

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300159

研究課題名(和文) 心臓2次元膜電位光学マッピングデータからの心壁内3次元興奮伝播波面の再構成

研究課題名(英文) Reconstruction of three dimensional excitation propagation waveform in heart wall from two dimensional optical mapping data

研究代表者

佐久間 一郎(SAKUMA, Ichiro)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50178597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：不整脈発生時の心筋内活動電位伝播様式は複雑な三次元的構造を持つ。膜電位感受性色素を用いた光学マッピングによって得られる膜電位情報は、組織標本表層から深さ300 μ mの浅い情報であり、心内膜側を計測するためには心室壁を切開するなどの処置が必要であった。本研究では心外膜と心内膜を同時かつその位置関係を正確に同定して光学マッピングするシステムを開発した。線状レーザー光を心外膜側から照射し、心内膜側の像を観察することで位置の対応関係を同定する方法を考案し、1mm以下の精度で画像統合可能であることを確認した。またウサギLangendorff灌流心標本右心室の心外膜側と心内膜側の同時光学マッピングを実施した。

研究成果の概要(英文)：The cardiac excitation propagation during arrhythmia shows a three-dimensional complex excitation behavior. The conventional optical measurement system mainly observes the action potential signal of the epicardium, and the endocardial signal measurement without incising the heart is difficult. In addition, an incised heart no longer exhibits the natural excitation behavior. We constructed a simultaneous measurement system that integrates the conventional epicardial measurement system and the endocardial measurement system by using an endoscope for an intact heart. Then, we proposed a line-laser registration method that can match correspondence between the epicardial and endocardial images for a short period. We demonstrated that this registration method has a sub-millimeter accuracy. Subsequently, we succeeded in simultaneous optical measurement of the excitation propagation of the epicardium and endocardium of the right heart wall by using an isolated rabbit heart.

研究分野：医用工学

キーワード：不整脈 光学マッピング 3次元興奮伝播 リエントリ シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

膜電位感受性色素を用いる心臓灌流標本の膜電位光学計測法は不整脈の成因の一つであるスパイラルリエントリーのダイナミクスの実験的解析手法として幅広く使用されている。提案者らは励起光源に青色発光ダイオードアレイを、撮影系に高速度カメラを用いる高空間・時間分解能の心臓膜電位光学マッピングシステムを開発し、種々の抗不整脈薬・冷却・電場刺激がスパイラルリエントリーのダイナミクスに与える影響の検討を行った。光学的膜電位計測法は細胞膜に取り込まれた膜電位感受性色素が細胞膜活動電位の発生に伴う大きな電界変化によりその分光特性が変化することを用いて間接的に膜電位を計測するものである。生体組織による光散乱に伴う信号減衰のため電位情報は心外膜下約 $300\mu\text{m}$ の深さの情報のみを与えるものであり、原理的に二次元計測となっている。しかし生体心における渦巻型旋回興奮波は複雑な三次元構造をとり、心表面にスパイラル構造が表れるとは限らない。そこで提案者らはこれまで心室筋の内側を液体窒素で凍結凝固させ、心外膜下心筋の薄い層のみを残させた二次元標本を作成し、スパイラルリエントリーの解析を行ってきた。このような現状の心臓膜電位光学マッピング技術の限界を打破する目的で、Pertsov、Rothらは心外膜側、心内膜側の2方向から励起光を照射し、光源側と組織透過後の2つの位置に高速度カメラを配置し、光源と撮影系の4つの組み合わせ（[光源位置-撮影位置]という組み合わせで表現すると[心外膜-心外膜]、[心外膜-心内膜]、[心内膜-心外膜]、[心内膜-心内膜]の4組）の二次元画像を計測し、光拡散をモデル化した理論解析にもとづき強度変化を分析することで、心壁内の特定の位置における膜電位変化を推定する試みを報告している。これらの報告は心壁の一部を切り出した試験片を対象とするものであり、心臓灌流標本を対象としておらず、また詳細な三次元スパイラルリエントリー解析はいまだ十分に行われていない。

一方、活動電位モデルからなる三次元心臓モデルを構築し、興奮伝播シミュレーションを行うことが近年の大規模計算環境の飛躍的向上により可能となっている。本提案での共同研究者である中沢と芦原らは詳細な心臓興奮伝播モデルを開発し三次元興奮波のダイナミクスに関する詳細な検討を行っている。シミュレーション結果とウサギ摘出心臓灌流標本での興奮伝播計測結果などの実験事実との比較検討が課題となっている。

2. 研究の目的

不整脈の主な成因であるスパイラルリエン

トリーのダイナミクスの実験的解析手法として幅広く使用されている電位感受性色素を用いる膜電位光学計測法は、心外膜下約 $300\mu\text{m}$ の深さの情報のみを与えるものであり、心壁内に三次元的に存在するスパイラルリエントリーの計測には限界があった。本研究では新たに心内膜側からも膜電位光学マッピングを可能とする内視鏡型光学系を新たに試作開発し、摘出灌流心標本の心外膜側・心内膜側の2方向から励起光照明条件、撮影条件を複数変えて同時にマッピングを行い、三次元興奮伝播シミュレーションから得られた知見を活用し、不整脈における心壁内のスパイラルリエントリーの解析を可能とする実験技術の開発とその応用を目的とする。

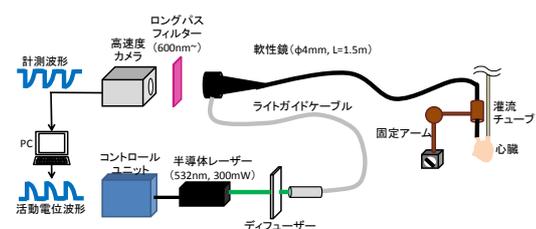
3. 研究の方法

(1) 心腔内に挿入可能な直径 5mm 以下の内視鏡型の膜電位感受性色素励起用と光シグナル画像計測のための内視鏡光学系を設計試作した。

図1に示す、Langendorff灌流心臓標本の心内膜側の膜電位光学マッピングシステムを実現するために、心腔内に挿入可能な直径 5mm 以下の内視鏡型の膜電位感受性色素励起用と光シグナル画像計測のための内視鏡光学系を設計試作する。口径が小さくなることで光学系が暗くなることから、現在使用している高速度カメラより12倍感度の高い高速度カメラの使用、励起光源にレーザを使用する等の工夫を行い、心腔内から膜電位光シグナルを計測可能な画像光学系を構築した。

内視鏡には直径 4mm の工業用ファイバスコープ（オリンパス社製 IF4D5-15-D）を使用し、集光光学系が細径となることから、十分な信号を得るために、光源にはこれまでの研究で使用してきた発光ダイオードに代わり、波長 532nm 、最大出力 300mW の半導体レーザを使用し、励起光を内視鏡の照明工学系へ導いた。心内膜表面では、 $55\text{mW}/\text{cm}^2$ の光強度が得られている。

図1 内視鏡を用いた心内膜側膜電位光学マッピングシステム



またこの試作システムによりウサギ Langendorff 灌流心臓標本での膜電位計測に適用し、心内膜側の光シグナル強度の評価、興奮伝播マッピングを行った。

(2) 心外膜側・心内膜側同時計測システム

の試作

心内膜側と心外膜側を同時に光マッピングすることを、二つの画像計測の幾何学位置関係をより正確に行いつつ実施可能とするシステムの試作を行った。実験装置の概略を図2示す。

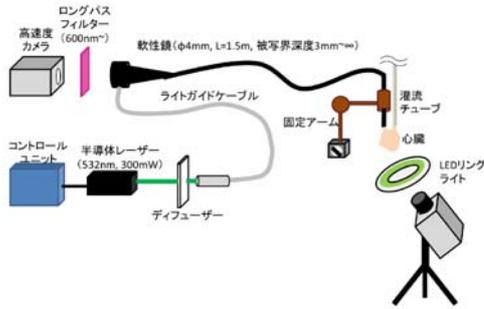


図2 心外膜側・心内膜側同時計測システム

心外膜側・心内膜側の計測画像の位置統合 (registration) を客観的に行うために心外膜側から線状のレーザ光を照射し、その透過光を心内膜側で観察し、二つの画像の相対的位置関係を同定する手法を検討した。その概要を図3に示す。

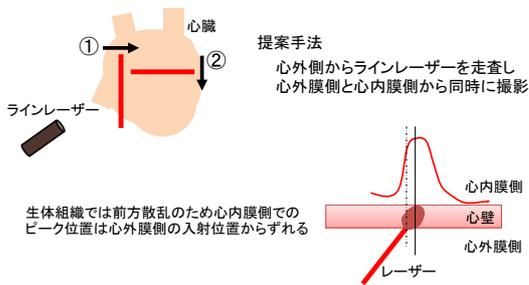


図3 ラインレーザ光を用いる位置統合手法

心筋壁内でレーザ光の散乱、レーザ光の心外膜面への照射角度の位置統合誤差への影響を検討した。

(3) ウサギ Langendorff 灌流心臓標本を用いたシステム基本性能評価を行った。

(4) 壁内情報の再構成法に関する基礎検討

深さ方向の情報を得るために新たに拡散光トモグラフィの原理を応用した計測手法の検討シミュレーションを中心に行った。

4. 研究成果

(1) 心内膜側膜電位光学マッピング

当初心外膜側から LED 光源 (主波長 525nm) を用いて励起光照射を行い、光拡散により心内膜側まで励起引きを到達させ、心腔内に挿入した硬性内視鏡に接続した高速度カメラとでの計測を、膜電位感受性色素 di-4-ANEPDS で染色したウサギ Langendorff 灌流心臓標本により実施した。一定の活動電位シグナルを計測することは可能であったが、

心内膜側の光シグナルは心房組織の厚みは薄いものの心壁内の組織の細胞活動電位の重ね合わせになってしまうという課題が確認された。また信号強度も弱く適切な信号を得るためには、撮影速度は 100fps (毎秒 100 枚) 程度としなければならず、性能的に不十分であった。

このため図1に示すような励起光源をレーザとした。従来の心外膜光学計測システムと同等の良好なシグナル計測に成功した。また 3000fps という高速度撮像ではノイズが大きくなるが、デジタルフィルタリングの適用を試み、特徴的な電位信号の抽出を実現した。

(2) 心外膜側からラインレーザ光を照射し、心壁を透過した光の像を心内膜側で計測し、心外膜側と心内膜側の画像の位置統合を行う場合、厚みのある心壁における光の散乱とレーザ入射角度が心外膜の法線方向となす角度に依存した誤差が生ずる。この誤差を定量的に見積もるためにウサギ心臓標本より右心室壁 (厚さ 2mm)、左心室壁 (厚さ 5mm) を切り出し、レーザ光の心外膜法線方向と入射光のなす角度を種々変えて、位置誤差を評価した。その結果を図4に示す。

その結果条件下ではサブミリメートルでの位置統合が可能であることを確認した。

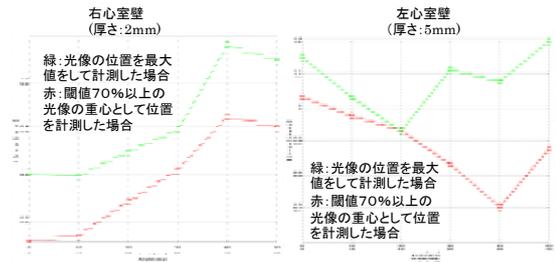
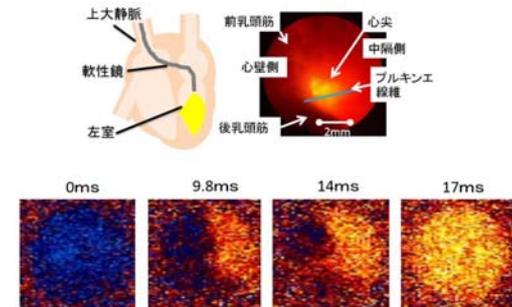


図4 位置統合誤差の定量的評価結果

(3) 図5に計測部位と異なる時刻での観察画像の変化を、図6に心腔内で観察された膜



電位波形の例を示す。

図5 計測実験の概要と得られた興奮電波マッピングの結果例

また図6に心腔内各部での信号波形を示す。

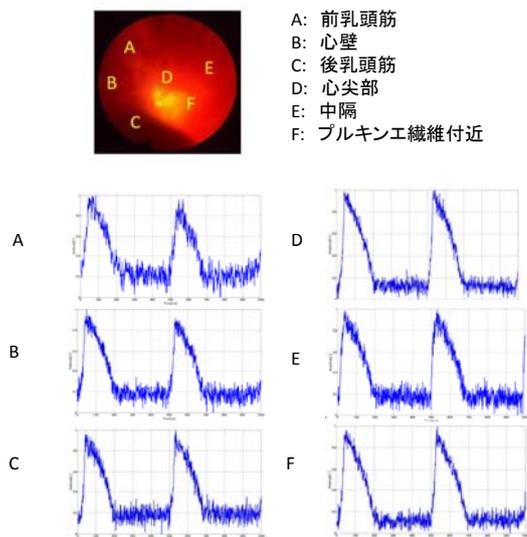


図6 心腔内各部での活動電位波形

図7にウサギ Langendorff 灌流心標本右心室に挿入した内視鏡、新壁内外でほぼ同一位置と想定される測定点における活動電位計測結果を示す。通常の興奮電波では心内膜・心外膜側でおおよそ同様の伝播様式となることが予想されるが、結果もほぼ同一時刻に活動電位が立ち上がったことを示すデータとなっている。

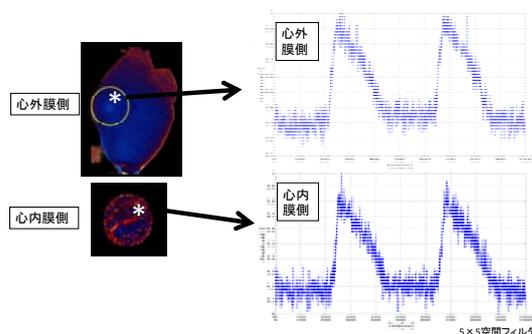


図7 心外膜・心内膜側の対応点での活動電位計測結果例

(4) 壁内情報の再構成法に関する基礎検討
縦 25 mm x 横 20 mm x 高さ 3 mm の 3次元膜電位分布モデルを用いたシミュレーション結果よりノイズの無い理想状態においては正規化された膜電位変化が 3 mm の深さにおいて平均二乗誤差 0.2 という良好な結果を得られることが分かった。

組織深部の計測プロセスにおいてレーザー光を一点照射し、組織表面上に現れる放射蛍光の分布を計測する必要があるため計測領域全体の計測に時間がかかり、非周期的な興奮伝播現象を捉えることが難しいということが問題であった。そのため圧縮センシングの考えを取り入れ、少ないサンプリング数から元の膜電位情報を再構成可能であるかの検討を行った。シミュレーション結果から

64 x 64 pixel の画像においてランダムに 800 点 (全画素数の約 20%) での計測を行えばノイズの無い理想状態においては -80 mV から 30 mV まで変化する膜電位二次元画像で 9 mV 程度の平均二乗誤差で膜電位情報を再構成することができることを示した。

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)

① INADA Shin, ZHANG Henggui, TELLEZ James O, SHIBATA nitaro, NAKAZAWA Kazuo, KAMIYA Kaichiro, KODAMA Itsuo, MITSUI Kazuyuki, DOBRZYNSKI Halina, BOYETT Mark R, HONJO Haruo: Importance of gradients in membrane properties and electrical coupling in sinoatrial node pacing, PLoS ONE, 査読有、(9) 4、2014、e94565、10.1371/journal.pone.0094565

② UEDA Norihiro, YAMAMOTO Misuru, HONJO Haruo, KODAMA Itsuo, KAMIYA Kaichiro: The role of gap junctions in stretch-induced atrial fibrillation, Cardiovascular Research, 査読有、104、2014、364-370、10.1093/cvr/cvu202. Epub 2014 Sep 2.

③ IIDA Masato, ISHIGURO Yuko S., YAMAZAKI Masatoshi, UEDA Norihiro, HONJO Haruo, KAMIYA Kaichiro: Urinary type IV collagen is related to left ventricular diastolic function and brain natriuretic peptide in hypertensive patients with prediabetes, Journal of Diabetes and Its Complications, 査読有、28(6)、2014、824-830、10.1016/j.jdiacomp.2014.08.005. Epub 2014 Aug 22.

④ 井尻敬, 芦原貴司, 梅谷信行, 小山裕己, 五十嵐健夫, 原口亮, 横田秀夫, 中沢一雄: Shape Matching法による心臓拍動のビジュアルシミュレーション、生体医工学、査読有、2014、54 (3) , In Press
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jsmbe-char/ja/>

[学会発表] (計 22 件)

1. N. Tomii, T. Arafune, H. Honjo, I. Kodama, N. Shibata, and I. Sakuma: Point Electric Stimulation-Induced Cardiac Spiral Wave Shift Employing Optical Mapping Feedback System, APCMBE2014, 2014.10.9-12, 台南市 (台湾)

2. T. Harada, T. Arafune, M. Yamazaki, H. Honjo, N. Shibata and I. Sakuma:

Simultaneous Optical Mapping System of Endocardial and Epicardial Excitation, 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2014.8.26-30, シカゴ (アメリカ)

3. YAMAZAKI Masatoshi, HONJO Haruo, NAKAGAWA Yasuaki, YAMADA Chinatsu, KODAMA Itsuo, KAMIYA Kaichiro: Prevention of ventricular reentrant activity in a transgenic mouse model with sudden cardiac death by aliskiren. *Cardiostim* 2014, 2014.

6.18-21, ニース (フランス)

4. YAMAZAKI Masatoshi, HONJO Haruo, NAKAGAWA Yasuaki, UEDA Norihiro, NIWA Ryoko, OGAWA Takashi, KODAMA Itsuo, KAMIYA Kaichiro, KUWAHARA Koichiro: Role of renin-angiotensin system on the lethal arrhythmias in a transgenic mouse model with reactivation of the fetal gene program, 第 29 回日本不整脈学会学術大会/第 31 回日本心電学会学術集会、2014. 7. 22-25, ザ・プリンスパークタワー東京 (東京都港区)

5. UEDA Norihiro, OGAWA Takashi, NIWA Ryoko, YAMAZAKI Masatoshi, HONJO Haruo, KODAMA Itsuo, KAMIYA Kaichiro: The role of gap junctions in atrial fibrillation induced by acute stretch, 第 29 回日本不整脈学会学術大会/第 31 回日本心電学会学術集会、2014. 7. 22-25, ザ・プリンスパークタワー東京 (東京都港区)

6. INADA Shin, SHIBATA Nitaro, MITSUI Kazuyuki, HONJO Haruo, KAMIYA Kaichiro, KODAMA Itsuo, NAKAZAWA Kazuo: Evaluating excitation conduction between sinoatrial node and right atrium with a safety factor -A Simulation Study-, 第 29 回日本不整脈学会学術大会/第 31 回日本心電学会学術集会、2014. 7. 22-25, ザ・プリンスパークタワー東京 (東京都港区)

7. UEDA Norihiro, OGAWA Takashi, KAMIYA Kaichiro, HONJO Haruo, YAMAZAKI Masatoshi, NIWA Ryoko : Effects of calmodulin kinase in atrial fibrillation caused by atrial stretch, The 7th Asia-Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session, 2014.10.29-11.1, ニューデリー (インド)

8. 富井直輝, 佐久間一郎, 荒船龍彦, 柴田仁太郎, 本荘晴朗: 光学マッピングのリアルタイム画像解析によるリエントリ旋回中心位置のトラッキング手法の検討, 第 30 回心電情報

処理ワークショップ、2014. 10. 26、伊豆山研修センター (静岡県熱海市)

9. Kim Nordmann, 山中健士, 富井直輝, 佐久間一郎, 柴田仁太郎, 本荘晴朗, 多点電極によるスパイラル・リエントリへの旋回同期刺激プロトコルの検討, 第 30 回心電情報処理ワークショップ、2014. 10. 26、伊豆山研修センター (静岡県熱海市)

10. 真子翔太, 原田匠, 神谷香一郎, 本荘晴朗, 山崎正俊, 柴田仁太郎, 荒船龍彦, 佐久間一郎: 光学計測を用いた右心房壁における自動興奮伝播計測, 第 29 回日本不整脈学会学術大会/第 31 回日本心電学会学術集会、2014. 7. 22-25, ザ・プリンスパークタワー東京 (東京都港区)

11. 真子翔太, 原田匠, 佐久間一郎: 灌流心臓におけるフィラメント形状同定のための高速 3 次元蛍光イメージングに関する研究, 第 8 回「システム疾患生命科学による先端医療技術開発」シンポジウム、2015. 2. 27、東京大学医学部附属病院 (東京都文京区)

12. 荒船龍彦, 舟久保昭夫, 柴田仁太郎, 佐久間一郎, 櫛山泰規, 山崎正俊, 本荘晴朗, 神谷香一郎: 細胞内 Ca²⁺ pocket 誘導 Ca²⁺ バースト現象によるスパイラルリエントリ発生の解析, 第 53 回日本生体医工学会大会、2014/6/24-26、仙台国際センター (宮城県仙台市)

13. 立柳紀林, 野口展士, 荒船龍彦, 柴田仁太郎, 佐久間一郎, 山崎正俊, 本荘晴朗, 神谷香一郎, 本間章彦, 舟久保昭夫: 心筋細胞内 Ca²⁺ 空間的不均一性によるマイクロリエントリ経路形成の解析, 第 30 回心電情報処理ワークショップ、2014. 10. 26、伊豆山研修センター (静岡県熱海市)

14. 立柳紀林, 野口展士, 荒船龍彦, 柴田仁太郎, 佐久間一郎, 山崎正俊, 本荘晴朗, 神谷香一郎, 本間章彦, 舟久保昭夫: 心筋細胞内 Ca²⁺ 持続時間画像を用いたリエントリ旋回中心の解析, 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会 2014、2014. 11. 22, 東京電機大学千住キャンパス (東京都足立区)

15. Tsumoto K, Ashihara T, Haraguchi R, Nakazawa K, Kurachi Y: Ischemia-induced subcellular sodium channel redistribution as a mechanism of arrhythmogenic effect of class-1 antiarrhythmic drugs on ventricle: A simulation study, 第 29 回日本不整脈学会学術大会/第 31 回日本心電学会学術集会、2014. 7. 22-25, ザ・プリンスパークタワー東京 (東京都港区)

16. Shin Inada, Daniel Harrell, Ryo

Haraguchi , Takashi Ashihara , Naomasa Makita , Kazu Nakazawa: Ventricular arrhythmia induced by the Purkinje network with reduced gap junction conductance –A simulation Study-, 日本生体医工学会大会、2014. 6. 24-26、仙台国際センター (宮城県仙台市)

17. 駒田裕亮、安藤岳洋、原田匠、荒船龍彦、山崎正俊、本荘晴朗、柴田仁太郎、小林英津子、佐久間一郎：光学・電極ハイブリッドマッピングによるspiral reentry旋回中心トラッキングシステム、2014年度精密工学会春季大会、2014.3.18、東京大学工学部 (東京都文京区)

18. 原田匠、荒船龍彦、山崎正俊、小川貴史、本荘晴朗、神谷香一郎、柴田仁太郎、佐久間一郎：内視鏡を用いた心内膜活動電位光学計測システムの開発、2014年度精密工学会春季大会、2014.3.18、東京大学工学部 (東京都文京区)

19. 原田匠、荒船龍彦、山崎正俊、本荘晴朗、神谷香一郎、柴田仁太郎、佐久間一郎：内視鏡を用いた心内膜活動電位光学計測システムの開発、第 30 回日本心電学会学術集会、2013.10.11、リンクステーションホール青森 (青森県青森市)

20. 平松照悟、荒船龍彦、柴田仁太郎、小川貴史、山崎正俊、本荘晴朗、佐久間一郎：光学計測を用いた右心房切片標本における自動能興奮伝播計測システム、第 30 回日本心電学会学術集会、2013.10.11、リンクステーションホール青森 (青森県青森市)

21. 真子翔太、原田匠、山崎正俊、本荘晴朗、神谷香一郎、柴田仁太郎、荒船龍彦、佐久間一郎：光学計測を用いた右心房壁における自動能興奮伝播計測、第 29 回心電情報処理ワークショップ、2013. 10. 27、越後湯沢ナスパニューオータニ (新潟県越後湯沢市)

22. 原田匠、荒船龍彦、山崎正俊、本荘晴朗、神谷香一郎、柴田仁太郎、佐久間一郎：内視鏡を用いた心内膜活動電位光学計測システムの開発、第 28 回心電情報処理ワークショップ、2012.10.27、熱海後楽園ホテル (静岡県熱海市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 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

佐久間 一郎 (SAKUMA, Ichiro)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号：50178597

(2) 研究分担者

小林 英津子 (KOBAYASHI, Etsuko)
東京大学・大学院工学系研究科・准教授
研究者番号：20345268

中沢 一雄 (NAKAZAWA, Kazuo)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究情報基盤管理室・研究室長
研究者番号：50198058

荒船 龍彦 (ARAFUNE, Tatsuhiko)
東京電機大学・理工学部・助教
研究者番号：50376597

本荘 晴朗 (HONJO, Haruo)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号：70262912

芦原 貴司 (ASHIHARA, Takashi)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：80396259

(3) 連携研究者

稲田 慎 (INADA, Shin)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究情報基盤管理室・研究員
研究者番号：50349792

原口 亮 (HARAGUCHI, Ryo)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究情報基盤管理室・研究員
研究者番号：00393215