

琉球大学学術リポジトリ

[総説] 心臓興奮伝播パターンの光学的マッピング

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): optical recording, excitation spread, mapping, heart 作成者: 酒井, 哲郎, Sakai, Tetsuro メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016199

心臓興奮伝播パターンの光学的マッピング

酒井哲郎

琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第二分野

Optical mapping of excitation spread pattern in the heart

Tetsuro Sakai

Department of Physiology, University of the Ryukyus School of Medicine

ABSTRACT

Optical methods for monitoring membrane potential with fast voltage-sensitive dyes have been introduced as a powerful tool for studying cardiac electrical functions. These methods offer two principal advantages over more conventional electrophysiological techniques. One is that it is possible to make optical recordings from very small cells which are inaccessible to microelectrode impalement, and the other is that multiple sites/regions of a preparation can be monitored simultaneously and provide spatially-resolved mapping of electrical activity. The former has made it possible to record spontaneous electrical activities in early embryonic pre-contractile hearts, and the later has been applied for the mapping of the propagation patterns of electrical activities in the cardiac tissue. In the course of optical studies of the excitation spread pattern of the vertebrate heart, we employed multiple-site optical recording of membrane potential activity, using a voltage-sensitive merocyanine-rhodanine dye (NK 2761) and a multiple-element photodiode array, to monitor action potentials in an isolated rat atrial preparation. We optically mapped the normal excitation spread pattern from the physiological pacemaker. We also mapped the excitation spread pattern during the events of tachycardia-like excitation (TE) evoked by electrical stimulation. These maps indicate that, during the event of TE, the excitatory waves were often rotated around the blocked area including ostium of the superior vena cava. The optical mapping during the initiation phase of TE indicated that the decrease of the conduction velocity and the appearance of blocked areas contributed the establishment of TE. *Ryukyu Med. J.*, 23(3) 59~69, 2004

Key words: voltage-sensitive dye, optical recording, excitation spread, mapping, heart

はじめに

心臓内での興奮波の伝播パターンの解析は、心臓の「自動能」という特徴的な生理的機能を理解する上で不可欠であるのみならず、心房や心室の粗動・細動といった病的な心電活動の原因の研究の上でもきわめて重要な意義を持っている。心臓内の興奮伝播パターンの解析は、従来、電気生理学的方法によりおこなわれてきたが、この場合、同時に測定可能な測定点の数は、最も多い細胞外誘導法でも数十ヶ所が限度となっており、より広い領域にわたるより詳細な解析をおこなうためには、より多数の測定領域のデータに基づいた興奮波伝播のマッピングをおこなう実験技術が必要である。この問題に対し、われわ

れは膜電位感受性色素を用いた活動電位の光学的多チャネル同時測定法 (multiple-site optical recording) を発生初期胚および成体の心臓に適用することにより、標本上の非常に多くの微小分画領域から心筋細胞の活動電位を光学的 (吸光) シグナルとして検出し、その立ち上がりタイミングから心臓の興奮伝播のマッピングをおこなう研究を進めてきた¹⁻⁵⁾。この研究成果をもとに、われわれは、この光学的測定法の適用範囲をさらに広げて哺乳類心臓への適用法を確立し、さらに、異常心電活動の成因解明へのアプローチをおこなってきた^{4,5)}。

ここでは、膜電位の光学的測定法とそれをラット心房摘出標本に適用した最近の実験結果を紹介する。

1. 膜電位の光学的測定法

A. 歴史的背景

膜電位の光学的測定法を紹介するに当たり、この測定法の歴史的背景についてまず述べておきたい。(なお、これについては文献6 に詳しく述べられている。併せて参照されたい。)

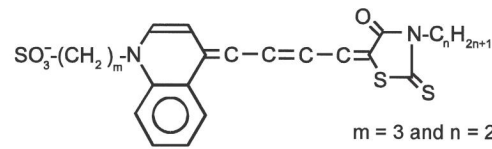
1968年、L. B. CohenらのグループとI. Tasakiらのグループにより相次いで論文が発表された^{7,8)}。ヤリイカの巨大神経線維において、内因性光散乱、複屈折性、および外因性の8-anilino-naphthalene-1-sulfonate (ANS) の蛍光が活動電位発生にともなって変化するというこれらの論文は、光学的測定を用いた生理機能の近代的研究の先駆けとなった。当初、これらの研究は、神経興奮に伴う細胞膜内分子の構造的変化を光学的に捉え、神経興奮のメカニズムを明らかにしようとして進められたものであった⁹⁾。しかし、その後のCohen, Salzbergらの研究により、蛍光変化は膜電位に依存したものであることが明らかにされたのである¹⁰⁾。さらに彼らは、この光学的シグナルが膜電位変化をコピーしているという現象を利用して、細胞内微小電極を用いずに膜電位を光学的に計測することが出来るという、いわば「逆転の発想」により、「膜電位の光学的測定法」の先鞭を付けた^{11,12)}。その後この光学的測定法は神経科学の領域を中心に広がっていった。(総説として文献6 および13-17を参考にされたい。)

膜電位の光学的測定法には、これまでの電気生理学的測定法に比べて、二つの大きな長所がある。その第一は、光学的測定が細胞内微小電極やパッチ電極の適用が不可能な微小・脆弱な細胞の膜電位変化を測定出来ることであり^{15,16)}、第二は多数の測定部位から光学的に同時記録をおこない、電気的活動のマッピングをおこなうことが可能であるという点である^{1,17,18)}。前者の特長を生かし、われわれは発生初期胚の心臓の電気的活動を解析する研究をおこなってきた(総説として文献1, 19, 20参照)。そして後者を活用して、心臓における興奮波伝播パターンの解析の研究を進めてきている¹⁻⁵⁾。膜電位の光学的測定法を心臓に適用する上での利点はもうひとつある。それは、膜電位を反映する光学的シグナルには除細動刺激のような強い電気刺激を加えてもアーチファクトが重畳しないという点である²¹⁻²³⁾。

B. 膜電位感受性色素

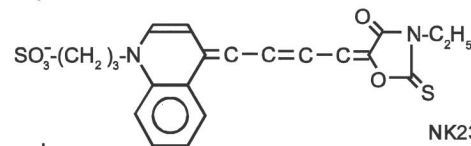
膜電位の光学的測定法は、ある種の色素(膜電位感受性色素)で生体染色されたヤリイカの巨大神経線維の吸光、蛍光、および複屈折性が膜電位に応じて変化するという現象を基本にしている¹⁵⁾。Cohenらの手により、1500種以上の色素がヤリイカ巨大神経線維を用いてスクリーニングされ、そのおよそ半数で吸光、蛍光、および複屈折性の光学シグナルが得られた²⁴⁻²⁶⁾。この研究の結果、

Merocyanine-rhodanine



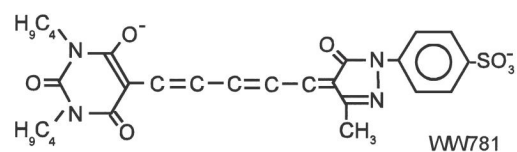
$m = 3$ and $n = 2$, Dye XVII
 $m = 4$ and $n = 3$, Dye XXIII
 $m = 4$ and $n = 4$, NK2761

Merocyanine-oxazolone

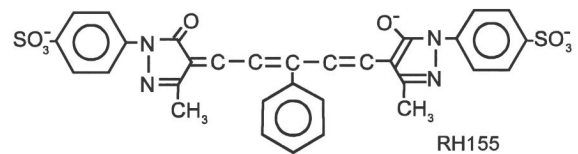


NK2367

Oxonol

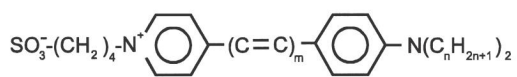


VW781

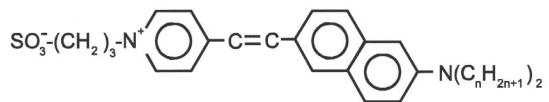


RH155

Styryl



$m = 3$ and $n = 4$, RH237
 $m = 2$ and $n = 5$, RH421



$n = 4$, di-4-ANEPPS
 $n = 8$, di-8-ANEPPS

Fig. 1 Chemical structures of voltage-sensitive dyes used for monitoring rapid changes in membrane potential. Merocyanine-rhodanine, merocyanine-oxazolone, and oxonol dyes are used for measuring absorption changes, and oxonol and styryl dyes are used for measuring fluorescence changes.

merocyanine-oxazolone系, merocyanine-rhodanine系, oxonol系, およびstyryl系の色素が活動電位のような速い膜電位変化に対応して大きな光学的シグナルを発生する膜電位感受性色素 (fast voltage-sensitive dye) として知られるようになった。膜電位変化を光学的シグナルに変換する“molecular transducer”として、これらの色素は、(1)光学的シグナルが大きい、すなわちシグナルのS/N比 (signal-to-noise ratio) が大きい、(2)光学シグナルが、静止電位±100 mVの生理学的範囲において2.0 μs以下の速い時定数で膜電位変化に追従する、(3)薬理学的作用、および光毒性が少ない、という特長を有しており、いろいろな種類の標本で速

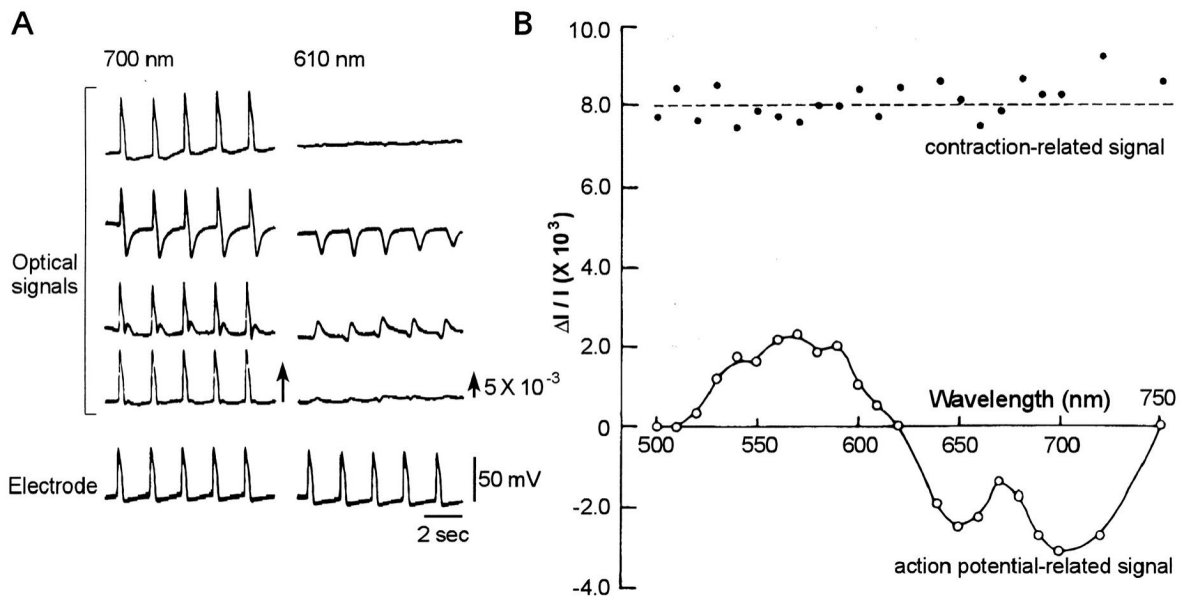


Fig. 2 Wavelength dependence of action potential-related optical signals. A: comparison of time courses of spontaneous action potentials (bottom trace) recorded intracellularly and optical changes recorded from bullfrog atrial preparation stained with a merocyanine-rhodanine dye NK2761. Optical recordings were obtained simultaneously from 4 different areas, using a 700 ± 11 or 610 ± 9 nm interference filter and 10×10 -element photodiode array. Intracellular recording was made with a microelectrode having a resistance of 30 M Ω . Preparation was bathed in a Ca^{2+} -free Ringer solution. Note that the time course of action potential-related optical signal coincides with that of the action potential recorded with the microelectrode, and the action potential signal is completely eliminated at 610 nm, but the contraction-related component remains. In this figure, the outputs of the individual detectors have been divided by the resting light level (DC-background intensity = fractional change $[\Delta I/I]$). Direction of arrows on optical traces indicates a decrease in transmittance, and length of arrows represents stated value of fractional change. B: fractional change in action potential-related optical signal and contraction-related signal as a function of wavelength. Here the optical signals used were of biphasic shape in the range of 610-700 nm and the fractional change of contraction-related signal was relatively larger than that of the action potential signal. Signals were recorded from a bullfrog atrium preparation stained with NK2761 in a Ca^{2+} -free Ringer solution. Graph was made by signals recorded from 1 position of a different preparation from that in A. All the recordings were made in a single sweep at room temperature.

い膜電位変化を測定する目的で現在も用いられている。代表的な膜電位感受性色素の構造式をFig. 1に示す。merocyanine-rhodanine系, merocyanine-oxazolone系, およびoxonol系色素は吸光測定に, oxonol系およびstyryl系色素は蛍光測定に用いられている。

脆弱な発生初期胚の心臓の電気的活動を測定するため, われわれはmerocyanine-rhodanine系色素NK 2761を新たにデザインし日本感光色素研究所(現: 林原生物化学研究所)に合成を依頼した^{27,28)}。その後, この色素は発生初期胚のみならず, 成体の心臓標本においても優れた膜電位感受性色素であることが明らかとなった¹⁻⁵⁾。この色素は分子吸光度が大きいため低濃度で染色することが可能である。また薬理学的作用や光毒性はみられず, 退色しにくい特性を持っている。この特性は, 特に心臓の研究において, 心リズムや不整脈の解析に欠かせない長時間の連続測定を可能にするものであり, この色素の大きな長所といえる。われわれはこの他にもいくつかの新しいmerocyanine-rhodanine系膜電位感受性色素をデザイン・開発している²⁹⁾。

oxonol系膜電位感受性色素RH 155はHildesheimらによって最初に合成されたもので³⁰⁾, われわれの実験でもS/N比の大きな光学的シグナルが得られている。しかしながら, この色素は発生初期胚の心臓において不整脈を発生させる場合がある(酒井, 小室, 廣田, 神野, 未発表データ)。

膜電位感受性蛍光色素としてはRH 421, di-4-ANEPPS, di-8-ANEPPSなどのstyryl系色素が多く用いられている³¹⁻³³⁾。しかし, これらの色素については光毒性の発現が報告されており, 長時間の連続記録をおこなう上では注意が必要となる^{34,35)}。

膜電位変化を反映した光学的シグナルの大きさはfractional change (= [光の強度の変化分] / [背景光強度], $\Delta I/I$) で表されるが, この大きさは測定に用いる光の波長に依存している^{25-27,36,37)}。膜電位感受性色素はそれぞれの色素に特有の波長依存性(action spectrum)を持っている。

NK 2761のaction spectrumはFig. 2 Bに示したように二相性で, 脱分極に対して, 波長520-600 nmで吸

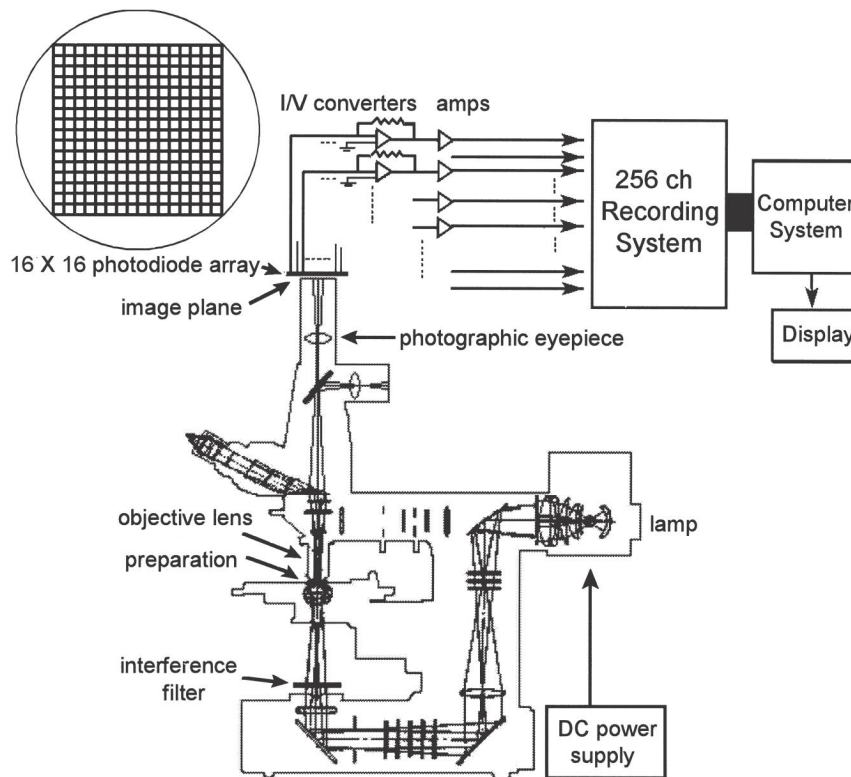


Fig. 3 Schematic diagram of the simultaneous 256-site optical recording system for monitoring changes in transmitted light from the stained preparation. The preparation chamber is mounted on the stage of a microscope. Bright-field illumination is provided by a 300 W tungsten-halogen lamp driven by a stable DC power supply. Incident light is collimated, passed through an interference filter and focused on the preparation by means of a bright-field condenser. The objective and photographic eyepiece project a magnified real image of the preparation onto a 16×16 -element silicon photodiode array. The output of each detector in the diode array was fed to an amplifier via a current-to-voltage (I/V) converter. The amplified outputs from 256 elements of the detector were recorded simultaneously on a PC-based 256-channel recording system.

光が減少し、630-750 nmで増加する。吸光変化は波長610-620 nmで消失し (null-wavelength), 700 nmで最大となる²⁷⁾。Fig. 2 AにNK 2761で染色されたウシガエル心房標本から得られた自発性活動電位に由来する光学的シグナルと細胞内微小電極の同時記録を示す。光学シグナルは100ヶ所からの同時記録のうちの4ヶ所からの記録で、透過光の減少すなわち吸光度の増加が上向きになるように表示してある。筋収縮を低減するため Ca^{2+} を除去したRinger液中での記録である。波長700nmで記録された光学的シグナルには時間経過の異なる二つの成分が含まれている。第1の成分は活動電位と同じ時間経過を取る活動電位由来の成分 (optical action potential) であり、第2の成分はそれより時間経過の遅い筋収縮由来の成分 (movement artefact) である。この筋収縮に由来するアーチファクトは、標本のoptical density, 光散乱, およびreflectanceの変化によるものであり、Fig. 2 Bに示すように波長依存性が少ない。このため、測定波長をnull-wavelengthである610 nmに切り替えることにより膜電位由来の第1の成分は消失し筋収縮由来の成分のみが残る。これにより、光学的シグナルの中に混入して

いる筋収縮由来のアーチファクトを区別することが出来る。筋組織から成る心臓の標本を用いて光学測定をおこなう際には、光学的シグナルにしばしば筋収縮由来のアーチファクトが混入するため、このチェックは重要である。

波長依存性のスペクトルは光学シグナルが膜電位に依存するメカニズムにも関係している。膜電位感受性のメカニズムについてはまだ定説が確立されていない現状であるが、有力な二つの仮説が提唱されている。第一は膜電位により色素のmonomer-dimer平衡が変化するというもので^{38,39)}、もうひとつは色素の発色団における電荷移動 (charge shift) によるものである^{40,41)}。このメカニズムのより詳細な解明は今後の研究に託されているが、より優れた膜電位感受性色素をデザインしていく上でも重要な課題であるといえる。(文献6の総説も併せて参照されたい。)

C. 光学的測定システム

膜電位感受性色素を用いて心臓の電気的活動を光学的に測定するための測定システムとしては、受光素子にフォトダイオードアレイを用いたものの他、CCDカ

メラを用いたもの, fiber opticsを用いたもの, および laser scanning system等の方式のものが挙げられるが²⁾, ここでは, われわれが用いているフォトダイオードアレイを用いたシステムについて解説する.

Fig. 3 に現有する 16×16 素子フォトダイオードアレイを用いた256チャンネル光学的同時測定システム (Hamamatsu Photonics, ARGUS-50/PDA) の模式図を示す. フォトダイオードアレイとは正方形の小さなシリコンフォトダイオードを基盤の目状に並べた受光素子である. われわれはこれまでに単一のフォトダイオード素子を組み合わせた多チャンネル測定システムに始まり, 5×5 素子, 10×10 素子, 12×12 素子, および1020素子のフォトダイオードアレイを用いた光学的多チャンネル同時測定システムを独自に開発し, 使用してきたが^{1,2,6,19,20)}, 基本的にはこれと同じ構造を持っている. 光学系には大型顕微鏡 (Nikon, Fluophoto VFD) を用い, 光源を300 Wタンングステン・ハロゲンランプを用いて強化し直流安定化電源で駆動している. 顕微鏡のステージ上に膜電位感受性色素NK 2761で染色された標本を置き, 下から干渉フィルタによって得られた波長700 nmの準単色光を照射する. 対物レンズと写真用接眼レンズにより作られた実像面上に 16×16 素子のフォトダイオードアレイを置き, 標本上の256ヶ所からの光学的シグナルを同時に電気的シグナルに変換し, 増幅してA/D変換を加えた後, デジタルデータとしてコンピュータシステムに記録する. このシステムを用いることにより, 標本上の256ヶ所の膜電位変化を光学的に同時記録することが可能となる. ラット心房標本を用いた実験では, 光学系の倍率は1倍で, 各フォトダイオード素子 (pixel) は標本上の $550 \times 550 \mu\text{m}^2$ の領域から光学的シグナルを検出している. この測定システムは本来神経系の標本の実験用に設計されているため, 心臓の実験をおこなうに際しては, システム付属のソフトウェアに加え, 自作のソフトウェアを用い, デジタルフィルタによるシグナルのオフライン処理やシグナルのディスプレイをおこなっている⁵⁾.

D. 筋収縮由来のアーチファクト

心臓は筋肉組織であるため, 電氣的興奮に伴い筋細胞の収縮が起こる. この収縮は光学的測定のアーチファクトの大きな原因となる. そのため, 心臓の標本に膜電位の光学的測定を適用する際には, 膜電位依存性のシグナルに筋収縮由来のアーチファクトが重畳してくる. (両者の区別は, 前述のように, null-wavelengthを用いて可能となる.) このアーチファクトをいかに抑制するかが質の良いデータを得るための鍵となる. 電氣的興奮性を変化させずに筋収縮を完全に抑制することが可能ならば, 筋収縮由来のアーチファクトを完全に抑制出来るのであるが, 現実には難しい. そのためいくつかの方法が取られている.

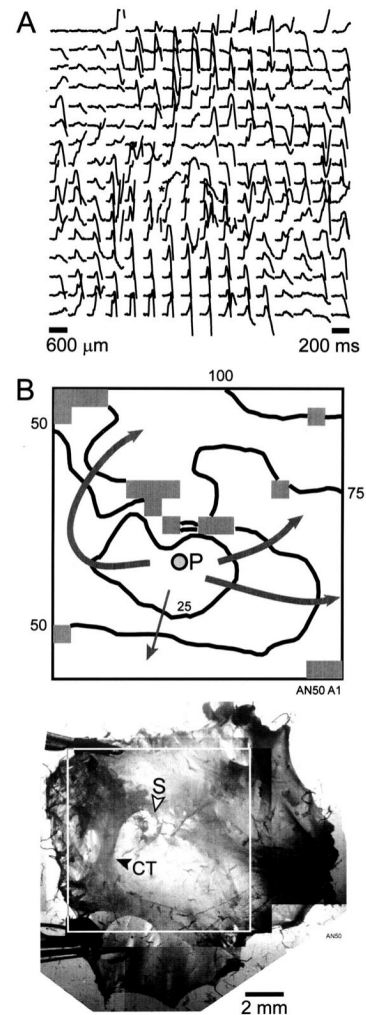


Fig. 4 A: an example of a simultaneous 256-site optical recording display of spontaneous action potential in the isolated rat atrial preparation, using a 256-site optical recording system. The preparation was stained with NK2761 and 703 ± 15 nm interference filter was used. The recording was carried out in 2,3-butanedione monoxime (BDM)-containing (20 mM) solution. The signals are arranged so that their relative positions in the figure correspond to the relative positions of the area of the preparation imaged onto the detectors. In the trace labeled by asterisks, the optical action potential first appeared, indicating that the pacemaker existed in this region. In this recording, the $\times 1$ objective and a $\times 1$ photographic eyepiece projected a $\times 1$ magnified real image of the preparation, so that each trace represents signals detected by one photodiode from a $550 \times 550 \mu\text{m}^2$ compartment of the preparation. A single sweep was recorded. The signals were obtained at room temperature. B: the map of the conduction pattern of spontaneous excitation. The pacemaker area is indicated by the circle labeled by "P". The positions of the wavefront are displayed as isochrone curves at 25 ms intervals. The gray arrows indicate pathway of the spread of the excitatory wave. The gray areas in the maps are the areas where the delay could not be measured due to noise or artefacts. The relative location of the photodiode array (white square) on the image of the preparation is illustrated on the bottom. S and CT indicate the ostium of the superior vena cava and crista terminalis, respectively.

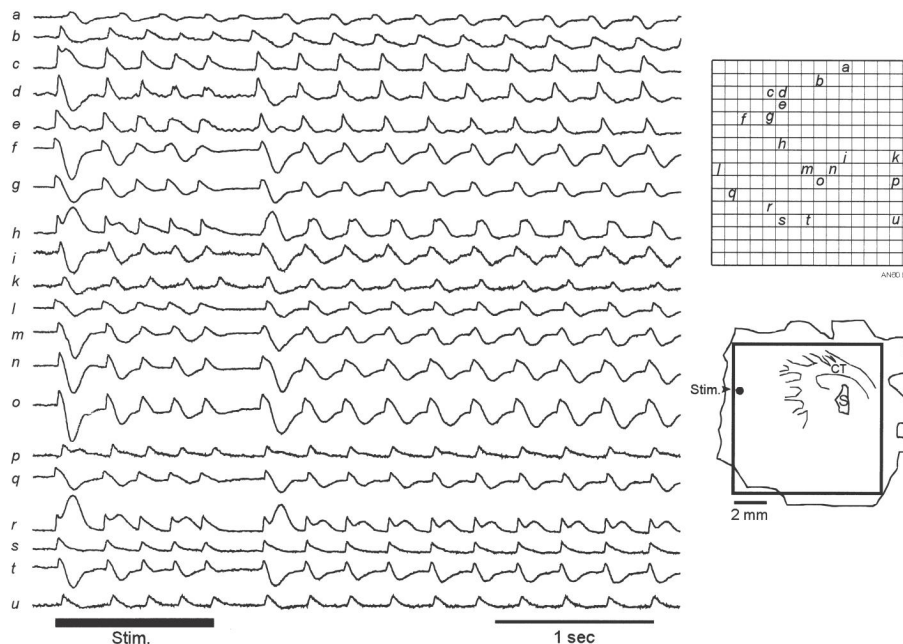


Fig. 5 Multiple-site optical recording of the initiation and the maintenance of tachycardia-like excitation (TE). Action potential-related optical signals were recorded simultaneously from the isolated atrial preparation stained with the merocyanine-rhodanine dye (NK2761) using the 16×16 -element photodiode array. Optical signals detected by 20 elements (a-h, j-u) are displayed. The measurement was made in a single sweep with an interference filter of 702 ± 16 nm at a room temperature. The bar under the traces ("Stim.") indicates the period of tetanus stimulation (10 Hz, 1 sec) for the induction of TE. The drawing to the right illustrates the location of the preparation on the array element. The position of the stimulating electrode is indicated by "Stim.". The relative positions of the photodiode elements are also shown on the right.

最も単純な方法は機械的に収縮を抑える方法である。われわれのカエルおよびラットの心房標本を用いた実験では、標本を出来るだけ伸展した状態でシリコンゴムを張ったチェンバーの底にピンで貼り付けることにより筋収縮を抑制してアーチファクトを低減した³⁻⁵⁾。またSalamaらは心臓全体の標本を2枚のガラス板に挟んで筋収縮によるアーチファクトを抑制している⁴²⁾。

カエルにおいては筋収縮の際の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は興奮に伴う細胞外からの Ca^{2+} の流入に依存している。そのため、細胞外液として Ca^{2+} 濃度の低いRinger液を用いることにより筋収縮を抑制して光学的シグナルのアーチファクトを小さくすることが出来る³⁾。また、われわれはニワトリ胚心臓標本に高浸透圧の細胞外液を用いることにより筋収縮を抑制して光学的測定と細胞内微小電極との同時測定をおこなった^{36,37,43)}。

哺乳類の心臓においては、2,3-butanedione monoxime (BDM, diacetyl monoxime: DAM) が電氣的興奮に大きな影響を与えずに筋収縮を抑制する薬物として知られている⁴⁴⁾。この薬物は光学的シグナルの筋収縮由来のアーチファクトを抑制する目的でわれわれを含めたいくつかの研究グループで用いられているが、興奮性に多少の影響は与えることが知られており、また、その作用機序はまだ充分には明らかにされていない⁴⁵⁾。最近、Zipersらはcytochalasin Dが電氣的興奮性に影響を与えずに

筋収縮由来のアーチファクトを低減することを報告している⁴⁶⁾。この薬物の有効性についてはわれわれもラット心房標本を用いて確認している(酒井, 未発表データ)。

2. 心臓興奮伝播パターンのマッピング

A. ラット 摘出右心房標本

われわれは、膜電位の光学的測定法を哺乳類の心房標本に適用し、興奮伝播パターンの解析をおこなう研究を進めている。実験に用いるのはラットから摘出した右心房標本である。エーテル麻酔したラットから心臓を手早く取り出し、さらに氷温Ringer液中で心房を分離する。左心房と右心耳を切除し、残った右心房をシリコンゴムを敷いたチェンバーの底にタングステン製の細いピンで平面的に展開していく。Fig. 4 下の写真がその一例である。標本は通常、上大静脈開口部("S")を含み、洞房結節を含むcaval areaが中心に位置してcrista terminalis("CT")の筋束を見ることが出来る。この標本を膜電位感受性色素NK 2761で染色して、BDM (20 mM)を含むRinger液中で光学的測定をおこなう。測定は室温でおこなっている。

B. 生理的ペースメーカーからの興奮波伝播パターン⁴⁾

Fig. 4 Aに 16×16 素子フォトダイオードアレイにより256ヶ所から同時記録されたラット摘出右心房標本の

自発性活動電位にともなう光学的シグナルを示す。光学的シグナルの立ち上がり相を中心に表示してあるので、シグナル後半の筋収縮由来のアーチファクトは振り切れている領域が多いが、ほとんどの領域で光学的シグナルの立ち上がり相、すなわち活動電位由来の成分 (optical action potential) を見ることが出来る。シグナルの立ち上がり注目すると、測定領域によってそのタイミングに違いがみられているが、これは興奮の伝播による活動電位の立ち上がりタイミングの違いを反映したものである。シグナルは“*”を付けた領域で最も早く立ち上がっており、この領域がペースメーカーに対応する領域である。それぞれのシグナルの立ち上りのタイミングを測定して、興奮伝播のマップを作成したものが Fig. 4 Bである。

興奮は“P”で示したペースメーカー領域から始まり測定領域全体へと伝播していく。等時線の配列から、興奮波はペースメーカーから等方向性に伝播するのではなく、マップ上の左右の方向に早く伝播し、上下方向の伝播速度はそれより遅いことが読み取れる。この結果は哺乳類の心房で提唱されている“non-radial propagation”の考えを支持するものである^{47,48}。この実験でみられる“preferential route”は、佐野と山岸が報告したウサギのものとは少し異なっている⁴⁸。

C. 実験的心房性不整脈: Tachycardia-like excitation (TE)^{4,5}

ラット 摘出右心房標本では、電気刺激を与えることにより頻拍性の不整脈を誘発することが出来る。Fig. 5は10 Hz/1秒間のtetanus刺激によって誘発された頻拍の一例である。256チャンネルの同時記録のうちの20チャンネル分を表示している。“Stim.”で示された電気刺激の後に、速いリズム (cycle length 約280 ms) で興奮が発現している。このリズムは約1 Hz程度で発現する生理的自発興奮よりもはるかに速いもので、生理的ペースメーカー機構はもはや機能していない。われわれはこの現象を“tachycardia-like excitation”(TE)と呼んでいる。TEはtetanus刺激の他に0.5 - 1 Hzのpacing刺激によっても誘発される。TEのeventの持続時間は1秒程度で自然に終了するものから2時間以上持続するものまで様々である。

Fig. 6はTE発現中の興奮波伝播パターンをマッピングしたものである。256チャンネル同時記録の内の4チャンネルの光学的シグナルをFig. 6 Aに示す。optical action potentialの立ち上りのタイミングをみると $d \rightarrow c \rightarrow b \rightarrow a \rightarrow d$ の順で立ち上がっており、Fig. 6の左下に示された測定領域の並びから見ると興奮波は測定領域を時計周りに伝播していることが示唆される。全ての測定領域についてoptical action potentialの立ち上りのタイミングを計測して作成した興奮波伝播のマップがFig. 6 Bである。このマップから興奮波は、測定領域

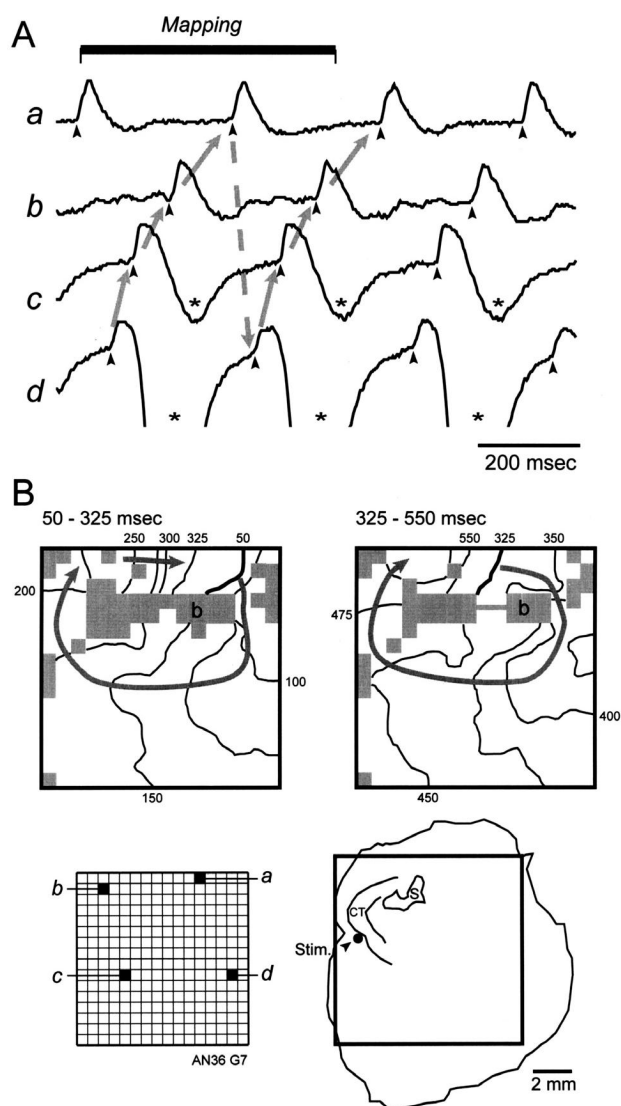


Fig. 6 Optical mapping of the excitation spread pattern during TE. A. action potential-related optical signals detected by four elements of the photodiode array during TE. The arrowheads indicate the upstroke of the optical action potentials and the gray arrows indicate the sequence of the conduction of action potentials ($d \rightarrow c \rightarrow b \rightarrow a \rightarrow d$). The asterisks indicate the contraction-related artefacts. The bar over the traces (“Mapping”) indicates the period of the mapping. B. maps of the spread of the excitation during TE. The maps show the conduction of excitation during the period of 50-325 msec (left) and 325-550 msec (right) after the start of the recording shown in A. The positions of the wavefront are displayed as isochrone curves with intervals of 25 msec. The wavefronts start at the thick isochrone curves indicated by 50 (on the left map) and 325 (on the right map). The gray areas indicated by “b” in the center of the map are the blocked area, over which the excitation could not propagate. At the bottom of the maps, the sketch of the preparation illustrates the location of the preparation on the array element. The relative positions of the photodiode elements are shown on the left bottom. Other conventions as in Fig. 4.

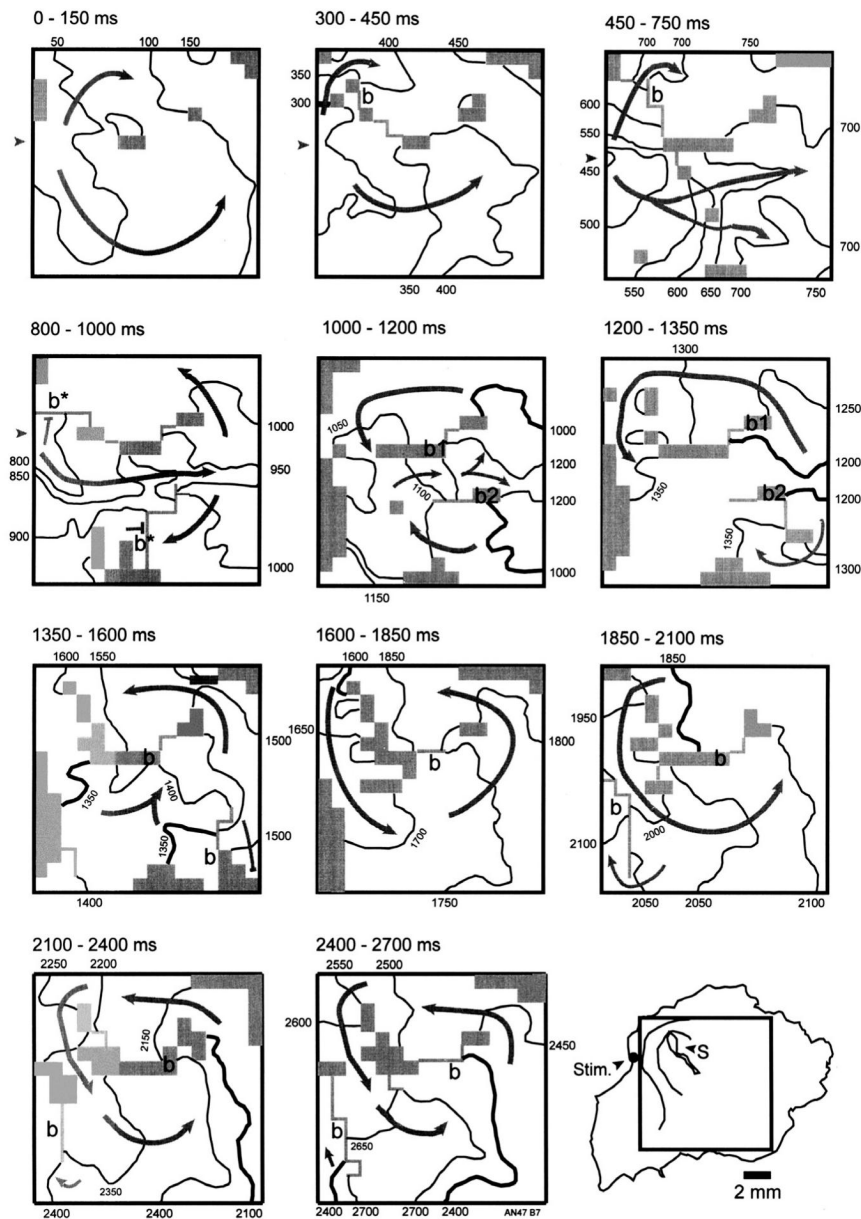


Fig. 7 Optical mapping of the initiation of TE. Sequential maps during the initiation phase of TE are shown. Tetanus stimulation (10 Hz, 1 sec) was applied from time 0 to 1000 ms. Gray arrowheads on the left side of the first four maps indicate the invasion of the action potentials evoked by the stimulation to the recording area. The drawing on the bottom right illustrates the location of the preparation on the array element. The position of the stimulating electrode is indicated by "Stim.". Other conventions as in Figs. 4 and 6. See Text for details.

の中央部に存在する興奮波が越えることの出来ない領域 (blocked area) の周りを時計回りに周回していることが明らかになった。ここで見られたblocked areaは、上大静脈開口部を含み、そこから直線的に伸びている。このような解剖学的障害(多くは上大静脈開口部)を含むblocked areaの周囲をめぐる興奮旋回、すなわちmacro reentryがTEの大多数の例で見られている。TE発現中の興奮伝導パターンとしてはこの他に、少数ではあるが、異所性ペースメーカーによるもの、解剖学的障害を含まないblocked areaの周囲をめぐる興奮旋回、以上のどれでもない複雑なパター

ンを取るもの、が見られている。TE発現中の興奮伝播パターンには標本間のvariationの他に、同一標本においてもTEのeventにより興奮伝播パターンが異なるevent-to-event variationも見られる。

tetanus刺激(10 Hz, 1秒)によるTEの誘発の過程を追跡した一連のマップがFig. 7である。最初のマップ(0-150 ms)では最初の刺激パルスによって起こった興奮波が測定領域の左縁から侵入して約100 mm/sの伝導速度で標本全体に広がっていく。2番目のマップ(300-450 ms)では刺激による第2の興奮波が測定領域に入ってくる

が、等時線の間隔は第1波より狭くなっており、興奮伝導速度が約60 mm/sと遅くなっていることがわかる。さらに測定領域の左上に線状のblocked area (“b”) が現われ、興奮波は上下二つの経路に分かれて広がっていく。第3のマップ(450-750 ms)では刺激による第3の興奮波が入り、第2波と同様に広がるが、伝導速度はさらに低下(20-60 mm/s)している。第4のマップ(800-1000 ms)では拡大したblocked areaが上方の経路を遮断し、もうひとつのblocked areaが測定領域の下側に現われる。刺激による第4の興奮波は遅い速度(約30 mm/s)で測定領域の中央を通り右側で上下の2波に分かれる。刺激が終ると第4のマップで見られた二つのblocked area (“b*”) は消滅し(すなわちunidirectional blockが発現し)、上下に分かれた興奮波は測定領域の左側に再侵入して、上下二つのblocked area (“b 1”, “b 2”) の周りを周回する二つのreentryのリングが一過性に形成される(1000-1350 ms)。その後、下のリングは消滅し(1350-1600 ms)、上大静脈開口部を含むblocked areaの周囲を興奮波が旋回するパターンが形成される(1600 ms以降)。この時の興奮波の伝導速度は約50 mm/sである。このTEのeventは20分以上続いた。TEの誘発の際には、Fig. 7のように、一過性の複雑かつ不安定な興奮伝播パターンの時期を経て安定した興奮旋回のパターンに移行するケースがしばしば見られた。

これまでの実験結果からTE発現の過程は次のようにまとめられる。

1. 頻回の興奮により伝導速度が低下し、不安定なblocked areaが発現する。
2. 一過性の不安定な興奮旋回がblocked areaの周囲で始まる。
3. 初期の興奮旋回の過程で、blocked areaが安定化して来る。
4. 安定したblocked areaの周囲を安定した興奮旋回が持続する。

伝導速度の低下およびblocked area発現の機構についてはまだ明らかではないが、Fig. 7に示したように、この現象が頻回の興奮に伴い段階的に発現して来ることから、細胞内Ca²⁺濃度の上昇と、その結果引き起こされる心筋細胞間のgap junction channelのコンダクタンスの低下が関与していることが示唆される⁴⁹⁾。

臨床的には、大血管開口部の周囲を興奮波が旋回するmacro reentryは心房粗動の発現機構と考えられている⁵⁰⁾。TEは摘出されたラット心房標本において発現する頻拍状態であり、その機構は上大静脈孔の周囲を旋回するmacro reentryである。両者を比較する上では、ヒトとラットとの活動電位の波形と発現機構(関与するイオンチャネル)の違いや、intact whole heartと摘出標本との違いなどを考慮する必要があるが、われわれは、心房におけるmacro reentryの*in vitro* modelとして、TEを心房粗動とanalogousな現象と考えている。TEが発現する摘出心

房標本は単純な平面的構造を持っており、時間的・空間的分解能に優れた光学的マッピングに適していることはこの実験系の大きな利点である。臨床電気生理学的、薬理学的なアプローチをも含めた、この実験系を用いたより詳細な研究が、われわれの今後の課題である。

むすび

膜電位の光学的測定法は決して完成された実験技術ではなく、オプトエレクトロニクスやコンピュータサイエンスの進歩に加えて新しい膜電位感受性色素の開発を含めて日々新しくなっていく技術である。われわれは、最新の実験技術を駆使しながら、心臓を主なターゲットと見据えて、生理学・病態生理学の新たな研究のフロントを拓いていきたいと考えている。

文 献

- 1) Kamino K.: Optical approaches to ontogeny of electrical activity and related functional organization during early heart development. *Physiol. Rev.* 71: 53-91, 1991.
- 2) Sakai T. and Kamino K.: Optical mapping approaches to cardiac electrophysiological functions. *Jpn. J. Physiol.* 51: 1-18, 2001.
- 3) Komuro H., Sakai T., Hirota A. and Kamino K.: Conduction pattern of excitation in the amphibian atrium assessed by multiple-site optical recording of action potentials. *Jpn. J. Physiol.* 36: 123-137, 1986.
- 4) Sakai T., Hirota A., Momose-Sato Y., Sato K. and Kamino K.: Optical mapping of conduction patterns of normal and tachycardia-like excitations in the rat atrium. *Jpn. J. Physiol.* 47: 179-188, 1997.
- 5) Sakai T.: Optical mapping of the spread of excitation in the isolated rat atrium during tachycardia-like excitation. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 447: 280-288, 2003.
- 6) 神野耕太郎: ニューロン活動の光学的測定の背景と展開. *神経科学レビュー* 5: 155-187, 1991.
- 7) Cohen L.B., Keynes R.D. and Hilié B.: Light scattering and birefringence changes during nerve activity. *Nature (Lond.)* 218: 438-441, 1988.
- 8) Tasaki I., Watanabe A., Sandlin R. and Carnay L.: Changes in fluorescence, turbidity, and birefringence associated with nerve excitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61: 883-888, 1968.
- 9) Kobatake Y., Tasaki I. and Watanabe A.: Phase transition in membrane with reference to

- nerve excitation. *Adv. Biophys.* 2: 1-31, 1971.
- 10) Davila H.V., Cohen L.B., Salzberg B.M. and Shrivastav B.B.: Changes in ANS and TNS fluorescence in giant axons from *Loligo*. *J. Membrane Biol.* 15:29-46, 1974.
 - 11) Salzberg B.M., Davila H.V., Cohen L.B. and Waggoner A.S.: A large change in axon fluorescence, potentially useful in the study of simple nervous systems (Abstract). *Biol. Bull. (Woods Hole)* 143: 415, 1972.
 - 12) Salzberg B.M., Grinvald A., Cohen L.B., Davila H.V. and Ross W.N.: Optical recording of neuronal activity in an invertebrate central nervous system: simultaneous monitoring of several neurons. *J. Neurophysiol.* 40: 1281-1291, 1977.
 - 13) Waggoner A.: Optical probes of membrane potential. *J. Membrane Biol.* 27: 317-334, 1976.
 - 14) Cohen L.B., Salzberg B.M. and Grinvald A.: Optical methods for monitoring neuron activity. *Annu. Rev. Neurosci.* 1: 171-182, 1978.
 - 15) Salzberg B.M.: Optical recording of electrical activity in neurons using molecular probes: Current Methods in Cellular Neurobiology. vol. 3, *Electrophysiological Techniques* (Barber J.L. ed.) pp. 139-187, Wiley, New York, 1983.
 - 16) Grinvald A., Frostig R.D., Lieke E. and Hildesheim R.: Optical imaging of neuronal activity. *Physiol. Rev.* 68: 1285-1366, 1988.
 - 17) Cohen L.B. and Salzberg B.M.: Optical measurement of membrane potential. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 83:35-88, 1978.
 - 18) Grinvald A., Cohen L.B., Leshner S. and Boyle M.B.: Simultaneous optical monitoring of activity of many neurons in invertebrate ganglia using a 124-element photodiode array. *J. Neurophysiol.* 45:829-840, 1981.
 - 19) Kamino K., Hirota A. and Komuro H.: Optical indications of electrical activity and excitation-contraction coupling in the early embryonic heart. *Adv. Biophys.* 25: 45-93, 1989.
 - 20) Kamino K.: Optical studies of early developing cardiac and neural activities using voltage-sensitive dyes. *Jpn. J. Physiol.* 40:443-461, 1990.
 - 21) Tung L., Neunlist M. and Sobie E.A.: Near-field and far-field stimulation of cardiac muscle: Progress in Biomedical Optics: Proceedings of Clinical Applications of Modern Imaging Technology II (Cerullo L.J. *et al* eds.), pp. 367-374, SPIE, Bellingham WA, USA, 1994
 - 22) Dillon S.M.: Optical recording for investigating electrical defibrillation: Progress in Biomedical Optics: Proceedings of Clinical Applications of Modern Imaging Technology II (Cerullo L.J. *et al* eds.), pp. 387-396, SPIE, Bellingham WA, USA, 1994.
 - 23) Knisley S.B. and Hill B.C.: Fluorescence mapping of transmembrane potentials during cardiac stimulation: Progress in Biomedical Optics: Proceedings of Clinical Applications of Modern Imaging Technology II (Cerullo L.J. *et al* eds.), pp. 397-406, SPIE, Bellingham WA, USA, 1994
 - 24) Cohen L.B., Salzberg B.M., Davila H.V., Ross W.N., Landowne D., Waggoner A.S. and Wang C.H.: Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential. *J. Membrane Biol.* 10:1-36, 1974.
 - 25) Ross W.N., Salzberg B.M., Cohen L.B., Grinvald A., Davila H.V., Waggoner A.S. and Wang C.H.: Changes in absorption, fluorescence, dichroism, and birefringence in stained giant axons: optical measurement of membrane potential. *J. Membrane Biol.* 33:141-183, 1977.
 - 26) Gupta R.K., Salzberg B.M., Grinvald A., Cohen L.B., Kamino K., Leshner S., Boyle M.B. and Waggoner A.S. and Wang C.H.: Improvements in optical methods for measuring rapid changes in membrane potential. *J. Membrane Biol.* 58: 123-137, 1981.
 - 27) Fujii S., Hirota A. and Kamino K.: Action potential synchrony in embryonic precontractile chick heart: optical monitoring with potentiometric dyes. *J. Physiol. (Lond.)* 319: 529-541, 1981.
 - 28) Kamino K., Hirota A. and Fujii S.: Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. *Nature (Lond.)* 290: 595-597, 1981.
 - 29) Momose-Sato Y., Sato K., Sakai T., Hirota A., Matsutani K. and Kamino K.: Evaluation of optimal voltage-sensitive dyes for optical monitoring of embryonic neural activity. *J. Membrane Biol.* 144: 167-176, 1995.
 - 30) Grinvald A., Hildesheim R., Guputa R. and Cohen L.B.: Better fluorescent probes for optical measurement of changes in membrane potential (Abstract). *Biol. Bull. (Woods Hole)* 159: 484, 1980.
 - 31) Grinvald A., Fine A., Farber I.C. and Hildesheim R.: Fluorescence monitoring of electrical responses from small neurons and their processes. *Biophys. J.* 42: 195-198, 1982.

- 32) Loew L.M., Cohen L.B., Dix J., Fluhler E.N., Montana V., Salama G. and Wu J.Y.: A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations. *J. Membrane Biol.* 130:1-10, 1992.
- 33) Bedlack Jr. R.S., Wei M. and Loew L.M.: Localized membrane depolarizations and localized calcium influx during electric field-guided neurite growth. *Neuron* 9: 393-403, 1992.
- 34) Schaffer P., Ahammer H., Müller W., Koidl B. and Windisch H.: Di-4-ANEPPS causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 426: 548-551, 1994.
- 35) Obaid A.L., Koyano T., Lindstrom J., Sakai T. and Salzberg B.M.: Spatiotemporal patterns of activity in an intact mammalian network with single-cell resolution: optical studies of nicotinic activity in an enteric plexus. *J. Neurosci.* 19: 3073-3093, 1999.
- 36) Fujii S., Hirota A. and Kamino K.: Optical signals from early embryonic chick heart stained with potential sensitive dyes: evidence for electrical activity. *J. Physiol. (Lond.)* 304: 503-518, 1980.
- 37) Fujii S., Hirota A. and Kamino K.: Optical recording of development of electrical activity in embryonic chick heart during early phases of cardiogenesis. *J. Physiol. (Lond.)* 311: 147-160, 1981.
- 38) Waggoner A.S. and Grinvald A.: Mechanism of rapid optical changes of potential sensitive dyes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 303: 217-242, 1977.
- 39) Wolf B.E. and Waggoner A.S.: Optical studies of the mechanism of membrane potential sensitivity of merocyanine 540: *Optical Methods in Cell Physiology* (De Weer P. and Salzberg B.M. eds.), pp. 101-113, Wiley-Interscience, New York, 1986.
- 40) Loew L.M. and Simpson L.L.: Charge-shift probes of membrane potential: a probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on hemispherical lipid bilayer. *Biophys. J.* 34: 353-365, 1981.
- 41) Fluhler E., Burnham V.G. and Loew L.M.: Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry* 24: 5749-5755, 1985.
- 42) Kanai A. and Salama G.: Optical mapping reveals that repolarization spreads anisotropically and is guided by fiber orientation in guinea pig hearts. *Circ. Res.* 77: 784-802, 1995.
- 43) Hirota A., Fujii S. and Kamino K.: Optical monitoring of spontaneous electrical activity of 8-somite embryonic chick heart. *Jpn. J. Physiol.* 29: 635-639, 1979.
- 44) Li T., Sperelakis N., Ten Eick R.E. and Solaro R.J.: Effects of diacetyl monoxime on cardiac excitation-contraction coupling. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 232: 688-695, 1985.
- 45) Sellin L.C. and McArdle J.J.: Multiple effects of 2,3-butanedione monoxime. *Pharmacol. Toxicol.* 74: 305-313, 1994.
- 46) Wu J., Biermann M., Rubart M. and Zipes D.P.: Cytochalasin D as excitation-contraction uncoupler for optically mapping action potentials in wedges of ventricular myocardium. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 9: 1336-1347, 1998.
- 47) James T.N.: The connecting pathways between the sinus node and A-V node and between the right and left atrium in the human heart. *Am. Heart. J.* 66: 498-508, 1963.
- 48) Sano T. and Yamagishi S.: Spread of excitation from the sinus node. *Circ. Res.* 16: 423-430, 1965.
- 49) Spray D.C., Stern J.H., Harris A.L. and Bennett M.V.L.: Gap-junctional conductance: comparison of sensitivities to H and Ca ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 441-445, 1982.
- 50) Waldo A.L.: Atrial flutter: Mechanisms, clinical features, and management: *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside*, 2nd ed. (Zipes D.P., Jalife J. eds.), pp. 666-681, W. B.

Saunders Co., Philadelphia, 1995.