

心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  マッピングによるスパイラルリエントリの解析Analysis of spiral reentry using intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mapping

○ 立柳紀林(電大) 荒船龍彦(電大) 野口展士(電大)

柴田仁太郎(新宿三井ビルクリニック) 小川貴史(名大環研) 山崎正俊(名大環研)

本荘晴朗(名大環研) 神谷香一郎(名大環研) 福井 康裕(電大)

本間章彦(電大)

Norifusa TACHIYANAGI, Tokyo Denki University

Tatsuhiko ARAFUNE, Tokyo Denki University

Hiroo NOGUCHI, Tokyo Denki University

Nitaro SHIBATA, Sinjuku Mitsui Building Clinic

Takashi OGAWA, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

Masatoshi YAMAZAKI, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

Haruo HONJO, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

Kaichiro KAMIYA, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

Yasuhiro FUKUI, Tokyo Denki University

Akihiko HOMMA, Tokyo Denki University

**Abstract:** Ventricular tachycardia (VT) and fibrillation (VF) are well known as fatal arrhythmias leading to sudden cardiac death. Abnormal excitation propagation “reentry” is thought that main cause of VT/VF. Recently it was reported that characteristic phenomenon of intracellular calcium ( $\text{Ca}_i$ ) changes such as triggered activity were induced faster than transmembrane potential ( $V_m$ ) when emergence VF. However interaction between  $V_m/\text{Ca}_i$  when VT exacerbation VF and mechanisms of reentry generation were still unclear. In this study for analyze VF induction. We correlation between spatial heterogeneous Action potential duration (APD) and  $\text{Ca}^{2+}$  amplitude during VT. Simultaneous optical mapping  $V_m/\text{Ca}_i$  was performed with Langendorff-perfused rabbit hearts during pacing and VF induced cross-field stimulation protocol. APD and  $\text{Ca}^{2+}$  amplitude maps were constructed during pacing and VT both. APD and  $\text{Ca}^{2+}$  amplitude altered spatially which magnitude increase each beat in VT.  $\text{Ca}^{2+}$  amplitude alternans were larger than APD alternans. That induced spatially discordant APD alternans and reentry generation. This result suggest that functional block line emerged alternans in VT is mechanisms of reentry generation.

**Key Words:** arrhythmias, cardiac, optical mapping

## 1. 背景

心臓は血液ポンプの役割を担う重要な臓器であり、その収縮は心筋細胞の電氣的興奮伝播によって駆動される。この興奮伝播に異常が起こり正常なポンプ機能が果たせなくなる単形性心室頻拍(VT: Ventricular Tachycardia)や多形性心室細動(VF: Ventricular Fibrillation)は心臓突然死を惹起する重篤な不整脈であり、その成因は渦状の興奮の再侵入(スパイラルリエントリ)である。VTは安定したスパイラルリエントリが形成され維持されている状態であるが、VFは複数のスパイラルリエントリが断裂融合を繰り返し複雑化した状態である。

スパイラルリエントリ発生の機序解明のため、組織や臓器の形を保ったままの標本で活動電位を観察する光学計測の研究が行われてきた<sup>(1)</sup>。さらに近年では興奮収縮連関において重要な役割を担う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ に着目した、活動電位と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の同時光学計測に関する研究が多く行われている<sup>(2)(3)</sup>。これら膜電位と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ の同時光学計測に関する研究により、Triggered Activity や  $\text{Ca}^{2+}$  Alternans、 $\text{Ca}^{2+}$  sinkhole などの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 動態異常が VF 発生の機序において重要な役割を担っていることがわかってきた。

しかし、細胞内膜電位  $\text{Ca}^{2+}$ 動態の変化が膜電位のスパイラルリエントリ発生につながる詳細な機序は未だ不明である。

そこで本研究では全体心標本を用いた膜電位と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ の同時光学計測を行い、空間的に局在する膜電位と  $\text{Ca}^{2+}$ のオルタナンスに着目し、解析することで細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ と旋回興奮発生の関連を明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

### 2-1 全体心標本の作成と光学計測

全体心標本にはウサギ摘出心から作製したランゲンドルフ還流心標本を用い、膜電位感受性色素 RH-237 と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性色素 Rhod-2 AM で同時染色を行った。また、筋収縮抑制剤として Cytochalasin D を用い、すべての還流は 27°C で行った。

光学計測は二台の高速度カメラ(Photron 社)を用いて 50 × 50mm<sup>2</sup>の範囲に対して 250fps、解像度 512 × 512pixel で撮影を行った。染色した全体心標本への励起光源として主波長 525nm の高輝度青緑色 LED を用い、カットオフ 630nm のダイクロイックミラーで蛍光シグナルを分離した。膜電位シグナルはカットオフ 700nm のロングパスフィルターを通して撮影し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルはカットオフ周波数 510 ± 20nm のバンドパスフィルターを通して撮影した。

実験プロトコルとしてペーシング刺激(S1)後に早期直交刺激(S2)を加え、VT および VF を誘発した。

2-2 解析手法

S2 後、VT から VF へ増悪化するエピソードについて解析を行った。すべての解析は MATLAB を使い、 $7 \times 7, \sigma=1$  のガウシアンフィルタを適用して行った。また、各画素での輝度値の変化の最高値が 1、最低値が 0 となるように正規化を行った。

各画素における活動電位持続時間 (APD: Action Potential Duration) を二次元的に表示した APD マップは、一拍分の正規化波形で最大値から 50% の輝度値を超える時刻を立ち上がり、50% を下回る時刻を立ち下がりとして持続時間を計測した。

$Ca^{2+}$  シグナル持続時間 (CaSD: Calcium Signal Duration) についても同様に各画素で計測を行い、CaSD マップとした。

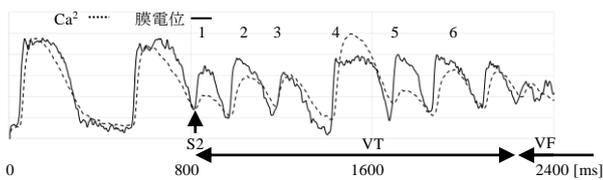
また、ペーシング刺激から VF になるまでの  $Ca^{2+}$  時系列データに対して正規化を行い、各画素における波高を一拍ごとに二次元的に表示した Amplitude マップを作成した。

立ち上がり時間を二次元的に表示した Activation マップは波形を微分した値が最も高い時刻を立ち上がりとした。

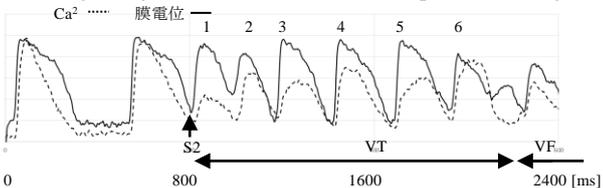
3. 結果

S2 刺激を加えると平面的な VT が 5 拍発生した後、旋回興奮が発生しその後 VF へと移行した。

Fig.1 に得られた膜電位及び細胞内  $Ca^{2+}$  の波形を示す。



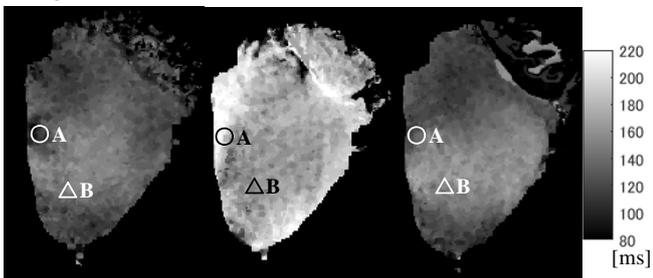
(a) Large magnitude of  $Ca^{2+}$  alternans at point A during VT



(b) Small magnitude of  $Ca^{2+}$  alternans at point A during VT

Fig.1 Intracellular  $Ca^{2+}$  trace and Corresponding transmembrane potential

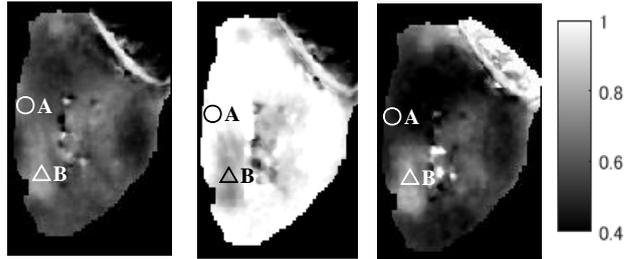
Fig.2 に VT が VF に増悪化する際の APD<sub>50</sub> マップを示す。



(a) beat 3 (1192 – 1420ms) (b) beat 4 (1420 – 1684ms) (c) beat 5 (1684 – 1888ms)

Fig.2 Action potential duration (APD) map of each beat during VT

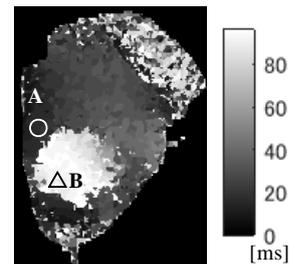
Fig.3 に VT が VF に増悪化する際の  $Ca^{2+}$  Amplitude Map を示す。



(a) beat 3 (1192 – 1420ms) (b) beat 4 (1420 – 1684ms) (c) beat 5 (1684 – 1888ms)

Fig.3 Intracellular  $Ca^{2+}$  Amplitude map of each beat during VT

Fig.5 に VT が VF に増悪化する直前の旋回興奮の際の Activation マップを示す。



beat 6 (1860-1960ms)

Fig.5 Activation map of spiral propagation

4. 考察

領域 A では波形の  $Ca^{2+}$  Amplitude オルタナンスが徐々に大きくなっていくのに対し、領域 B ではオルタナンスの大きさは周囲に対して小さいまま維持された。また、領域 B では VT の 3 拍目と 4 拍目の間隔が 212ms であり、領域 A では 3 拍目と 4 拍目の間隔が 268ms であった。Fig.3(b) に示す 4 拍目ではオルタナンスの起きている領域の  $Ca^{2+}$  Amplitude が大きいことから、3 拍目と 4 拍目の間に筋小胞体に溜め込まれた  $Ca^{2+}$  が一気に放出されることでオルタナンスが増強されていると考えられた。

VT が VF に増悪化する直前の旋回興奮は、領域 B の APD が相対的に短くなることによって (fig.1) そこが機能的ブロックラインとなって発生していた。このことから、空間的な APD/ $Ca^{2+}$  Amplitude オルタナンスの空間的不均一性による機能的ブロックラインの形成が旋回興奮の発生の機序であるとと考えられた。

5. 結論

不整脈が VT から VF へと増悪化する機序において、膜電位と細胞内  $Ca^{2+}$  の時間・空間的なオルタナンスがスパイラルリトリ誘発に重要な役割を担っていることが示唆された。

参考文献

- (1) Igor R Efimov et.al, Optical Mapping of Repolarization and Refractoriness From Intact Heart, Circulation, vol. 90, pp. 1469-1480, 1994.
- (2) Chikaya Omichi et.al, Intracellular Ca dynamics in ventricular fibrillation, Am J Physiol Heart Circ, vol.286,pp. H1836-H1844,2004.
- (3) Gyo-Seung Hwang et.al, Intracellular Calcium and Vulnerability to Fibrillation and Defibrillation in Langendorff-Perfused Rabbit Ventricles, Circulation, vol.114, pp.2595-2603, 2006