

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461078

研究課題名(和文)断片化興奮波wavelet伝播とCa動態の光学的追跡による心房細動発症機転の解明

研究課題名(英文)Optical mapping study for the analysis of the pathoelectrophysiological bases of atrial fibrillation

研究代表者

酒井 哲郎(SAKAI, Tetsuro)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40153845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膜電位イメージングの技法を駆使して、実験的心房頻拍モデル(頻拍様興奮：tachycardia-like excitation)における不整脈発現時の興奮波伝播パターンのmapping/imagingを進めた。本研究では特に受光素子としてcMOSカメラを用いて、興奮波伝播パターンの動画によるvisualization(可視化)を可能とする新しい実験技術を独自に開発した。この実験方法を駆使して複数のmicro re-entryと異常自動能のfociが不規則に存在しwaveletが複雑に伝播する"chaotic propagation pattern"の存在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using a complementary metal-oxide semiconductor image sensor (CMOS) camera and a 16 X 16-element photodiode array together with a voltage-sensitive absorption dye (NK2761), we optically mapped the spread of excitation during experimental tachyarrhythmia (tachycardia-like excitation, TE) in the isolated rat atrial preparation, in order to elucidate the basic pathoelectrophysiological phenomena during the arrhythmia. Using the CMOS camera which was newly introduced to this study, chaotic spread of excitation during TE was visualized by movies. During the event of "chaotic" TE, fragmented excitatory waves (wavelets) propagated irregularly with unstable blocked areas which blocked the excitation spread, unstable micro re-entry circuits and/or unstable foci of abnormal automatism. We consider that these patterns may mimic the electrical activities during atrial arrhythmias.

研究分野：生理学

キーワード：膜電位イメージング 不整脈 頻拍様興奮 膜電位感受性色素 心房細動 cMOS camera photodiode array

1. 研究開始当初の背景

心房細動は、臨床の場で多く見られる疾患であり、その電気生理学的病態については臨床の現場での心臓カテーテルによる心臓電気生理学(EPS)検査や ablation の成果などから多くの重要な知見が集められている。しかしながら、実験電気生理学の視座からは心房細動の発現・持続の基礎となる機構の全貌は必ずしも明らかにはなっていないと思われる。これは、*in vitro* 条件下で実験的に心房細動を誘発しその際に現れる興奮波伝播の時間的・空間的パターンを詳細に mapping をおこない解析する優れた実験技術がまだ十分に確立されてはいないことがひとつの原因であると言える。

本研究では膜電位感受性色素を用いた膜電位の光学的イメージングの技法を、ラットから摘出した心房展開標本に適用して、実験的心房細動を誘発し、そのときの心電活動を詳細なマッピングをもとに不整脈発現機構の解析をすすめていくものである。

2. 研究の目的

本研究は、細胞膜電位の光学的イメージング技術を駆使し、摘出心房 *in vitro* モデルにおける実験的心房細動の誘発・維持の過程での断片化した興奮波‘wavelet’の空間的伝播パターンの詳細な map を作成し、「心房細動基質」の重要な要素として挙げられる triggered activity and/or abnormal automatism、および興奮波の micro re-entry などの proarrhythmic な異常興奮性発現の時間的空間的パターンを明らかにする。さらに各種の細胞内 Ca^{2+} dynamics 擾乱環境を用いて異常興奮伝播と細胞内 Ca^{2+} dynamics の異常との共役関係を明らかにすることにする。これらの実験を通じて単一細胞としてではなく、摘出組織レベルでの電気生理学的な心房細動基質発現の解明を目的とする。

3. 研究の方法

細胞の膜電位変化にともなって光学的性状が変化する膜電位感受性色素を用いた細胞電気活動の光学的測定法には、標本に対して侵襲を与えることなく、標本上の多数の領域から活動電位を同時に記録できるという大きな特徴がある。さらに得られた光学シグナル(optical action potential)をもとにイメージングをおこなうことにより、興奮波の伝播をダイナミックに**画像化 / 可視化**することができる。これが研究の方法論である。

本研究で用いる膜電位感受性色素は merocyanine-rhodanine 系の NK2761 で、われわれが独自に開発した色素である。この色素は、膜電位変化に対して大きな**吸光変化**を示す色素で、細胞への有害な薬理学的作用を示さない優れた色素である。また、吸光変化を測定するため、蛍光色素に見られるような光毒性や速い退色がなく、長時間の安定した測定が可能であり、不整脈研究に極めて適した色素である。

光学的測定に用いる装置は、われわれがこれまで用いてきた浜松ホトニクス社製の 16×16 素子 photodiode array を用いた光学的同時測定システム(ARGUS-50/PDA)に加え、complementary metal-oxide semiconductor イメージセンサ(CMOS カメラ : ORCA flash4.0, Hamamatsu Photonics Ltd., Hamamatsu, Japan, および Zyla 5.5 10-tap, Andor Technology Ltd., Belfast, UK)を受光素子とした新たな測定システムをハードウェア・ソフトウェアの両者をそれぞれ独自に開発して用いる。このシステムの導入により興奮波伝播パターンの mapping 作業の効率が格段に向上し、さらに断片化した興奮波 wavelet の同定が容易となる。

4. 研究成果

(1) 膜電位イメージングによる実験心房性不整脈(tachycardia-like excitation : TE)発現時における興奮波伝播パターンの mapping :

これまでの研究ではわれわれは長い wavefront を持った“大きな興奮波”を中心に mapping をおこなって来たが、本研究では、これまであまり重要視して来なかった断片化した wavelet に注目した mapping をおこない、re-entry path や blocked area の形成、自発興奮の異所性 focus の発現などをより詳細に記録をおこなった。その結果、これまで知られていなかった、興奮波が不規則に伝播する"chaotic propagation pattern"を持った TE (“chaotic TE”) の存在を明らかにした。

(2) TE 誘発に関わる proarrhythmic な condition の探索 : 安定して TE を誘発する条件の探索を進め、細胞内 Ca^{2+} dynamic の擾乱を引き起こす実験操作(細胞内 Ca^{2+} 負荷、ouabain, ryanodine, blebbistatin などの薬物投与)により、高頻度で不整脈が発現することを明らかにした。さらに生後半年以上の「加齢ラット」をにおいては軽度の細胞内 Ca^{2+} 負荷により不整脈が発現を誘発できることを明らかにした。

(3) CMOS カメラを受光素子とする新たな光学的測定技術の開発 : 本研究で開発したシステムを用いて、興奮波伝播の時間的・空間的パターンを動画により可視化することを可能とした。膜電位感受性色素の吸光変化を画像化するこのシステムの構想は世界的にも類を見ないものである。このシステム開発では、そのハードウェアばかりではなく、コンピュータによるシグナル処理技術やコンピュータグラフィックス技術を駆使した興奮波伝播の動画化などのソフトウェア面の開発も独自に進め、基本的測定技術を完成させた。その結果、興奮波の光学的 mapping

の実験の精度と効率を大幅に上げることに成功した。この測定システムは世界的にも本研究のものが唯一である。

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 1 件)

1. Sakai T, and Kamino K Functiogenesis of cardiac pacemaker activity Journal of Physiological Sciences 66: 293-301 2016 (査読あり)

[学会発表](計 8 件)

1. 酒井哲郎 cMOS イメージセンサーと吸光型膜電位感受性色素を用いた摘出心房標本における異常自動能発現の時間空間パターンの可視化 第 95 回日本生理学会大会 2018 年

2. 酒井哲郎 ラット摘出心房標本に誘発した頻拍性不整脈(tachycardia-like excitation : TE)で見られた異常自動能発現の光学的膜電位イメージングによる画像化 第 68 回西日本生理学会 2017 年

3. 酒井哲郎 頻拍様興奮(tachycardia-like excitation) 発現時の Chaos 的興奮伝播の光学的マッピング: 細胞内 Ca^{2+} 負荷摘出心房標本による研究 第 94 回日本生理学会大会 2017 年

4. 酒井哲郎 cMOS イメージセンサーと膜電位感受性色素を用いた心筋興奮伝播パターンの可視化 第 93 回日本生理学会大会 2016 年

5. 酒井哲郎 Optical mapping study of the circus movement of the excitatory waves in the rat isolated atrium preparation under the intracellular Ca^{2+} overloaded condition 8th FAOPS (第 8 回アジアオセアニア生理学会)(国際学会) 2015 年

6. 酒井哲郎 ラット摘出心房標本において細胞内 Ca^{2+} 負荷により発現した micro re-entry 性 tachycardia-like excitation 第 66 回西日本生理学会 2015 年

7. 酒井哲郎 脊椎動物心臓ペースメーカー機能の個体発生的起源の光学的探求: 培養 multiple-hearts による研究 第 92 回日本生理学会大会 2015 年

8. 酒井哲郎 cMOS イメージセンサーと膜
電位感受性色素による心筋興奮伝播の可視
化 第65回西日本生理学会 2014年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

琉球大学医学部システム生理学講座

[http://www.med.u-ryukyu.ac.jp/medicine_cp/](http://www.med.u-ryukyu.ac.jp/medicine_cp/6445.html#description)

6445.html#description

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 哲郎 (SAKAI, Tetsuro)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 40153845

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし