

学位（博士）授与の記録

きの した とし お
木 下 利 雄

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第505号

学位授与の日付：平成26年4月23日

主 論 文：Antifibrotic response of cardiac fibroblasts in hypertensive hearts through enhanced TIMP-1 expression by basic fibroblast growth factor
（高血圧心における心筋線維芽細胞における塩基性線維芽細胞増殖因子によるTIMP-1発現亢進を介した線維化抑制効果）

著 者：Kinoshita T, Ishikawa Y, Arita M, Akishima-Fukasawa Y, Fujita K, Inomata N, Suzuki T, Namiki A, Mikami T, Ikeda T, Yamazaki J, Ishii T, Akasaka Y

公 表 誌：Cardiovasc Pathol 23: 92-100, 2014

論文内容の要旨

【背景】高血圧心不全における心筋リモデリングでは、代償性肥大期より間質線維化が進行し遠心性心拡大と収縮不全が惹起される。この線維化過程において心筋線維芽細胞（cardiac fibroblast：CF）は組織修復関連蛋白および種々のサイトカインを産生し、心筋間質線維化の進行に大きな役割を果たしている。これまで高血圧性心不全ラット（Dahl rat）におけるbasic fibroblast growth factor（bFGF）の直接心筋内投与により心拡大・収縮不全の進行抑制による心筋リモデリングが実証されている。しかしbFGFによる心筋間質線維化を介した心筋リモデリング抑制機序はいまだ解明されていない。

【目的】今回われわれは培養CFを用いてbFGFによる心筋間質線維芽細胞における組織修復関連蛋白の発現変化の解析からbFGFによる心筋リモデリング抑制機序を解明することを目的とした。

【方法】高血圧心不全モデルDahl ratに6週齢より8%高食塩食を負荷し、高血圧心を作製する。それぞれ6, 12, 15, 18週齢において心臓を採取し組織標本を作製しAzan-Mallory染色により血管周囲や心筋間質の線維化の経時的変化を定量的解析から評価した。また15週齢の高食塩負荷Dahl rat心筋にbFGF（100 μ g）を直接投与し、18週齢における心筋間質線維化を定量的に評価した。代償肥大期（12週齢）および線維化増悪期（16週齢）同ラットから採取された心筋組織より培養CFを樹立し、2～3代目の継代細胞を用いて線維化関連蛋白の発現動態を評価した。蛋白およびmessenger ribonucleic acid（mRNA）レベルの発現性はウエスタンブロット法、TaqMan法によるreal-time polymerase chain reaction（PCR）法で解析した。またmatrix metalloproteinase（MMP）-2, 9活性の評価にはzymography法を用いた。bFGF刺激による線維化関連蛋白の発現変化の特異性を評価するFGF-receptor1（FGFR1）のノックアウト実験はFGFR1 mRNAをターゲットとするsmall interfering RNA（siRNA）の感作実験から検証した。

【結果】高食塩負荷Dahl ratにおける心筋間質線維化は15～18週齢にかけて著明な増悪傾向を示した。15週齢の高食塩負荷Dahl ratにbFGFを直接心筋投与すると、15～18週齢にかけてbFGF投与群ではbFGF非投与群に比較して心筋間質線維化が臓器レベルで有意に減少していた。細胞レベルでは代償肥大期（12週齢）と線維化増悪期（16週齢）から樹立した培養CFのうち、線維化増悪期CFではMMP-9, collagen-1, 3の発現上昇がみられた。この線維化増悪期CFにbFGFを添加するとtissue inhibitor of metalloproteinase（TIMP）-1の著明な発現増加とMMP-9の発現抑制およびzymographyにおけるMMP-9の活性化抑制を認めた。またbFGF添加により筋線維芽細胞への分化マーカーである α -smooth muscle actin（ α -SMA）の発現抑制が認められた。培養CFの主たる受容体FGFR1 mRNAのsiRNA感作実験では、bFGF添加後FGFR1ノックアウト群では非ノックアウト群に比べbFGF誘導性の組織修復関連蛋白の発現が有意に減少しており、上記の反応性がFGFR1を介したbFGF特異的変化であることが確認された。

【考察】Dahl ratにおける組織の反応性線維化はbFGF心筋内投与により抑制し得ることを組織レベルで実証し、bFGFによる心筋リモデリング抑制効果における間質線維化抑制の関与を示した。さらにわれわれが示してきたbFGFによる臓

器レベルでの心筋リモデリング抑制作用の機序を細胞・分子レベルにおける線維化関連蛋白の発現変化から実証した点が意義深い。すなわち本研究で明らかにされた高血圧心不全発症過程の線維化増悪期由来CFにおけるMMP-9とcollagen-1, 3の発現上昇から、CFによる心筋組織再構築と細胞外基質沈着の亢進能が*in vitro*で実証され、CFの心筋リモデリングにおける組織修復能の積極的な関与が示唆された。bFGF添加によるTIMP-1発現増加はヒト平滑筋細胞で報告されているが、CFにおけるTIMP-1発現増加の報告はほとんどみられない。一般にTIMP-1はTIMP-1/MMP-9複合体を形成し、MMP-9の活性化を抑制する。このことからbFGFはCF上のTIMP-1発現亢進からMMP-9活性を抑制し、臓器レベルでの心筋間質の過剰な組織改築を抑制し、心筋リモデリング抑制に寄与していると考えられた。これまで左心室拡大と収縮不全におけるヒト血中MMP-9の有意な増加が報告されてきたが、本結果よりCFにおけるTIMP-1発現を介したMMP-9の発現動態が示唆された。またbFGF添加により α -SMAの発現抑制が証明され、筋線維芽細胞への分化抑制からcollagen-1や-3による細胞外基質の産生低下による心筋間質線維化抑制の関与も示唆された。

【結論】bFGFは心筋間質線維芽細胞におけるTIMP-1発現増加とそれに伴うMMP-9活性化抑制を介して過剰な心筋組織改築とコラーゲン沈着を抑制し心筋間質線維化を抑制することで心筋リモデリング抑制に寄与していると考えられた。

く どう ひで やす
工 藤 秀 康

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第506号

学位授与の日付：平成26年5月22日

主 論 文：Clinical value of routine use of thin-section 3D MRI using 3D FSE sequences with a variable flip angle technique for internal derangements of the knee joint at 3T
(3T-MRIにおける3D高速spin echo法を用いた膝関節MRIの評価に関する研究)

著 者：Kudo H, Inaoka T, Kitamura N, Nakatsuka T, Kasuya S, Kasai R, Tozawa M, Nakagawa K, Terada H

公 表 誌：Magn Reson Imaging 31: 1309-1317, 2013

論文内容の要旨

【背景と目的】膝関節内病変に対しては、現在、magnetic resonance imaging (MRI) が非侵襲的な標準的診断法である。これまでtwo-dimensional (2D) 系シーケンスが主流であったが、より薄く、連続断面で撮影し、観察することのできるthree-dimensional (3D) 系シーケンスの臨床応用が始まっている。3D系シーケンスではグラディエントエコー系シーケンスでの撮影が行われてきたが、関節内構造では関節軟骨の評価には適するが、半月板、靭帯の評価には適していなかった。スピネコー系シーケンスは半月板、靭帯の評価にも適していると考えられていたが、撮像時間が長く、実用的ではなかった。近年、フリップ角変動型3D高速スピネコー系シーケンスが開発され、撮像時間の短縮が可能となり、臨床的に応用され始めている。そこで本研究では、膝関節に対してフリップ角変動型3D高速スピネコー系シーケンスを応用し、従来の2D系シーケンスでの評価と比較し、関節内病変の検出におけるその有用性を評価検討する。

【方法】膝関節内病変の外科的に確定診断が得られた34膝関節を対象とした。従来の2D系シーケンスとして、プロトン密度強調矢状断像、T1強調矢状断像、T2*強調矢状断像、脂肪抑制プロトン密度強調冠状断像、脂肪抑制プロトン密度強調横断像を厚さ3~4mmで撮像し、2D MRIプロトコールとした。また、フリップ角変動型3D高速スピネコー系シーケンスとして3D sampling perfection with application-optimized contrasts using different flip-angle evolutions (SPACE) を使用し、脂肪抑制プロトン密度強調冠状断像を0.6 mmの厚さで撮像し、基本的な3方向を1 mmの厚さで再構成した。再構成した3方向に2D系シーケンスのプロトン密度強調矢状断像、T1強調矢状断像、T2*強調矢状断像を加えたものを3D MRIプロトコールとした。画像評価として、放射線科医2名が、従来の2D MRIと3D MRIプロトコールでの半月板、関節軟骨、靭帯病変の有無について比較評価した。2つのMRIプロトコールの観察者内の一致度は、重みを付けた κ 係数で評価した。また、診断の正確性は、2つのMRIプロトコールのreceiver operating characteristic (ROC) 曲線下面積 (Az 値) で比較した。

【結果】半月板38病変, 関節軟骨39病変, 靭帯20病変が外科的に検出された. 従来の2D MRI プロトコールと3D MRI プロトコールで, 良好な観察者内の一貫性が得られたが ($\kappa=0.91\sim0.98$), 3D MRI プロトコールでわずかに一貫度が良好であった. 半月板, 関節軟骨, 靭帯病変の検出の平均 Az 値は3D MRI プロトコールが2D MRI プロトコールよりも有意に高かった ($p<0.01$ または $p<0.001$).

【結論】フリップ角変動型3D高速スピネコーシーケンスで撮像した3D MRI プロトコールは膝関節内病変の評価に有用である.

いし わたり たか お
石 渡 誉 郎

学位の種類: 博士 (医学) 学位番号: 甲第507号

学位授与の日付: 平成26年6月26日

主 論 文: Remodeling of the pulmonary artery induced by metastatic gastric carcinoma: A histopathological analysis of 51 autopsy cases

(胃癌転移による肺動脈構築改変—剖検例51例に関する病理組織学的解析—)

著 者: Ishiwatari T, Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Kobayashi J, Shinozaki M, Aki K, Sasai D, Yamamoto Y, Nakayama H, Shibuya K

公 表 誌: BMC Cancer 14: 14 (online journal), 2014

論文内容の要旨

【背景】近年, 胃癌細胞が肺動脈内腔に定着・増殖し, 内膜線維性肥厚および血栓形成を誘導する予後不良の病態が報告されている. このような肺動脈の改築が肺高血圧を招来すると推測されているが, 両者の関連について詳細な研究は行われていない. 本研究では, 肺動脈内腔あるいは内膜に定着した胃癌細胞が肺動脈の構築および血行動態に与える影響を明らかにするために胃癌剖検例を用いて詳細な病理組織学的解析を行った.

【方法】1) 解析対象症例: 東邦大学医療センター大森病院において1981~2009年に施行された剖検症例を対象として, 剖検記録に「胃癌」と記載されている症例を抽出. 肺組織標本を鏡検し, 肺動脈内に癌細胞を確認した症例を解析対象とした. 2) 肺動脈の形態解析: 収集した剖検症例の肺組織標本における肺動脈を撮影し, 肺動脈血管径ならびに狭窄率を計測した. 測定された肺動脈血管径ならびに狭窄率の相関関係を解析した. 3) 右室壁厚の計測: 心臓を右心室後壁を三尖弁輪に直交する面で標本化し, 標本上の三尖弁附着部位より心尖側へ1 cm 程度離れた部位の近傍3カ所の右室壁厚を測し, 平均値を算出した. 4) 肺動脈構築改変に伴う肺高血圧の評価: Heath-Edwards分類(心室中隔欠損の手術適応を評価する, 肺動脈構築改変の形態学的分類)でおおむね一般化されている閾値に従い, 肺動脈径を100 μm 未満, 100 μm 以上300 μm 未満, 300 μm 以上に分け, 3つに分類された群ごとに肺動脈狭窄率と右室厚の相関関係を評価した. また, 肺動脈狭窄率の95%信頼区間における下限値を閾値として設定し, 狭窄率が下限値未満の症例群ならびに下限値以上の症例群における右室厚の平均値を分類された血管径群ごとに t 検定を用いて比較した.

【結果】1) 解析対象症例の収集: 1981~2009年に4612例の剖検が施行されていた. そのうち, 168例において剖検報告書に「胃癌」と記載されており, これらの剖検症例における肺組織標本を鏡検した結果, 肺動脈内に癌細胞が確認できたのは51症例であった. 2) 肺動脈の形態学的解析: 得られた51症例の肺動脈血管径ならびに狭窄率の相関関係を調査した結果, 6症例で正の相関関係, 7症例で負の相関関係が得られ, 残りの38症例では有意な相関関係を見いだせなかった. 3) 右心室厚の計測: 肺動脈内に癌細胞が確認された51症例における右室厚の平均値 \pm 標準偏差は 3.14 ± 0.90 mmであった. 4) 肺動脈構築改変による血行動態変化の評価: 血管径群ごとに95%信頼区間の下限値未満ならびに以上に症例を分類した結果, 各血管群における下限値未満の症例数は100 μm 未満群31/51症例, 100~300 μm 未満群31/51症例, 300 μm 以上群33/51症例であった.

肺動脈狭窄率と右室厚の相関関係を測定した結果, いずれの群においても肺動脈狭窄率ならびに右室厚の間に有意な正の相関関係が得られた. さらに分類した血管径群ごとに下限値未満群と下限値以上群の右心室厚平均値を検定した結果,

いずれの血管径においても下限値以上群は右心室厚が有意に厚かった。

【考察】胃癌剖検例の約1/3において、肺動脈内に胃癌細胞を認め、肺動脈狭窄率は症例によって大きく異なっていた。300 μm以上の血管において、肺動脈狭窄率が95%信頼区間下限値以上である症例は18例であり、そのうち17例は300 μm未満の血管でも狭窄率が下限値以上を示していた。このことは、胃癌細胞による肺動脈狭窄が、肺動脈の広い範囲で同時に生じていることを示唆する。Heath-Edwards分類で一般化されている血管径の閾値を用いて肺動脈を3群に分類したいずれの血管径群においても、肺動脈狭窄率と右室壁厚は有意な正の相関関係を示していた。そして95%信頼区間下限値以上の群は下限値未満の群よりも有意に右室壁厚が厚かった。肺動脈内に認める胃癌細胞を循環している状態と理解するならば、胃癌細胞は肺動脈内腔を循環するだけでは肺動脈狭窄を生じない。胃癌細胞が肺動脈に定着、増殖し、間質を誘導することにより血管を狭窄させる。ひとたび胃癌細胞が肺動脈に定着、増殖することで肺動脈狭窄が起こり肺高血圧を招来することが示唆された。

【結論】胃癌剖検例の約30%で肺動脈内に胃癌細胞が観察された。このうち約40%の症例で胃癌細胞の定着・増殖による線維性内膜肥厚を認めた。この線維性内膜肥厚により肺動脈狭窄の程度と、右室壁厚の間には有意な相関を認めた。よって胃癌細胞が肺動脈に定着・増殖して線維性内膜肥厚を起こし、血管を狭窄させ、肺高血圧を招来することが示唆された。

こ いずみ まさ ゆき
小 泉 雅 之

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第508号

学位授与の日付：平成26年6月26日

主 論 文：Aryl hydrocarbon receptor mediates indoxyl sulfate-induced cellular senescence in human umbilical vein endothelial cells
(ヒト臍帯静脈内皮細胞においてアリル炭化水素受容体はインドキシル硫酸による細胞老化を仲介する)

著 者：Koizumi M, Tatebe J, Watanabe I, Yamazaki J, Ikeda T, Morita T

公 表 誌：Atheroscler Thromb 21: 904-916, 2014

論文内容の要旨

【背景】慢性腎不全（chronic kidney disease：CKD）に伴う心血管病（cardiovascular disease：CVD）の発症、いわゆる心腎連関は広く認知されており、動脈硬化はその病態メカニズムの重要な役割を担っている。動脈硬化につながる血管細胞老化の促進に酸化ストレスは深く関与しており、nicotinamide adenine dinucleotide（NAD⁺）合成の律速酵素である細胞内 Nampt（intracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase：iNampt）の活性減弱に伴う NAD⁺合成障害が惹起する NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素 sirtuin 1（Sirt1）の活性低下は、その重要なメカニズムである。

CKD 進行に伴って蓄積する尿毒症物質は CKD 患者でこの酸化ストレスを増強する原因の1つとして重要である。食物蛋白質由来のトリプトファンが腸肝循環を経て生成される尿毒症物質インドキシル硫酸（indoxyl sulfate：IS）は、有機アニオントランスポーターにより細胞内に取り込まれ、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate（NADPH）oxidaseの活性化を介して細胞内酸化ストレスを増強することが報告されているが、細胞内に取り込まれたISがどのようにしてNADPH oxidaseを活性化するかは不明であった。

アリル炭化水素受容体（aryl hydrocarbon receptor：AhR）は、臓器発生や癌発生、薬物代謝に関与しているリガンド活性型の転写因子である。われわれは最近、ISによるNADPH oxidaseの活性化がこのaryl hydrocarbon receptor（AhR）依存性であり、酸化ストレスの増強を介してヒト臍帯静脈内皮細胞（human umbilical vein endothelial cells：HUVECs）の炎症反応を惹起することを報告している。本研究では、内皮細胞におけるAhRの新たな病態生理学的意義の解明を目指し、ISによる細胞老化への関与を検討した。

【方法および結果】内皮細胞老化に与えるISの影響を検討するため、IS 500 μmol/l 共存下で24時間培養したHUVEC

に老化細胞の検出が可能である senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) 染色を施行し、陽性細胞と総細胞数の割合を評価した。その結果、ISで刺激したHUVECではコントロールと比較して有意にSA- β gal陽性細胞の割合が増加しており、細胞老化が促進していた。さらにわれわれはそのメカニズムを解明するためにHUVECにおけるiNampt活性、細胞内NAD⁺、Sirt1活性への影響を比色法で評価した結果、ISによる細胞老化促進にはiNampt-NAD⁺-Sirt1系の障害が関与していることを見いだした。

次に、このiNampt-NAD⁺-Sirt1系の障害にAhR依存的なNADPH oxidaseの活性化が関与するかをAhR阻害剤である α -naphthoflavone、CH223191とNADPH oxidase阻害薬であるapocyninを用いて検討した結果、これらの阻害薬で前処置されたHUVECではIS暴露による細胞老化とともにiNampt活性・NAD⁺合成・Sirt1活性の低下も有意に改善していた。以上により、ISによりAhR・NADPH oxidase依存的に障害されたiNampt-NAD⁺-Sirt1系が細胞老化を促進していることが明らかにされた。

最後にISによるNAD⁺合成低下が細胞老化を来したことを確認するために、NAD⁺の基質であるnicotinamide (NAM)投与下でのIS暴露の影響を評価した結果、NAMの投与はISにより低下したNAD⁺をコントロールレベルまで改善し、Sirt1活性低下と細胞老化を有意に抑制した。

【考察】本研究でわれわれはISによる内皮細胞老化のメカニズムがiNampt-NAD⁺-Sirt1系の障害を介すること、そしてそれがAhR依存性であることを初めて実証した。ISは心腎連関の促進におけるキープレイヤーであり、ISによるCVDの促進を予防するためには血中IS濃度を低下させるかISの作用をブロックすることが重要である。AST-120 [クレメジン、(株)クレハ、東京]は現在、血中IS濃度を低下させ、CKDの進行を緩徐にする効果的な治療薬として使用されており、血管内皮障害や血管老化を減弱するという血管系への有用性も報告されている。本研究でわれわれはHUVECにおいてIS-AhR経路の障害がiNampt-NAD⁺-Sirt1系の障害を減弱し、細胞老化を抑制することを明らかにした。この結果はIS-AhR経路の遮断が心腎連関における新たな治療戦略となりうる可能性を示唆する。

【今後】現在、*in vitro*で得られたこれらの知見を*in vivo*でも証明するための腎障害動物モデルによる検証が進行中である。さらに心腎連関に対する新たな治療薬の開発を目指す。AhRシグナルはそのリガンドにより生体防御に働く転写因子NF-E2-related factor 2 (Nrf2)の活性化にも関与しているため、完全なIS-AhR経路の障害は生体に悪影響を及ぼす可能性が示唆される。従って、内皮細胞に存在するAhRをターゲットとし、NADPH oxidase・iNampt-NAD⁺-Sirt1系を遮断する一方で、Nrf2には影響を与えないpartial antagonistもしくはpartial agonist作用を有する新たな物質を同定し、創薬開発へと繋げる計画である。

なか の ち ひろ
中 野 千 裕

学位の種類：博士(医学) 学位番号：甲第509号

学位授与の日付：平成26年7月24日

主 論 文：Utility of MostGraph and fractional exhaled nitric oxide measurement in chronic cough
(慢性咳嗽におけるモストグラフ法と呼気NO測定意義についての検討)

著 者：Nakano C

公 表 誌：J Med Soc Toho 61: 81-91, 2014

論文内容の要旨

【目的】慢性咳嗽患者を対象にモストグラフ法、fractional exhaled nitric oxide (FENO)測定、肺機能検査を行った。慢性咳嗽の鑑別診断、治療効果判定に対してモストグラフ法、FENO測定、肺機能検査の測定意義および有効性について検討した。

【方法】慢性咳嗽を主訴に来院した患者106名と安定期の気管支喘息患者32名を対象とした。気道抵抗測定は呼吸抵抗装置MostGraph-01 [チェスト(株)、東京]を用いた。FENOはNIOX-MINO[®] (Aerocrine AB, Solma, Sweden)を用いた。肺機能検査はスパイロメトリー [フクダ電子(株)、東京]を使用した。治療薬は β 刺激薬、吸入ステロイド薬の併

用を中心とした。治療前後で結果を比較した。また同様の検査を行い慢性咳嗽患者と比較検討をした。

【結果】5 Hzにおける気道抵抗 (resistance at 5 Hz : R5), 20 Hzにおける気道抵抗 (resistance at 20 Hz : R20) は慢性咳嗽患者では高い傾向にあった。症状の改善とともに気道抵抗とFENOは有意な減少を認めた。肺機能検査では有意な変化は認めなかった。

気管支喘息患者との比較では、気道抵抗、肺機能検査は有意差を認めなかったが、気管支喘息患者においてFENOの有意な上昇を認めた。

【結論】慢性咳嗽患者ではR5, R20が高い傾向にあり、治療により低下した。気道抵抗とFENOは相関を認めず、慢性咳嗽の病態に気道抵抗の上昇が関与し、これは必ずしも好酸球炎症の程度を反映するものではないと考えられた。

気管支喘息患者とFENO \geq 24群の慢性咳嗽患者ではFENO、気道抵抗と肺機能は有意差が認められなかった。好酸球炎症を伴う慢性咳嗽と安定期の気管支喘息は似通った病態であることが推測された。

モストグラフ法、FENO測定は慢性咳嗽の鑑別診断には至らないが簡便性と迅速性から慢性咳嗽の治療方針の早期決定、治療効果判定に有用である可能性が示唆された。

か ず さ かつ ゆ き
上 総 勝 之

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第510号

学位授与の日付：平成27年3月24日

主 論 文：Effects of pH on nifekalant-induced electrophysiological change assessed in the Langendorff heart model of guinea pigs

(モルモットランゲンドルフ灌流心標本を用いての抗不整脈薬 nifekalant の心臓電気生理学的作用に及ぼす pH の影響)

著 者：Kazusa K, Nakamura Y, Watanabe Y, Ando K, Sugiyama A

公 表 誌：J Pharmacol Sci 124: 153-159, 2014

論文内容の要旨

Nifekalantは難治性の心室性頻拍の治療に用いられるIII群抗不整脈薬であるが、副作用としてQT間隔の過度の延長によるtorsade de pointes (TdP)の発現が報告されている。この副作用は主に代謝性アシドーシスや急性腎不全、電解質異常などの重篤な状態からの回復期に見られる。Nifekalantの投与により心室頻拍が停止した後、全身循環が完全に回復するまでの間に体内の各臓器は低いpHの血流に曝される。細胞外pHの変化は細胞膜の各種ポンプや輸送担体、イオンチャネルを介して心筋細胞の電氣的活動に影響することが知られることから、nifekalantの副作用が発生する一因として血液pHの変化が関与している可能性が考えられる。今回われわれは、pHがnifekalantによる電気薬理学的作用や催不整脈性に及ぼす影響に関して、細胞外環境を任意に調節できるランゲンドルフ灌流心を用いて検討した。動物種については、モルモットの心筋細胞に発現するイオンチャネルは I_{to} チャネルを除きヒトと類似することから、モルモットを利用した。

実験1として、薬剤の存在しない状態で灌流液のpHを7.4から6.4(酸性)に低下させ、30分後に再び7.4に戻し、第II誘導心電図(electrocardiogram: ECG)、洞調律下および電気刺激ペーシング下(200, 240および300 bpm)での単相性活動電位(monophasic action potential: MAP)、有効不応期(effective refractory period: ERP)および再分極終末相(terminal repolarization period: TRP)の推移をそれぞれ観察した。その結果、pH6.4の灌流液への暴露によりMAPの第II相のamplitudeが低下した他、pH低下直後に単相性活動電位90%回復時間(MAP duration at a 90% repolarization level: MAP₉₀)およびERPが一過性に短縮した。実験を通じてTRPに変化は認められなかった。ECGのT波形はpH変化により形状が大きく変化したため、再分極時間の正確な評価にはMAPが適切であると考えられた。pH低下後のMAPのamplitude低下は過去の報告と一致し、MAPプラトー相におけるCa²⁺流入の低下に起因する可能性が考えられた。一方、MAP₉₀は酸性条件で延長・短縮の両方向に変化しうることが報告されている。酸性条件ではプロトンがI_{Kr}やI_{Ca}チャネルと結合し各イオン電流を抑制する他、adenosine triphosphate (ATP)産生の低下によりATP依存性K⁺チャネルが

活性化することが報告されており、さまざまな要因が複合的に関与することから、実験手法による差異が生じるものと考えられた。

実験2として、pH7.4で安定させた標本をpH6.4の灌流液に20分間暴露し、次にpH6.4の状態では10 μ Mのnifekalantを20分間投与し、最後に同薬剤濃度のままpHを7.4に正常化し、このときのECG、MAP、ERPおよびTRPへの影響を観察した。更に、心室の再分極時間の時間的ばらつきの指標であるshort term variability (STV)、long term variability (LTV) およびcoefficient of variation (CV) を評価すべく、各時点の連続する30拍のMAP波形のbeat-to-beat解析を行った。その結果、pH6.4におけるnifekalantの適用によってMAP₉₀およびERPが延長し、pHの正常化によりそれぞれが更に延長した。ECGは各操作後にT波の形状が大きく変化した。このように酸性条件においてnifekalantの薬理学的作用が減弱する原因について、以下のように考察した。NifekalantのpKaは7.9であることから、pH6.4においてはイオン化した分子が増加し、脂質膜のI_{K1}チャンネルへの薬剤の到達率が低下すると考えられた。また、酸性下で増加したプロトンがI_{Kr}チャンネルに直接結合し、薬剤のチャンネルへの結合を競合的に阻害することが報告されている。今回の結果は、これらの要因が関与しているものと考えられた。Beat-to-beat解析の結果、MAP₉₀のSTVはpH6.4での薬剤投与後に最高値を示し、LTVおよびCVについても、統計学的に有意ではなかったものの、同様の傾向が認められた。このことから、心室再分極過程の時間的ばらつきが酸性条件下におけるnifekalantの投与によって増大し、TdPのtriggerの発生リスクが特に高まることが示唆された。一方、薬剤存在下でのpHの正常化によってMAP₉₀とERPが更に延長したのに対し、TRPは維持されていた。この状態においては、周囲の細胞からの不規則な刺激への反応性、つまり電氣的受攻性が高い状態であることが示唆された。

以上の結果から、nifekalant投薬後の虚血再灌流時においては、アシドーシスの改善に伴い電氣的受攻性が増大し、時間的ばらつきも残存していることにより、不整脈発症リスクが特に高まると考えられた。