

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590268

研究課題名(和文)活動時マウスにおけるダイナミックな循環調節の解明

研究課題名(英文)An Analysis of dynamic cardiac regulation during active state in mice

研究代表者

佐藤 紳一 (SHINICHI, SATO)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：10375305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：自由行動下マウス心電図連続記録のための電極埋込み手術不要な平板型心電図・ピエゾ素子複合センサーシステムの開発を行い特許出願(特願2015-058838)を行った。本センサーは、心電図記録の際にマウス足裏の発汗(精神性発汗)を要件とするため、ストレス時および睡眠時について実験を行い以下の発見があった。マウスは音や振動さらにヒトに凝視されるだけで足裏発汗と心拍数上昇を伴う精神的ストレス反応を示す。ヒトと異なり、マウスは睡眠時に足裏に発汗する。この反応は睡眠時に行うとダイナミックな心拍数変化が得られ、さらに心房細動と思われる不整脈を引き起こす。

研究成果の概要(英文)：I have developed a flat-plate electrocardiogram/piezoelectric-element hybrid sensor for continuous electrocardiographic recording in freely-moving mice without the need for electrode-implantation surgery and made a patent application on the hybrid-sensor system (#2015-058838). As the sensor required the sweating (emotional sweating) on the soles of mice for the electrocardiographic recording, experiments were performed during under stress and during sleep, and there were several findings as follows: (1) Mice exhibit heartrate elevation with sweating on their soles as psychological-stress response when exposed to sounds or vibration and when being gazed at by an experimenter. (2) In contrast to humans, mice exhibit sweating on their soles during sleep. (3) The response of (1) becomes a more dynamic change in heart rate when conducted during sleep, and furthermore, mice exhibit an arrhythmia thought to be the atrial fibrillation.

研究分野：生理学、睡眠科学、電子工学

キーワード：精神的ストレス ストレス反応 情動系 自律神経 心拍数 心房細動 睡眠 自由行動

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外の研究の動向：当時、電極埋め込み手術を要しない、足裏から記録するマウス・ラット用心電図記録装置が既に発売されていたが (ECGenie, Mouse Specifics Inc.)、4個の導電ジェルパッド付き方形電極の上に四肢が静止した状態が要求され、自由に動き回れる環境ではなく、活動時のダイナミックな心拍数変動が記録可能なものではなかった。一方、研究代表者は心拍数測定に関して生体が発する音や振動を電気信号に変換し検出する piezoelectric sensor を使用した非侵襲的マウス用心拍・呼吸数測定装置 (国際特許: Sato et al., US No.7174854) の開発に成功し報告した (Sato et al., Med Biol Eng Comput. 44(5): 353-362, 2006)。本装置は既に製品化・販売され、動物実験においてその正確性、非侵襲性および安全性が確認されている。本装置は生後2週程度までのマウス・ラットの心拍数記録には最適であったが、その後成熟し四肢で動き回る状態での記録は不可能であった。これを解決するために開発予定の心電図・piezoelectric sensor 複合センサーは手術が不要かつ平板状で通常のマウスケージに設置できることから成熟マウスの活動状態におけるダイナミックな心拍数変化が記録できることが期待された。

本研究の予想外の成果と関連する心房細動記録の当時の背景として、マウス・ラットの心房細動を誘発させる方法としては唯一心房ペーストペースティング法が現在まで定着している (Kai Friedrichs et al. Plos One February 18, 2014; Jian Shan et al. Circulation Research 111: 708-717, 2012; Schrickel JW et al. Basic Res Cardiol 97(6):452-60, 2002; etc.)。電気刺激によるこの方法は侵襲的であるため、心房細動記録は摘出心臓あるいは in vivo 実験では麻酔下で行わざるを得なかった。心房細動の原因は解明されていない重要課題であり、ヒト、動物において多くの研究が行われていた。

2. 研究の目的

マウスなど小動物の心拍数は一定時間の平均値で議論されることが多く、短時間の心拍数変動に関する詳細な報告は極めて少ない。活動時の心拍数長時間記録を唯一可能にするテレメトリー法は発信器を体内に埋めこむ手術による侵襲やそのサイズと重さがマウスの活動に与える影響を排除できない。本研究は、これまで明らかになっていない小動物の活動時におけるダイナミックな循環調節の態様および自律神経系の関与等を詳細に検討することを目的とし、同時に電極装着や手術を要せず無麻酔、非拘束条件下で自由に行動しストレスの無い自然に近い状態におけるマウスの活動中の瞬間的な心拍・呼吸数変動を記録するシステ

ムを開発するものである。

3. 研究の方法

平板型心電図・piezoelectric sensor 複合センサーシステムの開発

(1) 平板上心電図電極パターンの検討。

(2) 16ch 信号記録システムの構築。

(15ch 心電図 + 1ch piezoelectric sensor 信号)

(3) 15ch 心電図信号加算回路の開発。

(4) ビデオ画像 (+ 加算回路信号) 記録システム

の構築。

活動時マウスのダイナミックな循環調節の検討

(1) 活動時および睡眠時のマウスにおけるダイナミックな心拍数変化を記録する。

(2) 交感神経、副交感神経ブロック投与下で (1) と同じ実験を行い自律神経系の関与について検討する。

(3) 精神的ストレス付与時のマウスにおけるダイナミックな心拍数変化を記録する。

(4) 交感神経、副交感神経ブロック投与下で (3) と同じ実験を行い自律神経系の関与について検討する。

4. 研究成果

(1) 従来のテレメトリー技術と異なり、電極埋め込み等の手術を一切行わない自由行動下マウスの心電図連続記録のための平板型心電図・piezoelectric sensor 複合センサーシステムの開発を行い、特許出願 (特願 2015-058838) を行った。本センサーは、15

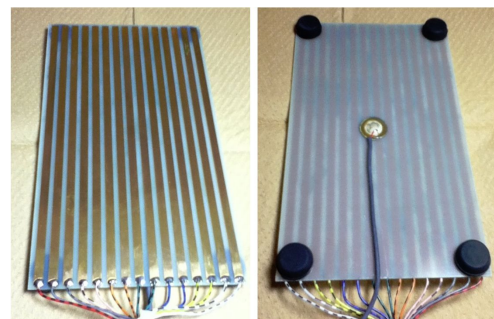


図1 心電図・piezoelectric sensor 複合センサー

本のストライプ状電極および piezoelectric sensor をそれぞれ上面および下面に配置し、自由行動下マウスの四肢の内少なくとも2肢が異なる電極に接した時に心電図を検出する。piezoelectric sensor は心電図情報が得られない時に可能な限り心拍・呼吸情報を検出し補うもので、原理的に心拍数情報の連続記録を可能にした (図1)。

(2) 実際のマウス心電図記録実験において、本センサーでの心電図記録がほとんどできない事態が一時期続いたことが、研究の遅れと予想外の重要な発見に結び付いた。すなわち、誤ってマウスケージに衝撃を与えた瞬間から今まで見えなかった心電図波形がモニター画面に現れ出すことを発見し

た。この発見はマウスケージを棒で叩くことで再現されたことから(図2)、マウス足裏からの心電図記録には精神的ストレスによる足裏の発汗(精神性発汗)が必要であること、そして普段はマウス足裏の発汗は少なく足裏と電極との間の接触抵抗が高いことが分かった。

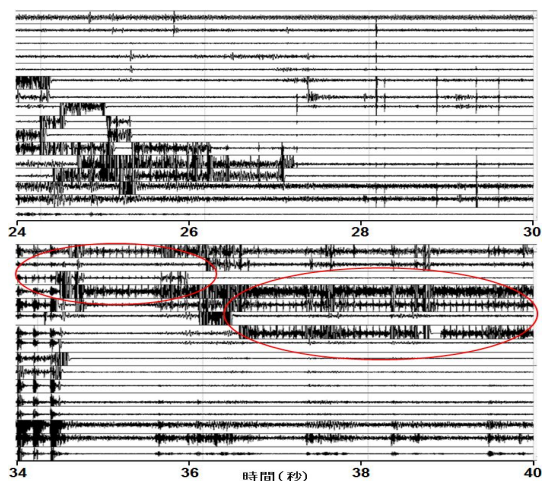


図2 15ch 心電図 + ピエゾ信号記録。
(上: 30秒まで心電図は見られない。下: 34秒前後のケージ打撃以後心電図が出現した(赤円))

(3) さらに驚くべき発見は、実験者がマウスケージ内のマウスを覗き込んだ時に足裏発汗と共に心拍数が急上昇したことである。これは視覚情報が情動(精神的ストレス)を惹起し、交感神経活動を促進した結果と考えられる。この反応は睡眠中に行うとさらにダイナミックな心拍数変化をもたらす心房細動と考えられる不整脈を誘発した(図3)。

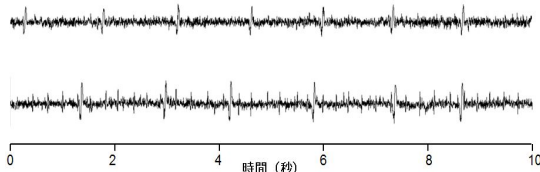


図3 睡眠時(上)およびマウス凝視後(下)の加算回路出力心電図波形
(マウス凝視後に心周期が不規則になり、R波間にf波様の信号が見られた。)

この現象は遺伝子操作の行われていないマウス(C57BL/6J)で確認されたものであり、マウスのような小動物自体が心房細動に対して脆弱である可能性がある。以上の発見は事実であれば極めて重要であり、ヒトの凝視による精神的ストレスがマウス心房細動を誘発する世界初の観測であり、生理学的、病態生理学的に意義のある発見である。この現象は視覚による皮質でのストレス認知が辺縁系での情動喚起を引き起こし視床下部を介した心機能に対する自律神経制御の結果であると考えられ、心房細動モデル

マウスとして未解明の心房細動発生メカニズムの研究にも貢献が予想される。さらに、ヒトと異なり、睡眠中に足裏に発汗する意義についても興味深い。以上の発見について一部を学会発表しており(佐藤他、第92回日本生理学会大会、2015年)さらに再確認実験も含め現在論文投稿に向けて準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Takashi Koyama, Shinichi Sato, Takashi Kanbayashi, Hiroyuki Watanabe, Tetsuo Shimizu, Hiroshi Ito, Kyoichi Ono, Apnea during Cheyne-Stokes-like breathing detected by a piezoelectric sensor for screening of sleep disordered breathing, *Sleep and Biological Rhythms*, 13(1), 2015, 57-67
DOI: 10.1111/sbr.12097

佐藤 紳一、マウス尾の捕捉による拘束ストレスが引き起こす除脈の自律神経機構の解明、*自律神経*、50、2013、116-119

Jun Tokunaga, Shinichi Sato, Takashi Kanbayashi, Aya Imanishi, Yohei Sagawa, Masatoshi Sato, Noriaki Sakai, Seiji Nishino, Tetsuo Shimizu, Sympathetic and parasympathetic control of heart rate response to restraint stress during the vulnerable period in newborn rats, *Akita J Med*, 40(2), 2013, 89-103

Adachi T, Shibata S, Okamoto Y, Sato S, Fujisawa S, Ohba T, Ono K, The mechanism of increased postnatal heart rate and sinoatrial node pacemaker activity in mice, *J Physiol Sci*, 63(2), 2013, 133-146
DOI: 10.1007/s12576-012-0248-1

[学会発表](計8件)

佐藤紳一、神林崇、清水徹男、Freely-moving mice exhibit emotional sweating on their soles in response to stress stimulus and during sleep from onset -A finding by the use of sweating-aided electrocardiogram floor sensor-, 第92回日本生理学会大会、2015年3月21日~23日、神戸国際会議場(神戸)

S. SATO, J. TOKUNAGA, T. KANBAYASHI, Y. SAGAWA, M. SATO, N. SAKAI, K. ONO, T. SHIMIZU, S. NISHINO, Slow and rapid heart rate change in mice/rats mediated by sympathetic-parasympathetic interaction in intrinsic cardiac ganglia, *Neuroscience 2014*, 10-13 November, 2014, San Diego (USA)

佐藤紳一、西島嗣生、神林崇、遠藤文代、徳永純、佐川洋平、櫻井滋、清水徹男、西野精治、 Piezosenzor 信号のフーリエ変換 (FFT) および心周期変動解析による中枢性と閉塞性睡眠時無呼吸イベントの判別、*日本睡眠学会第 39 回定期学術集会*、2014 年 7 月 3 日 ~ 4 日、あわぎんホール(徳島)

Shinichi Sato, Tsuguo Nishijima, Takashi Kanbayashi, Fumiyo Endou, Jun Tokunaga, Yohei Sagawa, Shigeru Sakurai, Tetsuo Shimizu, Differentiation of Central and Obstructive Sleep Apnea by Fast Fourier Transform (FFT) Analysis on Cardiorespiratory Signals Detected by a Piezoelectric Sensor, *SLEEP2014*, May 31–June 5, 2014, Minneapolis (USA)

佐藤紳一、徳永純、神林崇、今西彩、佐川洋平、佐藤雅俊、伊東若子、酒井紀彰、西野精治、清水徹男、ヒト REM 睡眠時体動 (twitch) 後頻脈と新生ラットの拘束時瞬間的心拍数上昇の自律神経制御、*日本睡眠学会第 38 回定期学術集会*、2013 年 6 月 27 日 ~ 28 日、秋田キャッスルホテル (秋田)

Shinichi Sato, Takashi Kanbayashi, Yohei Sagawa, Jun Tokunaga, Masatoshi Sato, Noriaki Sakai, Tetsuo Shimizu, Seiji Nishino, Apnea sound analysis by acoustic spectrography and fast Fourier transform (FFT) with high-resolution apnea sound detected by a piezoelectric sensor, *SLEEP2013*, 1–5 June, 2013, Baltimore (USA)

Shinichi Sato, Jun Tokunaga, Takashi Kanbayashi, Masatoshi Sato, Yohei Sagawa, Tetsuo Shimizu, Seiji Nishino, Transient bradycardia induced by restraint stress is differently controlled by autonomic nervous system between newborn mouse and rat, *第 90 回日本生理学会大会*、2013 年 3 月 27 日 ~ 29 日、タワーホール船堀 (東京)

Shinichi Sato, Nobuhide Hirai, Takashi Kanbayashi, Yohei Sagawa, Jun Tokunaga, Masatoshi Sato, Tetsuo Shimizu, Seiji Nishino, Analysis of Respiration Sound using IC Recorder and Piezoelectric Sensor, *The 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, 13–17 October, 2012, New Orleans (USA)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称：動物に適用される心電図情報取得用の心電センサ、心電図情報取得装置および心電図情報取得方法

発明者：佐藤 紳一

権利者：佐藤 紳一

種類：特許願

番号：2015-058838

出願年月日：2015 年 3 月 22 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 紳一 (SATO SHINICHI)

秋田大学大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10375305

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：