

## 審査の結果の要旨

氏名 エルナンデス ポポ ジョナダブ イグナシオ

不整脈現象発生の一つの要因である早期後脱分極 EAD, (Early After Depolarization)、や遅延後脱分極 DAD (Delayed After Depolarization) には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ の動態が深く関与していることが報告されている。その詳細な解析には興奮伝播時における膜電位変化と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の時間的・空間的变化の計測が求められる。光学的膜電位マッピング、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 指示蛍光色素を用いた  $\text{Ca}^{2+}$ マッピング法がこのような目的で応用されている。本論文は摘出心の灌流標本の電気生理現象の計測法である、膜電位感受性色素を用いた細胞活動電位の光学マッピング計測と、蛍光色素を用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度マッピング計測を同時に行うシステムに関して、その画像計測情報の精密な重畳手法の提案と評価、そして開発した手法を適用した不整脈現象の解析結果を報告したものである。制作した計測システムにより頻拍の状態や、心不全状態等細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ハンドリングの異常な状況で観察される不整脈発生のメカニズムの一つとして注目されている Late Phase 3 EAD に着目し、膜電位と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の時空間マッピングを応用し、解析を行っている。

第1章では、不整脈現象に関して概説するとともに、本研究で対象とする EAD、DAD など異常な自発興奮についてのこれまでの知見を概説している。また膜電位変化と細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ の同時マッピングシステムに関する既存研究を文献的に考察し、従来の研究報告では、重畳のための対応点を取るための方法に課題があると同時に、膜電位の光学的マッピングデータと膜電位と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度イメージングデータの重畳精度に関しての詳細な定量的評価がなされていなかったことを指摘している。第2章で本研究の目的を述べている。第3章では膜電位と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を同時計測するため、励起光源システム、ダイクロイックミラーと光学フィルター、2台の高速カメラから構成される計測装置の設計と製作と、膜電位と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度画像の光学系の歪補償、レーザー光を用いた参照点列を用いた Landmark based レジストレーション、二つの画像の相互情報量最大化という三段階の処理で膜電位マッピング結果と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度マッピング結果を高精度に重ね合わせる手法を提案している。ウサギ摘出灌流心標

本を想定したファントムを用いた評価実験ならびに実際に膜電位感受性色素 RH237 と  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 Rhod-2 で染色したウサギ摘出心の Langendorff 灌流標本を用いた同時計測実験で重ね合わせの精度を評価し、二乗平均誤差で 1 画素程度（標本表面で約 0.1mm）の精度で 2 つの画像情報の重ね合わせが可能であることを確認した。また基本刺激を加えた心臓標本の観察実験により 250fps の速度で膜電位と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の画像計測が安定して行えることを実験的に確認した。第 4 章では第 3 章で開発した計測システムを用いて、実験的に Late Phase 3 EAD が発生しやすい状態であると考えられる、心不全の状態等の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ハンドリングの異常状況での頻拍状態を模擬するために、ウサギ摘出心の Langendorff 灌流標本に Nicorandil、Isoproterenol を投与し、高頻度刺激時に発生した心室細動中に強い電気刺激 (80V) を加えた直後に観察される現象を記録し解析した。その結果、(1)細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇、(2)活動電位持続時間の短縮、(3) $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇後の脱分極の発生、という特徴で示される Late Phase 3 EAD と推測される興奮発生を確認した。Late Phase 3 EAD 心臓標本部位の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度、膜電位の時空間解析により、Late Phase 3 EAD が発生したと考えられる領域から、新たな興奮伝播が発生し、再び心室細動状態に移行する過程であることを示唆するデータを得た。Late Phase 3 EAD が心室細動への電気刺激後の再細動に至る新たな自発興奮の発生である可能性を示唆する報告はこれまでであったが、発生場所とその後の興奮伝播様式の関係は明らかではなかったが、本研究により Late Phase 3 EAD から新たな興奮が生じ、心室細動に至る現象を示唆する膜電位動態・細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を確認した。染色状態、励起光照射条件の問題などにより今回得られた結果の S/N 比は十分ではなく、実験装置・条件の一層の改良を行い、より良い S/N 比での計測をより高い撮影速度で行い、本研究で示された結果の検証が、Late Phase 3 EAD と不整脈発生の詳細な解析には必要であることが指摘されたが、これらの実験結果は電気ショック直後の数 10 msec の時間内で発生する電気生理動態の過渡現象解析における本研究で提案された膜電位変化と細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の同時マッピングシステムの有効性を示している。

以上の研究成果は、不整脈現象の解析において重要となる膜電位動態・細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を高い精度（約 0.1mm 程度の誤差）で重畳して解析する手法を提案して、細動を停止するために印加する電気ショック直後の不整脈発生メカニズム解析に重要と考えられる現象の一つである Late Phase 3 EAD から心室細動に至る興奮が発生することを示唆するデータを得ており、学術的な貢献が認められる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。