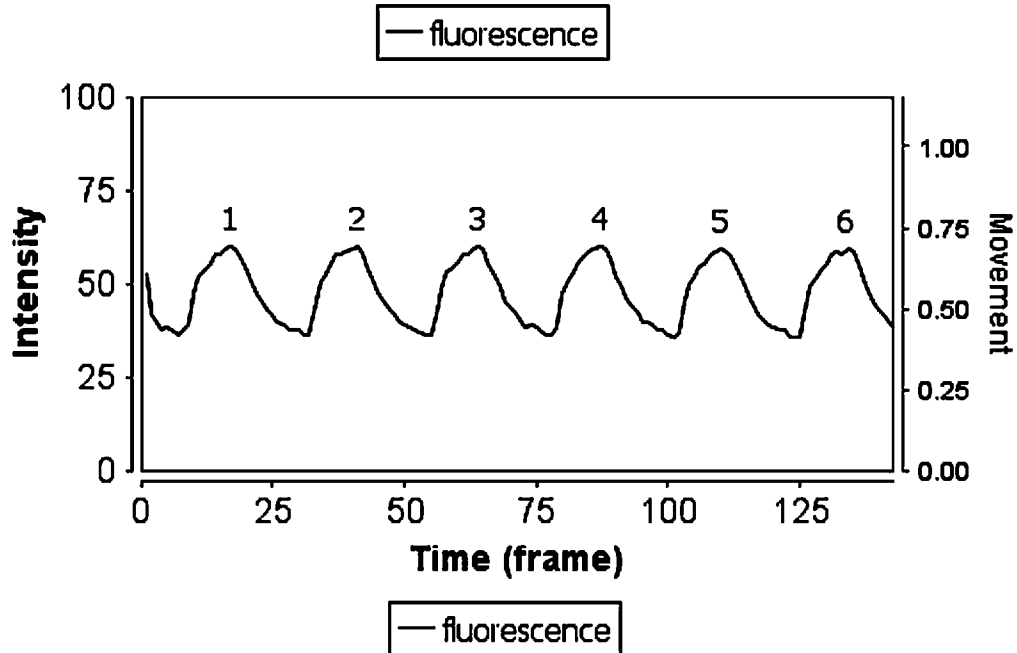
[図25-2]

Verapamil 100nM

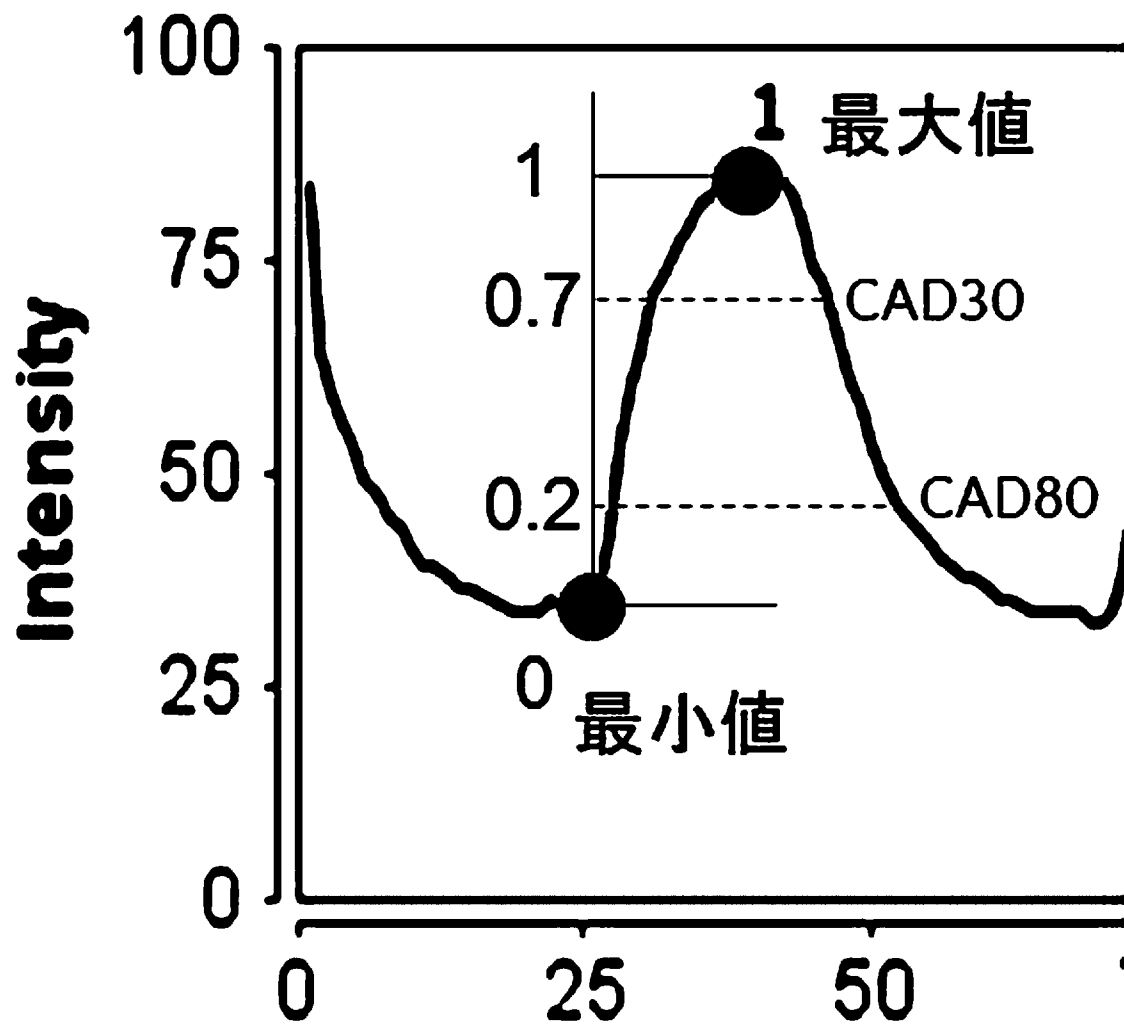
C post



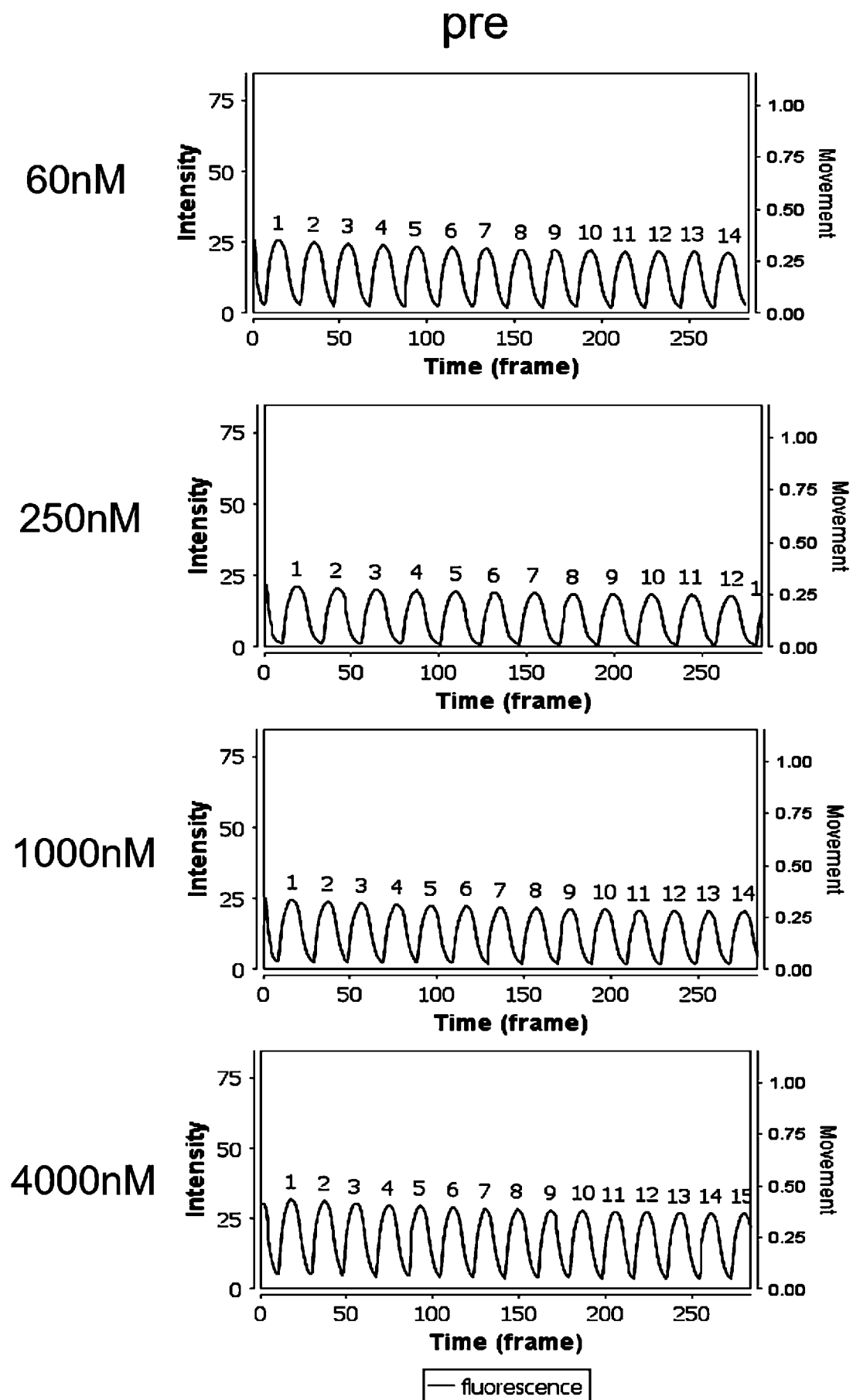
D



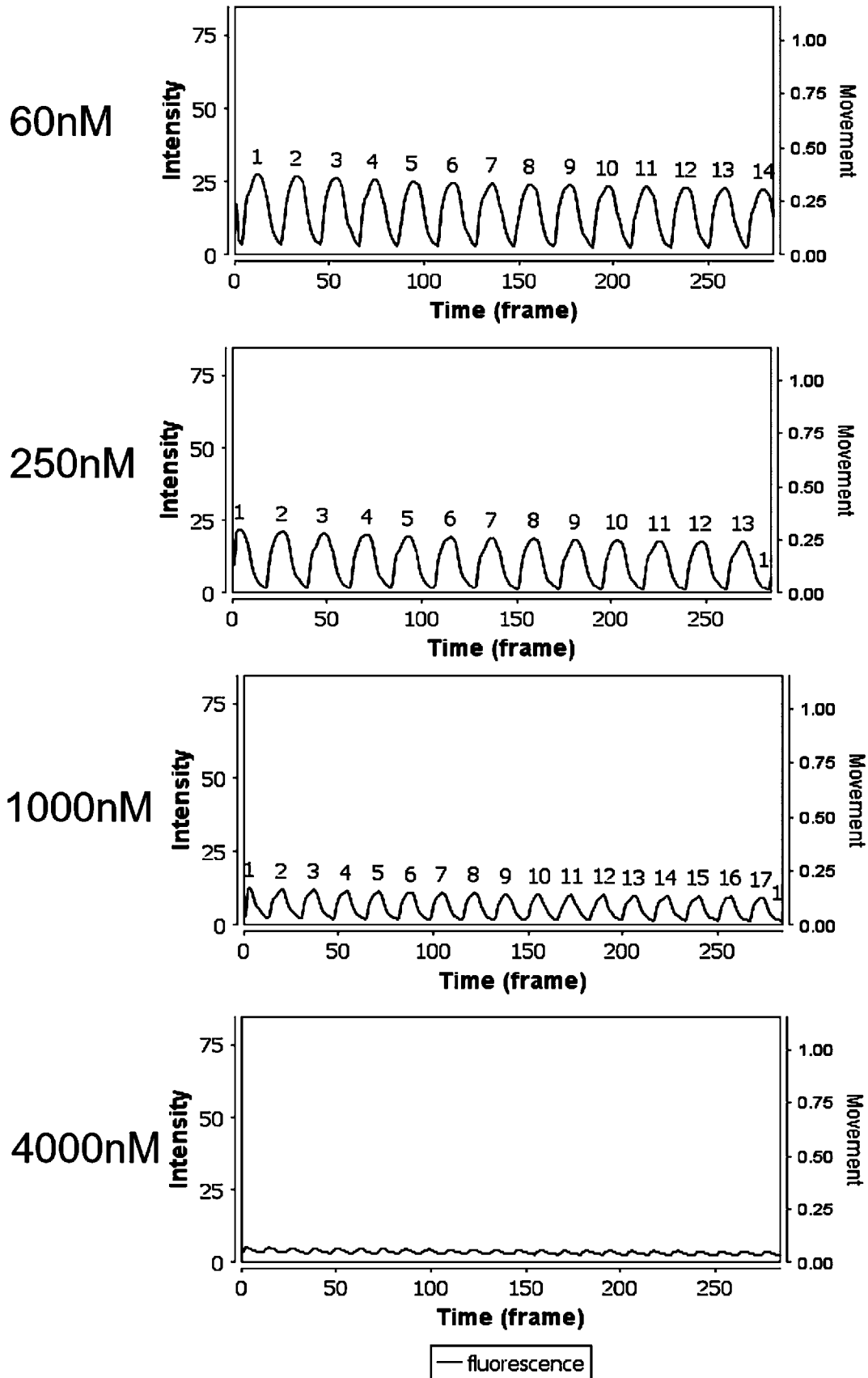
[図26]



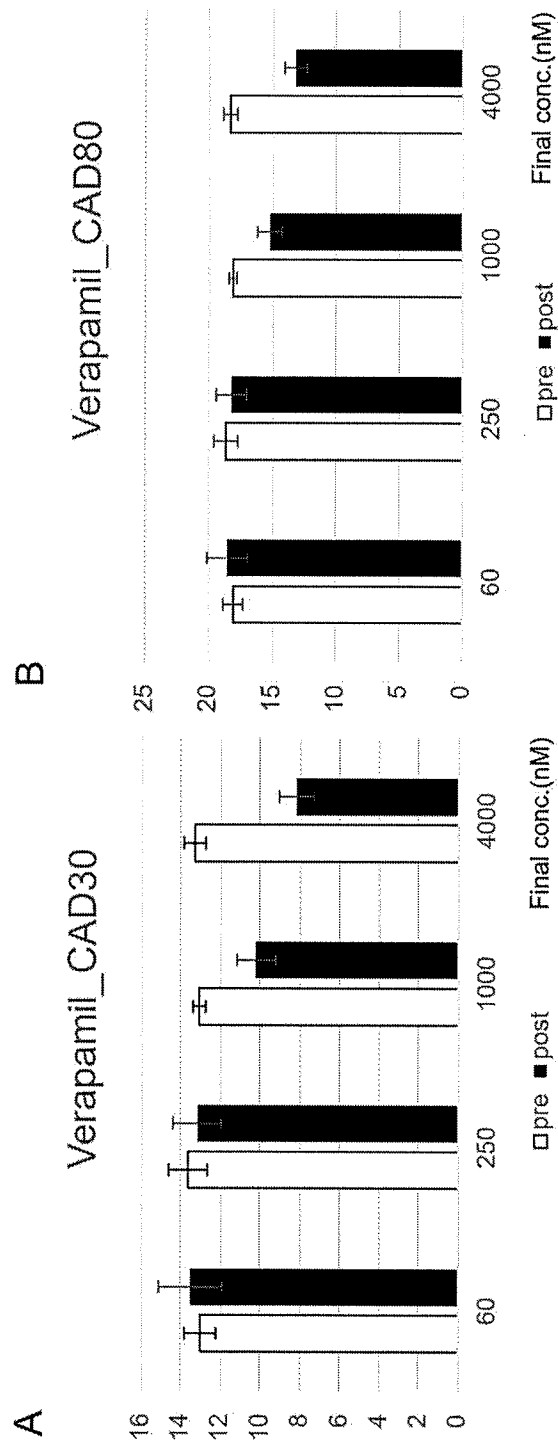
[図27-1]



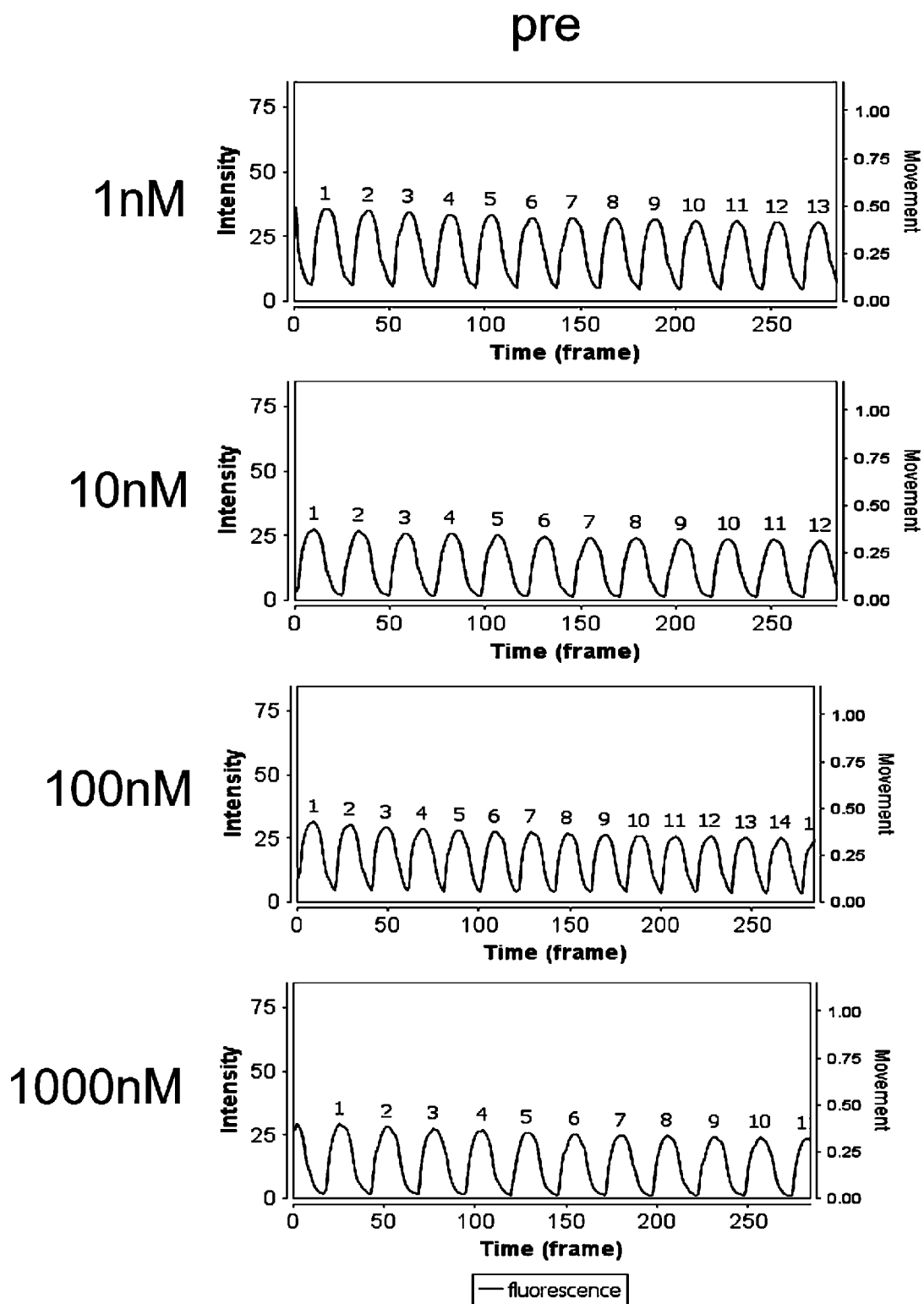
[図27-2]

Verapamil
post

[図28]

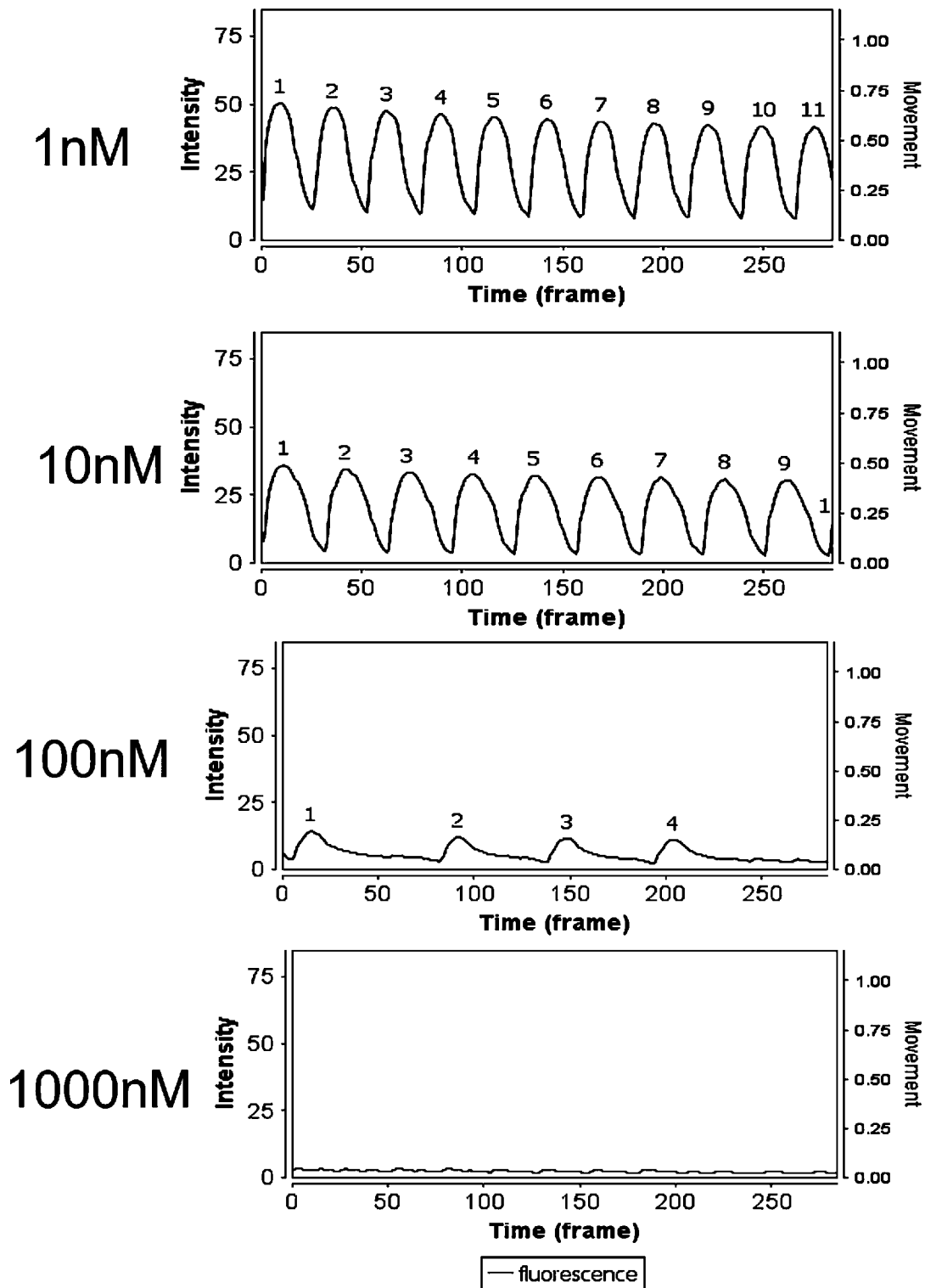


[図29-1]

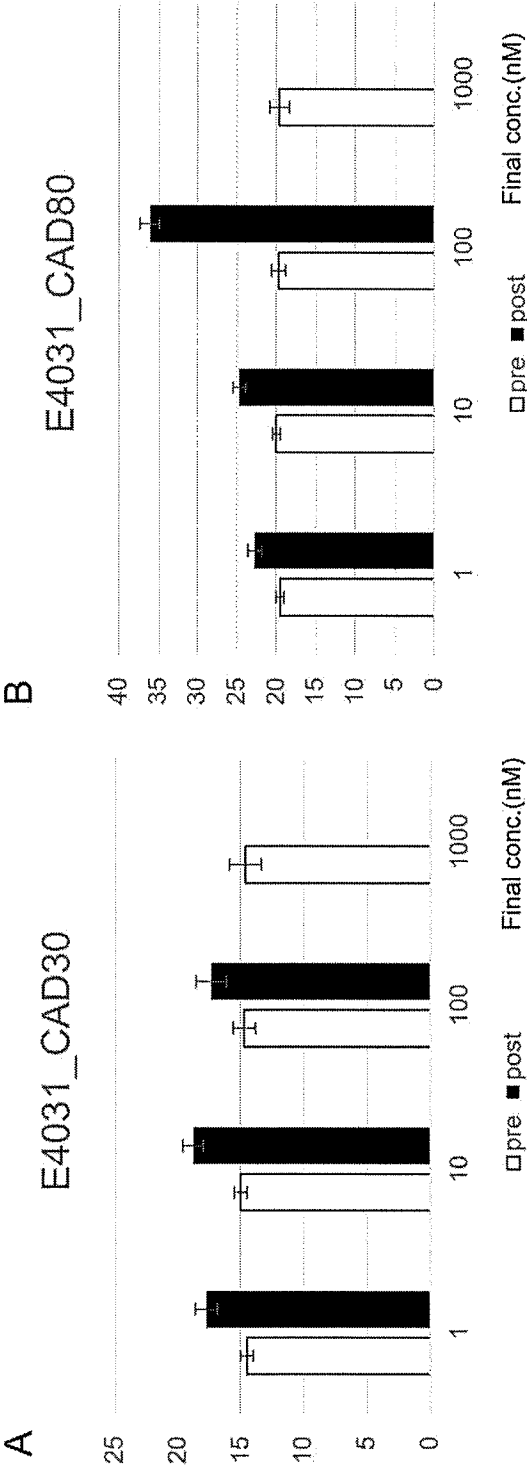


[図29-2]

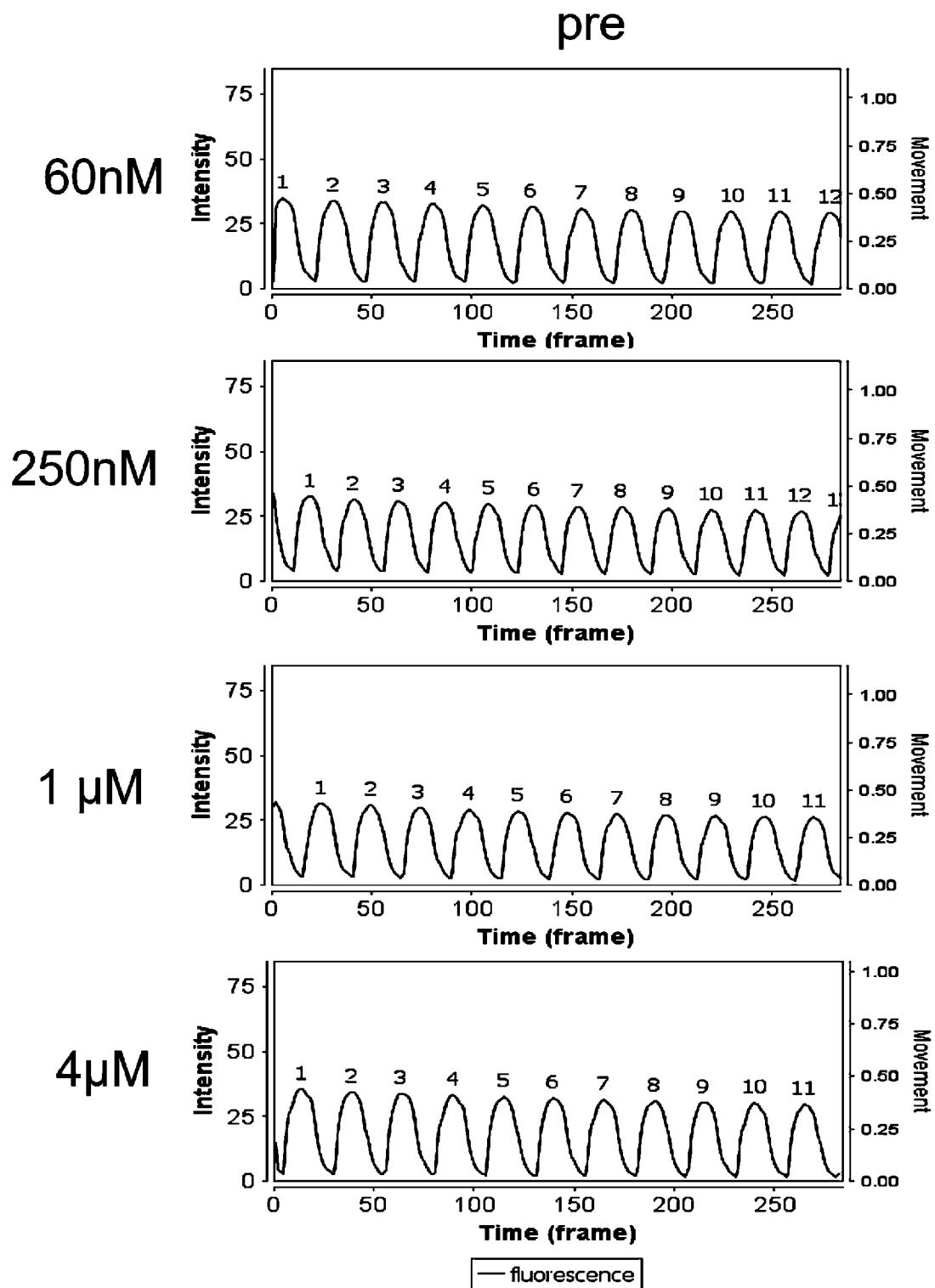
E-4031 post



[図30]

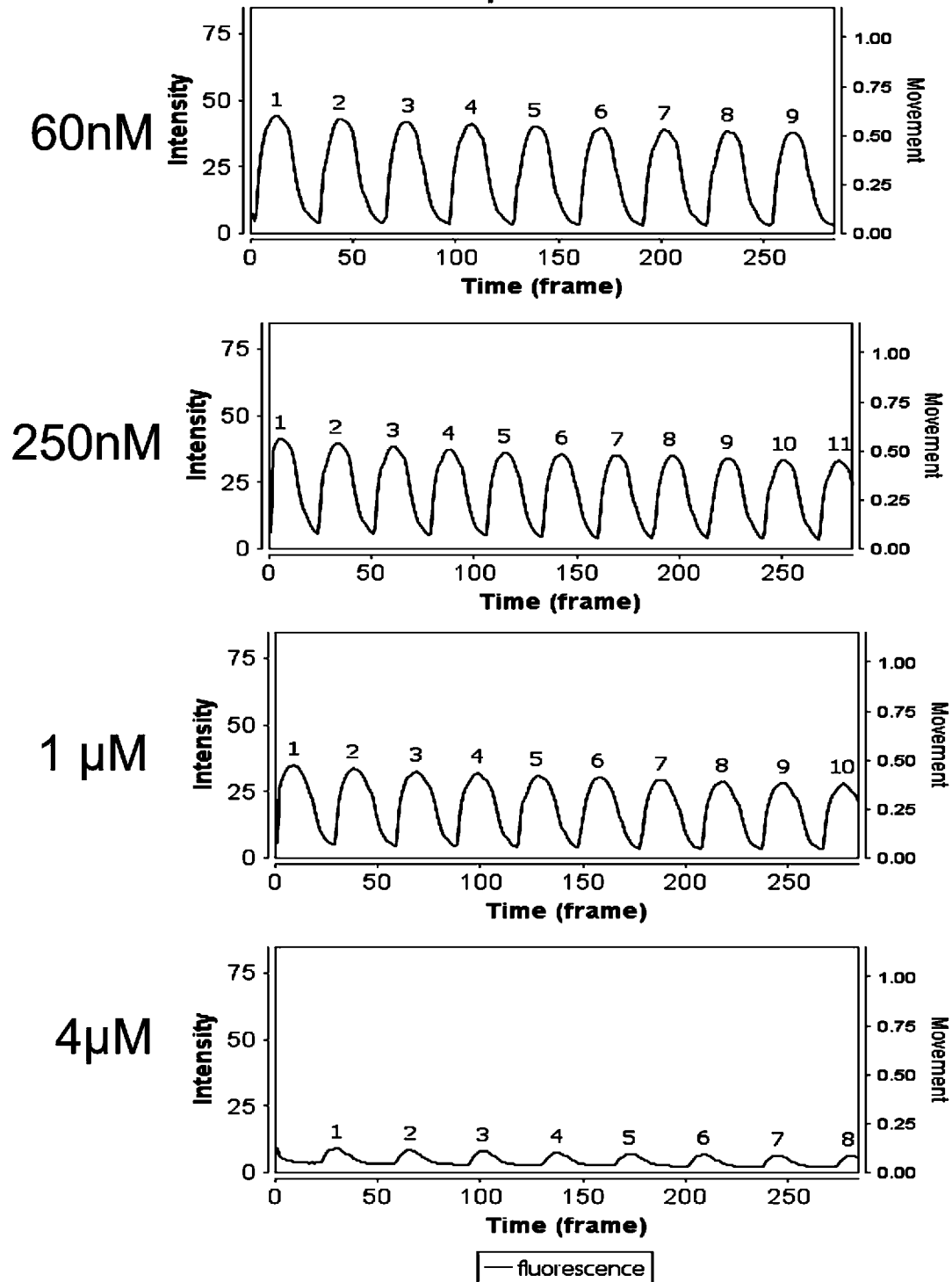


[図31-1]

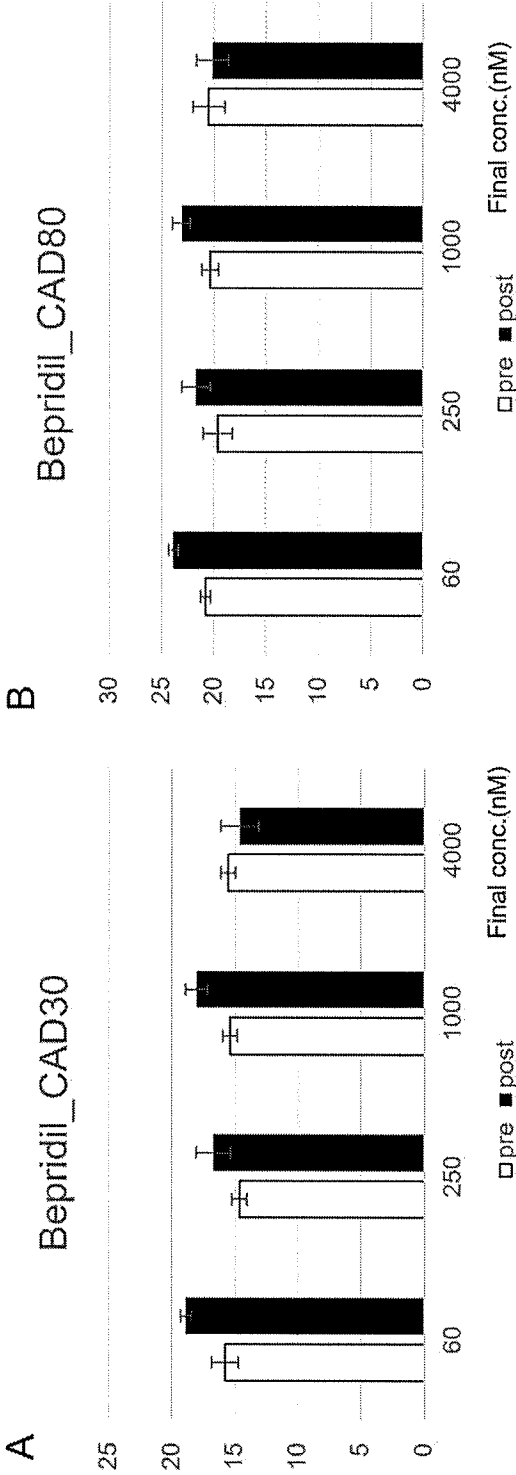


[図31-2]

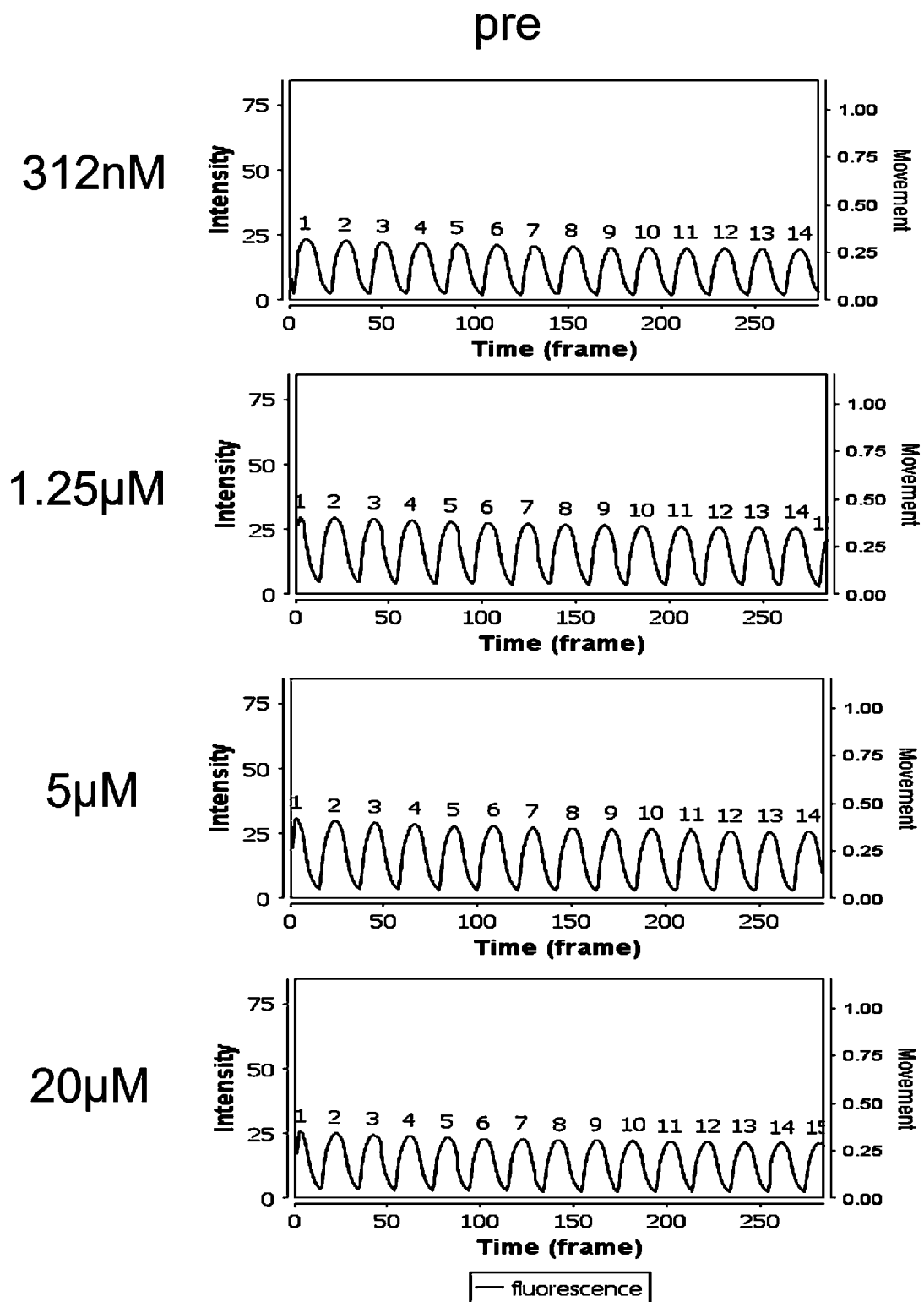
Bepridil post



[図32]

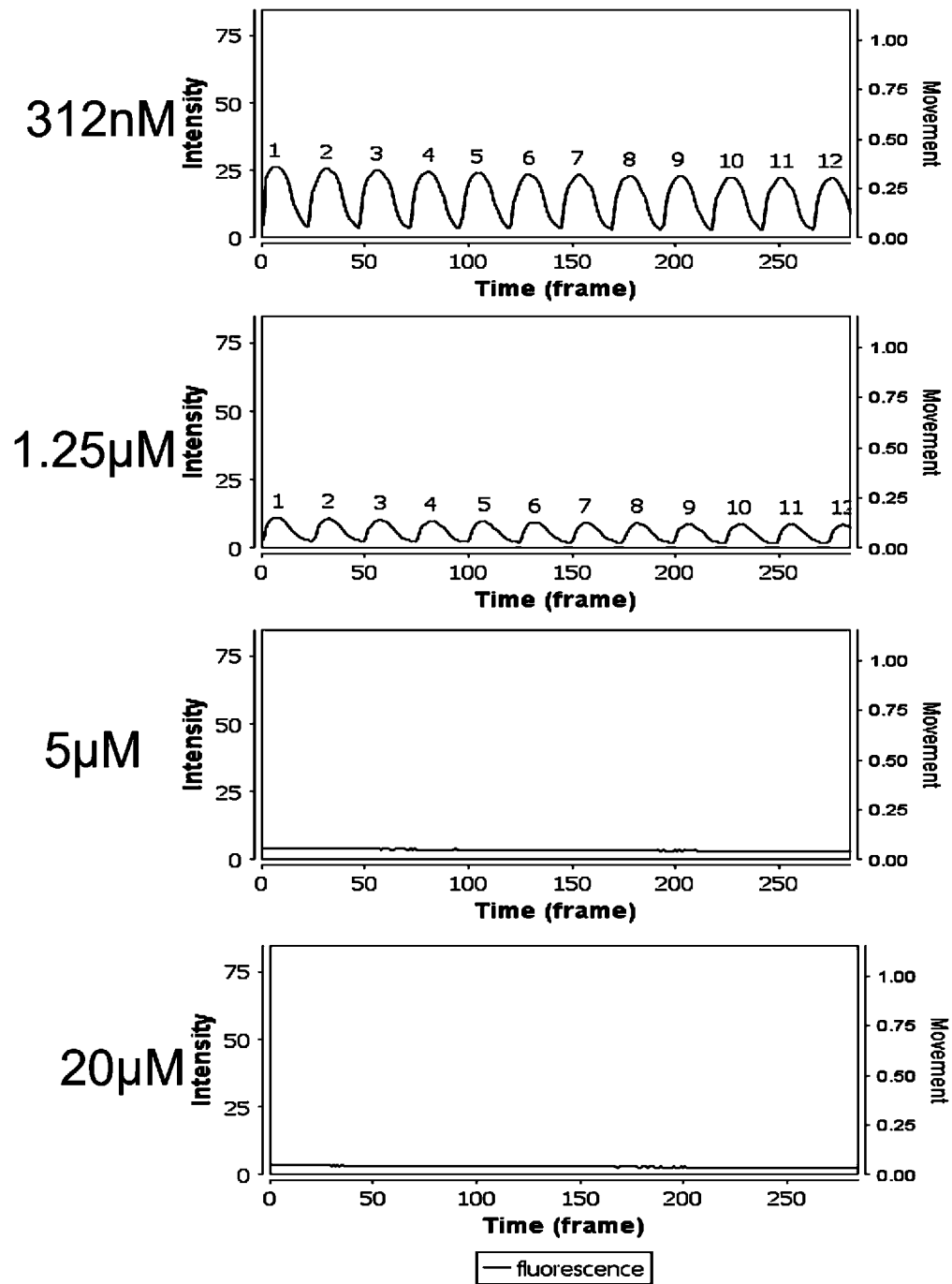


[図33-1]

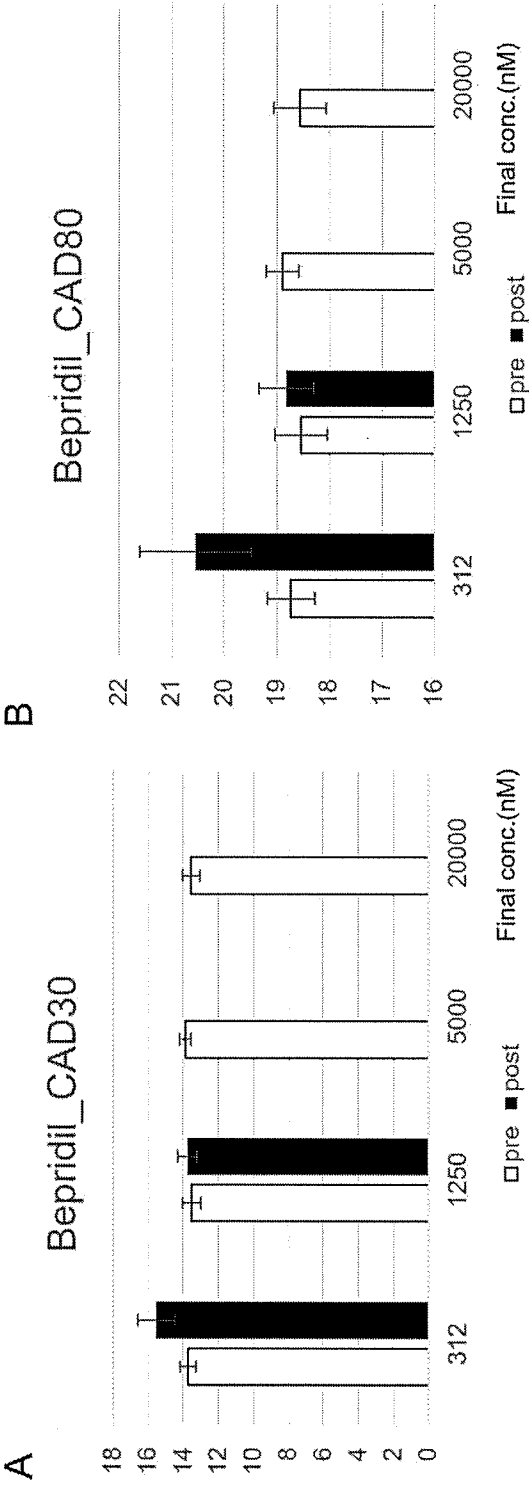


[図33-2]

Bepridil post



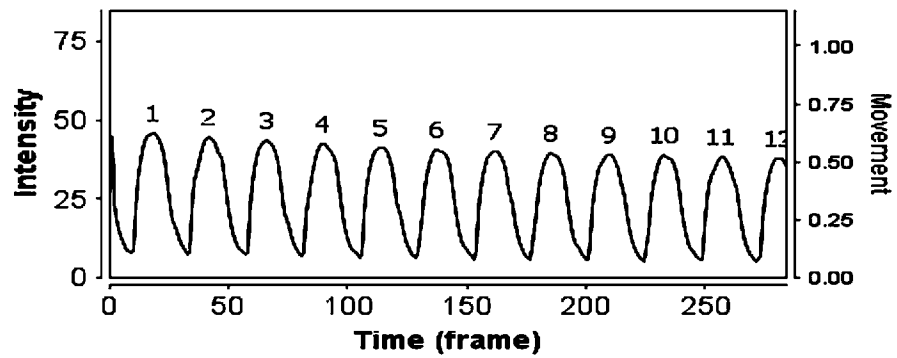
[図34]



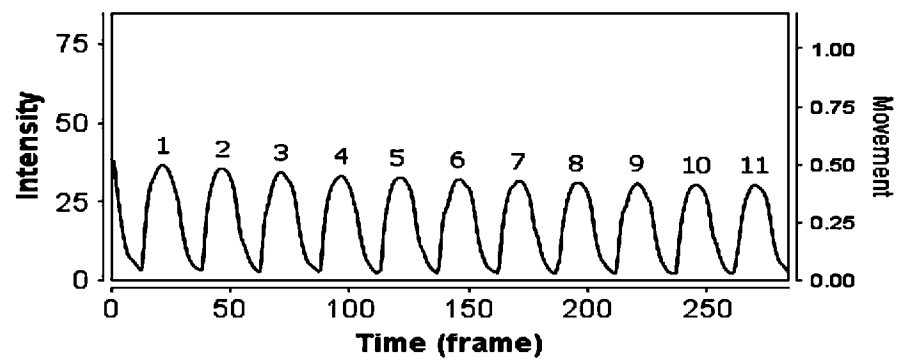
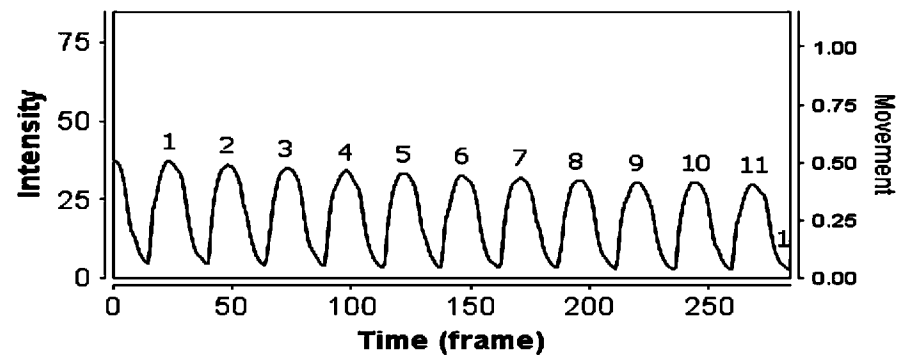
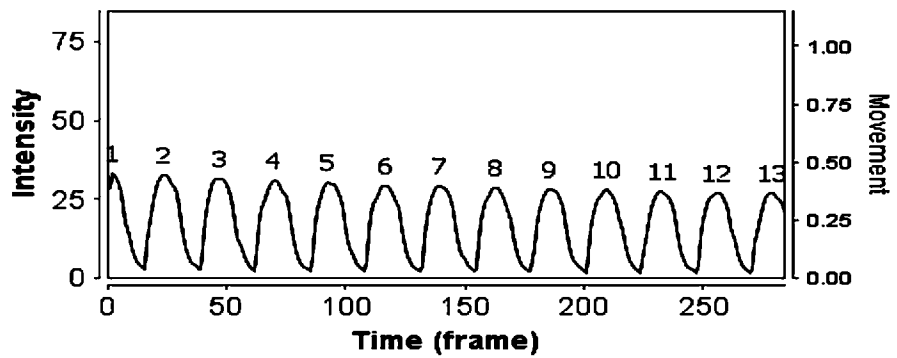
[図35-1]

pre

1nM



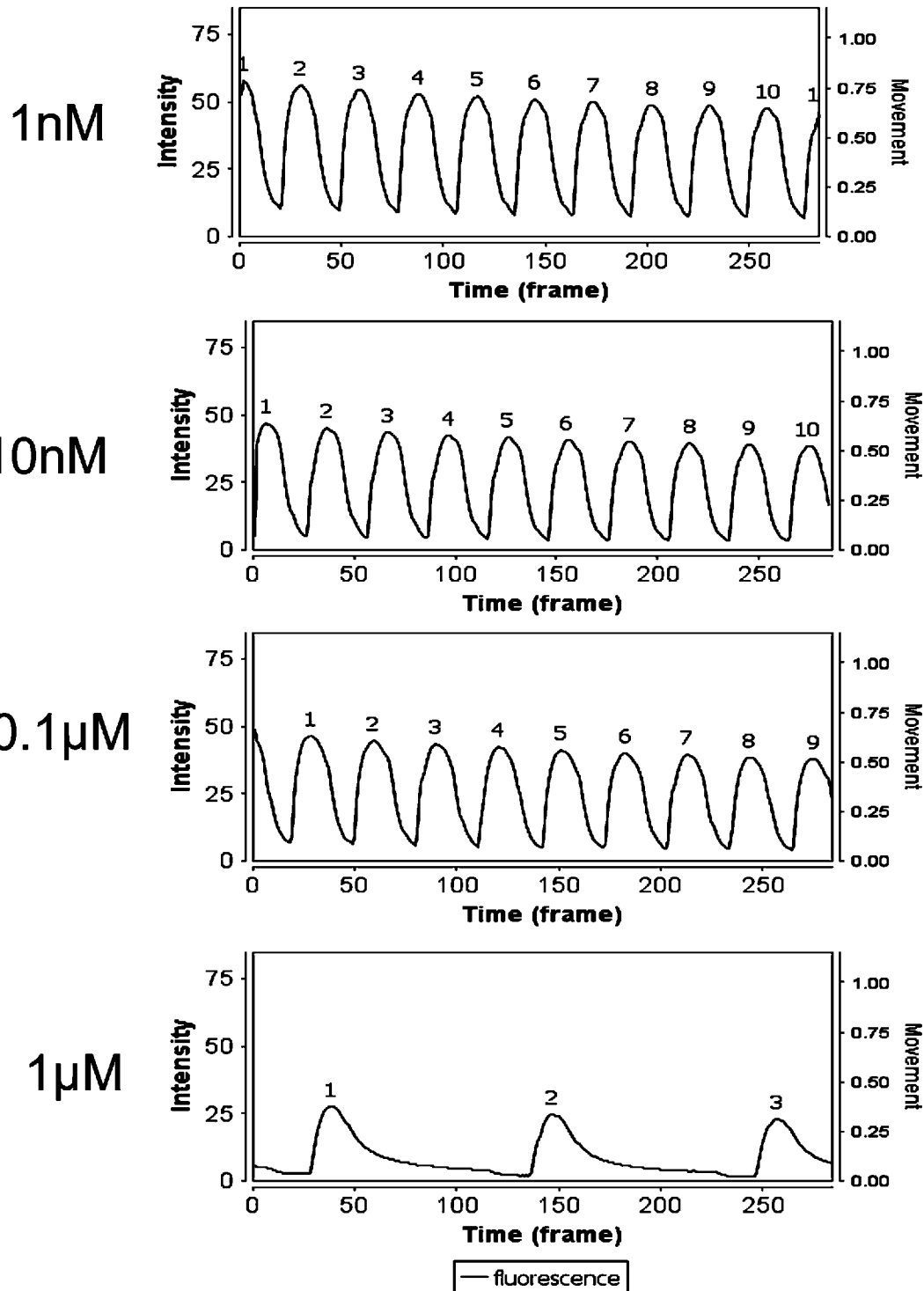
10nM

0.1 μ M1 μ M

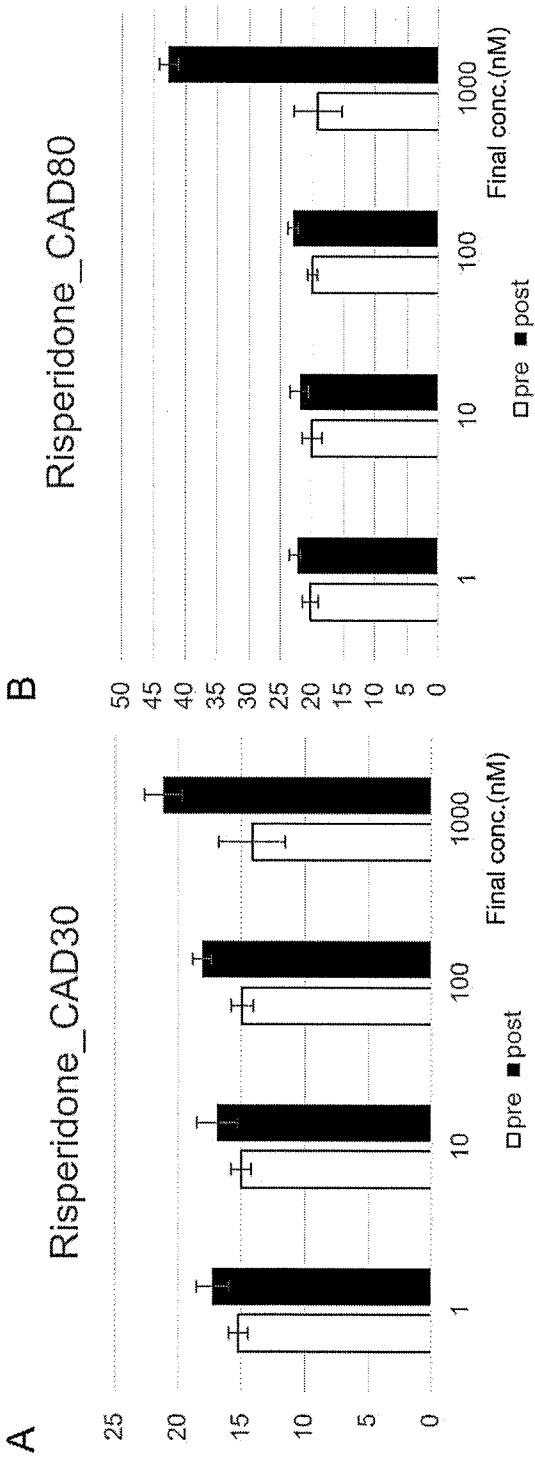
— fluorescence

[図35-2]

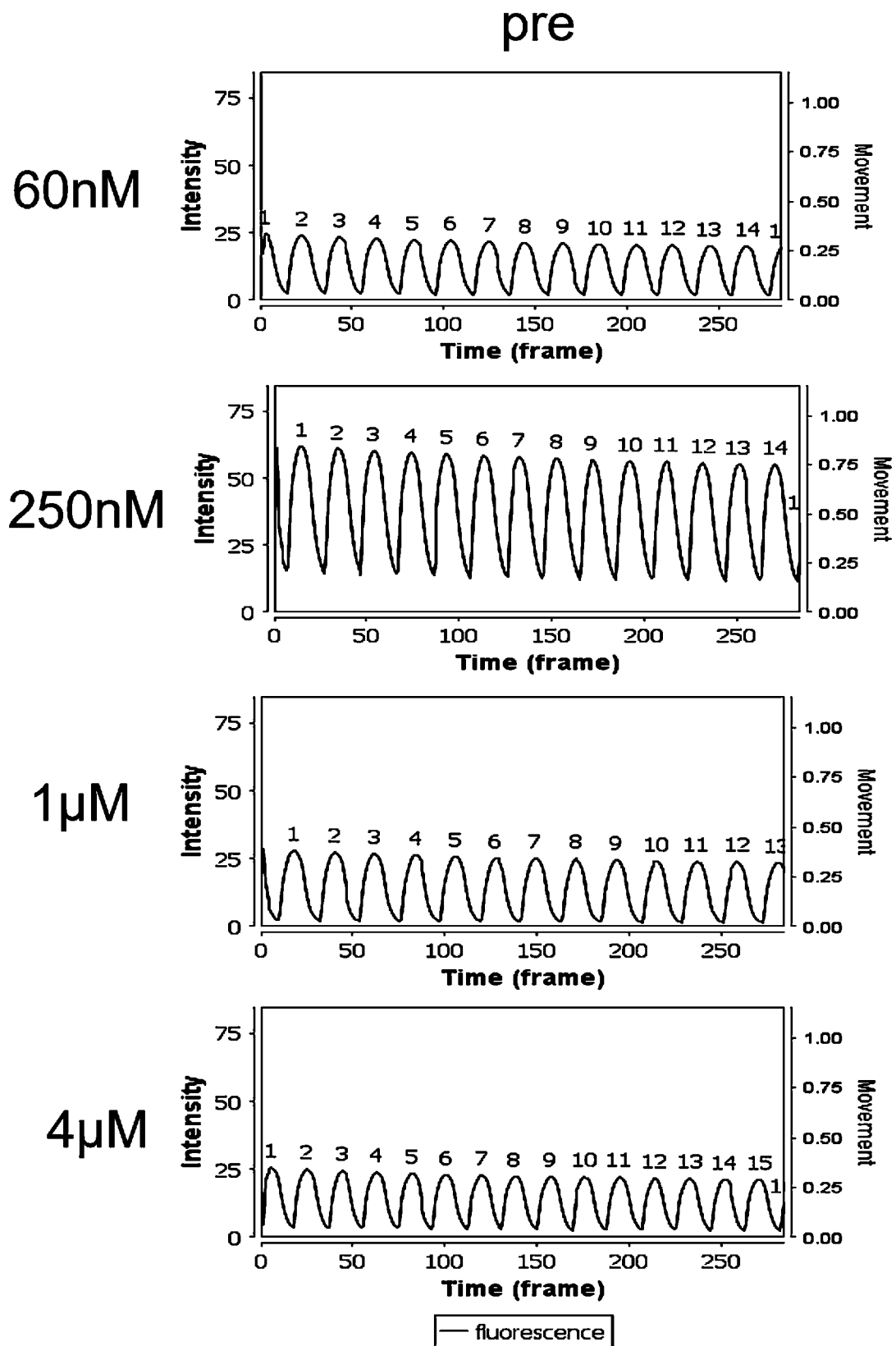
Risperidone post



[図36]



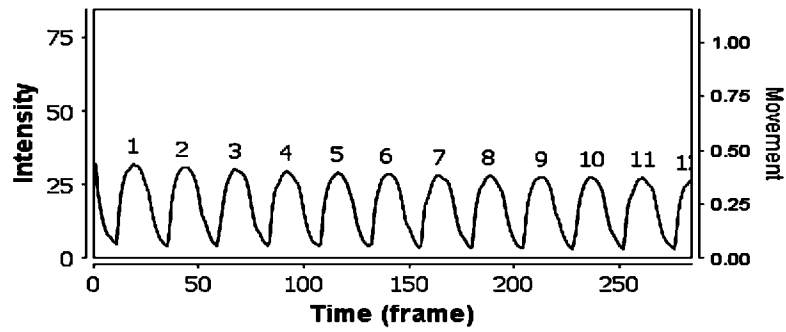
[図37-1]



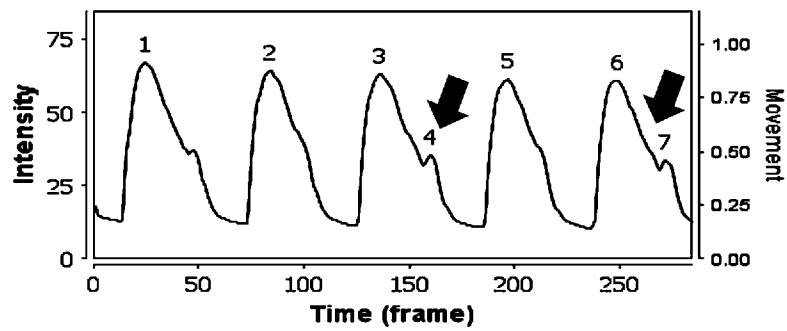
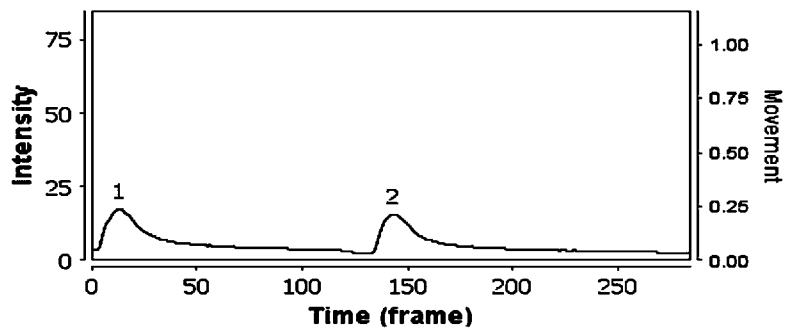
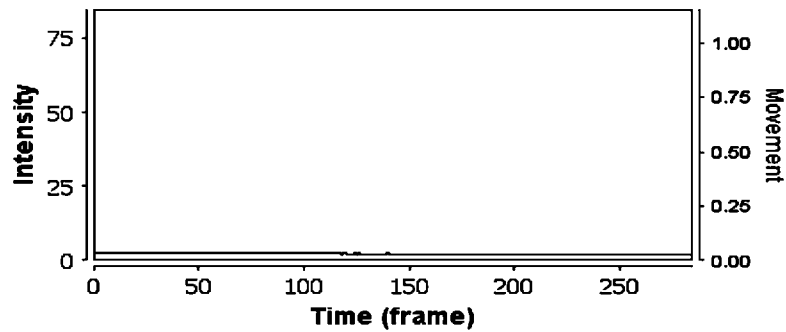
[図37-2]

Risperidone
post

60nM

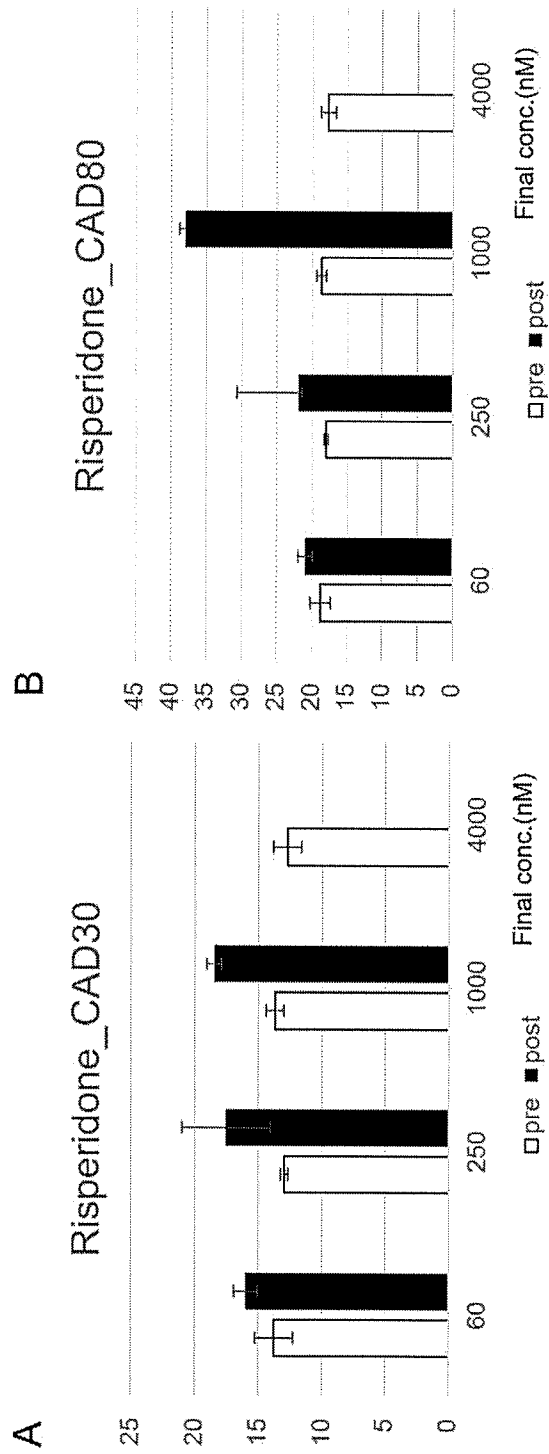


250nM

1 μ M4 μ M

— fluorescence

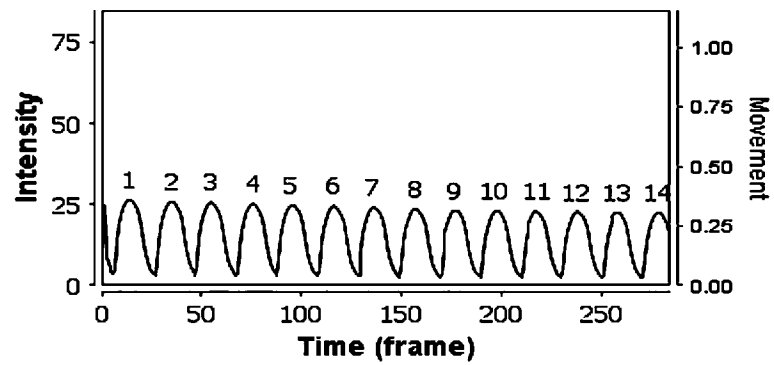
[図38]



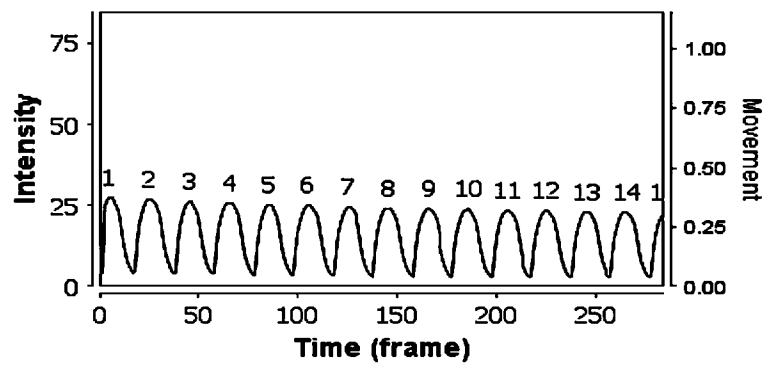
[図39-1]

pre

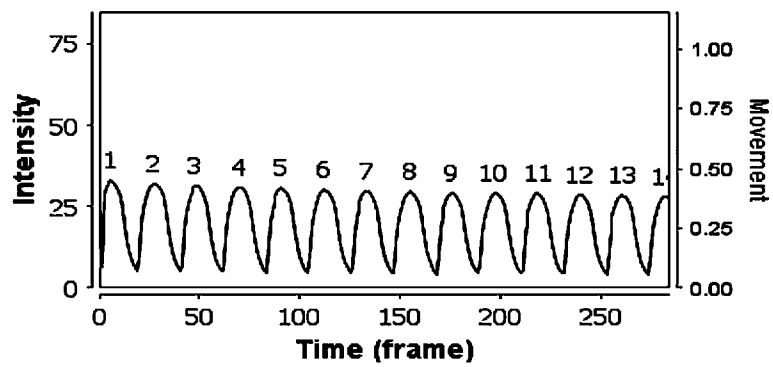
0.25nM



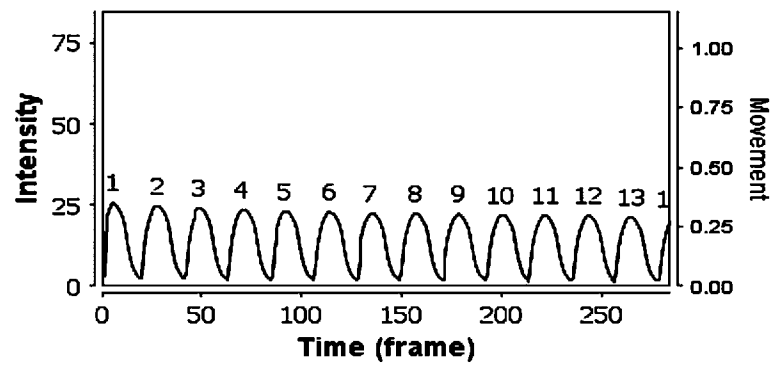
1nM



4nM



16nM

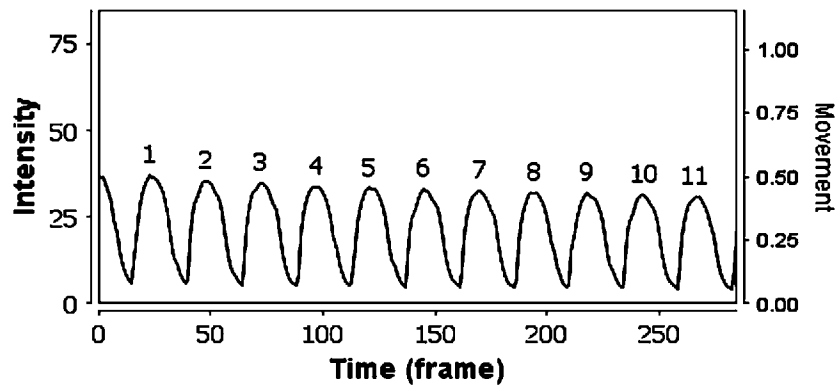


— fluorescence

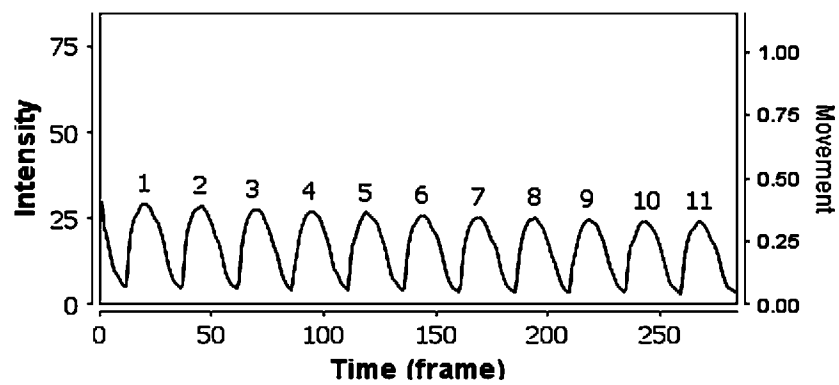
[図39-2]

Terfenadine post

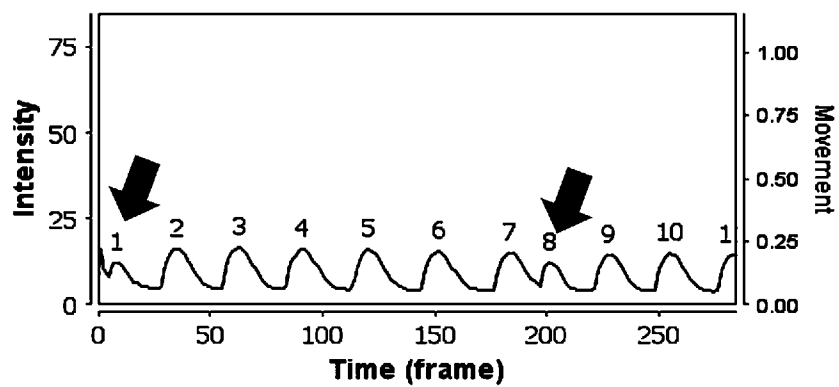
0.25nM



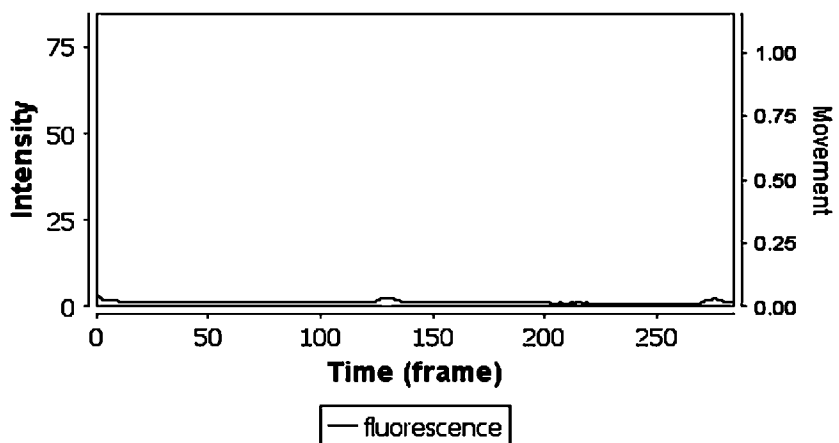
1nM



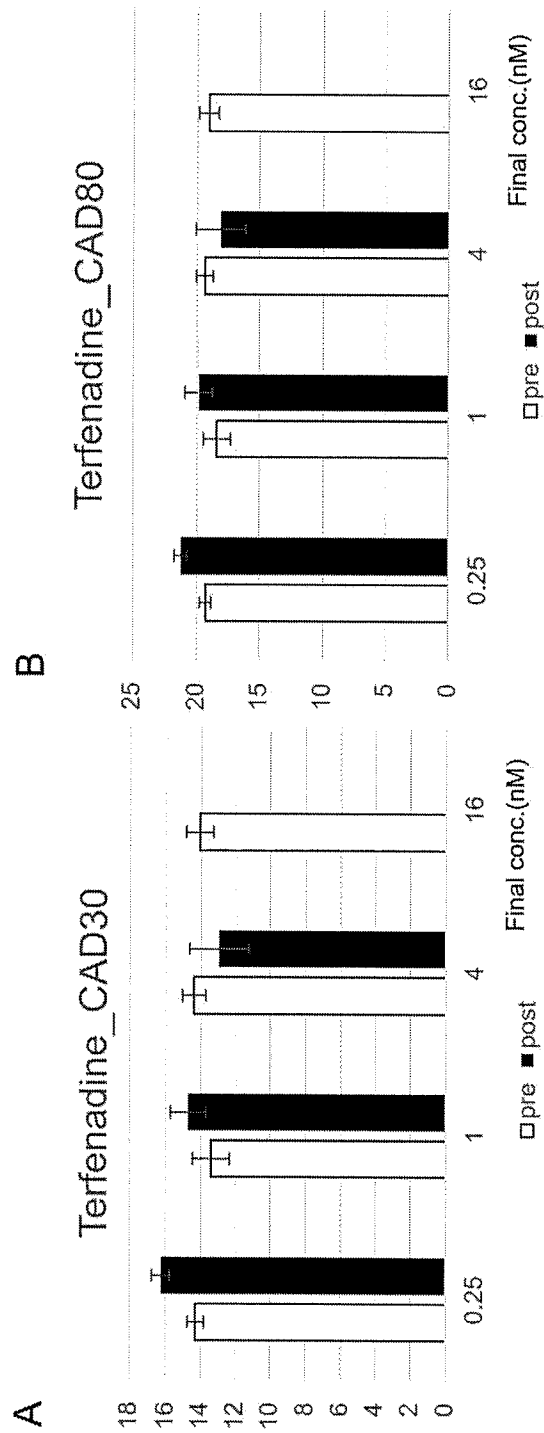
4nM



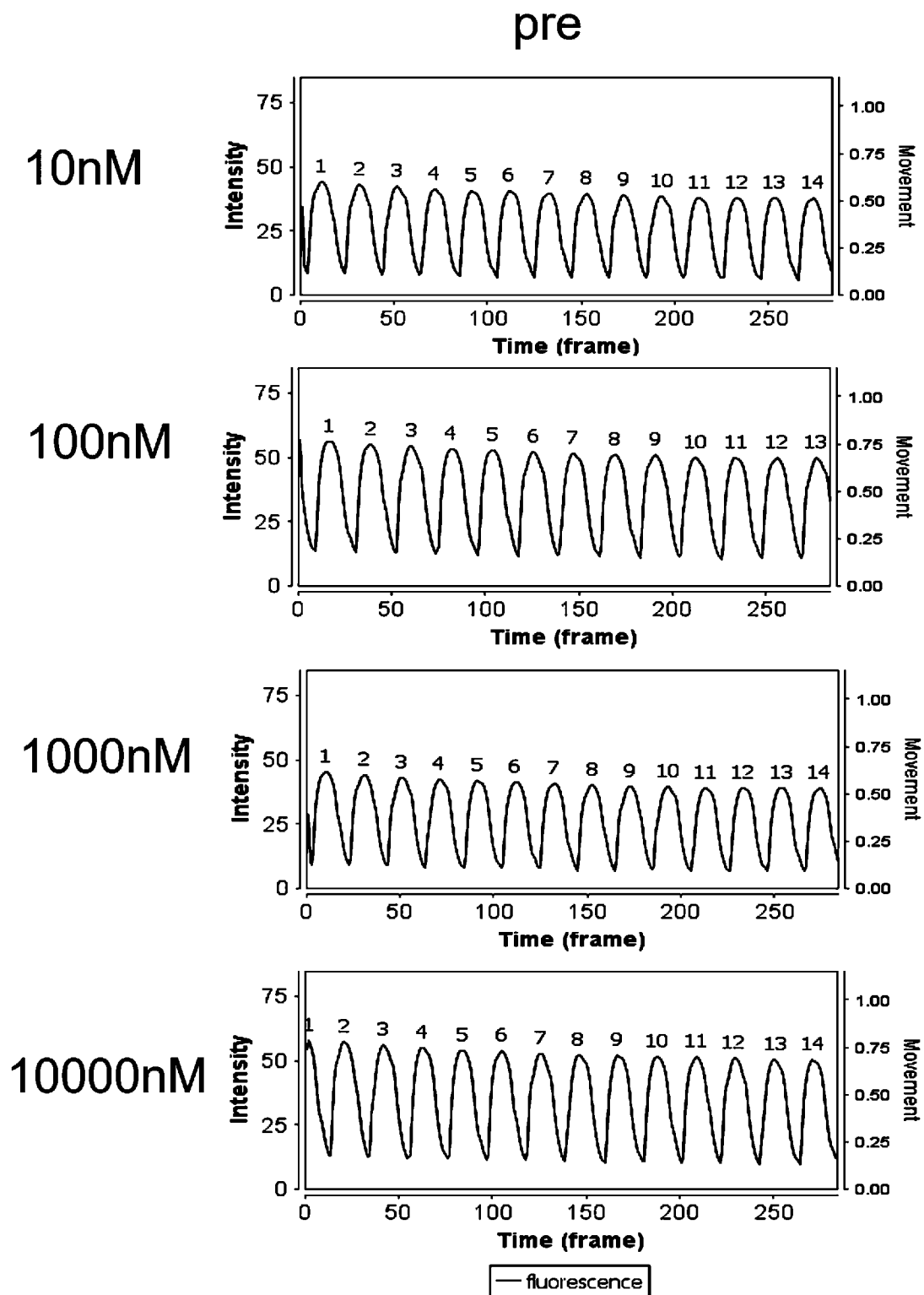
16nM



[図40]



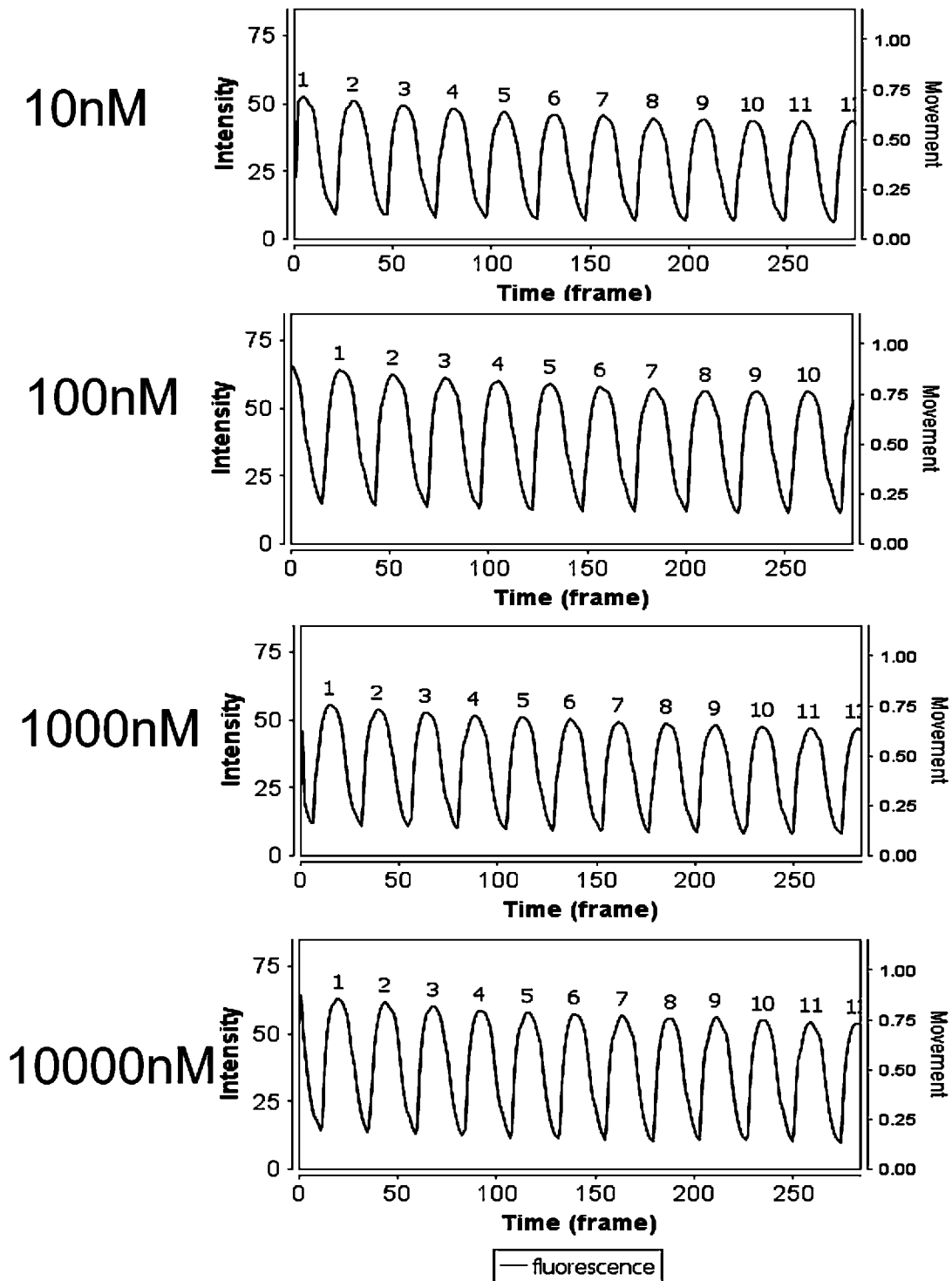
[図41-1]



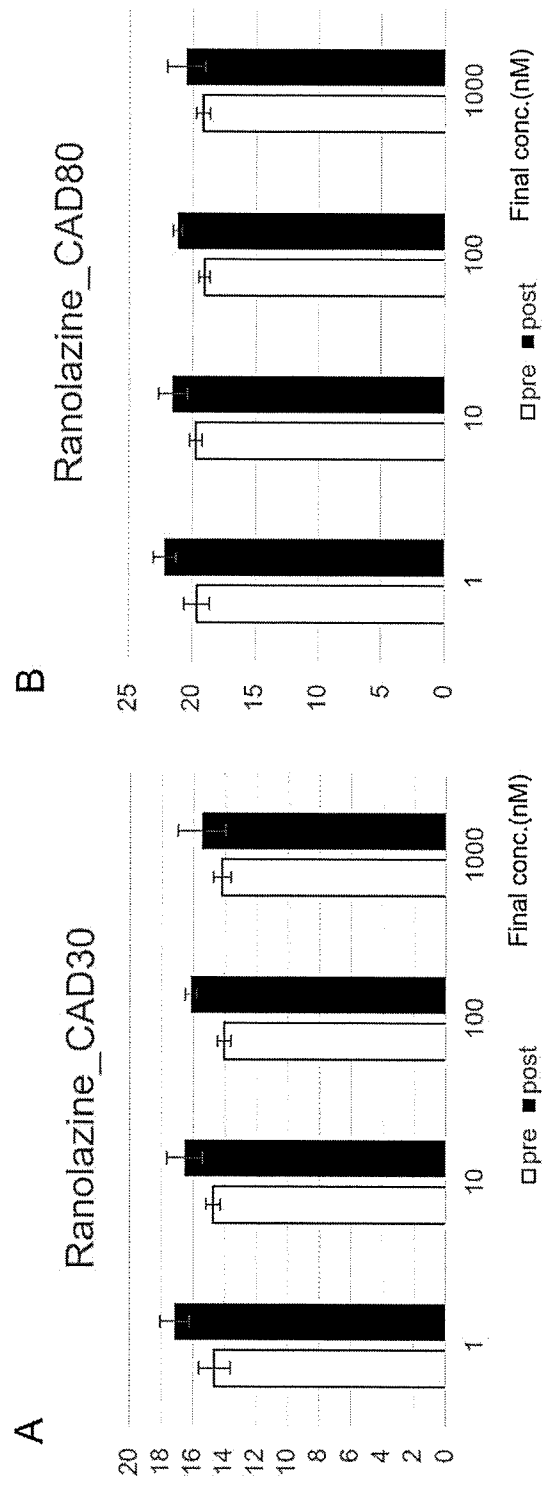
[図41-2]

Ranolazine

post



[図42]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/000252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/02(2006.01)i; *C12M 3/00*(2006.01)i; *C12N 5/077*(2010.01)i; *C12N 5/10*(2006.01)i; *C12Q 1/68*(2018.01)i
FI: C12Q1/02 ZNA; C12M3/00 A; C12N5/077; C12N5/10; C12Q1/68

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)

C12Q1/02; C12M3/00; C12N5/077; C12N5/10; C12Q1/68

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/131806 A1 (MYORIDGE CO LTD) 04 July 2019 (2019-07-04) claims, paragraphs [0023], [0034], example 4, paragraph [0217]	1-17
Y	WO 2020/256079 A1 (MITSUI CHEMICALS INC) 24 December 2020 (2020-12-24) paragraphs [0041], [0042], examples 1-11	1-17
Y	JP 2016-521571 A (PLURIOMICS B.V) 25 July 2016 (2016-07-25) examples 1, 3	2, 3



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

15 March 2023

Date of mailing of the international search report

04 April 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/000252

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/000252

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2019/131806	A1	04 July 2019	US 2021/0372993 A1 paragraphs [0077], [0089], example 4, paragraph [0404] EP 3733863 A1	
WO	2020/256079	A1	24 December 2020	US 2021/0309954 A1 paragraph [0065], examples 1-11 EP 3839034 A1 CN 112823204 A SG 11202103024R A KR 10-2022-0004613 A	
JP	2016-521571	A	25 July 2016	US 2016/0122718 A1 examples 1, 3 US 2020/0370018 A1 WO 2014/200339 A1 EP 3008172 A1 EP 3708655 A1 CA 2914922 A1 CN 105473708 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/02(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12N 5/077(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i FI: C12Q1/02 ZNA; C12M3/00 A; C12N5/077; C12N5/10; C12Q1/68														
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）） C12Q1/02; C12M3/00; C12N5/077; C12N5/10; C12Q1/68 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table> 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年													
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2019/131806 A1 (株式会社マイオリッジ) 04.07.2019 (2019 - 07 - 04) 特許請求の範囲、[0023]、[0034]、実施例4、[0217]</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2020/256079 A1 (三井化学株式会社) 24.12.2020 (2020 - 12 - 24) [041], [0042], 実施例1 - 11</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2016-521571 A (プルーリオミクス・バー・フェー) 25.07.2016 (2016 - 07 - 25) 実施例1、3</td> <td>2, 3</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	WO 2019/131806 A1 (株式会社マイオリッジ) 04.07.2019 (2019 - 07 - 04) 特許請求の範囲、[0023]、[0034]、実施例4、[0217]	1-17	Y	WO 2020/256079 A1 (三井化学株式会社) 24.12.2020 (2020 - 12 - 24) [041], [0042], 実施例1 - 11	1-17	Y	JP 2016-521571 A (プルーリオミクス・バー・フェー) 25.07.2016 (2016 - 07 - 25) 実施例1、3	2, 3
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
Y	WO 2019/131806 A1 (株式会社マイオリッジ) 04.07.2019 (2019 - 07 - 04) 特許請求の範囲、[0023]、[0034]、実施例4、[0217]	1-17												
Y	WO 2020/256079 A1 (三井化学株式会社) 24.12.2020 (2020 - 12 - 24) [041], [0042], 実施例1 - 11	1-17												
Y	JP 2016-521571 A (プルーリオミクス・バー・フェー) 25.07.2016 (2016 - 07 - 25) 実施例1、3	2, 3												
☐ 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、一般的技术水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献														
国際調査を完了した日 15.03.2023		国際調査報告の発送日 04.04.2023												
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 濱田 光浩 4N 3763 電話番号 03-3581-1101 内線 3439												

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

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表

☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式

☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表

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

☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/000252

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2019/131806	A1	04.07.2019	US	2021/0372993	A1	
				[0077], [0089], Example 4, [0404]			
				EP	3733863	A1	
WO	2020/256079	A1	24.12.2020	US	2021/0309954	A1	
				[0065], Example 1-11			
				EP	3839034	A1	
				CN	112823204	A	
				SG	11202103024R	A	
				KR	10-2022-0004613	A	
JP	2016-521571	A	25.07.2016	US	2016/0122718	A1	
				実施例 1、3			
				US	2020/0370018	A1	
				WO	2014/200339	A1	
				EP	3008172	A1	
				EP	3708655	A1	
				CA	2914922	A1	
				CN	105473708	A	