

学位論文題名

膜電位光学マッピング法を用いた1型糖尿病ラットにおける
心房細動基質の検討

学位論文内容の要旨

[背景と目的]

糖尿病は心房細動の独立した危険因子であるが、糖尿病が心房の電気生理学的特性に与える変化については十分に検討されていない。実験的研究においても、間質の線維化亢進に関連した興奮伝導遅延や交感神経活性の増強による不応期の不均一性の増大によって心房細動の誘発性が高まることが報告されているのみであり、糖尿病心の心房における催不整脈的機序に関わる知見は未だ不足している。特に、多くの発作性心房細動は肺静脈内起源の高頻度反復性異常興奮によって発生するため、高頻度の電氣的興奮に対する糖尿病心の心房での電気生理的变化を解明することは臨床医学的にも求められている。このため、我々は糖尿病動物の心房において、興奮伝導遅延や興奮伝導の不均一性、活動電位持続時間(APD)の時間的空間的不均一性が増大しているか、また、それらが興奮頻度の増加に伴って増強されるかを検証する目的で、膜電位光学マッピング法を用い薬剤誘発性糖尿病ラットの右心房における電気生理的变化について検討した。

[材料と方法]

8週齢のWister rat(オス)にStreptozotocin (STZ) 65mg/kgを腹腔内投与し、糖尿病ラットを作成した。実験には糖尿病ラット20匹、対照ラット21匹を使用した。直接的気管切開による人工呼吸下に心臓を摘出し、Langendorff法により逆行性灌流を行った。心房細動誘発試験は対照ラット12匹、糖尿病ラット10匹に対して行い、5秒間の連続刺激法を計5回行い、最長持続時間を心房細動持続時間とした。膜電位光学マッピング法は、対照ラット9匹、糖尿病ラット10匹に対して行った。膜電位感受性色素Di-4-ANEPPSの投与後、ミオシンII特異的阻害剤Blebbistatineの持続灌流により、電氣的活動を保ったまま心拍動を停止させた。励起光源を標本心臓に照射し、放射蛍光を高感度電荷結合素子(CCD)カメラにて撮影した。撮影は右心耳からの頻回刺激中に行い、刺激間隔は200、150、100、80、75msec、以下は刺激頻度と心房興奮が1:1に繋がらなくなるまで5msecずつ減少させた。活動電位持続時間(Action potential duration, APD)として、その80%再分極点までの時間APD80と同APD50を測定した。局所の脱分極点は、活動電位波形の立ち上がり最大速度時点とし、ペーシング部位と各ピクセル間の時間差を算出し、興奮伝播マップを当時間線で表した。更に、それを元に速度ベクトルマップを作成し、ベクトルの平均値を平均興奮伝導速度とした。また、興奮伝導の不均一性の評価として、ピクセル間の脱分極時間の差(phase difference)からphase differenceマップを作製し、その定量評価として不均一性絶対値、不均一性指数を算出し、両群間の差を比較した。組織学的検討は両群6匹ずつのラットで行い、組織断面積における線維化領域面積の割合を測定した。

[結果] 心房細動の持続時間は糖尿病ラットで有意に延長した(対照ラット 0.9 ± 0.3 vs. 糖尿病ラット 2.4 ± 0.6 sec, $P < 0.05$)。興奮伝導速度は糖尿病ラットで有意に低下した。不均一性絶対値、不均一性指数は糖尿病ラットにおいて有意に高値だった。また、これらの数値は、糖尿病ラットにおいて刺激周期の短縮に伴う上昇を認めた。APD80は右心房内の4領域(右心耳、右心房自由壁、高位右心房、下位

右心房)で測定し、その平均値は糖尿病ラットで有意に延長した(対照ラット 40.4 ± 2.6 vs. 糖尿病ラット 53.4 ± 2.3 msec、 $P < 0.01$)。また、APD80の不均一性を示す変動係数(標準偏差/平均)は、糖尿病ラットにおいて有意に高値だった(対照 0.15 ± 0.01 vs. 糖尿病ラット 0.20 ± 0.02)。刺激周期の変化によるAPDの短縮は糖尿病ラットにおいて強調されており、刺激周期200msecでのAPD80に対する刺激周期150、100、80msecのAPD80の割合は、糖尿病ラットで有意に低下しており、同様の結果は、APD50でも認めた。糖尿病ラットでは100msec前後の刺激周期で、活動電位オルタナンスと呼ばれる活動電位が1拍毎に長短長短を繰り返す現象が頻繁に認められ、その出現頻度は対照ラットで11%、糖尿病ラットで100%と糖尿病ラットで高値だった($P < 0.001$)。更に刺激頻度を短くしていくと、一部の糖尿病ラットでは活動電位波形が複雑に変化し、局所的な興奮伝導ブロックが観察された。活動電位オルタナンスの出現機序の一つと考えられているAPDの回復曲線特性を検討したが、曲線の最大傾きは対照 0.6 ± 0.2 、糖尿病ラット 0.8 ± 0.2 と有意差を認めず、最大傾き値1以上であった個体の割合についても対照22%、糖尿病ラット20%と有意差を認めなかった。組織学的検討において、線維化領域の割合は対照ラット $7.0 \pm 0.4\%$ に対し、糖尿病ラット $12.0 \pm 0.8\%$ と糖尿病ラットで有意に線維化の亢進を認めた($P < 0.001$)。

[考察]

今回の研究において、糖尿病心の心房における心房細動持続時間の延長、興奮伝導速度の低下と興奮伝導の不均一性の増大、APDの延長、刺激周期の短縮に伴うAPD短縮度の増大、活動電位オルタナンスの易出現性、間質の線維化の増大を認めた。興奮伝導速度低下や興奮伝導の不均一性の増大は、過去の報告から心房細動基質として重要であることが報告されているが、我々は膜電位光学マッピングを用いることにより、糖尿病心の心房におけるこれらの指標を初めて詳細に検討し得た。また、我々は糖尿病心の心房におけるAPDの延長も確認した。糖尿病心の心房におけるAPDに関する報告は非常に限られている。加えて、それらの結果は動物モデルによって異なっており、今後のエビデンスの蓄積が必要と思われる。このAPD延長の機序については全く明らかとされていないが、糖尿病心の心室では外向きカリウム電流の減弱やナトリウム-カルシウム交換電流の増強が報告されており、心房においても同様の機序の関与が推測される。APDの延長が有する催不整脈性についても未だ明らかではないが、近年の動物実験における報告から早期脱分極による異所性興奮が関与していると推測される。今回、APDの空間的不均一性の増大や活動電位オルタナンスの易出現性についても確認したが、これらの再分極異常は心房内での伝導ブロックを助長し、心房細動の発生に関与する可能性があり、糖尿病における心房細動発生機序の一つと考えられた。活動電位オルタナンスの出現機序については、これまでの研究から回復曲線の影響と細胞内カルシウム制御不全の影響の二つの可能性が考えられている。今回の研究では、その一つであるAPD回復曲線の特性について検討したが、両群間に差は認めなかった。この結果に加え、糖尿病下の心室筋では細胞内カルシウム制御異常が報告されていることから、我々が観察した糖尿病下の心房における活動電位オルタナンスの出現には細胞内カルシウム制御不全が関与していることが間接的に示唆される。

上述のような糖尿病下の心房における電気生理学的変化は、基礎疾患を背景としない心房細動患者における心房細動の病態進行における機序とは異なっており、今後の更なる研究により詳細な病態の把握と背景にある機序の解明が望まれる。

[結論]

本研究では、STZ投与により誘発された糖尿病ラットの右心房において、正常対照ラットとの比較により、下記のような電気生理学的、組織学的変化が確認された。(1)心房細動持続時間の延長、(2)興奮伝導速度の低下、(3)興奮伝導の不均一性が増大、(4)APDが延長、(5)APDの空間的不均一性の増大、(6)APDの頻度依存性短縮度の増大、(7)活動電位オルタナンスの易出現性、(9)間質の線維化の亢進。

上記のような糖尿病ラットの心房における変化は、糖尿病患者における心房細動発生の機序となっている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	本間	さと
副査	教授	神谷	温之
副査	教授	筒井	裕之
副査	教授	上田	哲男

学位論文題名

膜電位光学マッピング法を用いた1型糖尿病ラットにおける 心房細動基質の検討

本研究は、糖尿病の危険因子である心房細動の発症メカニズムを、ラットを用い検討した実験的研究である。ストレプトゾシン投与によりラットに1型糖尿病を発症させ、ランゲンドルフ逆行性灌流心を用いて電位感受性色素による光学的手法を行い右心房における膜電位を計測し、催不整脈に関わるメカニズムの検討を行った。その結果、心房細動持続時間延長、興奮伝達速度の低下、興奮伝達の不均一性の増大、活動電位持続時間の延長、活動電位持続時間の心臓内での不均一性の増大、刺激頻度増大に伴う活動電位オルタナンスの出現、心筋間質の線維化の亢進が観察された。これらの電気生理学的、形態学的変化が、糖尿病における心房細動出現頻度の増大のメカニズムとして強く示唆される結果である。

審査会においては、副査の神谷教授より、本研究で膜電位感受性色素によるイメージング解析を用いた理由、特に、直接的な電気活動計測に比較して光学計測は反応が遅いため波形にゆがみができないか、活動電位との一致度はどの程度かとの質問があった。申請者は、本法は心臓を切断することなく心筋の活動を記録できる点で有利で、一般的に用いられる実験方法であること、また、心臓の活動電位は、骨格筋や神経細胞に比較して遅い反応であるため、電位感受性色素でも波形のゆがみや遅れはあまり問題にならないこと、波形は直接電極を刺入して計測した結果と大差ないと回答した。さらに、活動電位オルタナンス発生に関わる心筋の Ca^{++} transient 延長のメカニズムについて質問があり、申請者は、メカニズムは不明であるが、拡張期の Ca^{++} 取り込みの延長、 Na^+ - Ca^{++} 交換系の機能低下、異なる K^+ や Ca^{++} チャネルの関与が想定される旨の回答があった。引き続き、副査の上田教授より、光学マッピングにおけるイメージングの範囲が比較的狭いので、心臓全体を一度にイメージングし全体の興奮伝達を検討できないかどうかとの質問が

あった。これに対し、申請者は、広範なイメージングを行うと、蛍光色素の検出感度が低下してしまうこと、また、周辺にひずみができ、正確な計測ができないため、今回の測定範囲を設定したとの回答があった。次に、タイトルの「心房細動基質」の意味について質問があり、この場合の「基質」は、substrate や matrix の意味ではなく、「素因」、「原因となるメカニズム」の意味であるとの回答があったが、誤解を生じる可能性があり、語句の使い方として不適切と思われる。

さらに、副査の筒井教授より、本実験の結果として、糖尿病における様々な心筋の障害、特に心筋間質の線維化の亢進、や心房内興奮伝達の不均一性などを生じるそもそもの原因は高血糖にあると考えられるが、高血糖がこれらの障害を生じるメカニズムについてどのようなことが考えられるかとの質問があった。これに対し、申請者は、高血糖が血管障害を生じ、結果的に心筋の酸素や栄養因子の供給に障害を来す可能性が特に、心室筋では推察されていること、その際、いくつかの転写因子などの関与が想定されること、心房筋でも同様のメカニズムが推察されると回答した。また、圧倒的に数の多い2型糖尿病においてはどうか、との質問に対し、同様の検討の必要性は認識しているが、ラットにおいて心房細胞を生じるまでの変化が生じにくく、検討は困難であると回答した。最後に主査の本間教授より、今回の実験で用いたストレプトゾシン投与後16週（生後20週）のラットの体重が、離乳直後のラット並の低体重であることから、実験動物の全身症状について、糖尿病以外の様々な栄養状態の障害、血管障害などが問題にならないか、ペースメーカー電位への直接作用が今回の結果に影響していないかどうか、心房筋の興奮性の不均一性にギャップ結合の数、障害が関与していないかどうか、の質問があった。これに対し、申請者は、心房細動を生じるまでには、16週の経過が必要であったこと、特に多飲多尿による全身症状の悪化があったが、他の方法論に比較して確実に心房に変化を来す方法であったため、採用したこと、ペースメーカー電位そのものにも、糖尿病による影響がみられたこと、間質の線維化の増大に伴い、ギャップ結合の数の低下は観察され、これが活動電位や興奮性の不均一性の増大の一因になっている可能性が大であると、回答した。

糖尿病が心房細動の危険因子となるメカニズムを、光学マッピング法により検討した本研究の成果は、糖尿病患者での心房細動発症機序を示唆し、治療・予防のターゲットとなる点でも意義がある。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。