

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位イメージングの測定装置と 実験プロトコルの開発

井出吉紀*, 山崎大樹, 諫田泰成, 関野祐子#

Development of imaging apparatus and experimental protocol for evaluating action potential of human iPSC-derived cardiomyocytes

Yoshinori Ide*, Daiju Yamazaki, Yasunari Kanda, Yuko Sekino#

Human-iPS derived cardiomyocytes (hiPS-CMs) are widely expected to be used in nonclinical studies. We have standardized a testing method using hiPS-CMs and field potential (FP) recording with a multi-electrode array (MEA) system. We have successfully demonstrated its reproducibility and robustness by applying a multi-site prevalidation study using E-4031 which specifically blocks the human ether-a-go-go-related gene (hERG) channel. We organized a multi-disciplinary consortium, Japan iPS Cardiac Safety Assessment (JiCSA), to evaluate the usage of hiPS-CMs for predicting the proarrhythmic risks using 60 compounds. JiCSA has achieved significant scientific progress for using hiPS-CMs in safety pharmacology. In the US, a Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) paradigm has been proposed to improve cardiac safety for regulatory approval. It aims to replace the preclinical hERG assay and the clinical tQT study required in the ICH S7B and E14 guidelines with more translationally relevant assessments of proarrhythmic risk. JiCSA is now collaborating with the CiPA myocyte team for an international validation study, and collecting MEA data using blinded compounds.

An additional approach using voltage sensitive dye (VSD)-imaging of membrane potential changes has been chosen for the international validation. Hence, we have customized a VSD-imaging protocol for the cumulative application of drugs in which stable responses over 90min should be observed. First, we developed equipment for a simultaneously recording FP and VSD-imaging. We then selected a fluorescent VSD, Di-8-ANEPPS, to stain hiPC-CMs sheets because it is the least toxic among the dyes that we tested. When we started VSD-imaging experiments, we observed slight changes in FPD and the inter-spike interval of the MEA recordings. We found that the changes came from an increase in the temperature of the culture medium. To avoid the temperature increase, we determined the intensity and duration of the illumination (530nm) needed to excite the VSD and inserted a copper plate with a 5-mm diameter hole between a recording probe and a heating plate. In addition, we made a cap for the recording probe with a ribbon heater to prevent evaporation of the culture medium in the MEA probe during the assay. Our recording condition for the VSD-imaging and the improvement of the equipment itself would be very useful in performing long-term VSD-imaging for cumulative applications of drugs. We will evaluate the drug effects using the simultaneous recording system of VSD-imaging and FP recordings.

Keywords: voltage-sensitive dye imaging, human iPS cells, cardiac safety assessment, proarrhythmia, multi-electrode array system

To whom correspondence should be addressed:

Yuko Sekino; Division of Pharmacology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext.340; Fax: +81-3-3700-1452; E-mail: yukos@nihs.go.jp

* Pharmacological Evaluation Institute of Japan

1. はじめに

ヒト iPS 技術開発により、今まで入手が困難だったヒト心筋細胞を用いた in vitro 試験法の開発が期待されており、特に医薬品候補物質の安全性薬理試験への応用に対する関心が急速に高まっている。我々はこれまで、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (ヒト iPS 心筋細胞) を使って医薬品の催不整脈性リスク評価に関する新たな安全性薬

理試験法を開発してきた。さらに、多施設間バリデーション試験により実験データの再現性と実験方法の頑健性を検証している。2014年には産官学の専門家を集めてコンソーシアムJiCSA (Japan iPS Cardiac Safety Assessment) を結成して、多点電極アレイ (Multi-Electrode Array : MEA) システムを用いてヒトiPS心筋細胞シートの細胞外電位 (Field potential : FP) に関する実験プロトコルを整備した。心筋シートはMEAプローブに細胞を高密度に播種することにより形成させ、薬剤は国内における他の検証試験と同様に累積的に投与し、エンドポイントとしてFP持続時間 (FP duration : FPD) およびEAD発生率を設定した¹⁻⁵⁾。この共通プロトコルを基に、催不整脈性リスクの異なる60化合物を用いた大規模バリデーション実験を実施し、現在、致死性不整脈Torsade de Pointesの予測性などを解析中である (論文投稿中)。

米国ではFDAを中心とする国際コンソーシアムCiPA (Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay) が結成され、JiCSAと同様に再分極遅延のみに着目した現行の安全性薬理試験法を改良し、新たな催不整脈性リスク評価を目指すパラダイムを提案した⁶⁾。CiPAのMyocyteサブチームではMEAに加えて、膜電位感受性色素 (Voltage-sensitive dye : VSD) を用いたイメージング技術を採用し、MEA、VSDイメージングともに単回投与のプロトコルで評価している⁷⁾。VSDイメージングは、活動電位 (Action potential : AP) 波形が直接得られることから⁸⁻¹²⁾、催不整脈性リスク評価法として期待される。

我々はMEAを用いた新規試験法の構築を目指して、CiPAのMyocyteサブチームと国際共同研究を開始し、実験プロトコルならびに複数の化合物による予備データを共有した³⁾。一方で、VSDイメージングについては、陽性対照化合物であるhERG阻害剤E-4301を用いたVSDイメージングによる評価を報告したが²⁾、CiPAと同じ単回投与での評価であり、MEAの際にJiCSAで採用した累積投与ではない。したがって、JiCSAで取得したMEAデータと厳密に比較することができないため、多施設間バリデーション試験を行うためにはMEAと同様にVSDの累積投与の実験プロトコルを整備し、複数の薬剤を評価する必要がある。しかしながら、長時間記録可能なVSDプロトコルはいまだ確立されておらず、MEAデータと比較検討するために早急にシステムを構築する必要がある。

そこで今回我々は、ヒトiPS心筋細胞を用いてMEAとVSDイメージングでの長時間安定な累積投与プロトコルを整備するために、その検証方法としてFP波形とVSDイメージングの完全なる同時記録が可能なシス

テムを構築した。今後、今回構築した同時記録システムを用いて多くの薬剤を評価する予定である。

2. 研究方法

ヒトiPS心筋細胞

ヒトiPS心筋細胞は、Cellular Dynamics International (CDI) 社のiCell cardiomyocyte (iCell, ロット番号 : #1094831) を用いた。CDI社プロトコルおよび過去の報告に基づいて解凍・播種作業を行った^{1,2,4)}。凍結バイアルを液体窒素容器から取り出した直後に37°Cの温浴で4分間解凍し、クリーンベンチ内で解凍用培地 (CDI社) をゆっくりと加えて6mlとした。血球計算盤を用いて生細胞数をカウントし、0.1%ゼラチンを37°Cで1時間以上コートした6wellプレート合計2wellに3mlずつ加えて、培養を開始した (実験0日とする)。1日おきに維持培地 (CDI社) にて半量交換し培養した。約1週間後、0.25%トリプシン/EDTAを用いて細胞を剥離し、細胞数をカウントした後に 3.0×10^4 細胞/2 μ lとなるように調製した。MEAプローブ (アルファメッドサイエンティフィック社 ; P515A) の電極部分を2 μ lのフィブロンectin (50 μ g/ml) にて37°Cで1時間以上コートした後、細胞懸濁液2 μ lを播種し、4時間後に1mlの維持培地を添加した。以後1日おきに維持培地を半量交換し、プローブへの播種5日後から実験に用いた。

多点電極システム

MEAシステムとしてMED64 (アルファメッドサイエンティフィック社) を用いてFPを記録した。High pass filterは0.1Hz, Low pass filterは1kHzを用い、細胞を播種したMEAプローブは温度を36.5-37°Cに維持し、5% CO₂, 95% O₂ガスを通気した。FP波形を記録して、主に拍動間隔を示すInter-spike interval (ISI, 1st peak to 1st peak) および心電図のQT間隔に相当するFP持続時間 (FP duration : FPD, 1st peak to 2nd peak) を解析した。FP波形を20分以上記録し安定を確認した後、MEAシステムの64電極の中からJiCSAが定めた波形基準 (1st positive or negative peak amplitude : $\geq \pm 200 \mu$ V, 2nd peak amplitude : $\geq 20 \mu$ V, ISI : 750-1715 ms, FPD : 340-450ms)²⁾を満たす2電極をイメージング装置へ取り込み、VSDイメージングデータと共に同時記録した。

VSDイメージング

VSDイメージングシステムとして、倒立型マクロ蛍光顕微鏡 (プレインビジョン社, 特注品), 光学測定系として対物/集光レンズLEICA PLAN APO 2X, 500-540nmバンドパスフィルタ (520 x 36nm ; Edmund optics), 560nmダイクロイックミラー (FF560-Di01 ; Semrock), 580nm蛍光用ロングパスフィルタ (O-58 ;

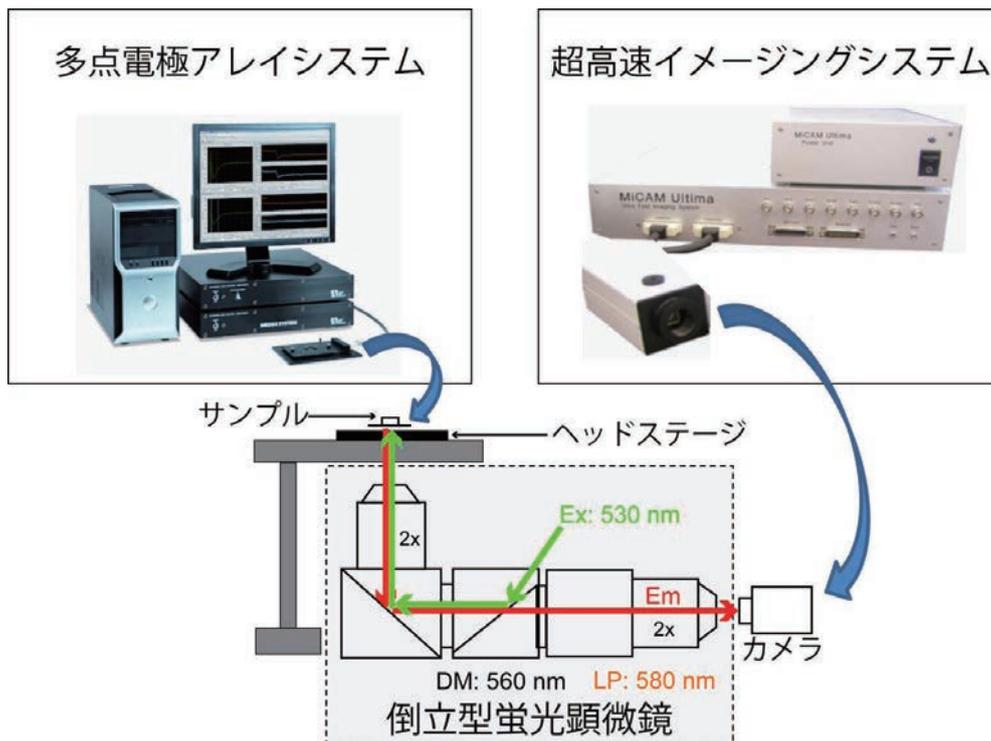


図1 多点電極による細胞外電位記録と膜電位イメージングの同時記録システムの概略図

多点電極アレイプローブ上の心筋細胞シートを多点電極アレイシステム (MED64 システム, 左上図) および超高速イメージングシステム (ULTIMA システム, 右上図) による同時記録を可能にするための倒立型蛍光顕微鏡を中心としたシステム (下図) の概略図を示す。励起波長: 530 nm, 蛍光波長: >580 nm.

Edmund optics) を用いた。画像の取得には超高速 CMOS イメージングシステム MiCAM ULTIMA (プレインビジョン社) を用いた。励起光源としてプレインビジョン社製緑色 LED 光源 LEX2-G (中心波長 530 nm, 100% 出力時輝度 150 mW/cm^2) を用いた。ヒト iPS 心筋細胞シートはフェノールレッドを含まない DMEM 培地にて希釈した $10 \mu\text{M}$ Di-8-ANEPPS (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて、30 分間染色した。染色中はプローブを 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ に静置した。その後、色素を維持培地にて洗浄して、60 分間 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ に静置した後に測定を行った。カメラの撮像条件を 1 ms/frame , $8,192 \text{ frames}$ に設定した。また、同期信号を同時記録に用いた FP 波形の 1st peak に設定し、その 410 frames 前より記録が開始されるよう設定した。取得した画像データは BV_Analyzer (プレインビジョン社, Version 15.08.20) を用いて解析した。各時間の蛍光強度を F とし、記録開始時の拍動収縮前における蛍光強度 F_0 を基準にして、ピクセル毎に $(F-F_0)/F_0$ の値が計算された。色素の蛍光強度は細胞の膜電位変化に比例して変化するため、 $\Delta F/F_0 = (F-F_0)/F_0$ を蛍光変化量と定義すると、結果的に活動電位と同じ形をした波形が得られ

る。得られた画像データは、 $3 \times 3 \text{ pixels}$ の空間フィルタおよび移動平均により処理を行った。画像データの観測領域 (Region of interest: ROI) は 64 電極の位置・サイズと等しい $35 \times 35 \text{ pixels}$ の範囲を選択し、ROI 内の全 pixel における AP 波形の平均値を表示した。

3. 研究結果・考察

本研究において、我々はヒト iPS 心筋細胞の電位変化を記録する MEA と VSD イメージングの 2 つの方法について完全なる同時記録が可能なシステムの構築を行った。図 1 は、倒立型マクロ蛍光顕微鏡を中心に FP 記録装置 (MED64) による MEA システムと光学測定装置 (ULTIMA) による VSD イメージングシステムを組み合わせた FP と AP の同時記録システムである。

図 2A に、MEA プローブ上のヒト iPS 心筋細胞シートと典型的な FP 波形を示した。FP 波形において、ISI と FPD は、ヒト iPS 心筋細胞の電気生理学的性質を評価する上で極めて重要なパラメーターである。一方 VSD イメージングによる膜電位測定は、パッチクランプなどの熟練した技術が必要な電気生理学的実験を行わずに AP を記録することができ、また画像解析によって AP の発

生部位を可視化して興奮伝播も解析できるため、非常に多くの情報が得られる利点がある。MEAシステムを用いた多施設間バリデーション試験では累積投与のプロトコルを使用しているため、我々は累積投与が可能なFPとAPの同時記録を試みた。まず予備検討により、VSDイメージング中に拍動数の変化が観察された(図示せず)。イメージング技術を用いて測定する際、細

胞に取り込まれた蛍光プローブからの微弱な蛍光量変化を観測するために測定中に励起光を照射する必要がある。そこで、ISI及びFPDに対する照射する励起光の影響を調べた結果、励起光パワー強度を25%から100%まで変化させるとISIおよびFPDの変動が増大し、励起光によりISIおよびFPDが短縮することが分かった(図2B)。またMEAプローブ内の温度に対する励起光パワー強度の影響を検討した。その結果、励起光照射直後わずか1-2秒でMEAプローブ内温度が急激に上昇し、その温度変化はパワー強度に依存すること、照射時間にもよるが出力が100%時にはプローブ内温度が最大で1.0°Cも上昇することが明らかとなった(図2C)。過去の知見および我々のMEAシステムによる記録の経験から、ヒトiPS心筋細胞は温度変化に対して非常に敏感であり、わずか0.1°Cの温度変化でISIやFPD等のFPパラメーターに大きな影響を及ぼすことが知られている。このことから励起光照射によってプローブ内温度が上昇したことにより、

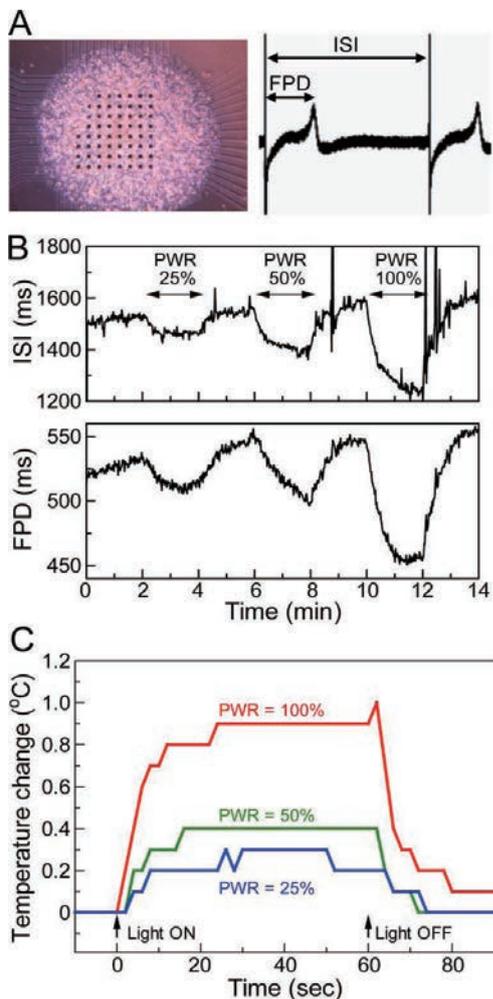


図2 励起光照射によるFPパラメーターの変化とプローブ内温度上昇

(A) 64電極のMEAプローブ上に播種した典型的な心筋細胞シート(左パネル)と1電極で記録された典型的なFP波形(右パネル)を示す。パラメーター：ISIはFP波形の1st peakと1st peakの時間間隔であり、FPDはFP波形の1st peakと2nd peakの時間間隔である。
(B) 励起光パワーを25%-100%まで段階的に変化させた時のISIおよびFPDの経時変化を示す。励起光強度に依存した変化が観察された。
(C) 励起光パワーに依存したプローブ内温度の経時変化を示す。励起光の強度に依存した温度の変化が観察された。

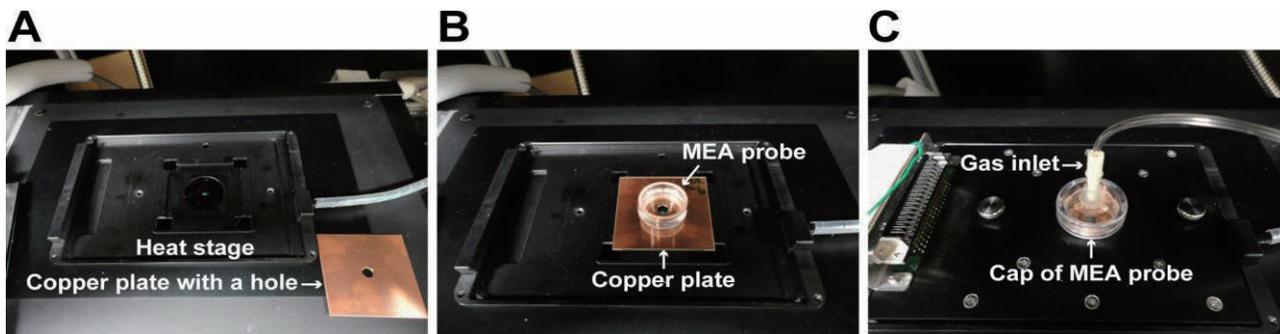


図3 励起光照射による温度変化を低減させるための放熱用銅板の導入

(A) ヒートステージと作製した直径5mmの穴を持つ放熱用銅板を示す。
(B) プローブとヒートステージの間に銅板を設置した。
(C) プローブに混合ガス導入口を持つ蓋を設置した。

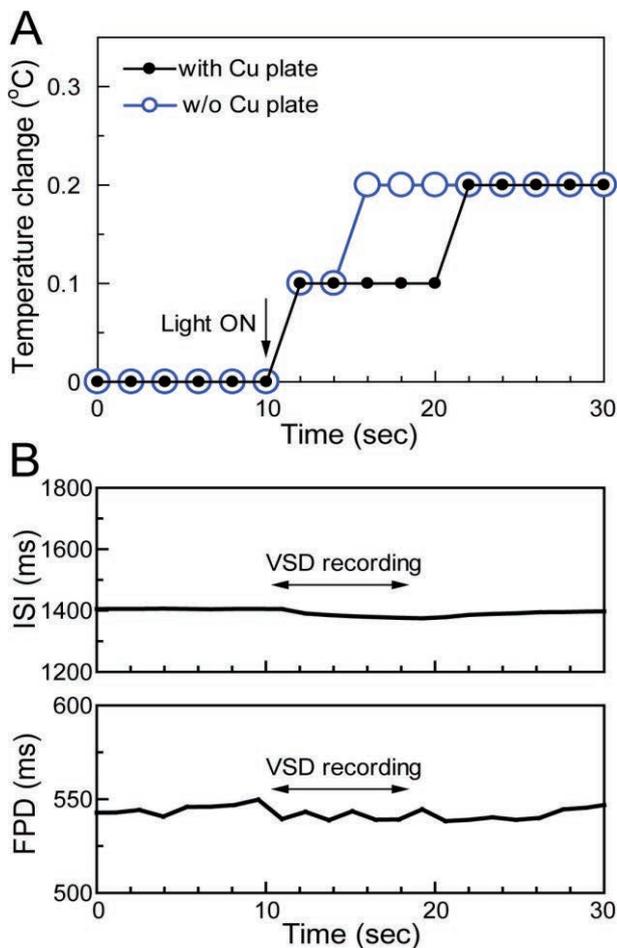


図4 銅板による放熱効果と励起光照射時における拍動安定性

(A) 5mm 径の穴を持つ銅板によりプローブ内温度上昇が抑制された。銅板を使用しない場合には、6秒後にプローブ内温度は0.2°C上昇した。銅板を入れた場合、励起光照射後10秒間の温度上昇は0.1°Cに抑えられた(励起光パワー25%時)。

(B) 銅板を使用し、励起光パワー20%で約8秒間光学測定した場合のISIとFPDの変動を示す。ISI、FPDとも励起光照射中に大きな変動は見られなかった。

ヒトiPS心筋細胞におけるISIおよびFPDが短縮したと考えられた。図2Bおよび2Cの結果を考慮すると、VSDイメージングによる安定な記録のためには励起光強度を下げるのが有効と考えられるが、励起光出力を下げすぎるとノイズが多くなり、正確に測定できない可能性がある。実際、出力を25%まで低下させても、依然としてISIで約100ms、FPDで約30msの短縮が生じたことから、熱の影響を除去する必要があると考えられた。

次に、励起光照射による温度上昇をさらに抑えるため、放熱用の銅板に励起光透過用の穴を設けて、ヒートステージとMEAプローブの間に設置した(図3)。穴の径

を4mmから10mmまで変えてプローブ内の温度を測定した結果、5mm径の放熱効果が最も高かったことから(図示せず)、以後穴の径が5mmの銅板を用いた。MEAシステムのヒートステージ上に放熱銅版を置き(図3A)、その上にMEA用プローブを設置した(図3B)。さらに、薬剤投与時に蓋の開閉操作がしやすいよう、混合ガス導入口も兼ね備えた蓋を作製した(図3C)。これを用いて励起光によるプローブ内の温度上昇に対する放熱板の効果を検討したところ、励起光パワー25%照射直後のプローブ内の温度上昇は10秒間で0.1°Cに抑えることが可能となった(図4A)。実際にMEAプローブ上に細胞を播種し、FP波形測定中に励起光を照射したところ、パワー出力を20%に抑えると、約8秒間の光学測定においてISIおよびFPDの変動をほぼ無視できることが示唆された(図4B)。一方で、今回作製した銅板は、MEAプローブ内の温度を均一化する効果が副次的に得られた。ヒートステージ底面には直径約3cmの穴が開いており、プローブの周辺部が加熱される構造となっている。そのため細胞および電極が位置するプローブの中心部分へは熱が伝わりにくく、細胞の内周部(中心から1mm)と外周部(中心から2mm)の温度差は0.1°C程度あった。今回、穴の径が5mmの銅板により、プローブ周辺部と中心部の温度差を解消した(図示せず)。以上の結果より、同時記録システムの標準プロトコルとして励起光パワー強度20%、VSDイメージング計測時間約8秒の測定条件を確定した。

薬剤の累積投与実験のための同時記録プロトコル

MEAシステムの累積投与プロトコルでは測定開始から投与終了まで約90分間かかるため、ISIとFPDの2パラメーターを長時間安定して記録する必要がある。図5B(黒線)に示すように、通常のMEAシステムではISIおよびFPDが徐々に延長して安定化はほとんど認められなかった(図5B, 黒線)。その際、測定終了後に蓋およびプローブ内壁に水滴が付着していたことから、培地中の水分蒸発がISIおよびFPD延長の原因であることが予想された。そこで、MEAプローブ用に作製した蓋(図3C)にリボンヒーターを装着し約45°Cに加温した(図5A)。その結果、リボンヒーターにより、プローブおよび蓋の内壁に水滴が付着しなくなり、培地の蒸発も低減され、ISIおよびFPDが長時間に渡り安定化することが明らかになった(図5B, 赤線)。リボンヒーターを装着して加温してもISIおよびFPDには特に影響を与えなかったことから、プローブ内の培地温度は一定であると推定された。

MEAとVSDイメージングの同時記録システム

図6Aに同時記録システムによるヒトiPS心筋細胞のAP波形の1例を示した。波形は、MEA用プローブ内の

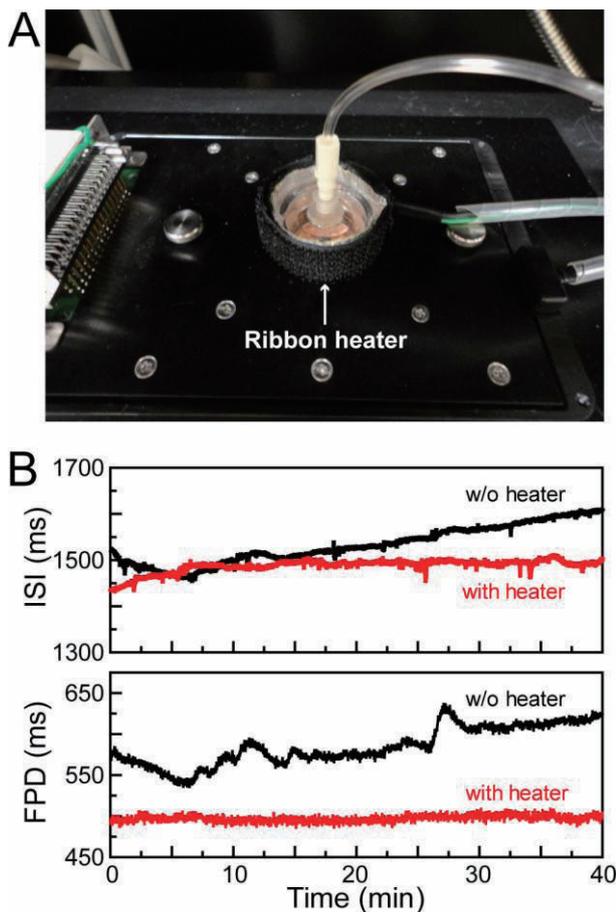


図5 長時間安定したFP記録を実現するためのプローブ蓋用リボンヒーター

(A) プローブ用の蓋の周囲にリボンヒーターを装着し、設定温度を45°Cとした。蓋とプローブ側壁に付着する水蒸気が減少した。

(B) リボンヒーターがない場合にはISIおよびFPDが徐々に延長した(w/o heater: 黒線)。リボンヒーターを装着するとISIおよびFPDが安定したことを示す(with heater: 赤線)

電極位置・サイズと等しい35 x 35 pixelsの領域(図6B赤枠)内におけるAP波形を平均化したものである。図6Bは、ヒトiPS心筋細胞シート内において、APが立ち上がり(時間領域①: 0-10ms)とプラトー/立ち下がり(時間領域②: 100-630ms)時に伝播する様子を擬似カラーで示した。ヒトiPS心筋細胞シート内のペースメーカー細胞から活動電位が生じ、10ms程度で直径約2mmのヒトiPS心筋細胞シートに伝播し、数百ミリ秒程持続することが分かった。図6Cには構築した同時記録システムによるAP波形(上段)とFP波形(下段)を示した。各拍動においてAP波形の立ち上がりと立ち下がり、それぞれFP波形の1st peakおよび2nd peakと同

期していることが示唆された。また今回のVSDイメージングデータからヒトiPS心筋細胞の興奮伝播速度は約20cm/sであった。ヒト心室筋細胞の伝播速度は50cm/sと報告されており、ヒトiPS心筋細胞はヒト心室筋細胞よりも伝播速度が少し遅いと考えられるが¹³⁾、今後、その違いが薬剤応答にどのように影響するのか検討する必要がある。

VSDは今回用いたDi-8-ANEPPS以外にもFluoVoltやRH237、Di-4-ANEPPSなど様々な色素が知られており、神経細胞や心筋細胞、単離心臓など様々な組織・細胞の膜電位測定に広く使われている^{2,10,14-18)}。我々は国内外で一般的に使用される複数のVSDについて染色条件を検討し、毒性が最も弱かったDi-8-ANEPPS^{19,20)}を選択した。今後、実験プロトコルのさらなる整備に向けて、蛍光色素の細胞毒性や色素と薬剤の相互作用についても検討しなければならない^{21,22)}。特にOxonol系色素であるDiBAC4(3)は化合物と相互作用することが報告されており^{23,24)}、ANEPPS系色素についても検証する必要があると考えられる。

4. 結論

本研究において、我々は、ヒトiPS心筋細胞を用いてVSDイメージングでの長時間安定な累積投与プロトコルを整備するために、その検証方法としてFP波形とVSDイメージングの完全なる同時記録が可能なシステムを倒立型マクロ蛍光顕微鏡を中心に構築した。システムを構築する上で、励起光照射によるプローブ内温度の急激な上昇に伴い、VSD測定時に心拍数が上昇し、ISIおよびFPDが大幅に短縮することが明らかとなった。また、5mm径の穴を持つ銅板を作製し、プローブとヒートステージ間に設置することで、励起光照射時のプローブ内温度の上昇を銅板の放熱効果によって低減させた。最終的には励起光パワー20%、計測時間約8秒をVSDイメージングの標準プロトコルとした。さらに、MEAプローブ用の蓋を独自に作製し、リボンヒーターを装着し約45°Cに加温することで、培地蒸発を低減した。その結果、長時間測定で見られていたISIおよびFPDの変動を抑えることができ、2時間以上の長時間にわたるVSDイメージングが可能となった。

今後、本システムを医薬品による催不整脈リスクの予測評価等に活用するためには、FPとAPの各種パラメーター間の相関性や薬剤応答性のデータを蓄積し、多施設間バリデーション用にプロトコルを整備する必要がある。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金「ヒトiPS分化

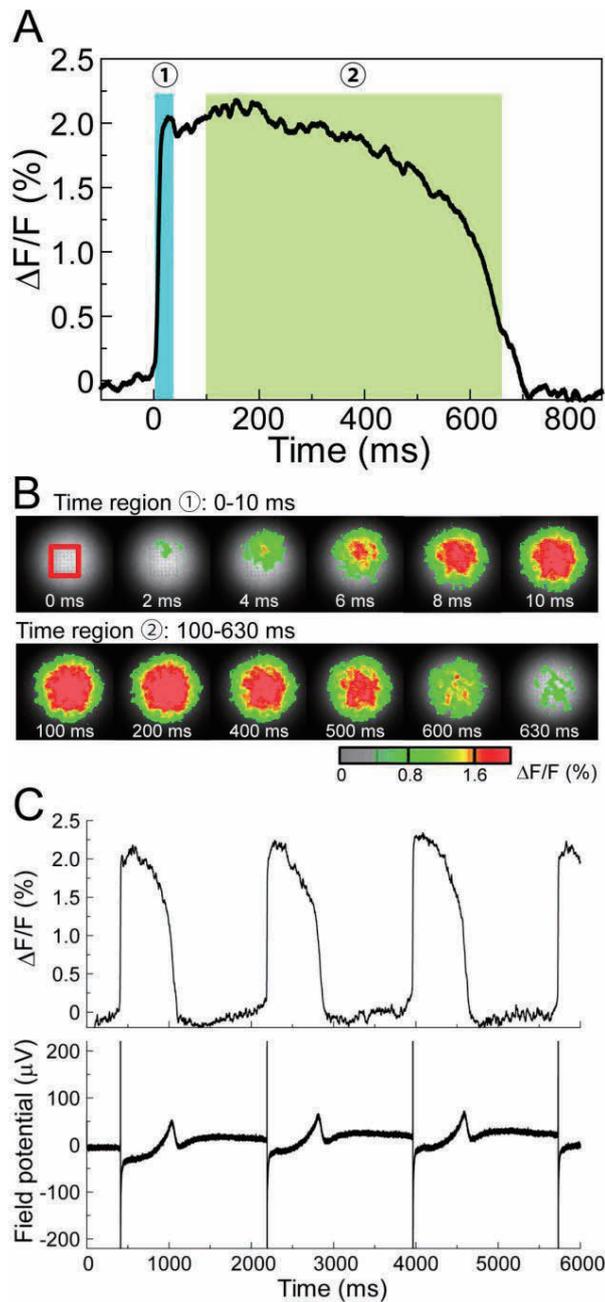


図6 VSD イメージングによる膜電位波形とその伝播の空間パターンおよび MEA との同時記録

(A) VSD イメージングにより記録された 1 拍分の活動電位 (Action potential: AP) 波形を示す。図 B (0ms のイメージ上) の赤枠内の領域における波形の平均である。

(B) 心筋細胞シート内における活動電位伝播の様子を示す。図 A の時間領域① (0ms-10ms) における活動電位伝播 (上) と時間領域② (100ms-630ms) における活動電位伝播 (下)。脱分極部位は緑～赤の擬似カラーで示す。

(C) プローブ内に播種した心筋シートの VSD による AP 波形 (上) と MEA による FP 波形 (下) の同時記録を示す。64 Ch の中から選択した 2Ch の FP 波形と VSD による AP 波形を同時記録した。

細胞を利用した医薬品のヒト特異的有害反応評価系の開発・標準化」(H24-医薬-指定-030 to YS) および国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 医薬品等規制調和・評価研究事業「ヒト iPS 分化細胞技術を活用

した医薬品の次世代・安全性評価試験系の開発と国際標準化に関する研究」(#15mk0104053h0101 to YS) のサポートにより行った。

引用文献

- 1) Nakamura Y, Matsuo J, Miyamoto N, Ojima A, Ando K, Kanda Y, Sawada K, Sugiyama A, Sekino Y: *J Pharmacol Sci.* 2014;124:494-501.
- 2) Asakura K, Hayashi S, Ojima A, Taniguchi T, Miyamoto N, Nakamori C, Nagasawa C, Kitamura T, Osada T, Honda Y, Kasai C, Ando H, Kanda Y, Sekino Y, Sawada K: *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2015;75:17-26.
- 3) Kanda Y, Yamazaki D, Kurokawa J, Inutsuka T, Sekino Y: *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2016;81:196-200.
- 4) Kitaguchi T, Moriyama Y, Taniguchi T, Ojima A, Ando H, Uda T, Otabe K, Oguchi M, Shimizu S, Saito H, Morita M, Toratani A, Asayama M, Yamamoto W, Matsumoto E, Saji D, Ohnaka H, Tanaka K, Washio I, Miyamoto N: *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2016;78:93-102.
- 5) Nozaki Y, Honda Y, Watanabe H, Saiki S, Koyabu K, Itoh T, Nagasawa C, Nakamori C, Nogawa H, Nakayama C, Iwasaki H, Suzuki S, Washio I, Takahashi E, Miyamoto K, Yamanishi A, Endo H, Shinozaki J, Kunimatsu T: *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;77:75-86.
- 6) Sager PT, Gintant G, Turner JR, Pettit S, Stockbridge N: *Am Heart J.* 2014;167:292-300.
- 7) Colatsky T, Fermini B, Gintant G, Pierson JB, Sager P, Sekino Y, Strauss DG, Stockbridge N: *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2016;81:15-20.
- 8) Lopez-Izquierdo A, Warren M, Riedel M, Cho S, Lai S, Lux RL, Spitzer KW, Benjamin IJ, Tristani-Firouzi M, Jou CJ: *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;307:H1370-7.
- 9) Tian Q, Oberhofer M, Ruppenthal S, Scholz A, Buschmann V, Tsutsui H, Miyawaki A, Zeug A, Lipp P, Kaestner L: *Cell Physiol Biochem.* 2011;27(3-4):281-90.
- 10) Bedut S, Seminatore-Nole C, Lamamy V, Caignard S, Boutin JA, Nosjean O, Stephan JP, Coge F: *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016;311:H44-53.
- 11) Dempsey GT, Chaudhary KW, Atwater N, Nguyen C, Brown BS, McNeish JD, Cohen AE, Kralj JM: *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2016;81:240-50.
- 12) Lee P, Klos M, Bollensdorff C, Hou L, Ewart P, Kamp TJ, Zhang J, Bizy A, Guerrero-Serna G, Kohl P, Jalife J, Herron TJ: *Circ Res.* 2012;110(12):1556-63.
- 13) Noujaim SF, Pandit SV, Berenfeld O, Vikstrom K, Cerrone M, Mironov S, Zugermayr M, Lopatin AN, Jalife J: *J Physiol.* 2007;578:315-26.
- 14) Aseyev N, Roshchin M, Ierusalimsky VN, Balaban PM, Nikitin ES: *J Neurosci Methods.* 2013;212(1):17-27.
- 15) Sidorov VY, Holcomb MR, Woods MC, Gray RA, Wikswo JP: *Basic Res Cardiol.* 2008;103(6):537-51.
- 16) Savtchenko LP, Gogan P, Korogod SM, Tyc-Dumont S: *Neurosci Res.* 2001;39(4):431-46.
- 17) Fujieda T, Koganezawa N, Ide Y, Shirao T, Sekino Y: *Neurosci Lett.* 2015;590:126-31.
- 18) Kelly A, Ghouri IA, Kemi OJ, Bishop MJ, Bernus O, Fenton FH, Myles RC, Burton FL, Smith GL: *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2013;6(4):809-17.
- 19) Rohr S, Salzberg BM: *Biophys J.* 1994;67(3):1301-15.
- 20) The Molecular Probes® Handbook: A GUIDE TO FLUORESCENT PROBES AND LABELING TECHNOLOGIES 11th Edition (2010).
- 21) Schaffer P, Ahammer H, Muller W, Koidl B, Windisch H: *Pflugers Arch.* 1994;426(6):548-51.
- 22) Preuss S, Stein W: *PLoS One.* 2013;8(10):e75678.
- 23) Tang W, Kang J, Wu X, Rampe D, Wang L, Shen H, Li Z, Dunnington D, Garyantes T: *J Biomol Screen.* 2001;6(5):325-31.
- 24) Wolff C, Fuks B, Chatelain P: *J Biomol Screen.* 2003;8(5):533-43.