

初代培養心筋細胞集団における ピン止め回転ラセン波の除去

京都大学ウイルス研究所 磯村 彰宏 (Akihiro Isomura)

Institute for Virus Research, Kyoto University

1 はじめに

生命現象で見られるリズム現象や空間パターンの自発的生成は非平衡開放系に特徴的な現象であり、数理物理の観点からも重要な研究対象である。その中でも心臓における心筋細胞の集団的な非線形ダイナミクスは、不整脈などとの関連でヒトの生死に関わる重要な現象である¹。

心臓は、心筋細胞集団における膜電位伝播と興奮収縮連関によってそのポンプ機能が維持されている。不整脈の一種である頻脈 (tachycardia) の状態では、興奮回転ラセン波が発生していると考えられており、抗頻脈ペーシング (anti-tachycardia pacing=ATP) と呼ばれる短周期の電気刺激を複数回与える治療方法が実際に用いられている。しかし、その成功率は 60~90% と必ずしも成功しないことが知られており、その原因は不明なままであった。

近年、壊死した組織や血管などの正常な心筋組織と異なる組織 (解剖学的障害物) を模した、興奮性を失った不均質な領域にピン止めされた回転ラセン波が安定であり、その解消が困難であることが報告された²⁻⁴。それに対し、均質な興奮場におけるピン止めされていない回転ラセン波については、

ATPのような周期的な電気刺激によってラセン波の端点を徐々に刺激源から遠い方向へ押しやり(ドリフト)、系の境界と衝突させることでラセン波を消滅できることがBZ反応系や心筋細胞培養系などの興奮性媒体に関する研究で知られていた^{5,6}。しかし、ピン止めラセン波についてもATPのような周期的な電気刺激によってラセン波を解消できるのかどうかは、その実験的検証とメカニズムの解明が課題となっていた。

そこで、我々はラット心筋細胞の初代培養系を用いたピン止め回転ラセン波の実験的研究及び数値シミュレーションを行った⁷。まず、ラット心筋細胞の単層培養組織において、細胞が存在しない領域にピン止めされた回転ラセン波を発生させ、ラセン波の外側の領域において周期的な電気刺激を行い、ピン止め回転ラセン波を除去できるかどうかを試みた。

2 実験方法

心筋細胞の実験には、ラット新生児から摘出した心臓を用いた^{8,9}。まず、生後1日齢又は2日齢のWistar Ratから心臓を単離し、心組織の切片を得た。次に、Collagenaseにて細胞外基質を消化、細胞を分散させた後、遠心分離によって細胞を回収した。細胞懸濁液はCO₂インキュベータ(37°C、5%CO₂)で60分間インキュベートした後、上清を回収した。細胞は計数された後、10⁶cellsが細胞接着タンパク質のFibronectin(12µg/ml)をコーティングした直径22mmのカバーガラス上に播種された。細胞はCO₂インキュベータ(37°C、5%CO₂)内で観察前まで維持された。培養1日目は、10% Fatal Bovine Serum (FBS) と 1% penicillin-streptomycin を含んだ Dulbecco-modified Eagle Medium (DMEM) 培地中で細胞を培養した。培養2日目以降は 10% Calf Serum(CS) と 1% penicillin-streptomycin を含んだ Minimum Essential Medium (MEM) 培地中で細胞を培養した。

興奮波の観察は培養開始から4~6日後に行った。培地は180µMのLidocaine(ナトリウムチャンネル阻害剤)を含んだTyrode's Salt Solutionに交換さ

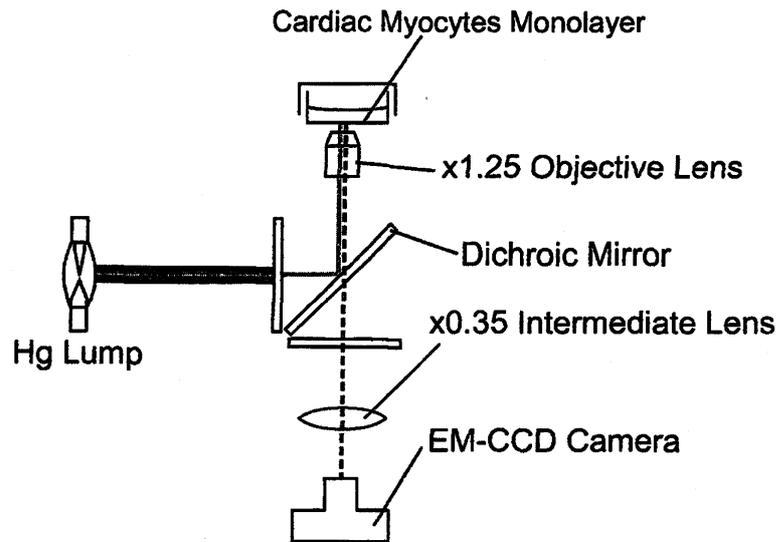


図1 カルシウム感受性色素の蛍光観察装置の模式図。ミラーとレンズを通過している灰色の実線と点線はそれぞれ励起光の青色光と蛍光の緑色光を表す。

れ、室温で観察が行われた。興奮波は、カルシウム感受性蛍光色素 Fluo-4 を細胞内に導入し、水銀ランプで励起することで可視化された。図1に、実験で用いられた観察装置の模式図を示す。蛍光観察には、倒立顕微鏡 (IX-70; Olympus)、 $\times 1.25$ 対物レンズ (PLAPON, N.A.=0.04; Olympus)、及び $\times 0.35$ の中間変倍を組み合わせた光学系を用いて行った。

蛍光像の観察には、EMCCD カメラ (iXon DV887ECS-UVB; Andor) を用いた。4 \times 4 ビニングでの撮影によって、128 \times 128 ピクセル、100fps、14-bit の動画像が取得された。得られた画像データは、ImageJ とカスタムメイドのプラグインを用いて解析された。時系列データは、5.0Hz の時間方向ローパスフィルタと、1 ピクセル半径のガウス空間平滑化フィルタによってノイズが除去された。さらに、蛍光強度のアップストロークが検出され、Activation Time Map が計算された¹⁰。

電気刺激は、単極の電気刺激装置によって培養組織の局所的な領域を脱分極させることで導入された。また、回転ラセン波は、伝播する興奮波の不応

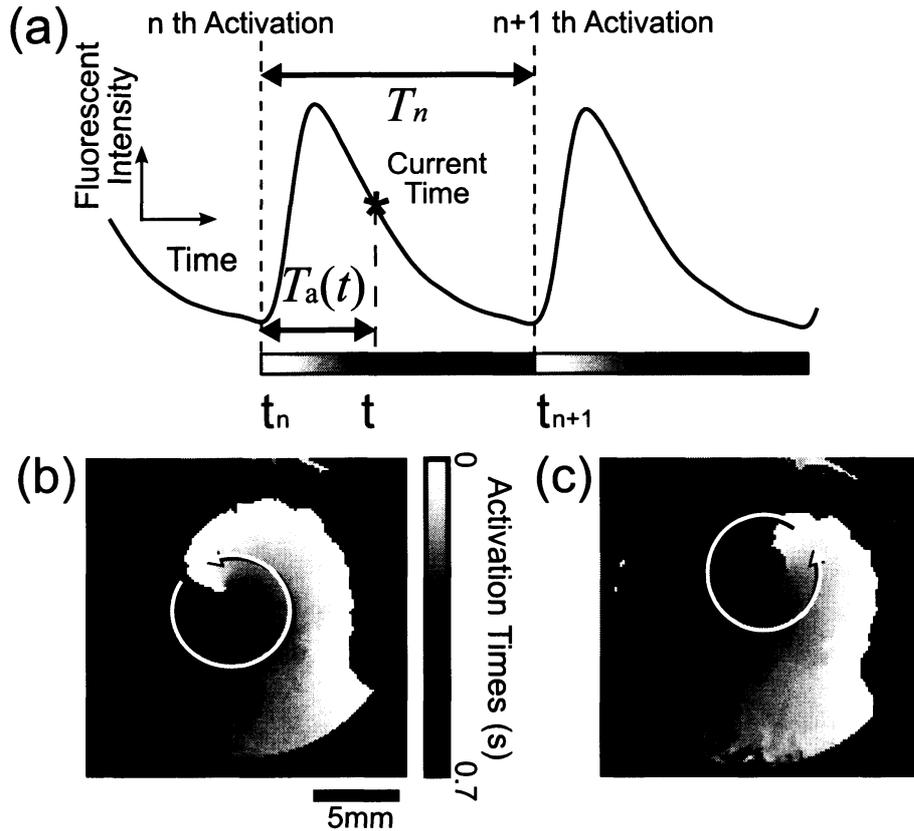


図2 培養心筋細胞集団における興奮回転ラセン波。(a) 蛍光強度の時系列の模式図と Activation Time のカラーマップ。(b) ピン止めされていない回転ラセン波。(c) ピン止め回転ラセン波。(b) と (c) の矢印はラセン波の回転方向を示す。

期の刺激、または高周波刺激による興奮波面の崩壊によって人為的に発生させられた。

3 実験結果

図2に培養心筋細胞集団で観察された興奮回転ラセン波のダイナミクスを示す。まず、図1の観察装置によって得られるEMCCDカメラ1ピクセルあたりの蛍光強度の時系列の模式図を図2(a)に示した。図に見られるように、 n 回目に蛍光強度が上昇した時刻を発火時刻 t_n として検出し、それ以

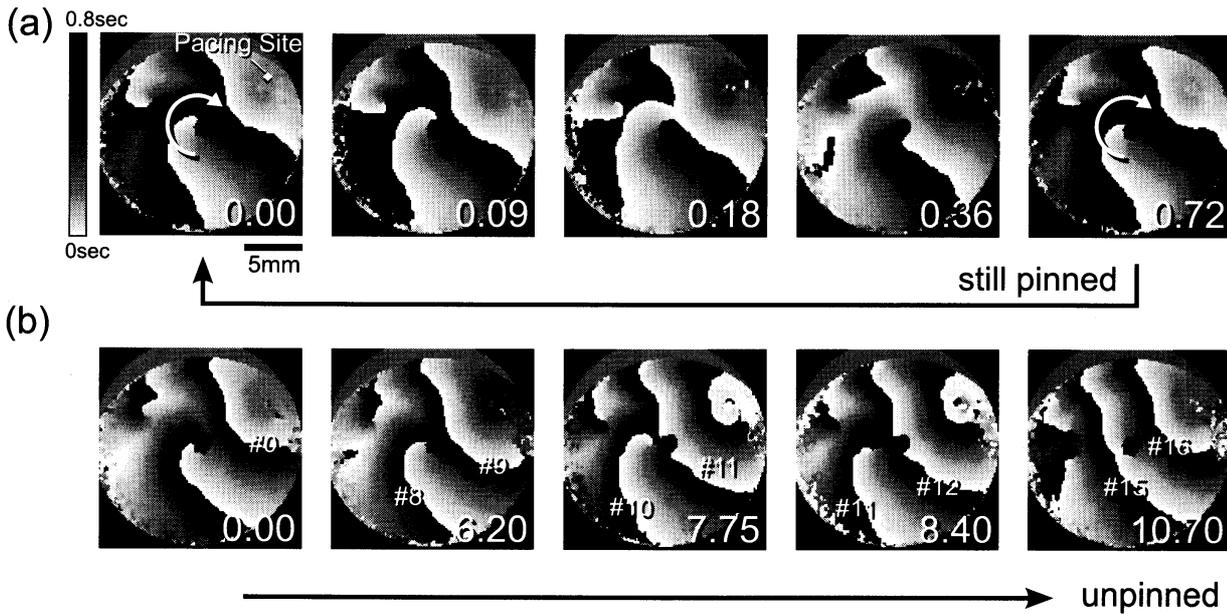


図3 培養心筋細胞集団におけるピン止め回転ラセン波の除去。(a) 失敗例と (b) 成功例を示した。

後の経過時間 $T_a(t)$ をグレイスケールの濃淡画像にマップ (Activation Time Map) する。図 2(b) は、そのようにして得られたピン止めされていない興奮回転ラセン波のスナップショットである。ピン止めラセン波は、ピン止めされていないラセン波の回転中心付近の細胞をピンセットなどで外科的に取り除くことで形成された。図 2(c) は、そのようにして得られたピン止めされ回転ラセン波のスナップショットである。その回転中心の黒い領域は細胞が存在しない領域を示す。ここで注意したいのは、図 2(b) の回転中心では白い波面の端点に白から黒のすべての”位相”が合流する位相特異点が存在するのに対し、図 2(c) ではそれが見られないことである。すなわち、ラセン波がピン止めされているかどうかは、このような位相特異点の有無で判別することができる。こうして Activation Time Map によって、興奮波面を白いラインとして可視化できるだけでなく、ピン止めされているかどうかをより明瞭に判別することが可能になった。

そこで、我々はこのようなピン止め回転ラセン波に対して周期的な電気刺

激を導入することで興奮波を送り込み、ピン止め回転ラセン波が除去できるのかどうかを調べた。図3に、1.2Hzで回転するピン止め回転ラセン波に対して、1.3Hzで電気刺激した場合と1.5Hzで電気刺激した場合について示した。1.3Hzで刺激した場合、刺激源で発生した1番目の興奮波は障害物から離れた場所でピン止めラセン波と衝突し、対消滅した。しかし、その次の波は1.3Hzとピン止めラセン波より短い周期で送り込まれたため、より障害物に近い領域でピン止めラセン波と衝突、対消滅した。それを何度か繰り返し替えた後、図3(a)に示されているように、障害物の上部で対消滅が起こり、一方で下部を進行してきた波が新たなピン止めラセン波になる、といった定常状態に達した。この定常状態は、少なくとも10回以上繰り返し替えされた。そこで、我々はさらに刺激の周波数を1.5Hzに上昇させた。すると、数回の衝突を経て位相特異点が露になり(図3(b)の時刻6.20秒)、ピン止めラセン波がピン止めから解放されたことが確認された。もはやピン止めされていないラセン波は、その後から送り込まれた興奮波によって押し出され(ドリフト)、最終的に系の境界付近に追いやられ、消滅した。

これまで、均質な興奮場におけるピン止めされていないラセン波については、ラセン波の回転周波数以上の周期刺激を導入すれば必ずそのラセン波が除去できることが知られていた。しかし我々の実験結果から、ピン止め回転ラセン波についてはその条件だけでは十分ではなく、さらに高い周波数の刺激を導入しなければピン止めラセン波を除去できないことが明らかになった。また、ピン止め解消後は以前から知られていたドリフトの効果でラセン波を系の境界まで押しやり、消滅させることができることがわかった。そこで、ピン止め回転ラセン波の解消に必要な条件をさらに調べるため、心筋モデルを用いた数値シミュレーションを行った。

4 数値計算

モデルは、3変数の心筋モデルである Fenton-Karma モデル^{11,12}を用いた。Fenton-Karma モデルは、活動膜電位 (u)、速いゲート変数 (v)、遅いゲート変数 (w) の3変数から成り、

$$\frac{\partial u}{\partial t} = \nabla \cdot (D\nabla u) - J_{fi}(u; v) - J_{so}(u) - J_{si}(u; w), \quad (1)$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = \frac{S(u_c - u)}{\tau_v^-(u)}(1 - v) - \frac{S(u - u_c)}{\tau_v^+}v, \quad (2)$$

$$\frac{\partial w}{\partial t} = \frac{S(u_c - u)}{\tau_w^-}(1 - w) - \frac{S(u - u_c)}{\tau_w^+}w, \quad (3)$$

などと表される。ここで、 J_{fi} は速い内向き電流、 J_{so} は遅い外向き電流、 J_{si} は遅い内向き電流であり、

$$J_{fi}(u; v) = -\frac{S(u - u_c)}{\tau_d}v(1 - u)(u - u_c), \quad (4)$$

$$J_{so}(u) = \frac{S(u_c - u)}{\tau_o}u + \frac{S(u - u_c)}{\tau_r}, \quad (5)$$

$$J_{si}(u; w) = -\frac{w}{2\tau_{si}}(1 + \tanh[k(u - u_c^{si})]), \quad (6)$$

$$\tau_v^-(u) = S(u - u_v)\tau_{v1}^- + S(u_v - u)\tau_{v2}^-, \quad (7)$$

などと表される。ただし、 $S(u) = (1 + \tanh(k_u u))/2$ である。電気生理学的なパラメータは、 $\tau_r=50.0$, $\tau_{si}=44.84$, $\tau_o=8.3$, $\tau_v^+=3.33$, $\tau_{v1}^-=1000.0$, $\tau_{v2}^-=19.2$, $\tau_w^+=667.0$, $\tau_w^-=11.0$, $u_c=0.13$, $u_v=0.055$, $g_{fi}=2.47$, $k_u = 50$, $u_c^{si}=0.85$, $\Delta t=0.02$ (msec), $\Delta x=0.01$ (cm), $D=0.001$ (cm²/msec) と設定した。また、システムサイズは 5.12×5.12 (cm) とし、障害物近傍と系の外周には Neumann 境界条件を適用し、陽解法で数値計算を行った。

図4に、心筋モデルによるピン止め回転ラセン波の除去の数値シミュレーション結果を示した。この例では、176.1msec 周期で定常回転するピン止め

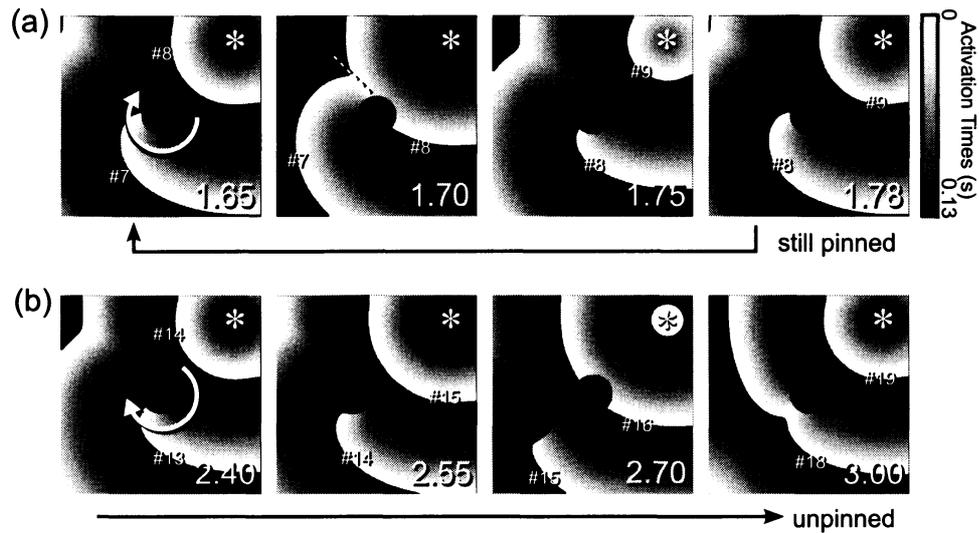


図4 心筋モデルによるピン止め回転ラセン波の除去の数値シミュレーション。周期 176.1msec で定常回転したピン止めされたラセン波に対し、(a)130.0ms と (b)120.0ms の周期的な電気刺激を図の*の位置に与えた。

回転ラセン波に対し、130.0msec と 120.0msec の周期刺激を加えた。図4(a)は、130.0msec の周期刺激を加えた場合のスナップショットである。この場合、刺激で発生した興奮波がピン止め回転ラセン波と上方で対消滅し、下方を進行する興奮波が新しいピン止め回転ラセン波になる定常状態に達し、ピン止めラセン波を解消できなかった。一方、さらに 120.0msec と刺激周期を小さくした場合、図4(b)のように、やがて位相特異点が露になり、ラセン波ピン止めが解消され、更に後から来た興奮波にドリフトされ、ラセン波は完全に除去された。このように、数値シミュレーションの結果においても、ピン止めラセン波の周期より短い場合でも、必ずしもラセン波のピン止め解消ができるわけではないという実験の定性的な結果が確認された。

また、刺激周期と障害物半径がピン止め解消の成功と失敗にどのような影響を及ぼすのかを調べた。図5は刺激周期と障害物半径のパラメータを変えて得られたピン止め解消条件の相図である。この相図から、小さい半径の障害物かつ短周期刺激ならばピン止め解消に成功しやすく、逆に大きい半径の障害物かつ長い周期刺激ならばピン止め解消が難しいという傾向が明

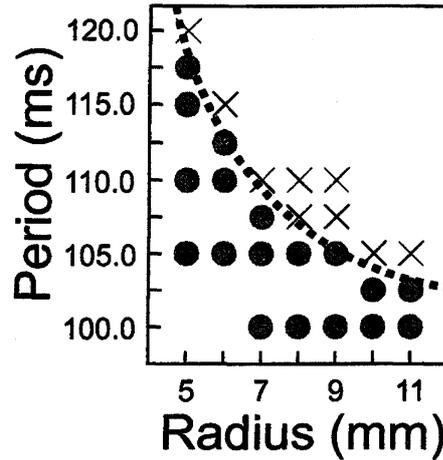


図5 ピン止め回転ラセン波の除去の成功条件を示した相図。×印は除去に失敗した条件、●印は成功した条件を示す。点線は視覚的な補助線。

らかになった。

5 議論

これまで、ピン止め回転ラセン波についてはそのダイナミクスの安定性が指摘されていたが^{2,4}、今回の我々の研究からピン止め回転ラセン波もまた周期的な電気刺激によって除去できることがわかった。また、除去のための刺激周期の条件がピン止めされていない回転ラセン波の場合より厳しく、その関係性は障害物の半径と刺激の周期によって支配されていることがわかった。

除去の過程において、ピン止め回転ラセン波は一旦ピン止めされていないラセン波になった後で、さらに導入された進行波にドリフトによって押し出されることで最終的な解消に至った。また、図4(b)の時刻2.55秒のパネルにあるように、障害物近傍の進行波だけがその伝播をブロックされることによって、ピン止め回転ラセン波が外されることもわかった。これらの結果は、障害物近傍の進行波だけがその伝播をブロックされるための条件が、図5で得られたような障害物の半径と刺激の周期によって説明できることを示

唆する。

2次元の興奮性媒体において、興奮波の進行速度は興奮性ダイナミクスに基づいた分散関係と、興奮波面の幾何学的形状に基づいた Eikonal 方程式とによって規定される。まず、波面が直線である平面波が周期 T の刺激で生成されている場合、その進行速度 v_0 は T の単調減少関数で表される。すなわち、より短い周期刺激で発生した波は、より遅い伝播速度で進行する。ここで、 T にはそれ以上小さいと波が伝播できなくなる臨界的な周期があり、それに対応する臨界速度以下の興奮波は進行できずに消滅する。これは、不応期を初めとする興奮性媒体の特徴を端的に反映した現象である。一方で、Eikonal 方程式は、興奮波の速度を v 、その波面の曲率を κ 、拡散係数を D 、平面波の速度を v_0 とすると、

$$v = v_0 - \kappa D, \quad (8)$$

で表される。ただし、進行方向に凸な興奮波の場合、 $\kappa > 0$ である。

今、周期 T の刺激で発生した波を考えると、その進行速度は $v_0(T) - \kappa D$ となる。ここで、まず、周期 T を固定した場合について、図 5 の関係性を考える。ピン止めラセン波について、障害物の半径が無限に大きい場合、そのラセン波はもはや平面波に他ならないため、進行速度が最大値、すなわち $v_0(T)$ に等しくなると考えられる。そのような速度は臨界速度から非常に離れているため、障害物近傍の進行波だけがその伝播をブロックされるような状況は起こりにくいであろう。一方、徐々に障害物の半径を小さくしていくと、ピン止めラセン波の障害物近傍の波面は曲率の効果によって進行速度が次第に減少する。このような場合、障害物近傍の波面の伝播速度が臨界速度に近づくため、より伝播がブロックされやすくなる。このように、障害物半径が小さい条件は、その近傍の波面の伝播速度を減少させるため、ピン止めの成功に必要な刺激周期の条件を緩和するものと考えられる。次に、障害物半径を固定して、周期 T の影響を考える場合、短い周期の刺激はやはり波面の伝播速度を減少させるため、ピン止めの成功に必要な障害物半径の条件を

緩和するものと考えられる。すなわち、小さい半径の障害物かつ短周期刺激ならばピン止め解消に成功しやすく、逆に大きい半径の障害物かつ長い周期刺激ならばピン止め解消が難しい。このように、ピン止め解消のダイナミクスは、興奮性媒体の一般的な性質である分散関係と Eikonal 方程式といった性質によって説明できると考えられる。

今回、我々は心筋組織における興奮波ダイナミクスを実験と数値シミュレーションの両面から調べた。このようなピン止めラセン波の解消は Belousov-Zhabotinsky 反応系やその数理モデルである Oregonator モデルを用いた数値シミュレーションにおいても確認でき、その成功条件なども今回の結果と定性的に一致している¹³。そのため、この現象は興奮性媒体に一般的なものであると考えられる。

6 まとめ

我々はラット心筋細胞の初代培養系を用いたピン止め回転ラセン波の実験的研究及び数値シミュレーションを行った。ラット心筋細胞の単層培養組織において、細胞が存在しない領域にピン止めされた回転ラセン波を発生させ、ラセン波の外側の領域において周期的な電気刺激を行い、ピン止め回転ラセン波を除去できるかどうかを試みた。その結果、除去のためには刺激の周期が十分短い必要があることがわかり、その条件はピン止めされていない回転ラセン波の除去に必要な周期よりも短かった。さらに、心筋モデルを用いた数値シミュレーションにおいても、同様の結果が確認でき、刺激周期と障害物の半径が除去の成否に大きく関わっていることが明らかになった。そして、小さい半径の障害物かつ短周期刺激ならばピン止め解消に成功しやすく、逆に大きい半径の障害物かつ長い周期刺激ならばピン止め解消が難しいことがわかった。今回得られた知見が、刺激周期の設定等を含めた ATP の更なる最適化など、医療技術へ応用されることが期待される。

均質な媒体中における興奮波の非線形動学的な研究は、複合回転ラセン

波などの興味深い問題も多く、現在でも積極的に展開されている。一方、近年の研究から媒体の不均質性が興奮波の不安定化や外部刺激の応答などに関して質的に異なるダイナミクスの誘起に寄与することが明らかになりつつある¹⁴⁻¹⁶。我々の今回の結果はそのような不均質性の重要性を示す結果であり、不均質な興奮性媒体における非線形ダイナミクスの更なる研究が期待される。

謝辞

本研究は、著者が京都大学大学院 理学研究科 物理学・宇宙物理学専攻 吉川研究室に在籍時に行ったものです。共同研究者の、吉川研一、Konstantin Agladze、北畑裕之、Marcel Hörning、田中正信の各氏に感謝致します。

参考文献

- [1] L. Glass, *Physics Today* **49**, 40–45 (1996).
- [2] D. Pazó, L. Kramer, A. Pumir, S. Kanani, I. Efimov, and V. Krinsky, *Phys. Rev. Lett.* **93**, 168303 (2004).
- [3] Y.-Q. Fu, H. Zhang, Z. Cao, B. Zheng, and G. Hu, *Phys. Rev. E* **72**, 046206 (2005).
- [4] Z. Y. Lim, B. Maskara, F. Aguel, R. Emokpae, and L. Tung, *Circulation* **114**, 2113–2121 (2006).
- [5] V. I. Krinsky and K. I. Agladze, *Physica D* **8**, 50–56 (1983).
- [6] K. Agladze, M. W. Kay, V. Krinsky, and N. Sarvazyan, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H503–513 (2007).
- [7] A. Isomura, M. Hörning, K. Agladze, and K. Yoshikawa, *Phys. Rev. E* **78**, 066216 (2008).
- [8] S. Matoba, T. Tatsumi, N. Keira, A. Kawahara, K. Akashi, M. Kobara,

- J. Asayama, and M. Nakagawa, *Circulation* **99**, 817 (1999).
- [9] T. Harada, A. Isomura, and K. Yoshikawa, *Physica D* **237**, 2787–2796 (2008).
- [10] S.-m. Hwang, K.-h. Yea, and K. J. Lee, *Phys. Rev. Lett.* **92**, 198103 (2004).
- [11] F. Fenton and A. Karma, *Chaos* **8**, 20–47 (1998).
- [12] D. Allexandre and N. F. Otani, *Phys. Rev. E* **70**, 061903 (2004).
- [13] M. Tanaka, A. Isomura, M. Hörning, H. Kitahata, K. Agladze, and K. Yoshikawa, *Chaos* **19**, 043114 (2009).
- [14] G. Bub, A. Shrier, and L. Glass, *Phys. Rev. Lett.* **88**, 058101 (2002).
- [15] S. Takagi, A. Pumir, D. Pazó, I. Efimov, V. Nikolski, and V. Krinsky, *Phys. Rev. Lett.* **93**, 058101 (2004).
- [16] A. Pumir, V. Nikolski, M. Hörning, A. Isomura, K. Agladze, K. Yoshikawa, R. Gilmour, E. Bodenschatz, and V. Krinsky, *Phys. Rev. Lett.* **99**, 208101 (2007).