

多電極電位計測システムを用いた心毒性検査の培地条件探索及び、ニコチン添加によるニワトリ胚由来心筋細胞への影響

KAMEI, Yuichiro / 亀井, 雄一郎

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

35

(発行年 / Year)

2015-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2015-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(生命科学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

2014 年度 修士論文

多電極電位計測システムを用いた心毒性検査の
培地条件探索及び、ニコチン添加による
ニワトリ胚由来心筋細胞への影響

指導教授 金子 智行

2015 年 2 月

法政大学大学院理工学研究科

生命機能学専攻修士課程

学生証番号 13R7102

亀井 雄一郎

目次

1. 要旨	1
2. 序論	
2.1 心毒性検査における多電極電位計測システム	3
2.2 ニコチンの作用と心臓への影響	6
3. 材料と方法	
3.1 材料	9
3.2 方法	11
3.2.1 MEA 電極上の親水化処理	11
3.2.2 ニワトリ 13 日胚の解剖	11
3.2.3 密度勾配法を利用した心筋細胞の単離	11
3.2.4 培地の pH 測定	12
3.2.5 細胞外電位の測定	12
3.2.6 細胞外電位の解析	14
4. 結果	
4.1 多電極電位計測システムを用いた心毒性検査の培地条件探索	15
4.1.1 時間経過による培地の pH 変化	15
4.1.2 培地別の時間経過に伴う ISI、FPD の変化	17
4.1.3 150 分時経過時の ISI、FPD	19
4.2 ニコチン添加によるニワトリ胚由来心筋細胞への影響	21
4.2.1 ニコチン添加による ISI、FPD の変化	21
4.2.2 ニコチン添加濃度別の ISI、FPD	23
4.2.3 ニコチン添加後の STV	25
4.2.4 Na ⁺ ピーク及び K ⁺ ピークの変化	26
5. 考察	
5.1 MEA システムの測定条件と培地の選定	28
5.2 ニコチンによる心筋細胞への影響	29
6. 結論	31
7. 謝辞	32
8. 参考文献	33

1.要旨

医薬品は病気の症状を改善する効果だけでは無く副作用があり、医薬品の開発段階において副作用を調べる毒性検査は必要不可欠な試験である。特に、心臓への毒性は不整脈などを引き起こし致死的であるため心毒性検査は最重要項目になっている。現状、毒性検査は莫大な時間とコストがかかっており、コスト面や倫理面、技術面をより改善した手法が求められている。それらをクリアできる可能性のある手法が多電極電位計測(Multi Electrode Array: MEA)システムである。MEA システムは心筋細胞の細胞外電位を非侵襲的に長時間測定が可能であり、不整脈を引き起こす危険性の指標を示すことができると期待されている。しかし、MEA システムを用いた毒性試験には明確なプロトコルが確立されておらず、測定培地条件もその一つである。

そこで、一般的に用いられる 37°C保温箱内で一般的な細胞培養で使われている Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を測定培地として、心筋細胞の拍動間隔(Interspike Interval: ISI)と不整脈の危険性の指標となる細胞外電位持続時間(Field Potential Duration: FPD)を測定したところ、時間経過と共にどちらも大幅に変動することがわかった。37°C保温箱内では CO₂ 濃度を制御していないので、時間経過と共に培地の pH が大きく変化し、その変化が心筋細胞の拍動に影響している可能性がある。そこで pH 緩衝作用を持つ 25 mM HEPES buffer の入った DMEM(HEPES 培地)と CO₂ 濃度の影響を調べるために、CO₂ 濃度に依存しない CO₂ 非依存培地について検討を行った。両培地とも心筋細胞の ISI と FPD を安定して測定することができ、培地の pH は時間経過で上昇したものの DMEM と比べ、その上昇は緩やかであった。CO₂ 非依存培地は培地の組成が公表されておらず、培地成分と薬剤の反応が不明であるため、毒性検査に用いる培地は HEPES 培地が最適であると判断した。

次に HEPES 培地を測定培地として、タバコに含まれる毒物であるニコチンの心筋細胞への直接的な影響を調べた。ニコチンは喫煙が生体に及ぼす影響の主因となる化学物質であり、その作用は一般的には脳などの神経系を介した間接効果であると考えられている。しかし、それだけではなく神経系を介さず、心筋細胞の hERG チャネルと筋小胞体 Ca²⁺ポンプに直接作用する可能性が示唆されている。そこで、MEA システムを用いてニコチンの心筋細胞への直接作用について細胞外電位を測定することにより ISI,FPD への影響、及び FPD の Short Term Variability (STV)を算出し、不整脈の生じる可能性について検証した。

その結果、600 μM 以上のニコチンで ISI は短縮し、FPD は延長した。ISI の短縮は筋小胞体 Ca²⁺ポンプへの作用で生じ、FPD 延長は hERG チャネルへの

作用により生じると考えられた。hERG チャネル阻害の可能性を調べるためにさらに、K⁺ピークの値を比べたところ、600 μM 以上ではピークが小さくなり K⁺チャネルの阻害が確認できた。よって、K⁺チャネルの阻害により FPD が延長する可能性が示唆された。さらに、FPD の STV を算出した結果、6.0 mM ではニコチン添加前の 3 倍近くの STV であることから、この濃度では不整脈を起こす可能性が高いことが示唆された。しかし、喫煙時の最高血中濃度は約 0.5 μM であるため喫煙によるニコチン摂取で不整脈を起こす可能性は低いと思われる。

本研究の結論として、保温箱内での MEA システムによる心毒性検査において測定溶液の pH の変動は心筋細胞の拍動に影響を与える可能性があるため、pH 変動が小さい測定培地を選定することが望ましいと示唆された。また、ニコチンは心筋細胞の筋小胞体 Ca²⁺ポンプや K⁺チャネルなどに直接作用する可能性が高いが、喫煙などによる摂取では心臓への直接的な影響は小さいことが示唆された。

2. 序論

2.1 心毒性検査における多電極電位計測システム

抗がん剤をはじめとする多くの薬剤は副作用を持つ場合が多い。新規の医薬品が開発される際に数多くの毒性検査を行い、その副作用についても調べられる。毒性検査を行う上で、最重要視される項目のひとつとして心臓への毒性を検査する心毒性検査がある。心臓に対する副作用は重篤な不整脈を引き起こす可能性があり、致命的である。心毒性検査の手法として *in vivo* では、サルやイヌ、ブタ等を用いた動物薬剤試験がある。しかし、この動物薬剤試験は動物を飼育する費用が大きく、飼育するのに手間がかかり、さらに生命を扱うことから倫理面でも問題があり、多くの課題が残っている。また、サルやイヌ、ブタなどの動物とヒトでは心臓の拍動の活動電位の電位持続時間や拍動間隔が異なっているため、動物薬剤試験で起こったことがヒトでそのまま適応できるとは限らない。この種差間での作用の違いも問題になっている。*in vitro* では、細胞に微小電極を吸着させて細胞の電位を測定するパッチクランプ法がある。パッチクランプ法は細胞を用いるため、動物薬剤試験などのように倫理面では問題になりにくい。このパッチクランプ法は、細胞膜の単一チャネルレベルで電位を測定することができる。心毒性検査の際に、注目されるチャネルは、急速活性型遅延整流電流 (IKr) を形成する K⁺チャネルの一種である human Ether-a-go-go Related Gene (hERG)チャネルである。IKr は心室筋の活動電位持続時間を終了させ、活動電位再分極をもたらす重要な電流である。この電流が hERG チャネルの阻害を受け、抑制された場合、活動電位の終了が遅延し、心電図上での QT 延長が起こる[1,2]。この QT 延長が起こることで不整脈やトルサード・ド・ポアンツ(Torsades de Pointes: TdP)等の症状が現れることがある[3,4]。TdP とは、QRS 波の振幅と周期長が 1 拍ごとに変化し、基線の周囲をねじれながら振動するよう見える心室頻拍であり、重症不整脈である[5]。そのため QT 延長は不整脈が起こる可能性を示す指標とされている。これらのことから、hERG チャネルは最も重要なイオンチャネルの 1 つであり、このチャネルを検査することで不整脈について調べることができる。しかし、この手法は測定時に細胞に微小電極を吸着させることで、細胞に穴が開いた状態になり、細胞の内容物が流出し、やがては活動が停止してしまう。そのため、長時間の測定には向いていない。さらに、不整脈についての要因を 1 種類のチャネルのみの検査で済ませてしまっていることも問題である。

心毒性検査は *in vivo* と *in vitro* の両方で行われているが、これらの現状から、より迅速かつ低コストで倫理面もクリアしやすい細胞レベルで非侵襲的に測定できる毒性検査方法が求められている。

そこで、次世代の手法として多電極電位計測(Multi Electrode Array: MEA)システムがあり、これは心毒性検査の問題を解決する可能性のある手法である。MEAは電極上に播種した細胞から Na^+ と Ca^{2+} と K^+ から構成される細胞外電位を細胞レベルで測定することができる。この細胞外電位の波形から細胞外電位持続時間(Field Potential Duration: FPD)と拍動間隔(Interspike Interval: ISI)を算出することができ、FPDは心電図上のQT間隔に相当するため不整脈の指標として用いることができる[6-8]。

上記の測定法であるMEAシステムは非侵襲的に細胞に流入出する Na^+ と Ca^{2+} と K^+ により生じる電位を一度に測定できることが特徴である[9,10]。細胞を傷つけないため、細胞内の内容物の流出が起こらず長時間の測定も可能である。さらに最終的にはヒトの体細胞などから作成したinduced Pluripotent Stem(iPS)細胞由来の分化した細胞を用いることで、種差の問題も解決できる可能性が示唆されている。

しかしMEAシステムを用いた心毒性検査はプロトコルが定まっていないのが現状である。その一つとして挙げられるのが測定時の培地条件である。測定の際に細胞培養で用いるDMEMを用いると時間経過で拍動は不安定になりFPD、ISIが測定できなくなることが多い。可能性として培養時と測定時での大気組成の違いで培地のpHが変化し、その影響で拍動が不安定になることが考えられる。そのため本研究ではpHを考慮し、様々な培地条件で測定を行いMEAシステムに最適な培地条件の探索を行った。

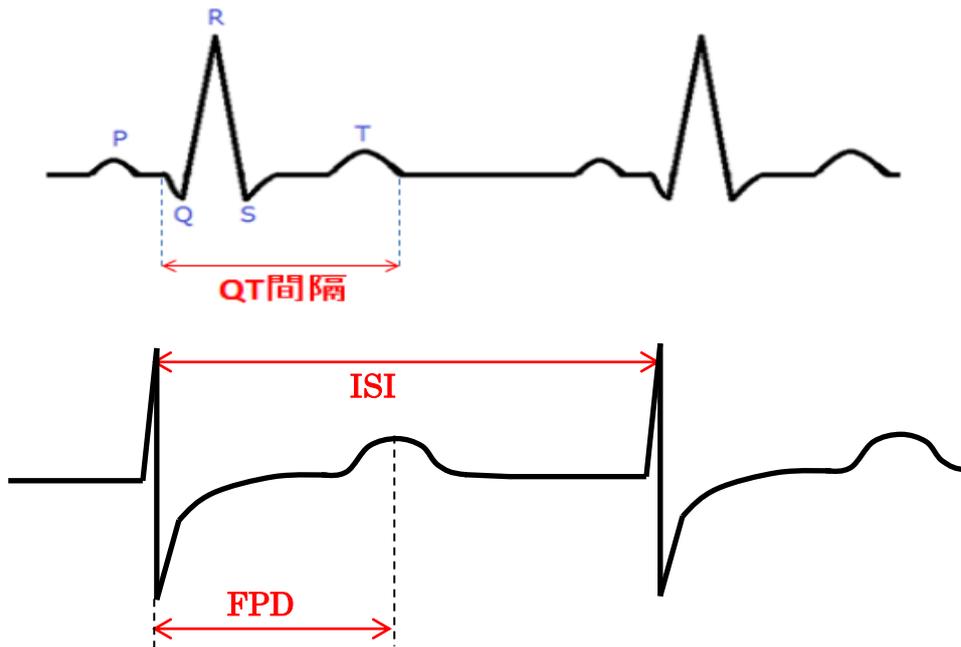


図 1. 心電図と細胞外電位の基本波形

心臓が拍動する際に体表面でとらえられる電気現象を波形で示したものが心電図である(図上)。この電気現象は活動電位による電気活動の総和である。P波は心房中を活動電位が伝播することによって生ずる波、QRS波は心室筋に活動電位が生ずることにより生ずる波、T波は心室の活動電位が消退することにより生ずる波である。このQ波の始まりからT波の終わりまでがQT間隔であり、QT間隔の延長は不整脈を引き起こす可能性を示す指標となる。 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ により形成された細胞外電位の波形(図下)において拍動間隔をISI、細胞外電位持続時間をFPDで示す。このFPDは心電図上のQT間隔に相当しているとされる。

2.2 ニコチンの作用と心臓への影響

近年、アメリカでは喫煙者を減らす動きが高まっている。その動きに対しても煙草をやめられない人は多い。その原因となっているのが煙草に含まれるニコチン(図 2)への依存症である。ニコチンは心臓に及ぼす影響が大きく、摂取することは依存症も重なり、健康に大きなリスクとなる[11-13]。ニコチンは喫煙が生体に及ぼす影響の主因となる化学物質であり、その作用は一般的には神経系を介した間接効果であると考えられている。ニコチンは脳、自律神経節、副腎、神経筋接合部位のコリン作動性ニコチンレセプターに結合して作用を発揮する。主な作用としては心拍数、血圧の上昇、一回拍出量、心筋収縮力の増加、冠血流量の増加、心筋酸素消費量の増加等である[14]。これらのような神経系を介した効果だけでなく、神経系を介さない心機能に対する直接効果に関する可能性も示唆されているが、この非神経依存性作用についての報告は、少ないのが現状である。

ニコチンの直接効果は心筋細胞の活動の制御に関わるイオンチャネルやポンプの働きを阻害、促進するものであると考えられている。心筋細胞の拍動のメカニズムは活動電位が起こることで Na^+ チャネルが開き Na^+ が流入し細胞は急速に脱分極状態になり、続いて Ca^{2+} が流入し、 K^+ チャネルが開き一時的に大量の K^+ が細胞外に流出し再び分極状態に戻る。また心筋細胞内の筋小胞体による Ca^{2+} 濃度の調節も収縮の制御に深く関わっており、その際に筋小胞体 Ca^{2+} ポンプが中心的役割を果たしている。心筋細胞は収縮時、最初に活動電位が生じることで Ca^{2+} チャネルが開き、細胞内に Ca^{2+} 流入する。その後、筋小胞体のリアノジンレセプターに結合し、チャネルが開くことで濃度勾配により筋小胞体内の Ca^{2+} は細胞質内に放出され、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。この流れを Ca^{2+} induced - Ca^{2+} release(CICR)といい、この CICR によって細胞質中に放出された Ca^{2+} は筋繊維に結合することで筋収縮を引き起こす。収縮後、細胞質中に放出された Ca^{2+} は筋小胞体の Ca^{2+} ポンプへの回収、または細胞膜中の Na^+ - Ca^{2+} 交換機構によって細胞外に運び出され、細胞内の電位は低い状態に戻る。このように筋小胞体 Ca^{2+} ポンプは収縮時に高まった細胞内の Ca^{2+} を回収し細胞内 Ca^{2+} 濃度を下げる働きをしている。これらの筋肉の収縮、弛緩の間に起こる細胞内の Ca^{2+} の上昇、低下の動きを Ca^{2+} トランジェントという(図 3)。

これらの心筋細胞の働きに対して、ニコチンは hERG チャネル、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプに直接的に作用する可能性が報告されている。ニコチンが心筋細胞に直接作用することで hERG チャネルは阻害を受ける可能性が示唆されているが、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプは逆に Ca^{2+} の取り込みが促進されると考えられている[15-19]。この 2 つの作用により K^+ チャネルと Ca^{2+} トランジェントに対し何らかの影響を及ぼすことが予想される。本研究ではこれらについて MEA システ

ムを用いて細胞外電位を測定することでイオン流入への影響を調べ、心筋細胞の直接作用について検討することを目的とした。

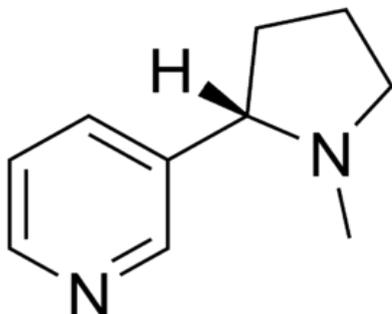
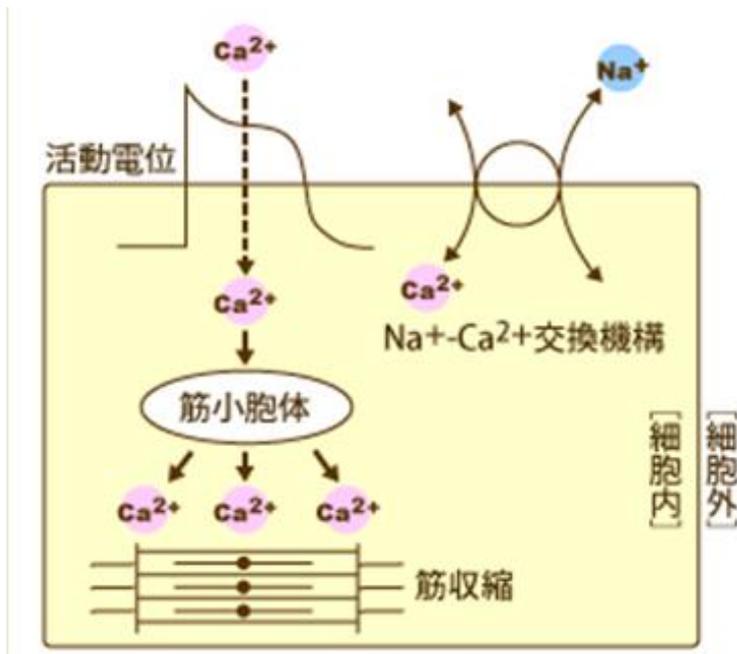


図 2. ニコチンの構造式

化学式 $C_{10}H_{14}N_2$ 。油状液体で水への溶解はあり。青酸カリの倍の毒性を持つ非常に毒性が高い物質。一部のトランスポーター、非特異的拡散により細胞内に取り込まれるとされる[20]。



引用元：東邦大学 心筋バーチャルラボラトリー

図 3. Ca^{2+} トランジェントの仕組みの模式図

Ca^{2+} トランジェントは活動電位刺激による筋小胞体への流入、筋小胞体からの細胞質中への Ca^{2+} の放出、筋小胞体への Ca^{2+} の取り込み及び $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換機構という一連の流れで起こる細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇、及び低下の動きである。

3.材料と方法

3.1 材料

- 13 日胚ニワトリ卵(デカルブブラウン種)
- (-)-Nicotine (和光純薬工業株式会社)
- Cellmatrix Type I -C(新田ゼラチン株式会社 130607)
- 希塩酸(0.0035%, pH 3)
- 0.2% コラゲナーゼ(Wako 034-22363)
- Percoll stock solution (GE Healthcare, 1.11 g/ml)

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma D8062)+10% Fetal Bovine Serum, 100 units / ml Penicillin,100 µg / ml streptomycin
- DMEM with 25 mM HEPES (HEPES 培地) (gibco by lifetechnologies)+10% Fetal Bovine Serum, 100 units / ml Penicillin,100 µg / ml streptomycin
- PBS(-)(1370mM NaCl, 27mM KCl, 81mM Na₂HPO₄, 14.7mM KH₂PO₄)
- CO₂ independent medium(CO₂ 非依存培地) (gibco by lifetechnologies)
- Ads buffer (1.1 M NaCl, 0.2 M HEPES, 10mM Na₂HPO₄, 50mM Glucose, 50mM KCl, 10mM MgSO₄)
- Stock solution(10×Ads buffer 1/10, Percoll stock solution 9/10)
- Top solution (Stock solution 9/20, 1×Ads buffer 11/20) (1.059 g/ml)
- Bottom solution(Stock solution 13/20, 1×Ads buffer (phenol red 20µg/ml) 7/20) (1.082 g/ml)

- CO₂ インキュベーター(Thermo SCIENTIFIC, MODEL 3110)
- pH メーター(HORIBA F-52)
- pH メーター電極(HORIBA 0030/0040)
- ウォーターバス(AS ONE, IWB-250)
- 遠心分離機(BECKMAN COULER Allegra™6KR Centrifuge)
- セルストレーナー(100 µm) (BD Falcon, REF352360)
- 多電極電位計測(MEA)システム(東京医科歯科大学 安田研究室製)
- 孵卵器(温度 38°C湿度 60%) (Rcom, King SURO MAX20 MX-SURO)
- MEA 基板(ALPHA MED SCIENTIFIC, MED-P515A)(図 4, 5)

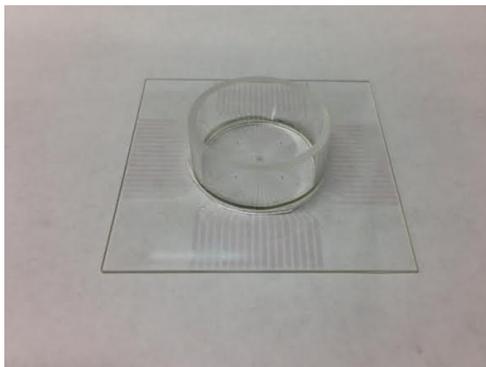


図 4. MEA 基板
培地を入れ中央のリング中に心筋細胞を播種する。

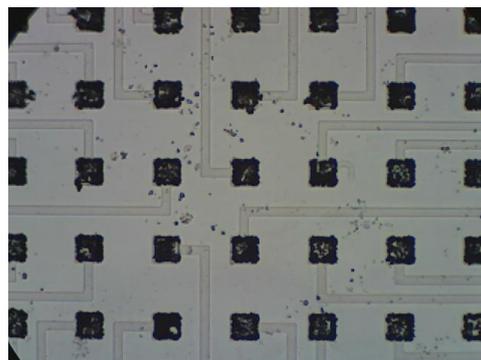


図 5. MEA 電極
四角の黒点部分が電極部分であり、電極大きさは $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ である。

3.2 方法

3.2.1 MEA 電極上の親水化処理

Cellmatrix Type I -C 200 μ l を 15 ml チューブに加え、さらに希塩酸 2 ml を加えることでコラーゲン溶液を作成した。

MEA 電極へ心筋細胞を培養するため、作成したコラーゲン溶液を電極上にコートした。その後、溶液を乾燥させ、PBS(-) 2 ml 加えた。コラーゲン溶液をコートすることで電極上を疎水性から親水性にし、細胞を MEA 電極に接着させることができる。また、コラーゲンを電極上にコートする際、できる限り電極中に細胞を接着させるために、コラーゲン溶液を電極の中心にのみ添加した。

3.2.2 ニワトリ 13 日胚の解剖

ディッシュを 3 枚用意し、それぞれのディッシュに DMEM を加えた。ディッシュ 1 はニワトリを解剖する場として設け、ディッシュ 2 はニワトリから取り出した心臓についての動脈や静脈などを取り除く場として設けた。ディッシュ 3 は取り出してきた心臓を保管する場として設けた。

卵から取り出してきたニワトリ胚の胴体部位をディッシュ 1 で切り開き心臓を取り出しディッシュ 2 に移す。ディッシュ 2 では心臓組織をピンセットでつまむことで血液を抜き、心室以外の部位をできるだけ切り離し、心室をディッシュ 3 に移した。ディッシュ 3 で取り出してきた心室をハサミで切り刻んだ。細胞組織を直径 1.0 mm 程の断片になるまで切り刻んだ。

3.2.3 密度勾配法を利用した心筋細胞の単離

細胞の種類ごとの密度の違いを利用した密度勾配法を利用した。ディッシュ 3 で切り刻んだ心臓組織を 15 ml チューブに 10 ml の DMEM と共に入れた。細胞沈殿後、アスピレーターを用いて上澄みを除去した。洗浄のため、PBS(-)10 ml を入れ沈殿させた後、上澄みを除去した。再び PBS(-)5 ml を加え、沈殿物のみを 10 ml ピペットを用いてスターラーが入った瓶に移し、0.2% コラゲナーゼ 10 ml を加え、ウォーターバスで 10 分間スターラーで攪拌させた。その後瓶内の上澄みを 50 ml チューブ(1)に移し、そこに DMEM 30 ml も加え、氷上に保管した。その後、細胞断片が残った瓶内に 0.2% コラゲナーゼ 10 ml を加え、同様に 10 分間攪拌した。前述と同様に上澄みを 50 ml チューブ(2)に移し DMEM 30 ml を加え、2 本の 50 ml チューブ、(1)、(2)を 5 分間 1000 rpm で遠心分離した。遠心分離後、(1)、(2)の 50 ml チューブの上澄みを捨て、チューブ先端のタッピングを行い、それぞれのチューブに DMEM 20 ml を加えた。その後、各々の培地を 100 μ m のセルストレーナーを用いて大きな組織を取り除き、新しい 1

つのチューブに移し、5 分間、1000 rpm で遠心分離した。遠心分離後、上澄みを取り除き、チューブの先端をタッピングした。1×ADS buffer 2 ml で細胞を懸濁し、あらかじめ作っておいた Top solution(4 ml)と Bottom solution(3 ml)の 2 層状態の溶液 2 本の水面にそれぞれ細胞溶液を 1 ml 加えた。30 分間、3500 rpm ノンブレーキに設定で遠心分離した。細胞の密度の違いにより線維芽細胞と心筋細胞に分けられ、溶液内に 2 つのバンド状の層が形成された。上層にあるものが線維芽細胞、下層にあるものが心筋細胞であるためガラスピペットで線維芽細胞を除去後、心筋細胞を吸い出し 50 ml チューブに移した。50 ml になるまで DMEM を足した。5 分間、1000 rpm で遠心分離した。上澄みを除去後、タッピングを行い DMEM で希釈した。適切な細胞濃度になるように MEA 基板に心筋細胞を播種した。播種後、MEA 基板の中心に心筋細胞が集まるよう、円を描くように MEA 基板を回した。その後、約 1 日 CO₂ インキュベーター内で保管した後、DMEM で培地交換を行い、再度 CO₂ インキュベーター内で約 1 日、培養した。

3.2.4 培地の pH 測定

MEA 基板に 2 ml 培地を入れ CO₂ インキュベーター内に 2 時間置いた。保温箱に移し pH メーターを用いて培地の pH 変化を 30 分までは 5 分おき、それ以後は 10 分おき、90 分以後は 15 分おきに測定した。

3.2.5 細胞外電位の測定

心筋細胞の単離から約 3~4 日後に測定を行った。測定前に 37°C に保温した DMEM、HEPES 培地、CO₂ 非依存培地で培地交換を行った。DMEM のみ培地交換後 2 時間 CO₂ インキュベーター内に置いた。その他の 2 種の培地は培地交換後そのまま次の操作を行った。培地交換を行った MEA 基板を保温箱(図 6)に設置し、約 10 分間放置した。測定箱の温度設定は 37°C とした。MEA システム(安田研究室)を用いて測定し、CellAD2.0.6 で波形の記録を行った(図 7)。測定は 150 分間行った。初めの 30 分間は 5 分おき、次の 60 分間は 10 分おき、最後の 60 分は 15 分おきに 1 分間分の波形の記録を行った。

ニコチンを添加する際は 4 回に分けて行い、1 回目の添加から Dose1~4 とし、1 から順に最終濃度が 6.0 μM, 60 μM, 600 μM, 6000 μM となるように行った。最初の 30 分間は 5 分おきに 1 分間測定を行った。1 回の添加につき 10 分測定し、4 回の添加後、溶液全量をニコチンの含まれていない各培地で交換した。この洗浄は 3 回行い、1 回の洗浄につき 17 分間測定した。

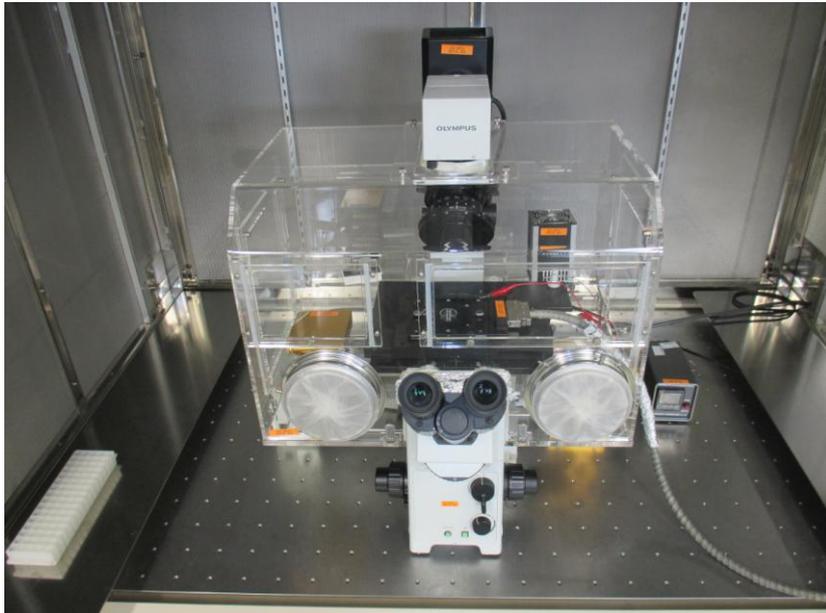


図 6. MEA システム測定装置及び保温箱

顕微鏡上に MEA 基板を取り付ける装置を設置した。保温箱内は温度調節器により、センサー付近を 37°C の一定温度に保った。

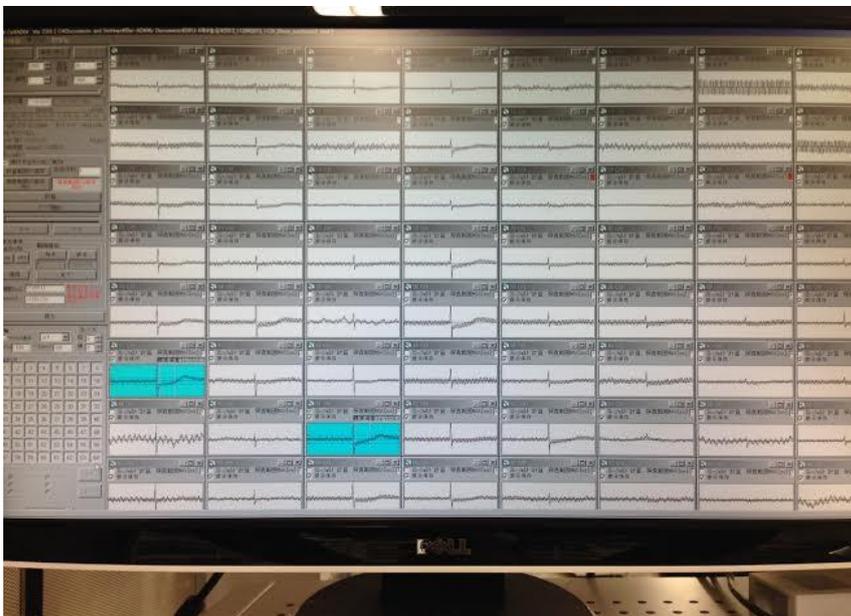


図 7. CellAD2.0.6

記録した心筋細胞の波形データは、CellAD2.0.6 を用いて分析を行った。CellAD2.0.6 は 64 個の電極から細胞外電位を記録、測定することができる。また、チャンネルを選択して分析することが可能である。さらに複数のチャンネルを測定することができるので、細胞間の刺激の速度等も分析することができる。

3.2.6 細胞外電位の解析

CellAD2.0.6 で記録した波形のデータから、Na⁺チャネル開口による Na⁺流入から得られるマイナスのピークと次の拍動による Na⁺チャネル開口のマイナスのピークの時間差を計算することで ISI とした。また、Na⁺チャネル開口による Na⁺流入のマイナスのピークと再分極による K⁺の急速な流出によるプラスのピークの時間差を計算することで FPD とした(図 8)。また ISI を拍動間隔、FPD を QT 様間隔として分析を行った。STV は隣接する拍動の FPD の揺らぎから算出した。この値が大きくなるほど不整脈を引き起こす可能性が高いと言われている。ヒト ES 細胞由来心筋細胞塊を用いた実験ではコントロールに対して 1.9 倍を超えると不整脈を引き起こす可能性があることが指摘されている[21]。STV は以下の式により算出した。

$$STV = \frac{\sum |FPD_{n+1} - FPD_n|}{n\sqrt{2}} \quad (n \geq 30)$$

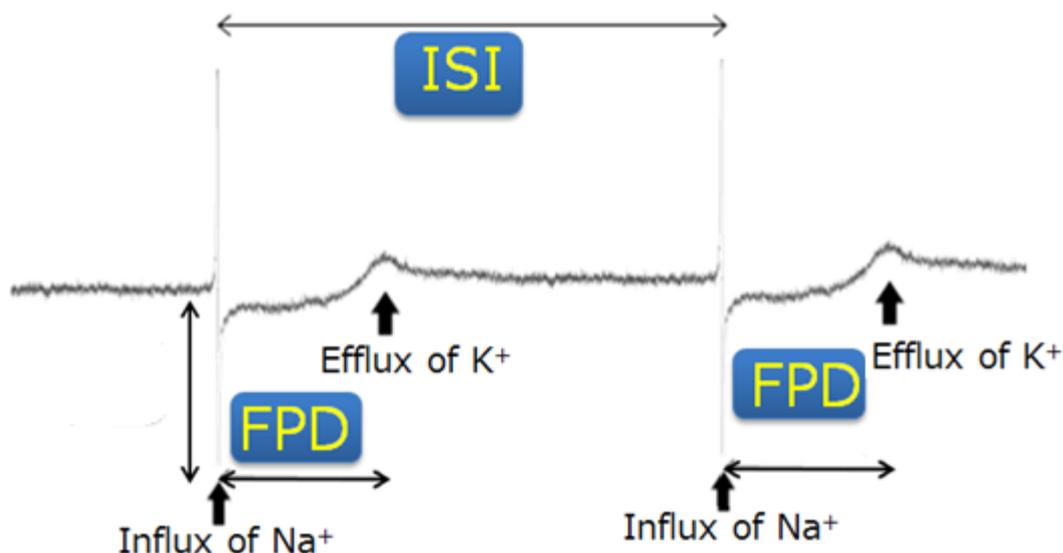


図 8. MEA システムによる心筋細胞の細胞外電位の基本波形

Na⁺ピークから、次の拍動の Na⁺ピークまでを拍動間隔(Interspike Interval: ISI)、Na⁺ピークから K⁺ピークまでを細胞外電位持続時間(Field Potential Duration: FPD) とした。

4.結果

4.1 多電極電位計測システムを用いた心毒性検査の培地条件探索

4.1.1 時間経過による培地の pH 変化

心毒性検査で重要なことは薬剤を加えない状態で心筋細胞が安定して拍動することであるため、心筋細胞周囲の環境が変わらない条件で測定する必要がある。MEAを用いた心毒性検査の測定の際、心筋細胞を培養しているCO₂インキュベーターから取り出し、保温箱に移動してから測定を行うのが一般的である。保温箱内はCO₂濃度が制御されていないため、急激に大気中のCO₂濃度が低い環境に変わる。そのため、測定中は培地中のCO₂が抜けていき、培地のpHが変化する可能性がある。細胞を播種していない状態で測定を行うための37°Cに設定した保温箱の中に置いてpHを測定し、測定培地のpH変動について調べた。測定培地にはDMEMに加え、pH緩衝能を持つHEPES培地とCO₂濃度の影響を受けにくいCO₂非依存培地を用いた。測定時間は心毒性検査の測定時間と同等の、150分間のpH変化を測定した(図9)。その結果、全体的にどの培地も時間経過と共にpHは上昇したが、pHの変化速度には違いが現れた。DMEMとCO₂非依存培地の測定開始時のpHは6.8であり、150分で最終的にDMEMは8.3となり、CO₂非依存培地は7.3まで上昇した。HEPES培地は測定開始時が7.3で、150分後は最終的に8.1となった。150分間のそれぞれの上昇幅はDMEMが、1.5で、CO₂非依存培地は0.5で、HEPES培地は0.9となった。CO₂非依存培地とHEPES培地は、ほぼ同じくらいの速度で緩やかにpHが上昇したが、DMEMは2倍近い速度で急速に上昇し、変動幅も2倍近かった。

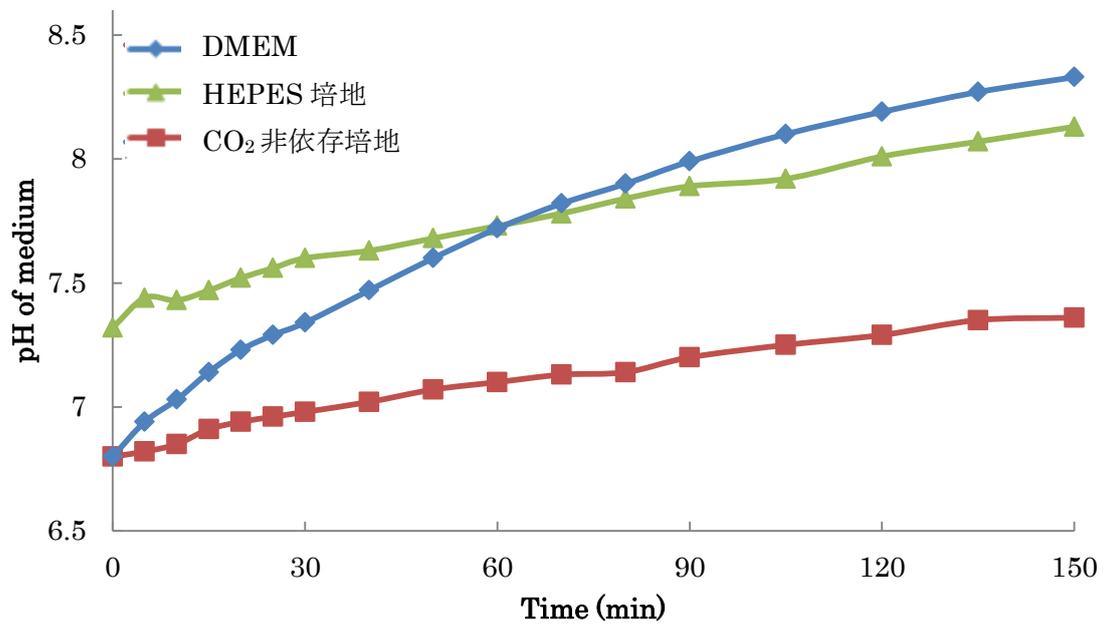


図 9. 時間経過に伴う培地ごとの pH 変化

DMEM(青:ひし形)と HEPES 培地(緑:三角)と CO₂ 非依存培地(赤:四角)を用いて 150 分間測定した。最初の 30 分は 5 分おきに、次の 60 分間は 10 分おきに、次の 60 分間は 15 分おきにそれぞれ 1 分間測定した。

4.1.2 培地別の時間経過に伴う ISI、FPD の変化

MEA システムを用いた心毒性検査は薬剤添加時の ISI や FPD を測定し、その変化量から不整脈発生の可能性を測定するものである。そのため心毒性検査の培地条件としては心筋細胞の ISI、FPD の変動を最小限にとどめ、拍動が揺らがないことが最適である。しかし、4.1.1 で示された結果より、DMEM は pH が HEPES 培地と CO₂ 非依存培地と比べ、急速に pH が上昇したことが示された(図 9)。pH 変化が拍動に影響があるならば、ISI、FPD の変動として表れるので、DMEM と HEPES 培地と CO₂ 非依存培地が ISI, FPD にどのように影響するかを検証するため、各培地を用いて細胞外電位を 150 分間測定した(図 10)。

DMEM の ISI は 60 分経過付近から揺らぎが生じ始め、値が上昇し始めた。90 分付近から揺らぎが大きくなり、最終的には測定開始時の ISI の 3 倍以上になり揺らぎもさらに大きくなった。FPD は揺らぎが生じなかったものの同じく 60 分付近から上昇し始め、測定開始時の 0.2 秒から 0.3 秒まで上昇した。

HEPES 培地と CO₂ 非依存培地の ISI は測定開始時に変動したが、30 分付近から安定し始め、測定終了付近も 30 分経過時とほぼ同じ値を維持した。FPD も同じく測定開始時の変動から 30 分経過付近には変動は収まり、測定終了時に 30 分経過時と同じ値を示した。この実験により、測定開始から 30 分経過時点では、CO₂ インキュベーターから保温箱に移した際の環境変化による変動が比較的収まることと、HEPES 培地と CO₂ 非依存培地の緩やかな pH の上昇による ISI、FPD への影響は小さいことが示唆された。また、測定から 30 分経過時点で測定開始時の変動は収まることが示唆されたため、測定開始から 30 分経過時点から心毒性検査を行うこととした。

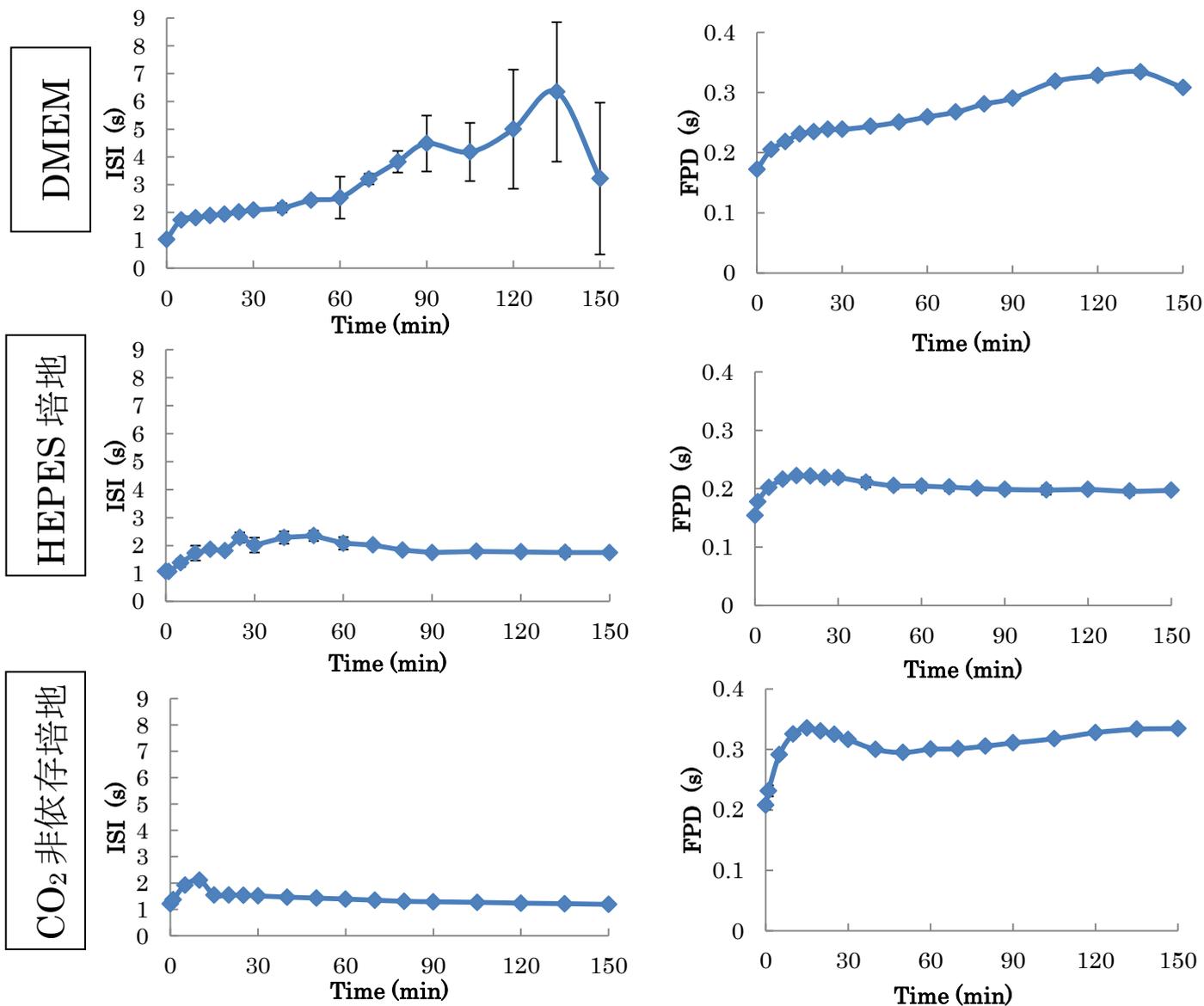


図 10. 培地別の時間経過による ISI, FPD の変化

DMEM(上段)、 HEPES 培地(中段)、 CO₂ 非依存培地(下段)の ISI(左)と FPD(右)を算出した。複数回行ったうち典型例を示した。エラーバーは SD を示し、ISI、FPD の揺らぎとして示した。

4.1.3 150分経過時の ISI、FPD

測定開始 30 分後からは ISI, FPD とも緩やかに変動することから、30 分後から 150 分後の変化量を測定した。薬剤毒性検査の測定の条件は、ISI と FPD が安定して測定できることに加え、薬剤の応答を測定する 120 分間の測定ができることも重要である。そこで DMEM, HEPES 培地, CO₂ 非依存培地について測定開始から 30 分経過時点の ISI, FPD を 1 として、150 分経過時点の値を複数回測定し、標準化した(図 11)。

150 分後の DMEM は、ISI は約 3 倍に増加し、FPD は約 1.4 倍に増加していた。HEPES 培地と CO₂ 非依存培地の ISI は 150 分経過後も変動が小さく、測定開始 30 分後から拍動が維持されていることが示された。FPD も変動は小さく、150 分後も培地による変動はほぼ生じないことが示唆された。

これまでの結果で、CO₂ 濃度が制御されていない保温箱内で測定を行う心毒性検査では、培地中の CO₂ が抜けることで培地の pH が変動し、それが心筋細胞の拍動に影響を及ぼす可能性が示唆された。このことから DMEM は pH が変動しやすく、徐々に ISI, FPD が変動し安定しなくなるため、心毒性検査の測定培地には適していないことが示された。CO₂ 非依存培地は CO₂ 濃度によらず、pH や細胞の挙動が安定していたが、溶液の組成は公表されておらず、培地成分と薬剤の反応が否定できないため、心毒性検査には適用できない。そこで心毒性検査を行う培地には HEPES 培地を選定した

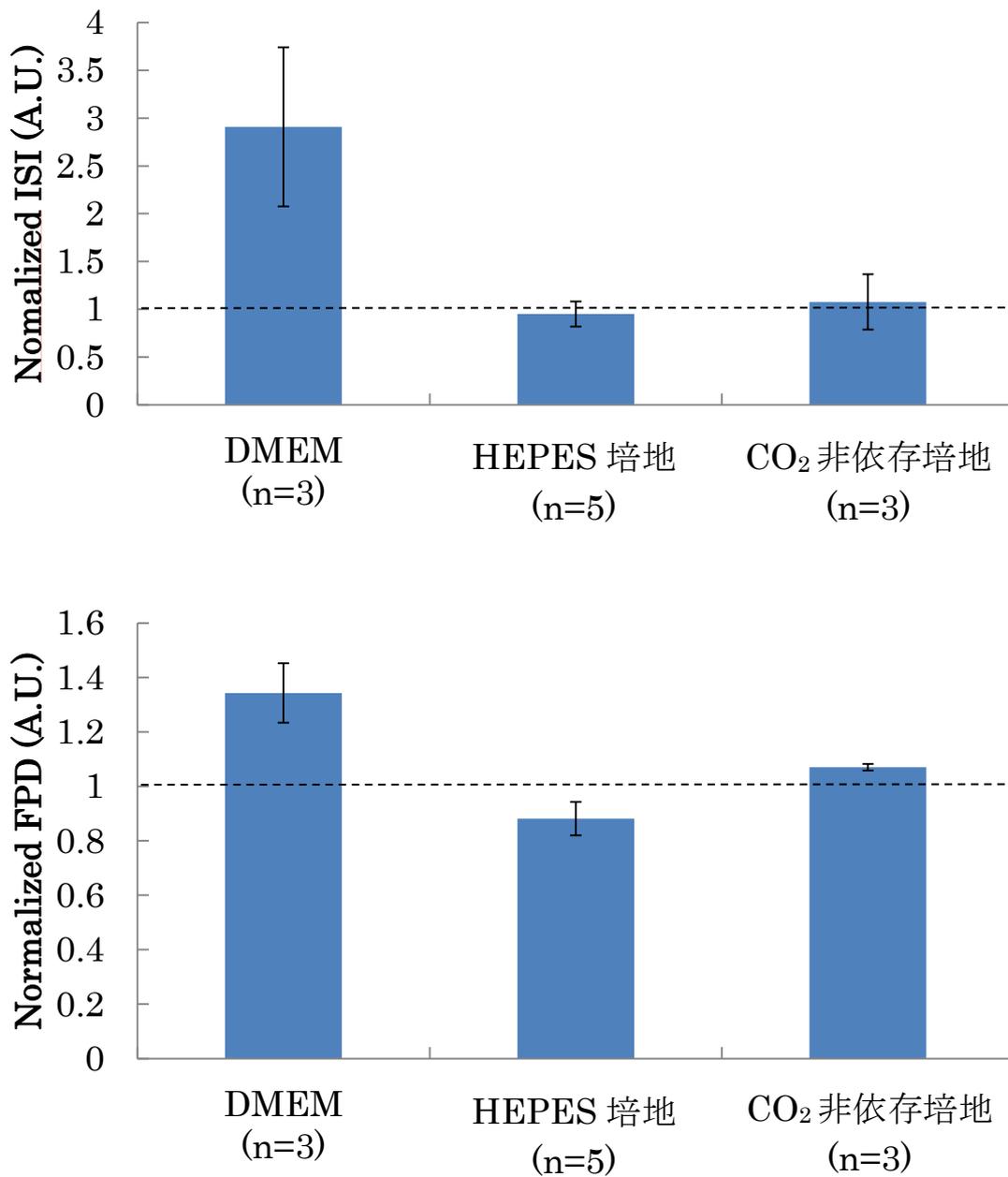


図 11. 150 分経過時の ISI と FPD

測定開始から安定し始める時間を 30 分後に設定し、30 分経過時点の ISI, FPD を 1 として 150 分経過時の ISI、FPD の値を標準化した。エラーバーは SE を示す

4.2 ニコチン添加によるニワトリ胚由来心筋細胞への影響

4.2.1 ニコチン添加による ISI、FPD の変化

ニコチンの主な作用として神経を介した神経依存作用があるが、神経を介さず心臓に対して直接作用を引き起こす非神経依存作用がある可能性が指摘されており、心筋細胞の拍動に直接的に何らかの影響を与える可能性がある。そのため、ニワトリ 13 日胚由来心筋細胞を用いて、MEA システムにより測定された細胞外電位の Na^+ 、 Ca^{2+} の流入、 K^+ の流出の情報から ISI、FPD の拍動情報を算出することで、ニコチンの心筋細胞への直接作用について検討した(図 12)。

4.1 の実験にて、測定開始 30 分後に測定開始時の ISI、FPD の変動が収まることが示されたため、薬剤添加の開始を 30 分経過時点に設定した。測定開始から 30 分後にニコチンの添加をはじめ、最終濃度が 6.0 μM 、60 μM 、600 μM 、6.0 mM となるように濃度が低い順にニコチンを添加し、一回の添加につき 10 分間連続して細胞外電位を測定した(以降それぞれの添加を濃度が低い順に Dose1~4 とする)。さらに、ニコチンの心筋細胞への毒性が可逆的なものであるかを確認するため、培地を全量交換し、計 3 回の洗浄を行った(以降洗浄を順に wash1~3 とする)。

その結果、FPD と ISI とともに Dose3 から変化が表れ、ISI は短縮する傾向がみられ、FPD は延長する傾向がみられた。Dose4 では添加数分後に拍動が停止した。この ISI 短縮と FPD 延長は、添加直後ではなく添加後の 1~3 分後から表れ、10 分間の測定の最後の数分で最も大きく変動が表れた。Dose4 での拍動の停止も添加後の 1~3 分後に引き起こされた。

洗浄後は 3~7 分後に拍動が復帰した。FPD は元の値に戻ったが、ISI は安定せず添加前の値に戻らないことが多かった。

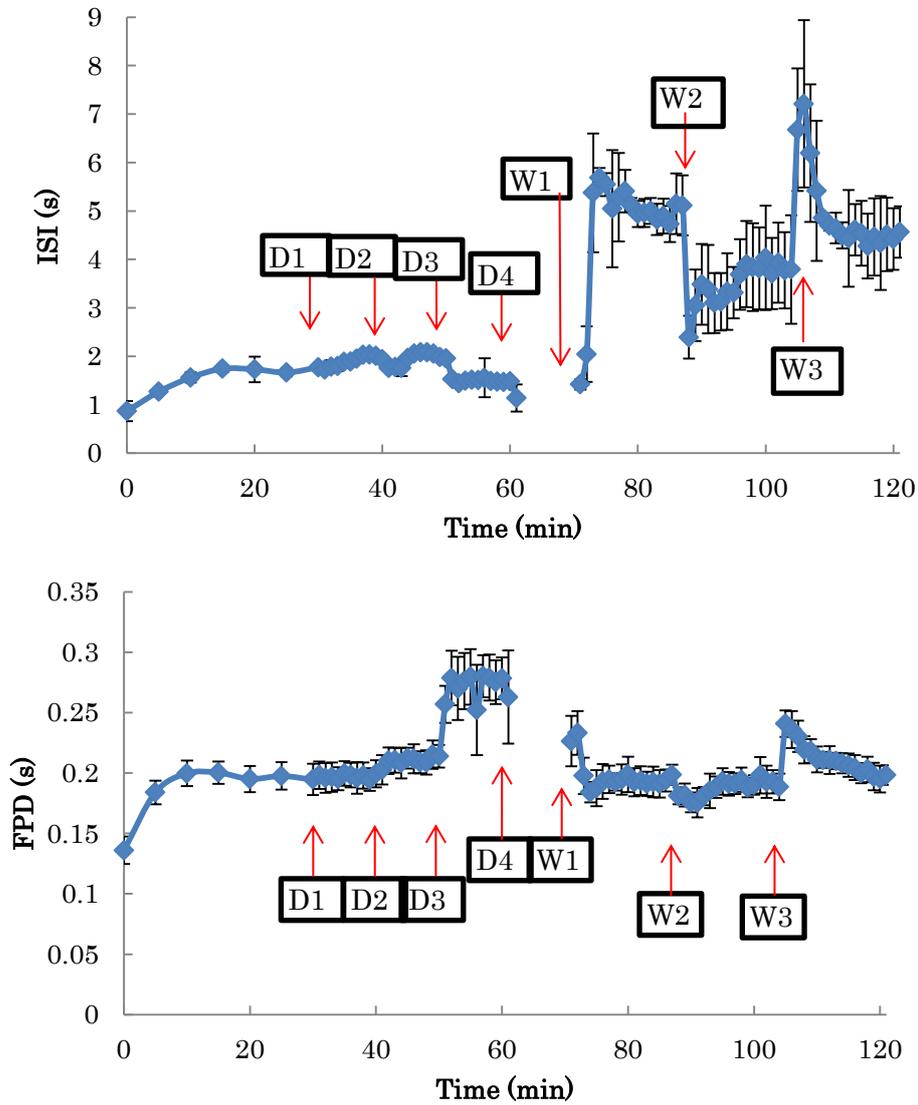


図 12. ニコチン添加時の ISI と FPD の変化

ニコチンを添加し、その後洗浄を行った時の ISI, FPD を算出し、典型的なデータ例を経時的に示した。Dose1~4 を D1~4 で、Wash1~3 を W1~3 として示した。エラーバーは SD を示した。

4.2.2 ニコチン添加濃度別の ISI、FPD

4.2.1 のようにして複数回ニコチンの添加実験を行い、その結果の添加時と洗浄後を添加前と比較した。測定開始から拍動が安定し始める 30 分後の 1 分間の ISI, FPD のそれぞれの平均を添加直前のデータとしてコントロールとした。添加後と洗浄後はそれぞれ、測定の最後の数分に最終的な結果が表れると判断したため、それぞれ測定の最後の 1 分間の ISI, FPD のそれぞれの平均を処理後の変化と考え、算出した。その後、ISI, FPD に関して、コントロールを 1 として、添加後と洗浄後の最後の 1 分間の平均を標準化した。

ISI は Dose1 および 2 では影響はほとんどみられなかったが、Dose3,4 では濃度が高くなるほど短縮した。4 回目の添加後、培地を全量交換し洗浄を行ったが拍動は安定しなかった(図 13)。

FPD も同じく Dose1, 2 では変化はなかった。しかし Dose3, 4 では濃度依存的に延長されることが示唆された。洗浄後は、延長状態から復帰し元の値に戻り、FPD については可逆性が示された(図 14)。

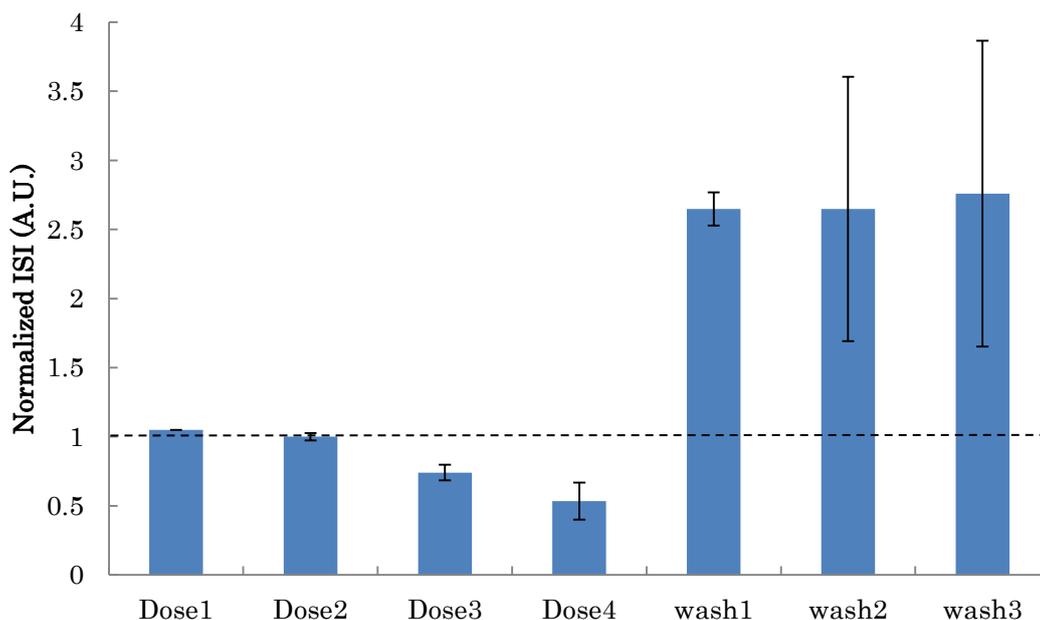


図 13. ニコチン添加後の ISI

測定開始から拍動が安定し始める 30 分後の 1 分間の ISI, FPD の平均を 1 として、ニコチン添加後、洗浄後の末尾 1 分間の平均を標準化した。Dose4 は拍動停止前の 1 分間から算出した。エラーバーは SE を示す(n=3)。

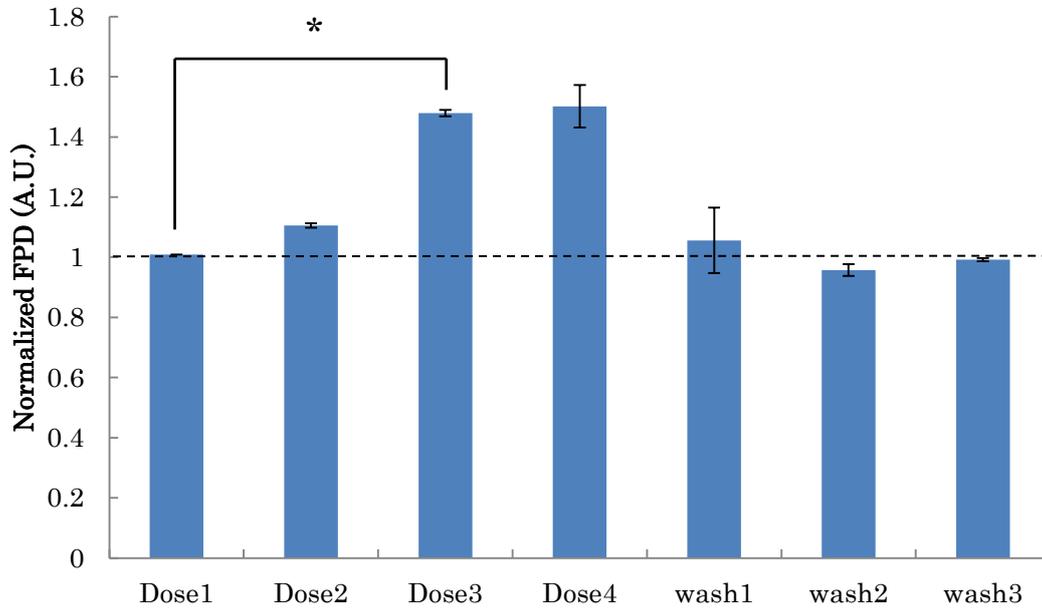


図 14.ニコチン添加後の FPD

ニコチン添加直前とニコチン添加後と洗浄後の最後の 1 分間の FPD を算出し、添加直前を 1 として添加後と洗浄後の FPD を比で示した。Dose4 は拍動停止前の 1 分間から算出した。エラーバーは SE を示した。Dose3 は Dose1 に対し t 検定により有意差が示された(* $p < 0.05$ n=3)。

4.2.3 ニコチン添加後の STV

4.2.2 の結果で FPD 延長が示されたため、不整脈を引き起こす可能性が示唆された。心臓が不整脈を引き起こすかどうかは FPD の時間的不均一性の有無に起因しており、FPD 延長が起きた場合も、1 拍ごとの FPD の変動が少ない場合は不整脈のリスクは低く、ばらつきが大きい場合には不整脈を引き起こす可能性が高いと考えられている。そのため、一拍ごとの時間的不均一性を示す STV の値を算出することで、不整脈を引き起こす可能性を調べた。測定開始から安定し始める 30 分経過後をコントロールとし、各添加後と洗浄後の STV を示した(図 15)。Dose1,2 ではコントロールとほぼ同じ値を示し、変化はなかった。しかし、Dose3,4 では上昇し 1.9 倍を上回る値が示された。洗浄後は再び、STV の値は低下し、コントロールとほぼ同じ値に戻った。

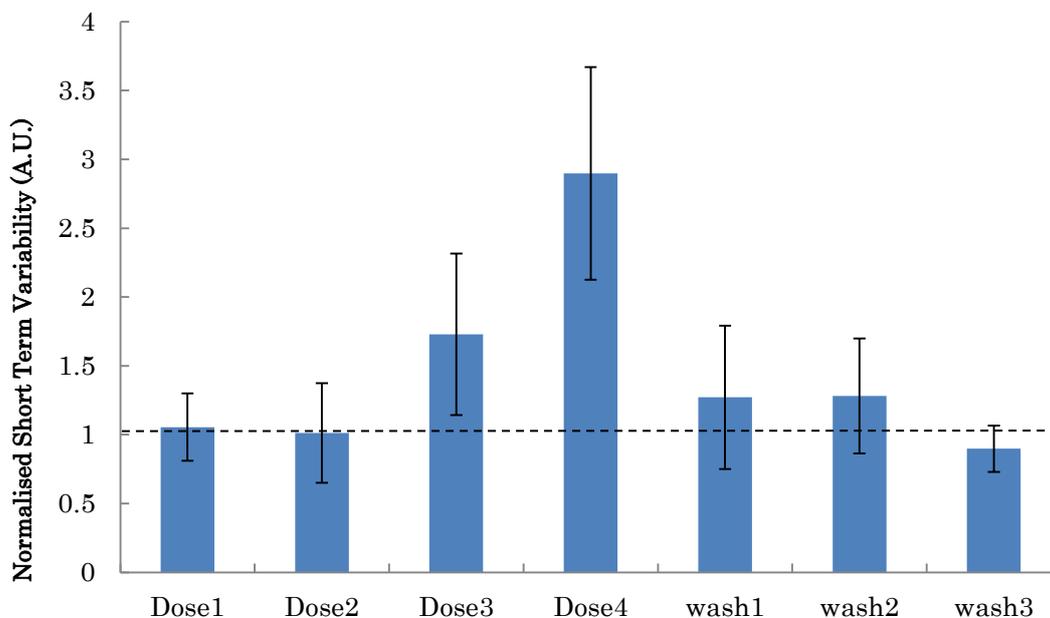


図 15. ニコチン添加による STV の変化

ISI, FPD から STV を算出し、不整脈を引き起こす可能性についての結果を示した。ニコチン添加直前とニコチン添加後と洗浄後の STV を算出し、添加直前を 1 として添加後と洗浄後を比で示した。エラーバーは SE を示した(n=3)。

4.2.4 Na⁺ピーク及びK⁺ピークの変化

細胞外電位は波形のピークの大きさから、Na⁺, K⁺のおおよその流入量、流出量を判定できる。そこで、ニコチンは心筋細胞のhERGチャンネルや筋小胞体Ca²⁺ポンプへ直接作用することが示唆されているため、ニコチンの直接作用がNa⁺とK⁺の流入量、流出量にどのように影響するかを検討した。Na⁺とK⁺のピークを算出し、測定30分経過時のコントロールを1として、添加後、洗浄後のそれぞれ最後の1分間の平均を標準化した。

ニコチン添加後にNa⁺の大幅な変化は見られなかったが、洗浄後は上昇し、揺らぎも増加した(図16)。次に、K⁺の流出量に関してはDose1,2で変化は見られなかったが、Dose3,4ではK⁺ピークは0.8倍まで減少した。その後の洗浄によりK⁺ピークは復帰し可逆性が示された(図17)。

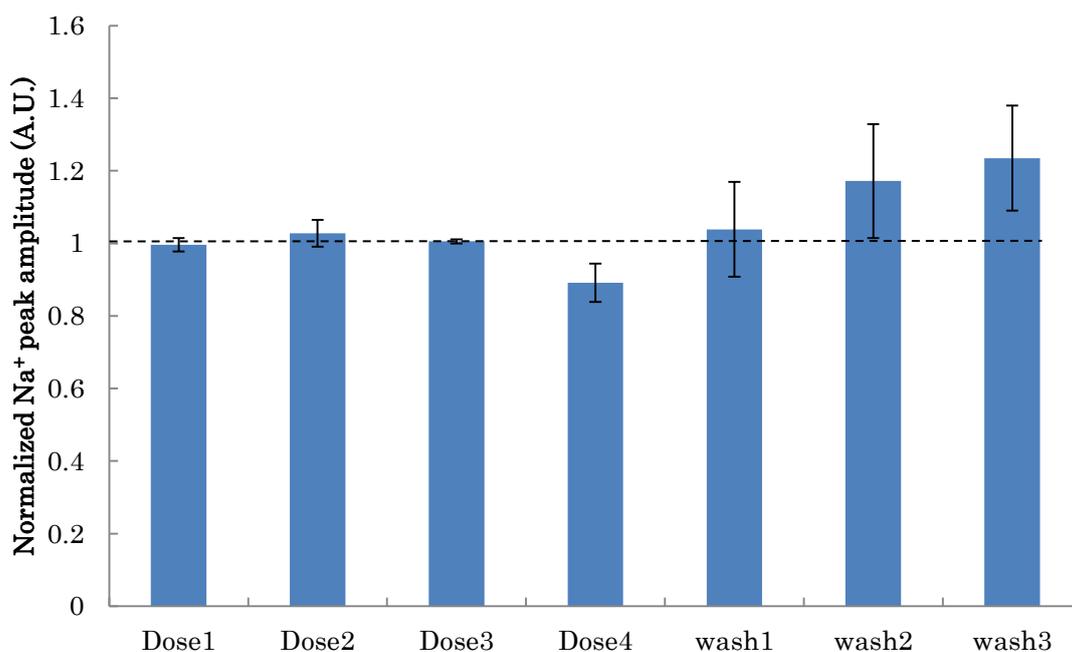


図16. ニコチン添加によるNa⁺流入量の変化

Na⁺ピークからNa⁺の流入量の変化を調べた。ニコチン添加直前のNa⁺ピークの値を1として添加後と洗浄後を比で示した。Dose4は拍動停止前の1分間から算出した。エラーバーはSEを示した(n=3)。

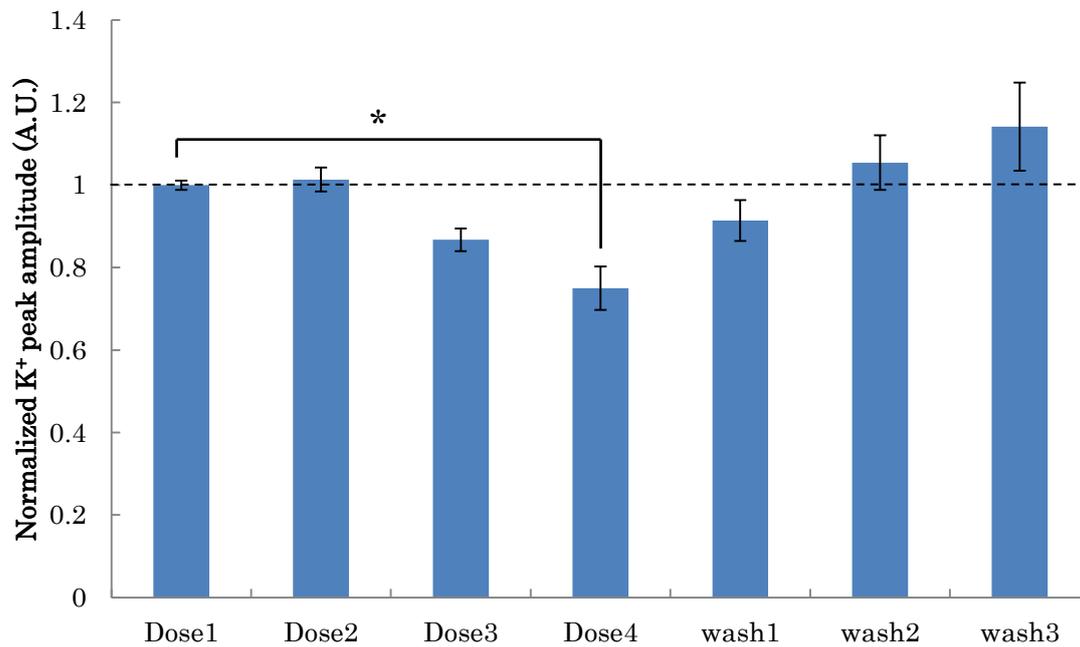


図 17. ニコチン添加による K⁺流入量の変化

K⁺ピークから K⁺の流入量の変化を調べた。ニコチン添加直前の K⁺ピークの値を 1 とし
て添加後と洗浄後を比で示した。エラーバーは SE を示した。Dose4 は拍動停止前の 1
分間から算出した。Dose4 は Dose1 に対し t 検定により有意差が示された(p<0.05 n=3)。

5. 考察

5.1 MEA システムの測定条件と培地の選定

DMEM、HEPES 培地、CO₂ 非依存培地の pH を測定した結果、DMEM の pH は、他の 2 種類の培地と比べて急激に上昇していた。これは培養時の CO₂ インキュベーター内と測定時の保温箱内の大気中の CO₂ 濃度が変化したからであると考えられる。本実験では pH の上昇が CO₂ の影響によるものかを判断するため CO₂ 非依存培地を用いた。CO₂ インキュベーターは CO₂ 濃度が 5% に保たれているが、保温箱内は CO₂ 濃度が制御されていないため外気と同じ 0.04 % であると考えられる。そのため測定時に CO₂ インキュベーターから保温箱内に移動することで、周囲環境中の CO₂ 濃度が減少し、時間経過と共に培地内の CO₂ は抜けていく [22]。培地に溶解した CO₂ は $2\text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ となり培地から抜けることで培地溶液中の H⁺ 濃度が減少し、pH が塩基性に偏っていく事が考えられた。しかし HEPES 培地と CO₂ 非依存培地の pH は DMEM と比べて緩やかに上昇したものの、急激な上昇は抑えられていた。CO₂ 非依存培地は大気中の CO₂ 濃度に依存しない培地であるため、pH 変化が軽減されたと考えられる。HEPES 培地の pH の変化量、上昇量は CO₂ 非依存培地とほぼ同様であったため HEPES 緩衝液による緩衝能で大気中の CO₂ 濃度の変化を軽減できたと考えられる。

また、測定時の温度によっても培地の pH が変化することが分かっている [23]。培地にかかわらず溶液は温度が低下すると pH が上昇する。また、保温箱内は、37°C に設定されているが、温度を制御するセンサーを培地内に入れられないため、実際の培地中の温度は 32°C 程度になっている。そのため培養中の CO₂ インキュベーターと保温箱で培地の温度環境も異なっている。温度低下により、CO₂ 濃度変化にかかわらず、すべての培地で pH が上昇したと考えられる。

MEA を用いてニワトリ胚由来心筋細胞の ISI, FPD の変化を測定したところ、測定開始直後にすべての培地で変動がみられたが、30 分経過時点では安定した。この変動は CO₂ インキュベーターから保温箱に移したことによる大気中の CO₂ 濃度変化によるものと考えられる。30 分経過後、DMEM の ISI と FPD は時間経過によりともに上昇し、ISI に関しては揺らぎが大きくなった。しかし、HEPES 培地と CO₂ 非依存培地では測定開始から 30~150 分まで ISI, FPD ともにほぼ変動はなく、安定して拍動していた。このことから HEPES 培地と CO₂ 非依存培地の温度変化によるものと思われる pH 変化は拍動に影響を与えないことが示唆された。また、pH の急速な変化が与える心筋細胞の拍動への影響が大きいことも示唆された。

MEA システムを用いた心毒性検査では薬剤の毒性が ISI と FPD にどのような影響を及ぼすかを観察する。そのため ISI と FPD は静置条件で安定していることが必要である。HEPES 培地は細胞に若干の毒性があると言われている[24]が、本実験の 150 分間の測定では影響はなかったため問題ないと判断した。結論として HEPES 培地が心毒性検査の測定培地として最適であると考えた。

5.2 ニコチンによる心筋細胞への影響

ニコチンは筋小胞体 Ca^{2+} ポンプと K^+ チャネルの一種である hERG チャネルに直接作用する可能性が報告されている[19]。MEA システムを用いて Na^+ , Ca^{2+} , K^+ の流入、流出から形成される細胞外電位を測定した結果、600 μM と 6.0 mM の濃度で ISI の短縮と FPD の延長がみられた。 Ca^{2+} 感受性の蛍光色素を用いて Ca^{2+} トランジェントの挙動を調べた実験やパッチクランプを用いた実験などの別の手法を用いて行われた研究では、ニコチンは筋小胞体 Ca^{2+} ポンプに対しては Ca^{2+} の取り込み量の上昇、取り込み速度の促進、hERG チャネルに対しては K^+ 透過を阻害するとされている[19]。そのためニコチンを作用させ、筋小胞体の Ca^{2+} ポンプの Ca^{2+} 取り込み速度が上昇した場合、 Ca^{2+} トランジェントが加速することにより ISI が短縮することが考えられる。同時にみられた hERG チャネルが阻害され K^+ の流出量、流出速度が減少した場合、細胞外電位波形の K^+ ピークの発生が遅くなり FPD が延長すると考えられる。また、 K^+ ピークの結果より、 K^+ の流出量が減少したことからも hERG チャネルの阻害の可能性が高いことが示唆された。これらの結果は Ca^{2+} トランジェントの挙動を調べた実験やパッチクランプを用いた実験の筋小胞体 Ca^{2+} ポンプと hERG チャネルへの作用とも一致しているため、本実験により筋小胞体 Ca^{2+} ポンプと hERG チャネルに作用している可能性がより高いことが示唆された。

4 回のニコチン添加後に洗浄を行った結果、ISI は元の値に戻らないことが多く、可逆性がみられなかった。ISI への作用は筋小胞体 Ca^{2+} ポンプへの作用と考えられるため、この結果から筋小胞体 Ca^{2+} ポンプへの作用は不可逆的であることが示された。また、FPD は洗浄後に元の値に戻ったため、可逆的であることが示唆された。FPD への影響は 4.2.4 の K^+ の流出量が減少した結果からも hERG チャネルの阻害と考えられるため、ニコチンの hERG チャネルへの作用は可逆的であることが示唆された。

また、Dose3 のニコチン添加後の FPD が延長した結果から、不整脈を引き起こす可能性が示唆された。不整脈は FPD の延長だけでなく、拍動一拍の FPD の時間的不均一性の有無にも起因する。この時間的不均一性の指標として STV を算出したところ、FPD 延長に相関して上昇していた。また Dose4 での STV

は不整脈を起こす危険性を示す 1.9 の値[21]を超えていたため、直接作用させた場合でも不整脈を引き起こす可能性があることが示された。しかし Dose4 の 6.0 mM の濃度はあまりに高すぎるため、生体レベルでは別の要因で死に至る[25]と考えられる。しかし、Dose1,2 の濃度では ISI,FPD に大きな変化を引き起こさなかったことから、喫煙時の最高血中濃度は約 0.25 μM である[26]ため喫煙によるニコチン摂取で不整脈を起こす可能性は低いと思われる。

また、ニコチンの hERG チャンネルに対する阻害作用を引き起こす濃度は 5.0 μM であると示唆されている[27]。本実験で Dose1 の濃度は 6.0 μM であるが、FPD の延長は表れず、 K^+ のピークも減少しなかった。これは筋小胞体 Ca^{2+} ポンプへの作用が干渉し合った可能性がある。筋小胞体 Ca^{2+} ポンプの Ca^{2+} 取り込み量、速度が上昇することで細胞外電位波形上の Ca^{2+} による FPD が短縮することが考えられる。hERG チャンネルの FPD 延長作用と筋小胞体 Ca^{2+} ポンプの Ca^{2+} 取り込み量、速度の上昇による FPD の短縮作用が同時に作用した結果、互いの作用を打ち消し合い、それらの作用が表面化しなかったと考えられる。ニコチンの濃度が高くなると hERG チャンネルの阻害作用が優勢になり、FPD の延長が表れたと推察した。

Dose4 では添加後 1~3 分後に拍動が停止した。Dose4 は過剰な濃度での添加になり筋小胞体 Ca^{2+} ポンプや hERG チャンネルだけでなく、他のチャンネルやポンプまで阻害を受けるマルチチャンネルブロックが生じたと考えられた。

本実験でニコチンが心筋細胞に直接作用することが示唆されたが、神経を介した作用が存在していることも知られている。そのため心筋細胞と神経細胞に対し、同時に薬剤を作用させられる系を確立することは、ニコチンの作用についてさらに幅広く検査することが可能であり、様々な毒性検査を行う上で有意義な手法になることが期待される。

6. 結論

本実験により、MEA システムにおいて測定溶液の pH の変動は心筋細胞の拍動に影響を与える可能性があるため pH 変動が小さい測定培地を選定することが望ましく、現状では MEA システムを用いる実験では、HEPES 培地を用いることが推奨される。さらに、ニコチンは心筋細胞の筋小胞体 Ca^{2+} ポンプや K^{+} チャンネルなどに直接作用する可能性が高いが、喫煙などによる摂取では心臓への直接的な影響は小さいことが示唆された。

7. 謝辞

本研究は法政大学生命科学部生命機能学科再構成細胞学研究室において行いました。本研究を遂行するにあたって、丁寧に指導してくださいました金子智行教授に心から感謝し、厚く御礼を申し上げます。また本研究で用いた MEA システムを提供して下さった東京医科歯科大学生体材料工学研究所 安田賢二教授、野村典正准教授に厚く御礼申し上げます。そして議論を交わし、研究を進める上で多大な協力を頂いた再構成細胞学研究室の皆様に深く感謝致します。最後に大学生活に関わったすべての人に心から感謝し、御礼申し上げます。

8. 参考文献

- [1] Lengyel C, Varro' A, Ta'bori K, Papp JG, Baczkó I: "Combined pharmacological block of IKr and IKs increases short-term QT interval variability and provokes torsades de pointes." *British Journal of Pharmacology*, **151**, 941- 951 (2007).
- [2] Lawrence CL, Pollard CE, Hammond TG, Valentin JP: "Nonclinical proarrhythmia models: predicting Torsades de Pointes." *J Pharmacol Toxicol Methods* **52**, 46-59 (2005).
- [3] Polak S, Wis'niowska B, Brandys J: "Collation, assessment and Analysis of literature in vitro data on hERG receptor blocking potency for subsequent modeling of drugs' cardiotoxic properties." *J Appl Toxicol* **29**, 183-206 (2009).
- [4] Suessbrich H, Waldegger S, Lang F, Busch AE: "Blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole." *FEBS Lett* **385**, 77-80 (1996).
- [5] Moric-Janiszewska E, Głogowska-Ligus J, Paul-Samojedny M, Smolik S, Woźniak M, Markiewicz-Łoskot G, Mazurek U, Węglarz L, Szydłowski L: "Expression of genes KCNQ1 and HERG encoding potassium ion channels Ikr, Iks in long QT syndrome." *Kardiol Pol* **69** (5), 423-429 (2011).
- [6] El Harchi A, Melgari D, Zhang YH, Zhang H, Hancox JC "Action Potential Clamp and Pharmacology of the Variant 1 Short QT Syndrome T618I hERG K⁺ Channel." *PLoS ONE* **7** (12), e52451 (2012).
- [7] Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A, Shah R: "The potential for QT prolongation and proarrhythmia by nonantiarrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a policy conference of the European Society of Cardiology." *Eur Heart J* **21**, 1216-1231 (2000).
- [8] Di Diego JM, Belardinelli L, Antzelevitch C: "Cisapride-induced transmural dispersion of repolarization and torsade de pointes in the canine left ventricular wedge preparation during epicardial stimulation." *Circulation* **108**, 1027-1033 (2000).
- [9] Reppel M, Pillekamp F, Lu ZJ, Halbach M, Brockmeier K, Fleischmann BK, Hescheler J: "Microelectrode arrays: a new tool to measure embryonic heart activity." *J Electrocardiol* **37**, Suppl 104-109 (2004).

- [10] Tanaka T, Tohyama S, Murata M, Nomura F, Kaneko T, Chen H, Hattori F, Egashira T, Seki T, Ohno Y, Koshimizu U, Yuasa S, Ogawa S, Yamanaka S, Yasuda K, Fukuda K: "In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes." *Biochemical and Biophysical Reserch Communication* **385**, 497-502 (2009)
- [11] Lakier JB: "Smoking and cardiovascular disease." *Am J Med.* **93**, 8S-12S (1992)
- [12] Jarvik ME: "Beneficial effects of nicotine." *Br J Addict* **86**, 571-575 (1991).
- [13] Benowitz NL, Gourlay SG: "Cardiovascular toxicity of nicotine: imoplication for nicotine replacement therapy." *J Am Cell Cardiol* **29**, 1422-1431 (1997)
- [14] Herine D, Jolma MD, Ricardo A, Samson MD, Scott E, Klewer MD, Richard L, Donnerstein MD, Stanley J, Goldberg MD: "Acute cardiac effects of nicotine in healthy young adults." *Echocardiography* **19**, 443-448 (2012).
- [15] Asahi M, Nakayama H, Tada M, Otsu K: "Regulation of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} adenosine triphosphatase by phospholamban and sarcolipin: implication for cardiac hypertrophy and failure." *Trends Cardiovasc Med* **13**, 152-157 (2003).
- [16] Wang H, Shi H, Zhang L, Pourrier M, Yang B, Nattel S, Wang Z: "Nicotine is a potent blocker of the cardiac A-type K^+ channels : Effect on Cloned Kv4.3 channels and native transient outward current" *Circulation* **102**, 1165-1171 (2000).
- [17] Tang G, Hanna TS, Wang R: "Effects of nicotine on K^+ channel currents in vascular smooth muscle cells from rat tail arteries." *Eur J Pharmacol* **364**, 247-254 (1990)
- [18] Wang H, Yang B, Zhang L, Xu D, Wang Z: "Direct block of inward rectifier potassium Channels by nicotine." *Toxicology and Applied Pharmacology* **164**, 97-101 (2000).
- [19] Wang H, Shi H, Wang Z: "Nicotine depresses the function of multiole cardiac potassium channels." *Life Sciences* **65**, (12) PL 143-149, (1999).

- [20] Fukada A, Saito H, Urakami Y, Okuda M, Inui K: "Involvement of specific transport system of renal basolateral membranes in distribution of nicotine in rats." *Drug Metab Pharmacokinet* **17**, 554-560 (2002).
- [21] Kaneko T, Nomura F, Hamada T, Abe Y, Takamori H, Sakakura T, Takasuna K, Sanbuissho A, Hyllner J, Sartipy P, Yasuda K: "On-chip in vitro cell-network pre-clinical cardiac toxicity using spatiotemporal human cardiomyocytes measurement on a chip" *Sci Rep* **4**, 4670 (2014).
- [22] Marzzacco CJ: "Demonstrating the effect of CO₂ on the pH of water – The bad breath indicator." *CHEM 13 NEWS* **4** (2006).
- [23] Galster H: "pH Measurement: Fundamentals, Methods, Applications, Instrumentation." *VCH Publishers Inc* p21 (1991).
- [24] Zigler JS Jr, Lepe-Zuniga JL, Vistica B, Gery I: "Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium." *In Vitro* **21**, 282-287 (1985).
- [25] Mayer B: "How much nicotine kills a human? Tracing back the generally accepted lethal dose to dubious self-experiments in the nineteenth." *Arch Toxicol* **88**, 5-7 (2014).
- [26] 井谷 舜郎: "低ニコチンシガレットへの移行期にみられた喫煙者におけるニコチン導体の変動について" 喫煙科学研究財団 **2**, (2007).
- [27] Wang H, Shi H, Liao S, Wang Z: "Inactivation gating determines nicotine blockade of human HERG channels." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* Published **277**, (3), H1081-H1088 (1990).