

心筋収縮と心筋 Vm/Cai 同時計測システム

Dual measurement system of myocardium contraction and
cardiac action potential/intracellular calcium signal

○ 立柳紀林 (電機大) 柴田仁太郎 (新宿三井ビルクリニック)

山崎正俊 (名大環研) 本荘晴朗 (名大環研)

荒船龍彦 (電機大) 本間章彦 (電機大)

Norifusa TACHIYANAGI Tokyo Denki University

Nitaro SHIBATA Sinjuku Mitsui Building Clinic

Masatoshi YAMAZAKI Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

Haruo HONJO Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

Tatsuhiko ARAFUNE Tokyo Denki University

Akihiko HOMMA Tokyo Denki University

Abstract: Cardiac simultaneous optical mapping of membrane voltage (Vm) and intracellular calcium (Cai) has become powerful tools for analyze cardiovascular electrophysiological function. However, cardiac contraction produces motion artifacts during optical recording. For eliminating motion artifact, conventional optical mapping approach were adding excitation-contraction uncoupler (E-C uncoupler) such as 2,3-butanedione monoxime (BDM). Nevertheless, BDM has proven to affect APD restitution and incidence of arrhythmia. We developed a image processing software to subtract motion artifacts from optical mapping signal that were captured in the experiment without E-C uncoupler. Optical mapping performed with Langendorff-perfused rabbit heart stained with voltage-sensitive dye RH237 and Ca²⁺ sensitive dye Rhod-2. The fluorescence signal was split with a dichroic mirror at 630nm. The emitted fluorescence signal were recorded using two CMOS cameras. Motion tracking information estimated from both Cai and Vm images by deformable transform and transform as static image.

Key Words:

1. 背景

心臓は血液ポンプの役割を担う重要な臓器であり、その収縮は心筋細胞の活動電位により駆動される。この興奮伝播に異常が起こると心室細動のような心臓突然死に至る重篤な疾病や、血栓の原因となり脳塞栓症や肺塞栓症のリスクを高める心房細動が引き起こされる。

興奮伝播に異常が発生する機序を解明するために、組織や臓器の形を保ったままの標本を色素で染め、高速度カメラを用いて活動電位やイオン動態を観察する光学計測による研究がおこなわれてきた⁽¹⁾。

従来の光学計測手法では同一画素に同一心筋が映り続けることを前提として波形導出を行っているため、モーションによるアーチファクトを抑えるために筋収縮を抑制する薬剤である 2,3-butanedione monoxime (BDM) などの筋収縮抑制剤(E-C uncoupler : excitation-contraction uncoupler)を添加するのが一般的である。しかし、BDM は不整脈機序の重要な指標である APD restitution 曲線に影響を与えるなど、電機生理学的な変化をもたらすことが知られている⁽²⁾。また、興奮伝播に伴う心筋細胞の収縮と伸展が逆に細胞内イオン動態に影響を与えることも知られている。中でも収縮に伴う Ca²⁺電流発生である Stretch-Activate channel (SAC)は Na⁺チャンネルに先行して脱分極を誘発する現象であり、。心房細動の発生は SAC による肺静脈からの期外収縮が原因であると考えられ⁽³⁾⁽⁴⁾、より詳細な不整脈の機序解明のためには心臓標本の筋収縮を抑制せずに活動電位およびイオン動態を計測するシステムを開発しなければならない。

Inagaki らによって、E-C uncoupler を用いずに剛体幾何学変換を用いて活動電位を計測する手法が報告されているが⁽⁵⁾、細胞内 Ca²⁺と活動電位の両方のシグナルの E-C uncoupler 無し同時マッピングは未だ行われていない。

本研究の目的は、心臓表面のテクスチャおよびランドマークを用いて非剛体レジストレーションを行うことで E-C uncoupler を用いない活動電位、細胞内 Ca²⁺の同時光学計測システムを開発することである。

2. 方法

2.1 全体心標本の作成と光学計測

全体心標本にはウサギ摘出心から作製したランゲンドルフ還流心標本を用い、膜電位感受性色素 RH-237 と細胞内 Ca²⁺感受性色素 Rhod-2 AM で同時染色を行った。

光学計測は二台の高速度カメラ(Fastcam-Max: Photron 社)を用いて 50×50mm²の範囲に対して 250fps、解像度 512×512pixel で撮影を行った。染色した全体心標本への励起光源として主波長 525nm の高輝度青緑色 LED を使い、カットオフ 630nm のダイクロイックミラーで蛍光シグナルを分離した。膜電位シグナルはカットオフ 700nm のロングパスフィルターを通して撮影し、細胞内 Ca²⁺シグナルはカットオフ周波数 510±20nm のバンドパスフィルターを通して撮影した。ランドマークとして蛍光色素であるフィコエリスリンをシートにし、貼付した。

2.2 解析手法

すべての解析は MATLAB および Open Source Project であ

る ITK を使い、 $7 \times 7, \sigma=1$ のガウシアンフィルタを適用して行った。

活動電位(Vm: membrane Voltage)シグナルを計測した映像と Ca^{2+} シグナルを計測した映像に対し、位置合わせのために剛体幾何学変換を用い、その後非剛体レジストレーションを用いてモーションアーチファクトの除去を行った。

非剛体レジストレーションアルゴリズムとして Thirion の demons algorithm(6)を用いた。

Ca^{2+} 映像から非剛体レジストレーションによってモーションアーチファクトを除去し、各画素の輝度の最大値を 1、最小値を 0 とする正規化を行った。 Ca^{2+} より得られた変換行列を用いて Vm についてもレジストレーションを行った。同一点より活動電位持続時間 (APD : Action Potential Duration) および細胞内 Ca^{2+} シグナル持続時間(CaSD : Calcium Signal Duration)を導出した。持続時間は立ち上がり点から立下り点までの時間を持続時間とした。

3. 結果

モーションアーチファクト除去を行わなかった Ca^{2+} 波形と、モーションアーチファクト除去を行った Ca^{2+} 波形を同一点より導出したものを Fig.1 に示す。

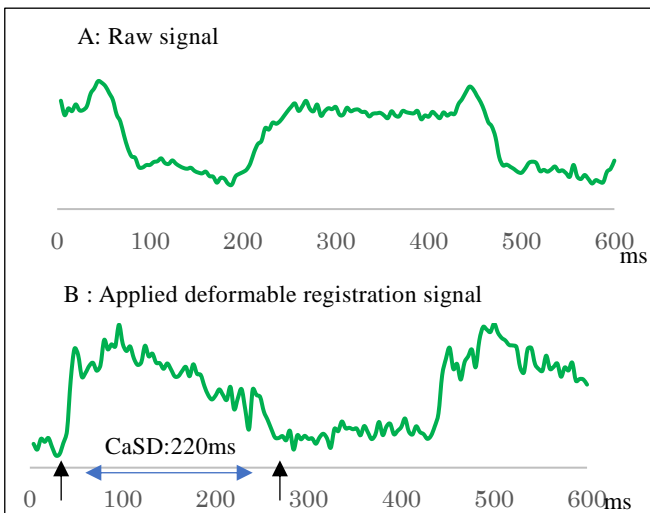


Fig.1 Intracellular Ca^{2+} signal trace A: Raw signal deisturbed by motion artifact B:Applied proposal processing signal eliminated motion artifact by deformable registration

モーションアーチファクト除去を行わなかった Vm 波形と、モーションアーチファクト除去を行った Vm 波形を同一点より導出したものを Fig.2 に示す。

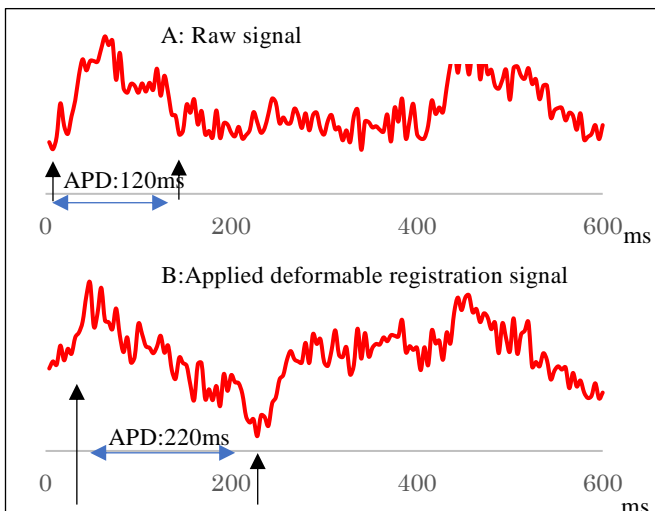


Fig.2 Intracellular Vm signal trace A: Raw signal deisturbed by

motion artifact B:Applied proposal processing signal eliminated motion artifact by deformable registration

Fig.3 に提案手法を適用した Vm/ Ca^{2+} 両波形の時系列を合わせた波形を示す。

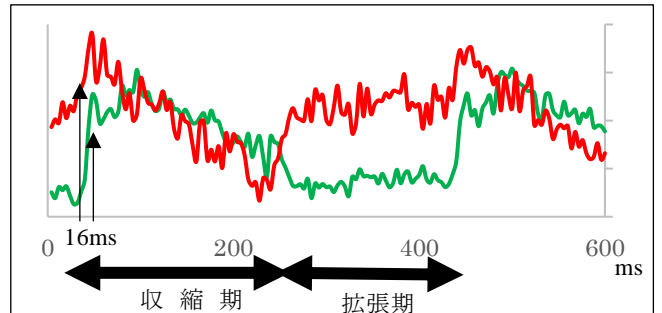


Fig.3 Intracellular Ca^{2+} trace and Corresponding transmembrane potential eliminated motion artifact

4. 考察と結論

Fig.1 より、提案手法を適用した結果モーションアーチファクトが除去され、正常な Ca^{2+} 波形様が得られた。また、Fig.2 ではモーションアーチファクトによりゆがめられた電位波形の APD が 120ms であったのに対し、提案手法適用後の APD は 200ms であった。Fig.1 B より導出した CaSD は 220ms であったため、波形形状は十分でないものの APD に関しては改善がみられた。Vm/ Ca^{2+} 両波形を合わせた Fig.3 を見ると立ち上がりの差は 16ms で Vm が先であり、正常な心筋細胞の Vm に遅れて Ca^{2+} が立ち上がる現象を詳しくとらえることができた。さらに、拡張期で Vm/ Ca^{2+} の波形に大きな差が生じていることから、拡張期のレジストレーションに課題が見られた。拡張期におけるテクスチャの少ない領域の緩慢な動きに対応するため、マーカやアルゴリズムの改善が必要であると考えられた。

参考文献

- (1) Chikaya Omichi et.al, Intracellular Ca dynamics in ventricular fibrillation, Am J Physiol Heart Circ, vol.286,pp. H1836-H1844,2004
- (2) Qing Lou et al, The role of dynamic instability and wavelength in arrhythmia maintenance as revealed by panoramic imaging with blebbistatin vs. 2,3-butanedione monoxime Am J Physiol Heart Circ, vol.302,pp. H262-H269,2012
- (3) Kunihiro Nishida et al, Animal models for atrial fibrillation: clinical insights and scientific opportunitiesEuropace,vol 12 pp.160-172,2010
- (4) Masatoshi Yamazaki et al, Mechanisms of Stretch Induced Atrial Fibrillation in the Presence and the Absence of Adreno-Cholinergic Stimulation: Interplay between Rotors and Focal Discharges,Heart Rhythm,vol6(7),pp.1009-1017,2009
- (5) M Inagaki et al, High resolution optical mapping of cardiac action potentials in freely beating rabbit hearts,IEEE EMBS,September,pp.1-5,2004
- (6) Thirion JP, Image matching as a diffusion process: an analogy with Maxwell's demons,Med Image Anal,Sep2(3),pp.243-60,1998