

機関番号：12601  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20500387  
 研究課題名（和文）心臓標本の膜活動電位・Ca 動態高空間時間分解能同時光マッピング法の開発  
 研究課題名（英文）Cardiac action potential and Ca<sup>2+</sup> ion simultaneous dual measurement and temporal and spatial high resolution optical mapping system  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、計測は1台の高速度カメラで行い、撮影フレームごとにVm用/Ca<sup>2+</sup>用2種の光学フィルタを高速で切り替えて2つの信号を同時に取得するシステムを開発した。標本からの計測光は複数枚のレンズを組み合わせた光学レンズ系によってフィルタ位置で絞られ、撮影素子に復元する。本システムによりウサギ摘出心を用いて同時計測を行い、ペーシング時の活動電位波形、Ca<sup>2+</sup>動態を観察に成功した。また当初の基礎的検討では1台カメラ・フィルタ回転同期システムの光学機構設計に難航したため、平行して2台カメラとダイクロイックミラーを組み合わせた従来手法を改良し、Mutual Informationを用いて膜電位変化とCa動態を精緻に画像位置補正する装置も開発した。

## 研究成果の概要（英文）：

We developed optical mapping system which records two signals simultaneously using single camera by taking each frame synchronized with filter switching. We designed the optical lens system to concentrate fluorescent light at filter position and form image on the CMOS sensor, additionally a custom filter holder for long-pass filter and band-pass filter which is rotated by a motor. Using this system, we observed Vm and Ca<sup>2+</sup> dynamics in isolated rabbit heart. Firstly in the first step of basic study, there were many difficulties about the optical design of measuring system. Then we developed another solution for exquisite Vm and Ca dual mapping system that was constructed by 2 camera, dichroic mirror and Mutual Information based registration software both.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体情報・計測

## 1. 研究開始当初の背景

心臓突然死の主要な原因である心室細動(VF)は、その大部分が心室頻拍(VT)を

契機として発生する。近年、膜電位感受性色素を用いた心筋活動電位の高分解能光シグナルマッピング実験によりVT/VFの発生に

渦巻き型の興奮旋回（スパイラルリエントリー）が重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。Reentry 現象は通常一心拍ごとに消える心臓の電氣的興奮が消えずに残る現象であり、心室性不整脈の成因と考えられている。スパイラルリエントリーのダイナミクスは、心筋細胞個々の電気生理学的特性（イオン電流のダイナミクス、細胞内イオン動態）や、心筋ギャップ結合の分布、線維化などによる心筋構築の変化などが複雑に関与していることが示されつつある。膜電位感受性色素を用いた心筋細胞膜電位の光学マッピング技術や細胞内 Ca 濃度指示薬を使用した細胞内イオン動態の可視化技術は、生体の動的な変化を捉える点でこれらの研究において重要な実験技術となっている。さらに近年の研究により、このような不整脈の維持に関与する心筋細胞興奮の不安定性に細胞内 Ca イオン導体が関与していることを示す報告されており、膜活動電位という電気現象と、細胞内 Ca 動態を同時計測することが必要となってきた。このような目的には、膜電位感受性色素を用いて、細胞膜活動電位を蛍光信号という光シグナルに変換して計測する細胞膜活動電位光マッピングという計測技術、ならびに細胞内カルシウム濃度を蛍光信号に変換する蛍光プローブを用いた細胞内 Ca イオン濃度計測法という技術が有効な手段となる。活動電位と Ca イオン動態の同時計測については、膜電位感受性色素と Ca 蛍光プローブで染色した摘出心標本を試料とした先行研究が行われている (Bum-Rak Choi, Guy.Salama: J. Physiol. 529, 171-188, 2000) しかしこれらの多くは、ダイクロイックミラーを用いて放射蛍光を2分割し、活動電位及び Ca イオン動態のそれぞれについて光学フィルタを介して別の記録装置で計測するため、(1) 膜電位感受性色素と、Ca 指示薬は蛍光励起波長が近接していること、あるいは異なる励起波長を2種類使用する場合は、励起波長と複数の蛍光波長に重なりがないこと、(2) 二種類の色素の蛍光波長が波長軸上で分離可能であること、といった制限が課せられる。また、スパイラルリエントリーのダイナミクスを検討する場合には、興奮波面が複雑に時空間的に変化することから、高い空間分解能と時間分解能での計測が求められる。たとえば、スパイラルリエントリーに対する点電気刺激により、スパイラルの挙動がどのように変化するかを検討する場合、心筋細胞構築の線維方向とそれに垂直な方向での細胞間結合の電氣的コンダクタンスの不均一性より、電極近傍では脱分局領域と過分極領域が入り組んだ仮想電極分極現象 (Virtual Electrode Polarization) が観測されるが、このパターンは電極周囲の 1 m m 付近で観測されることから、高い空間分解

能計測が現象解析には求められる。スパイラルリエントリーのダイナミクスを考える場合、興奮波面が時空間的に複雑に変化することから、従来報告されている手法のように放射蛍光を波長分割する光学系を備えることは、測光効率を低下させ、S/N 比の低下、それに伴う露光時間増大による時間分解能の低下、空間分解能の低下につながる。また信号変換効率が低い色素の組み合わせを用いようとしても、膜電位感受性色素と、Ca 指示薬は蛍光励起波長が近接しているあるいは、異なる励起波長を2種類使用する場合は、励起波長と複数の蛍光波長に重なりがないことという制限から使用が困難となる。また、高い空間分解能での計測を行う場合、2つのカメラを用いた計測システムでは、電位信号計測用カメラと、Ca 信号計測用カメラの画角を厳密に同一になるように調整しない限り、二つの信号が同一の画素から観測されていることを保証することはできず、計測技術上の限界となっている。

## 2. 研究の目的

(1) 前述した、現在実現されている心臓不整脈現象の解析に用いられている膜電位と細胞内 Ca 濃度の同時計測の技術的な問題点解決することを目的に、二つの励起光源を変調し、計測フィルタ切替機構をこれと同期させて駆動することで、臓興奮伝播現象と Ca イオン動態を同一の画角で同時計測可能な光学計測システムの構築することを目的とする。具体的には、選択した蛍光プローブのそれぞれの励起波長に合致した発光中心波長を有する発光ダイオードを励起光源とし、この点滅度同期して高速回転する光学フィルタユニットを高速度カメラ前面に設置し、時分割で膜電位光シグナルと Ca 光シグナルを動画像計測可能なシステムを開発し、動物心臓灌流標本における、スパイラル・リエントリー発生時の電位・Ca 動態同時計測を行う。

(2) 上記の新規手法による計測シグナル S/N や光量が不十分な場合に備え、従来手法と同様にダイクロイックミラーと2台のカメラを用いた膜電位と Ca 動態の同時計測システムの構造を踏襲した改良システムも平行して検討する。本システムでは、膜電位・Ca 動態計測時に、心臓標本へ多点レーザーを投射して光学マーカーとし、撮影後に2台のカメラ画像を独自に開発するソフトウェアにより Mutual Information (以下 MI) を用いて画像統合およびレンズゆがみ等を1ピクセル単位で位置補正し、上記と同様、精緻に同一画角に補正された2種類の異なる波長信号を取得する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 1台カメラによるフィルタ切り替えシステム

##### ① 光学計測手法の選定

まず心筋の膜電位と細胞内 Ca を光学蛍光計測するための色素として、膜電位感受性色素 RH237 (520nm 励起光に対し、主波長 750nm の放射光を放射し、脱分極に応じて短波長側にシフトする)、Ca 感受性色素 Rhod-2 (主波長 550nm の励起光に対し、Ca イオン濃度の上昇に応じて主波長 580nm の放射蛍光の蛍光強度が増加する) を用いた。それぞれの信号の計測には、膜電位信号に対して 690nm のロングパスフィルタ、Ca シグナルに対して主波長 580nm・半値幅 20nm のバンドパスフィルタを採用した。

##### ② システム概要

本研究で開発したシステム概要を示す。

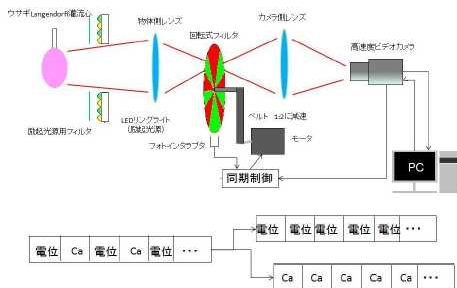


図1. システム概要

ウサギ摘出心からランゲンドルフ灌流心標本を作製し、RH237 と Rhod-2 の両染色を行い、心臓標本には 520nm と 550nm の主波長を持つ高輝度 LED を交互に配置したリングライトを励起光源として照射する。放射蛍光は独自に開発したレンズ機構により、まず物体側レンズで光学フィルタを交互に円盤上に配置した回転式フィルタの位置で一旦集光され、フィルタを通過した光はカメラ側レンズで再び高速ビデオカメラの撮像素子上に結像される。回転式フィルタは円盤周縁に配置した突起からフォトインタラプタでフィルタ位置が同期制御装置に入力され、高速ビデオカメラの 1 フレームごとの露光時間と同期される。撮影された映像は 1 フレームごとに膜電位信号と Ca 信号が記録され、計測後 PC でオフライン処理され、それぞれの計測動画を取得する。計測カメラには Fastcam Max

(Photron 社) を用いた。計測された画像はそれぞれ正規化・信号値反転処理と 180 度回転処理を行い、処理後の信号値に応じてカラーバーから色を与え、興奮伝播および Ca 動態を二次的に取得する。信号波形を取得する場合は  $10 \times 10$  の空間平均をしてノイズ除去した。

##### ③ 光学設計

このレンズシステムの要求仕様を下記のように定めた。

物体の大きさ…  $\phi 40\text{mm}$

中間の大きさ…  $\phi 10\text{mm}$

像の大きさ…  $\phi 17.408\text{mm}$

フィルタスペース… 30mm 以上

解像度… 物体上中心 3LP/mm で MTF0.6 以上

物体としてウサギ心臓の大きさを想定し  $\phi 40\text{mm}$  とした。最終的に形成される像の大きさは高速カメラの CMOS センサの大きさとし、 $\phi 17.408\text{mm}$  とした。中間像はフィルタ位置で計測光を絞る際に作られる像であり、この大きさは十分に小さく絞るという観点から  $\phi 10\text{mm}$  以内とした。またフィルタ切り替え機構を設置するスペースとして  $\phi 30\text{mm}$  以上とした。解像度は心臓で発生する局所的な現象を十分観察できる程度に定めた。結果として物体側 NA0.1、像側 NA0.23、中間像部分の NA0.47 を実現した。中間像高は  $\phi 9\text{mm}$  であり、またフィルタスペースは鏡筒を含め 30.5mm を確保し、要求仕様を十分満たした。設計したレンズを図に示す。

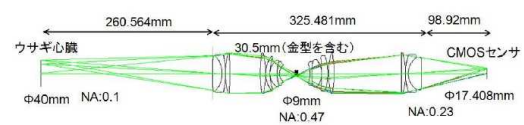


図2. レンズ設計図

モータとフォトインタラプタによるフィルタ回転機構を図3に、全てをくみ上げたシステム概観を図4に示す。

##### (2) 2台カメラによるソフトウェアレジストレーションシステム

初年度にフィルタ切り替え方式の試作を行ったが、検出感度の限界や、光学設計上の

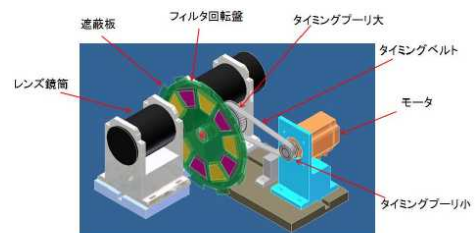


図3. フィルタ回転機構

課題があること、ならびに実験条件の最適化が必要であることが予備的な実験で明らかになった。そこで、まず最終的な光学フィルタ切り替え式を用いる前に、実験条件の最適化や画像計測系に求められる性能を実験的に確認するために、従来法と同様に、心臓標本からの蛍光信号をカットオフ波長 630nm のダイクロイックミラーで分割し、一方をカットオフ波長 700nm のロングパスフィルタ、そ

して他方を中心波長 585nm のバンドパスフィルタを透過させ、2 台の高速カメラで撮影するシステムを構築し、実験を行った。また、膜電位画像と Ca 画像を正確に重ね合わせるためのレジストレーションアルゴリズムの検討を行った。

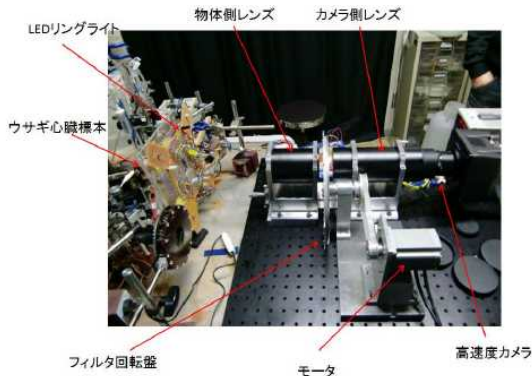


図4 計測システム概観

具体的には、ウサギ摘出心からランゲンドルフ灌流心標本を作製し、膜電位感受性色素 (RH237), Ca 指示薬 (Rhod-2) で両染色する。標本温度は 26°C とした。モーションアーチファクトの除去には筋収縮抑制剤 Cytochalasin-D を灌流液に投与した。膜電位の励起光として主波長 525nm の青緑色高輝度 LED を使い、放射蛍光を反射角度 45 度、分解波長 630nm のダイクロックミラーで分光し、膜電位信号は 700nm のロングパスフィルタを介して、Ca 動態は半値幅 20nm、主波長 580nm のバンドパスフィルタを介して、それぞれ計測した。信号の計測には、共に高速デジタルビデオカメラ Fastcam Max (Photron 社) を 2 台使用し、512×512pixel, 250fps で計測した。システム概要を図に示す。

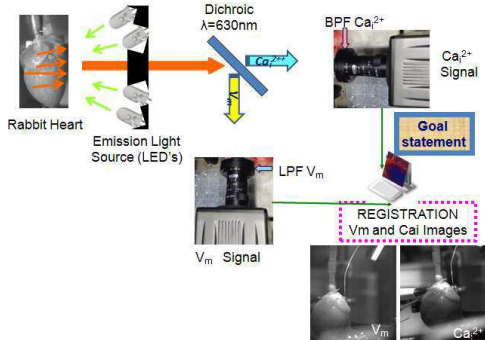


図5 2台カメラによる膜電位/Ca 同時計測システム概要

次に膜電位画像と Ca 画像を正確に重ね合わせるためのレジストレーションアルゴリズムの検討を行った。心臓標本に投影したレーザースポットを対応点群として用いる Point Based Registration の後に、相互情報量の最小化によるレジストレーションを行うことで、二乗平均誤差で 2 画素の正確なレジス

レーションを行うことが可能であった。これを用いてウサギランゲンドルフ灌流心標本の膜活動電位、細胞内カルシウム同時計測を行った。具体的には 2 台のカメラの映像のキャリブレーションは以下のプロトコルに従った。

- 1, 実験装置とカメラを配置した段階で、まず 5×5mm の白と黒の正方形が 9×9 個配列されたチェスパターンを心臓標本位置に設置して撮影し、得られたパターンからレンズ歪みを補正する
- 2, 心臓設置後、心表面に多点レーザー 10 点を照射してそれを撮影し、撮影画像から光点重心を求めて Point-based registration を行い、膜電位画像と Ca 動態画像の変換行列  $X_0$  を求める
- 3-4,  $X_0$  と Mutual Information を組み合わせた画像補正ソフトウェアを開発し、最終的に補正画像を取得する

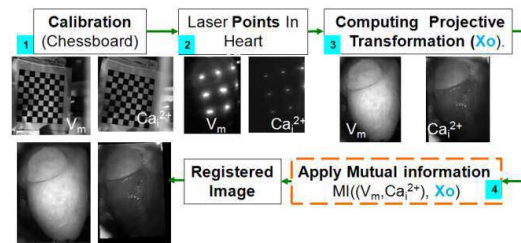


図6 2画像位置補正プロトコル

#### 4. 研究成果

(1) 1 台カメラによるフィルタ切り替えシステム

##### ① システム評価実験

動物実験に入る前に、本システムが同期同時計測が可能かモデルパターンを撮影し、60fps, 露光時間 8ms, および 125fps, 露光時間 4ms のそれぞれの組み合わせで計測した画像を評価した。結果を図 7 に示す。

フィルタ回転盤の金属フレームなどが写りこむことなく、それぞれのフィルタで正しく計測されたことを確認した。

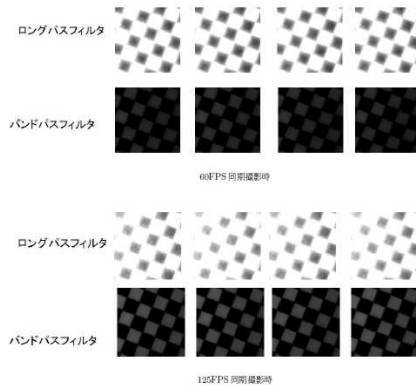


図7 チェスパターン計測による評価

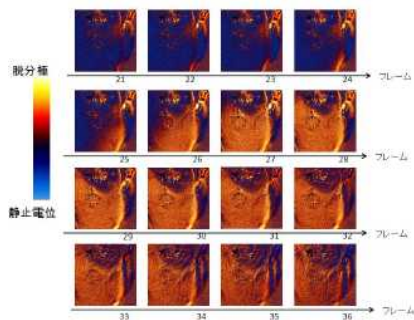


Fig. 4.4 活動電位マッピング結果 (60FPS)

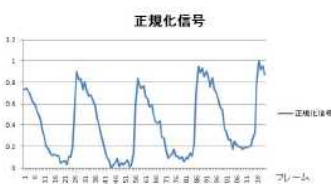
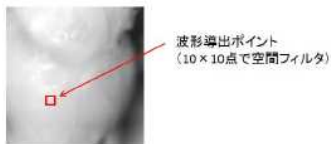


図 8 本システムを用いた膜電位独立計測結果

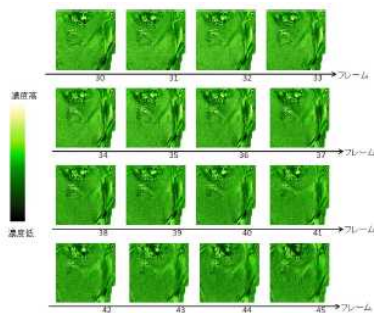


Fig. 4.10 カルシウムイオン動態マッピング結果 (60FPS)

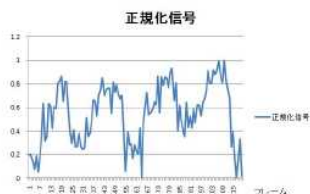
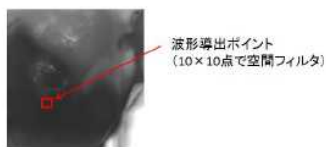


図 9 本システムを用いた Ca 動態独立計測結果

## ② 独立計測実験

同期計測の前段階として、フィルタを回転せずに固定し、膜電位と Ca イオンについて個別に計測を行い、評価を行った。実験系概

観を図 5 に、それぞれ計測された膜電位と Ca 動態の結果を図 6, 7 に示す。

## ③ 考察

システムの持つ計測性能としては、モデルパターンを用いた同期計測実験において空間分解能 0.039mm/pixel, 時間分解能 125fps (つまり膜電位と Ca それぞれは 62fps), 露光時間 4ms で同期計測が可能であることが示された。

また動物を用いた計測実験では、ウサギ摘出心 (N=3) を用い、膜電位と Ca 動態それぞれを独立に計測した。しかし筋収縮抑制剤 Cytohalasin-D を用いたものの、標本の心筋の動きを完全に止めることが出来ずモーションアーチファクト由来のノイズが生じた。今後は計測目的に応じて、洞結節ブロックの強化やBDMなど別の筋収縮抑制剤の使用に変更するなどの手段を検討する必要がある。

本研究で開発したシステムは、高い空間分解能を有し、かつ画像の位置合わせの必要がないという点で、既存のシステムに比べ優位である。本システムが対象とする Triggered Activity 等の現象は、元来細胞レベルで発生する局所的な現象であり、観察する際には画像のずれは致命的な欠点となる。

図 8 本システムを用いた膜電位独立計測結果

また Triggered Activity の発生から不整脈への移行までを詳細に観察した例はなく、本研究で開発したシステムを用いて、これら局所的な現象を観察することは極めて有意義であると考えられる。

## (2) 2 台カメラによるソフトウェアレジストレーションシステム

まず本システムによる補正後の 2 台のカメラ画像の誤差は、Point-based registration のみでは RMSE=1.54 ± 0.73 pixel, Mutual Information も併用した結果 RMSE=1.38 ± 0.70 pixel となった。画像補正後の膜電位波形と Ca 動態波形、および心尖部ペーシングによる興奮波伝播の同じく補正後のスナップ画像を図に示す。

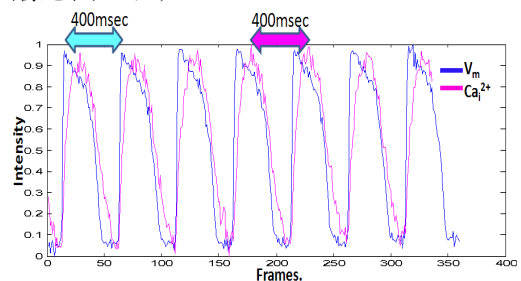


図 10 2 台カメラシステムによる位置補正後の膜電位波形と Ca 波形

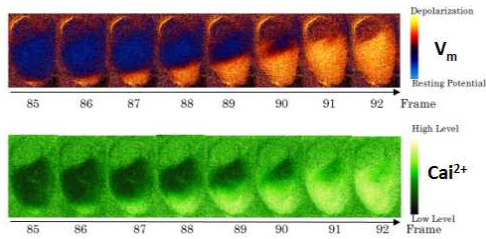


図 1.1 2 台カメラシステムによる興奮伝播と Ca 動態のスナップ画像

本システムの画像補正により、2 台のカメラで撮影した  $512 \times 512$  pixel の解像度の映像を、 $RMSE=1.38 \pm 0.70$  pixel という非常に高い精度で合致させることが可能となった。本システムを用いて今後  $Ca^{2+}$  sinkhole などの電極近傍の微小領域に発生しながら心臓全体の興奮状態に影響を与えるような不整脈発生・除細動機序に強く寄与する現象を精緻に計測・解析することは大変有意義と考えられる。

#### 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 件)

[学会発表] (計 31 件)

- ・ エルナンデス イグナシオ "Registration Method for Membrane Potential ( $V_m$ ) and Intracellular Calcium ( $Ca^{2+}$ ) Dual Optical Mapping System Based on Mutual Information", 第 26 回心電情報処理ワークショップ, 2010/10/23-24 会津
- ・ 荒船龍彦 "リアルタイムリエントリ旋回中心認識と局所冷却手法による除細動メカニズムの解明", 第 26 回心電情報処理ワークショップ, 2010/10/23-24 会津
- ・ エルナンデス イグナシオ "Simultaneous membrane potential  $V_m$  and  $Ca^{2+}$  optical mapping system for analysis of arrhythmia phenomena", 第 27 回日本心電学会学術集会, 2010/10/8-9 大分
- ・ 山崎貴弘 "心室性頻拍中の点電極によるリアルタイムフィードバックシステムについての検討", 第 27 回日本心電学会学術集会, 2010/10/8-9 大分
- ・ 荒船龍彦 "フィードバック刺激を用いた局所低温除細動治療メカニズムの解明", 第 27 回日本心電学会学術集会, 2010/10/8-9 大分
- ・ 荒船龍彦 "心筋興奮伝播の光学マッピング", 第 25 回生体・生理工学シンポジウム 2010, 2010/9/23-25 岡山
- ・ 山崎貴弘 "Analysis of spiral shift by a point stimulation for spiral reentry

with optical mapping system", 第 49 回日本生体医工学会大会, 2010/6/25-27 大阪

- ・ 富井直輝 "Control of electrical shock around the center of spiral reentry, using simplified analysis of excitation phase.", 第 49 回日本生体医工学会大会, 2010/6/25-27 大阪
- ・ 荒船龍彦 "Analysis of phase singularity during local hypothermic defibrillation using optical mapping system", 第 49 回日本生体医工学会大会, 2010/6/25-27 大阪
- ・ 富井直輝 "心臓光学マッピングを用いたスパイラルリエントリ旋回中心のリアルタイム検出法", 第 25 回心電情報処理ワークショップ, 2009/10/17-18 神戸
- ・ 荒船龍彦 "局所冷却除細動における Phase Singularity の解析", 第 25 回心電情報処理ワークショップ, 2009/10/17-18 神戸
- ・ 荒船龍彦 "スパイラルリエントリへの点通電刺激における仮想電極現象の解析", 第 24 回生体・生理工学シンポジウム 2009, 2009/9/24-26 仙台
- ・ 荒船龍彦 "光学計測を用いた低温除細動における仮想電極誘発興奮伝播現象の解析", 生体医工学シンポジウム 2009, 2009/9/18-19(9/18)千葉
- ・ 富井直輝 "心臓活動電位マッピング法を用いた通電刺激によるスパイラルリエントリの制御に関する研究", 第 26 回日本心電学会学術集会, 2009/7/2-4(7/3)京都
- ・ 荒船龍彦 "局所冷却除細動における virtual electrode 誘発興奮伝播現象の解析", 第 26 回日本心電学会学術集会, 2009/7/2-4(7/2)京都
- ・ 後藤萌 "光学計測を用いた仮想電極分極現象誘発興奮の解析", 第 48 回日本生体医工学会大会, 2009/4/23-25(4/25)東京
- ・ 富井直輝 "心臓活動電位マッピング法を用いた通電刺激によるスパイラルリエントリの制御に関する研究", 第 48 回日本生体医工学会大会, 2009/4/23-25(4/23)東京
- ・ 荒船龍彦 "心臓局所冷却除細動における仮想電極分極現象の解析", 第 48 回日本生体医工学会大会, 2009/4/23-25(4/23)東京
- ・ 富井直輝 "心臓活動電位マッピング法を用いた通電刺激によるスパイラルリエントリ制御に関する研究", 第 25 回日本心電学会学術集会, 2008/11/1-2 新潟
- ・ 荒船龍彦 "低温除細動治療における心筋局所冷却誘発仮想電極分極現象の解析", 第 25 回日本心電学会学術集会,

- 2008/11/1-2 新潟
- ・ 荒船龍彦 “心筋局所冷却における通電刺激誘発仮想電極分極現象の解析”，第 24 回心電情報処理ワークショップ，2008/10/18-19 神奈川
  - ・ 富井直輝 “心臓活動電位マッピング法を用いた通電刺激によるスパイラルリエントリの制御に関する研究”，生体医工学シンポジウム 2008，2008/19-20 大阪
  - ・ 富井直輝 “心臓活動電位マッピング法を用いた通電刺激によるスパイラルリエントリの制御に関する研究”，第 6 回生活支援工学系学会連合大会，2008/9/17-19 山口
  - ・ 櫻井輝子 “膜電位及びCa<sup>2+</sup>動態同時マッピングシステムの開発”，第 47 回日本生体医工学会大会，2008/05/08-10 神戸
  - ・ 後藤萌 “光学計測を用いた仮想電極分極現象誘発 Spiral Reentry の解析”，第 47 回日本生体医工学会大会，2008/05/08-10 神戸
  - ・ 荒船龍彦 “光学マッピングを用いた冷却心筋における通電刺激誘発仮想電極分極現象の解析”，第 47 回日本生体医工学会大会，2008/05/08-10 神戸

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
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

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

児玉 逸雄 (KODAMA ITSUO)  
名古屋大学環境医学研究所・教授  
研究者番号：30124720

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