レーザー光を用いた心筋活動電位の測定

Optical Measurement of Conducted Action Potential in Cardiac Muscle Using Laser Light

佐藤 隆 宮崎 保光

Takashi SATO and Yasumitsu MIYAZAKI

豊橋技術科学大学 工学部

Using the laser light, the fluorescent signals of a Nile Blue A dye in response to action potential were measured on the whole carp's ventricular muscle. The most serious problem with the measurement of optical signal from contracting tissue is the large signal changes caused by muscle contraction. A reliable procedure to suppress the light changes due to muscle contraction from the optical trace was described. In the measurement on contracting heart muscle, spontaneous optical signals consisting of two components were often detected. The first component (1st signal) is a dye-related fluorescence intensity change due to the action potential, and the second component (2nd signal) is a light scattering change due to contraction (that is to say "motion artifact"). The correlation between the 1st and 2nd signal corresponded to relationship between excitation and contraction. When the preparation was bathed in Ca^{2+} -free solution, the contractile force and the peak size of 2nd fluorescent signal were reduced depending on bathing time. Ca^{2+} -free solution was prepared by simply removing CaCl_2 from normal composition of Holmes-Stott solution.

1. まえがき 活動電位は細胞膜における膜電位が、膜のイオン透過性の変化により静止電位から脱分極することによって生じ、その発生は心筋組織において興奮伝搬や筋収縮の誘発などに大きく関与する。しかし自動能を有する洞房結節や房室結節においてこの過程に異常が生ずると、各々の部分での自動能の優位性が失われて異所性刺激生成が起こり、不整脈発生の一因となる¹⁾。またその成因には他に興奮伝搬異常が考えられており、一般に心臓生理学における不整脈発生機序の解明には、心表面上を伝搬する興奮を捉えるという手法が用いられている²⁾。

以上のような観点から著者らは、活動電位の光学的測定法をもとに、心臓生理学的・臨床的に不整脈発生の成因を解明するのに有用となる、心表面上興奮伝搬をモニタするための心筋活動電位多数カ所同時測定システムの開発を目的として、その基礎的な検討をおこなってきた³⁾。

本稿では、収縮性組織からの活動電位の光学的測定における基礎的な問題、並びにその問題を解決する方法の一つの試みとして現在おこなっている実験及びその検討結果について報告する。

2. 光学的活動電位測定システム 光学的活動電位測定法は、膜電位プローブ（電位感受性色素：Voltage Sensitive Dye）となる有機色素により染色した組織や細胞に光を照射して励起すると、その細胞の膜電位変化に伴って、得られる蛍光放射強度及び吸光特性が変化するという現象にもとづいており、その関係が線形である色素の場合には膜電位の大きさを定量的に評価することが可能となる。上記の原理にもとづいて構成した測定システムを図1に示す。本研究では光源に集束性・指向性に優れたレーザー光源として He-Ne レーザ（波長632.8nm, 出力5mW, 直線偏光）を用い、膜電位プローブにはカエルの単一骨格筋での使用例が報告されているオキサジン系色素 Nile Blue A（ $C_{20}H_{20}N_3OCl$; Eastman Kodak Co.）を使用して、コイの心室筋細胞における活動電位に依存した蛍光強度変化の測定をおこなっている。なお、Nile Blue A 色素は 550～650nm 付近に吸収帯を持ち、蛍光放射ピーク波長は680～685nmである。また、

図1. レーザ励起心筋活動電位測定システム

試料として用いるコイの心室筋細胞は、リンガー溶液を溶媒とする、濃度0.01mg/mlのNile Blue A色素溶液中に約10～15分間浸すことにより染色される。

3. 心筋興奮収縮連関 図2に、心筋細胞膜興奮（活動電位）と筋収縮応答との関係、即ち心筋興奮収縮連関（E-C coupling）及び細胞膜を介したイオン動態を示す。心筋細胞では通常、細胞膜の興奮は Ca^{2+} 透過性の上昇を伴い、活動電位発生時に Ca^{2+} が外部から流入してプラトー相の持続に寄与する。この流入 Ca^{2+} は筋収縮反応の惹起において本質的な役割を果たす（筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離を誘発し、それがトロポニンCに作用する）と考えられているが、実際に収縮タンパク質系（ミオシン、アクチン等）を活性化する Ca^{2+} が、この流入してきたものであるのか、あるいは筋小胞体（Sarcoplasmic reticulum:SR）での Ca^{2+} 放出による遊離 Ca^{2+} であるのかは、骨格筋の場合

図2. 心筋興奮収縮連関とイオン動態

合なども含めて多くの場合、まだわかっていない。

図2において活動電位の発生と収縮応答の関係を見ると収縮応答のピークは活動電位の立ち上がり時期に比べわずかな時間的遅れをもって生ずることがわかる。

4. 光学的測定における心筋収縮の影響 骨格筋や心筋などの収縮性組織では、それを構成する筋細胞での活動電位の発生に伴い筋の収縮が起こる。特に心筋では、自発性興奮を繰り返すために、心表面での興奮の広がりを経路学的にモニタする場合には、その収縮が測定に大きな影響を与えることになる。本研究の基礎的検討段階における、金山ら³⁾のコイの心室筋活動電位測定結果は心筋切片についてのものであり、しかも収縮によるアーチファクトをなくすためにカバーガラスにより圧着固定している。今後、より臨床に近い応用について検討する場合には心筋切片ではなく、「丸ごと」の心臓を考えなければならず、その際には収縮の抑制は検討しなければならない、非常に重要な点である。光学的活動電位測定では、収縮によって心表面が動くことで、検出器に入射するレーザー照射スポットから放射された蛍光量が変化し、これが本来の活動電位に依存した信号成分以外のアーチファクトとなって現れる。図3に、収縮の影響を受けた、コイの「丸ごと」の心室筋に対する光学的活動電位測定結果例(測定波長 $\lambda_{\text{meas.}}=685\text{ nm}$)を示す。この例では波形が2成分より構成さ

図3. 光学的測定における心筋収縮の影響

れているのがわかるがこの2成分のうち図2の関係から、最初の成分(図中1)は本来の活動電位に依存したものであり、2番目の成分(図中2)は収縮に依存した成分であると考えられる。その証拠として、 $\lambda_{\text{meas.}}=633\text{ nm}$ ではこのような2成分の信号波形は観測されない。

5. 心筋収縮の抑制 上に述べたような光学的測定における収縮の影響は、以前から研究上の問題となっており、心筋切片や初期鶏胚心臓を試料として用いた実験においては、低 Ca^{2+} 溶液あるいは Ca^{2+} を含まない溶液(以下 Ca^{2+} -free溶液)に試料を浸すことによって収縮抑制の効果を得ることができる、という報告がされている^{4), 5)}。また、心筋に特有な Slow channel の阻害剤として Ca^{2+} -antagonist が知られており⁶⁾、これらの薬物は活動電位の顕著な変化を伴わずに、心筋の興奮収縮連関を遮断、収縮張力を抑制する。これらの抑制法の中で我々は一つの試みとして、通常浴溶液として用いている淡水硬骨魚類用リンガー溶液(Holmes-Stott溶液)の組成から、 CaCl_2 を除いて作成した Ca^{2+} -free溶液を用いて、その「丸ごと」のコイの心室筋に対する収縮抑制効果について検討をおこなっている。

図4. Ca^{2+} -free溶液による収縮力抑制

図4に、 Ca^{2+} -free溶液に浸す時間をパラメータとして、収縮力低下の割合を調べた結果を示す。また対照として、通常のリンガー溶液に浸した場合の収縮力低下の割合をも示した。測定は、各々の浴溶液中に試料を浸した状態で、 $\lambda_{\text{meas.}}=633\text{ nm}$ において心筋による散乱光強度変化を約30分間連続記録し、その散乱光強度の低下を収縮力低下とみなして各々を比較した。その結果、通常

のリンガー溶液に浸した場合にはほとんど変化をみせなかったのに対し、 Ca^{2+} -free溶液の場合、約25分後には初期強度の約1/10にまで低下し、明らかに収縮抑制の効果がみられた。

6. 活動電位成分と収縮依存成分との分離 上記したような Ca^{2+} -free溶液の収縮力抑制効果により、 $\lambda_{\text{neas.}}=685\text{nm}$ での蛍光強度変化信号において、本来の活動電位に依存した成分と心筋の収縮による成分との分離が可能になると考えられる。

図5に、 Ca^{2+} -free溶液に試料を浸す時間をパラメータとした時の、蛍光信号波形の時間的変化を示す。測定開始時(Bathing time=0min)には

図5. 蛍光信号における収縮依存成分の抑制

蛍光信号波形は一つの成分しかみられないが、約18分後から2つの成分よりなる信号波形が観測され始める。そして時間の経過に伴い、成分1がはっきりしてきて、同時に成分2が衰えてゆくのがわかる。これは図2の心筋興奮収縮連関との対照から、最初、収縮による大きな信号変化によって「隠されていた」本来の活動電位成分が、 Ca^{2+} -free溶液による収縮抑制に従って現れ始めたものと思われる。即ち、一つめの成分(図中1)は活動電位の立ち上がりを反映したものであり、二つめの成分(図中2)は収縮依存性の信号であることを示すものである。図6は、図5における各々の信号成分強度変化を、横軸に浴時間をとって書き表したものである。この特性からも、 Ca^{2+} -free溶液に浸されている時間が長くなるにつれて、成分2の蛍光強度変化が成分1に比べて大きく低下してゆく様子がわかる。

図6. 各蛍光信号成分強度変化の浴時間依存性

7. まとめ 本稿では、心表面での興奮伝搬の様子をモニタする光学的心筋活動電位多数カ所同時測定システムの開発の基礎的検討において問題となる、心筋収縮の影響及びその抑制法について述べた。今後は、より厳密な検討のために収縮抑制時の心筋の活動状態について電気生理学的方法により測定し、光学的方法で得られた結果と比較検討してゆく所存である。

《参考文献》

- 1) 後藤昌義: 心臓の生理, 247/279, 南江堂(1984)
- 2) 福井康裕, 小谷誠, 河村剛史, 和田寿郎: 心表面興奮伝搬図のオンライン表示, 医用電子と生体工学, 19-4, 271/276(1981)
- 3) 金山省一, 宮崎保光: He-Neレーザ励起による心筋膜電位の分光特性, 信学技報, MBE85-57(1985)
- 4) T. Sawanobori, A. Hirota, S. Fujii and K. Kamino: Optical recording of conducted action potential in heart muscle using a voltage-sensitive dye, Jpn. J. Physiol., 31, 369/380(1981)
- 5) A. Hirota, K. Kamino, H. Komuro, T. Sakai and T. Yada: Optical studies of excitation-contraction coupling in the early embryonic chick heart, J. Physiol., 366, 89/106(1985)
- 6) A. Fleckenstein: History of calcium antagonists, Circ. Res., 52, 3/16(1983)