

明 細 書

発明の名称： 薬剤の評価方法、試薬およびキット

技術分野

[0001] 本開示は、心筋細胞を用いて、薬剤が心筋細胞の心拍数に与える影響を評価することを含む、薬剤の評価方法に関する。本開示はさらに、上記の薬剤の評価方法を行うための試薬およびキットに関する。

背景技術

[0002] 心疾患を診断する方法の1つとして、心筋細胞の拍動数を測定することが挙げられる。また、薬剤のスクリーニングを目的として、多能性幹細胞から分化誘導した心筋細胞または生体から樹立した初代心筋細胞を用いて、薬剤の薬効評価や毒性評価を行うことが行われている。

[0003] 例えば、特許文献1においては、霊長動物多能性幹細胞由来心筋細胞を用いてアドレナリン受容体の作動薬またはムスカリン受容体の作動薬による心拍数の上昇および低下の評価が可能であることが記載されている。非特許文献1においては、マウス由来初代心筋細胞を用いてムスカリン受容体の作動剤による心拍数の低下、およびムスカリン受容体の阻害剤による心拍数の上昇が記載されている。さらに非特許文献2においては、iPS細胞由来心筋細胞を用いて薬剤を評価することが記載されており、ムスカリン受容体の作動剤による心拍数の低下が記載されている。

[0004] 特許文献2においては、ヒト胚性幹（hES）細胞を、心筋細胞分化誘導因子を排出する細胞またはそれから得られる細胞外培地と、分化を誘導する条件下で共培養することによって、心筋細胞分化を誘導することが記載され、培養解離hES心筋細胞に対するフェニレフリン、イソプレナリンおよびカルバコールの効果を試験したことが記載されている。

[0005] 特許文献3においては、信号放出粒子を含む予め選択された細胞をシリコンモールド上に播種する工程と、上記の予め選択された細胞を培養して、収縮性細胞構築物を生成する工程とを含む、収縮性細胞構築物を生成する方

法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第5917429号公報

特許文献2：特表2006-523091号公報

特許文献3：米国特許出願公開2018/0044640号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Kohashi et al., Biological Rhythm Research, 34 (4), 367-381, 2004

非特許文献2：Lu et al., Frontiers in Physiology, 13, Article 838435, 2022

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明者らの検討においては、心筋細胞を用いた従来の評価方法においては、ムスカリン受容体の作動剤の評価が困難なケースがあることが明らかになった。また、心筋細胞を用いた従来の評価方法においては、アドレナリン受容体およびムスカリン受容体の阻害剤の評価はできないことが明らかになった。

[0009] 本開示は、心筋細胞を用いた薬剤の評価方法であって、ムスカリン受容体の作動剤、アドレナリン受容体の阻害剤、およびムスカリン受容体の阻害剤などの薬剤が心拍数に与える影響をスループット高く評価することができる方法を提供することを解決すべき課題とする。本開示はさらに、上記の薬剤の評価方法を行うための試薬およびキットを提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、心筋細胞と薬剤とを接触させて薬剤が心筋細胞の心拍数に与える影響を評価する方法に

において、心筋細胞と薬剤との接触の前に、交感神経系の生理活性物質および／または副交感神経系の生理活性物質を含む培地により心筋細胞を処理することによって、薬剤をスループット高く評価できることを見出した。本開示は上記の知見に基づいて完成したものである。

[0011] 即ち、本開示によれば、以下の発明が提供される。

<1> 交感神経系の生理活性物質および／または副交感神経系の生理活性物質を含む培地により心筋細胞を処理すること；

上記で処理された心筋細胞に、薬剤を接触させること、および
薬剤が心筋細胞の心拍数に与える影響を評価すること、
を含む、薬剤の評価方法。

<2> 上記培地が無血清である、<1>に記載の方法。

<3> 上記交感神経系の生理活性物質が、アドレナリン受容体の作動剤を含む、<1>または<2>に記載の方法。

<4> 上記副交感神経系の生理活性物質が、ムスカリン受容体の作動剤を含む、<1>または<2>に記載の方法。

<5> 上記薬剤の上記アドレナリン受容体の阻害効果を評価することを含む、<1>または<2>に記載の方法。

<6> 上記薬剤の上記ムスカリン受容体の阻害効果を評価することを含む、<1>または<2>に記載の方法。

<7> 上記心筋細胞が、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞である、<1>または<2>に記載の方法。

<8> 上記副交感神経系の生理活性物質がカルバコールであり、上記交感神経系の生理活性物質がイソプロテレノールである、<1>または<2>に記載の方法。

<9> アドレナリン受容体の作動剤および／またはムスカリン受容体の作動剤を含む、<1>または<2>に記載の方法を行うための試薬。

<10> <9>に記載の試薬と、培地とを含む、キット。

<11> さらに心筋細胞を含む、<10>に記載のキット。

発明の効果

[0012] 本開示によれば、心筋細胞を用いて、アドレナリン及びムスカリン受容体の作動剤、アドレナリン受容体およびムスカリン受容体の阻害剤が心拍数に与える影響を高いスループットで評価することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、拍動時間（秒）の測定結果を示す。

[図2]図2は、ムスカリン受容体の作動剤（カルバコール）を無血清培地に添加した時の心拍数への影響を評価した結果を示す。

[図3]図3は、アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の作動剤（カルバコール）による心拍数の低下を評価した結果を示す。

[図4]図4は、アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の作動剤（セビメリン）による心拍数の低下を評価した結果を示す。

[図5]図5は、アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の作動剤（ピロカルピン）による心拍数の低下を評価した結果を示す。

[図6]図6は、維持用培地を用いてカルバコールによる心拍数の低下を評価した結果を示す。

[図7]図7は、アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）およびムスカリン受容体の作動剤（カルバコール）を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の阻害剤（アトロピン）による心拍数の上昇を評価した結果を示す。

[図8]図8は、アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）及びムスカリン受容体の作動剤（カルバコール）を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の阻害剤（チオトロピウム）による心拍数の上昇を評価した結果を示す。

[図9]図9は、アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）及びムス

カリン受容体の作動剤（カルバコール）を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の阻害剤（グリコピロニウム）による心拍数の上昇を評価した結果を示す。

[図10]図10は、アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）及びムスカリン受容体の作動剤（カルバコール）を添加した無血清培地を用いてアドレナリン受容体の阻害剤（プロプラノロール）による心拍数の低下を評価した結果を示す。

[図11]図11は、アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）及びムスカリン受容体の作動剤（カルバコール）を添加した無血清培地を用いてアドレナリン受容体の阻害剤（アテノロール）による心拍数の低下を評価した結果を示す。

[図12]図12は、アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）およびムスカリン受容体の作動剤（カルバコール）を添加した無血清培地を用いて心拍数へ作用しない薬剤（アスピリン）を添加した際の影響を評価した結果を示す。

[図13]図13は、維持用培地を用いてムスカリン受容体の阻害剤（アトロピン）による心拍数の上昇を評価する方法と結果を示す。

[図14]図14は、無血清培地を用いてムスカリン受容体の阻害剤（アトロピン）による心拍数の上昇を評価する方法と結果を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 以下において、本開示の内容について詳細に説明する。本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を意味する。 μM は、 $\mu\text{mol/L}$ と同義である。

[0015] 本開示の薬剤の評価方法は、交感神経系の生理活性物質および／または副交感神経系の生理活性物質を含む培地により心筋細胞を処理すること；上記で処理された心筋細胞に、薬剤を接触させること、および薬剤が心筋細胞の心拍数に与える影響を評価すること、

を含む。

[0016] 本開示における心筋細胞は、多能性幹細胞から誘導した心筋細胞、または組織から樹立した心筋細胞（好ましくは、初代心筋細胞）のいずれでもよいが、好ましくは多能性幹細胞から誘導した心筋細胞である。

[0017] 多能性幹細胞とは、生体を構成する全ての細胞に分化することができる多分化能（*pluripotency*）と、細胞分裂を経てもその多分化能を維持することができる自己複製能を有する細胞を意味する。多能性幹細胞としては、人工多能性幹細胞（*iPS*細胞）、胚性幹細胞（*ES*細胞）、または胚性生殖細胞（*EG*細胞）が挙げられる。好ましくは、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞（*iPS*細胞）、または胚性幹細胞（*ES*細胞）である。即ち、本開示における心筋細胞としては、好ましくは人工多能性幹細胞（*iPS*細胞）由来心筋細胞、または胚性幹細胞（*ES*細胞）由来心筋細胞であり、より好ましくは *iPS*細胞由来心筋細胞である。

[0018] 心筋細胞の生物種は特に限定はされないが、好ましくは哺乳類であり、より好ましくは齧歯類（マウス、ラット、ハムスターなど）または霊長類（サル、ヒトなど）であり、さらに好ましくは霊長類であり、特に好ましくはヒトである。

心筋細胞は、ヒト *iPS*細胞由来心筋細胞であることが特に好ましい。

[0019] 多能性幹細胞から心筋細胞を誘導する方法は知られており、例えば、国際出願公開第2013/111875号公報、国際出願公開第2015/182765号公報、国際出願公開第2020/027278号公報、および *Minami I, et al., Cell Rep. 2012 Nov 29; 2(5): 1448-60* に記載の方法が例示される。また、多能性幹細胞から誘導された心筋細胞は、*ES*細胞または *iPS*細胞由来の心筋細胞として市販されている細胞（例えば、*iCell*（登録商標）心筋細胞（*FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc.* 製）、*iCell*（登録商標）心筋細胞2.0（*FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc.* 製））であってもよい。

[0020] 本開示において使用する心筋細胞は、培養細胞であり、平面培養されている細胞であることが好ましく、2次元のシート状である心筋細胞であることが好ましい。すなわち、本開示において使用する心筋細胞は、3次元組織であるオルガノイドではないことが好ましい。オルガノイドではなく、平面培養されている細胞を使用することにより、薬剤の評価を簡便に行うことができる。

[0021] 本開示において使用する心筋細胞は、好ましくは、心室性 (ventricular) 細胞、心房性 (atrial) 細胞、および結節性 (nodal) 細胞を含む。なお、心筋細胞の一種としてはペースメーカー細胞と称される細胞が知られているが、ペースメーカー細胞は、大部分 (90~100%) が結節性 (nodal) 細胞から構成されている細胞である。本開示において使用する心筋細胞は、好ましくは主に心室性心筋細胞から成る細胞であり、ペースメーカー細胞とは異なる細胞である。

[0022] 本開示において使用する心筋細胞における結節性 (nodal) 細胞の割合は、好ましくは80%以下であり、より好ましくは50%以下であり、さらに好ましくは30%以下であり、20%以下でもよい。

本開示において使用する心筋細胞における心室性マーカーを発現する細胞 (すなわち、心室性心筋細胞) の割合は、好ましくは30%以上であり、より好ましくは40%以上であり、さらに好ましくは50%以上である。

心室性心筋細胞、心臓性心筋細胞、結節性心筋細胞は、例えば、活動電位の形状により判別することができ、Ma J. et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 301: H2006-H2017 2011に記載の方法が例示される。また、特定のタンパク質の発現をマーカーとし、免疫染色により判別することもできる。この場合、心室性心筋細胞のマーカーとしては、MLC-2V、心房性細胞のマーカーとしては、MLC-2a、結節性細胞のマーカーとしては、HCNを挙げることができる。

[0023] 本開示においては、交感神経系の生理活性物質および／または副交感神経

系の生理活性物質を含む培地により心筋細胞を処理することに先立って、心筋細胞を前培養してもよい。例えば、凍結状態の心筋細胞を使用する場合には、凍結状態の心筋細胞を解凍し、解凍用培地（例えば、心筋細胞としてFUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞2.0を使用する場合には、FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞解凍用培地）に懸濁した後、プレート上に1well当たり10,000~100,000 cellsで播種することができる。心筋細胞は、CO₂インキュベーター内で静置した後、維持用培地（例えば、心筋細胞としてFUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞2.0を使用する場合には、FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞維持用培地）を加え、CO₂インキュベーター内で例えば1日~4週間、好ましくは2日~2週間培養することができる。なお、交感神経系の生理活性物質および／または副交感神経系の生理活性物質を含む培地により心筋細胞を処理する日の前日に培地を、無血清培地に交換しておいてもよい。

[0024] 本開示においては、心筋細胞に薬剤を接触させる前に、交感神経系の生理活性物質および／または副交感神経系の生理活性物質を含む培地により心筋細胞を処理する。培地は、好ましくは、交感神経系の生理活性物質および副交感神経系の生理活性物質の両方を含む。

[0025] 交感神経系の生理活性物質としては、アドレナリン受容体の作動剤があり、アドレナリン、ノルアドレナリン、イソプロテレノール、テルブタリン等が挙げられる。

[0026] 副交感神経系の生理活性物質としては、ムスカリン受容体の作動剤があり、アセチルコリン、ムスカリン、カルバコール、ベタネコール、セビメリン、ピロカルピン等が挙げられる。

[0027] アドレナリン受容体の作動剤を使用する場合における、培地中のアドレナリン受容体の作動剤の濃度は、好ましくは0.05 $\mu\text{mol/L}$ ~ 50 μm

0.1 $\mu\text{mol/L}$ であり、より好ましくは 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ であり、さらに好ましくは 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ であり、特に好ましくは 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ~ 5 $\mu\text{mol/L}$ であり、最も好ましくは 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ~ 2 $\mu\text{mol/L}$ である。

[0028] ムスカリン受容体の作動剤を使用する場合における、培地中のムスカリン受容体の作動剤の濃度は、好ましくは 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ であり、より好ましくは 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ であり、さらに好ましくは 1 $\mu\text{mol/L}$ ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ であり、特に好ましくは 1 $\mu\text{mol/L}$ ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ であり、最も好ましくは 1 $\mu\text{mol/L}$ ~ 5 $\mu\text{mol/L}$ である。

[0029] 交感神経系の生理活性物質および副交感神経系の生理活性物質の両方を併用する場合、培地中の交感神経系の生理活性物質および副交感神経系の生理活性物質の濃度の比率は、好ましくは 0.1 : 1 ~ 1 : 20 であり、より好ましくは 0.5 : 1 ~ 1 : 10 であり、さらに好ましくは 1 : 1 ~ 1 : 5 であり、一例としては 1 : 3 である。

[0030] 交感神経系の生理活性物質および／または副交感神経系の生理活性物質を含む培地により心筋細胞を処理する培養時間は、一般的には 1 分から 4 時間であり、好ましくは 5 分から 2 時間であり、より好ましくは 10 分から 1 時間であり、さらに好ましくは 10 分から 30 分である。

[0031] 交感神経系の生理活性物質および／または副交感神経系の生理活性物質を添加する培地としては、一般的に心筋細胞の培養に使用されるものであればよく、特に限定されないが、無血清であるか、または血清を含む場合には血清の含有量は好ましくは 3 体積% 以下であり、より好ましくは 1 体積% 以下である。培地としては、無血清培地が特に好ましく、さらにアルブミンを含まない培地でも良い。交感神経系の生理活性物質および／または副交感神経系の生理活性物質が添加される培地としては、例えば、FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製の心筋細胞無血清アッセイ用培地を挙げることができるが、特に限定されない。

- [0032] 心筋細胞を培養するための容器は、一般的に細胞培養に使用される容器であればよく、特に限定されない。容器の形状は、シャーレ、プレート、ボトル、チャンバー、マルチウェルプレート（例えば、6、12、24、48、96、または384ウェルプレート）等が挙げられる。上記の中でもマルチウェルプレートが好ましく、スループットの観点では、48ウェルプレートまたは96ウェルプレートが特に好ましい。
- [0033] 心筋細胞の培養形式は、平面培養であることが好ましい。
- 心筋細胞の播種細胞数は、48ウェルを用いた場合、1ウェル当たり10,000～100,000 cellsが好ましく、より好ましくは、20,000～80,000 cellsであり、30,000～60,000 cellsが特に好ましい。
- [0034] 本開示においては、交感神経系の生理活性物質および／または副交感神経系の生理活性物質を含む培地により心筋細胞を処理した後に、上記で処理された心筋細胞に、薬剤を接触させる。例えば、心筋細胞を含む培地に薬剤（薬剤の候補物質を含む）を添加することにより、心筋細胞に薬剤を接触させることができる。
- [0035] 薬剤（薬剤の候補物質を含む）としては、特に限定されず、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、有機低分子化合物などの化合物、ペプチド、タンパク質、抗体、核酸、糖質、脂質、細胞抽出物、細胞培養上清、植物抽出物、微生物産生物等が挙げられる。化合物、ペプチド、タンパク質、抗体はそれぞれのライブラリーを使用することもできる。例えば、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリーなどを使用することができる。ただし、本開示の薬剤の評価方法においては、副作用の評価を行うことができるため、薬剤としての所望の活性を有することが確認されている物質を薬剤（候補物質）として使用することが好ましい。
- [0036] 薬剤（薬剤の候補物質を含む）としては、全ての領域の医薬品の有効成分の候補物質が含まれる。例えば、薬剤（薬剤の候補物質を含む）としては、心疾患の処置剤を評価することができる。心疾患とは、不整脈または不整脈

を伴う循環器系の疾患を意味する。不整脈には、頻脈性不整脈および徐脈性不整脈が含まれる。

[0037] 薬剤としては、例えば、ムスカリン受容体の阻害薬があり、アトロピン、チオトロピウム、グリコピロニウム、AF-DX116等を使用してもよいが、特に限定されない。

[0038] 薬剤としては、例えば、アドレナリン受容体の阻害薬があり、プロプラノロール、アテノロール等を使用してもよいが、特に限定されない。

[0039] 本開示においては、心筋細胞に薬剤を接触させた後に、薬剤が心筋細胞の心拍数に与える影響を評価する。

薬剤による心筋細胞の心拍数に与える影響の評価としては、薬剤のアドレナリン受容体の阻害効果を評価してもよいし、または薬剤の上記ムスカリン受容体の阻害効果を評価してもよい。

[0040] 薬剤による心筋細胞の心拍数に与える影響の評価においては、例えば、心筋細胞の細胞外電位の測定結果から、心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔を拍動時間（秒）とし、心拍数（／分）＝60（秒／分）／拍動時間（秒）の式を用いることにより、拍動数（心拍数）を算出することができる。

[0041] 細胞外電位は、例えば、心筋細胞を多電極アレイと接触させることにより、測定することができる。多電極アレイは、基板上に微小電極が多数、例えば1個～768個配置され、さらに、細胞培養用のウェルが1～384個、例えば48個または96個配置された電極である。培養細胞の細胞外電位を測定できる多電極アレイ（Multiple electrode array：MEA）システムとしては、例えば、MEAシステム（Axion Biosystems, Inc製、Maestro Pro）などが市販されている。多電極アレイシステムとは基板上に配した多数の微小電極により複数の細胞からの電気信号を同時に観測し、あるいは細胞や組織へ電氣的に刺激を与えて刺激に対する細胞の応答を観測することができるシステムである。

[0042] 別の例としては、心筋細胞の拍動は、標準的な電気生理学的方法（例えば

パッチクランプ)、弾性率検出装置(例えば、MicroTester (CellScale))、画像撮影装置、またはそれら方法、装置の組み合わせにより検出してもよい。

[0043] ウェル内に配置された微小電極を有するマルチウェルプレートを用いる場合、電極周辺の心筋細胞の播種密度は、 $100 \sim 10,000 \text{ cells/mm}^2$ が好ましく、 $500 \sim 8000 \text{ cells/mm}^2$ がより好ましく、 $1000 \sim 6000 \text{ cells/mm}^2$ が特に好ましい。電極周辺の心筋細胞の播種密度の算出には、心筋細胞をプレートに播種し、培養した後、固定し、核染色を行い、顕微鏡下で電極およびその周辺を撮影して得られた画像を用いることができる。細胞の固定には、例えば、パラホルムアルデヒドなどを用いることができる。核染色には、例えば、Hoechst 33342などを用いることができ、画像の撮影には蛍光顕微鏡下で行うことができる。蛍光顕微鏡下で電極及びその周辺を撮影して得られた画像において、解析ソフトを用いて電極周辺の心筋細胞の播種密度を算出することができる。

[0044] 本開示によれば、アドレナリン受容体の作動剤および／またはムスカリン受容体の作動剤を含む、本開示の薬剤の評価方法を行うための試薬が提供される。アドレナリン受容体の作動剤および／またはムスカリン受容体の作動剤の詳細は本明細書に記載した通りである。

[0045] 本開示によればさらに、上記した本開示の試薬と、培地とを含む、キットが提供される。本開示のキットは、さらに心筋細胞を含んでいてもよい。培地および心筋細胞の詳細は本明細書に記載した通りである。

[0046] 以下の実施例により本開示をさらに具体的に説明するが、本開示は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0047] 参考例1：ムスカリン受容体の作動剤(カルバコール)を無血清培地に添加した時の心拍数への影響を評価する方法と結果

凍結状態のヒトiPS細胞由来心筋細胞(FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞2.0)を解

凍し、解凍用培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞解凍用培地）に懸濁した後、MEAプレート（Axion BioSystems, Inc製、CytoView MEA 48）上に1well当たり50000cellsを播種した。電極周辺の心筋細胞の播種密度は2736cells/mm²であった。CO₂インキュベーター内で数時間静置した後、血清を含む維持用培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞維持用培地）を加え、CO₂インキュベーター内で約1週間培養した。測定前日に培地を無血清培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、心筋細胞無血清アッセイ用培地）に交換した。

[0048] 測定当日、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を培養したMEAプレートをMEAシステム（Axion BioSystems, Inc製、Maestro Pro）に設置し、20分経過後に細胞外電位を測定した（媒体対照、カルバコール濃度0μmol/L）。引き続き、0.01μmol/Lのカルバコール（東京化成工業製）をMEAプレートに添加し、添加してから20分経過後に、細胞外電位を測定した。同様に、0.1μmol/L、1μmol/L、10μmol/Lとなるようにカルバコールを加え、添加してから20分経過後に各濃度で細胞外電位を測定した。なお、添加するカルバコールの溶媒は無血清培地とした。測定後の細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、Hoechst 33342で核染色を行い、蛍光顕微鏡（倒立顕微鏡ECLIPSE, Ti-UNikon）下で電極およびその周辺の画像を撮影した。取得した画像から、解析ソフト（ImageJ, NIH）を用いることにより心筋細胞を検出し、撮影領域の面積で規格化することで、電極周辺の心筋細胞の播種密度を算出した。なお、以下の実験においても同様の方法によって電極周辺の心筋細胞の播種密度を算出した、

[0049] 細胞外電位の測定結果より、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔（図1）を拍動時間（秒）とし、心拍数（/分）=60/

拍動時間（秒）を算出した。カルバコールの添加により、最大で15%の心拍数の低下を確認した（図2）。

[0050] 実施例1：アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の作動剤（カルバコール）による心拍数の低下を評価する方法と結果

凍結状態のヒトiPS細胞由来心筋細胞（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞2.0）を解凍し、解凍用培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞解凍用培地）に懸濁した後、MEAプレート（Axion BioSystems, Inc製、CytoView MEA 48）上に1well当たり50000cellsを播種した。電極周辺の心筋細胞の播種密度は2671cells/mm²であった。CO₂インキュベーター内で数時間静置した後、血清を含む維持用培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞維持用培地）を加え、CO₂インキュベーター内で約1週間培養した。測定前日に培地を無血清培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、心筋細胞無血清アッセイ用培地）に交換した。

[0051] 測定当日、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を培養したMEAプレートをMEASシステム（Axion BioSystems, Inc製、Maestro Pro）に設置し、培地に1μmol/Lのイソプロテレノール（東京化成工業製）を添加した後、添加してから20分経過後に細胞外電位を測定した（媒体対照、カルバコール濃度0μmol/L）。引き続き、0.01μmol/Lのカルバコール（東京化成工業製）をMEAプレートに添加し、添加してから20分経過後に細胞外電位を測定した。同様に、0.1μmol/L、1μmol/L、10μmol/Lとなるようにカルバコールを加え、各濃度で細胞外電位を測定した。なお、添加するカルバコールの溶媒は1μmol/Lのイソプロテレノールを加えた無血清培地とし、カルバコ

ールの添加時に無血清培地中のイソプロテレノール濃度が変化しないようにした。

[0052] 細胞外電位の測定結果より、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔を拍動時間 (秒) とし、心拍数 (／分) = $60 / \text{拍動時間 (秒)}$ を算出した。カルバコールの添加により、最大で 34 % の心拍数の低下を確認した (図 3)。

[0053] 実施例 2 : アドレナリン受容体の作動剤 (イソプロテレノール) を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の作動剤 (セビメリン) による心拍数の低下を評価する方法と結果

実施例 1 と同様に、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞を培養した M E A プレートを用いて評価を行った。具体的には、実施例 1 で添加したカルバコールをセビメリン (シグマアルドリッチ製) に変更し、セビメリン添加濃度が $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $100 \mu\text{mol/L}$ であること以外は実施例 1 と同様の操作を行った。

[0054] 細胞外電位の測定結果より、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔を拍動時間 (秒) とし、心拍数 (／分) = $60 / \text{拍動時間 (秒)}$ を算出した。セビメリンの添加により、最大で 26 % の心拍数の低下を確認した (図 4)。

[0055] 実施例 3 : アドレナリン受容体の作動剤 (イソプロテレノール) を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の作動剤 (ピロカルピン) による心拍数の低下を評価する方法と結果

実施例 1 と同様に、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞を培養した M E A プレートを用いて評価を行った。具体的には、実施例 1 で添加したカルバコールをピロカルピン (富士フイルム和光純薬製) に変更し、ピロカルピン添加濃度が $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $100 \mu\text{mol/L}$ であること以外は実施例 1 と同様の操作を行った。

[0056] 細胞外電位の測定結果より、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔を拍動時間 (秒) とし、心拍数 (／分) = $60 / \text{拍動時間}$

(秒)を算出した。ピロカルピンの添加により、最大で15%の心拍数の低下を確認した(図5)

[0057] 比較例1：維持用培地を用いてムスカリン受容体の作動剤(カルバコール)による心拍数の低下を評価する方法と結果

凍結状態のヒトiPS細胞由来心筋細胞(FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞2.0)を解凍し、解凍用培地(FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞解凍用培地)に懸濁した後、MEAプレート(Axion BioSystems, Inc 製、CytoView MEA48)上に1well当たり50000cellsを播種した。電極周辺の心筋細胞の播種密度は2798cells/mm²であった。CO₂インキュベーター内で数時間静置した後、血清を含む維持用培地(FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞維持用培地)を加え、CO₂インキュベーター内で約1週間培養した。測定日まで維持用培地で培養を行った。

[0058] 測定当日、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を培養したMEAプレートをMEAシステム(Axion BioSystems, Inc 製、Maestro Pro)に設置し、20分経過後に細胞外電位を測定した(媒体対照、カルバコール濃度0μmol/L)。引き続き、0.01μmol/Lのカルバコール(東京化成工業製)をMEAプレートに添加し、添加してから20分経過後に細胞外電位を測定した。同様に、0.1μmol/L、1μmol/L、10μmol/Lとなるようにカルバコールを加え、各濃度で細胞外電位を測定した。

[0059] 細胞外電位の測定結果より、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔を拍動時間(秒)とし、心拍数(1/分)=60/拍動時間(秒)を算出した。カルバコールの添加による明確な心拍数の低下を確認できなかった(図6)。

[0060] 実施例4：アドレナリン受容体の作動剤(イソプロテレノール)およびムス

カリン受容体の作動剤（カルバコール）を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の阻害剤（アトロピン）による心拍数の上昇を評価する方法と結果

凍結状態のヒトiPS細胞由来心筋細胞（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞2.0）を解凍し、解凍用培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞解凍用培地）に懸濁した後、MEAプレート（Axion BioSystems, Inc. 製、CytoView MEA48）上に1well当たり50000cellsを播種した。電極周辺の心筋細胞の播種密度は2725cells/mm²であった。CO₂インキュベーター内で数時間静置した後、血清を含む維持用培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞維持用培地）を加え、CO₂インキュベーター内で約1週間培養した。測定前日に培地を無血清培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、心筋細胞無血清アッセイ用培地）に交換した。

[0061] 測定当日、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を培養したMEAプレートをMEAシステム（Axion BioSystems, Inc. 製、Maestro Pro）に設置し、培地に1μmol/Lのイソプロテレノール（東京化成工業製）および3μmol/Lのカルバコール（東京化成工業製）を添加した後、添加してから20分経過後に細胞外電位を測定した（媒体対照、アトロピン濃度0μmol/L）。引き続き、0.01μmol/Lのアトロピン（東京化成工業製）をMEAプレートに添加し、添加してから20分経過後に細胞外電位を測定した。同様に、0.1μmol/L、1μmol/Lとなるようにアトロピンを加え、各濃度で細胞外電位を測定した。なお、添加するアトロピンの溶媒は1μmol/Lのイソプロテレノールおよび3μmol/Lのカルバコールを加えた無血清培地とし、アトロピンの添加時に無血清培地中のイソプロテレノールおよびカルバコール濃度が変化しな

いようにした。

[0062] 細胞外電位の測定結果より、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔を拍動時間 (秒) とし、心拍数 (／分) = $60 / \text{拍動時間 (秒)}$ を算出した。アトロピンの添加により、最大で 51 % の心拍数の増加を確認した (図 7)。

[0063] 実施例 5 : アドレナリン受容体の作動剤 (イソプロテレノール) およびムスカリン受容体の作動剤 (カルバコール) を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の阻害剤 (チオトロピウム) による心拍数の上昇を評価する方法と結果

実施例 4 と同様に、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞を培養した M E A プレートを用いて評価を行った。具体的には、実施例 4 で添加したアトロピンをチオトロピウム (東京化成工業製) に変更し、チオトロピウム添加濃度が 1 pmol/L 、 10 pmol/L 、 100 pmol/L 、 1000 pmol/L であること以外は実施例 4 と同様の操作を行った。

[0064] 細胞外電位の測定結果より、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔を拍動時間 (秒) とし、心拍数 (／分) = $60 / \text{拍動時間 (秒)}$ を算出した。チオトロピウムの添加により、濃度依存的な心拍数の増大が確認でき、最大で 36 % の心拍数の増加が確認できた (図 8)。

[0065] 実施例 6 : アドレナリン受容体の作動剤 (イソプロテレノール) およびムスカリン受容体の作動剤 (カルバコール) を添加した無血清培地を用いてムスカリン受容体の阻害剤 (グリコピロニウム) による心拍数の上昇を評価する方法と結果

実施例 4 と同様に、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞を培養した M E A プレートを用いて評価を行った。具体的には、実施例 4 で添加したアトロピンをグリコピロニウム (東京化成工業製) に変更し、グリコピロニウム添加濃度が 0.01 nmol/L 、 0.1 nmol/L 、 1 nmol/L 、 10 nmol/L であること以外は実施例 4 と同様の操作を行った。

[0066] 細胞外電位の測定結果より、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞の脱分極を示す

鋭いピークの間隔を拍動時間（秒）とし、心拍数（／分）＝60／拍動時間（秒）を算出した。グリコピロニウムの添加により、濃度依存的な心拍数の増大が確認でき、最大で36％の心拍数の増加が確認できた（図9）。

[0067] 実施例7：アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）およびムスカリン受容体の作動剤（カルバコール）を添加した無血清培地を用いてアドレナリン受容体の阻害剤（プロプラノロール）を添加した際の心拍数の影響を評価する方法と結果

実施例4と同様に、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を培養したMEAプレートを用いて評価を行った。具体的には、実施例4で添加したアトロピンをプロプラノロール（富士フイルム和光純薬製）に変更し、プロプラノロールの添加濃度が0.1nmol/L、1nmol/L、10nmol/L、100nmol/Lであること以外は実施例4と同様の操作を行った。

[0068] 細胞外電位の測定結果より、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔を拍動時間（秒）とし、心拍数（／分）＝60／拍動時間（秒）を算出した。プロプラノロールの添加により、濃度依存的に心拍数の低下が確認でき、最大で28％の心拍数の低下が確認できた。（図10）。

[0069] 実施例8：アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）およびムスカリン受容体の作動剤（カルバコール）を添加した無血清培地を用いてアドレナリン受容体の阻害剤（アテノロール）を添加した際の心拍数の影響を評価する方法と結果

実施例4と同様に、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を培養したMEAプレートを用いて評価を行った。具体的には、実施例4で添加したアトロピンをアテノロール（東京化成工業製）に変更し、アテノロールの添加濃度が0.01μmol/L、0.1μmol/L、1μmol/L、10μmol/Lであること以外は実施例4と同様の操作を行った。

[0070] 細胞外電位の測定結果より、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔を拍動時間（秒）とし、心拍数（／分）＝60／拍動時間（秒）を算出した。アテノロールの添加により、濃度依存的に心拍数の低下

が確認でき、最大で22%の心拍数の低下が確認できた。(図11)。

[0071] 実施例9：アドレナリン受容体の作動剤（イソプロテレノール）およびムスカリン受容体の作動剤（カルバコール）を添加した無血清培地を用いて心拍数へ作用しない薬剤（アスピリン）を添加した際の影響を評価する方法と結果

凍結状態のヒトiPS細胞由来心筋細胞（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞2.0）を解凍し、解凍用培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞解凍用培地）に懸濁した後、MEAプレート（Axion BioSystems, Inc製、CytoView MEA48）上に1well当たり50000cellsを播種した。電極周辺の心筋細胞の播種密度は2783cells/mm²であった。CO₂インキュベーター内で数時間静置した後、血清を含む維持用培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞維持用培地）を加え、CO₂インキュベーター内で約1週間培養した。測定前日に培地を無血清培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、心筋細胞無血清アッセイ用培地）に交換した。

[0072] 測定当日、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を培養したMEAプレートをMEASシステム（Axion BioSystems, Inc製、Maestro Pro）に設置し、培地に1μmol/Lのイソプロテレノール（東京化成工業製）および3μmol/Lのカルバコール（東京化成工業製）を添加した後、添加してから20分経過後に細胞外電位を測定した（媒体対照、アスピリン濃度0μmol/L）。引き続き、0.1μmol/Lのアスピリン（富士フイルム和光純薬製）をMEAプレートに添加し、添加してから20分経過後に細胞外電位を測定した。同様に、1μmol/L、10μmol/Lとなるようにアスピリンを加え、各濃度で細胞外電位を測定した。なお、添加するアスピリンの溶媒は1μmol/Lのイソプロテレノールお

よび $3 \mu\text{mol/L}$ のカルバコールを加えた無血清培地とし、アスピリンの添加時に無血清培地中のイソプロテレノールおよびカルバコール濃度が変化しないようにした。

[0073] 細胞外電位の測定結果より、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔を拍動時間 (秒) とし、心拍数 (／分) = $60 / \text{拍動時間 (秒)}$ を算出した。アスピリンの添加による心拍数の増加は、最大でも 17 % であった (図 12)。

[0074] 比較例 3 : 維持用培地を用いてムスカリン受容体の阻害剤 (アトロピン) による心拍数の上昇を評価する方法と結果

凍結状態のヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell 心筋細胞 2.0) を解凍し、解凍用培地 (FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell 心筋細胞解凍用培地) に懸濁した後、MEA プレート (Axion BioSystems, Inc 製、CytoView MEA48) 上に 1 well 当たり 50000 cells を播種した。電極周辺の心筋細胞の播種密度は 2662 cells/mm^2 であった。CO₂ インキュベーター内で数時間静置した後、血清を含む維持用培地 (FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell 心筋細胞維持用培地) を加え、CO₂ インキュベーター内で約 1 週間培養した。測定日まで維持用培地で培養を行った。

[0075] 測定当日、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を培養した MEA プレートを MEA システム (Axion BioSystems, Inc 製、Maestro Pro) に設置し、20 分経過後に細胞外電位を測定した (媒体対照、アトロピン濃度 $0 \mu\text{mol/L}$)。引き続き、 $0.01 \mu\text{mol/L}$ のアトロピン (東京化成工業製) を MEA プレートに添加し、添加してから 20 分経過後に細胞外電位を測定した。同様に、 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ となるようにアトロピンを加え、各濃度で細胞外電位を測定した。

[0076] 細胞外電位の測定結果より、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の脱分極を示す

鋭いピークの間隔を拍動時間（秒）とし、心拍数（／分）＝60／拍動時間（秒）を算出した。アトロピンの添加による明確な心拍数の上昇を確認できなかった（図13）。

[0077] 比較例4：無血清培地を用いてムスカリン受容体の阻害剤（アトロピン）による心拍数の上昇を評価する方法と結果

凍結状態のヒトiPS細胞由来心筋細胞（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞2.0）を解凍し、解凍用培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞解凍用培地）に懸濁した後、MEAプレート（Axion BioSystems, Inc製、CytoView MEA48）上に1well当たり50000cellsを播種した。電極周辺の心筋細胞の播種密度は2703cells/mm²であった。CO₂インキュベーター内で数時間静置した後、血清を含む維持用培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、iCell心筋細胞維持用培地）を加え、CO₂インキュベーター内で約1週間培養した。測定前日に培地を無血清培地（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. 製、心筋細胞無血清アッセイ用培地）に交換した。

[0078] 測定当日、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を培養したMEAプレートをMEAシステム（Axion BioSystems, Inc製、Maestro Pro）に設置し、20分経過後に細胞外電位を測定した（媒体対照、アトロピン濃度0μmol/L）。引き続き、0.01μmol/Lのアトロピン（東京化成工業製）をMEAプレートに添加し、添加してから20分経過後に細胞外電位を測定した。同様に、0.1μmol/L、1μmol/Lとなるようにアトロピンを加え、添加してから20分経過後に各濃度で細胞外電位を測定した。

[0079] 細胞外電位の測定結果より、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の脱分極を示す鋭いピークの間隔を拍動時間（秒）とし、心拍数（／分）＝60（秒／分）

／拍動時間（秒）を算出した。アトロピンの添加による明確な心拍数の上昇を確認できなかった（図 1 4）。

請求の範囲

- [請求項1] 交感神経系の生理活性物質および／または副交感神経系の生理活性物質を含む培地により心筋細胞を処理すること；
前記処理された心筋細胞に、薬剤を接触させること、および
薬剤が心筋細胞の心拍数に与える影響を評価すること、
を含む、薬剤の評価方法。
- [請求項2] 前記培地が無血清である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記交感神経系の生理活性物質が、アドレナリン受容体の作動剤を含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記副交感神経系の生理活性物質が、ムスカリン受容体の作動剤を含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項5] 前記薬剤のアドレナリン受容体の阻害効果を評価することを含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項6] 前記薬剤のムスカリン受容体の阻害効果を評価することを含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項7] 前記心筋細胞が、ヒト i P S 細胞由来心筋細胞である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項8] 前記副交感神経系の生理活性物質がカルバコールであり、前記交感神経系の生理活性物質がイソプロテレノールである、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項9] アドレナリン受容体の作動剤および／またはムスカリン受容体の作動剤を含む、請求項1または2に記載の方法を行うための試薬。
- [請求項10] 請求項9に記載の試薬と、培地とを含む、キット。
- [請求項11] さらに心筋細胞を含む、請求項10に記載のキット。