

研究結果を基に、実際の ICD にループアンテナを搭載し放射特性を評価する。

B-1-1 アンテナの性能改善

ICD の筐体を模擬した金属製の筐体に、磁界型アンテナであるループアンテナを搭載した構成において、ループアンテナと金属筐体とを接続することによる利得改善効果について示す。また、ループアンテナに加え、電界型アンテナであるモノポールアンテナについて、アンテナを誘電体で覆うことによる放射効率改善効果について示す。

B-1-2 アンテナの小型化と配置による特性

ループ及びモノポールアンテナに対し、アンテナ素子を小型化した場合の放射特性を把握する。筐体からのループ及びモノポールアンテナの突出量を削減した場合の放射特性を把握する。更に、ループアンテナの配置条件を変化して突出量を削減した場合の放射特性を把握する。

B-1-3 ICD に搭載したアンテナの放射特性

現在、実際に使用されている ICD の筐体(以下、**アンテナ評価機(M)** サイズ約 50mm × 60mm)にループアンテナを搭載し、ファントムに植込んだ場合の放射特性を把握する。

B-2 無線モジュールの試作検討

昨年度までの検討にもとづき、無線モジュールの試作を行う。この試作により、実際に生体内外通信を行う実験を可能とする。

B-3 緊急時通報システムの検証モデル検討

提案するシステム構成で生体内と生体外との通信実験を実環境において行う。本年度は、上記検討で試作を行った無線モジュールと PDA 型端末を用いた検証モデルを構築する。

生体内に植込んだ ICD と目標通信距離 2m 離れた生体外機器との通信実験を実環境において行う。通信実験用の機器として、ICD の筐体を模擬した金属筐体に無線機能のみを搭載したアンテナ評価機(以下、**アンテナ評価機(P)**)を用いる。

C 研究結果

C-1 アンテナに関する研究

C-1-1 アンテナの性能改善

ループアンテナの一端を ICD の金属筐体のグランドプレーンと接続することによるアンテナ利得の改善について示す。ICD の筐体本体は金属で構成されており、この筐体をアンテナの一部として利用することにより、アンテナ利得改善を図る。

なお、人体植込みアンテナの評価には、**図 C-1-3**に示す円柱形のファントム[1]を用いた。このファントムは 400MHz帯における人体筋肉の電気定数(比誘電率 $\epsilon_r=61$ 、導電率 $\sigma=0.8S/m$)に設定した液状媒質を充填している。アンテナの植込み位置は、実人体への植込み位置を想定し、ファントム表面から 10mmの位置とした。

図 C-1-1にループアンテナ構成を示す。ICD の筐体を模擬した金属筐体(50mm × 50mm × 15mm)から 12mm離れた位置にループ長が 0.17 波長の微小ループ(15mm × 50mm)を配置する。この構成において、ループの一端を筐体グランドに接続するか否かによるファントム植込み時の水平面(XY面)の平均利得を比較した結果、**図 C-1-2**に示すように、ループアンテナの一端を筐体グランドに接続することでファントム植込み時の平均利得が 10dB改善した。これは、ループアンテナを筐体に接続することでアンテナ電流が筐体にも分布し、アンテナとして動作する体積が増えることで、放射抵抗が大きくなりアンテナ利得が高くなったためであると考えられる。

次に、**アンテナ評価機(P)**に搭載したループ及びモノポールを誘電体で覆うことによる放射効率の改善について示す。なお、人体植込みアンテナの評価系には、**図 C-1-3**の円柱ファントムより人体に近い形状をした、**図 C-1-7**に示す直方体の上半身ファントム(日本人男性の平均体型[2]を基に設計)を用いた。アンテナ

ナ植込み位置は、ファントム表面から 10mm の位置とした。

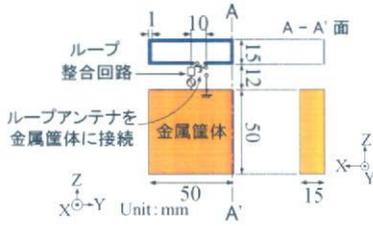


図 C-1-1 ループ構成

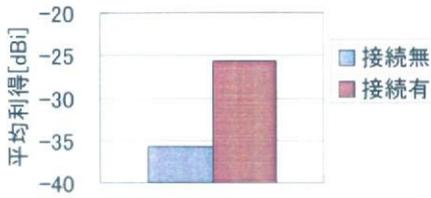


図 C-1-2 筐体との接続条件に対する平均利得

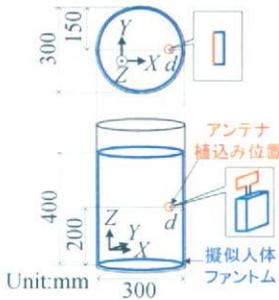


図 C-1-3 円柱ファントム及びアンテナ植込み位置

図 C-1-4 (a)にループアンテナ構成を示す。筐体(63mm×60mm×19mm)から 12mm離れた位置にループ長が 0.13 波長の微小ループアンテナ(15mm×33mm)を配置する。図 C-1-4(b)に素子長が 0.08 波長(27mm+33mm)のL字型モノポールの構成を示す。なお、各アンテナの筐体からの突出面積は同一に設定する。図 C-1-5にアンテナを覆う誘電体($\epsilon_r = 3.3$)の構成を示す。この構成において、アンテナを誘電体で覆わない「①」の場合、誘電体で覆い、アンテナと誘電体との距離 t を変化した 3 つの条件「② $t = 0\text{mm}$ (間隙なし)」、「③ $t = 2\text{mm}$ 」、「④ $t = 7\text{mm}$ 」の放射効率の変化を図 C-1-6に示す。ループの放射効率は①と比較して②で 0.3dB改善し、③④では更に 2dB改善

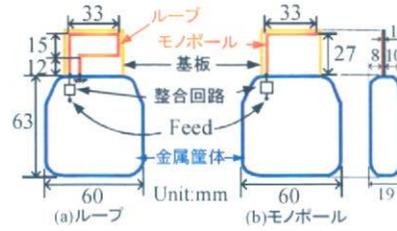


図 C-1-4 アンテナ構成(効率改善)

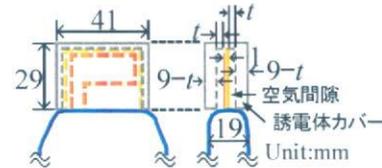


図 C-1-5 アンテナを覆う誘電体の構成

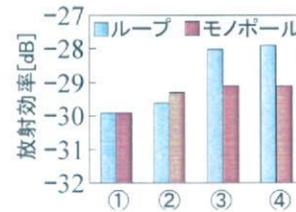


図 C-1-6 誘電体の構成に対する放射効率

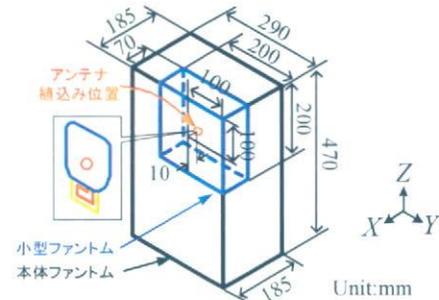


図 C-1-7 上半身ファントム及びアンテナ植込み位置

また、モノポールの放射効率も①と比較して②で 0.6dB、③④で 0.8dB 改善する。これは、①ではアンテナが損失媒質(ファントム)と非常に近接する(0.1mm)ため効率劣化影響が大きい、②ではアンテナ近傍を無損失媒質(誘電体)で覆うことで、損失媒質との距離が離れて(9mm)その影響が減り、③④では空気層の追加で損失媒質の影響が更に減ることが要因であると考えられる。また、モノポールアン

テナの放射効率の改善効果がループアンテナより低いことについて、電磁界シミュレーションにより解析した結果、モノポールアンテナ素子長が 0.08 波長と短いため、ループアンテナと比較してアンテナ素子より筐体に電流が多く分布する為、素子を覆う効果がループより少なくなることがわかった。

C-1-2 アンテナの小型化

①素子サイズと放射特性

本節では、まずループ及びモノポールアンテナの素子を小型化した場合の放射特性の変化について調べる。なお、アンテナの評価には図 C-1-3に示す円柱形ファントムを用いる。図 C-1-8、図 C-1-9にループ及びモノポールアンテナの 3 つのアンテナ構成をそれぞれ示す。図 C-1-8において、ループは筐体から 12mmの位置に配置し、その開口面積は(1)、(2)、(3)に示すように、それぞれ 15mm×50mm、11mm×38mm、7.5mm×25mmとする。したがってアンテナ占有面積は、(1)、(2)、(3)に示すように、 $27\text{mm} \times 50\text{mm} = 1350\text{mm}^2$ 、 $23\text{mm} \times 38\text{mm} = 874\text{mm}^2$ 、 $19.5\text{mm} \times 25\text{mm} = 487.5\text{mm}^2$ となる。図 C-1-9において、モノポールはL字型で構成され、アンテナ占有面積は図 C-1-8に示すループアンテナと同一である。図 C-1-10にアンテナ占有面積に対する平均利得を示す。ループ、モノポールアンテナ共に、自由空間と比較してファントムに植込んだ場合の平均利得が 15dB以上劣化していることが確認できる。

また、ループアンテナの占有面積が小さくなるにつれて、その平均利得は 7~9dB 低くなる。これは開口面積の小型化によってループの放射抵抗が低下したためであると考えられる。一方、モノポールアンテナは占有面積が小さくても平均利得の低下は僅かである(2dB)。これは、前節で述べたのと同様に、モノポールアンテナの素子長が約 0.1 波長と短く、ループアンテナと比較して、アンテナ素子よ

り筐体に電流が多く分布するためであると考えられる。

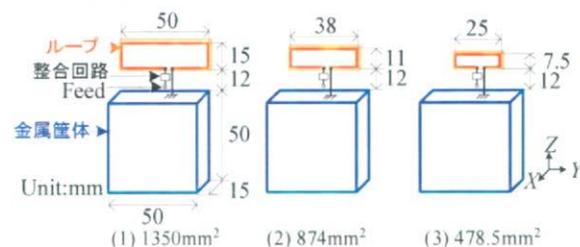


図 C-1-8 ループ構成(素子の小型化)

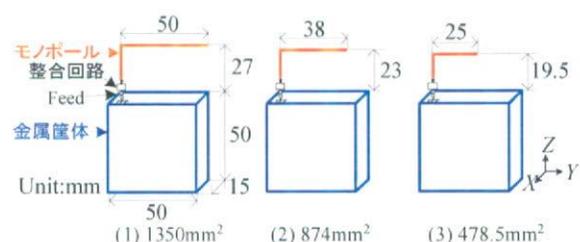


図 C-1-9 モノポール構成(素子の小型化)

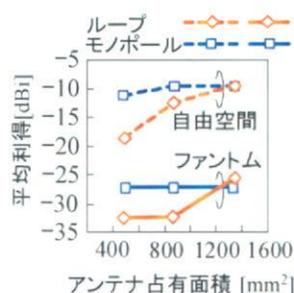


図 C-1-10 占有面積に対する平均利得

②筐体からの距離と放射特性

次に、アンテナ評価機(P)に搭載したループ及びモノポールアンテナの筐体からの突出量を削減した場合の放射特性について調べる。なお、人体植込みアンテナの評価には図 C-1-7に示す上半身ファントムを用いる。

図 C-1-11にループ及びモノポールの構成を示す。ループは開口面積が $33\text{mm} \times (a-1)\text{mm}$ で、筐体との間隔が 1mmとなる位置に配置し、筐体からの突出量aを 5~13mmに変化する。モノポールアンテナは素子長が $33\text{mm} + b[\text{mm}]$ のL字型構成で、突出量bを 2~12mmで変化する。

なお、アンテナは 2mmの空気間隙を設けて誘電体で覆う。図 C-1-12にループ及びモノポ

ールアンテナの突出量に対する平均利得を示す。筐体からの突出量が小さくなるにつれて、ループアンテナの平均利得が 0.35dB/mm 劣化するのに対し、モノポールアンテナは 0.9dB/mm 劣化することが確認できる。ループアンテナの利得劣化は、開口面積を削減することにより放射抵抗が低下したためであると考えられ、モノポールアンテナの利得劣化は、モノポールアンテナが筐体に近づくことで、筐体に分布するアンテナ電流とは逆位相の電流が増加するためであると考えられる。

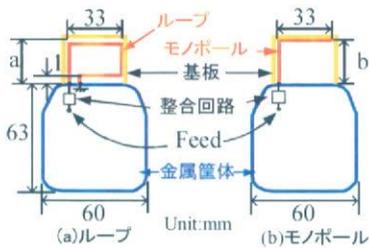


図 C-1-11 アンテナ構成(突出量の小型化)

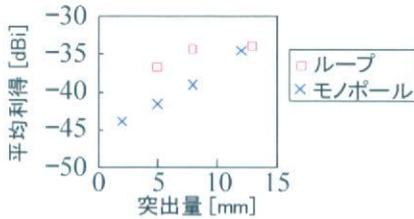


図 C-1-12 突出量に対する平均利得

この結果から、ループアンテナと筐体との距離を近接(1mm)させ、ループの開口面積を突出量に応じて最大限にする構成で、高いアンテナ利得が実現できることがわかった。

③配置と放射特性

次に、筐体へのループアンテナの配置条件を変化することで突出量を削減した場合の放射特性について調べる。なお、人体植込みアンテナの評価には図 C-1-7に示す上半身ファントムを用いる。図 C-1-13にループ開口面を筐体側面と平行に配置したアンテナ構成を示す。開口面積は $33\text{mm} \times 12\text{mm}$ で、筐体からのアンテナ突出量は 3mm とする。なお、ループアンテナは 2mm の空気間隙を設けて誘電体で覆う。このアンテナのファントム植込み時

の平均利得は -34dBi であり、図 C-1-12に示す開口面積が同一のループアンテナ(従来の配置条件、突出量 $a = 13\text{mm}$)と同等の高い利得が得られた。

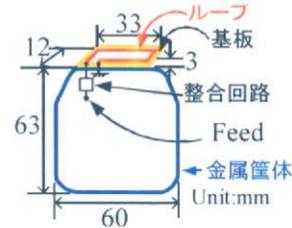


図 C-1-13 ループ構成(筐体への配置条件変化)

この結果から、ループアンテナの配置条件より開口面積を大きく確保することがアンテナ利得に対して重要であることがわかった。

C-1-3 ICDに搭載したアンテナ特性評価

アンテナ評価機(M)に搭載したループアンテナ構成を図 C-1-14に示す。金属筐体から突起した、リード線を装着する樹脂部分に、できるだけ大きな開口面積のループアンテナを構成する。ループの開口面積は $23\text{mm} \times 8\text{mm}$ で筐体からの突出量は 13mm であり、アンテナは 2mm の空気間隙を設けて誘電体で覆う。



図 C-1-14 ICDに搭載したループ構成(i)

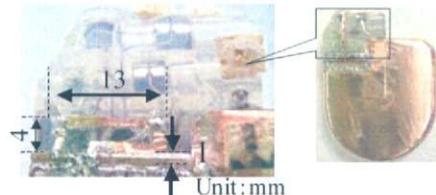


図 C-1-15 ICDに搭載したループ構成(ii)

また、本来筐体の内部に搭載すべきアンテナ評価用の小型発振器は、アンテナ評価機(M)の筐体内部には搭載できないため、筐体外部に搭載している。なお、人体植込みアンテナ

の評価には図 C-1-7に示す上半身ファントムを用いる。このアンテナ構成のファントム植込み時の平均利得は-34dBiで目標アンテナ利得に対するマージンは表 C-1-1に示すように20dB以上確保できている。また、通信実験で目標通信距離を達成したアンテナの利得に対してもマージンがあるため、問題なく通信できると考えられる。

表 C-1-1 アンテナ利得マージン[dB]

	+X	+Y	-X	-Y
目標通信距離[m]	2.0	1.5	0.6	1.5
目標利得[dBi]	-56.3	-58.8	-66.8	-58.8
図 C-1-14のループ	19.7	20.8	28.3	20.0
図 C-1-15のループ	11.7	13.8	14.5	14.9

表 C-1-2 MICS の代表的な無線設備仕様

項目	設備仕様
使用周波数帯	402~405MHz
輻射帯域幅	300kHz 以下
空中線電力	25 μ W 以下 (EIRP)
伝送速度	100kbps 程度
通信距離	2m 程度

(MICS:Medical Implant Communications System)

次に、図 C-1-14のループアンテナではマージンが 20dB以上確保できているため、ループアンテナを図 C-1-15に示すように小型化する。開口面積 13mm×4mmのループを、2mmの空気間隙を設けて誘電体で覆う。このアンテナ構成のファントム植込み時の平均利得は-44dBiであり、図 C-1-14と比較して 10dB劣化している。目標アンテナ利得に対するマージンも同様に低下するが、表 C-1-1に示すように 10dB以上確保できているため問題なく通信できると考えられる。但し、このアンテナ利得は、図 C-1-15に示すような小型なループ構成において、これまでの研究結果から予想される利得よりも高く、筐体外部に搭載した小型発振器の影響を含んでいるのではないかと考えられる。

C-2 無線モジュールの試作検討

体内植込み機器用に開発された Zarlink 社 RF-IC ZL70101 を用いて、無線モジュールの

試作を行う。

無線規格は表 C-1-2に示す『体内植込型医療用データ伝送用特定小電力無線局に使用するための無線設備』に準拠することとする。

無線モジュールの仕様としては、昨年度のモジュールよりも、シリアル通信速度の向上(55.6kbps→111.2kbps)を図り、さらなる小型化を達成している。

図 C-2-1に無線モジュールの機能ブロック図を示す。

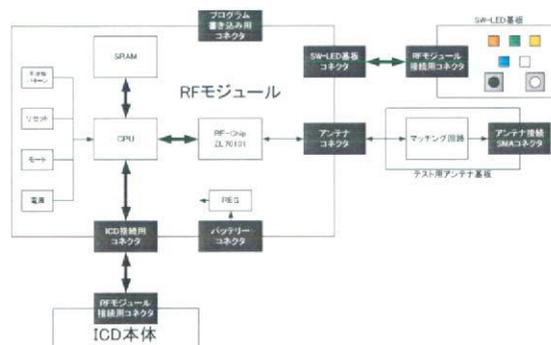


図 C-2-1 無線モジュール機能ブロック図

図 C-2-2に無線モジュールの概観を示す。

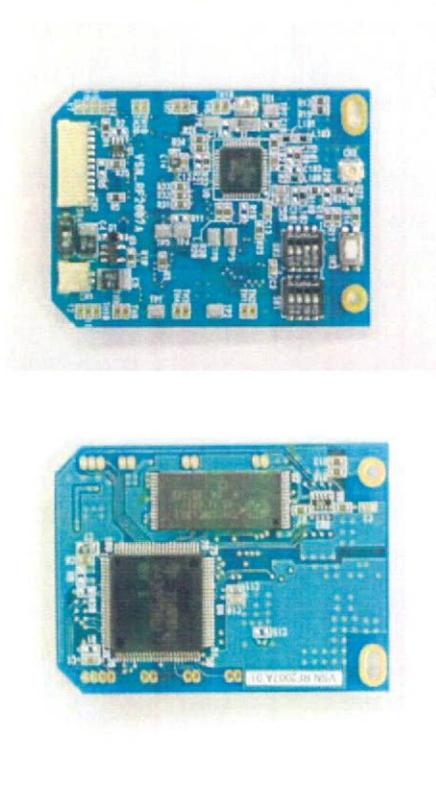


図 C-2-2 無線モジュール概観

図 C-2-3に本年度設計のICD試作機に無線モジュールを組み込んだ状態を示す。



図 C-2-3 無線モジュールの組み込み状態

C-3 緊急時通報システムの検証モデル検討

図 C-3-1に緊急時通報システムのイメージを示す。

体内植込み機器を植込まれた患者は、体外に中継装置(レピータ)を装着する。レピータは体内植込み機器が発する緊急信号を受信し、携帯電話網を介して緊急事態が発生したことを電子メールとして複数の箇所に送信する。この時に、ファイル形式でモニタリングされた生体信号を同時に添付される。

本年度は、上記システムの検証モデルを図 C-3-2に示す構成にて実現した。図 C-3-3に本年度に開発したレピータ装置の外観を示す。



本装置により、患者への取付けを可能とした。

図 C-3-1 緊急時通報システムイメージ

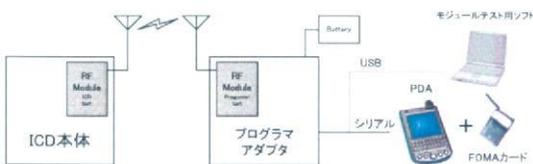


図 C-3-2 本年度の検証モデル



図 C-3-3 PDA版レピータ装置

実際の実験は次の要領で行った。ICDの目標アンテナ利得を回線設計により導き、目標利得に対するマージンを把握し、目標通信距離だけ離れた生体外機器との通信実験を行う。

ICDが通信する状態は、患者が (i)直立状態、(ii)寝た状態の±X、±Y方向においてICDとレピータ側無線ユニットとの目標通信距離を設定した(図 C-3-4)。

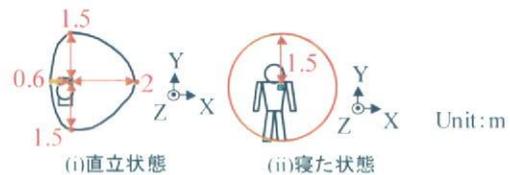


図 C-3-4 目標通信距離

表 C-3-1 目標通信距離及び目標アンテナ利得

	+X	+Y	-X	-Y
目標通信距離[m]	2.0	1.5	0.6	1.5
目標アンテナ利得[dBi]	-56.3	-58.8	-66.8	-58.8

表 C-3-2 アンテナ利得マージン[dB]

アンテナ構成	+X	+Y	-X	-Y
図 C-1-11 (a)のa=5mmループ	23.6	21.2	26.3	19.4
図 C-1-11 (b)のb=2mmモノポール	19.2	13.8	20.9	13.1
図 C-1-13のループ	25.6	16.0	29.1	20.1

レピータ側無線ユニットの所要受信電力レベルは-97dBmであり、これを基に必要なICDアンテナ利得を算出した結果を表 C-3-1に示す。なお、ここでは一例として(i)直立状態についてのみ示す。目標通信距離の2mを実現するためには、アンテナ利得は-56.3dBi以上必要

となる。表 C-3-2に前節で評価した 3 種類のアンテナ構成の利得マージンを示す。全てのアンテナ構成の±X、±Y方向において、マージンが確保できている。

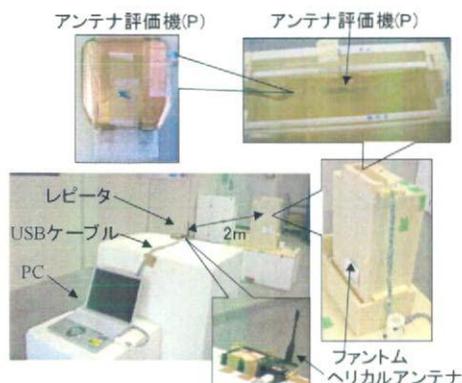


図 C-3-5 ファントムに植込んだ通信実験

表 C-3-3 ファントム植込み時の通信成功率[%]

アンテナ構成	+X	+Y	-X	-Y
図 C-1-11 (a) のa=5mmループ	100	100	100	100
図 C-1-11 (b) のb=2mmモノポール	100	100	100	100
図 C-1-13のループ	100	100	100	100

次に、3 種類のアンテナを搭載したアンテナ評価機(P)を用いて、通信成功率を測定する。通信実験の様子を図 C-3-5に示す。ICDを想定したアンテナ評価機(P)を植込んだ上半身ファントムと、生体外装置を想定したレピータ側無線ユニットを目標通信距離 2mだけ離して配置する。通信実験は、アンテナ評価機(P)からダミーの心電図データ(約 12kByte)を送信し、レピータ側無線ユニットで正しく受信できたかで確認する方法で行う。上半身ファントムの各方向(±X、±Y方向)にレピータ側無線ユニットを配置して実験した結果、表 C-3-3に示すように、試行回数 10 回に対する通信成功率は全て 100%となり、目標通信距離 2mにおいて問題なく通信できることがわかった。また、(ii)寝た状態における通信実験ではアンテナ利得マージンが 10dB以上確保でき、提案アンテナ構成の通信成功率は全て 100%となった。

次に、動物に植込んだ場合の通信実験について示す。アンテナ評価機(P)に搭載するアンテナは、図 C-1-11 (a)に示す突出量a=13mmのループアンテナ(ファントムに植込んだ通信実験で用いた図 C-1-11 (a)のa=5mmのループアンテナと比較して平均利得が 3dB高い)を用い、動物には犬を使用する。通信実験は、図 C-3-6に示すように、犬の腹部にアンテナ評価機(P)を植込み、ダミーの心電図データを送信し、2mの距離に配置したレピータ側無線ユニットで受信する構成で行った。

この通信実験の結果、試行回数 5 回に対する成功率は 100%となり目標通信距離 2m(見通し)において問題なく通信できることが確認できた。



図 C-3-6 動物に植込んだ通信実験

D 考察

D-1 アンテナに関する研究

D-1-1 アンテナの利得改善

ループアンテナの一端を筐体グラウンドと接続することでファントム植込み時の利得が改善するのは、アンテナ電流が筐体にも分布し、アンテナとして動作する体積が増えることで、放射抵抗が大きくなったためであり、金属筐体を持つ ICD やペースメーカー等の生体植え込み機器にとって、微小ループアンテナで高利得を実現するための有効な手段といえる。

アンテナ素子を誘電体で覆うことによりファントム植込み時の放射効率が改善するのは、アンテナ素子と損失媒質との距離を離すことで、損失媒質の影響が減るためであると考え

られる。したがってこの対策は、モノポールアンテナと比較して筐体よりアンテナ素子に電流が集中するループアンテナの構成において、より効果的である。

また、アンテナ素子に加えて筐体の一部も誘電体で覆うことが可能な場合は、更なる効率改善が期待できる。

D-1-2 アンテナの小型化

ICDの小型化に向けて、ループ及びモノポールアンテナの小型化に対する放射特性を把握した結果、ループアンテナの開口面を筐体側面と平行に配置する構成にすることで、筐体からの突出量が小さく、かつ最大の平均利得を確保できることがわかった。

また一方で、モノポールアンテナを上記ループアンテナと同様な配置条件とした場合には、モノポールアンテナと金属筐体に分布する電流が互いに逆位相になることの影響が予想されるため、ループアンテナのように高いアンテナ利得は得られないと考えられる。

D-1-3 ICDに搭載したアンテナ特性評価

アンテナ評価機(M)に搭載したループアンテナのファントム植込み時での放射特性を検討した結果、目標アンテナ利得に対するマージンを確保できることを確認できた。

これにより、現行サイズのICD(約50mm×60mm)であれば、本研究から得られた成果を用いることで、目標通信距離を安定した状態で実現可能であることがわかった。

D-2 無線モジュールの試作検討

本年度もZarlink社のRF-Chip ZL70101を使用し、実際の無線モジュールを開発した。

今後、体内植込み機器システムの検証が進み標準的なシステムが構築されることによって、システムの簡略化が進み、更なる小型化、低消費電力化が可能であると考えられる。

D-3 緊急時通報システムの検証モデル検討

アンテナ評価機(P)を上半身ファントム及び生体(成犬)に植込んで通信実験をした結

果、目標の見通し通信距離2mにおいて、100%のデータ受信成功率で通信できた。これにより、回線設計により算出した目標アンテナ利得の妥当性を確認することができた。

E 結論

今年度は、体内植込み機器専用開発されたRF-CHIPを用いて試作した無線モジュールを使用し、実サイズの模擬筐体を生体内に植え込んだ状態で無線通信機能を確認した。

生体内外の無線通信については、まだ研究が始まったばかりである。本研究で得られた成果が、今後のこの分野の発展に寄与することを期待する。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

G-1 論文

なし

G-2 学会発表

1. 石端他、“人体ファントム内部に配置された小型アンテナの放射特性、”電子情報通信学会、2007年総合大会(2007.3.20-23)
2. Ishibana, et al., “A study of antenna implanted in a human phantom,” 2007 International Symposium on Antennas and Propagation. (Aug. 20-24, 2007)

G-3 新聞報道

なし

H 知的所有権の取得状況

外国特許出願1件

参考文献

- [1] TELECOM-T241.
- [2] 河内まき子・持丸正明, 2005 AIST 人体寸法データベース, 産業技術総合研究所 H16PRO 287.

植込み型突然死防止装置の開発
システム LSI の開発（分担課題名）

分担研究者 保谷 和男（(株)日立超 LSI システムズ 経営戦略センタ 室員）

研究要旨：

本プロジェクトでは、従来の ICD には無い機能の研究開発を行なってきた。本報告では、新たな付加機能を内蔵した超 ICD システムの LSI 化について述べる。超 ICD の小型化、低電力化を図るための最適なシステム分割について検討し、2 品種の専用 LSI 開発の妥当性について報告する。次にこれらの専用 LSI とマイコン、メモリー LSI 等を一つのパッケージに収めて ICD 筐体内へ実装する方法について述べる。検討の結果、50cc 程度の容器内に収容可能なことを明らかにした。また、専用 LSI 開発に当たり注意すべき点について報告している。

A. 研究目的

厚生労働省が平成 15 年 3 月に策定した「医療機器産業ビジョン」では「より優れた」、「より安全性の高い」我が国発の革新的医療機器の開発を通じて、保健医療水準の向上に貢献し、医療機器産業の国際競争力の強化を図る、との方針が示されている。本プロジェクト(本 PJ)は、この研究開発方針にそい、我が国発の革新的医療機器の開発を目指して進めてきた。

従来の ICD を超える、新たな付加機能を ICD へ搭載するための研究を行なってきた。これらの機能を搭載した超 ICD の試作を行い、動物実験等でその有用性を確認した。しかし体内植込み型とするには、サイズ(50cc 程度)および電池寿命(5 年以上)が大きな課題となった。これらの課題を克服する 1 手段として、新規付加機能を取り込んだ超 ICD システムの専用 LSI 化の検討を行なった。

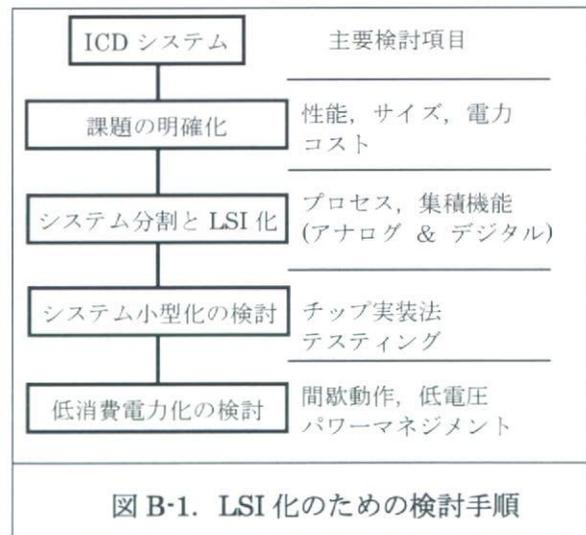
B. 研究方法

超 ICD 用専用システム LSI の開発について検討を行なった。図 B-1 に研究手順を示す。

なお、本報告は ICD システムの LSI 化に関するものであり、倫理面に対する配慮は不要である。

B-1. 小型化、低電力化における課題

本 PJ で目標とする超 ICD に内蔵される付加機能の検証のため、汎用 Op-Amp や汎用マイコンを使用して超 ICD を試作した。この超



ICD を用いて動物実験等を行い、電気的な特性が仕様を満たすことを確認した。しかし、試作した ICD 装置はかなり大型で製品化するためには、サイズの小型化と動作時間の拡大が必須である。この超 ICD の小型化、長寿命化のための課題と対応策の検討を行う。

B-2. システム分割と LSI 化について

超 ICD システムを専用 LSI 化するための最適な分割案について検討を行なう。アナログ回路部、論理回路部の LSI 集積範囲の最適化、定電圧電源回路および電源管理部の LSI 化、CPU 内蔵 ASIC 等について検討した。

B-3. システム小型化の検討

システムの小型化のために SIP(System In Package)技術による実装方法を検討する。

SIP パッケージを使用したときのパッケージ内部構造、ICD 筐体に内蔵されたときの内部構造について検討を行う。

B-4. 低消費電力化の検討

限られた電力で、長時間(5年間)の動作を可能とするために、低消費電力化の要素技術とその具体化のための手法について検討を行う。電池総エネルギーの各機能への割付の最適化を行い、LSI 省電力化技術の中で ICD システムに適した技術の採用可否の検討を行なう。

C. 研究結果

C-1. 小型化、低電力化の課題

本 PJ で開発目標とした超 ICD には、付加機能として通常の除細動機能のほかに、ペースメーカー機能、迷走神経刺激機能、コンダクタンス測定機能、無線通信機能等を取り込み付加価値の向上を図っている。

これらの機能基板と高耐圧コンデンサー、電池、コネクタ等を 50cc 程度の体積に収め、内蔵電池により、最低 5 年の連続動作が必要である。表 C-1-1 にその技術課題と対応策を示す。検討の結果、これらの課題に対応する

項目	現状システムの課題	対応策
小型化	・アナログ部の部品サイズ大 ・MPU、高圧 SW 他搭載チップ数大	・アナログ部、関連する論理部を 1 Chip LSI 化 ・高密度実装 SIP-PKG の採用
低電力化	・アナログ部個別部品の消費電力大 ・常時動作の信号処理部電力大 (CPU 演算含む)	・間歇動作化 ・データ処理部論理のハード化 ・CPU クロックの低減 ・専用 LSI による高効率電源管理

図 C-1-1. 小型化・低電力化の技術課題と対応策

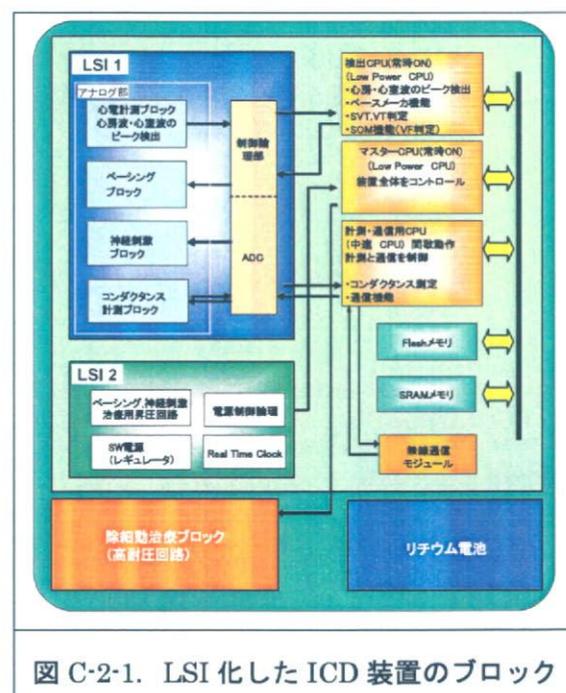
ためには、2種類の専用カスタム LSI の開発が最適と判断した。

C-2. システム分割と LSI 化について

新たに開発する 2種類の専用 LSI の概要、および全体ブロックを図 C-2-1 に示す。

LSI 1 は生体信号処理にかかわるアナログ部とその信号を処理する論理部およびペーシング用、神経刺激用信号発生回路を集積した生体信号処理 LSI である。

LSI 2 はペーシング、神経刺激用電源回路を含み、複数のスイッチング(SW)方式定電圧電源およびその制御回路を集積した高効率電源



管理 LSI である。

マイコンコア内蔵の ASIC-LSI についても検討したが、開発コスト、信頼度面、特殊 IP が必要など困難な面が多く、汎用製品を活用する方がメリット大と判断した。

C-3. システム小型化について

図 C-3-1 に超 ICD 用 SIP の概念図を上面図および断面図として示す。各種 LSI のほかにほとんどの LSI 周辺受動部品(L, C, R, X'tal 発振子等)を内蔵している。PKG の外形サイズは 20mm×20mm×3mm 程度になる。

C-4. 低消費電力化について

低電力化を図るため、各機能に分けて消費電力の概算を行なった。消費電力低減に対してネックとなるのは常時動作している生体信号取得部と生体信号処理用論理部であった。

電池容量と目標動作寿命(5 年間)から逆算した平均許容電流は全体で 45 μ A, このうち 25 μ A 程度が生体信号取得部への配分となる。

LSI 1 の消費電流を見積もる。従来 LSI 製品の実績から、信号処理部用には 10 μ A 程度が必要である。論理部はマイコンの消費電流を含め、処理スピードをクロック 4kHz とすることで 18 μ A 程度まで低減できる。生体信号自身は 100Hz 程度の帯域であり 4kHz クロックで十分処理可能と考える。合計で LSI 1 の消費電流は 28 μ A となる。

他のブロックについては動作デューティが小さいため、省電力設計と厳密な電源管理設計により目標の動作寿命 5 年が達成可能である。

D. 考察

D-1. 小型化、低電力化の課題について

小型化、低電力化(長寿命化)のためには LSI のみならず重要周辺部品として、除細動エネルギー蓄積用の高耐圧コンデンサーと 1 次電池がある。現状では自主開発は難しく最悪海

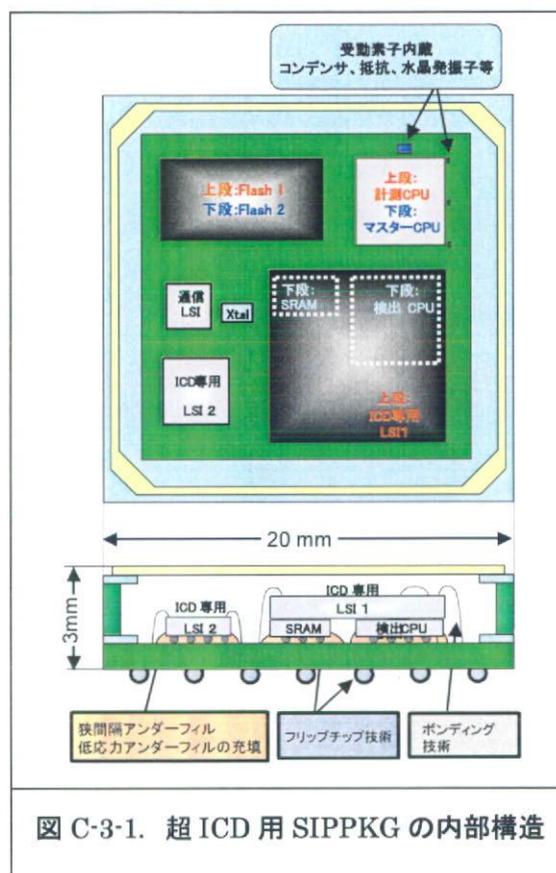


図 C-3-1. 超 ICD 用 SIPPCKG の内部構造

外も含めた大手専門メーカーからの既存製品の調達が必要となる。

D-2. システム分割と LSI 化について

2 個のカスタム LSI の開発を提案した。LSI 1 はアナログ主体のチップである。プロセスは 0.35 μ m 程度が、製造ライン実績、プロセス寿命、信頼性、電気的特性、消費電力等の面で総合的に有利である。Chip Size は 8mm \square 程度となる。チップまたは CSP (Chip Scale Package) で入手することが小型化にとって必須である。

LSI 2 は電源用の LSI である。最近では携帯電話などでも専用の多出力電源 IC を開発しきめ細かな電源マネージメントを行なって、消費電力を削減しており、専用 LSI の開発は有効な手段となる。また神経刺激関係は電源電圧が 10V 程度必要なことより、LSI 2 に集積可能である。チップサイズは 4mm \square 程度となる。また、WDT(Watch Dog Timer)や

RTC(Real Time Clock), システム起動回路等の機能を搭載しシステム信頼度の向上を図る必要がある。

D-3. システムの小型化について

図 D-3-1 に ICD 実装時の内部構造の概略図を示す。小型化のため SIP によるチップの高密度実装を提案した。メモリーLSI (SRAM, Flash) およびマイコンについては汎用製品の活用を想定している。従来, これらのチップは入手困難といわれてきたが, 最近ではチップ表面に基板接続用 Au ボールを搭載した面実装対応の CSP 製品として数多く製品化されており, 携帯型製品分野で強い需要がある。今後は小型で面実装に対応した汎用マイコン製品等の入手が容易になると思われる。

SIP の開発は専門メーカーに依頼することになる。多くの半導体 PKG 専門メーカーが SIP を取り扱っており, 自動設計ツールも用意されている。

D-4. 低消費電力化について

信号処理部には $10\mu\text{A}$ 程度が必要であり, また, 論理部はマイコンの消費電流を含め $18\mu\text{A}$ 程度まで低減できる。合計 $28\mu\text{A}$ と目標電流値 $25\mu\text{A}$ を多少超えるが LSI の詳細設計時に対応可能な範囲に収まっている。他のブロックについては動作デューティが小さいため, 省電力設計と厳密な電源管理設計により目標の動作寿命 5 年が達成可能と考える。

なお, 本システムに使用する LSI は生命にかかわる重要保安部品である。LSI の設計時のシステムの配慮はもとより, 製造, 検査, 在庫管理など, 信頼性について十分な対応が必要となる。また, LSI 開発には数億円/1 品種の費用がかかる。ICD 製品の市場動向, ビジネス規模など慎重な見極めが必要である。

E. 結論

超 ICD の小型化・低電力化の検討を行い,

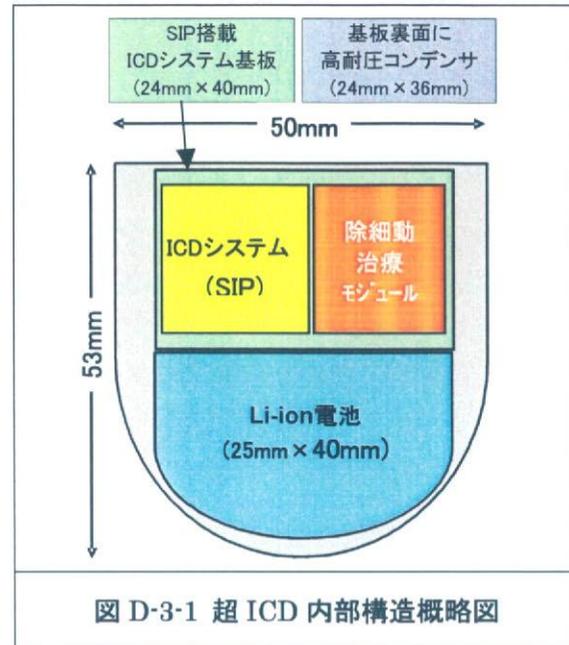


図 D-3-1 超 ICD 内部構造概略図

以下の結論を得た。

1. 専用 LSI を 2 品種開発し汎用 LSI や周辺部品とともにとともに SIP 化することで小型化・長寿命化の見通しを得た。
2. 各機能部の電力解析を行い, 高効率的な電力管理を行なうことで 5 年間の動作寿命の見通しを得た。
3. LSI 化に当たっては品質面, ビジネス面, 製品保守等で十分な検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G-1. 論文

ありません

G-2. 学会発表

ありません。

G-3. 新聞報道

ありません。

H. 知的所有権の取得状況

ありません。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
児玉逸雄	薬物による心室スパイラル・リエントリーの制御	堀江 稔	別冊 医学のあゆみ: 不整脈研究の最新動向	医歯薬出版	東京	2007	119-124
岡田純一, 鷺尾巧, 久田俊明	非線形問題に対する低計算負荷均質化法の提案			日本機械学会論文集A編		2008年2月	191-200

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamazaki T, Akiyama T, Kitagawa H, Komaki F, Mori H, Kawada T, Sunagawa K, Sugimachi M.	Characterization of ouabain-induced noradrenaline and acetylcholine release from in situ cardiac autonomic nerve endings.	<i>Acta Physiol (Oxf)</i>	191	275-284	2007
Uemura K, Li M, Tsutsumi T, Yamazaki T, Kawada T, Kamiya A, Inagaki M, Sunagawa K, Sugimachi M.	Efferent vagal nerve stimulation induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbit.	<i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i>	293	H2254-2261	2007
Sugimachi M, Kawada T, Kamiya A, Li M, Zheng C, Sunagawa K.	Electrical Acupuncture Modifies Autonomic Balance by Resetting the Neural Arc of Arterial Baroreflex System.	<i>Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc</i>	1	5334-5337	2007
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.	<i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i>	292	H921-927	2007
Mizuno M, Kamiya A, Kawada T, Miyamoto T,	Muscarinic potassium channels augment dynamic and static heart rate responses	<i>Am J Physiol Heart Circ</i>	293	H1564-1570	2007

Shimizu S, Sugimachi M.	to vagal stimulation	<i>Physiol;</i>			
Kawada T, Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T, Kamiya A, Uemura K, Mori H, Sugimachi M.	Hypothermia reduces ischemia- and stimulation-induced myocardial interstitial norepinephrine and acetylcholine releases.	<i>J Appl Physiol;</i>	102	622-627	2007.
Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Li M, Zheng C, Shishido T, Mori H, Sugimachi M.	Angiotensin II attenuates myocardial interstitial acetylcholine release in response to vagal stimulation.	<i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i>	293	H2516-2522	2007
Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Shishido T, Shimizu S, Mizuno M, Mori H, Sugimachi M.	Regional difference in ischaemia-induced myocardial interstitial noradrenaline and acetylcholine releases.	<i>Auton Neurosci;</i>	137	44-50,	2007.
Shimizu W, Matsuo K, Kokubo Y, Satomi K, Kurita T, Noda T, Nagaya N, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Inamoto N, Akahoshi M, Tomoike H:	Sex hormone and gender difference--role of testosterone on male predominance in Brugada syndrome.	<i>J Cardiovasc Electrophysiol.</i>	18:	415-21.	2007
Moss AJ, Shimizu W, Wilde AA, Towbin JA, Zareba W, Robinson JL, Qi M, Vincent GM, Ackerman MJ, Kaufman ES, Hofman N, Seth R, Kamakura S, Miyamoto Y, Goldenberg I, Andrews ML, McNitt S:	Clinical aspects of type-1 long-QT syndrome by location, coding type, and biophysical function of mutations involving the KCNQ1 gene.	<i>Circulation.</i>	115	2481-9	2007
Ohgo T, Okamura H, Noda T, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S, Ohe T, Shimizu W	Acute and chronic management in patients with Brugada syndrome associated with electrical storm of ventricular fibrillation.	<i>Heart Rhythm</i>	4	695-700	2007;..
Otomo K, Suyama K, Okamura H, Noda T, Satomi K, Shimizu W, Kurita T, Aihara N, Kamakura S:	Participation of a concealed atriohisian tract in the reentrant circuit of the slow-fast type of atrioventricular nodal reentrant tachycardia.	<i>Heart Rhythm</i>	4	703-10	2007;..

Otomo K, Suyama K, Okamura H, Noda T, Satomi K, Shimizu W, Kurita T, Aihara N, Kamakura S:	Implications of 2:1 atrioventricular block during typical atrioventricular nodal reentrant tachycardia.	<i>J Interv Card Electrophysiol.</i>	19	109-19.	2007
Yokokawa M, Noda T, Okamura H, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S, Shimizu W:	Comparison of long-term follow-up of electrocardiographic features in Brugada syndrome between the SCN5A-positive probands and the SCN5A-negative probands	<i>Am J Cardiol</i>	100	649-55	2007
Aiba T, Yamagata K, Shimizu W, Taguchi A, Satomi K, Noda T, Okamura H, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Kurita T:	Electrophysiologic study-guided amiodarone for sustained ventricular tachyarrhythmias associated with structural heart diseases.	<i>Circ J</i>	72	88-93.	2008
Tsutsumi T, Ide T, Yamato M, Kudou W, Andou M, Hirooka Y, Utsumi H, Tsutsui H, Sunagawa K.	Modulation of the myocardial redox state by vagal nerve stimulation after experimental myocardial infarction.	<i>Cardiovasc Res.</i>	77	713-721	2008
Nakano K, Egashira K, Ohtani K, Gang Z, Iwata E, Miyagawa M, Sunagawa K.	Azelnidipine has anti-atherosclerotic effects independent of its blood pressure-lowering actions in monkeys and mice.	<i>Atherosclerosis.</i>	196	172-179	2008
Chen M, Ichiki T, Ohtsubo H, Imayama I, Inanaga K, Miyazaki R, Sunagawa K.	Inhibition of balloon injury-induced neointimal formation by olmesartan and pravastatin in rats with insulin resistance.	<i>Hypertens Res.</i>	30	971-978	2007
Egashira K, Nakano K, Ohtani K, Funakoshi K, Zhao G, Ihara Y, Koga J, Kimura S, Tominaga R, Sunagawa K.	Local delivery of anti-monocyte chemoattractant protein-1 by gene-eluting stents attenuates in-stent stenosis in rabbits and monkeys.	<i>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</i>	27	2563-2568	2007
Kishi T, Yamada A, Okamatsu S, Sunagawa K.	Percutaneous coronary arterial thrombectomy for acute myocardial infarction reduces no-reflow phenomenon and protects against left ventricular remodeling related to the proximal left anterior descending and right coronary artery.	<i>Int Heart J.</i>	48	287-302	2007
Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Sagara Y,	Inhibition of Rac1-derived reactive oxygen species in nucleus tractus	<i>Hypertension.</i>	50	62-68	2007

Kishi T, Engelhardt JF, Sunagawa K.	solitarius decreases blood pressure and heart rate in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.				
Ohtsubo H, Ichiki T, Miyazaki R, Inanaga K, Imayama I, Hashiguchi Y, Sadoshima J, Sunagawa K.	Inducible cAMP early repressor inhibits growth of vascular smooth muscle cell.	<i>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</i>	27	1549-1555	2007
Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K.	Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction.	<i>Am J Physiol Heart Circ Physiol.</i>	293	H743-H753	2007
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.	<i>J Hypertens.</i>	25	399-406	2007
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.	<i>Atherosclerosis.</i>	194	309-316	2007
Takumi Washio, Jun-ichi Okada, Toshiaki Hisada,	A parallel multilevel technique for solving the bidomain equation on a human heart with Purkinje fibers and a torso model, SIAM	<i>Journal on Scientific Computing</i>			in print
岡田純一, 久田俊明	混合型有限要素法を用いた均質化法における超弾性体の圧縮性制御に関する研究	日本機械学会論文集A編	第73巻 735	1201-1208	2007
Harada M Honjo H Kodama I et al	Moderate hypothermia increases the chance of spiral wave collision in favor of self-termination of ventricular tachycardia/fibrillation	<i>Am J Physiol (Heart Circ Physiol)</i>		In press	2008
Honjo H Yamazaki M Kodama I et al	Modulation of spiral wave reentry by K channel blockade	<i>Circ J</i>	71 Suppl A	A26-A31	2007
児玉逸雄 本莊晴朗 他	薬物による心室スパイラル・リエントリーの制御：K チャネル遮断薬の有用性と限界	<i>心電図</i>	27	275-286	2007
Makoto Yoshizawa, Hiroyuki Kinoshita, Kanako Yamamoto, Kazuo Shimizu, Masashi Inagaki,	Development of an algorithm for detection of fatal cardiac arrhythmia for implantable cardioverter-defibrillator using a self-organizing map	<i>Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.</i>	In press		2008

Kazunori Uemura, Masaru Sugimachi, Kenji Sunagawa					
Hiroshi Oyamada, Atsuhiko Iijima, Akira Tanaka, Kazuhiko Ukai, Haruo Toda, Norihiro Sugita, Makoto Yoshizawa, Takehiko Bando	A pilot study on pupillary and cardiovascular changes induced by stereoscopic video movies	<i>Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation</i>	4(37)	(online journal; http://www.jneuroengineeringandrehab.com/content/4/1/37)	2007
E. Santos Filho, Y. Saijo, A. Tanaka, M. Yoshizawa	Detection and quantification of calcifications in intravascular ultrasound images by automatic thresholding	<i>Ultrasound in Medicine & Biology</i>	34(1)	160-165	2008
稲垣正司、杉町勝、砂川 賢二	ペースメーカー治療の将来	Heart View	11	647-653	2007
稲垣正司、砂川賢二	循環の制御	計測と制御	46	808-814	2007

Characterization of ouabain-induced noradrenaline and acetylcholine release from *in situ* cardiac autonomic nerve endings

T. Yamazaki,¹ T. Akiyama,¹ H. Kitagawa,¹ F. Komaki,¹ H. Mori,¹ T. Kawada,² K. Sunagawa² and M. Sugimachi²

¹ Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan

² Department of Cardiovascular Dynamics, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan

Received 11 January 2007,
revision requested 28 March 2007,
revision received 29 May 2007,
accepted 30 June 2007
Correspondence: T. Yamazaki,
Department of Cardiac
Physiology, National
Cardiovascular Center Research
Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita,
Osaka 565, Japan. E-mail:
yamazaki@ri.ncvc.go.jp

Abstract

Aim: Although ouabain modulates autonomic nerve ending function, it is uncertain whether ouabain-induced releasing mechanism differs between *in vivo* sympathetic and parasympathetic nerve endings. Using cardiac dialysis, we examined how ouabain induces neurotransmitter release from autonomic nerve ending.

Methods: Dialysis probe was implanted in left ventricle, and dialysate noradrenaline (NA) or acetylcholine (ACh) levels in the anaesthetized cats were measured as indices of neurotransmitter release from post-ganglionic autonomic nerve endings.

Results: Locally applied ouabain (100 μM) increased in dialysate NA or ACh levels. The ouabain-induced increases in NA levels remained unaffected by cardiac sympathetic denervation and tetrodotoxin (Na^+ channel blocker, TTX), but the ouabain-induced increases in ACh levels were attenuated by TTX. The ouabain-induced increases in NA levels were suppressed by pretreatment with desipramine (NA transport blocker) and augmented by reserpine (vesicle NA transport blocker). In contrast, the ouabain-induced increases in ACh levels remained unaffected by pretreatment with hemicholinium-3 (choline transport blocker) but suppressed by vesamicol (vesicle ACh transport blocker). The ouabain-induced increases in NA levels were suppressed by pretreatment with ω -conotoxin GVIA (N-type Ca^{2+} channel blocker), verapamil (L-type Ca^{2+} channel blocker) and TMB-8 (intracellular Ca^{2+} antagonist). The ouabain-induced increases in ACh levels were suppressed by pretreatment with ω -conotoxin MVIIC (P/Q-type Ca^{2+} channel blocker), and TMB-8.

Conclusions: Ouabain-induced NA release is attributable to the mechanisms of regional exocytosis and/or carrier-mediated outward transport of NA, from stored NA vesicle and/or axoplasm, respectively, while the ouabain-induced ACh release is attributable to the mechanism of exocytosis, which is triggered by regional depolarization. At both sympathetic and parasympathetic nerve endings, the regional exocytosis is because of opening of calcium channels and intracellular calcium mobilization.

Keywords acetylcholine, Ca^{2+} channels, cat, microdialysis, Na^+ , K^+ -ATPase, noradrenaline.

It is generally accepted that ouabain modulates autonomic nerve function by inhibition of membrane Na^+, K^+ -ATPase (Gillis & Quest 1979). This neuronal modulatory effect was mainly reported with *in vitro* sympathetic (Sweedner 1985), parasympathetic nerve endings (Satoh & Nakazato 1992, Gomez *et al.* 1996) and adrenal glands (Haass *et al.* 1997). Furthermore, ouabain-induced modulatory effect was reported with *in vitro* studies on motor endplate (Vyskocil & Illes 1977, Zemkova *et al.* 1990). From these *in vitro* studies, several mechanisms are presently suggested to induce release of neurotransmitter from the nerve endings. However, it is uncertain whether the manner of modulation differs between *in vivo* sympathetic and parasympathetic nerve endings. A major concern is whether ouabain induces a brisk increase in neurotransmitter efflux (spontaneous neurotransmitter release). Kranzhöfer *et al.* (1991) reported that ouabain-induced spontaneous noradrenaline (NA) release from sympathetic nerve endings. On the other hand, ouabain-induced spontaneous acetylcholine (ACh) release was reported *in vitro* studies using synaptosomes (Satoh & Nakazato 1992). No reports have described *in vivo* spontaneous ACh release evoked by ouabain. Further, a second issue is at which site ouabain induces neurotransmitter release: stored vesicle or axoplasm (Haass *et al.* 1997). NA and ACh release have been reported in stored vesicles and/or the axoplasm. It is uncertain, however, which site induces the predominant neurotransmitter release evoked by ouabain *in vivo*. Furthermore, the mechanisms underlying the neurotransmitter release evoked by ouabain remain unclear. Neuronal effects of ouabain have been attributed to the inhibitory action upon Na^+, K^+ -ATPase and transmembrane sodium pump (Haass *et al.* 1997). As a consequence of the reduced sodium gradient at the plasma membrane, two possible mechanisms have been proposed to induce NA release from nerve endings; (i) carrier-mediated reversed NA transport, and (ii) Ca^{2+} -dependent exocytotic NA release. The manner and mechanisms of NA efflux have been extensively studied and accepted *in vivo* in isolated tissues (Sweedner 1985, Haass *et al.* 1997). However, it remains unclear whether these assumptions are valid in the cardiac sympathetic or parasympathetic nerve endings *in vivo*.

Cardiac dialysis technique in combination with highly sensitive measurement of NA or ACh has offered a powerful method for detecting the low level of dialysate NA or ACh obtained from the myocardial space (Akiyama *et al.* 1991, 1994). We demonstrated that dialysate NA or ACh levels were affected by local administration of pharmacological agents through dialysis probes, indicating that changes in dialysate NA or ACh levels reflect NA or ACh output from cardiac postganglionic sympathetic or parasympathetic nerve end-

ings (Yamazaki *et al.* 1997, Kawada *et al.* 2001) respectively. Using dialysis technique, ouabain can be administered locally and it is possible to monitor NA or ACh output following locally applied ouabain (Yamazaki *et al.* 2001). Furthermore, comparison of the dialysate NA response in the presence and absence of neuronal agents can differentiate carrier-mediated NA release from calcium dependent exocytotic NA release (Yamazaki *et al.* 1997). With locally applied neuronal blockers, we examined the mechanisms and the sites underlying NA or ACh release evoked by ouabain.

Methods

Animal preparation

Adult cats were anaesthetized with pentobarbital sodium (30–35 mg kg^{-1} i.p.). The level of anaesthesia was maintained with a continuous intravenous infusion of pentobarbital sodium (1–2 mg kg^{-1} h^{-1}). The animals were intubated and ventilated with room air mixed with oxygen. Body temperature was maintained using a heated pad and lamp. All protocols were performed in accordance with the National Cardiovascular Center Research Institute Animal Care Ethics Committee guidelines that were in strict compliance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Electrocardiogram and mean arterial pressure were simultaneously monitored with a data recorder. The sixth rib on the left side was resected to expose the heart. With a fine guiding needle, one or two dialysis probes for dialysate sampling were implanted in the mid wall of the anterolateral region of the left ventricle. Heparin (100 U kg^{-1}) was administered after implantation of the dialysis probe and a maintenance dose was given every hour thereafter.

Dialysis technique

The material and properties of the dialysis probe were described previously (Akiyama *et al.* 1991, 1994). Briefly, we designed a transverse dialysis probe. Both ends of a dialysis fibre (13 mm length, 0.31 mm o.d. and 0.2 mm i.d.; PAN-1200, 50 000 molecular weight cutoff, Asahi Chemical, Tokyo, Japan) were connected and glued to polyethylene tubes (25 cm length, 0.5 mm o.d. and 0.2 mm i.d.). The dialysate NA or ACh levels were measured in separate animals. For the measurement of dialysate NA, the dialysis probe was perfused with Ringer's solution at 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Sampling periods were 2 min in duration (one sample volume = 20 μL), which was the minimum period necessary to collect sufficient NA for satisfactory measurement. For the measurement of dialysate ACh, Ringer's solution containing eserine (choline esterase

inhibitor, 100 μM) was perfused at 2 $\mu\text{L min}^{-1}$ and sampling periods were 15 min in duration. Dialysate sampling was started 120 min after probe implantation, when the dialysate NA or ACh concentration had reached a steady level. Each sample was collected in a microtube containing 0.1 N HCl or phosphate buffer to prevent oxidation. The dead-space volume between the dialysis and sample tube was measured. Taking this dead-space into account, samples were obtained.

Experimental protocols

In our previous study, we demonstrated that the dialysate NA or ACh levels reflect cardiac neuronal NA or ACh disposition at the nerve endings (Yamazaki *et al.* 1997, Kawada *et al.* 2001). Therefore, in the present study, we obtained dialysate samples and measured the dialysate NA or ACh levels as an index of NA or ACh output from post-ganglionic sympathetic or parasympathetic nerve endings respectively. Generally two mechanisms and sites are proposed to induce NA and ACh release from nerve endings: exocytotic (quantum) release from the stored vesicle and non-exocytotic (non-quantum) release from the axoplasm. The present studies were designed to clarify whether ouabain-induced NA or ACh efflux are affected by local administration of pharmacological agents that modify experimental conditions.

Protocol 1: Time courses of dialysate NA and ACh levels during local administration of ouabain. We examined the time course of dialysate NA and ACh levels during local administration of ouabain (100 μM). Ouabain was administered for 60 min. Dialysate NA levels were measured before and at 10-min intervals during ouabain administration. Dialysate ACh levels were collected in consecutive 15-min sampling periods.

Protocol 2: Influence of nerve transection and Na^+ channels on dialysate NA or ACh response evoked by ouabain. To test whether ouabain modulated central-mediated exocytotic neurotransmitter release, we examined the time course of ouabain-induced dialysate NA and ACh levels after transection of stellate ganglia or cervical parasympathetic nerve tract. For cardiac sympathetic denervation, the region of the stellate ganglia was exposed through the intercostal space, and bilateral transection of stellate ganglia was performed. After cardiac sympathetic denervation, heart rate response to carotid occlusion was blunted. In separate cats, cervical vagotomy was performed. We started dialysate sampling at 120 min after surgical interruption and ouabain-induced NA or ACh efflux was examined. Furthermore, to examine involvement of depolarization on NA or ACh release, ouabain-induced NA or ACh

efflux was measured with addition of tetrodotoxin (TTX, 10 μM) through the dialysis probe. At 60 min after the beginning of TTX administration, we started the control sampling and examined the ouabain-induced NA or ACh response.

Protocol 3: Influence of NA-, ACh- and choline transporters on dialysate NA or ACh response evoked by ouabain. To test whether ouabain-induced neurotransmitter efflux was derived from axoplasm or stored vesicle, ouabain-induced NA or ACh efflux was examined with local administration of pharmacological agents, which affected the transport and content of neurotransmitter at the nerve endings. Membrane carrier-mediated NA transport was blocked by local administration of desipramine, whereas vesicular NA import was blocked by local administration of reserpine. In either case, ouabain-induced NA efflux was examined with the addition of desipramine (100 μM) or reserpine (10 μM) through the dialysis probe. The dosage of agent-administration was decided after referring to the previous studies (Akiyama *et al.* 1994, Yamazaki *et al.* 1997). Membrane carrier-mediated choline transport was blocked by local administration of hemicholinium-3 (10 μM), whereas vesicular ACh import was blocked by local administration of vesamicol (10 μM) (Kawada *et al.* 2001). In either case, ouabain-induced ACh efflux was examined with the addition of hemicholinium-3 or vesamicol through the dialysis probe.

Protocol 4: Influence of Ca^{2+} transporter, channel, mobilization on dialysate NA or ACh response evoked by ouabain. To test the contention that ouabain-induced neurotransmitter efflux was modulated by changes in intracellular Ca^{2+} levels, the influence of Ca^{2+} transporter, channel, mobilization on the dialysate NA or ACh response evoked by ouabain was examined. We focused on the involvement of three types of voltage-dependent Ca^{2+} channel, the L- and N types in the NA release evoked by ouabain. Sixty minutes after starting local administration of verapamil (100 μM), or ω -conotoxin GVIA (10 μM), we measured the ouabain-induced NA response. Second, we examined the involvement of plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the NA release evoked by ouabain. The inhibitors of membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange (dechlorobezamil; 100 μM , or KB7943; 10 μM) were locally administered through the dialysis probe and the ouabain-induced NA response was measured. Third, we examined the involvement of intracellular Ca^{2+} level in the NA release evoked by ouabain. An intracellular Ca^{2+} antagonist [3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethyl amino)-octyl ester (TMB-8)] blocks the efflux of calcium from intracellular calcium stores without affecting influx