

マウスにおいて作成した短時間型心房細動と
長時間持続型心房細動の
電気生理学的メカニズムに関する研究

ほりい
堀井

しゅんぺい
俊平

(循環器病学専攻)

防衛医科大学校

平成30年度

目 次

第1章 緒言	1 頁
第1節 背景	1 頁
第2節 本研究の目的	2 頁
第2章 Modifiedランゲンドルフ法による心房細動誘発法の確立	4 頁
第1節 背景	4 頁
第2節 材料及び方法	4 頁
第3節 結果	8 頁
第4節 考察	9 頁
第3章 短時間型心房細動の電気生理学的特徴	10 頁
第1節 背景	10 頁
第2節 材料及び方法	10 頁
第3節 結果	11 頁
第4節 考察	12 頁
第4章 長時間持続型心房細動マウスモデルの作成とその電気生理学的特徴	14 頁
第1節 背景	14 頁
第2節 材料及び方法	15 頁
第3節 結果	19 頁
第4節 考察	21 頁
第5章 総括及び包括的考察	23 頁
第1節 総括	23 頁
第2節 包括的考察	24 頁
謝辞	26 頁
引用文献	27 頁
図表	30 頁

第1章 緒言

第1節 背景

心房細動は最も一般的な不整脈疾患であり加齢と共に罹患率は上昇することが知られている(1)。心房細動に罹患すると時間経過と共に発作性（短時間型）心房細動から持続性心房細動へと進展していくことが知られている(2)。現時点では発作性心房細動と持続性心房作動を明確に区別するファクターは持続時間以外になく、臨床的にも血栓リスク分類では発作性心房細動と持続性心房細動を区別はしていない（European Society of Cardiology のガイドライン）(3)。しかし発作性心房細動から持続性心房細動への進展が血栓イベントや死亡率を上昇させることが報告されており(4)、早期のカテーテルアブレーション治療が心房細動の進展を防ぐ可能性も示唆されている(5)。以上のことから発作性心房細動と持続性心房細動の電気生理学的メカニズムの違いを解明し、心房細動進展の予防に貢献することは焦眉の急である。

マウスを用いた実験では、電氣的連続刺激によって一過性に心房細動を起こすことは可能であるが(6)、数秒から数十秒間しか心房細動は持続しない。この持続時間を数時間程度にまで延ばすには現時点では遺伝子操作マウス（代謝異常マウス(7)、イオンチャネル異常マウス等(8, 9)）を使用する以外に報告がない。発作性心房細動から持続性心房細動への進展には心房の構造的基質が関わっていることが示唆されているが(10, 11)、これらのマウスモデルでは電氣的もしくは構造

的リモデリングによって心房に複数の基質が形成されることが報告されている。

しかし、その基質が心房細動の持続にどのように関わっているかの機序は不明であり、発作性心房細動と持続性心房細動を電気生理学的に分類されてはいない。適当な心房細動マウスモデルが存在しないことも心房細動進展の電気生理学的メカニズム解明を阻んでいる。

第2節 本研究の目的

心房細動の持続には心房基質が関わっていることはほぼ間違いないが、どのような基質が心房細動持続に関わっているかは解明されていない。従って、マウス実験において発作性心房細動（以下、短時間型心房細動）と持続型心房細動（以下、長時間持続型心房細動）の電気生理学的メカニズムの違いを明らかにすることで、心房細動が長時間持続するメカニズムの解明に寄与できると考えられた。

代謝異常による長時間持続型心房細動マウスモデルは存在するものの、これは遺伝子変異による心房基質の形成であり、このモデルでは正常な心房が短時間型から長時間持続型心房細動へ移行する変化を特定することはできない。我々は短時間型心房細動と長時間持続型心房細動のメカニズムの相違を検証するために、心房基質の無い野生型マウスに人工的に基質を作成し、この長時間持続型心房細動に移行するモデルの作成を試みた。本研究の目的は、人工的基質作成により新しい長時間持続型心房細動マウスモデルをつくり、その電気生理学的メカニズムを

観察して、短時間型心房細動のものと比較することにより、心房細動持続のメカニズムを考察することである。

この目的のため、第2章では膜電位色素でマウス心房を染色し得る modified ランゲンドルフ-マウス灌流心システムを新たに構築し、このシステムに電気刺激による短時間型心房細動を誘発することを目標とした。第3章では短時間型心房細動中の modified ランゲンドルフ-マウス灌流心の膜電位変化をオプティカル・マッピング法により観察した。第4章では modified ランゲンドルフ-マウス灌流心にレーザー照射をして人工的基質を作成し、長時間持続型心房細動マウスモデルを作った後、第3章と同様に膜電位変化をオプティカル・マッピング法により観察した。更に、レーザーの心筋に与える影響を調べるために組織学的変化や生化学的变化を評価した。

第2章 Modified ランゲンドルフ法による心房細動誘発法の確立

第1節 背景

現在、動物における心房細動・心室細動等の不整脈実験には、電気生理学的メカニズムを解明するためのオプティカル・マッピング法がよく利用されている。オプティカル・マッピング法施行するにあたりランゲンドルフ灌流心を膜感受性色素や Ca^{2+} インジケーターで染色する必要があるが(12)、小型動物であるマウス心筋を染めるのは技術的に困難である。心室筋のみならず心房筋を染色する場合には更に困難になる。過去の心房細動動物実験においても、オプティカル・マッピング法に使用されている動物はラット、イヌやブタ等の中型から大型動物が多い。我々は従来のランゲンドルフ灌流心の方法に沿って膜感受性色素でマウス心房筋染色を試みたが、染色が不安定であった。そのため、新規の方法を (Modified ランゲンドルフ灌流心) を発案した。Modified ランゲンドルフ灌流心に電気刺激を行い心房細動の誘発も試みた。

第2節 材料及び方法

(1) 実験動物と飼料

実験に使用するマウスは 10-12 週齢の C57BL/6 で、Specific Pathogen Free 環境下で、12 時間毎の明暗の照明の調節が行われている部屋で適切な温度、湿度の

下、飼育管理された。通常食(normal chow; NC) の固形飼料と飲料水は自由摂取とした。

本研究は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の指針に基づいて施行した。

(2) Modified ランゲンドルフ-マウス灌流心の作成

Modified ランゲンドルフ-マウス灌流心作成手技の概略図は、図 1 に示す。従来のランゲンドルフ灌流心では大動脈にカニュレを挿入し、肺動静脈を切断して心臓を摘出していたが、modified ランゲンドルフ法では両心室にカニュレを挿入し、両側肺を含めて肺動静脈を温存したまま心肺を灌流させた。

マウスの腹腔内に 3 種混合麻酔薬（塩酸メデトミジン 0.3mg/kg+ミダゾラム 4mg/kg+酒石酸ブトルファノール 5mg/kg）を投与後、ヘパリン（100 単位）を腹腔内注射した。疼痛反射の欠如によって適正な麻酔レベルを確認した。

開胸して心臓を剖出し、22 G サーフロー（側孔を作成済）を左心室から右心室へ向けて刺入後、サーフロー先端を塞いだ。その後、酸素化（95%酸素、5%二酸化炭素）された 37°C Tyrode 液（128.2mM NaCl, 1.3mM CaCl_2 ($2\text{H}_2\text{O}$), 4.7mM KCl, 1.05mM MgCl_2 ($6\text{H}_2\text{O}$), 1.19mM NaH_2PO_4 , 20mM NaHCO_3 , 11.1mM D-Glucose in deionized water, pH=7.35 \pm 0.05) をサーフローより流し灌流を行った。心電図やオプティカル・マッピング法による観察時、心拍動による motion artifact を抑えるために 2,3-butanedione monoxime (BDM) （6mMol/L）を Tyrode 液に混入した(13)。

灌流速度は心房圧が 5-10mmHg を保持するように調節した。また、灌流液の鬱滞や酸性化を防ぐために下行大動脈・下大静脈を切断した。血液が洗い流された後、観察を容易にするために胸腺や脂肪組織等を剥離した。

心電図電極を心房直下に置き、心電図記録を行った。

(3) オプティカル・マッピング法

Modified ランゲンドルフ灌流心に対して行った。上行大動脈をクランプ後、膜感受性色素 RH237 溶液 (1.25 mg/mL solution in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO) 30 μ L を 20mL の Tyrode 液に溶かし灌流液を持続注入し心筋を染色した。

膜電位蛍光シグナルは MiCAM 高速イメージングシステム (Brainvision, Tokyo, Japan) を使って記録した。蛍光シグナルは CMOS カメラ (Brainvision, Tokyo, Japan) を用いて空間解像度 100 \times 100 ピクセル、1000 フレーム/秒で記録した。膜電位蛍光シグナル記録に際してバンドパスフィルター (665nm/-50) を通してカメラで撮影した。励起光には LED を使い、バンドパスフィルター (549nm/12-25) を通して照射した。

全ての手技は心電図モニター上での心臓の正常な電気活動を確認しながら行った。また、蛍光シグナル解析には BV_Ana (Brainvision) を使用した。

(4) 心房細動誘発のための電気刺激条件の検討

Modified ランゲンドルフ灌流心に心房細動を誘発するための電気刺激条件を決定するために、生体マウスに条件を変えながら電気刺激を行って心房細動が出やすい条件を検討した。生体マウス心臓に電気刺激を行う方法は、過去に報告されている経食道心房ペーシング法を採用した(6, 14)。

マウスの腹腔内に 3 種混合麻酔薬を投与し、疼痛反射の欠如によって適正な麻酔レベルを確認した。2.2Fr の 4 極カテーテル電極をマウスの口から挿入して食道へ進めた。カテーテルは、心房を捕捉する最も低いペーシング閾値の場所に留置し(15)、電気刺激時間は 2 秒間とした。

まず刺激周波数を検討するために刺激交流電圧を 25V に固定し、刺激周波数を 10Hz から 110Hz まで 10Hz ずつ上げて検討した。各々の周波数毎に電気刺激を 3 回行い、心電図波形を見ながら心房細動が誘発されるかを観察した。次に刺激電圧を検討するために刺激周波数を 50Hz に固定し、電圧を 10V から 50V まで 10V ずつ上げて検討を行った。各々の電圧毎に電気刺激を 3 回行い、心電図波形を見ながら心房細動が誘発されるかを観察した。

(5) Modified ランゲンドルフ灌流心に対する心房細動誘発方法

Modified ランゲンドルフ灌流心に対して検討を行った。右側肺を片方の刺激電極クリップで挟み、左側肺をもう片方の刺激電極クリップで挟むことによって、両心房が 2 つの電極クリップの間に挟まれるように調節した。この 2 電極間に交流電圧を加えて心房に電気刺激を行った。

第3節 結果

(1) マウス心房筋染色とオプティカル・マップ

Modified ランゲンドルフ-マウス灌流心を作成後、膜電位感受性色素 RH237 によってマウス心房筋の染色を試行したところ、十分な観察が行い得る染色に成功した（図 2A）。心房筋染色を良好に行うことにより光学的 activation map や光学的活動電位の経時的変化（洞調律時）を良好に観察することが可能となった（図 2B, C）。

(2) 心房細動誘発のための電気刺激条件の検討

麻酔下の生体マウスに刺激条件を変えながら経食道心房電気刺激を行い、心房細動の誘発率を検討した（図 3）。その結果、刺激周波数は 40～80Hz、刺激交流電圧は 25V 以上であると最も心房細動が誘発されやすいことがわかった（図 4A, B）。これよりここからの実験において刺激条件は以下のように固定した。

刺激間隔：50Hz、刺激出力：30V、刺激時間：400msec

(3) Modified ランゲンドルフ灌流心に対する心房細動誘発

Modified ランゲンドルフ-マウス灌流心に心房細動が誘発されるかを試すために両側肺より交流電圧を加えてマウス心房に電気刺激を施行した。その結果、短時間（数秒から数十秒間）の心房細動を誘発することができた（図 5）。

第4節 考察

オプティカル・マッピング法を施行するにあたり、小型動物（マウス）の心房筋を従来のランゲンドルフ法を使って膜感受性色素等で染色するのは技術的に困難であった。しかし、我々が発案した modified ランゲンドルフ法では両側肺を含めて肺動静脈を温存し且つ大動脈からではなく両心室から色素を灌流させることによって比較的容易に心房筋を染色することができた。また、この方法では心臓を体外へ取り出さないので心臓支配の自律神経等が温存されているため、より生理的状态で検討を行える。自律神経系が心房細動の発生や持続化に影響を与えることは知られており(16)、心房細動研究には従来のランゲンドルフ法より modified ランゲンドルフ法の方が適していると考えられた。加えて modified ランゲンドルフ灌流心においても電気刺激により心房細動が容易に誘発されることが判明した。

心房細動誘発方法としては、従来は刺激電極を心房に直接置いて刺激を行っていた(17)。しかし、両側肺からの電気刺激を行うと心房に電極が直接触れないために、電極と心房筋の接触面に起こる組織学的及び生化学的变化を防ぐことも可能となった。

Modified ランゲンドルフ法による心筋染色方法と心房細動誘発法の確立により、心房細動中の電気生理学的特徴を観察する準備検討に成功した。

第3章 短時間型心房細動の電気生理学的特徴

第1節 背景

従来の報告では動物実験において心房細動の電気生理学的メカニズムをオプティカル・マッピング法で示すためには、ラットやイヌ等の中型から大型動物を使用していた(18, 19)。また、マウスを用いたオプティカル・マッピング法による電気生理学的研究についてはいずれも遺伝子操作マウスが用いられていた。これらのマウスでは心房筋線維化による基質がすでに形成された状態での電気生理学的観察を行っていた(8, 9)。従って、心房基質がどのように心房細動持続に関わっているかを検討するためには、心房基質がない状態とある状態の2つの場合の比較を要する。そこで本章では若年野生型マウスを使用して短時間型心房細動の電気生理学的特徴を掴むことを目標とした。

第2節 材料及び方法

若年野生型マウスから modified ランゲンドルフ灌流心を作成し、電気刺激を与えて短時間型心房細動を誘発した。次に短時間型心房細動中の電気生理学的動態をオプティカル・マッピングにて観察した。

Modified ランゲンドルフ-マウス灌流心作成、オプティカル・マッピング法、電気刺激法は前章と全く同様のプロトコールで行った。

第3節 結果

Modified ランゲンドルフ-マウス灌流心に心房細動を惹起して、オプティカル・マッピング法により心房膜電位変化を観察した。結果として、異所性タイプ (n=10) と渦タイプ (n=5) の2種類を観察することができた。図 6A-C には代表的な異所性タイプを示した。右心房のある局所から発火して右心房全体及び左心房に興奮が伝わり、2回中1回左心房への伝導がブロックされていた。臨床においても肺静脈付近を発生源として発作性心房細動を起こしていることは実証されており、類似した機構と考えられた(20)。図 7A-B には代表的な渦タイプを示した。興奮波が特異点の周りを渦巻きながら廻っているが(図 7A, B)、その特異点が彷徨していることが観察された(図 8A)。図 8B-D に短時間型心房細動中における渦の特異点の軌道を時空間的に示す。特異点が安定した軌道を描いておらず、不安定に彷徨していることが観察された。

また、我々は興奮波の渦の発生の瞬間を捉えることに成功した(図 8A)。はじめ層流であった興奮波が地点2の周辺で生じた(恐らく不応期と思われる)伝導ブロックにより波が2つに分かれ、1つの波(反時計回り)は渦を形成し、もう1つの波(時計回り)は地点1から回り込んできた波と地点3で衝突して互いに消滅してした(図 8B, C)。この渦も数秒程度の持続であった。

第4節 考察

従来より心房細動の電気生理学的メカニズムはリエントリー型（渦型も含む）と異所性型の2種類のタイプがあるとされてきた(21)。本研究により我々はマウス短時間持続型心房細動において同様の2タイプが観察できた。加えて、渦型発生の瞬間を捉えることに成功した。我々の知る限り、この観察は未だ報告がない。整った流れ（層流）が乱れた流れ（渦）に遷移する現象は自然界で多く見られるが、短時間型心房細動でもこの現象が起きている可能性が考えられた。この結果は線維化等の物理的な基質が存在しなくても、層流の中に不応期が生じればそこを基点に渦は発生し得ることを示している。また発生した渦の中心（特異点）は心房内を不安定に彷徨っており、過去の動物実験でも同様な現象が報告されている(22)。この“彷徨う渦”現象は長時間継続することはなかった。我々はこの不安定性が短時間型心房細動と長時間持続型との電気生理学的機序の違いに大きく寄与しているのではないかと考えた。ヒツジを用いた実験では、長時間持続型心房細動では短時間型心房細動に比較すると、優位興奮周波数（dominant frequency）が増加し特異点の彷徨う度合いが小さくなっていることが報告されている(23)。このことから心房細動の長時間持続にはより安定した渦現象が必要と考えられた。

最後に異所性タイプが心房細動を持続させる可能性であるかを考察した。臨床研究においても心房内異所性興奮が認められることはあるが、持続することはほとんどないことが知られている(24)。本研究結果からも異所性タイプが心房細動

持続に関わっている可能性は低く、安定な渦流の持続が長時間持続型心房細動移行への鍵であると考えられた。

第4章 長時間持続型心房細動マウスモデルの作成とその電気生理学的特徴

第1節 背景

長時間持続性心房細動のメカニズムについて様々な報告がある(25-27)。これら先行研究から導かれる課題は長時間持続性心房細動中に散見される多数の興奮波が少数の安定した自立的リエントリー回路 (self-sustained reentry circuits) から発生しているかどうかということである。言い換えると、この self-sustained reentry circuit が存在すれば心房細動が長時間持続する可能性が想定される。

第3章の実験結果より短時間型心房細動は多彩な電気生理学的メカニズムを示すことが分かったが、全てに共通していることはそれらのメカニズムが不安定な電気回路の上に成り立っていることである。ここから我々はより安定した構造、すなわち self-sustained reentry circuit が形成されれば心房細動が長時間持続するのではないかと仮定した。この self-sustained reentry circuit を人工的に造り長時間持続型心房細動マウスモデルを作成し、オプティカル・マッピング法で観察すれば、短時間型心房細動との違いを明らかにできると考えた。また心室筋に人工的な伝導障害を作成し渦発生のメカニズムを示した動物実験(28)やアブレーションにより心筋細胞の電気生理学的変化が生じて異常自動能を惹起するという報告(29)もあり、人工的伝導障害が心房細動持続の基質と成り得ることが想定された。

次にどのような基質が self-sustained reentry circuit と成り得るかを考察し、self-sustained reentry circuit が起こるシミュレーション実験を参考にした(30, 31)。これらの研究によると、平面波は内部不均一な障害物に衝突した時 2 つに分かれて、1 つは消滅し、もう 1 つの波が障害物の周りを持続的に回り、self-sustained reentry circuit を形成することがシミュレーションされていた。我々の動物実験でも人工的に内部不均一（非対称）な障害物を作ることで self-sustained reentry circuit が生み出されるのではないかと考えた。人工的基質作成に当たっては、障害範囲や形及びエネルギー調節が可能なレーザー光を採用した。

第2節 材料及び方法

細胞に高レベルレーザーを照射するとアポトーシスが促進されることが示唆されているため(32)、我々は modified ランゲンドルフ-マウス灌流心の心房にレーザーを照射して細胞に障害を与えることにより人工的基質を作成した。細胞のアポトーシス照射条件は、コントロール群（1 群）、レーザー均一照射群（2 群）、部分欠損によるレーザー不均一照射群（3 群）と 3 群に分けた。この 3 群の modified ランゲンドルフ心臓に心房細動を誘発させて持続時間を測定して比較した。そして、レーザー照射後の modified ランゲンドルフ心臓の膜電位変化をオプティカル・マッピング法により観察した。

次にレーザー照射による組織学的変化を観察するために心臓切片を作成しヘマトキシリン-エオジン（HE）染色を行った。また生化学的变化（NADH）も捉えるために光学イメージングシステムにより心筋の NADH 由来の自家蛍光を観察した。

動物、modified ラングンドルフ-マウス灌流心作成、オプティカル・マッピング法、電気刺激法は前章と全く同様のプロトコールで行った。

（１）レーザー照射による人工基質作成方法

Modified ラングンドルフ灌流心の心房表面に、レーザー光を照射直後（照射後 30 秒以内）に、心房細動誘発のための電気刺激を行い、心電図波形を観察しながら心房細動持続時間を計測した。

レーザー照射系について図 10A、B に示す。レーザー光源からの光をミラーで導光し、マウスの心房真上から凸レンズ（焦点距離 32mm）で心房上側（13mm）に焦点を結ぶ発散光で、心房上の所定照射範囲を照射するための駆動機能を備えた照射系を構成した。レーザー光源装置は Q-スイッチ Nd:YAG レーザー（Minilite II :Continuum, San Jose, CA, USA） 2 倍高調波を使用し、波長は 532nm で、パルス幅（1 回の照射時間）は 3-5nsec, 10Hz の繰返しで照射した。1 回照射のエネルギーは調整可能であり、2~8mJ の範囲で使用した。Defocus により所定照射範囲は直径約 1.5mm とした（図 10C, D）。

メカニカルステージで光軸方向に移動可能な凸レンズで、マウス毎の心房表面に焦点を合わせた後、所定量上方に defocus してレーザー光の直径を合わせ込むために使用した。

基質作成の評価実験のためのレーザー光の照射条件と評価方法は以下の通り

- ・照射範囲：直径 1.5mm
- ・照射部位の形状：直径 1.5mm の均一円形パターンと直径 1.5mm の不均一パターン、不均一パターンは均一円形パターン作成方法に心房 2-3mm 上方に楔形のマスクを設置して作成
- ・1 回照射当たりのエネルギー量：2mJ/回、4mJ/回、8mJ/回と 3 段階。
- ・照射時間、照射回数：2mJ で 60 秒（600 回照射）を 3 セット
4mJ で 60 秒（600 回照射）を 3 セット
8mJ で 60 秒（600 回照射）を 3 セット
120 秒（1200 回照射）を 3 セット
240 秒（2400 回照射）を 3～6 セット

基質は不可逆的なものだと考え、照射エネルギー量を漸増した。

- ・心房細動持続時間計測方法

レーザー照射 1 セット毎に心房細動誘起条件での電気刺激を 3 回行い、心電図波形を観察しながら心房細動持続時間を計測した。

（２）レーザー照射条件の違いによるグループ分け

Modified ランゲンドルフ-マウス心臓の心房に 3 条件に分けてレーザーを照射し人工的基質を作成した。照射条件は無照射（コントロール）群（1 群）、レーザー均一照射群（2 群）、レーザー不均一照射群（3 群）と 3 条件に分け、心房細動を誘発し持続時間を測定した。

（３）病理組織学的評価

Modified ランゲンドルフ灌流心臓の心臓を摘出し、10%ホルマリンによる 48 時間固定の後、パラフィンで包埋固定をした。4 μ m で断片にした心房にヘマトキシリン-エオジン（HE）染色を行った。

（４）NADH 自家蛍光観察

NADH 自家蛍光を観察するにあたり過去論文の NADH 蛍光イメージング方法(33)を参考にした。

図 11A、B に NADH 吸収スペクトル(34)と励起・蛍光スペクトル(35)を、図 12 に NADH 自家蛍光観察系使用した光源とフィルターの分光特性を示す。

NADH はピーク波長 340nm で 300-380nm の吸収波長帯を持ち、自家蛍光はピーク波長 450nm で 400-550nm の波長帯に生ずる。この吸収帯と蛍光波長帯に合わせて観察系を構築した。励起はキセノンライト光源（MAX302：Asahi Spectra Co., Tokyo, Japan）を用いて、360-370nm の励起光用バンドパスフィルター

(EM365/10 : Nikon, Tokyo, Japan)によって取り出した励起光を光源として、石英ライトガイドを用いてマウスの Modified ランゲンドルフ灌流心の斜上方より照射した。励起光により発生した自家蛍光を 380nm のバリアフィルター (SCF-50S-38L) と 430-490nm の蛍光用バンドパスフィルター (EM460/60 Nikon, Tokyo, Japan) を介して、カメラ (D750 Nikon Co., Tokyo, Japan) にてマクロレンズ (Micro-Nikkor, $f=105\text{mm}$) を使用して撮影した。露光時間は 8~60 秒であった。レーザー照射前/後の自家蛍光画像の変化を比較観察し、自家蛍光画像の強度分布の解析には、公開の画像処理ツール (Image J, NIH, USA) を使用した。

第3節 結果

(1) レーザー照射による長時間心房細動の誘発率

レーザー照射による人工的基質作成により長時間持続型心房細動が誘発されるかを検討した。一時間以上心房細動が持続したのは、1 群で 5 匹中 1 匹 (20%)、2 群で 5 匹中 0 匹 (0%)、3 群で 5 匹中 4 匹 (80%) であった (図 13)。レーザー不均一照射群において心房細動の持続時間が延長していることが分かった。

(2) 長時間持続型心房細動マウスのオプティカル・マップ

レーザー不均一照射後の modified ランゲンドルフ-マウス灌流心に心房細動を誘発して、オプティカル・マッピング法により心房膜電位変化を観察した。そ

の結果、レーザー照射部位の周りを electrical wave が回っていることが観察された（図 14A）。従って渦（特異点も含めて）が認められないため、electrical wave の曲がり角を白点でプロットし（図 14A）、時空間図で表した（図 14B-D）。右心房内の electrical wave の曲がり角の位置はほとんど変わっていないため、安定した軌道上を回っていることが確認された。

（3）レーザー照射後の組織学的検討

レーザー照射による組織学的変化を観察するために、レーザー照射後の心房筋切片に HE 染色を行ったが、組織学的変化は認められなかった（図 15A, B）。心室筋にも心房筋の場合と同条件でレーザー照射後、組織学的評価を行ったがレーザーによる明らかな変化は認められなかった（図 16A, B）。

（4）マウス心臓の NADH 自家蛍光観察

レーザー照射で組織学的変化が認められなかったため生化学的検討も行った。心室にレーザー不均一照射と均一照射を施行した後に自家蛍光観察した。その結果、照射範囲に NADH の低下が見られ、不均一照射では均一照射に比べてマスクで遮蔽されていた楔形部分の NADH の低下は認められなかった（図 17, 18）。

第4節 考察

心房細動の心房内の電気動態は乱流のカオス状態と考えられている。しかし、乱流は流れの抵抗が増えるためエネルギー散逸が著しくエネルギーを常に供給されないと維持出来ない。我々はそのエネルギーの発生源が self-sustained reentry circuit によってもたらされることを示した。このように考えると持続性心房細動中に散見される多数の興奮波は self-sustained reentry circuit から発散されたもので、この多数の興奮波が一見したところカオス状態を生み出していると言える。いわば、カオスの内部には安定した秩序構造を持っているということである。この安定した秩序構造、すなわち self-sustained reentry circuit を破壊すればカオス状態（心房細動）が維持されことはないと考えられるため、この概念を臨床の場に適応して持続性心房細動の治療方法に応用し、有効性が報告されている (27, 36-38)。このリエントリー回路の多くが不安定であるという報告もあるが (39)、いずれにしろ self-sustained reentry circuit が数 mm 程度の micro-reentry circuit の場合、現在の臨床技術で正確に可視化することは困難であると考えられた。

我々は人工的に self-sustained reentry circuit を作成し長時間持続型心房細動マウスモデルを構築した。このことは、self-sustained reentry circuit により心房細動が長時間持続する可能性を示唆する。しかし、実際の心房細動が持続するのに必ず self-sustained reentry circuit が必要不可欠かどうかは更なる検討を要する。長時間持続型心房細動マウス（Na チャネル異常遺伝子操作マウス）

をオプティカル・マッピング法で観察すると渦が彷徨していたという報告もある(9)。しかし、オプティカル・マッピング法は一方向撮影しかできないだけでなく数秒程度しか記録できないので心房の隅々までは観察できない。このような場合にも self-sustained reentry circuit が観察視野外に潜んでいる可能性は残されている。

次にレーザー照射により同部位の NADH の低下が観察された。ミトコンドリアの電子伝達鎖活動の低下が心房細動を進展させる心房基質形成と関わっていることが示唆されており(40)、本研究の場合ではレーザー照射によるミトコンドリア機能異常が NADH 低下を引き起こし、心房細動の基質を形成していることが想定された。

第5章 総括及び包括的考察

第1節 総括

本研究で我々はまずマウス不整脈の電気生理学的メカニズムを解明するために従来のランゲンドルフ法を改変して modified ランゲンドルフ法を新規に発案した。この方法により、膜感受性色素でマウス心房筋を比較的容易に染色することができるようになった。オプティカル・マッピング法は電気生理学的メカニズムの解明には現在最も有用なツールであるが、マウス心房筋染色を従来のランゲンドルフ法で施行するのは技術的に難しく、心房筋染色も不安定であった。本研究で modified ランゲンドルフ法によりこの観察を容易にしたのは今後の研究方法に意義があると考えられた。またこの方法では、両肺から電気刺激を行って心房細動を誘発できることも確認した。我々はこの modified ランゲンドルフ法を使ってマウス心房細動のメカニズムに関する観察を行った。

まず短時間型心房細動の電気生理学的メカニズムをオプティカル・マッピング法により観察したところ、異所性タイプと渦タイプの2種類を認めた。加えて渦の彷徨や渦の発生も捉えることができた。これらはいずれも不安定な電気活動であった。この結果からより安定な構造、すなわち self-sustained reentry circuit が存在すれば心房細動が長時間持続する可能性を想定し、シミュレーションを参考に、人工的基質をマウス心房に作ることにした。レーザーを不均一にマウス心房に照射して不均一な基質を作ることにより、長時間持続型心房細動マ

ウスモデルを作成することに成功した。また、このモデルをオプティカル・マッピング法で観察すると興奮波が安定した軌道を回っていることが判明した。

次にレーザーが心筋に与える影響を調べるために組織学的検討を行ったが、明らかな変化は認められなかったが、生化学的变化（NADH）を自家蛍光で検討したところ、レーザー照射範囲内の NADH は低下していることが分かった。

第2節 包括的考察

心房細動が発作性から持続性へ進展していく電気生理学的機序については未だに解明されていない。この過程で全く違う電気的特性に転移した可能性は十分に想定された。我々はこのメカニズムの転移を不安定構造から安定構造への転移と考え、その転移点が self-sustained reentry circuit の存在ではないかと想定した。self-sustained reentry circuit を興奮波が安定して回るとそこから多数の興奮波が持続的に発散されることにより、心房内の電気動態は無秩序と成り得る。一見すると発作性心房細動も持続性心房細動も心房内の電気動態は無秩序に見えるが、その中に安定した秩序の有無が発作性心房細動と持続性心房細動を分けている可能性が本研究から考えられた。現在、発作性心房細動と持続性心房細動の違いは持続時間の長短で決められており、電気的メカニズムの違いについての正確な言及はない。つまり、持続性心房細動の電気生理学的メカニズムを発作性心房細動のものの延長で捉えられている。発作性心房細動から持続性心房細動への進展には電気生理学的メカニズムの変化があるとするならば、我々の実験結

果はその一旦を示している可能性がある。すなわち、self-sustained reentry circuit の存在の有無が、発作性心房細動か持続性心房細動かを決定する可能性が示唆された（図 19A, B）。臨床の心房細動根治術として、肺静脈トリガーを治療標的とした経皮的カテーテル心筋焼灼術（肺静脈隔離術）が行われる(20)。この方法は発作性心房細動には有効であるが、持続性心房細動に対しては不十分であるとされ(41)、肺静脈以外の治療標的は未だ解明されていない。本研究は発作性心房細動と持続性心房細動の電気生理学的違いを識別する一助となり、心房細動のメカニズム解明と治療成績の向上に寄与する可能性があると考えられた。

謝 辞

本研究の遂行、論文の作成に際し、終始ご教授賜りました、防衛医科大学校内科学（循環器）講座教授 足立健先生、同准教授 矢田浩崇先生、同講師 井戸康夫先生、同大学医用工学講座教授 石原美弥先生、同シニアアドバイザー 辻田和宏先生に謹んで感謝御礼申し上げます。

引用文献

1. Miyasaka Y, *et al.* (2006) Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation* 114(2):119-125.
2. Iwasaki YK, Nishida K, Kato T, & Nattel S (2011) Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management. *Circulation* 124(20):2264-2274.
3. Camm AJ, *et al.* (2012) 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *European heart journal* 33(21):2719-2747.
4. Steinberg BA, *et al.* (2015) Higher risk of death and stroke in patients with persistent vs. paroxysmal atrial fibrillation: results from the ROCKET-AF Trial. *European heart journal* 36(5):288-296.
5. Nattel S, *et al.* (2014) Early management of atrial fibrillation to prevent cardiovascular complications. *European heart journal* 35(22):1448-1456.
6. Schrickel JW, *et al.* (2002) Induction of atrial fibrillation in mice by rapid transesophageal atrial pacing. *Basic research in cardiology* 97(6):452-460.
7. Ozcan C, Battaglia E, Young R, & Suzuki G (2015) LKB1 knockout mouse develops spontaneous atrial fibrillation and provides mechanistic insights into human disease process. *Journal of the American Heart Association* 4(3):e001733.
8. Li N, *et al.* (2014) Ryanodine receptor-mediated calcium leak drives progressive development of an atrial fibrillation substrate in a transgenic mouse model. *Circulation* 129(12):1276-1285.
9. Wan E, *et al.* (2016) Aberrant sodium influx causes cardiomyopathy and atrial fibrillation in mice. *The Journal of clinical investigation* 126(1):112-122.
10. de Vos CB, *et al.* (2010) Progression from paroxysmal to persistent atrial fibrillation clinical correlates and prognosis. *Journal of the American College of Cardiology* 55(8):725-731.
11. Burstein B & Nattel S (2008) Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology* 51(8):802-809.
12. Lang D, Sulkin M, Lou Q, & Efimov IR (2011) Optical mapping of action potentials and calcium transients in the mouse heart. *Journal of visualized experiments : JoVE* (55).
13. Sill B, Hammer PE, & Cowan DB (2009) Optical mapping of Langendorff-perfused rat hearts. *Journal of visualized experiments : JoVE* (30).
14. Suita K, *et al.* (2015) Norepinephrine-Induced Adrenergic Activation Strikingly Increased the Atrial Fibrillation Duration through beta1- and alpha1-Adrenergic Receptor-Mediated Signaling in Mice. *PloS one* 10(7):e0133664.

15. Verheule S, *et al.* (2004) Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circulation research* 94(11):1458-1465.
16. Shen MJ, *et al.* (2011) Neural mechanisms of atrial arrhythmias. *Nature reviews. Cardiology* 9(1):30-39.
17. Glukhov AV, Fedorov VV, Anderson ME, Mohler PJ, & Efimov IR (2010) Functional anatomy of the murine sinus node: high-resolution optical mapping of ankyrin-B heterozygous mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299(2):H482-491.
18. Lou Q, *et al.* (2014) Upregulation of adenosine A1 receptors facilitates sinoatrial node dysfunction in chronic canine heart failure by exacerbating nodal conduction abnormalities revealed by novel dual-sided intramural optical mapping. *Circulation* 130(4):315-324.
19. Lee P, *et al.* (2012) In situ optical mapping of voltage and calcium in the heart. *PloS one* 7(8):e42562.
20. Haissaguerre M, *et al.* (1998) Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *The New England journal of medicine* 339(10):659-666.
21. Nattel S (2002) New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 415(6868):219-226.
22. Zlochiver S, Yamazaki M, Kalifa J, & Berenfeld O (2008) Rotor meandering contributes to irregularity in electrograms during atrial fibrillation. *Heart rhythm* 5(6):846-854.
23. Martins RP, *et al.* (2014) Dominant frequency increase rate predicts transition from paroxysmal to long-term persistent atrial fibrillation. *Circulation* 129(14):1472-1482.
24. Takahashi Y, *et al.* (2006) Sites of focal atrial activity characterized by endocardial mapping during atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology* 47(10):2005-2012.
25. Haissaguerre M, *et al.* (2006) Localized sources maintaining atrial fibrillation organized by prior ablation. *Circulation* 113(5):616-625.
26. Jalife J, Berenfeld O, & Mansour M (2002) Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation. *Cardiovascular research* 54(2):204-216.
27. Narayan SM, *et al.* (2012) Treatment of atrial fibrillation by the ablation of localized sources: CONFIRM (Conventional Ablation for Atrial Fibrillation With or Without Focal Impulse and Rotor Modulation) trial. *Journal of the American College of Cardiology* 60(7):628-636.
28. Cabo C, *et al.* (1996) Vortex shedding as a precursor of turbulent electrical activity in cardiac muscle. *Biophysical journal* 70(3):1105-1111.
29. Nath S, Lynch C, 3rd, Wayne JG, & Haines DE (1993) Cellular electrophysiological effects of hyperthermia on isolated guinea pig papillary muscle. Implications for catheter ablation. *Circulation* 88(4 Pt 1):1826-1831.

30. Zykov V, Krekhov A, & Bodenschatz E (2017) Fast propagation regions cause self-sustained reentry in excitable media. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(6):1281-1286.
31. Sergio A & Markus B (2016) Reentry produced by small-scale heterogeneities in a discrete model of cardiac tissue. *Journal of Physics: Conference Series* 727(1):012002.
32. Osipov AN, Machneva TV, Buravlev EA, & Vladimirov YA (2018) Effects of Laser Radiation on Mitochondria and Mitochondrial Proteins Subjected to Nitric Oxide. *Frontiers in medicine* 5:112.
33. Asfour H, Wengrowski AM, Jaimes R, 3rd, Swift LM, & Kay MW (2012) NADH fluorescence imaging of isolated biventricular working rabbit hearts. *Journal of visualized experiments : JoVE* (65).
34. Mayevsky A & Rogatsky GG (2007) Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *American journal of physiology. Cell physiology* 292(2):C615-640.
35. Patterson GH, Knobel SM, Arkhammar P, Thastrup O, & Piston DW (2000) Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(10):5203-5207.
36. Shivkumar K, Ellenbogen KA, Hummel JD, Miller JM, & Steinberg JS (2012) Acute termination of human atrial fibrillation by identification and catheter ablation of localized rotors and sources: first multicenter experience of focal impulse and rotor modulation (FIRM) ablation. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 23(12):1277-1285.
37. Miller JM, *et al.* (2017) Clinical Benefit of Ablating Localized Sources for Human Atrial Fibrillation: The Indiana University FIRM Registry. *Journal of the American College of Cardiology* 69(10):1247-1256.
38. Narayan SM, *et al.* (2014) Ablation of rotor and focal sources reduces late recurrence of atrial fibrillation compared with trigger ablation alone: extended follow-up of the CONFIRM trial (Conventional Ablation for Atrial Fibrillation With or Without Focal Impulse and Rotor Modulation). *Journal of the American College of Cardiology* 63(17):1761-1768.
39. Haissaguerre M, *et al.* (2014) Driver domains in persistent atrial fibrillation. *Circulation* 130(7):530-538.
40. Emelyanova L, *et al.* (2016) Selective downregulation of mitochondrial electron transport chain activity and increased oxidative stress in human atrial fibrillation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 311(1):H54-63.
41. Verma A, *et al.* (2015) Approaches to catheter ablation for persistent atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* 372(19):1812-1822.



図1. Modifiedランゲンドルフ-マウス灌流心作成の概略図

- (1) 側孔のあるサーフロを左心室から右心室へ通し先端を栓をした。
- (2) 下行大動脈、下大静脈を切断した。
- (3) 灌流液をサーフロから流し灌流した。

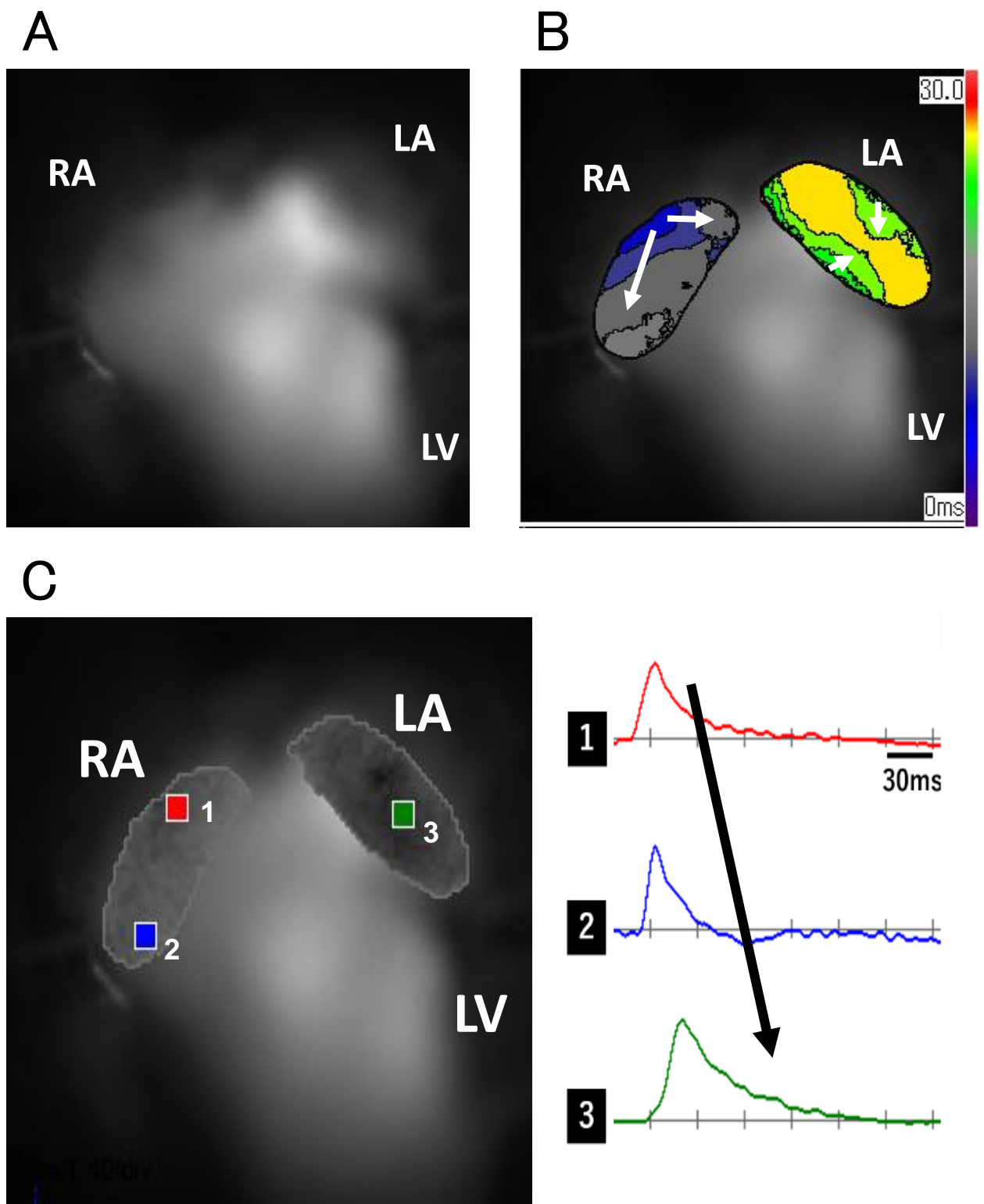


図2. マウス心房筋染色とオプティカルマップ

- (A) modifiedランゲンドルフ法による心筋染色（染色溶液：RH237）
- (B) 洞調律時の心房筋の光学的Activation map
- (C) 洞調律時の心房筋光学的活動電位の経時的変化

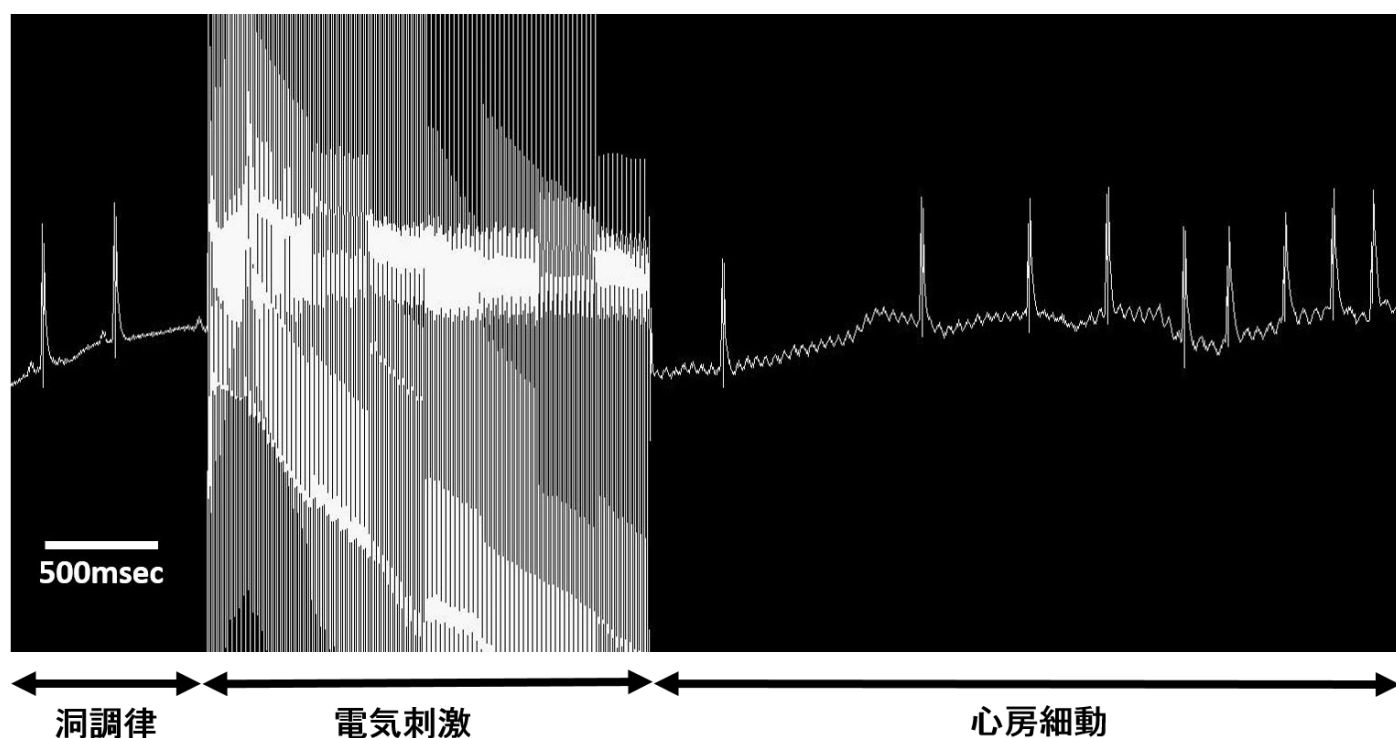
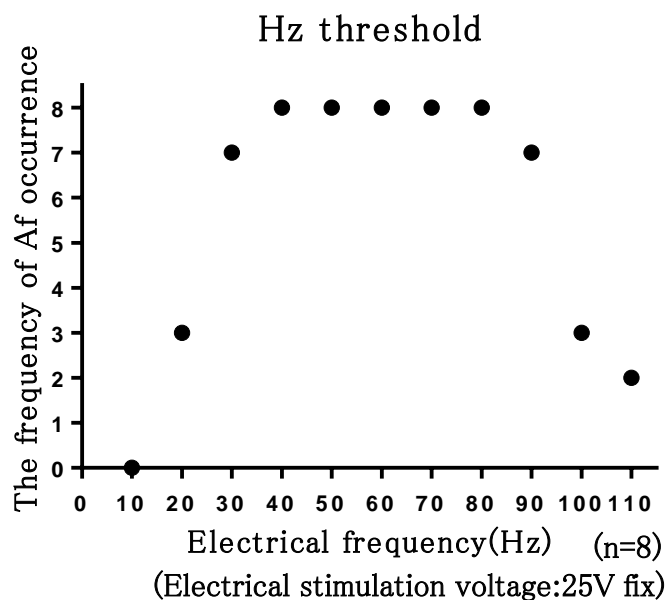


図3. 生体マウスに対する経食道心房ペーシングによる心房細動誘発
体表面心電図リードⅡにて記録した。
心房細動は数秒から数十秒程度持続して洞調律へ復帰した。

A



B

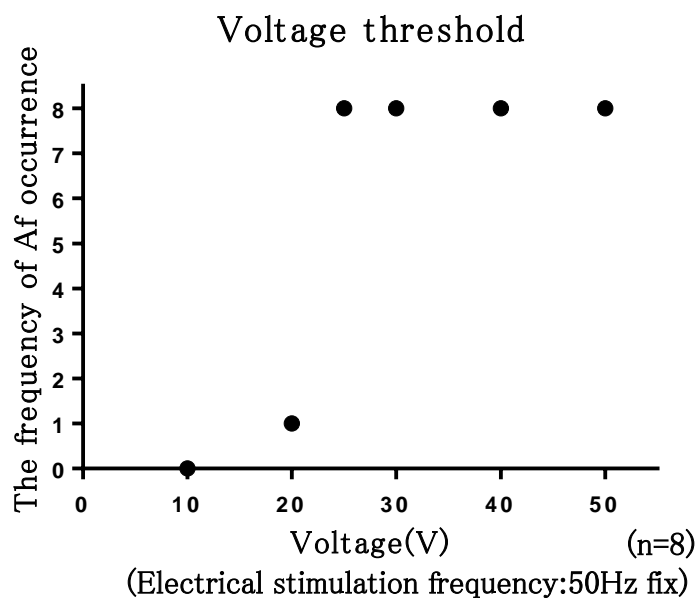


図4. 心房細動誘発の電気刺激条件の検討

- (A) 刺激周波数条件変化による心房細動誘発率
- (B) 刺激電圧変化による心房細動誘発率

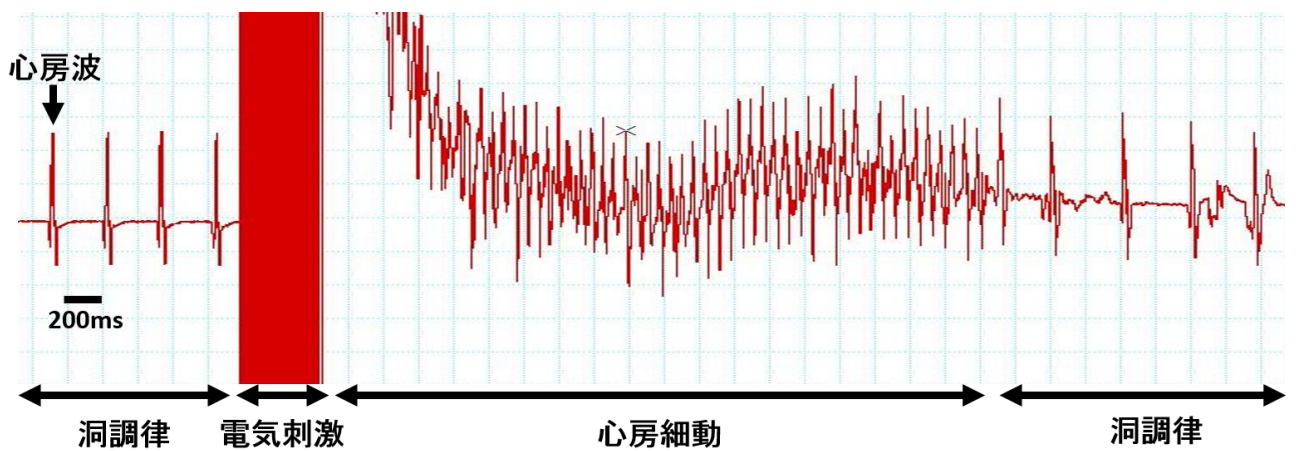


図5. Modifiedランゲンドルフ-マウス灌流心に対する心房細動誘発
modifiedランゲンドルフ灌流心に対して両側肺より電気刺激（周波数：50Hz、電圧：30V）を行ったところ心房細動が誘発され数秒から数十秒程度持続した。

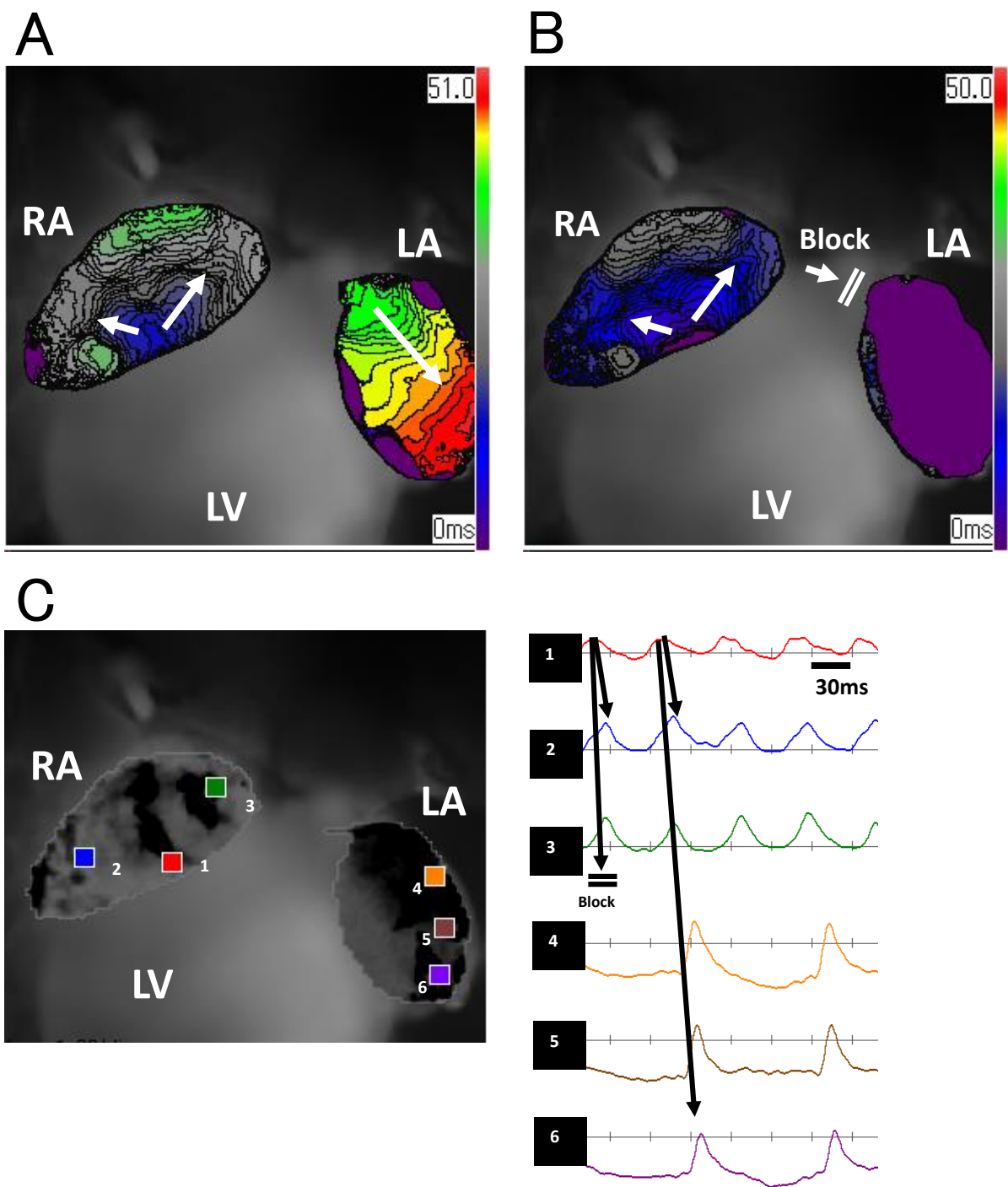


図6. 異所性タイプのオプティカルマップ

- (A) RAの局所から興奮波が発火しLAに伝導した。
- (B) RAの興奮波がLAへの伝導するのがブロックされた。
- (C) 心房細動中の心房筋光学的活動電位の経時的変化を示す。

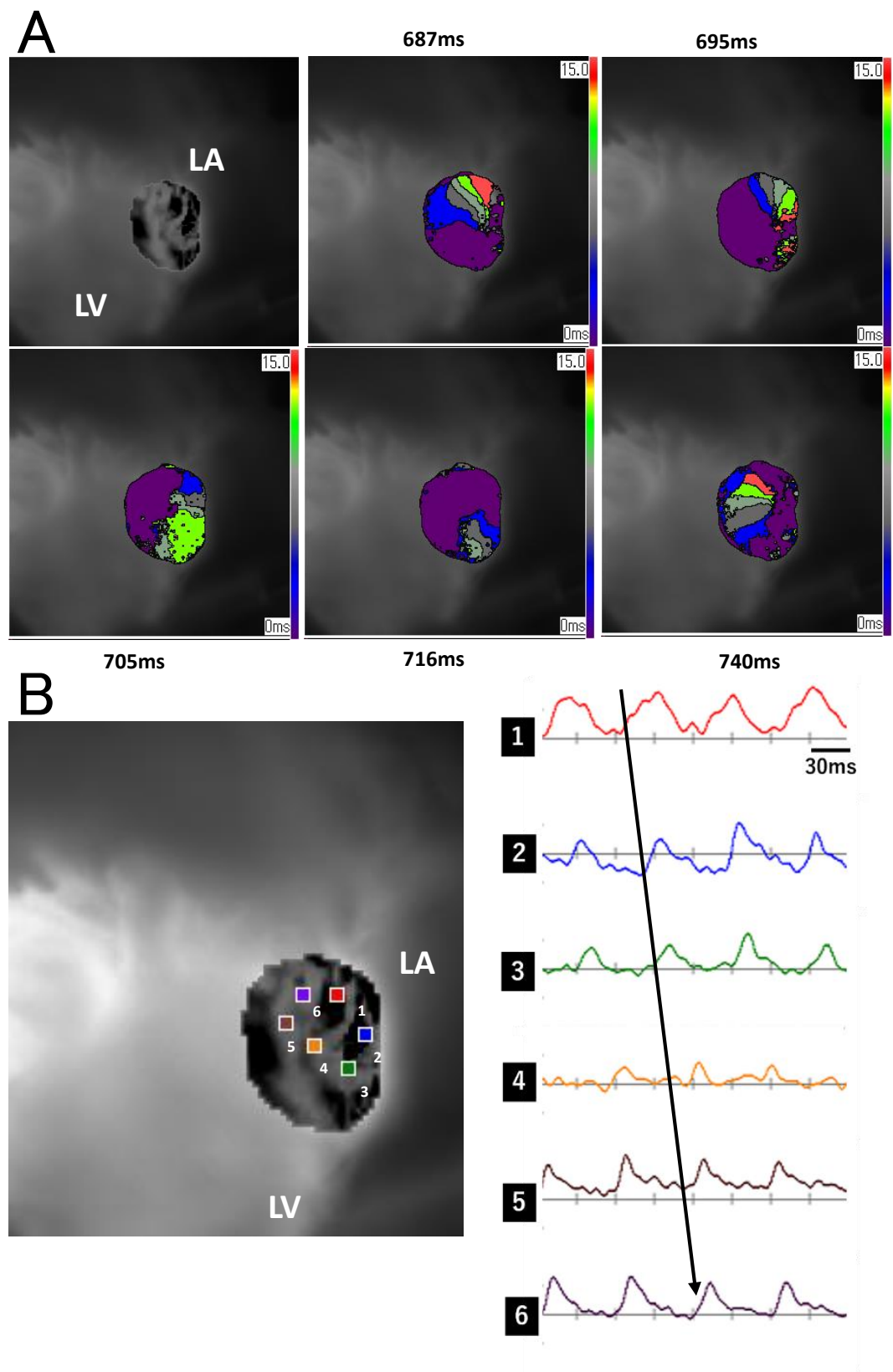


図7. 渦タイプのオプティカルマップ

(A) LA内で興奮波が渦を巻いていた。

(B) 心房細動中の心房筋光学的活動電位の経時的変化を示す。

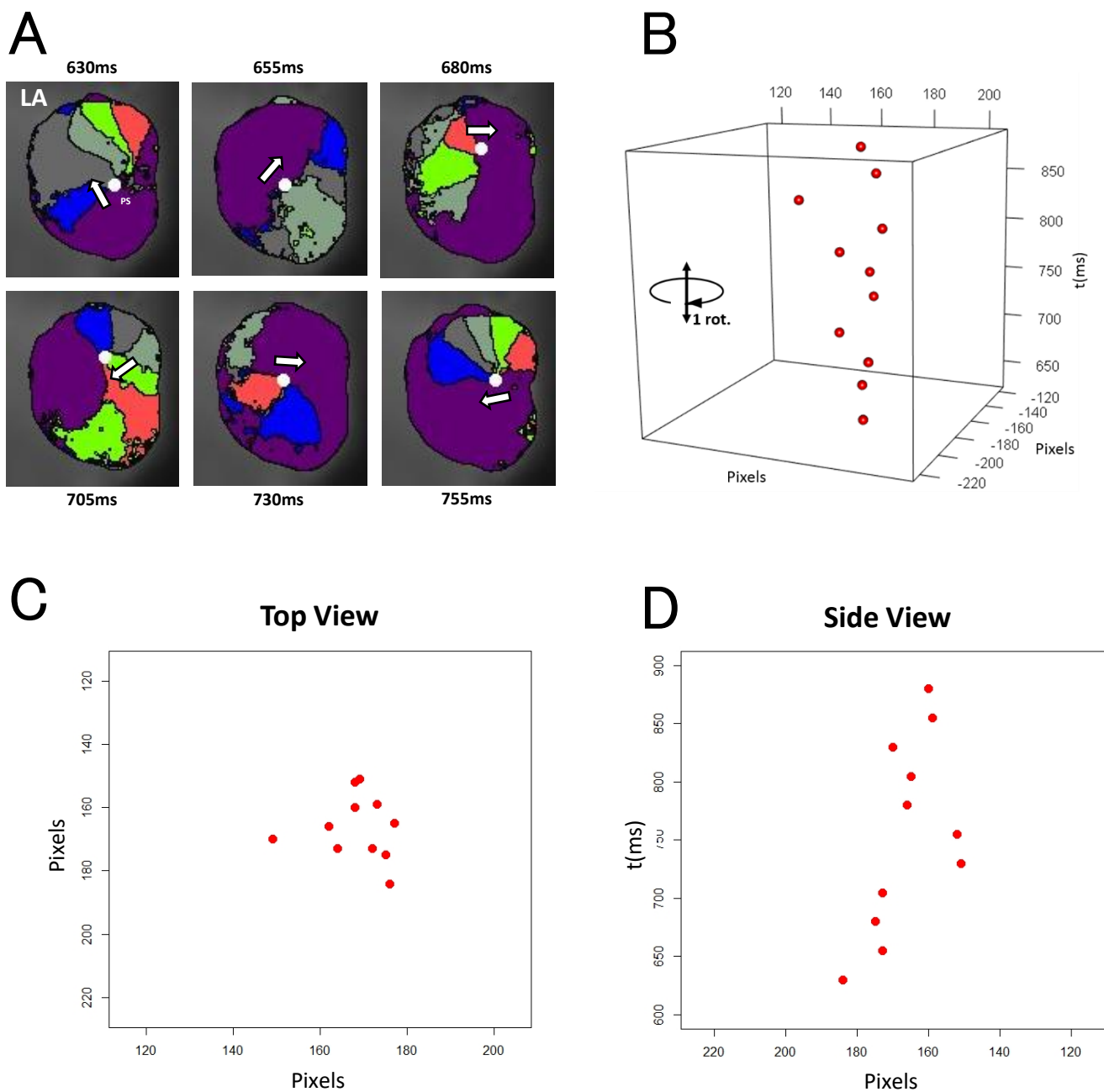


図8. 短時間持続型心房細動中の特異点の動態

(A) 渦の特異点の位置の経時的変化 (activation map)

(B) 渦の特異点の時空間 (x-y-t) プロット図

(C) 図Bのx-y平面図

(D) 図Bのy-t平面図

(1 pixel=0.025mm) (LA長軸：約110pixels、LA短軸：約90pixels)

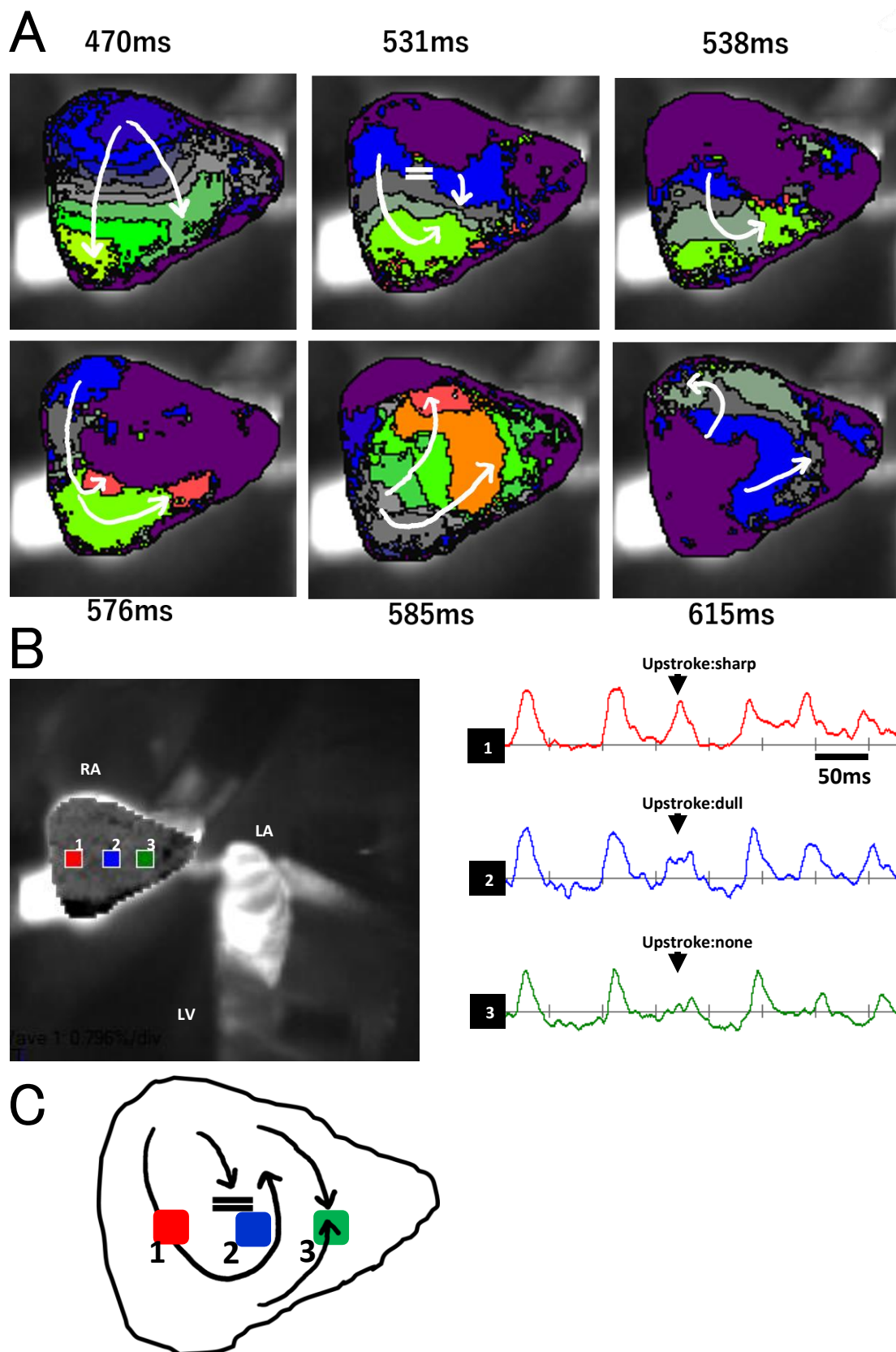


図9. 渦の発生

(A) 層流から乱流（渦）への遷移図（activation map）

(B, C) 地点2周辺で興奮波がブロックされ、地点1からの波が地点2を回り込むようにして渦が発生した。地点3では元の波と地点1からの波が衝突していた。

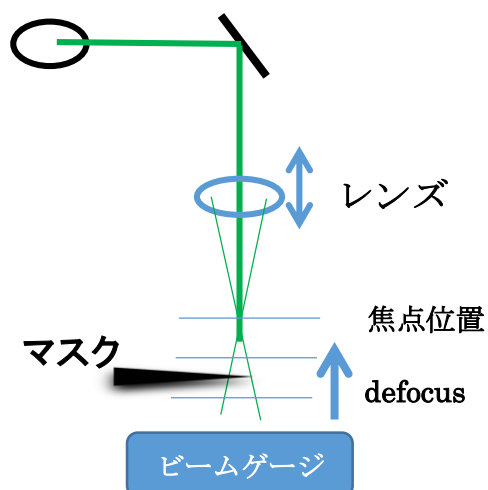
A

<上面図>

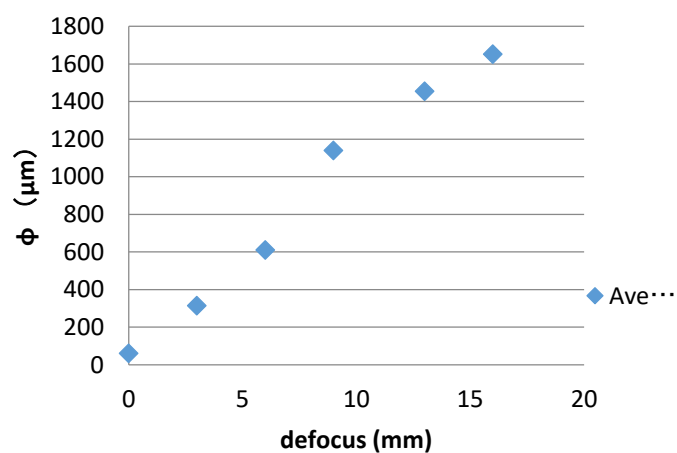


B

<側面図>



C

Beam dia. ϕ Ave (μm)

D

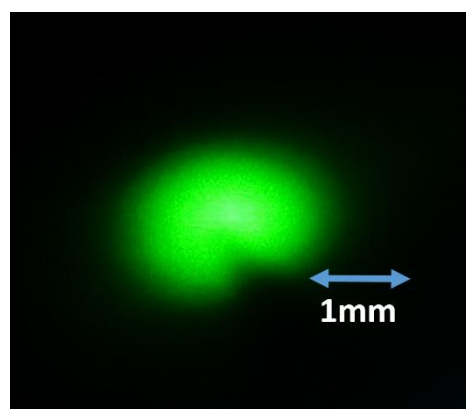
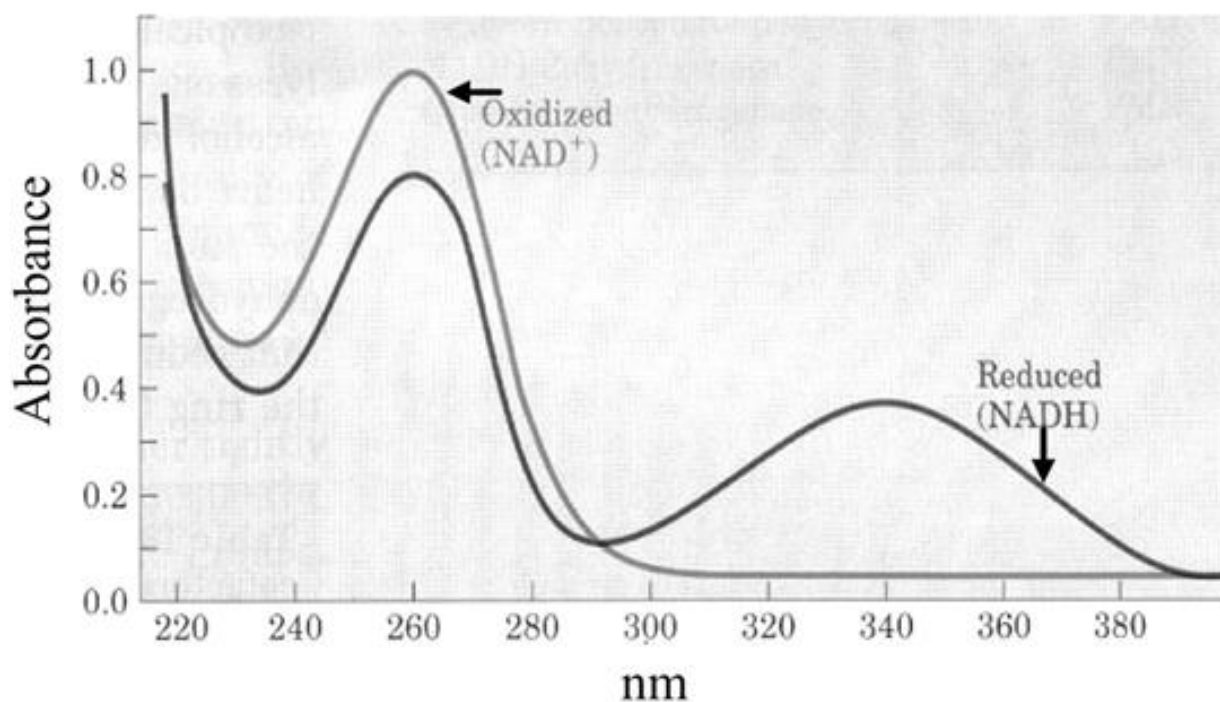


図10. レーザー照射方法と照射範囲

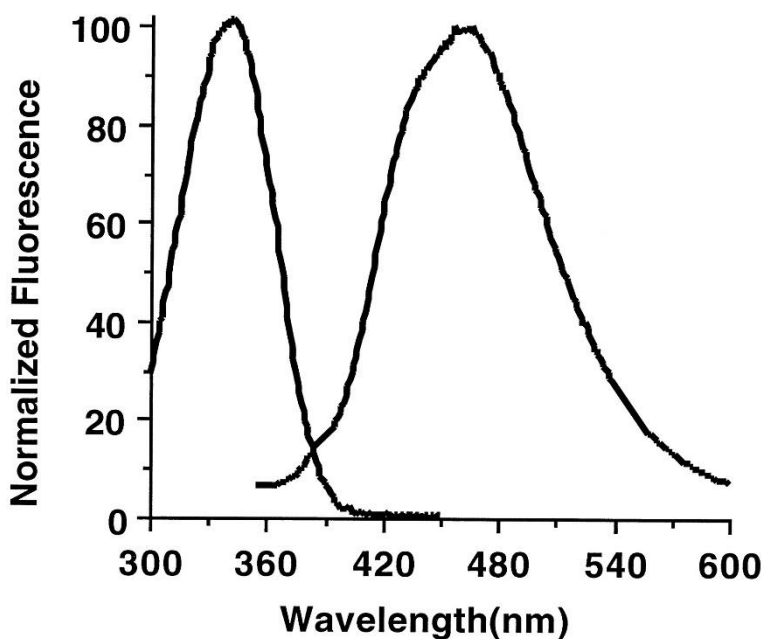
(A, B) レーザー照射系

(C) defocusと照射範囲の関係

(D) 実際のレーザー照射範囲(マスクあり)

A**NAD/NADH Spectrum**

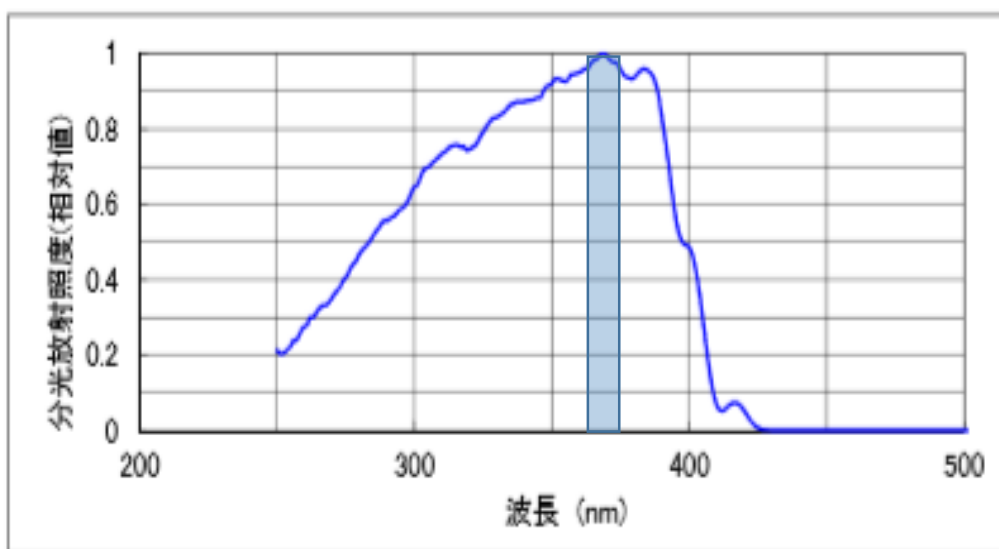
(Mayevsky A & Rogatsky GG(2007) Am J Physiol Cell Physiol 292(2):C615-640)

B**NAD(P)H excitation and emission spectra.**

(George H. Patterson et al. PNAS 2000;97:10:5203-5207)

図11. NADHの自家蛍光スペクトル

- (A) NADHの吸収スペクトル
- (B) NADHの励起及び蛍光スペクトル



光源：MAX302 UVユニット/石英ライトガイド
(Asahi Spectra Co., Tokyo, Japan)

図12. 光源と励起用フィルター分光特性

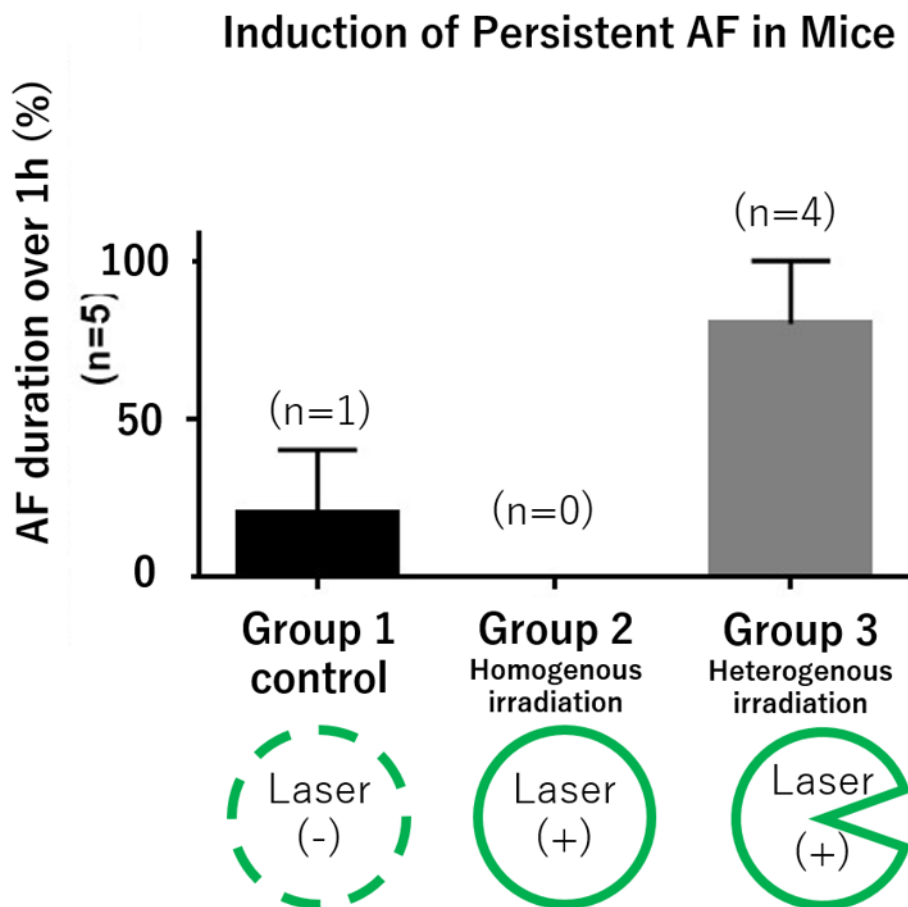
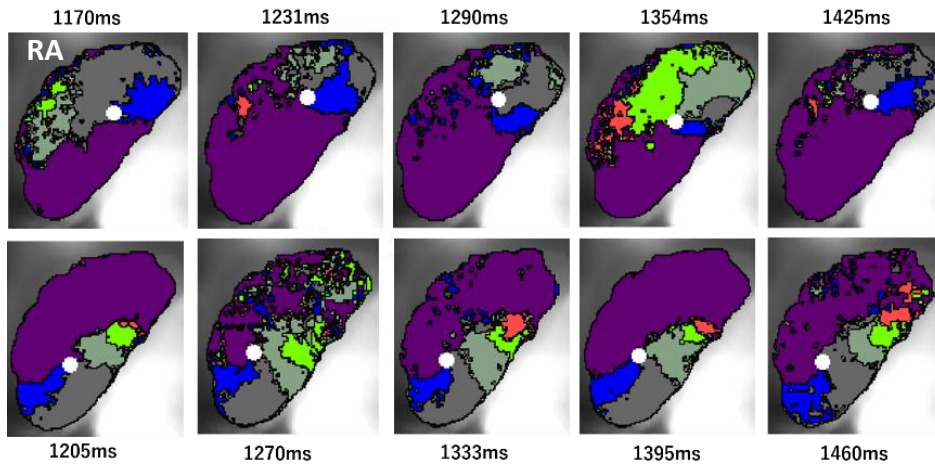
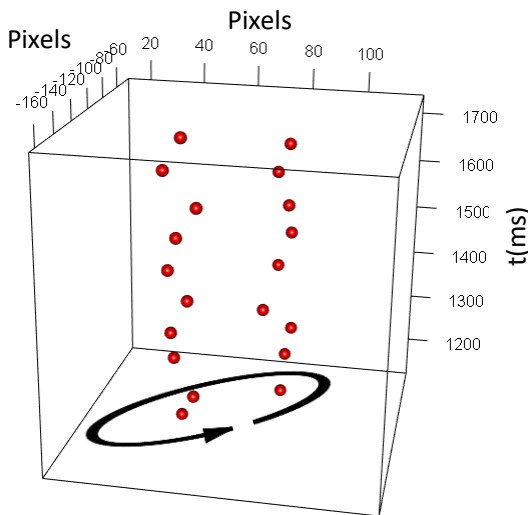


図13. レーザー照射による長時間心房細動の誘発率
コントロール群、均一照射群、不均一照射群 n=5

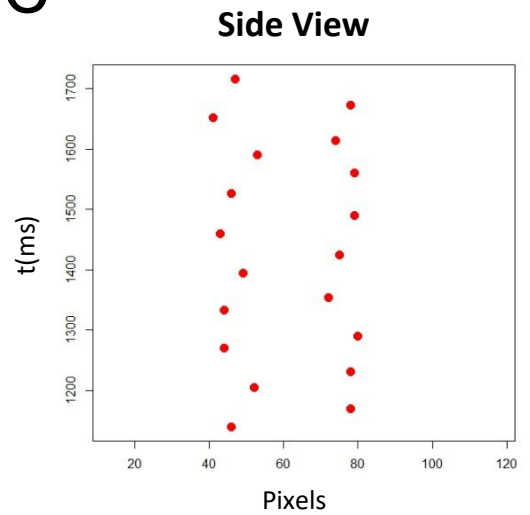
A



B



C



D

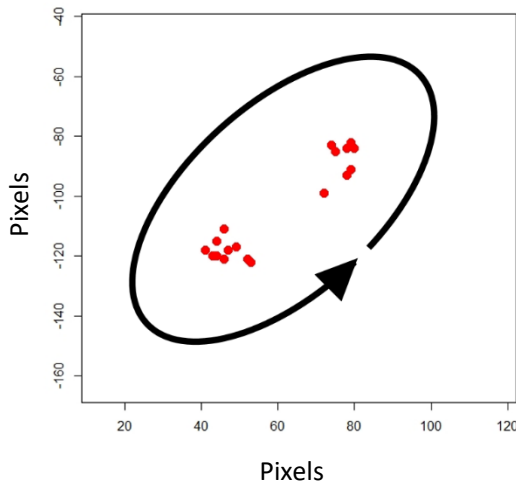


図14. 長時間持続型心房細動中のelectrical waveの動態

(A) オプティカルマップ(白点: electrical waveの曲がり角)

(B) (A)白点の時空間 (x-y-t) 図

(C) 図Bのx-t平面図

(D) 図Bのx-y平面図

(1 pixel=0.025mm) (RA長軸: 約130pixels、RA短軸: 約65pixels)

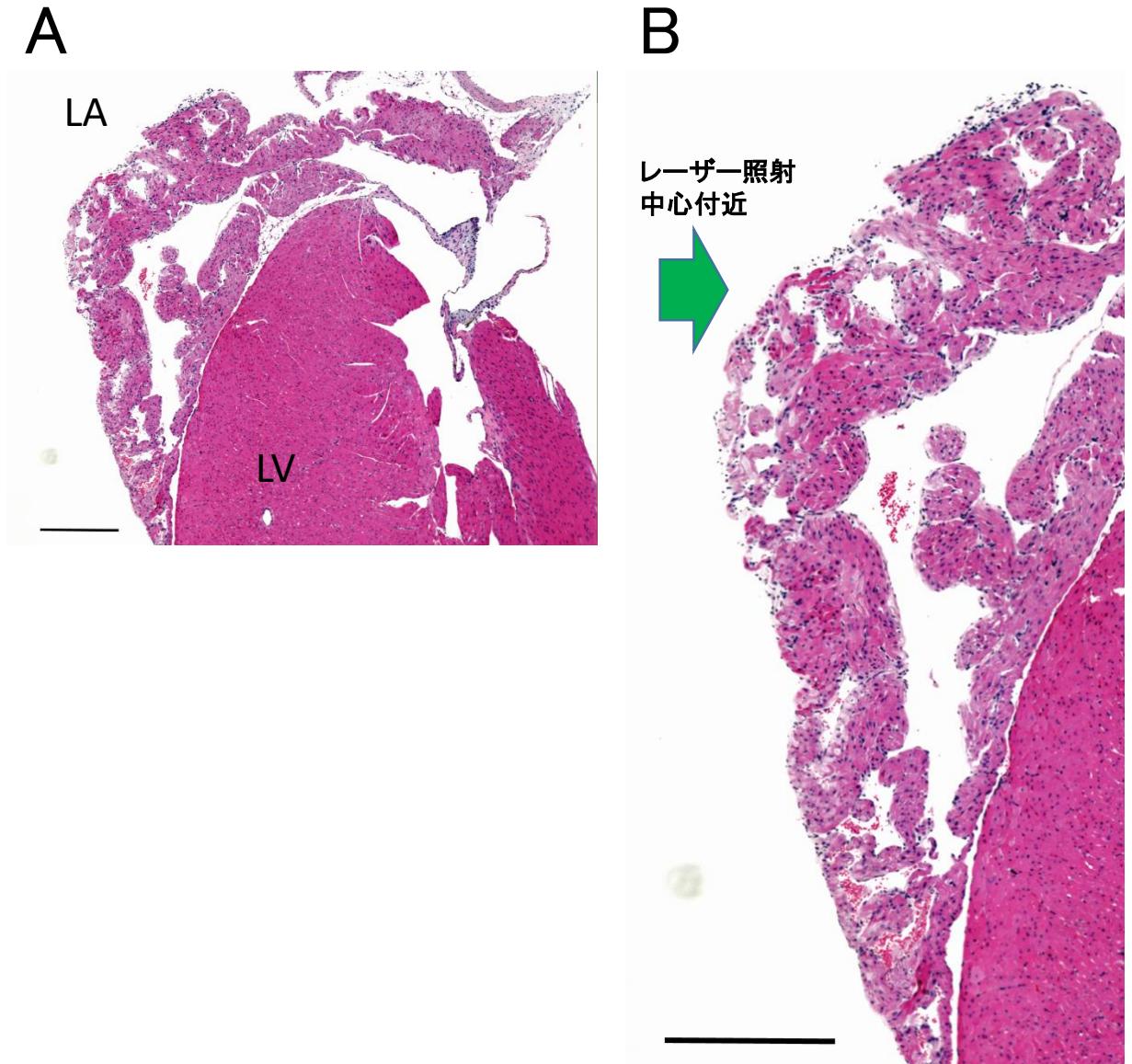


図15. レーザー照射後の心房筋組織学的検討
(A) マウス左心房をレーザー照射後、HEで染色した。
(B) (A) の拡大図
Scale bars: 3mm

A



B



図16. レーザー照射後の心室筋組織学的検討

(A) マウス左心室をレーザー照射後、HEで染色した。

(B) (A) の拡大図

Scale bars: 5mm

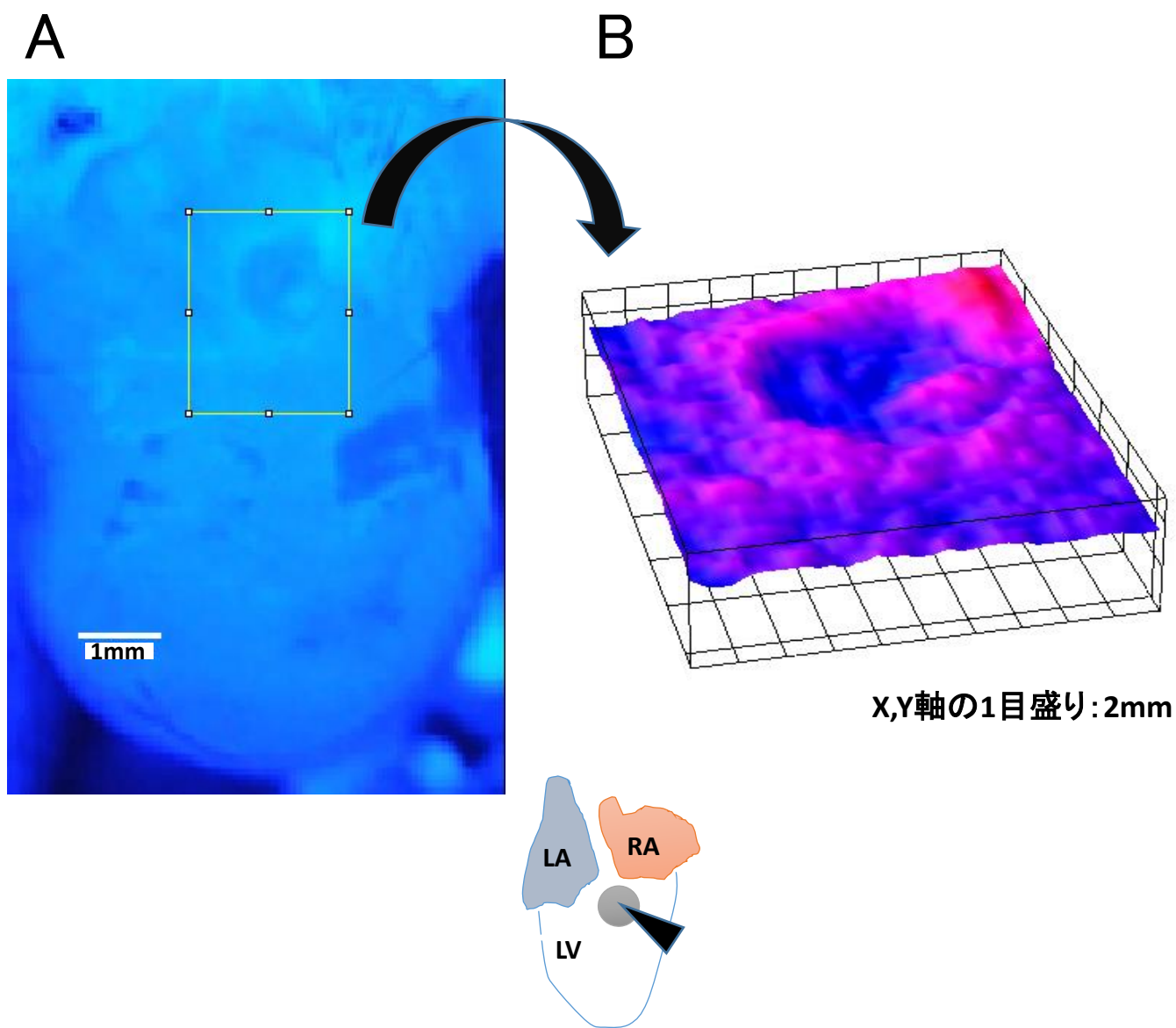


図17. レーザー照射後の自家蛍光 (NADH) 観察1

- (A) マウス左心室をレーザー不均一照射後、自家蛍光を示す。
- (B) (A) の黄枠内の明るさの濃淡を3次元表記した。

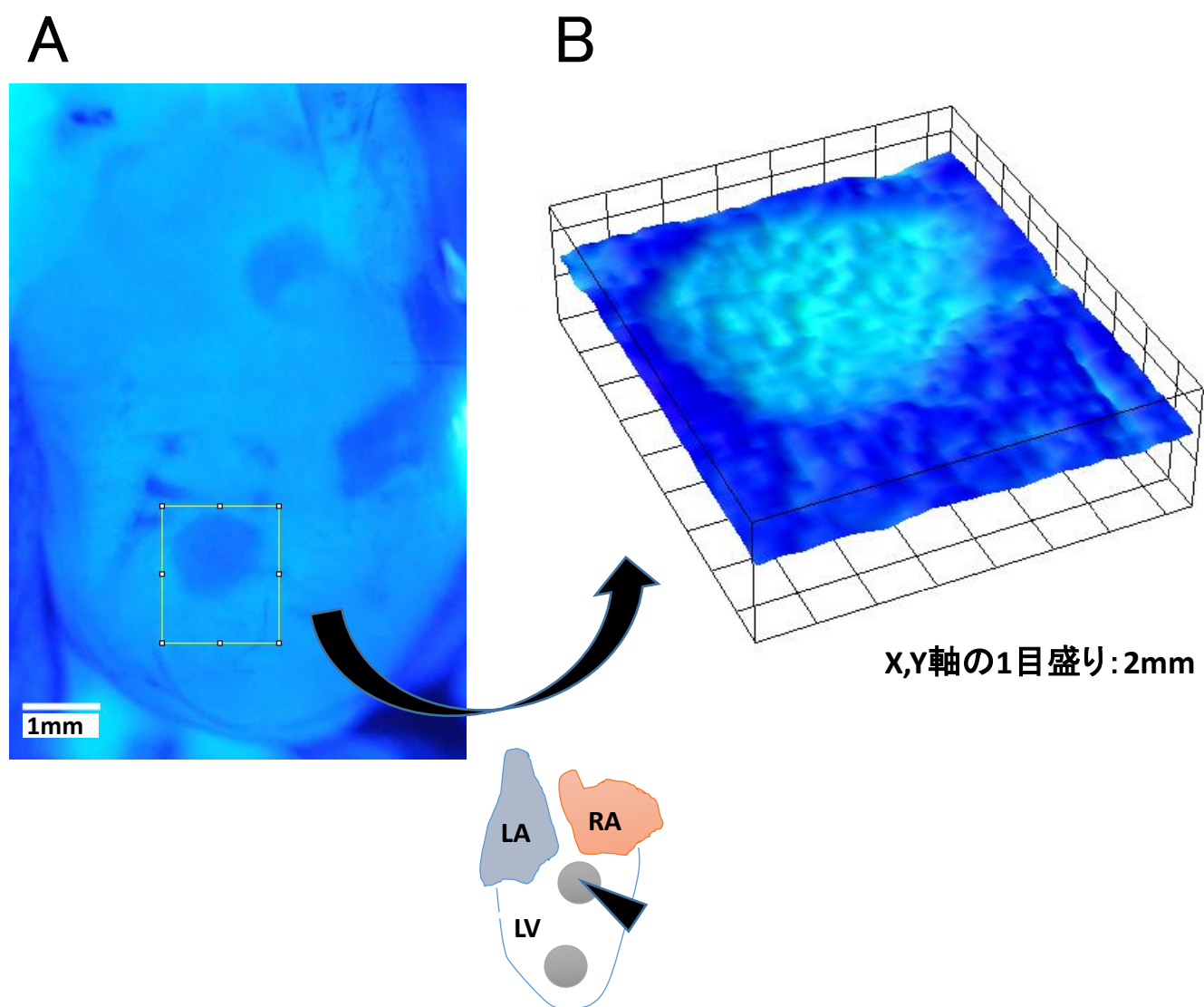
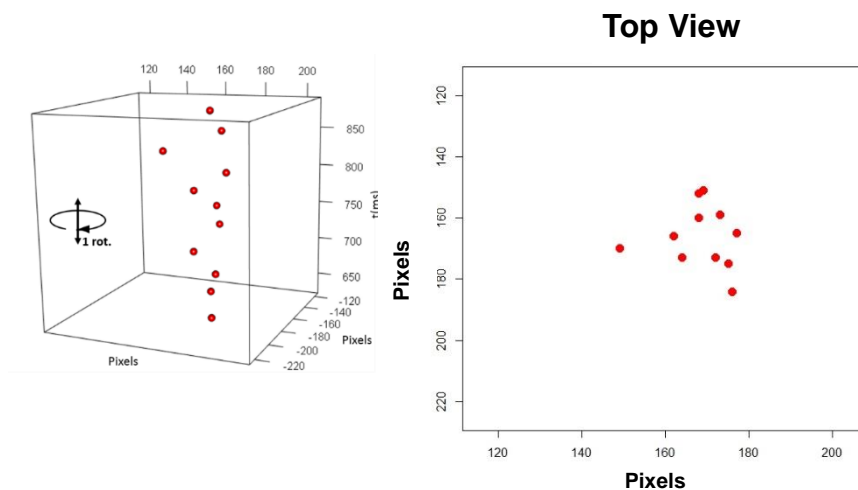


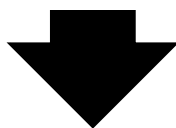
図18. レーザー照射後の自家蛍光 (NADH) 観察2

- (A) マウス左心室をレーザー均一照射後、自家蛍光を示す。
- (B) (A) の黄枠内の明るさの濃淡を3次元表記した。

A



self-sustained reentry circuitが存在すれば、
心房細動が持続化する可能性がある。



B

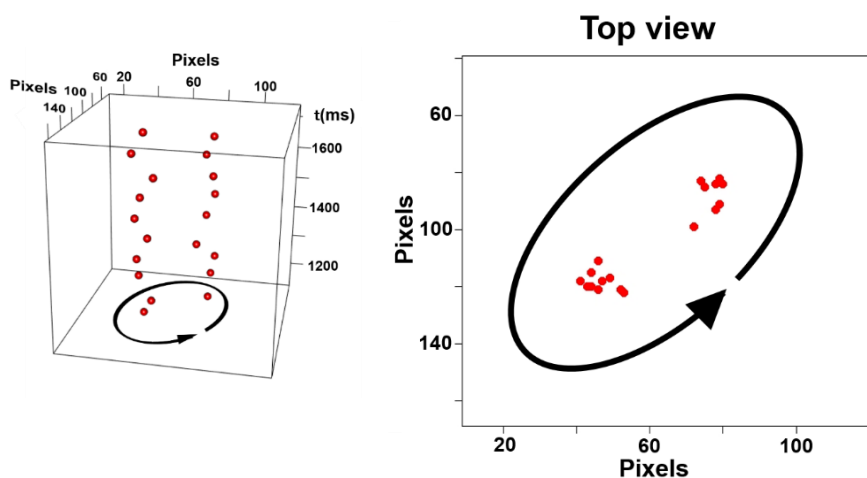


図19. 短時間型心房細動と長時間持続型心房細動の軌道比較

(A) 短時間型心房細動の不安定軌道（特異点の彷徨）

(B) 長時間持続型心房細動の安定軌道

(self-sustained reentry circuit)