

しかし、以上のこれまでの研究の中では ACh によって誘導されるどのようなものが、これまでの表現型の発現に関与するのか、つまり ACh 情報伝達系の中にあつて ACh の受容体結合後の重要な仲介因子は何か不明であった。一方で、心筋細胞レベルの短期的な虚血耐性獲得機構は明らかになったものの、より長期的低酸素刺激から心筋細胞を守る ACh の作用として、血管新生作用の可能性とその詳細については不明である。そこで、この二点を明らかにすることが、今回の研究の目的である。

B. 研究方法

B-1. NO ドナーによる心筋細胞の反応に関する研究

ACh 刺激後に NO 産生が心筋細胞レベルで起こることは、産生された NO を可視化する NO インジケーター-DAF-2/DA を用いて、その予備実験の段階で明らかであった。そこで ACh の代わりに、セカンドメッセンジャーである NO 自身が、ACh の情報伝達系において主要な役割をもつかどうかを調べるために、新生児ラット培養心筋細胞を用いて、NO ドナーである S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) でも同様に NO 産生が認められるかを検討した。1 μ M SNAP を心筋細胞に添加し、NO イメージングを行った。またこの作用が NO 特異的か否かを検討するため、NO 合成阻害剤である L-NAME (1mM) を用いてこの反応が遮断されるかを検討した。

B-2. NO ドナー刺激によって誘導される、心筋細胞由来物質の血管新生作用に関する研究

ACh の心筋細胞に対する作用効果にはその経過時間により (分および時間単位) さまざまなものが含まれる。これまで明らかにしてきたように、非低酸素状態であっても ACh により活性化される HIF-1 α は、さらにその下流の遺伝子群を制御しているが、その代表的な

のとして vascular endothelial growth factor (VEGF) が存在する (図 1)。

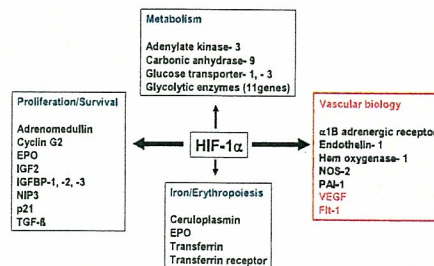


図 1 HIF-1 α により制御される下流遺伝子

さて、血管新生はさまざまな因子が時間的・空間的な相違とともに複合的に関与し生じるものであり、その因子の由来については、必ずしも血管内皮細胞由来のみではないことが最近報告されはじめています。そこで、NO にもそのような ACh と同様な効果が存在するか否かを調べるため、NO ドナーの心筋細胞での VEGF 産生能の有無を検討し、最終的に血管新生につながるか否かをヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討した。

1) NO ドナー-SNAP (1 μ M) による心筋細胞での VEGF 産生能の有無をウェスタンブロット法や免疫染色法で検討した。またこの VEGF 産生が、NO 特異的か否かを検討するために、L-NAME (1 mM) 存在下で心筋での VEGF 発現が Akt を介して抑制されるか否かを調べた。

2) 1 μ M SNAP で一定時間心筋細胞を処理し、その後 SNAP を完全除去するために新しい培地に交換、その後心筋細胞培養を続行し一定時間後に培養上清を採取し、それを 50% 濃度になるように HUVEC 培地 (DMEM、20% FBS、25 μ g/ml ECGS、10U/ml ヘパリン) の中に添加した。96 ウェルプレート上にマトリゲルをコート (50 μ L) し、その上に 1×10^4 個の HUVEC を播種し、HUVEC を上記のように調整した混合培地の中で培養した。SNAP 処理および無処理の違い (SNAP 処理心筋細胞培養培地が混合さ

れているか否かの違い) でチューブフォーメーションの形成過程に対する影響を、比較検討した。また VEGF 受容体の一つである Flk-1 のリン酸化の有無をウェスタンブロット法で検討した。

C. 研究結果

C-1. NO ドナーによる心筋細胞の反応に関する研究

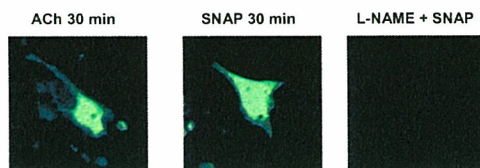


図2 NOドナーは、ACh同様に短時間で心筋細胞でのNO産生を調節するが、NO合成阻害剤で抑制される

血管新生促進因子の中の重要な因子の一つは VEGF があるが、最終的に心筋細胞自身に血管新生関連因子の産生能があるか否かを調べる目的で、最初に ACh の刺激情報伝達系における NO の関与を SNAP で心筋細胞を刺激することで調べた。

NO インジケータである DAF-2 を用いたところ、ACh と同様 NO ドナー (SNAP) は心筋細胞作用後 30 分以内という比較的早い時間経過で、細胞質内の蛍光強度を上昇させた。これは心筋細胞内での NO 産生が亢進したことを示唆した (図 2)。一方、L-NAME で前処理を行った心筋細胞では、たとえ L-arginine 存在下であっても蛍光強度の上昇は認められず、L-NAME は SNAP による NO 産生誘導を抑制した (図 2)。

さらに、NO ドナーはこの時心筋細胞での VEGF 発現を増加させることが、免疫染色およびウェスタンブロット法により明らかとなった (図 3)。

またこの NO ドナーは、細胞生存シグナルとして重要なリン酸化酵素の一つである Akt にも影響することが示唆された。

Control

VEGF



SNAP

VEGF

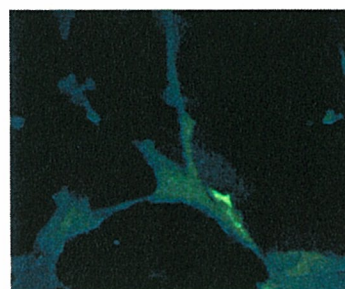


図3 心筋細胞で VEGF は SNAP により産生される

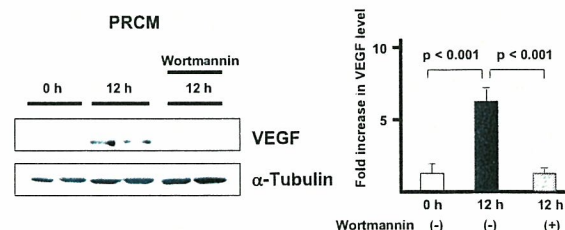


図4 NOドナーは、PI3K/Aktを介して心筋細胞での VEGF 発現を増加させる

すなわち SNAP は心筋細胞にはたらき VEGF を発現させるのであるが、この Akt リン酸化が VEGF 発現に必要な不可欠であることが明らかとなった (図 4)。その根拠は PI3K 抑制剤であ

る wortmannin により Akt リン酸化を抑制すると、VEGF の心筋細胞での発現が完全に抑制されたからである。一方で L-NAME によっても、wortmannin 同様に

Akt リン酸化が同程度に抑制されたことから、SNAP には NO を介し細胞生存シグナル Akt を活性化させ、その結果として VEGF を心筋細胞で産生させる効果があることが示唆された (図 5)。

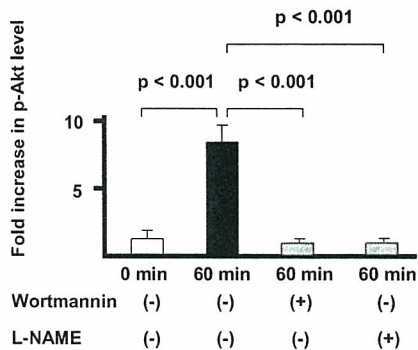


図 5 NO ドナーは、細胞生存シグナル PI3K/Akt を活性化化する

さらに、NO ドナーは ACh と同様に、HIF-1 α をその非低酸素経路により誘導した。すなわち正常酸素濃度 (21%) での心筋細胞培養条件下であっても、SNAP は HIF-1 α 蛋白発現を上昇させたのである (図 6)。

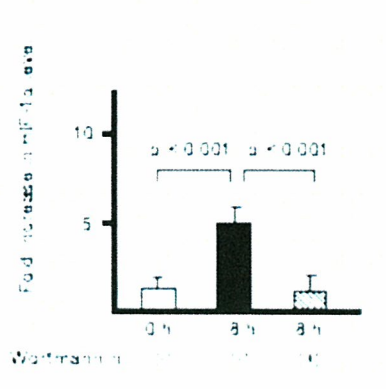


図 6 NO ドナーは、ACh 同様非低酸素条件下においても心筋細胞での HIF-1 α 蛋白を発現させる

以上の結果から、これまで我々の研究室が明らかにしてきた ACh の非低酸素経路による HIF-1 α の誘導、そしてその下流遺伝子の一つである VEGF の心筋細胞での発現亢進作用という一連の情報伝達経路とまさしく同じ経路を、SNAP も用いていることが明らかとなった。先にも示したように、SNAP による VEGF 発現は PI3K/Akt 抑制剤である wortmannin を用いても (図 4)、さらには HIF-1 α の dominant negative form (dnHIF-1 α) でも抑制された (図 7)。

以上をまとめると心筋細胞における SNAP による VEGF 発現には、NO 合成系に加えて PI3K/Akt/HIF-1 α が必須であることが示唆された。

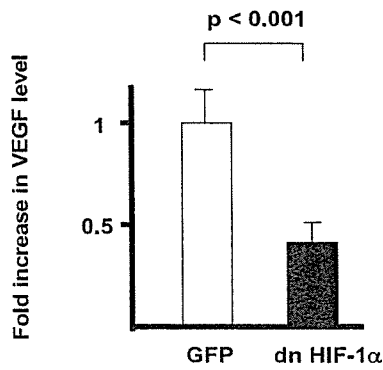


図7 NO ドナーによる心筋細胞での VEGF 発現は HIF-1 α に依存している

それでは、NO ドナーにより心筋細胞で産生された VEGF は、その後どのような機能を発揮するのであるか？

SNAP 処理した心筋細胞培地の一部を HUVEC に作用させ Flk-1 に影響があるか否かを確認するために、培養心筋細胞の培地上清を HUVEC へ添加したときの Flk-1 のリン酸化について検討した。Flk-1 は数種類の VEGF 受容体のうち、特に血管新生に関わる受容体として知られており、VEGF type 2 受容体または KDR として呼ばれている。この受容体にリガンドが作用するとその結果として Flk-1 がリン酸化されるのである。結果としては図8・図9のように SNAP 処理心筋細胞の培地上清は、HUVEC の Flk-1 リン酸化を起こした。一方、SNAP 非処理培地上清では、Flk-1 のリン酸化は認められなかった。

以上から心筋細胞に NO ドナーが作用すると、心筋細胞自身から VEGF が産生され、それがおそらく paracrine に HUVEC の VEGF 受容体 Flk-1 に作用し、VEGF のシグナルを血管内皮細胞に伝えることが示唆された。すなわち心筋細胞由来物質に血管新生促進作用物質が含まれるという可能性が示唆された。

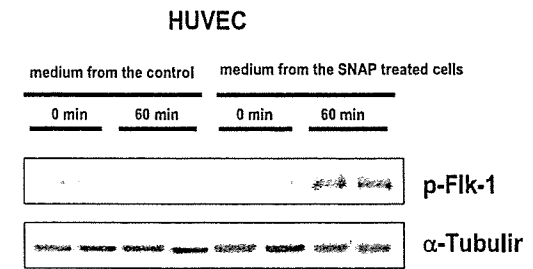


図8 心筋細胞由来 VEGF は HUVEC にはたらいて VEGF 受容体 Flk-1 をリン酸化する

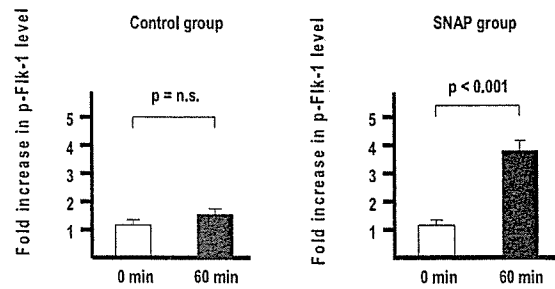
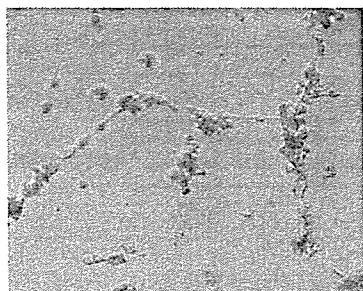


図9 心筋細胞培養培地には、VEGF 受容体にはたらき血管新生に重要な Flk-1 受容体を活性化させる (図6の定性的評価)

C-2. NO ドナー刺激によって誘導される、心筋細胞由来物質の血管新生作用に関する研究

図8・図9で示されたように、SNAP で処理し、その後完全に SNAP を洗い流した後、新たな培地に交換し12時間以上経過した心培養上清には、VEGFをはじめとするさまざまな血管新生促進物質が含まれることが示されたが、本当にこれは血管新生作用をもつのであろうか。マトリゲルを用いた HUVEC 培養法を用いることで、心筋細胞培養上清中に何らかの血管新生因子が含まれれば、無添加の場合と比較して、チューブフォーメーションに差が認められることが予想された。

Control group



SNAP group

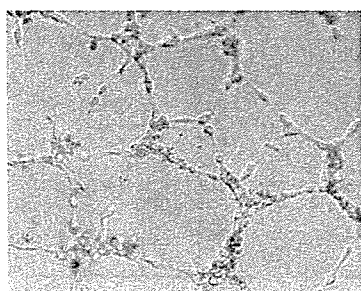


図 10 NO ドナー処理した心筋細胞培養培地には、チューブフォーメーション促進効果が存在する

図 10 のように HUVEC のチューブフォーメーションが促進された。これは、SNPA 非処理培養上清と比較しても明らかに、チューブの長さ、および分岐の多さにおいて顕著な差が認められた。

図 10 より明らかなように、SNAP 由来培地添加群では、チューブフォーメーションの促進が認められた。すなわち、より分岐の多い網目様構造をもった血管内皮細胞のチューブフォーメーションがより顕著に認められた。

以上より、心筋細胞由来の物質が、少なくとも VEGF を含めて、血管新生促進作用に関与することが示唆された。もちろん VEGF 以外のその他の物質が NO ドナー処理心筋細胞より産生された可能性は否定できない。

D. 考察

D-1. NO ドナーによる心筋細胞の反応に関する研究

本研究助成期間において当研究室では、主に副交感神経系神経伝達物質として、新規の ACh 心筋細胞直接作用を明らかにしてきた。その作用は主にムスカリン受容体を介するが、そのセカンドメッセンジャーとして NO が関与していることが今回の研究結果で明らかとなった。ACh の新規生物学的作用の一つとして、PI3K/Akt/HIF-1 α を活性化させた心筋保護作用が証明されたが、NO はこれと同じ経路を用いて同様の心筋保護作用をもつことが明らかとなったが、これは ACh の心筋保護作用が実際は NO に多く依存することを示唆している。

一方、これまで多くの先行研究で NO の心臓または心筋細胞への作用が調べられてきた。そのうち NO の直接作用として、NO 合成酵素基質要求量や NO 産生量の違いに応じて、NO は細胞障害作用または細胞保護作用のどちらかを持つことが実験条件や細胞種の違いによって報告されてきている。このような細胞保護と傷害作用という相反する作用がどのようにして生じるかその詳細なメカニズムはいまだ明らかではないが、しかし、NO の細胞保護作用さらには血管新生作用については、NO 合成酵素遺伝子欠損マウスを用いた研究結果などにより、おおよそ一致した見解であるといえる。以上より、NO ドナーを用いた心筋細胞反応の研究から、NO が NO 合成系、PI3K/Akt/HIF-1 α を介して心筋細胞保護作用シグナルを ACh と同様に活性化させることが示唆された。

D-2. NO ドナー刺激によって誘導される、心筋細胞由来物質の血管新生作用に関する研究

特に虚血性心疾患に代表される心臓疾患における血管新生療法は、血管再生を促進させ、より多くの機能的新生血管を形成し、虚血に暴露された心筋細胞を効率よくレスキューするという意味において、非常に重要な治療選

択の一つである。これまで血管内皮細胞を用いた血管新生に関する多くの研究から、血管新生に関与する主要な因子が報告されてきた。一方で、心臓における冠動脈支配分布を見てみるとその末梢にいたるまで、解剖学的に末梢冠動脈はその周囲を心筋によって囲まれている。したがって一心臓あたりに占める構成細胞成分の容積比で比較すると、圧倒的に血管組織よりも心筋組織の方が多いことが知られている。したがって、この事実をもとにして考えた場合、心臓における血管新生を促すときには、血管側からのアプローチによる血管新生に加え、その周囲にある心筋からの血管新生への影響をも考慮に入れることが重要であると考えられる。

そこで、我々はこれを調べるために、*in vitro* における心筋細胞と血管内皮細胞の共培養系を用いた。この系では、まず初代心筋細胞培養を通常通り行い、この心筋細胞を NO ドナーである SNAP で短時間処理し、その後完全に SNAP を含有した培養上清を新しい培地に置換することで、添加した SNAP の影響を無視できるようにしたものである。したがって、この培養法は、SNAP 刺激後あらためて心筋細胞で発現、産生され、培養心筋細胞の培地中に放出されたものの中に、血管内皮細胞のチューブフォーメーション促進効果をもつものが含有されているか否かをバイオアッセイとして探索するものである。

その結果、培養上清中に血管新生に重要な VEGF 受容体、Flk-1 (VEGF type 2 受容体) のリン酸化が、SNAP 刺激後の培養上清によってのみ誘導された。このことは、少なくともこの培養上清中に心筋細胞から産生され放出された VEGF が含有されることを強く示唆するものである。さらにこれを確認するために、チューブフォーメーションのアッセイを行ったところ、同様にこの培養上清のみに、形成促進効果が確認された。

以上のことから、NO ドナーによって刺激さ

れた心筋細胞からは、明らかに機能的にも血管新生促進作用物質が産生されるということ、そしてこれが paracrine 的に血管内皮細胞にはたらいたことが明らかになった。

E. 結論

今回の研究により、VEGF を含む心筋細胞由来因子が心筋細胞より産生され paracrine/autocrine 作用により、近隣の血管内皮細胞にはたらき血管新生を促進することが明らかとなった。この一連の情報伝達系には、一酸化窒素 (NO) が関与することがさらに明らかとなった。以上より本研究によって、ACh は細胞生存シグナルを活性化させると同時に心臓での血管新生促進に関与することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 著書・総説

1. 山崎文靖, 西永正典, 杉浦哲朗, 佐藤隆幸. PWV に影響しうる要因とその機序. 血圧. 宗像正徳 編集. 「PWVを知る PWVで診る」中山書店; 2006. p67-71.
2. 佐藤隆幸, 砂川賢二. バイオニック治療戦略. 循環器専門医 2006;14: 9-15.

G-2. 論文

1. Takaki H, Sakuragi S, Nagaya N, Suzuki S, Goto Y, Sato T, Sunagawa K. Postexercise VO_2 "Hump" phenomenon as an indicator for inducible myocardial ischemia in patients with acute anterior myocardial infarction. *Int J Cardiol*

- 2006;111:67-74.
2. Zhang Y, Kakinuma Y, Ando M, Katare RG, Yamasaki F, Sugiura T, Sato T. Acetylcholine inhibits the hypoxia-induced reduction of connexin43 protein in rat cardiomyocytes. *J Pharmacol Sci* 2006;101:214-222.
 3. Kuwabara M, Kakinuma Y, Ando M, Katare RG, Yamasaki F, Doi Y, Sato T. Nitric oxide stimulates vascular endothelial growth factor production in cardiomyocytes involved in angiogenesis. *J Physiol Sci* 2006;56:95-101.
 4. Yamasaki F, Ushida T, Yokoyama T, Ando M, Yamashita K, Sato T. Artificial baroreflex: Clinical application of a bionic baroreflex system. *Circulation* 2006;113:634-639.

G-3.学会発表

1. 佐藤隆幸. 迷走神経刺激の不全心・虚血心に対する抗リモデリング効果とその機序. *生体医工学* 2006;44:109. 第45回日本生体医工学会大会 福岡 (2006.05.15-17)
2. 杉町勝, 川田 徹, 宍戸稔聡, 李 梅花, 鄭 燦, 佐藤隆幸, 砂川賢二. バイオニック心臓病学: 循環調節の機能再建と異常是正. *生体医工学* 2006;44:124. 第45回日本生体医工学会大会 福岡 (2006.05.15-17)
3. Yamasaki F, Okamura T, Kawamura M, Sato K, Doi Y, Sugiura T, Sato T. Brachial compression by air cuff: Assessed by multi-dimensional CT. *J Clin Hypertens* 2006;8 Suppl:A132. American Society of Hypertension 21st Annual Scientific Meeting and Exposition, New York, USA. (2006.05.16-20)
4. 佐藤隆幸. 人工的動脈圧反射: バイオニック装置の臨床応用. *循環制御* 2006;27 Suppl:37. 第27回日本循環制御医学会総会. 東京 (2006.05.19-20)
5. 李 梅花, 鄭 燦, 川田 徹, 稲垣正司, 佐藤隆幸, 砂川賢二, 杉町 勝. 迷走神経電気刺激治療は心筋梗塞後心不全ラットのバゾプレッシン分泌と食塩摂取量を抑制する. *循環制御* 2006;27 Supple:64. 第27回日本循環制御医学会総会. 東京 (2006.05.19-20)
6. カレ ラジ エヌ, 山崎文靖, 佐藤隆幸. 迷走神経刺激はミトコンドリア膜の透過移行孔の開口を抑制して虚血再灌流傷害から心筋を保護する. 第7回 Neurocardiology Workshop. 東京 (2006.07.22)
7. 鄭 燦, 李 梅花, 川田 徹, 杉町勝, 佐藤隆幸. 塩酸ドネペジル(アリセプト) は心筋梗塞ラットの心室リモデリングを抑制し生存率を改善させる. 第7回 Neurocardiology Workshop. 東京 (2006.07.22)
8. 山崎文靖, 牛田享宏, 横山武志, 山下幸一, 安藤元紀, 佐藤隆幸. 侵襲的, 非侵襲的人工圧受容器反射装置. 第7回 Neurocardiology Workshop. 東京 (2006.07.22)
9. 佐藤隆幸. 「起立性低血圧の病態を考える」-ヒト圧反射の平衡線図解析によるアプローチ. 第7回 Neurocardiology Workshop. 東京 (2006.07.22)
10. 安藤元紀, 山崎文靖, 佐藤隆幸. 不規則チルト法と平衡線図解析法を用いた圧受容器反射機能の評価. 第59回日本自律神経学会総会. 東京 (2006.11.1-3)
11. 山崎文靖, 牛田享宏, 横山武志, 山下幸一, 安藤元紀, 佐藤隆幸. 脊髄刺激による血圧制御. 第59回日本自律神経学会総会. 東

- 京 (2006.11.01-03)
12. 佐藤隆幸. 人材は人財. 日本人工臓器学会 2006;35:S-60. 第 44 回日本人工臓器学会大会. 横浜 (2006.10.31-11.2)
 13. Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T. Engineered heart tissue - a novel tool for studying the acute ischemia induced changes in-vitro. Circulation 2006;114 Suppl II:12. 79th Annual Scientific Sessions of American Heart Association, Chicago, USA (2006.11.12-15)
 14. Ando M, Katare RG, Kakinuma Y, Yamasaki F, Sato T. Intermittent stretch-induced formation of gap junction between fibrocytes and cardiomyocytes improves dyssynchronous contraction in circular engineered heart tissue. Circulation 2006;114 Suppl II:80. 79th Annual Scientific Sessions of American Heart Association, Chicago, USA (2006.11.12-15)
 15. Arikawa M, Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Yamasaki F, Davidson MM, Sato T. Electrophysiological characterization of artificially-arranged human myocardial cells. Circulation 2006;114 Suppl II:291. 79th Annual Scientific Sessions of American Heart Association, Chicago, USA (2006.11.12-15)
 16. Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sasaguri S, Sato T. Vagal nerve stimulation attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting the mitochondrial permeability transition pore. Circulation 2006;114 Suppl II:1196. 79th Annual Scientific Sessions of American Heart Association, Chicago, USA (2006.11.12-15)
 17. Katare RG, Kakinuma Y, Ando M, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sato T. Vagal nerve stimulation salvage the myocardium against reperfusion injury through inhibition of mitochondrial permeability transition. 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会. 神戸 (2007.03.15-17)
 18. Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sato T. Vagal nerve stimulation protects heart against ischemic insult through differential regulation of myocardial TNF receptor subtypes. 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会. 神戸 (2007.03.15-17)
 19. Arikawa M, Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Handa T, Yamasaki F, Davidson MM, Sato T. Electrophysiological approaches to the mechanism of arrhythmogenesis in artificially-arranged cardiomyocytes. 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会. 神戸 (2007.03.15-17)
 20. Kakinuma Y, Katare RG, Arikawa M, Handa T, Ando M, Li M, Zheng C, Yamasaki F, Sato T. Donepezil promotes angiogenesis in an ischemic limb model of nicotinic $\alpha 7$ receptor KO mice. 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会. 神戸 (2007.03.15-17)
 21. Kakinuma Y, Katare RG, Arikawa M, Handa T, Akiyama T, Ando M,

Yamasaki F, Sato T. Cardiomyocytes produce acetylcholine in response to muscarinic receptor agonists: a possible mechanism for cardioprotective effects of vagal stimulation on cardiomyocytes. 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会. 神戸 (2007.03.15-17)

22. Kuwabara M , Kakinuma Y, Ando M, Katare RG, Yamasaki F, Doi M, Sato T. Nitric oxide has beneficial effects on cardiomyocytes by activation of the vascular endothelial growth factor. 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会. 神戸 (2007.03.15-17)
23. Handa T, Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Sasaguri S, Sato T. Cholinesterase inhibitor donepezil improves the ventricular function of mouse with non-ischemic chronic heart failure. 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会. 神戸 (2007.03.15-17)

G-4.その他

1. 佐藤隆幸. 電気刺激で血圧を制御し難病の克服を図る. みずほ総研, Fole 2006;5(44):11-12.

H.知的所有権の取得状況

1. 発明者:杉町 勝, 佐藤隆幸, 李 梅花, 鄭 燦, 砂川賢二. 発明の名称:心不全治療薬. 国際出願 PCT/JP2006/319249, 出願日:2006年9月28日

植込み型突然死防止装置の開発
神経刺激による致死性不整脈の予防的治療法の開発

分担研究者 砂川 賢二（九州大学大学院 教授）

研究要旨：

心不全の生命予後は現在も不良であり従来の概念を超えた新たな治療体系が求められている。心疾患の重症化には循環調節機能の破綻が深く関与することから、私たちは破綻した自律神経系に介入して致死性不整脈や突然死を予防する方法を開発している。これまでに、迷走神経刺激が、急性心筋梗塞後の生存率と心筋梗塞慢性期心不全の生存率を劇的に改善することが明らかとなっているが、心臓リモデリングや心機能への影響は明らかでなかった。本研究では、急性心筋梗塞直後発生からの迷走神経刺激による、心筋梗塞後の心臓リモデリングおよび心機能改善効果について検討した。その結果、心筋梗塞発症1時間後からの迷走神経刺激によって心臓リモデリングが抑制され、4週間後の心機能が改善されることが明らかとなった。

A. 研究目的

重症心不全は発達した現代医療をもってしてもなお予後の不良な疾患である。心臓移植や人工心臓はまだ多くの問題点があり、心不全患者の治療には、画期的な治療戦略が求められている。本研究の目的は、従来の植え込み型除細動器（ICD）を超える突然死防止効果を持つ装置の開発に向けて、神経刺激による致死性不整脈の予防的治療法を開発することである。これは神経刺激によって心不全の病態の進行を抑制し、より上流で致死性不整脈の発生を防止しようとするものである。

心不全に伴う致死性不整脈の発生には、交感神経活動の異常亢進や迷走神経活動の低下など自律神経系のバランスの崩れが関与していると考えられる。しかし、治療薬としては交感神経系を対象とした β 遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬が用いられるのみで、積極的に迷走神経系に介入することによって、心不全

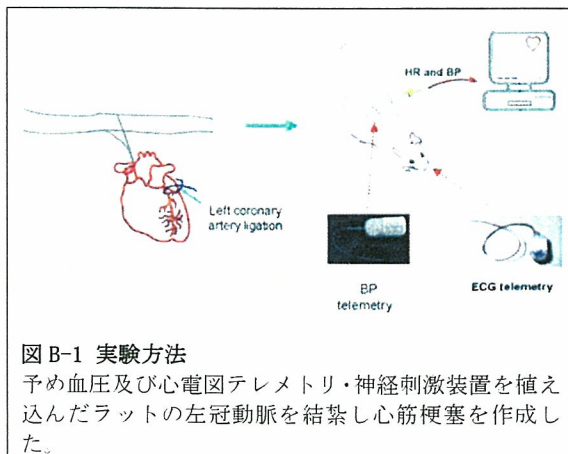
の病態を治療する試みはなかった。そこで、本研究では迷走神経系に直接的に介入することによって心不全を治療する装置を開発しようとしている。

これまでに、私たちは迷走神経の直接電気刺激が、ラットにおける急性心筋梗塞や慢性心不全の生存率を大幅に改善することを報告した。今回、急性心筋梗塞直後発生からの迷走神経刺激による、心筋梗塞後の心臓リモデリングを改善効果について検討した。

B. 研究方法

8週令の雄性Spregue-Dawleyラットを用い、迷走神経刺激群（VS, n=9）と迷走神経非刺激群（SS, n=10）における心筋梗塞作成4週間後の心機能を検討した。心筋梗塞作成1週間前に、右頸部迷走神経に刺激用のワイヤー電極を装着して、そのリード線を植え込み型遠隔パルス発生装置に接続した。また、心電図及び血圧テレメトリ装置を植え込んで心電図及

び血圧を連続記録した(図B-1)。1%ハロセン吸入麻酔下に、左冠動脈の基部から2~3 mmの部位を結紮して、急性心筋梗塞を作成した。結紮直後の1時間以内に発生する心室細動については心臓マッサージによって積極的に除細動した。心筋梗塞作成後1時間後よりVS群では、予め植込んでおいた刺激装置を用いて迷走神経刺激を開始した。刺激パルスの発生は外部コンピュータによって制御し、毎分10秒間の電気刺激(20 Hz、0.2 ms、0.10~0.13 mA)を行うようにした。心筋梗塞作成後、3日後、2週間後、4週間後に心臓超音波検査を行った。また、4週間後には心臓カテーテル検査による心機能評価を行った。1%ハロセン吸入麻酔下に、下大頸静脈よりポリエチレンチューブを右心房に挿入し、右房圧を計測した。右頸動脈よりコンダクタンスカテーテル挿入して、左室圧および左室容積を計測した。下大静脈の挿入したバルーンを拡張させ、心室容積を変化させて圧容積関係を記録し、左室収縮末期エラストランスを求めた。さらに、超音波血流計(2.5mm)を上行大動脈に装着して、心拍出量を計測した。



図B-1 実験方法

予め血圧及び心電図テレメトリ・神経刺激装置を植込んだラットの左冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号)、及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)に基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。適切な麻酔剤を

用い動物の苦痛の軽減に努め、実験計画を綿密に練ることにより不必要な動物実験を避けた。

C. 研究結果

C-1. 超音波検査

心臓超音波検査による、左室拡張末期内径(LVDd)、左室内径短縮率(%FS)の経時的変化を検討した。(図C-1)。LVDdの増大は、VS群(3日後:8.2±0.9mm、2週後:8.9±0.9mm、4週後:9.8±0.9mm)に比してSS群(3日後:8.5±0.7mm、2週後:9.5±0.8mm、4週後:10.0±0.7mm)において有意に大きかった(p<0.05)。 $\%$ FSの低下はVS群(3日後:16.3±5.0%、2週後:13.4±3.0%、4週後:13.1±4.0%)に比してSS群(3日後:16.0±3.0%、2週後:15.0±3.0%、4週後:11.0±2.0%)において有意に大きかった(p<0.05)。

C-2. 心臓カテーテル検査

左室拡張末期圧(LVEDP)はVS群に比しSS群で有意に高かった(20±4mmHg vs 29±12mmHg, p<0.01)。

心係数(CI)はVS群に比しSS群で有意に小さかった(170±25ml/min/kg vs 146±27ml/min/kg, p<0.05)。

左室収縮末期エラストランス(Ees)はVS群に比しSS群で有意に小さかった(345±155mmHg/ml vs 202±96mmHg/ml, p<0.05)。

左室拡張性の指標である左室圧一次微分最小値(dp/dt min)はVS群に比しSS群で有意に大きかった(-3933±537mmHg/s vs -3272±640mmHg/s, p<0.05)。

心重量はVS群に比しSS群で有意に大きかった(2.28±0.11g/kg vs 2.54±0.32g/kg, p<0.05)。

D. 考察

自律神経活動の異常は致死性不整脈の発生や心臓リモデリングと深く関わっていると考えられている。私たちのこれまでの研究の結果、迷走神経刺激が心筋梗塞急性期および心筋梗塞慢性期心不全において生存率を改善させることが明らかとなってきた。しかしながら、心筋梗塞急性期における迷走神経刺激による心臓リモデリング防止効果については、明らかでなかった。

本研究では、心筋梗塞発生1時間後からの迷走神経電気刺激が心機能を改善するか否かを心臓カテーテル検査によって詳細に検討した。その結果、心筋梗塞発生直後からの頸部迷走神経刺激が、4週間後の心機能を改善することが明らかになった。

心筋梗塞慢性期における迷走神経刺激では生命予後は改善するが、心機能に対する有意な改善効果は認められなかった。このことから、心筋梗塞患者においては、より早期から迷走神経刺激治療によってより大きな効果を得られる可能性があると考えられた。

E. 結論

心不全の生命予後は現在も不良であり従来の概念を超えた新たな治療体系が求められている。心疾患の重症化には循環調節機能の破綻が深く関与することから、私たちは破綻した自律神経系に介入して致死性不整脈や突然死を予防する方法を開発している。

本研究では、心筋梗塞発症直後からの迷走神経刺激が心臓リモデリングを抑制し4週後の心機能を改善することを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文

1. Nakano K, Egashira K, Ohtani K, Zhao G, Funakoshi K, Ihara Y, Sunagawa K. Catheter-based adenovirus-mediated anti-monocyte chemoattractant gene therapy attenuates in-stent neointima formation in cynomolgus monkeys. *Atherosclerosis*. 2006 (in press).
2. Monden Y, Kubota T, Tsutsumi T, Inoue T, Kawano S, Kawamura N, Ide T, Egashira K, Tsutsui H, Sunagawa K. Soluble TNF receptors prevent apoptosis in infiltrating cells and promote ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 73: 794-805, 2007.
3. Maruo T, Nakatani S, Jin Y, Uemura K, Sugimachi M, Ueda-Ishibashi H, Kitakaze M, Ohe T, Sunagawa K, Miyatake K. Evaluation of transmural distribution of viable muscle by myocardial strain profile and dobutamine stress echocardiography. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292: H921-H927, 2007.
4. Sagara Y, Hirooka Y, Nozoe M, Ito K, Kimura Y, Sunagawa K. Pressor response induced by central angiotensin II is mediated by activation of Rho/Rho-kinase pathway via AT1 receptors. *J Hypertens*. 25: 399-406, 2007.
5. Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, Sunagawa K. Long-acting calcium channel blocker, azelnidipine, increases endothelial nitric oxide

- synthase in the brain and inhibits sympathetic nerve activity. *Clin Exp Hypertens*. 29: 13-21, 2007.
6. Ohtani K, Egashira K, Nakano K, Zhao G, Funakoshi K, Ihara Y, Kimura S, Tominaga R, Morishita R, Sunagawa K. Stent-based local delivery of nuclear factor-kappaB decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*. 114: 2773-2779, 2006.
 7. Matsushima S, Kinugawa S, Ide T, Matsusaka H, Inoue N, Ohta Y, Yokota T, Sunagawa K, Tsutsui H. Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291: H2237-H2245, 2006.
 8. Imayama I, Ichiki T, Inanaga K, Ohtsubo H, Fukuyama K, Ono H, Hashiguchi Y, Sunagawa K. Telmisartan downregulates angiotensin II type 1 receptor through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cardiovasc Res*. 72: 184-190, 2006.
 9. Ohtani K, Egashira K, Ihara Y, Nakano K, Funakoshi K, Zhao G, Sata M, Sunagawa K. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates in-stent restenosis by inhibiting inflammation and progenitor cells. *Hypertension*. 48: 664-670, 2006.
 10. Ito K, Hirooka Y, Kimura Y, Sagara Y, Sunagawa K. Ovariectomy augments hypertension through rho-kinase activation in the brain stem in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 48: 651-657, 2006.
 11. Zheng C, Kawada T, Li M, Sato T, Sunagawa K, Sugimachi M. Reversible vagal blockade in conscious rats using a targeted delivery device. *J Neurosci Methods*. 156: 71-75, 2006.
 12. Hizume T, Morikawa K, Takaki A, Abe K, Sunagawa K, Amano M, Kaibuchi K, Kubo C, Shimokawa H. Sustained elevation of serum cortisol level causes sensitization of coronary vasoconstricting responses in pigs in vivo: a possible link between stress and coronary vasospasm. *Circ Res*. 99: 767-775, 2006.
 13. Kawano S, Kubota T, Monden Y, Tsutsumi T, Inoue T, Kawamura N, Tsutsui H, Sunagawa K. Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291: H1337-H1344, 2006.
 14. Fukuyama K, Ichiki T, Imayama I, Ohtsubo H, Ono H, Hashiguchi Y, Takeshita A, Sunagawa K. Thyroid hormone inhibits vascular remodeling through suppression of cAMP response element binding protein activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26: 2049-2055, 2006.
 15. Matsusaka H, Kinugawa S, Ide T, Matsushima S, Shiomi T, Kubota T, Sunagawa K, Tsutsui H. Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates exacerbated left ventricular remodeling and failure in

- diabetes-associated myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 48: 95-102, 2006.
16. Nakano K, Egashira K, Tada H, Kohjimoto Y, Hirouchi Y, Kitajima S, Endo Y, Li XH, Sunagawa K. A third-generation, long-acting, dihydropyridine calcium antagonist, azelnidipine, attenuates stent-associated neointimal formation in non-human primates. *J Hypertens.* 24: 1881-1889, 2006.
 17. Yamada M, Tatsumi R, Kikuiiri T, Okamoto S, Nonoshita S, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Shimokawa H, Sunagawa K, Allen RE. Matrix metalloproteinases are involved in mechanical stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve.* 34: 313-319, 2006.
 18. Michikami D, Kamiya A, Kawada T, Inagaki M, Shishido T, Yamamoto K, Ariumi H, Iwase S, Sugeno Y, Sunagawa K, Sugimachi M. Short-term electroacupuncture at Zusanli resets the arterial baroreflex neural arc toward lower sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291: H318-H326, 2006.
 19. Takaki H, Sakuragi S, Nagaya N, Suzuki S, Goto Y, Sato T, Sunagawa K. Postexercise VO₂ "Hump" phenomenon as an indicator for inducible myocardial ischemia in patients with acute anterior myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 111: 67-74, 2006.
 20. Matsusaka H, Ide T, Matsushima S, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Kinugawa S, Tsutsui H. Targeted deletion of p53 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res.* 70: 457-465, 2006.
 21. Aiba T, Shimizu W, Hidaka I, Uemura K, Noda T, Zheng C, Kamiya A, Inagaki M, Sugimachi M, Sunagawa K. Cellular basis for trigger and maintenance of ventricular fibrillation in the Brugada syndrome model: high-resolution optical mapping study. *J Am Coll Cardiol.* 47: 2074-2085, 2006.
 22. Matsushima S, Ide T, Yamato M, Matsusaka H, Hattori F, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Hasegawa Y, Kurihara T, Oikawa S, Kinugawa S, Tsutsui H. Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 113: 1779-1786, 2006.
 23. Matsusaka H, Ide T, Matsushima S, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Kinugawa S, Tsutsui H. Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload. *Hypertension.* 47: 711-717, 2006.
 24. Uemura K, Kamiya A, Hidaka I, Kawada T, Shimizu S, Shishido T, Yoshizawa M, Sugimachi M, Sunagawa K. Automated drug delivery system to control systemic arterial pressure, cardiac output, and left heart filling pressure in acute decompensated heart

failure. J Appl Physiol. 100: 1278-1286, 2006.

G-2.学会発表

1. 神谷 厚範、砂川 賢二、杉町 勝 生体信号を閉ループ制御するサーボ電気鍼システム 第 45 回日本生体医工学会大会 44: 110, 2006
2. 杉町 勝、川田 徹、宍戸 稔聡、李 梅花、鄭 燦、佐藤 隆幸、砂川 賢二 バイオニック心臓病学：循環調節の機能再建と異常是正 第 45 回日本生体医工学会大会 44: 124, 2006
3. 神谷 厚範、上村 和紀、清水 秀二、杉町 勝、砂川 賢二 宇宙心循環失調を克服する宇宙循環器医学の開発 第 45 回日本生体医工学会大会 44: 133, 2006
4. 鄭 燦、川田 徹、田辺 慎一、植村 俊雄、宍戸 稔聡、砂川 賢二、杉町 勝 情報量計測：自律神経系の神経インターフェースに関する基礎研究 第 45 回日本生体医工学会大会 44: 185, 2006
5. 上村 和紀、神谷 厚範、日高 一郎、川田 徹、清水 秀二、宍戸 稔聡、吉澤 誠、杉町 勝、砂川 賢二 急性重症心不全の循環管理を支援する血行動態自動制御システムの開発 第 45 回日本生体医工学会大会 44: 241, 2006
6. 稲垣 正司、吉澤 誠、久田 俊明、砂川 賢二、杉町 勝 心不全患者のための超 ICD の開発 第 45 回日本生体医工学会大会 44: 251, 2006
7. 杉町 勝、川田 徹、宍戸 稔聡、砂川 賢二 植え込み治療装置の微小デバイス化 第 45 回日本生体医工学会大会 44: 274, 2006
8. 藤崎 巖、川田 徹、高木 洋、砂川 賢二 高機能心拍制御機能を有したトレーニング機器の開発と実用化 第 45 回日本生体医工学会大会 44: 291, 2006
9. 川田 徹、高木 洋、藤崎 巖、砂川 賢二、杉町 勝 加速度センサー併用による正確なイヤーセンサー心拍検知 第 45 回日本生体医工学会大会 44: 292, 2006
10. 木下 広幸、吉澤 誠、稲垣 正司、上村 和紀、杉町 勝、砂川 賢二 自己組織化マップを用いた ICD 用致死性不整脈早期検出アルゴリズムの開発 第 45 回日本生体医工学会大会 44: 501, 2006
11. 宮本 忠吉、高木 洋、稲垣 正司、川田 徹、宍戸 稔聡、神谷 厚範、砂川 賢二、杉町 勝 心不全ラットにおける呼吸化学調節系の定量評価—呼吸異常のメカニズム解明への解析的アプローチ— 第 45 回日本生体医工学会大会 44: 545, 2006
12. 宮本 忠吉、高木 洋、稲垣 正司、川田 徹、宍戸 稔聡、神谷 厚範、砂川 賢二、杉町 勝 心不全ラットにおける呼吸異常発生機構の解明—統合的枠組みによる化学反射系の定量評価— 第 27 回日本循環制御医学会総会 27: 55, 2006
13. 神谷 厚範、上村 和紀、清水 秀二、砂川 賢二、杉町 勝 心不全血行動態を自動治療する装置の開発：臨牀実用化へ向けて 第 27 回日本循環制御医学会総会 27: 63, 2006
14. 李 梅花、鄭 燦、川田 徹、稲垣 正司、佐藤 隆幸、砂川 賢二、杉町 勝 迷走神経電気刺激治療は心筋梗塞後心不全ラットのバゾプレッシン分泌と食塩摂取量を抑制する 第 27 回日本循環制御医

- 学会総会 27: 64, 2006
15. Uemura K, Kamiya A, Shimizu S, Shishido T, Sugimachi M, Sunagawa K. Comprehensive physiological cardiovascular model enables automatic correction of hemodynamics in patients with acute life-threatening heart failure. IEEE EMBC 198-201, 2006
 16. Kinoshita H, Yoshizawa M, Inagaki M, Uemura K, Sugimachi M, Sunagawa K. Development of an algorithm for detection of fatal cardiac arrhythmia for implantable cardioverter-defibrillator using a self-organizing map. IEEE EMBC 4370-4373, 2006
 17. Miyamoto T, Inagaki M, Takaki H, Kamiya A, Kawada T, Shishido T, Sugimachi M, Sunagawa K. Sensitized central controller of ventilation in rats with chronic heart failure contributes to hyperpnea little at rest but more during exercise. IEEE EMBC 4627-4630, 2006
 18. Sunagawa K, Zheng C, Li M, Shishido T, Kawada T, Sugimachi M. Comprehensive physiological identification of cardiovascular regulation enables to restore and correct pathological regulation. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006 (WC 2006)
 19. Kamiya A, Uemura K, Shimizu S, Sugimachi M, Sunagawa K. A new automated drug delivery system to restore hemodynamics of decompensated heart failure in closed-chest clinical settings: potential application for clinical research. American Heart Association 2006
 20. Miyamoto T, Takaki H, Inagaki M, Shishido T, Kawada T, Kamiya A, Sunagawa K, Sugimachi M. Central chemoreflex hypersensitivity in rats with chronic heart failure contributes to hyperpnea little at rest but more during exercise. 71st Japanese Circulation Society 2007

G-3.新聞報道

なし

H.知的所有権の取得状況

国内出願 1 件

PCT 出願 3 件

研究要旨：

従来ICDで用いられている電極配置をベースに網羅的な静電場解析、及び新たに考案した膜電位変化速度解析を行い、最適電極配置に関する知見を得た。また心臓を包囲する新しい電極様式の可能性についても検討を加えた。またこのように絞り込まれた電極配置について、心臓に致死性不整脈を起こしてICDを作動させた場合の計算（動電場解析）を行い、除細動閾値を定量的に評価した。さらに従来実験的に知られる除細動閾値と比較しシミュレーションの妥当性を示した。加えて、心臓モデルの精密化を図るための刺激伝導系のモデル化とそれに基づく心電図再現、また検証用イヌモデルの試計算も行った。

A. 研究目的

本研究では、植え込み型除細動装置(ICD)の通電方法、電極配置を合理的に決定するため、計算機上に致死性不整脈をシミュレートすることのできる仮想心臓モデルを開発してきた。このシミュレータでは、心臓と接する胸郭領域の有限要素法によるモデル化もなされている。また効率的に細胞電気生理モデル(Luo-Rudyモデル^[1])を計算するための高速化並列計算手法や、bi-domainモデルから生じる大規模な連立一次方程式を高速で解くマルチグリッドソルバ^[2]、選択型時間積分などの諸手法が組み込まれている。

本年度は、昨年度に引き続き、先ず従来ICDで用いられている基本的な電極配置をベースに網羅的な静電場解析を行う。また新たな評価法として膜電位変化速度解析を行い、最適電極配置に関する知見を得る。また心臓を包囲するような新しい電極様式の可能性についても検討を加える。次に、このように絞り込まれた電極配置、電極様式に対して、心臓に致死性不整脈を起こしてICDを作動させた場合の計算（動電場解析）を行い、従来実験的に知られている除細動閾値との比較を行うことによりシミュレーションの妥当性を検討する。加えて、心臓モデルの精密化を図るため、刺激伝導系のモデル化とそれに基づく心電図再現、さらに検証用イヌモデルの試計算を行う。

B. 研究方法

B-1 有限要素法を用いた定式化の概要

B-1-1 心筋細胞電気生理モデル

人間の植え込み型除細動シミュレータの開発においては心筋細胞の興奮、回復過程が記述されていれば十分であると考えられる事から、LR91モデル^[1]を採用した。

LR91モデルでは、心筋細胞の6種類のイオン電流(I_{Na} : Na^+ 電流、 I_{Si} : Ca イオンによる遅い内向き

電流、 I_K :時間依存性の外向き K^+ 電流、 I_{K1} :時間非依存性の外向き K^+ 電流、 I_{Kp} :プラト-相において働く外向き K^+ 電流、 I_b :漏洩電流)をHodgkin-Huxley方程式^[3]と同様の形式でモデル化し、膜電位、細胞内の各種イオン濃度の時刻歴を記述する。

一方、ICDに起因する高電位差が細胞膜に負荷された場合を考慮し、本研究では I_{ep} :Electroporation電流を表す項を付け加えた^[4]。また、LR91は、モルモットの心筋細胞のモデルであるため、モデルのパラメータを人間のAPDに合うよう調整した。使用したパラメータを表B-1-1に、得られた活動電位の時刻歴を図B-1-1に示す。

$$\begin{aligned} \frac{dV}{dt} &= -\frac{1}{C}(I_{Na} + I_{Si} + I_K + I_{K1} + I_{Kp} + I_b + I_{ep}) \\ I_{Na} &= 23m^3 \cdot h \cdot j \cdot (V - E_{Na}) \\ I_{Si} &= G_{Si} \cdot d \cdot f \cdot (V - E_{Si}) \\ I_K &= G_K \cdot X \cdot X_i \cdot (V - E_K) \\ I_{K1} &= G_{K1} \cdot K_{1\infty} \cdot (V - E_{K1}) \\ I_{Kp} &= 0.0183 \cdot K_p \cdot (V - E_{Kp}) \\ I_b &= 0.03921 \cdot (V + 59.87) \\ \frac{dCa}{dt} &= 10^{-4} I_{Si} + 0.07(10^{-4} - Ca) \\ \frac{dx}{dt} &= \alpha_x \cdot (1-x) - \beta_x \cdot x \\ I_{ep} &= G_{ep} V \\ \frac{dG_{ep}}{dt} &= \alpha \cdot e^{\beta(V)^2} (1 - e^{-\gamma(V)^2}) \end{aligned} \quad (3)$$

V: membrane potential

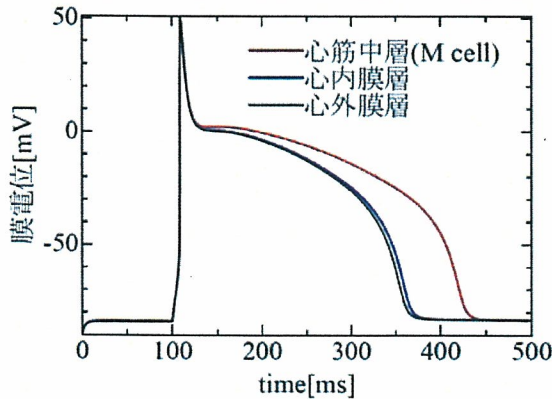
I_{ion} : ion current

x: gating variable (m,h,j,d,f,X,X_i,K₁)

Ca : calcium concentration

表 B-1-1 解析において用いたパラメータ
(単位:mS/cm²)

G _{Si}	0.065
G _k (心内膜)	0.282
G _k (Mcell)	0.1974
G _k (心外膜)	0.282



図B-1-1 活動電位の時刻歴

また、我々の使用した心筋細胞電気生理モデルは LR91 モデルのみではなく、解析の種類、目的、部位に応じて、細胞モデルを使い分けており、表 B-1-2 に概要を示す。各モデルの詳細は論文を参照して頂きたい。心電図の解析も初期段階では、LR91 モデルを用いて解析を行っていたが、より高精度な解析を行なうため、細胞内の Ca イオンの挙動が表現されている Noble モデルに変更した。除細動解析に関しては、数多くの計算を行う必要があるため、計算負荷の軽い LR91 モデルを引き続き用いるものとする。

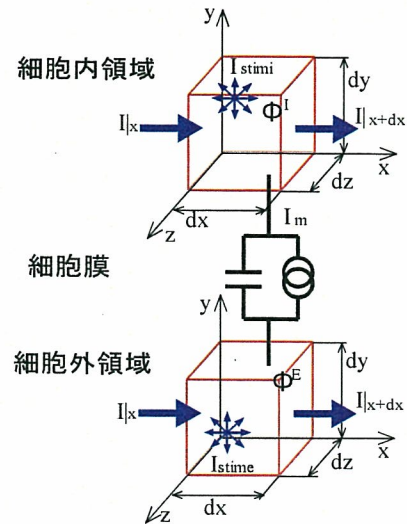
表 B-1-2 各解析で用いている細胞電気生理モデル

種類	目的	部位	モデル名
人間	除細動	心室	LR91 ^[1]
	心電図	心室	Noble2004 ^[4]
		心房	Nattel1998 ^[5]
		Prukinje 繊維	DiFrancesco1985 ^[6]
犬	除細動	心室	LR91
	心電図	心室	CMV2002 ^[7]
		Prukinje 繊維	DiFrancesco1985

B-1-2 除細動現象のモデル化

興奮の伝播を表す数理モデルは大きく分けて、細胞間のギャップ結合に加えて細胞外間質液を通じての伝播までを考慮した bi-domain モデルと、細胞外間質液を通じての伝播を無視した

mono-domain モデルの2つがある。



図B-1-2 bi-domainモデルの模式図

bi-domain モデルでは、細胞内、細胞外領域を表す図B-1-2に示すような電位場を考える。細胞内領域、細胞外領域における電位場は細胞膜のキャパシタンスと細胞モデルによって結合されている。この電気回路に対し、細胞内、細胞外の各領域において Kirchhoff の法則とオームの法則を適用すると、次式が成り立つ。

$$\beta \left(C_m \frac{\partial V}{\partial t} + I_{ion} \right) = I_{stime} - \frac{\partial}{\partial x_i} \left(G_{ij}^E \frac{\partial \phi^E}{\partial x_j} \right) \quad (4)$$

$$\beta \left(C_m \frac{\partial V}{\partial t} + I_{ion} \right) = -I_{stim} + \frac{\partial}{\partial x_i} \left(G_{ij}^I \frac{\partial \phi^I}{\partial x_j} \right)$$

$$V = \phi^I - \phi^E$$

図B-1-2の bi-domain モデルにおいて細胞外電位は総ての点で一律に0と仮定すると以下のようなになる。

$$\beta \left(C_m \frac{\partial V}{\partial t} + I_{ion} \right) = I_{stim} + \frac{\partial}{\partial x_i} \left(G_{ij}^I \frac{\partial V}{\partial x_j} \right) \quad (5)$$

これが mono-domain モデルであり、単純な問題に対しては、bi-domain モデルと大差のない解を求めることが出来るとされている。本シミュレータでは bi-domain モデル、mono-domain モデルの両者をインプリメントしてあるが、外部からの刺激電流が ICD 設計では重要な役割を果たすためバイメインモデル用いる。

除細動解析では、心臓のみならず心臓と接するトルソ、心腔内血液領域の電気伝導を含めたモデル化が必要となる。概念図を図B-1-3に示す。Bは血液領域、Cはトルソ領域、Hは心筋領域を表す。

電極は、胸部と心室内に設置し、除細動装置の作動時には、両電極間に電位差を与える。トルソ、血液部は、単純な抵抗場と仮定し、電気伝導を表す下記のLaplace型方程式を用いた。

・胸部の支配方程式

$$\frac{\partial}{\partial x_i} \left(G_{ij}^C \frac{\partial \phi^C}{\partial x_j} \right) = 0 \quad (6)$$

・血液部の支配方程式

$$\frac{\partial}{\partial x_i} \left(G_{ij}^B \frac{\partial \phi^B}{\partial x_j} \right) = 0$$

ここで G_{ij}^B , G_{ij}^C は、血液、トルソ領域の伝導率とする。 G_{ij}^C は、各組織・器官において異なり、空間的に分布している。各領域間の境界条件を以下に示す。トルソ、血液は心筋の細胞外領域と電気的に結合している。

$$n \cdot (G^C \nabla \phi^C) = 0 \quad x \in \partial C \quad (7)$$

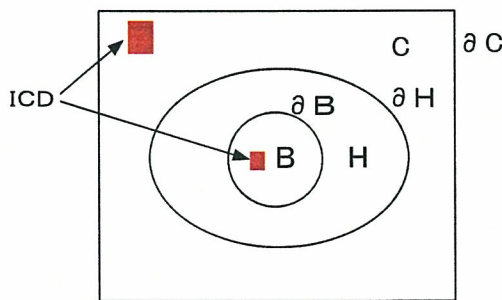
$$n \cdot (G^E \nabla \phi^E) = n \cdot (G^B \nabla \phi^B), \phi^E = \phi^B \quad x \in \partial B$$

$$n \cdot (G^E \nabla \phi^E) = n \cdot (G^C \nabla \phi^C), \phi^E = \phi^C \quad x \in \partial H$$

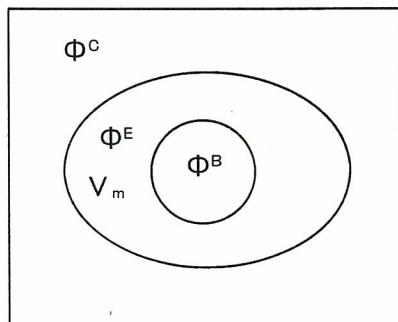
ICD 起動時には、負荷電圧を V_{ICD} として、

$$\phi_{ICD}^B = \phi_{ICD}^C + V_{ICD} [V] \quad x \in ICD_B \quad (8)$$

とする。



(a) 除細動現象のモデル化



(b) 電位(未知数)の定義

図B-1-3 除細動解析の概念図

静電場解析及び膜電位変化速度解析では、上記のバドメインモデルを近似的に用いて計算負荷の削減を行なう。静電場解析では、細胞内外の電流の流出入を無視し、心筋部も単純な抵抗場として解析を行う。故に心筋部の支配方程式は、

$$\frac{\partial}{\partial x_i} \left(G_{ij}^E \frac{\partial \phi^E}{\partial x_j} \right) = 0 \quad (9)$$

となり、トルソを含めたマトリクス方程式も細胞外電位を未知数とする静的な方程式となる。

一方、膜電位変化速度解析では、図 B-1-4 に示すように、イオン電流を無視し、細胞膜を単純なキャパシタンスとしてモデル化し、通電の瞬間の膜電位の変化速度分布を ICD の設計指標とする。その際の心筋部の支配方程式は、

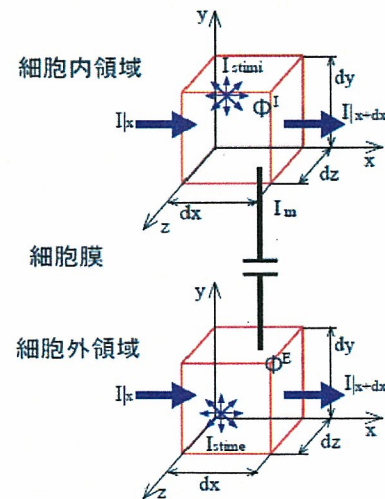
$$\beta \left(C_m \frac{\partial V}{\partial t} \right) = I_{stim} - \frac{\partial}{\partial x_i} \left(G_{ij}^E \frac{\partial \phi^E}{\partial x_j} \right) \quad (10)$$

$$\beta \left(C_m \frac{\partial V}{\partial t} \right) = -I_{stim} + \frac{\partial}{\partial x_i} \left(G_{ij}^I \frac{\partial \phi^I}{\partial x_j} \right)$$

$$V = \phi^I - \phi^E$$

となる。この手法により、より軽い計算負荷で、除細動により負荷するエネルギーと興奮が発生する領域・頻度との関係を明らかにできる。しかし、細胞モデルを外しているため細胞内外のコンダクタンスの空間分布は無視しており、VF による興奮部位と ICD による興奮部位との位置・位相関係などは表現できない。

以上の式を有限要素法で離散化した。



図B-1-4 除細動解析の概念図

B-2 有限要素モデル化

B-2-1 心臓の有限要素モデル化

心臓の有限要素モデルは、成人男性より取得したCT画像を基にして作成した。CT画像を3次元構成した後、心臓の表面データを抽出し、これを用いて0.44[mm]のボクセル有限要素メッシュを作成した(図 B-2-1 参照)。本研究では、心筋繊維方向の設定を効果的に行うために、既に当研究室で考案済の「電位ポテンシャル法」を用いた。これはラプラス方程式に適切な境界条件を与えて解く事により不規則な形状に対し、便宜的な座標を設定する方法である。この問題の場合、心室の内側を1、外側0の境界条件を与えてラプラス方程式を解く事により心臓モデルの各節点に0~1までの、パラメータを与えそれに基づいて繊維方向を設定した。この方法に従い、図 B-2-2 に示すように a)内層から外層へ90°~-60°まで繊維方向を線形的に変化させたモデル b) P. Hunter の公開している犬の心筋繊維方向データをマッピングしたモデルの2種類の心筋繊維モデルを作成した。ここでは、1)の繊維モデルの結果を示す。なお右左心室壁(中隔を含む)の心筋中層にM cellを分布させ、内、外層から中層までAPDが連続的に変化するように細胞モデルの特性を調節した。心臓解析で用いた物性値、解析条件を表 B-2-1 に示す。興奮の伝播速度は、繊維方向、繊維直交方向にそれぞれ、0.825[m/s]、0.207[m/s]であった。左心室内外壁間の伝播時間差は、30[ms]であった。これらの速度は実際の心臓の興奮伝播速度と一致する。

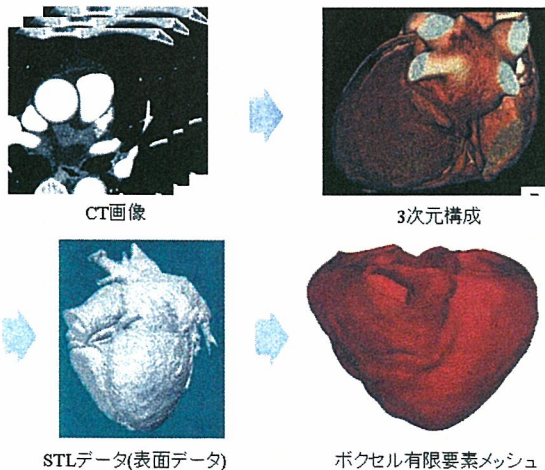


図 B-2-1 心臓の有限要素モデル化

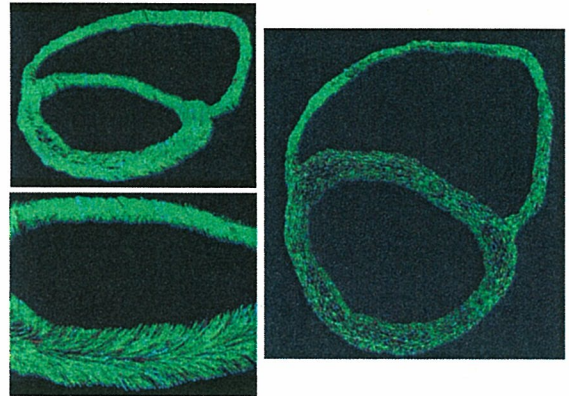
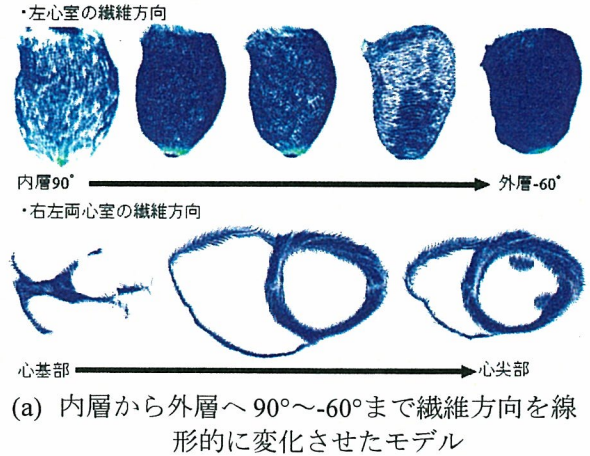


図 B-2-2 心筋繊維方向

表 B-2-1 心臓解析において用いた物性値、解析条件

心筋伝導率(細胞外)[S/m]	3.D0, 6.D0, 3.D0
心筋伝導率(細胞内)[S/m]	1.2D0, 6.D0, 1.2D0
Cm	1.0[μ F/cm ²]
β	1400[1/cm]
dx:メッシュサイズ	0.44[mm]
dt:時間刻み(脱分極時)	0.01[ms]
dt(その他)	0.1[ms]

次に cleavage plane を心臓モデルに組み込む。cleavage plane の位置は、乱数を用いて心筋内にランダムに配置した。cleavage plane 方向は、Hunterらが公開している犬の sheet 方向データから近似式を求め、それを基に設定した。作成したモデルを図 B-2-2 に示す。断面内でのシート方向は Hunter らの測定結果と概ね一致する。