

心筋活動電位と Ca イオン動態の同時計測システムに関する研究

66793 櫻井 輝子

指導教員 佐久間 一郎 教授

Ventricular tachycardia (VT) and fibrillation (VF) are well known to fatal arrhythmias leading to sudden cardiac death. Abnormal excitation propagation “reentry” is thought main cause of VT/VF. Recently, it was reported that “triggered activity” is preliminary phenomenon of reentry starts. It was known to the generation of the triggered activity deeply relations of Ca ion dynamics. So, it was necessary to measure action potential and Ca ion dynamics simultaneously to observe triggered activity. In this study, we tried to construct the system that can simultaneously measure action potential and Ca ion dynamics. The feature of our system is single measurement system (one high speed camera) and using rotating optical filter mechanisms. Using this system, we mapped cardiac action potential wave and Ca ion wave both simultaneously.

Key words: optical mapping, action potential, Ca ion dynamics

1. 緒言

不整脈は、心臓興奮伝播の異常によって拍動が乱れ、心臓の血液ポンプ機能が損なわれる疾患であり、特に心室頻拍及び心室細動等の心室性不整脈は心臓突然死につながる重篤な不整脈である。重篤な心室細動が一旦発生すると、数分以内に電気的除細動によってこれを停止させなければ死に至る可能性が高い。しかし細動時の除細動は患者への負担等のリスクが高いため、心室細動の前段階である心室頻拍の段階で、安全に治療することが望ましい。

不整脈の成因と考えられているのがリエントリである。リエントリとは、通常は一拍ごとに消滅する心臓の電気的興奮が、消滅せずに異常に心臓を興奮し続ける現象である。近年、このリエントリの発生を担う現象の一つとして Triggered Activity が注目されている。

Triggered Activity (以下 TA) とは、細胞内 Ca イオンの上昇によって異常膜電位振動が引き起こされる現象であり、これがリエントリへと発展すると考えられている¹⁾が、そのメカニズムは未だ不明である。

心室頻拍の段階での予測治療を行うためには、頻拍状態に陥る直前の現象である TA の詳細な計測と解析を行うことが重要である。このような観点から、活動電位と Ca イオン動態の両信号を同時に計測する研究が行われている。多くの先行研究では光学計測手法が用いられ、活動電位と Ca イオン動態の信号の光路を 2 分割し、光学フィルタを介して 2 台の計測装置で計測を行っている²⁾。そのため (1) 正確に同一画角での計測が難しい (2) 2 種以上の計測対象の場合システム構築が難しい、といった技術的課題が残る。

そこで、本研究では、光学フィルタ、励起光

源、カメラの撮影タイミングを同期制御することにより、心臓興奮伝播現象と Ca イオン動態を同一画角で同時計測可能なシステムを構築することを目的とする。

2. 実験

2.1 実験システム構成

本研究においては、1 次試作システム～3 次試作システムまで製作した。全システムにおいて共通となる要素を以下に記す。

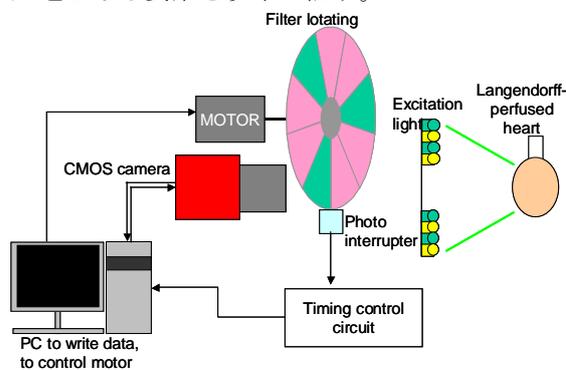


Fig1. Experimental setup

計測システムは①膜電位用及び Ca イオン動態用それぞれの光学フィルタを円盤中に配した光学フィルタ回転機構、②励起光源、③高速度カメラ、④摘出心臓標本から成り、①と②の駆動に同期して③が 1 フレームごとに撮影する (Fig1)。

システムの同期に用いる信号は光学フィルタ回転機構に設置した遮蔽板がフォトインタラプタを通過することで発生する。このフォトインタラプタで発生するパルスがカメラの毎フレームの露光開始トリガとなる。

トリガパルスが発生してから、カメラの画角

中央付近に光学フィルタが回転してくるまでには数 msec の時間遅れが生じる。そのためカメラ露光タイミングは、フォトインタラプタからのトリガパルスを受けた後に遅延時間を設けた。

活動電位と Ca イオン動態の計測には、光学計測手法を用いた。膜電位感受性色素 RH-237 と Ca 用蛍光プローブ Rhod-2 によって同時染色したウサギ摘出心を計測標本とした。

RH237 は励起波長 520nm、蛍光波長 782nm であり、脱分極時には蛍光波長が短波長側にシフトする。放射蛍光の主波長付近にカットオン波長を持つロングパスフィルタを用いることで透過光量の変化から膜電位の変化を計測した。

Rhod-2 は励起波長 558nm、蛍光波長 585nm であり、Ca イオン濃度が高いほど強い蛍光を発生する。蛍光波長に主波長を持つバンドパスフィルタを用いることで透過光量の変化から Ca イオン濃度の変化を計測した。

Rhod-2 の退色を防ぐため灌流液を 26°C に冷却し実験を行った。心尖部に設置した電極より 600msec 間隔でペーシング刺激を印加した。

計測データは撮影後、フレームごとに活動電位信号、Ca 信号それぞれに分け、正規化処理やカラーグラデーション表示等の画像処理をして動画ファイルとして出力した。

2.2 計測システムの開発

2.2.1 1次試作システム

2.2.1.1 システムの概要

(a) 励起光源

RH-237 励起用に主波長 520nm の LED を、Rhod-2 励起用に主波長 550nm の LED を 168 個、交互にリング状に配置した光源を製作した。光源はフォトインタラプタから発生したパルスを用いて撮影するフィルタの種類に合わせて点灯させる。交互点灯を実現することによって、励起波長と蛍光波長が近い色素でも相互の影響を受けずに計測することができる。

(b) 光学フィルタ

フィルタ回転機構に、台形加工したロングパスフィルタとバンドパスフィルタを搭載した。活動電位波形と Ca イオン波形では、活動電位の方が急峻な立ち上がりを持つため、ロングパスフィルタ(LP)をバンドパスフィルタ(BP)の 2 倍の枚数配置した(LP:6 枚 BP:3 枚)。

(c) 高速度 CMOS カメラ

Photon Focus 社製の高速度 CMOS カメラを用いた。計測は画像解像度 176×200pixel、階調度は 10bit で行った。

2.2.1.2 1次試作システムの計測結果

光学フィルタ回転機構を用いて活動電位と Ca イオン動態変化の同時・同期計測を行った。同期に成功したデータのうち 9 フレームごとの値をグラフ化した。露光時間は 8msec、平均

15FPS であり 10 点で空間平均をとった。計測された活動電位波形と Ca イオン波形を Fig 2 に示す。

同期計測における光量変化率 ($\Delta F/F$) は活動電位が 1.5%、Ca イオン動態が 1.1%となった。

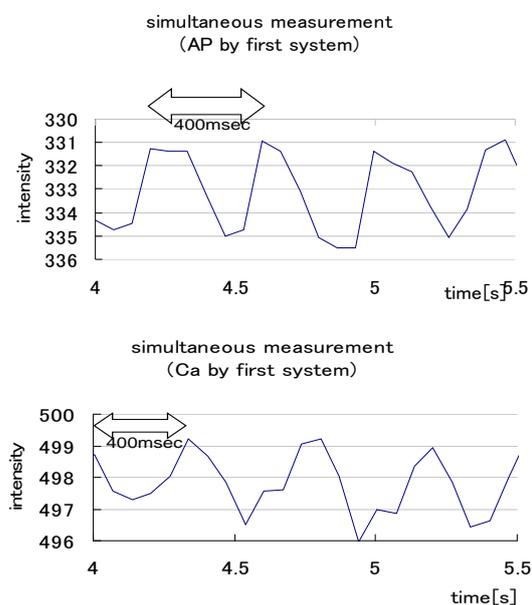


Fig.2. Action potential(:AP) and Ca ion dynamics(:Ca) wave from. (First experoment system)

光学フィルタ機構の回転を固定し、独立に計測した場合においては、ペーシング間隔に同期した信号を得ることができたが電気生理学的に特徴のある波形は得られなかった。一方同時同期計測においては、システムの同期に失敗する例が多く発生した。これはフォトインタラプタから発生するべきパルスが正しく生成しなかったことによると考えられた。また、ロングパスフィルタの特性の中に 480nm 付近の波長を透過するサイドバンドが発生していた。そのため反射の影響を大きく受けた可能性が示唆された。

2.2.2 2次試作システム

2.2.2.1 システムの概要

1次試作システムの計測結果を踏まえ、2次試作システムを製作した。

(a) 励起光源

1次試作システムで用いたリングライトについて光量を増加させる目的で2種のLEDを常時点灯とした。

(b) 光学フィルタ

1次試作システムと同様の配置とするが、フォトインタラプタの取付機構をより強固にした。

(c) 高速度 CMOS カメラ

1次試作システムと同様とした。

(d) 制御回路

タイミング制御回路の安定性を高めるためフォトトランジスタ側の負荷抵抗を最適化した。

2.2.2.2 2次試作システムの計測結果

露光時間 15msec, 18FPS で取得したデータに対して 10 点×10 点で空間平均を取った波形を Fig3 に示す。

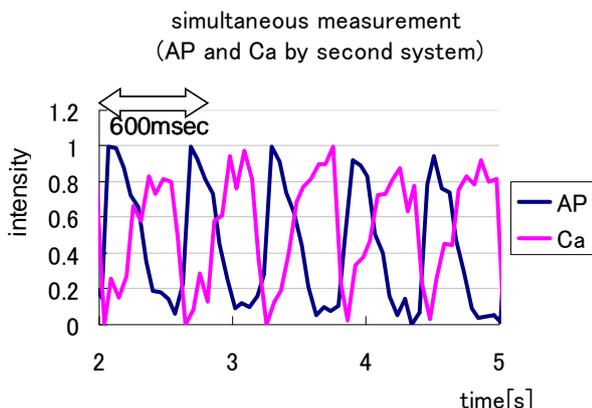


Fig. 3. AP and Ca wave form (Second experiment system).

光学フィルター一枚ごとに透過光量の違いを確認したため、フィルター間での輝度値の差を考慮し、フィルター一枚毎に輝度値の正規化を行った。光量変化率は活動電位について 2.4%, Ca イオン動態について 1.7%であった。

本システムを用いた同時・同期計測において、ペーシング間隔に同期した信号は得られたが、時間分解能が低いデータとなった。これはカメラの露光時間中にフィルタ回転機構のフィルタ固定用の金属フレームが映らないよう、低速で回転させていたことに起因する。この問題は露光開始までの遅延時間を精緻に設定することで解決可能である。

2.2.3 3次システム

2.2.3.1 システムの概要

2次試作システムの考察を踏まえて最終的な計測システムを製作した。

(a) 励起光源

標本に照射される光量をさらに増加させるため、2種のLEDを196個ずつ交互に配置し、LEDの照明角度を心臓標本に最適化して設置したリングライトを製作した。

(b) 光学フィルタ

これまでの機構では2種のフィルタの枚数が異なっていたため、フレームレートを定義することができなかった。そのため3次システムにおいては2種のフィルタを4枚ずつの同数とし、交互に配置した。

(c) 高速度 CMOS カメラ

高時空間分解能とするため fastcam MAX(FOTRON)を用いた。画像解像度は 256×256pixel, 階調度は 10bit で計測を行った。Delayの制御ができないため制御回路からの信号をタイミングパルスジェネレータに入力し、タイミングパルスジェネレータの出力をカメラのトリガパルスとした。

2.2.3.1 3次システムの計測結果

独立計測

光学フィルタ機構の回転を固定した状態で、活動電位と Ca イオン動態を、それぞれ独立に計測した。露光時間 4msec, 250FPS で撮影したデータについて 10×10 点で空間平均を取った波形を Fig4 に示す。

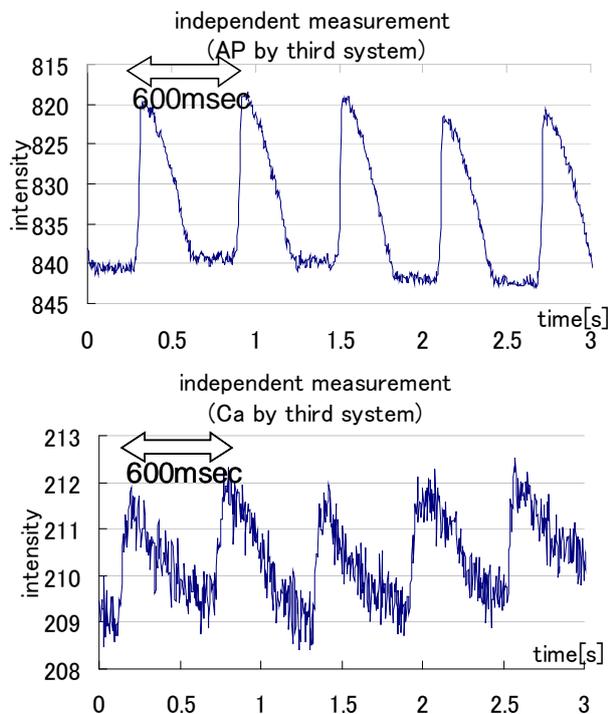


Fig 4. AP and Ca wave form (independent measurement by third experiment system).

同時・同期計測

フィルタ回転機構を駆動し、活動電位と Ca イオン動態の同時・同期計測を行った。

露光時間 4msec, 20FPS で取得したデータについて 10×10 点で空間平均を取った波形を Fig5 に示す。

光量変化率は、活動電位が 2.3%, Ca イオン動態が 1.4%となった。取得した信号変化をカラーグラデーションに対応させたマッピング結果を Fig6 に示す。

3. 考察

3.1 同時・同期計測システム

光学フィルタ回転機構の駆動と高速度カメラのフレーム毎の露光を同期させ、活動電位と Ca イオン動態計測の同時・同期計測を実現した。

活動電位と Ca イオン動態のそれぞれについて、ペーシング間隔に同期した信号変化が得られた。

活動電位計測については、活動電位波形の第1相～4相までの特徴的な波形信号を得ることが出来た。Ca イオン動態の計測については、活動電位の立ち上がり遅れて発現し、その後緩やかな上昇と下降を描く、Ca イオン動態の特徴的な変化を得ることが出来た。

同時同期システムによって最終的に実現した時間分解能は 20FPS であった。画面解像度は 256×256 pixel、空間分解能は 1.56mm である。

3.2 応用計測実験

興奮の間隔が連続的に短縮/拡張するような、頻拍状態を模擬した条件下においても同期同時計測の実現を確認した。

4. 結語

心筋活動電位と Ca イオン動態の同時計測システムを構築し、両信号の同時・同期計測を行った。構築したシステムを用いることで、両信号をほぼ同一画角で、かつ高空間分解能で計測が可能である。

今後、本システムを用いて心室性不整脈発生の成因と考えられている Triggered Activity 等の未解明な現象を詳細に検討することは大変有意義である。

参考文献

- 1) Kenneth.R.Laurita, Rodolphe.P.Katra, : J. C.ElectroPhysiol. Vol.16, 418-424(2005)
- 2) Bum-Rak Choi, Guy.Salama: J. Physiol. 529, 171-188 (2000).

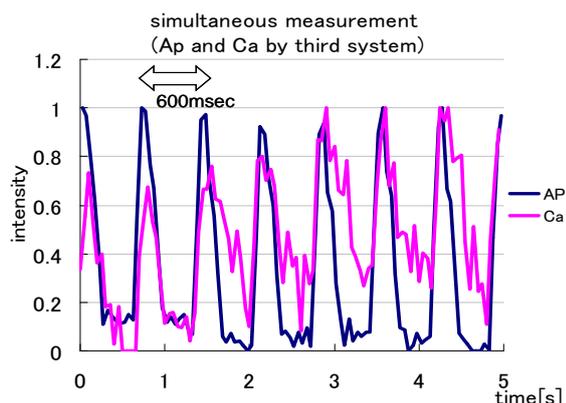
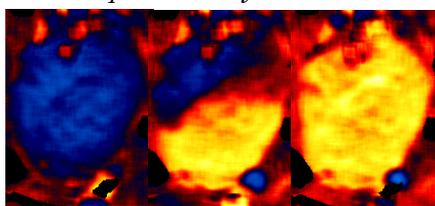
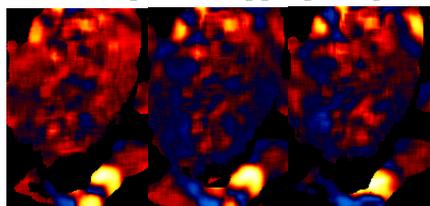


Fig 5. AP and Ca wave form (simultaneous measurement by third experiment system)



(A) AP (optical mapping image)



(B) Ca (optical mapping image)

Fig6 optical mapping image

3次システムを用いた応用実験

3次システムを用いてウサギ摘出心の心尖部からのペーシング間隔を 600 msec から 200 msec まで 100 msec 刻み(各 3 秒間)で短縮した場合と、200 msec から 600 msec まで 100 msec 刻み(各 3 秒間)で延長した場合の心筋活動電位及び Ca イオン動態の同時・同期計測を行った。露光時間 4msec、20FPS で取得したデータについて 10×10 点で空間平均を取った波形を Fig7 に示す。

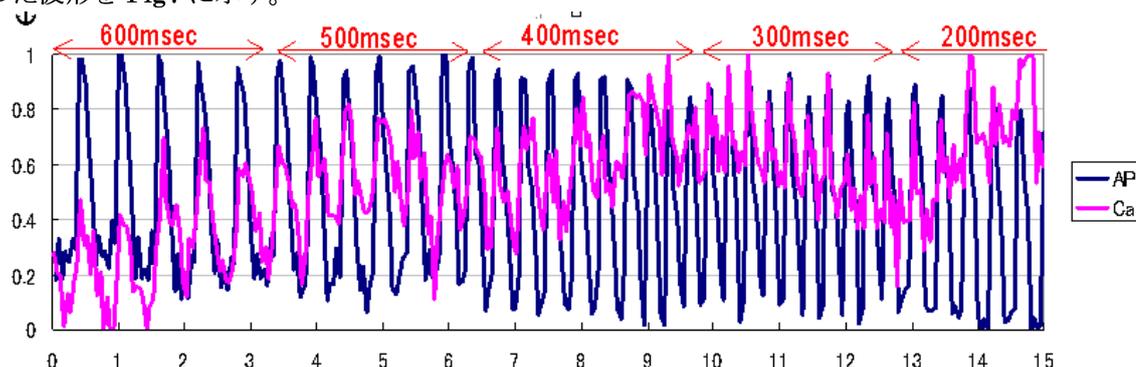


Fig7 AP and Ca wave form (simultaneous measurement)