

心筋細胞に対する光増感反応による  
活動電位障害の検討モデル

2018 年度

土井 万理香

学位論文 博士 (工学)

心筋細胞に対する光増感反応による  
活動電位障害の検討モデル

2018 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

土井 万理香

# 主論文要旨

主論文題目：

心筋細胞に対する光増感反応による活動電位障害の検討モデル

(内容の要旨)

本研究では、*in vivo* 心筋組織に対するタラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応による即時的な活動電位障害の調査に用いる、*in vitro* 心筋細胞モデルに関して検討した。不整脈の電気信号遮断治療に光増感反応を応用するための基礎検討として、心筋組織の酸化作用に対する即時的な活動電位障害に関するエビデンスを *in vitro* 細胞実験で得ることが望ましいが、調査に用いる *in vitro* モデルが存在しない。そこで本研究では、溶液流れにより光増感反応の酸素環境を改善するとともに、低侵襲な *in vitro* 電位計測法を採用した。*In vitro* モデルの対照となる *in vivo* モデルでは、薄い心筋組織と、安定した接触が可能な環状レーザカテーテルおよび環状電極カテーテルを採用した。そして、これらのモデルで共通の電位障害基準を定義して、両モデルの光増感反応に対する応答を比較することで、*in vitro* 心筋細胞モデルの光増感反応による活動電位障害検討の有用性を示した。

*In vitro* でのラット心筋細胞の電位計測法として、低侵襲な多電極アレイによる接触電位計測と、膜電位感受性色素蛍光計測の 2 方法を検討した。前者では、電極に対する垂直方向の細胞接触性が不安定なため生じたと思われる測定波形のバリエーションが観測されたため、本研究に適さないと判断した。後者の方法の色素毒性に関する条件検討後、安定した活動電位計測が可能であったため、膜電位感受性色素の蛍光計測法を採用した。光増感反応中に反応領域に対して細胞剥離、細胞の自発拍動停止が生じない上限である 0.4 mm/s で未反応の溶液を流して、反応領域に酸素供給を行った。酸素供給速度の改善は、流れが 0.02 mm/s のときと比較し約 9.7 倍と見積もられた。この *in vitro* モデルとの比較に用いる *in vivo* モデルとして、イヌ上大静脈壁の薄い心筋組織と、安定した接触が可能な環状レーザカテーテルを用いて光増感反応を行い、洞調律伝導電位の減少を環状電極カテーテルを用いて測定した。*In vitro* および *in vivo* モデルにおいて測定した活動電位の振幅減衰を用いて、両モデルの実験結果を比較した。電位減衰が初期値の  $1/e$  になるまでに必要なエネルギーを、*in vitro* と *in vivo* 実験で比較したところ、それぞれ約  $6 \text{ J/cm}^2$  および  $2.6\text{-}3.9 \text{ J/cm}^2$  となり、オーダーが一致した。この結果より、*in vitro* および *in vivo* において同オーダーの効率で光増感反応障害が起きていると考えられる。

以上本研究では、*in vitro* モデルにおける酸素環境の改善および、共通の電位基準を用いた *in vivo* 実験との比較により、作成した *in vitro* モデルを使えば光増感反応による即時的な *in vivo* 活動電位に対する酸化障害を検討できることを確認した。

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

### Title

*In vitro* model to study a damage against action potential on myocardial cells by a photosensitization reaction

### Abstract

The author established an *in vitro* myocardial cell model to investigate the immediate damage against action potential of myocardium by a photosensitization reaction using talaporfin sodium, as a basic study of proposed arrhythmia ablation method using the photosensitization reaction. A spontaneous action potential of myocardial cells and an electrical potential conducted through the myocardium were measured to confirm the similarity of this *in vitro* model to a *in vivo* model.

A contact action potential measurement of rat myocardial cells using a multielectrode array and a fluorescence measurement of voltage-sensitive dyed cells were employed as less invasive action potential measurements during the photosensitization reaction *in vitro*. Measured action potential waveforms by the contact method were widely varied. This variation might be originated from a contact condition of the cells on the electrode. The author judged that this method was not appropriate to the purpose of this study. The action potential measurement with the voltage sensitive dye was relatively reliable under a stained condition considering the dye toxicity. The author employed the combination of this method and a solution flow to improve the oxygen supply in the photosensitization reaction area. The flow rate of 0.4 mm/s was used to keep the myocardial cells adhesion and spontaneous beats of the cells. Estimated improvement on the oxygen supply was 9.8-fold larger than that of 0.02 mm/s. Thin myocardium inside of canine superior vena cava and a combination of a ring laser emission catheter and ring electrode catheter with stable contact capability were employed as an *in vivo* model to compare the *in vitro* action potential decrease. The author applied the same judgement criterion, 1/e potential decrease, to compare the *in vitro* and *in vivo* action potential decreases by the photosensitization reaction on the myocardial cells/myocardium. The energies required to reach this decrease were about 6 J/cm<sup>2</sup> and 2.6-3.9 J/cm<sup>2</sup> in the *in vitro* and *in vivo* models, respectively. These results suggested that the oxidative damage by the photosensitization reaction on the myocardial cells in the *in vitro* model might have similar efficacy against the *in vivo* myocardium model.

Therefore, the author concluded that proposed *in vitro* model with the improved oxygen supply

and less invasive action potential measurement may be useful to investigate the photosensitization reaction conditions on *in vivo* action potential damage in the myocardium during the photosensitization reaction.

# 目次

第1章 序論	1
1.1 緒言	1
1.2 本研究の背景と目的	1
1.3 本論文の構成	2
1.4 結言	3
参考文献	4
図表	6
第2章 心房性不整脈のアブレーション治療	7
2.1 緒言	7
2.2 頻脈性不整脈	7
2.2.1 心臓の刺激伝導系	7
2.2.2 頻脈性不整脈の病態と発生機序	7
2.3 頻脈性不整脈に対する治療法	9
2.3.1 高周波アブレーション	9
2.3.2 クライオアブレーション	10
2.3.3 その他のアブレーション	11
2.4 カテーテルアブレーションにおけるリアルタイムの心筋活動電位計測	11
2.4.1 心内心電図	11
2.4.2 3次元マッピング法	12
2.5 結言	12
参考文献	13
図表	19
第3章 光線力学的治療を応用した心房性不整脈のアブレーション技術	23
3.1 緒言	23
3.2 光増感反応	23
3.2.1 光増感反応の原理	23
3.2.2 我が国で認可を受けている光感受性薬剤	24
3.2.3 光増感反応を利用した悪性腫瘍治療	25
3.2.4 光増感反応を利用したその他の治療	26
3.3 光線力学的治療を応用した心房性不整脈のカテーテルアブレーション技術の提案	27
3.4 結言	28
参考文献	29
図表	33

第4章 光線力学的治療による心筋細胞の活動電位障害を研究するための <i>in vitro</i> モデルの提案	36
4.1 緒言	36
4.2 不整脈のアブレーション技術における <i>in vitro</i> 心筋細胞活動電位調査の必要性	36
4.3 <i>In vitro</i> における活動電位障害検討モデルの設計における課題	37
4.4 光線力学的治療を用いた不整脈のアブレーション技術における心筋細胞の 活動電位障害を検討する <i>in vitro</i> モデルの提案	38
4.4.1 <i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> モデルにおける活動電位評価と基準の選定	38
4.4.2 <i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> モデルにおける酸素環境の違いと <i>in vitro</i> にて実施した改善	39
4.5 結言	39
参考文献	40
図表	46
第5章 多電極アレイを用いた細胞外光増感反応による心筋細胞の接触電位 変化の計測	48
5.1 緒言	48
5.2 光増感反応による心筋細胞電位変化：多電極アレイを用いた計測	48
5.2.1 実験方法	48
5.2.1.1 使用した多電極アレイシステムにおける心筋接触電位計測条件と 細胞播種準備	48
5.2.1.2 心筋細胞の培養とタラポルフィンナトリウム溶液の調製	49
5.2.1.3 光増感反応の励起光照射系の構築	49
5.2.1.4 光増感反応中の心筋細胞接触電位計測および光増感反応前後の 心筋細胞の形態変化観察	50
5.2.2 実験結果	50
5.2.2.1 心筋細胞接触電位波形	50
5.2.2.2 光増感反応による心筋細胞接触電位変化および心筋細胞形態変化	51
5.2.3 考察	51
5.2.3.1 多電極アレイを用いた光増感反応による接触電位計測で評価できる 心筋細胞障害	51
5.2.3.2 光増感反応による心筋細胞の活動電位に対する酸化障害の進行	52
5.3 接触電位波形と心筋細胞接着状態の関係	52
5.3.1 接触電位を用いた計測の問題点	52
5.3.2 実験方法	53
5.3.3 実験結果	53
5.3.4 考察	53
5.4 結言	54
参考文献	55
図表	57

第6章 膜電位感受性色素を用いた細胞外光増感反応による心筋細胞の活動電位変化の計測と <i>in vivo</i> との比較	64
6.1 緒言	64
6.2 光増感反応中の <i>in vitro</i> 心筋細胞電位変化	64
6.2.1 実験方法	64
6.2.1.1 心筋細胞の培養	64
6.2.1.2 タラポルフィンナトリウム溶液灌流チャンネル系	64
6.2.1.3 膜電位感受性色素による光増感反応中の心筋細胞活動電位測定	65
6.2.1.4 膜電位感受性色素のフォトブリーチングによる影響の評価	66
6.2.2 実験結果	67
6.2.2.1 心筋細胞の膜電位波形と膜電位感受性色素のフォトブリーチングによる影響の評価	67
6.2.2.2 光増感反応による心筋細胞膜電位変化	68
6.3. 光増感反応中の <i>in vivo</i> 心筋電位変化	68
6.3.1 実験方法	68
6.3.1.1 イヌ上大静脈におけるカテーテルの設置と光増感反応条件	68
6.3.1.2 環状型レーザーカテーテルの構造と放射パワーの設定	69
6.3.1.3 血中のタラポルフィンナトリウム濃度計測および上大静脈内壁の心筋厚みの計測	70
6.3.2 実験結果	70
6.4 考察	71
6.4.1 <i>In vitro</i> 実験における酸素供給	71
6.4.2 <i>In vivo</i> 実験における光感受性薬剤濃度と励起光強度の関係	72
6.4.3 <i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> 実験における有効放射照射量の比較	73
6.4.4 本研究の limitation	74
6.5 本研究の新規性と応用	74
6.5.1 類似研究の文献調査と本研究の新規性	74
6.5.2 光線力学的治療の基礎研究における作成した <i>in vitro</i> モデルの応用	75
6.5.2.1 皮膚の光線力学的治療	75
6.5.2.2 悪性脳腫瘍の光線力学的治療	75
6.6 結言	76
参考文献	77
図表	82
第7章 結論	98
付録	100
A 用語および記号説明	100
A.1 光照射および光計測に関する用語および記号説明	100
A.1.1 用語説明	100

目次

A.1.2 記号説明	100
参考文献	101
著者論文目録	<b>102</b>
謝辞	

## 図表の目次

図 1-1	本論文の構成
図 2-1	心臓の刺激伝導系
図 2-2	心筋細胞の活動電位とイオンの流出入
表 2-1	主なアブレーションデバイス
図 2-3	3次元マッピングシステム
図 3-1	光増感反応のエネルギー機構
図 3-2	光感受性薬剤の構造式
図 3-3	光線力学的治療を応用した心房性不整脈のカテーテルアブレーション技術の構想
図 4-1	カテーテルアブレーションに関する基礎研究報告のまとめ
表 4-1	2次元、3次元の心筋細胞電気伝導路作成法
図 5-1	光増感反応中における心筋細胞接触電位計測の実験系
図 5-2	タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトルと 5.2.1 節の実験での励起波長
図 5-3	ラット心筋細胞の自発拍動による接触電位波形
図 5-4	光増感反応前および反応中の心筋細胞接触電位の第 1 負ピーク変化の代表例
図 5-5	光増感反応中の心筋細胞接触電位の第 1 負ピーク変化
図 5-6	光増感反応前後の心筋細胞形態変化の位相差顕微鏡画像
図 5-7	心筋細胞の位相差顕微鏡画像輝度と電位振幅の関係
図 6-1	光増感反応による心筋細胞電位変化計測のための <i>in vitro</i> 実験系
図 6-2	タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトルおよび励起波長と膜電位感受性色素の励起波長および蛍光測定波長 ( <i>in vitro</i> モデル)
図 6-3	膜電位感受性色素および光感受性薬剤の励起光の照射サイクル ( <i>in vitro</i> モデル)
図 6-4	【対照実験 1】膜電位感受性色素励起光 (488 nm) による膜電位感受性色素のブリーチングの影響 ( <i>in vitro</i> モデル)
図 6-5	【対照実験 2】タラポルフィンナトリウム励起光 (663 nm) による膜電位感受性色素のフォトブリーチングの影響 ( <i>in vitro</i> モデル)
図 6-6	ラット心筋細胞の自発拍動による膜電位感受性色素の蛍光輝度変化 ( <i>in vitro</i> モデル)
図 6-7	膜電位感受性色素で計測した光増感反応によるラット心筋細胞の膜電位変化 ( <i>in vitro</i> モデル)
表 6-1	式 (6-1) の各放射照度における係数および決定係数 ( <i>in vitro</i> モデル)
図 6-8	定義した有効放射照射量の放射照度依存性 ( <i>in vitro</i> モデル)

図 6-9	イヌの上大静脈における環状電極カテーテルおよび環状レーザーカテーテルの設置状況 ( <i>in vivo</i> モデル)
図 6-10	<i>In vivo</i> 光増感反応に使用した環状側射型レーザーカテーテル ( <i>in vivo</i> モデル)
図 6-11	光増感反応を行ったイヌ上大静脈の摘出後の展開写真 ( <i>in vivo</i> モデル)
図 6-12	電極カテーテルで計測した光増感反応前後のイヌ上大静脈内側の心筋組織における活動電位波形 ( <i>in vivo</i> モデル)
図 6-13	光増感反応によるイヌ上大静脈内側の心筋組織における洞調律伝導電位変化 ( <i>in vivo</i> モデル)
図 6-14	溶液流れによる酸素濃度の改善 ( <i>in vitro</i> モデル)
図 6-15	心筋表面からの深さと有効放射照射量の関係 ( <i>in vivo</i> モデル)
表 A-1	光照射に関する用語説明一覧
表 A-2	光学記号の一覧

## 第1章 序論

### 1.1 緒言

本研究では、光線力学的治療を応用した心房性不整脈に対するアブレーション技術の基礎検討のため、光増感反応による心筋細胞の即時的な活動電位障害を調査するための *in vitro* モデルを作成する。この *in vitro* モデルと *in vivo* モデルとの対応を確認するため、心筋細胞の自発電位および心筋伝導電位の振幅減衰に着目し、両モデルから得られた結果を比較する。

不整脈のアブレーション治療は、心筋電位計測により術中に電気伝導遮断を確認しながら治療を進めるため、即時的な活動電位障害が必要である。治療学における段階的なエビデンスの積み上げの観点から、*in vitro* 研究で即時的な活動電位障害に関するエビデンスを得ることが望ましい。しかし、不整脈アブレーション治療作用の研究では、即時的な活動電位障害の調査に用いる *in vitro* モデルが存在しない。著者らは、光線力学的治療を応用した心房性不整脈に対するアブレーション技術を提案している。このアブレーション技術では、光増感反応により発生する一重項酸素により心筋組織を酸化障害する。光増感反応が心筋細胞に与えるこの酸化障害に対する、即時的な活動電位障害を調査するために、*in vitro* モデルを作成する必要がある。著者は併せて光増感反応中の *in vitro* モデルの酸素環境を改善し検討した。

### 1.2 本研究の背景と目的

不整脈のアブレーション治療は、心房性の頻脈性不整脈に対する非薬物的な根治療法として近年普及している [1, 2]。この治療では、主に通電による熱作用が用いられることから、心筋組織の過加熱が原因で発生する合併症の抑制が課題となっている [1-3]。一方、光線力学的治療は悪性腫瘍治療に対する選択的な治療法で、光増感反応により産生する一重項酸素により、非熱的に細胞を障害するという特徴がある [4]。著者らは、光線力学的治療のこの非熱的な特徴を活かした、光増感反応を用いた不整脈のアブレーション技術を提案している [5-10]。不整脈のアブレーション治療では、心内心電図や3次元マッピングシステムによりリアルタイムの心筋電位計測が可能のため、治療効果を即時的に判定しながら治療を行っている [11]。光増感反応を用いた悪性腫瘍治療は、アポトーシスを主体とした緩徐な作用を使用しているため [12]、そのままアブレーション技術に応用することができない。そこで著者らは、主に細胞外で光増感反応を行うことで、細胞膜のイオンチャネルを酸化障害し、即時的な作用効果が得られる方式を提案している [5, 6]。

不整脈のアブレーション治療作用の研究では、即時的な活動電位障害の調査に用いる *in vitro* モデルが存在しない。障害作用に対する即時的な心筋活動電位応答の評価は、主に *in*

*in vivo* 実験において行われている [5, 7-9, 13, 14]。これら *in vivo* 実験の結果は、施術の技術レベルの関与などの理由から、治療条件などを決めるための科学的エビデンスとして参考にならない (4.2 部参照)。したがって、光増感反応による酸化作用に対する心筋細胞の即時的な活動電位障害を調査するためのモデルを、*in vitro* で作る必要がある。

光増感反応が発生すると、モデル中の酸素が消費され、酸素濃度は減少する。*In vitro* モデルにおいて酸素は、溶液に物理溶解の形で存在している。光増感反応を行う *in vitro* モデルは、基本的に外部からの酸素供給のない貯留系であり、このような系では光増感反応中に酸素濃度減少、ときに枯渇が生じる [15, 16]。これに対して *in vivo* モデルでは、酸素が物理溶解の他に、ヘモグロビンと結合する化学溶解でも存在している [17]。血中の化学溶解酸素量は物理溶解酸素量の 60-100 倍程度ある [17]。*In vivo* モデルでは、さらに血流による酸素供給がある。そのため *in vitro* モデルと比較して *in vivo* モデルでは、反応に使用できる酸素が 2 桁程度多く、光増感反応中の酸素濃度減少や枯渇は生じにくい。そこで著者は、*in vitro* モデルにおいて灌流チャンネルを設計し、光増感反応中に反応領域に対して未反応の溶液を流すことで、酸素を反応領域に連続的に供給した。

*In vitro* と *in vivo* モデルにおける、心筋細胞の即時的な活動電位障害を比較するには、両実験において測定できるパラメータを評価に採用する必要がある。著者は、障害作用による心筋/心筋細胞の活動電位減少を比較に使用することにした。*In vitro* モデルでは、一般的なパラメータである心筋細胞の自発電位を、できるだけ低侵襲な電位計測法を用いて測定する。*In vivo* モデルでは、環状カテーテルの性能試験に使用するイヌ上大静脈内側の、心筋における洞調律信号伝導モデルにおいて、光増感反応作用に対する心筋接触電位の減少を測定する。

### 1.3 本論文の構成

本論文は7章から構成される。図 1-1 に本論文の構成を示す。

本章では光増感反応による心筋細胞の即時的な活動電位障害を調査するための *in vitro* モデルの作成に関する本研究の背景と目的を述べた。

第2章では、心房性不整脈 (主に心房細動) の病態と治療法を述べ、カテーテルアブレーション治療の課題を述べた。

第3章では、光線力学的治療の原理と抗腫瘍効果および光線力学的治療を応用した心房性不整脈のアブレーション技術について述べた。

第4章では、光線力学的治療を応用した不整脈に対するアブレーション技術において、光増感反応による心筋細胞における即時的な活動電位障害の調査を行う *in vitro* モデルの作成の必要性を説明した。

第5章では、多電極アレイを用いて光増感反応中の心筋細胞活動電位を計測し、酸化障害による心筋細胞接触電位の変化に関して検討を行った。

第6章では、膜電位感受性色素を用いて光増感反応中の心筋細胞活動電位を計測し、実験結果を *in vivo* 実験における心筋活動電位変化と比較した。*In vitro* 実験では溶液流れにより、光増感反応中の酸素供給を改善した。*In vitro* と *in vivo* の比較のために、共通に用いることのできる電位評価基準を設定した。

第7章では、第5章および第6章の検討から、本研究を総括した。

#### 1.4 結言

本章では、光増感反応中の心筋細胞における即時的な活動電位障害の調査に用いる *in vitro* モデルの作成に関しての本研究の背景と目的を述べ、本論文全体の構成を示した。

## 参考文献

- [1] 奥村謙, 相澤義房, 相原直彦, 青沼和隆, 沖重薫, 熊谷浩一郎, 庄田守男, 住友直方, 高橋淳, 内藤滋人, 中村好秀, 野上昭彦, 平尾見三, 松本万夫, 村川裕二, 山根禎一, “カテーターアブレーションの適応と手技に関するガイドライン,” *Circ J* 2012, pp. 3-67, 2012.
- [2] H. Calkins, G. Hindricks, R. Cappato, Y. H. Kim, E. B. Saad, L. Aguinaga, J. G. Akar, V. Badhwar, J. Brugada, J. Camm, P. S. Chen, S. A. Chen, M. K. Chung, J. C. Nielsen, A. B. Curtis, D. W. Davies, J. D. Day, A. d’Avila, N. M. S. de Groot, L. D. Biase, M. Duytschaever, J. R. Edgerton, K. A. Ellenbogen, P. T. Ellinor, S. Ernst, G. Fenelon, E. P. Gerstenfeld, D. E. Haines, M. Haissaguerre, R. H. Helm, E. Hylek, W. M. Jackman, J. Jalife, J. M. Kalman, J. Kautzner, H. Kottkamp, K. H. Kuck, K. Kumagai, R. Lee, T. Lewalter, B. D. Lindsay, L. Macle, M. Mansour, F. E. Marchlinski, G. F. Michaud, H. Nakagawa, A. Natale, S. Nattel, K. Okumura, D. Packer, E. Pokushalov, M. R. Reynolds, P. Sanders, M. Scanavacca, R. Schilling, C. Tondo, H. M. Tsao, A. Verma, D. J. Wilber, and T. Yamane, “2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRs/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation,” *Europace*, vol. 20, pp. e1-e160, 2018.
- [3] H. Calkins, J. Brugada, D. L. Packer, R. Cappato, S. A. Chen, H. J. Crijns, R. J. Damiano Jr, D. W. Davies, D. E. Haines, M. Haissaguerre, Y. Iesaka, W. Jackman, P. Jais, H. Kottkamp, K. H. Kuck, B. D. Lindsay, F. E. Marchlinski, P. M. McCarthy, J. L. Mont, F. Morady, K. Nademanee, A. Natale, C. Pappone, E. Prystowsky, A. Raviele, J. N. Ruskin, and R. J. Shemin, “HRS/EHRA/ECAS Expert Consensus Statement on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation: Recommendations for Personnel, Policy, Procedures and Follow-Up: a report of the Heart Rhythm Society (HRS) Task Force on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation developed in partnership with the European Heart Rhythm Association (EHRA) and the European Cardiac Arrhythmia Society (ECAS); in collaboration with the American College of Cardiology (ACC), American Heart Association (AHA), and the Society of Thoracic Surgeons (STS). Endorsed and approved by the governing bodies of the American College of Cardiology, the American Heart Association, the European Cardiac Arrhythmia Society, the European Heart Rhythm Association, the Society of Thoracic Surgeons, and the Heart Rhythm Society,” *Europace*, vol. 9, pp. 335-379, 2007.
- [4] C. H. Sibata, V. C. Colussi, N. L. Oleinick, and T. J. Kinsella, “Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment,” *Braz J Med Biol Res*, vol. 33, pp. 869-880, 2000.
- [5] A. Ito, S. Hosokawa, S. Miyoshi, K. Soejima, S. Ogawa, and T. Arai, “The myocardial electrical blockade induced by photosensitization reaction,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 57, pp. 488-495, 2010.

- [6] A. Ito, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai, "Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium," *Photochem Photobiol*, vol. 87, pp. 199-207, 2010.
- [7] A. Ito, S. Miyoshi, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, K. Fukuda, and T. Arai, "Myocardial electrical conduction block induced by photosensitization reaction in exposed porcine hearts in vivo," *Lasers Surg Med*, vol. 43, pp. 984-990, 2011.
- [8] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, K. Nakajima, S. Kashimura, Y. Katsumata, T. Nishiyama, N. Nishiyama, T. Arai, and K. Fukuda, "Electrical superior vena cava isolation using photodynamic therapy in a canine model," *Europace*, vol. 18, pp. 294-300, 2016.
- [9] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, K. Fukumoto, M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, T. Arai, S. Ogawa, and K. Fukuda, "Nonthermal cardiac catheter ablation using photodynamic therapy," *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 6, pp.1025-1031, 2013.
- [10] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, Y. Katsumata, T. Nishiyama, N. Nishiyama, Y. Tanimoto, Y. Aizawa, T. Arai, and K. Fukuda, "Optimal conditions for cardiac catheter ablation using photodynamic therapy," *Europace*, vol. 17, pp. 1309-1315, 2015.
- [11] 井上博, 奥村謙, *EPS—臨床心臓電気生理検査*, 東京: 医学書院, 2010, pp. 9-38.
- [12] N. L. Olenick, R. L. Morris, and I. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 1, pp. 1-21, 2002.
- [13] T. A. Simmers, J. M. De Bakker, F. H. Wittkampf, and R. N. Hauer, "Effects of heating on impulse propagation in superfused canine myocardium," *J Am Coll Cardiol*, vol. 25, pp. 1457-1464, 1995.
- [14] T. A. Simmers, J. M. De Bakker, F. H. Wittkampf, and R. N. Hauer, "Effects of heating with radiofrequency power on myocardial impulse conduction: Is radiofrequency ablation exclusively thermally mediated?," *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 7, pp. 243-247, 1996.
- [15] E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, "Detailed in vitro study of the photosensitization reaction of extracellular talaporfin sodium in rat myocardial cells," *Lasers Surg Med*, vol. 45, pp. 660-667, 2013.
- [16] M. J. Niedre, A. J. Secord, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, "In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy," *Cancer Res*, vol. 63, pp. 7986-7994, 2003.
- [17] 広重力, 加藤正道, *小生理学*, 東京: 南山堂, 1995, pp. 17-33, 97-102.

図表

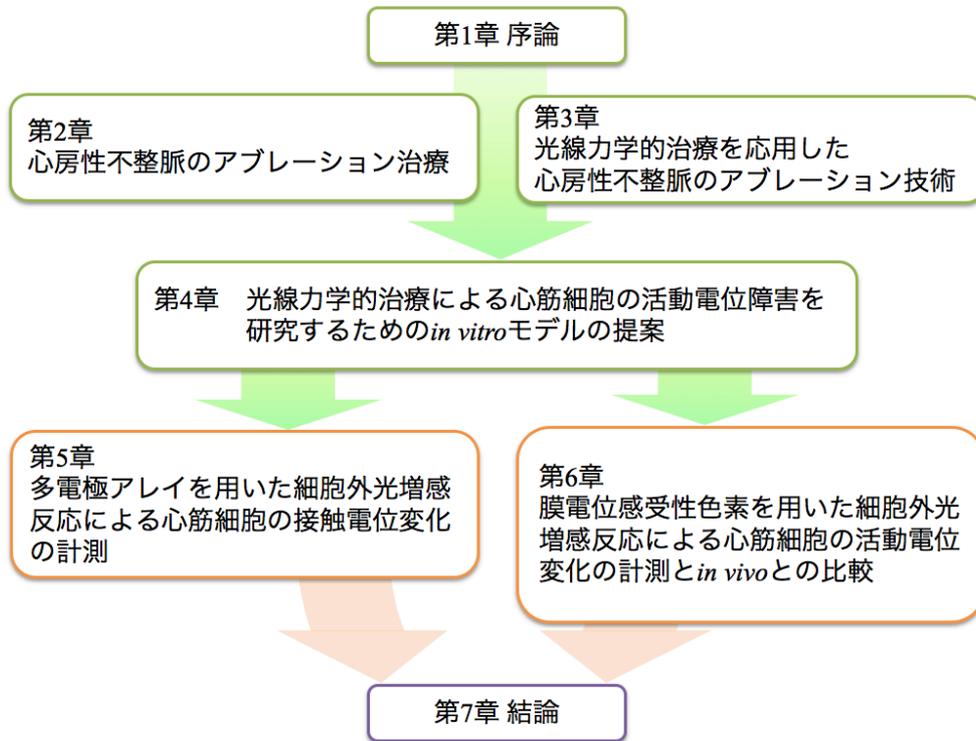


図 1-1 本論文の構成

## 第2章 心房性不整脈のアブレーション治療

### 2.1 緒言

本章では、頻脈性不整脈のうち特に心房性の頻脈性不整脈と、その非薬物治療であるカテテルアブレーションの原理および合併症について述べる。不整脈のアブレーション治療で実施する心筋の電位計測について説明する。

### 2.2 頻脈性不整脈

#### 2.2.1 心臓の刺激伝導系

心臓は左右の心房と心室から構成される臓器であり、心房と心室が交互に収縮・弛緩することで肺循環および大循環系に血液を送り出すポンプとして機能する。この規則的な収縮と弛緩は、図 2-1 に示す心筋内の刺激伝導系に電位興奮が伝搬することで生じる [1, 2]。刺激伝導系の上端は上下大静脈と右心房の接合部付近にある洞房結節である。洞房結節で興奮が生じるとまず心房筋が収縮する。心房筋の次に、心房中隔基底部の右心房側にある房室結節が興奮する。房室結節は約 4×7 mm 寸法の卵円形をした組織で、心房と心室をつなぐ唯一の経路である [3]。房室結節内の興奮はヒス束に伝わり、次いで心室中隔の左右を下方に向かって走行する左脚および右脚へと伝搬する。左脚および右脚よりさらに細かく枝分かれしたプルキンエ線維から、心室筋内に興奮が伝わることで心室の収縮が起きる。心臓の刺激伝導系は単純で疎であり、これを心筋細胞間の電気伝導が補う。心筋の興奮とは心筋細胞の一過的な電位の上昇および下降を指し、これを活動電位と呼ぶ。心筋細胞膜に存在するイオンチャンネルでのイオンの流出入により活動電位は生じている。心筋細胞の活動電位と各イオンの流出入を図 2-2 に示す。細胞外の電位を 0 mV としたとき、心筋細胞内の電位は約 -90 mV になっており、これを静止膜電位と呼ぶ。心筋細胞は静止膜電位が深い。活動電位の発生時、心筋細胞が脱分極すると膜電位は約 30 mV に達する。脱分極の後、カリウムイオンの流出とカルシウムイオンの流入などが平衡し、プラトーと呼ばれる電位の緩やかな減少相が形成されるのが特徴である。心筋細胞の活動電位持続時間は骨格筋細胞よりも長く、300 ms 程度である。心筋細胞は隣り合う心筋細胞とギャップジャンクションを介して結合している。ギャップジャンクションでは隣り合う細胞膜同士が 2-4 nm まで接近しており、コネクソンと呼ばれる直径約 20 Å のタンパク質が最大数百個存在する [1]。コネクソンを通じた隣接細胞へのイオンの移動により、心臓全体に脱分極が瞬時に伝搬する。

#### 2.2.2 頻脈性不整脈の病態と発生機序

刺激伝導系における興奮の伝搬により、心臓が規則的に拍動している状態を洞調律と呼

ぶ。成人の洞調律は 60-100 回/min の脈拍数が正常値であり、これ以外を不整脈と総称する。脈拍数が 100 回/min 以上を頻脈性不整脈、60 回/min 以下を徐脈性不整脈と呼ぶ [4]。頻脈性不整脈は脈拍数でさらに頻拍 (100-250 回/min)、粗動 (250-350 回/min)、細動 (350-回/min) に分類される [5]。これらの病名は成因に関係なく、症状から名付けられている。頻脈性不整脈の中で最も症例数が多いのが心房性の細動、つまり心房細動である。心房細動は持続期間によって名称が 5 つに分かれる。心電図上で初めて確認された心房細動を初発心房細動と呼ぶ。発生開始から 7 日以内に停止するものを発作性心房細動、7 日以上持続するか、持続が 7 日以内であっても人為的な停止措置を必要とするものを持続性心房細動と呼ぶ。持続性心房細動が発症後 1 年以上持続すると長期持続性心房細動と呼び、さらに電氣的・薬理学的な除細動で停止しない状態を永続性 (慢性) 心房細動と呼ぶ [6-8]。発作性心房細動のうち約 25% が 5 年で永続性心房細動となる [9]。心房細動の罹患者数はアメリカで約 223 万人 (1995 年) [10]、日本で約 72 万人 (2005 年) である [11]。アメリカの報告では、50 代の罹患者率が約 0.5% であるのに対し、60 代で約 2%、70 代で約 5%、80 代で約 9% と、罹患者率は加齢と共に増加する [12, 13]。日本においては、高齢化により 2050 年までに罹患者数は 100 万人を超えると予想されている [11]。心房細動自体は致死性の疾患ではないが、脳梗塞を合併症として引き起こす恐れがある。心房細動により心房が痙攣し心房内の血流がよどむと、特に左心耳に栓子が生じる [14]。栓子が頭頸部の血管を閉塞させると脳塞栓、次いで脳梗塞が生じる。脳梗塞のリスクは特に高齢者において増大し [15]、脳梗塞患者のうち心房細動を原因とするのは、50 代で約 1.5% であるのに対して 80 代で約 23.5% という報告がある [16]。

心房細動の発生機序は、心筋内の異所性興奮および局所的なリエントリー (ローター) が原因とされている [14]。異所性興奮は正常な心筋の刺激伝導系以外での興奮の発生である。心房細動を起こす異所性興奮の主な発生場所は、肺静脈と左心房後壁の接合部および上大静脈と右心房の接合部である [14, 17]。そのほか左心房後壁、マーシャル静脈、分界稜、冠状静脈洞、心房中隔などが発生源となる [18]。Haïssaguerre らは肺静脈隔離術により、異所性興奮の起源の 88.8% が肺静脈付近にあることを示した [19]。この報告が 2.3 部で示す不整脈アブレーションの爆発的普及のきっかけとなった。肺静脈と左心房の接合部には、心筋鞘 (myocardial sleeve) と呼ばれる心筋が内側にくさび状に分布している [14, 20, 21]。上大静脈の内部には、奇静脈分岐まで右房より続く心筋組織が分布している [22]。これらの心筋細胞は洞房結節と類似した浅い静止膜電位を持つため、異所性興奮発生の原因となると考えられている [21, 23, 24]。リエントリーは心筋内を一定の回路を持たず、消失せずに巡回し続ける興奮波を指し、一旦心房細動が発生してからの持続に関与すると考えられている [22]。解剖学的構造に不均一性があるほどリエントリーが生じやすいが、心耳や上大静脈、肺静脈などが接合する心房は構造的に不均一な組織であるため、リエントリーが成立しやすい基質となっている [14]。

### 2.3 頻脈性不整脈に対する治療法

頻脈性不整脈のうち心房細動では、基本的に薬物治療が第一選択として用いられる。まず栓子の形成を予防する抗血栓療法を行い、その後状況に応じてレートコントロール、あるいはリズムコントロール治療を行う [14, 25]。レートコントロール治療は、β遮断薬やカルシウム拮抗薬など、異所性興奮の発生を抑制する薬剤を用いて 60-80 回/min を目標とした心拍数の調節を行う治療である [25]。リズムコントロール治療は、主にイオンチャネル作用薬など心臓の興奮頻度を減らして細動を停止に導く薬剤を用いて、心拍の洞調律化と不整脈の再発予防を図る治療である [25]。薬物療法は侵襲性が少なく、通院で行えるため患者への負担は少ないが、不整脈を根治する療法ではないため、長期間の薬剤の服用が必要となるという欠点がある [4]。

1970-80 年代の外科的手術の進歩や、1980 年代の植込み型除細動器 (ICD) およびカテーテルアブレーション治療の開発により、心房性の頻脈性不整脈に対する非薬物治療が著しく重要な治療となった [26]。カテーテルアブレーションは、カテーテルを心臓内に経静脈的に挿入し、外部からエネルギーを与えることで心房細動を発生させる異常な電気信号を遮断する治療である。1980 年代の Kent 束と呼ばれる副伝導路のアブレーション、ヒス束アブレーションなどを経て [27]、1998 年に報告された Haïssaguerre らの左心房肺静脈におけるアブレーションによる心房細動治療により急激に発展した [19]。日本では 1994 年に保険適用が認められたのち、急速に普及した [26]。日本全国の循環器・心臓血管外科を持つ施設のうち約 60%が回答した調査によると、2017 年度のカテーテルアブレーションの実施件数は 7.4 万件であり、2013 年度の 4.7 万件から年々増加している [28]。心房細動のアブレーション治療の目標は、異所性興奮からの電気信号の伝搬の遮断である。異所性興奮の起源の約 9 割が肺静脈付近にあるため (2.2.2 節参照)、左心房から 4 本に分岐する肺静脈の入り口部を囲う肺静脈隔離術がほぼ全例で行われる [27]。心房細動の根治には複数回のアブレーションを適用することが多く、発作性心房細動に対する肺静脈隔離術を 1 回行った場合、再発抑制率は 50-80%、2 回では 80-90%と報告されている [29, 30]。カテーテルアブレーションの利点は、頻脈性不整脈を根治可能な点にある。患者に対する利点が多く、QOL の改善、脳梗塞リスクの低減、心不全リスクの低減、生存率の改善などが見込める [31]。主要なアブレーションデバイスを表 2-1 に示す。近年開発されているカテーテルアブレーション治療とその合併症を、障害原理別に 2.3.1-2.3.3 節にまとめる。

#### 2.3.1 高周波アブレーション

高周波アブレーションは、心筋組織の熱凝固壊死を電気伝導遮断の原理とした治療法である。この治療では、心腔内に挿入したカテーテル電極と、患者の背部に貼った対極板の間に高周波を通電する。組織に流れた電流が組織抵抗で熱エネルギーに変換されることを利用し、心筋組織を熱凝固する。通電条件は周波数 500-750 kHz、電力 20-50W、通電時間

約 60 s である [32, 33]。一般に高周波通電による障害発生領域は組織表面から深さ約 3-5 mm の領域に限定される [34]。治療時の即時的な電気伝導遮断は、カテーテル先端の温度計で計測する温度が  $50\pm 8^{\circ}\text{C}$  のときに達成されると報告されている [35]。熱凝固壊死した心筋組織は、治療後数週間経つと瘢痕化し絶縁層となるため、永続的な電気伝導遮断が実現される。永続的な電気伝導遮断はカテーテル先端温度が  $62\pm 15^{\circ}\text{C}$  のときに達成されると報告されている [35]。

アブレーションでの心筋壊死領域の作成箇所 (アブレーションライン) の決定は、術前および術中の電気生理学的検査に基づいて行われる (2.4 部参照)。カテーテルアブレーションが登場した当初は、カテーテル先端にキャップ状の長さ 4-8 mm の電極がついたアブレーションカテーテルを用いて、点状の障害領域を作成し、これを少しずつ繋げて遮断線にする point-to-point アブレーションが主流であった。Point-to-point アブレーションでは、一ヶ所 60 s で直径 3-5 mm の凝固領域を作るため時間がかかるうえ、ライン形成に術者のスキルが影響しやすいという課題がある。また、過度な温度制御を抑制する目的で先端から生理食塩水を注入できるイリゲーションカテーテルも登場している。高周波通電中に 17-30 mL/min の生理食塩水を注入するため [36]、総注入量は 1-1.5 L となり、患者への侵襲が懸念される [37]。

高周波カテーテルアブレーションの合併症は主に治療時の組織の過加熱により生じる [38]。2000-2010 年に実施された 93,801 症例における合併症の発生率は総計 6.29% であった [39]。カテーテル電極に付着した血液が熱により凝固して血栓が生じると、無症候性大脳塞栓症 (2-15%)、脳卒中 (0-2%) や、冠状静脈狭窄/塞栓 (<0.1%) が発生する。また、左心房の後方に位置する食道や横隔神経まで熱凝固による障害が達すると、食道瘻 (0.02-0.11%) や横隔神経麻痺 (0-0.4%) が生じる。心膜腔に血液が貯まる心タンポナーデ (0.2-5%) は、過度な心筋加熱による水蒸気爆発 (pop 現象) により心筋に亀裂が入り生じる。合併症の発生率は他のインターベンション治療と比較して高くはないが、第一選択の薬物治療により維持診療が可能な疾患としては問題となる。

### 2.3.2 クライオアブレーション

クライオアブレーションはカテーテル先端の二重バルーン内に亜酸化窒素ガスを灌流することでバルーンを  $-40$  から  $-60^{\circ}\text{C}$  に冷却し、肺静脈入口部に接触させ、凍結融解壊死により電気伝導遮断を得る肺静脈隔離術専用の方式である [40]。Point-to-point デバイスと比較し、術時間が約半分に短縮される [41]。2012-2015 年にかけて実施された大規模臨床治験 (FIRE and ICE trial) では、冷却機能付き高周波カテーテルアブレーションとクライオアブレーションの治療効果および安全性が評価され、クライオアブレーションは高周波アブレーションに劣らない治療を行えることが報告されている [42]。クライオアブレーションでは、組織の凍結融解により治療後数時間で細胞の破壊が生じる。治療から約 2 週間後には組織が

繊維質に置換し、永続的に電気伝導が遮断される [43]。クライオアブレーションは熱を使用しないため、急激な組織加温が原因の水蒸気爆発や血栓形成のリスクは少ないが、左心房に近接する横隔神経におけるリスクは 8.1-13.5%と高い [44, 45]。

### 2.3.3 その他のアブレーション

クライオアブレーションと同様、バルーンを用いた肺静脈隔離術専用の環状アブレーションデバイスとして、レーザーバルーン (HeartLight<sup>®</sup>, CardioFocus, マールボロ, アメリカ) や高周波加熱ホットバルーン (SATAKE Hot balloon<sup>®</sup>, 東レ, 東京) がある。レーザーバルーンは水で満たされたバルーン内から波長 980 nm、5.5-12 W のレーザー光を心筋に照射し、心筋組織の光吸収による発熱および熱伝導により組織を熱凝固壊死させる [46, 47]。高周波加熱ホットバルーンは、バルーン内のコイル上の電極と患者背部に貼り付けられた対極板との間に 1.8 MHz、150 W の高周波電流を通電することによりバルーン内の充填液を加熱し、バルーンと接触している心筋組織を熱伝導で熱凝固壊死させる [48]。これらバルーンを用いたアブレーションデバイスは肺静脈隔離術専用で、形状の特性上、術中に肺静脈の血流閉止を伴うという課題がある。

心房細動に対する新しいアブレーション技術として、Pulsed electric fields を用いたアブレーションがある [49]。このアブレーション技術は、エレクトロポレーションの機構で心筋組織に対して選択的な細胞壊死を起こす方法で、現在臨床試験が進められている [49]。

## 2.4 カテーテルアブレーションにおけるリアルタイムの心筋活動電位計測

### 2.4.1 心内心電図

カテーテルアブレーション実施時には心筋電位をリアルタイムで測定し、術前や術中の電位モニタリングおよび治療達成の判定を行う。心内電位記録は異常興奮伝搬により発生する不整脈の研究の過程で発展してきた [50]。心筋での電位を直接計測する方法として、電極カテーテルを用いた心内心電図がある。侵襲的な検査ではあるが、不整脈診療および治療に広く用いられている。心内心電図測定は単に電位測定を行うだけでなく、電位を誘発するため刺激の付与が基本的に行われる。これは刺激により、伝導方向やアブレーションの完成などを確認する意味がある。カテーテルアブレーションの普及により、アブレーションする部位の解剖学的な特徴に合わせた種々のカテーテルが開発された。基本的なカテーテルは通常 5-7 Fr の太さで、2-10 極の単極あるいは双極電極対がついている。単極電極の場合、カテーテル先端とカテーテル近位部にある参照電極との間の電位差が測定される。一般に計測電極の間隔は 5-10 mm である。参照電極を生体内電気活動が発生しない場所に留置するため、電極直下の心筋活動電位を計測できるという利点がある。双極電極の場合、一般に 2 mm 間隔の 2 つの電極間の差分が測定される。各双極電極間の間隔は一般に 5-10 mm である。単極電極と比較しノイズが少なく安定した計測が行える。また、電気信号

の到達方向がわかるという利点がある。

#### 2.4.2 3次元マッピング法

従来、術者は電位情報と2次元X線透視画より心内のカテーテルの位置を把握し、治療を行ってきた。これらの情報に、計測した3次元解剖学的情報を加味して表示する方法が、3次元マッピング法である [50, 51]。主要な装置として CARTO<sup>®</sup> system (Biosense Webster, アーバイン, アメリカ) と EnSite<sup>®</sup> (St. Jude Medical, セントポール, アメリカ) がある。CARTO<sup>®</sup> system はカテーテル電極による心内心電図と、磁気を利用して得られるカテーテルの位置から図 2-3 (a) に示すような興奮伝搬の3次元電位マップを作り出す。このシステムでは、微弱な磁場を発生する3つのコイルが内蔵された位置検出用装置を、患者の背部に設置する。電極およびアブレーションカテーテルの先端に内蔵された磁気センサーがこの磁場を感知することで、3つのコイルそれぞれからの距離が計測され、3点測定の原理でカテーテルの位置が検出できる。3次元電位マップを作成するためには、電極カテーテルで心腔内の数十ヶ所の電位を計測する必要がある。定常的に生じていない発作性の電位検出には時間を要するし、不正確である [50, 51]。EnSite<sup>®</sup>は非接触のマッピング法で、図 2-3 (b) に示す専用の64極バスケットカテーテルを用いて一心拍で3,360ヶ所もの仮想電位を同時に記録することが可能である [52]。心腔内にバルーンを入れると、体表面心電図の電位をリファレンスとして心内膜面の遠隔電場電位が記録される。得られた電位情報からラプラス逆変換より仮想単極電位が作成されることで図 2-3 (b) に示すような3次元電位マップができる [52]。1心拍周期でデータ採取は終了するが、計算には時間がかかる。透視を用いずに心腔の形状と電位情報が得られるが、カテーテル電極で計測した電位と異なる場合があるなど不安定な要素も含む [50, 51]。

### 2.5 結言

本章では、心房性不整脈に対する現行の非薬物治療であるカテーテルアブレーションについて述べ、現行手法の課題について述べた。カテーテルアブレーションは心筋組織を壊死させることで不整脈の原因である異常な電気信号を遮断する治療である。カテーテルアブレーションは心房性不整脈に対する有効な根治療法であるが、心筋組織の過加熱や過冷却に伴う合併症の発生があり、これは薬物治療による保存的な治療ができる疾患としては問題である。

## 参考文献

- [1] 大谷修, 堀尾嘉幸, カラー図解 人体の正常構造と機能II 循環器, 東京: 日本医事新報社, 2002, pp. 14-15.
- [2] J. T. Hansen and B. M. Koeppen, ネット解剖生理学アトラス, 相磯貞和, 渡辺修一訳, 東京: 南山堂, 2006, pp. 66-87.
- [3] D. Dubin, イオン・アドベンチャー, 東京: 文光堂, 2008, pp. 25-54.
- [4] 井上博, 山下武志, 不整脈クリニカルプラクティス 不整脈専門医をめざして, 東京: 南江堂, 2009, pp. 9-11.
- [5] 山下武志, 心筋細胞の電気生理学—イオンチャンネルから, 心電図, 不整脈へ—, 東京: メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2011, pp. 13-15.
- [6] 小川聡, 相澤義房, 新博次, 井上博, 奥村謙, 鎌倉史郎, 熊谷浩一郎, 是恒之宏, 杉薫, 三田村秀雄, 矢坂正弘, 山下武志, 大江透, 児玉逸男, 比江嶋一昌, 矢野捷介, “心房細動治療 (薬物) ガイドライン (2008年改訂版),” *Jpn Circ J*, vol. 72 (Suppl. IV), pp. 1581-1638, 2008.
- [7] 小林義典, 新田隆, 不整脈診療レジデントマニュアル, 東京: 医学書院, 2012, pp. 324-334.
- [8] M. M. Gallagher and A. J. Camm, “Classification of atrial fibrillation,” *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 20, pp. 1603-1605, 1997.
- [9] C. R. Kerr, K. H. Humphries, M. Talajic, G. J. Klein, S. J. Connolly, M. Green, J. Boone, R. Sheldon, P. Dorian, and D. Newman, “Progression to chronic atrial fibrillation after the initial diagnosis of paroxysmal atrial fibrillation: results from the Canadian Registry of Atrial Fibrillation,” *Am Heart J*, vol. 149, pp. 489-496, 2005.
- [10] W. M. Feinberg, J. L. Blackshear, A. Laupacis, R. Kronmal, and R. G. Hart, “Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation,” *Arch Intern Med*, vol. 155, pp. 469-473, 1995.
- [11] H. Inoue, A. Fujiki, H. Origasa, S. Ogawa, K. Okumura, I. Kubota, Y. Aizawa, T. Yamashita, H. Atarashi, M. Horie, T. Ohe, Y. Doi, A. Shimizu, A. Chishaki, I. Kodama, and S. Kamakura, “Prevalence of atrial fibrillation in the general population of Japan: An analysis based on periodic health examination,” *Int J Cardiol*, vol. 137, pp. 102-107, 2009.
- [12] E. J. Benjamin, D. Levy, S. M. Vaziri, R. B. D’Agostino, A. J. Belanger, and P. A. Wolf, “Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study,” *Jama*, vol. 271, pp. 840-844, 1994.

- [13] W. B. Kannel, P. A. Wolf, E. J. Benjamin, and D. Levy, "Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates," *Am J Cardiol*, vol. 82, pp. 2N-9N, 1998.
- [14] 山下武志, *心房細動 アップストリーム治療とダウンストリーム治療*, 東京: 中山書店, 2007, pp. 36-58, 118-125.
- [15] 小川聡, *不整脈テキスト 発生機序から見た治療のすべて*, 東京: 西村書店, 2008, pp. 2-31.
- [16] V. Fuster, L. E. Rydén, D. S. Cannom, H. J. Crijns, A. B. Curtis, K. A. Ellenbogen, J. L. Halperin, J. L. Heuzey, G. N. Kay, J. E. Lowe, S. B. Olsson, E. N. Prystowsky, J. L. Tamargo, and S. Wann, "ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines and the European Society of Cardiology Committee for practice guidelines," *J Am Coll Cardiol*, vol. 48, pp. e149-e246, 2006.
- [17] K. Kumagai, C. Khrestian, and A. L. Waldo, "Simultaneous multisite mapping studies during induced atrial fibrillation in the sterile pericarditis model," *Circulation*, vol. 95, pp. 511-521, 1997.
- [18] W. S. Lin, C. T. Tai, M. H. Hsieh, C. F. Tsai, Y. K. Lin, H. M. Tsao, J. L. Huang, W. C. Yu, S. P. Yang, Y. A. Ding, M. S. Chang, and S. A. Chen, "Catheter ablation of paroxysmal atrial fibrillation initiated by non-pulmonary vein ectopy," *Circulation*, vol. 107, pp. 3176-3183, 2003.
- [19] M. Haissaguerre, P. Jaïs, D. C. Shah, A. Takahashi, M. Hocini, G. Quiniou, S. Garrigue, A. L. Mouroux, P. L. Métayer, and J. Clémenty, "Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins," *N Engl J Med*, vol. 339, pp. 659-666, 1998.
- [20] H. Nathan and M. Eliakim, "The junction between the left atrium and the pulmonary veins," *Circulation*, vol. 34, pp. 412-422, 1966.
- [21] T. Saito, K. Waki, and A. E. Becker, "Left atrial myocardial extension onto pulmonary veins in humans," *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 11, pp. 888-894 2000.
- [22] 青沼和隆, 松崎益徳, *不整脈を診る・直す 非薬物治療のすべて*, 東京: 文光堂, 2009, pp. 180-199.
- [23] S. A. Chen, M. H. Hsieh, C. T. Tai, C. F. Tsai, V. S. Prakash, W. C. Yu, T. L. Hsu, Y. A. Ding, and M. S. Chang, "Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from pulmonary veins," *Circulation*, vol. 100, pp. 1879-1886, 1999.
- [24] A. Perez-Lugones, J. T. McMahon, N. B. Ratliff, W. I. Saliba, R. A. Schweikert, N. F. Marrouche, E. B. Saad, J. L. Navia, P. M. McCarthy, P. Tchou, A. M. Gillinov, and A. Natale,

- “Evidence of specialized conduction cells in human pulmonary veins of patients with atrial fibrillation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 14, pp. 803-809, 2003.
- [25] 井上博, 新博次, 奥村謙, 鎌倉史郎, 熊谷浩一郎, 是恒之宏, 杉薫, 三田村秀雄, 矢坂正弘, 山下武志, “心房細動治療 (薬物) ガイドライン (2013年改訂版),” *JSC 2013*, pp. 1-60, 2013.
- [26] R. Rosso, A. Halkin, Y. Michowitz, B. Belhassen, A. Glick, and S. Viskin, “Radiofrequency ablation of paroxysmal atrial fibrillation with the new irrigated multipolar nMARQ ablation catheter: Verification of intracardiac signals with a second circular mapping catheter,” *Heart Rhythm*, vol. 11, pp. 559-565, 2014.
- [27] 奥村謙, 相澤義房, 相原直彦, 青沼和隆, 沖重薫, 熊谷浩一郎, 庄田守男, 住友直方, 高橋淳, 内藤滋人, 中村好秀, 野上昭彦, 平尾見三, 松本万夫, 村川裕二, 山根禎一, “カテーテルアブレーションの適応と手技に関するガイドライン,” *Circ J 2012*, pp. 3-67, 2012.
- [28] 循環器疾患診療実態調査 (2017年度実施・公表) 報告書 Web版, [http://www.j-circ.or.jp/jittai\\_chosa/jittai\\_chosa2016web.pdf](http://www.j-circ.or.jp/jittai_chosa/jittai_chosa2016web.pdf) (2018/11/23).
- [29] R. Cappato, H. Calkins, S. A. Chen, W. Davies, Y. Iesaka, J. Kalman, Y. H. Kim, D. Packer, and A. Skanes, “Worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation,” *Circulation*, vol. 111, pp. 1100-1105, 2005.
- [30] F. Ouyang, R. Tilz, J. Chun, B. Schmidt, E. Wissner, T. Xerm, K. Neven, B. Köktürk, M. Konstantinidou, A. Metzner, A. Fuernkranz, and K. H. Kuck, “Long term results of catheter ablation in paroxysmal atrial fibrillation; Lessons from 5 year follow-up,” *Circulation*, vol. 122, pp. 2368-2377, 2010.
- [31] H. Calkins, K. H. Kuck, R. Cappato, J. Brugada, A. J. Camm, S. A. Chen, H. J. G. Crijns, R. J. Damiano Jr., W. Davies, J. DiMarco, J. Edgerton, K. Ellenbogen, M. D. Ezekowitz, D. E. Haines, M. Haissaguerre, G. Hindricks, Y. Iesaka, W. Jackman, J. Jalife, P. Jais, J. Kalman, D. Keane, Y. H. Kim, P. Kirchhof, G. Klein, H. Kottkamp, K. Kumagai, B. D. Lindsay, M. Mansour, F. E. Marchlinski, P. M. McCarthy, J. L. Mont, F. Morady, K. Nademanee, H. Nakagawa, A. Natale, S. Nattel, D. L. Packer, C. Pappone, E. Prystowsky, A. Raviele, V. Reddy, J. N. Ruskin, R. J. Shemin, H. M. Tsao, and D. Wilber, “2012 HRS/EHRA/ECAS expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation: recommendations for patient selection, procedural techniques, patient management and follow-up, definitions, endpoints, and research trial design,” *Europace*, vol. 14, pp. 528-606, 2012.
- [32] M. D. Lesh, G. F. Van Hare, L. M. Epstein, A. P. Fitzpatrick, M. M. Scheinman, R. J. Lee, M. A. Kwasman, H. R. Grogan, and J. C. Griffin, “Radiofrequency catheter ablation of atrial arrhythmias: Results and mechanisms,” *Circulation*, vol. 89, pp. 1074-1089, 1994.

- [33] Y. Ni, S. Mulier, Y. Miao, L. Michel, and G. Marchal, "A review of the general aspects of radiofrequency ablation," *Abdom Imaging*, vol. 30, pp. 381-400, 2005.
- [34] S. Nath, J. O. H. N. DiMARCO, and D. E. Haines, "Basic aspects of radiofrequency catheter ablation," *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 5, pp. 863-876, 1994
- [35] J. J. Langberg, H. Calkins, R. El-Atassi, M. Borganeli, A. Leon, S. J. Kalbfleisch, and F. Morady, "Temperature monitoring during radiofrequency catheter ablation of accessory pathways," *Circulation*, vol. 86, pp. 1469-1474, 1992.
- [36] Boston Scientific, BSC OI アブレーションカテーテル添付文書, 2018年2月 (第2版).
- [37] E. M. Aliot, W. G. Stevenson, J. M. Almendral-Garrote, F. Bogun, C. H. Calkins, E. Delacretaz, P. D. Bella, G. Hindricks, P. Jaïs, M. E. Josephson, J. Kautzner, G. N. Kay, K. H. Kuck, B. B. Lerman, F. Marchlinski, V. Reddy, M. J. Schalij, R. Schilling, K. Soejima, and D. Wilber, "EHRA/HRS expert consensus on catheter ablation of ventricular arrhythmias: Develop in a partnership with the European Heart Rhythm Association (EHRA), a registered branch of the European Society of Cardiology (ESC), and the Heart Rhythm Society (HRS); in collaboration with the American College of Cardiology (ACC) and the American Heart Association (AHA)," *Europace*, vol. 11, pp. 771-817, 2009.
- [38] H. Calkins, J. Brugada, D. L. Packer, R. Cappato, S. A. Chen, H. J. Crijns, R. J. Damiano Jr, D. W. Davies, D. E. Haines, M. Haissaguerre, Y. Iesaka, W. Jackman, P. Jais, H. Kottkamp, K. H. Kuck, B. D. Lindsay, F. E. Marchlinski, P. M. McCarthy, J. L. Mont, F. Morady, K. Nademanee, A. Natale, C. Pappone, E. Prystowsky, A. Raviele, J. N. Ruskin, and R. J. Shemin, "HRS/EHRA/ECAS Expert Consensus Statement on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation: Recommendations for Personnel, Policy, Procedures and Follow-Up: a report of the Heart Rhythm Society (HRS) Task Force on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation developed in partnership with the European Heart Rhythm Association (EHRA) and the European Cardiac Arrhythmia Society (ECAS); in collaboration with the American College of Cardiology (ACC), American Heart Association (AHA), and the Society of Thoracic Surgeons (STS). Endorsed and approved by the governing bodies of the American College of Cardiology, the American Heart Association, the European Cardiac Arrhythmia Society, the European Heart Rhythm Association, the Society of Thoracic Surgeons, and the Heart Rhythm Society," *Europace*, vol. 9, pp.335-379, 2007.
- [39] H. Calkins, G. Hindricks, R. Cappato, Y. H. Kim, E. B. Saad, L. Aguinaga, J. G. Akar, V. Badhwar, J. Brugada, J. Camm, P. S. Chen, S. A. Chen, M. K. Chung, J. C. Nielsen, A. B. Curtis, D. W. Davies, J. D. Day, A. d'Avila, N. M. S. de Groot, L. D. Biase, M. Duytschaever, J. R. Edgerton, K. A. Ellenbogen, P. T. Ellinor, S. Ernst, G. Fenelon, E. P. Gerstenfeld, D. E. Haines, M. Haissaguerre, R. H. Helm, E. Hylek, W. M. Jackman, J. Jalife, J. M. Kalman, J.

- Kautzner, H. Kottkamp, K. H. Kuck, K. Kumagai, R. Lee, T. Lewalter, B. D. Lindsay, L. Macle, M. Mansour, F. E. Marchlinski, G. F. Michaud, H. Nakagawa, A. Natale, S. Nattel, K. Okumura, D. Packer, E. Pokushalov, M. R. Reynolds, P. Sanders, M. Scanavacca, R. Schilling, C. Tondo, H. M. Tsao, A. Verma, D. J. Wilber, and T. Yamane, “2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation,” *Europace*, vol. 20, pp. e1-e160, 2018.
- [40] G. B. Chierchia, A. Sorgente, A. Sarkozy, C. de Asmundis, and P. Brugada, “The use of cryoballoon ablation in atrial fibrillation: simplifying pulmonary vein isolation?,” *J Atr Fibrillation*, vol. 3, pp. 33-43, 2010.
- [41] P. Kojodjojo, M. D. O’Neill, P. B. Lim, L. Malcolm-Lawes, Z. I. Whinnett, T. V. Salukhe, N. W. Linton, D. Lefroy, A. Mason, I. Wright, N. S. Peters, P. Kanagaratnam, and D. W. Davies, “Pulmonary venous isolation by antral ablation with a large cryoballoon for treatment of paroxysmal and persistent atrial fibrillation: medium-term outcomes and non-randomised comparison with pulmonary venous isolation by radiofrequency ablation,” *Heart*, vol. 96, pp. 1379-1384, 2010.
- [42] K. H. Kuck, J. Brugada, A. Fürnkranz, A. Metzner, F. Ouyang, K. J. Chun, A. Elvan, T. Arentz, K. Bestehorn, S. J. Pocock, J. P. Albenque, and C. Tondo, “Cryoballoon or radiofrequency ablation for paroxysmal atrial fibrillation,” *N Engl J Med*, vol. 374, pp. 2235-2245, 2016.
- [43] D. L. Lustgarten, D. Keane, and J. Ruskin, “Cryothermal ablation: mechanism of tissue injury and current experience in the treatment of tachyarrhythmias,” *Prog Cardiovasc Dis*, vol. 41, pp. 481-498, 1999.
- [44] G. Mugnai, G. Irfan, C. de Asmundis, G. Ciconte, Y. Saitoh, B. Hunuk, V. Velagic, E. Stroker, P. Rossi, L. Capulzini, P. Brugada, and G. B. Chierchia, “Complication in the setting of percutaneous atrial fibrillation ablation using radiofrequency and cryoballoon techniques: A single-center study in a large cohort of patients,” *Int J Cardiol*, vol. 196, pp. 42-49, 2015.
- [45] D. L. Packer, R. C. Kowal, K. R. Wheelan, J. M. Irwin, J. Champagne, P. G. Guerra, M. Dubuc, V. Reddy, L. Nelson, R. G. Holcomb, J. W. Lehmann, and J. N. Ruskin, “Cryoballoon ablation of pulmonary veins for paroxysmal atrial fibrillation: first results of the North American Arctic Front (STOP AF) pivotal trial,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 61, pp. 1713-1723, 2013.
- [46] S. R. Dukkipati, P. Neuzil, J. Skoda, J. Petru, A. d’Avila, S. K. Doshi, and V. Y. Reddy, “Visual balloon-guided point-by-point ablation: Reliable, reproducible, and persistent pulmonary vein isolation,” *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 3, pp. 266-273, 2010.
- [47] 独立行政法人医薬品医療機器総合機構, HeartLight 内視鏡アブレーションシステム 審査報告書, 2017/6/1.

- [48] K. Tanaka, S. Satake, S. Saito, S. Takahashi, Y. Hiroe, Y. Miyashita, S. Tanaka, M. Tanaka, and Y. Watanabe, "A new radiofrequency thermal balloon catheter for pulmonary vein isolation," *J Am Coll Cardiol*, vol. 38, pp. 2079-2086, 2001.
- [49] V. Y. Reddy, J. Koruth, P. Jais, J. Petru, F. Timko, I. Skalsky, R. Hebel, L. Labrousse, L. Barandon, S. Kralovec, M. Funosako, B. B. Mannuva, L. Sediva, and P. Neuzil, "Ablation of atrial fibrillation with pulsed electric fields," *J Am Coll Cardiol EP*, vol. 4, pp. 987-995, 2018.
- [50] 井上博, 奥村謙, *EPS—臨床心臓電気生理検査*, 東京: 医学書院, 2010, pp. 9-38.
- [51] 小林義典, 野上昭彦, *心内局所電位 アブレーションに役立つ特殊電位観察法*, 東京: 南江堂, 2014, pp. 74-105.
- [52] P. A. Friedman, "Novel mapping techniques for cardiac electrophysiology," *Heart*, vol. 87, pp. 575-582, 2002.

## 図表

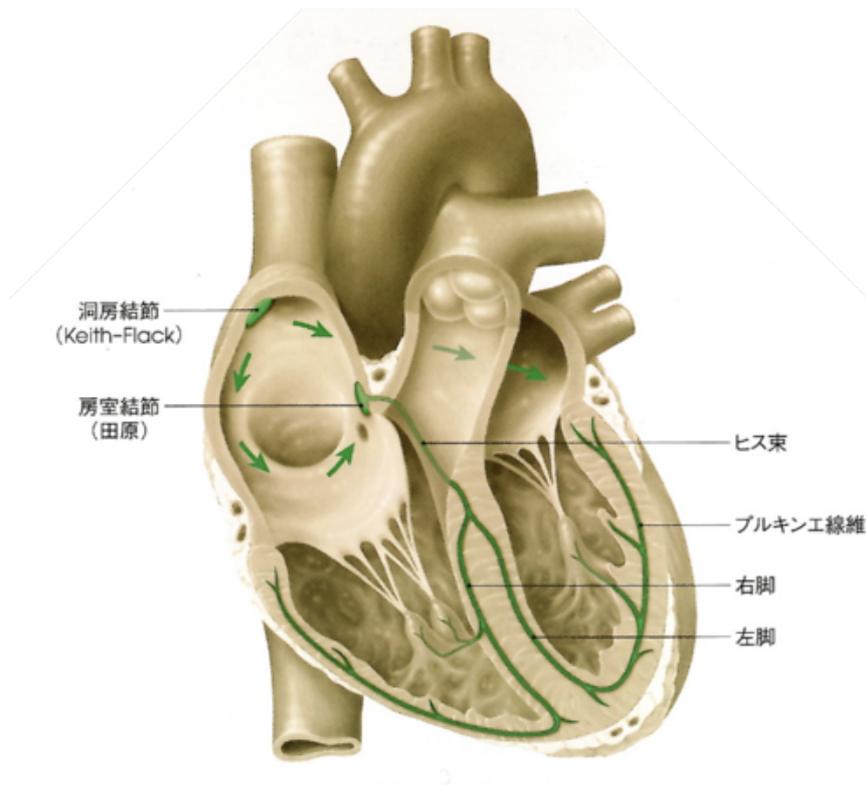


図2-1 心臓の刺激伝導系 (文献 [1] 大谷修, 堀尾嘉幸, カラー図解 人体の正常構造と機能II 循環器, (坂井建雄, 河原克雅編), 第1版, 東京: 日本医事新報社, 2002, p. 15 より。日本医事新報社より許可を得て引用)

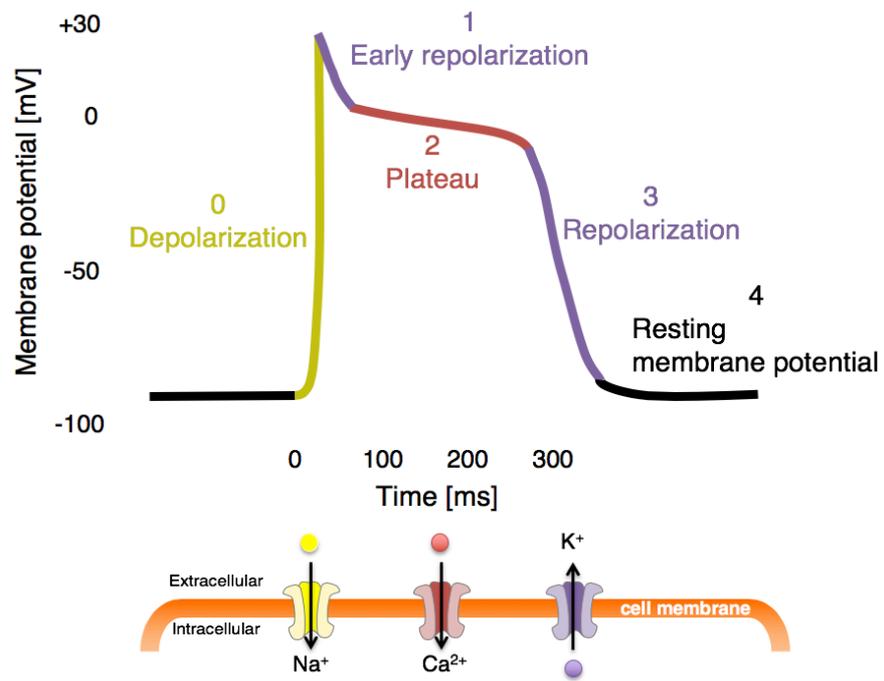


図 2-2 心筋細胞の活動電位とイオンの流出入 [3]

表 2-1 主なアブレーションデバイス

Catheter type	Image	Name (Company)	Mechanism	Size	Input power
Point-to-point		サーモクール スマートタッチ <sup>®</sup> SF (Biosense Webster)	Radiofrequency Irrigation	8 Fr	~50 W
Balloon		Actic Front Advance <sup>™</sup> (Medtronic)	Cryoablation	10.5 Fr	—
Balloon		HeartLight <sup>®</sup> (Cardiofocus)	Laser	12 Fr	~12 W
Balloon		SATAKE Hot balloon <sup>®</sup> (Toray)	Hotballoon	13 Fr	150 W

※画像の引用元

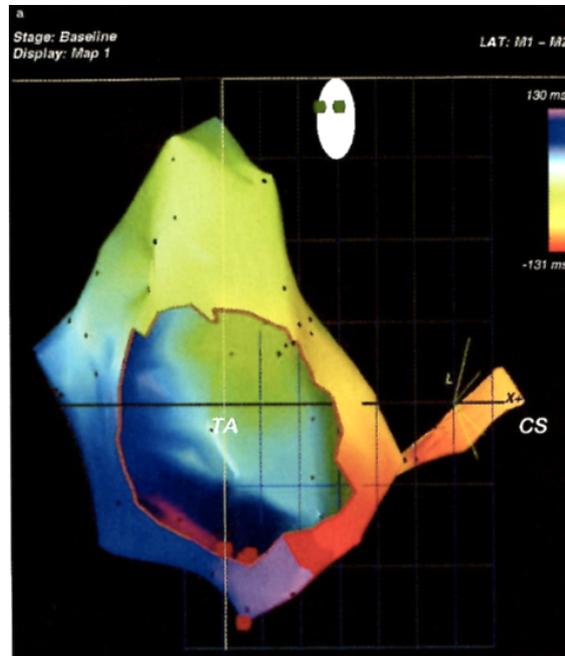
・サーモクールスマートタッチ<sup>®</sup>SF : [https://www.jnj.co.jp/jjmkk/doctor/products/biosense/biosense\\_pro.html](https://www.jnj.co.jp/jjmkk/doctor/products/biosense/biosense_pro.html) (2019/01/10 閲覧) より。ジョンソン・エンド・ジョンソンより許可を得て引用。

・Actic Front Advance<sup>™</sup> : 日本メドトロニックより許可を得て引用。

・HeartLight<sup>®</sup> : <https://www.jll.co.jp/information/2014/1219.html> (2019/01/10 閲覧) より。日本ライフラインより許可を得て引用。

・SATAKE Hot balloon<sup>®</sup> : <https://www.toray.com/satakehotballoon/ja/medical/index.html> (2019/01/10 閲覧) より。東レより許可を得て引用。

(a)



(b)

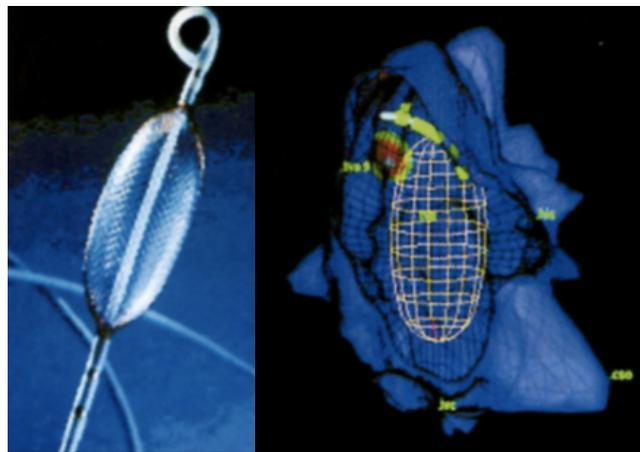


図 2-3 3次元マッピングシステム

(a) CARTO システムの通常型心房粗動の3次元電位マッピング画像 (文献 [50] 福本耕太郎, 副島京子: 三次元マッピング法. *EPS—臨床心臓電気生理検査*, (井上博, 奥村謙編), 第2版, 東京: 医学書院, 2010, p. 31 より。医学書院より許可を得て転載)

(b) Ensite array プローブと心房頻拍の3次元電位マッピング画像 (文献 [52] P. A. Friedman, *Heart*, **87**, 580, 2002 より。BMJ Publishing Group より許可を得て引用)

## 第3章 光線力学的治療を応用した心房性不整脈のアブレーション技術

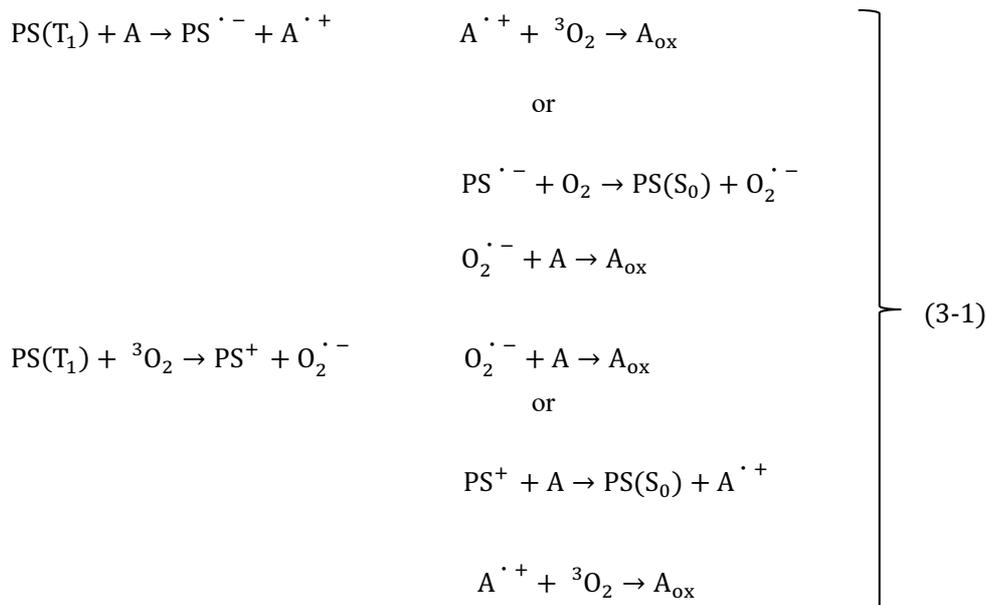
### 3.1 緒言

本章では、光線力学的治療に用いられる光増感反応の原理について説明する。現在我が国で認可を受けている光感受性薬剤のうち、特に本研究で用いているタラポルフィンナトリウムに関してその特徴を述べる。光増感反応の主要な応用である、悪性腫瘍治療の原理を説明する。また本研究の主たる対象である、近年提案されている心房性不整脈のアブレーションに対する応用について解説する。

### 3.2 光増感反応

#### 3.2.1 光増感反応の原理

光増感反応は、光・光感受性薬剤・酸素による光化学反応である。光増感反応のエネルギー機構を図 3-1 に示す [1, 2]。基底状態 ( $S_0$ ) の光感受性薬剤が、その吸収帯波長の光を吸収すると励起一重項状態 ( $S_1$ ) となる。励起一重項状態の光感受性薬剤は蛍光を発して基底状態に戻るか、項間交差により励起三重項状態 ( $T_1$ ) に移行する。励起三重項状態の寿命は  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  s と長いため [3, 4]、多くの励起三重項状態分子が周囲の分子に作用する。生体内や空気中など酸素の多い環境で光増感反応が生じるとき、励起三重項状態の光感受性薬剤分子は酸素と反応し、Type I および Type II 反応を生じる。励起三重項状態の光感受性薬剤 PS ( $T_1$ ) と隣接分子 A あるいは酸素分子との電子交換より生じるラジカル反応または酸化還元反応が Type I 反応であり、以下の式 (3-1) に示す複数の反応経路がある [5, 6]。



いずれの Type I 反応経路においても、最終的に隣接分子 A の酸化物が生成される。Type II 反応では、励起三重項状態の光感受性薬剤が周囲環境に存在する酸素分子にエネルギーを移乗する。式 (3-2) に示すように三重項基底状態 ( $^3\text{O}_2$ ) にあった酸素分子はエネルギーを吸収して励起一重項状態 ( $^1\text{O}_2$ ) の活性酸素種となり [2, 3]、これが生体内で起これば周囲の生体組織に酸化障害を与える。



Type I, II 反応のうち、どちらの反応が生体組織障害に支配的になるかは、周囲の環境や光感受性薬剤の特性から決まる。Type I 反応は生体組織と直接反応する機構であるため、光感受性薬剤と隣接分子が 10 Å 以内に接近している必要がある。生体内でこの距離を実現できるような高薬剤濃度を実現することは難しい [2, 3]。一方 Type II 反応は、生体内の溶存酸素が励起三重項状態の光感受性薬剤とその寿命 ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$  s) 内に衝突すると生じる。よって生体内のような酸素分圧が高い環境下では、Type II 反応が支配的となる [3]。Type II 反応で生成する一重項酸素の寿命は液中で 10-50 ns であり、反応は発生した一重項酸素の周囲、半径 10-20 nm の領域に限定される [7, 8]。つまり光感受性薬剤の局在位置が、光増感反応による障害部位を示すことになる。悪性腫瘍細胞/組織に対する光線力学的治療における光感受性薬剤の主な局在位置は、ミトコンドリアやライソソームなどの細胞内小器官、あるいは脂質二重膜である [9-11]。これらの薬剤の局在位置によって細胞壊死の発生機構が異なっている。

### 3.2.2 我が国で認可を受けている光感受性薬剤

光感受性薬剤は葉緑素やヘモグロビンと同じポルフィリンを基本骨格とした化合物である [3]。現在我が国で光線力学的治療用に認可を受けている光感受性薬剤 (物質名) は、ポルフィマーナトリウム (Pfizer, ニューヨーク, アメリカ)、タラポルフィンナトリウム (Meiji Seika ファルマ, 東京)、ベルテポルフィン (Novartis, バール, スイス) の3種類である。各薬剤の構造式を図 3-2 に示す。第一世代光感受性薬剤のポルフィマーナトリウムは、ブタ血液由来のヘマトポルフィリン二塩酸塩を原料とし合成されたポルフィリンの多量体である。ポルフィマーナトリウムの Q 帯吸収ピーク波長は 630 nm にあり、この波長でのモル吸収係数は  $1.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、一重項酸素の量子収率は 0.25 である [12]。励起には波長 630 nm のエキシマダイレーザーを用いる。ポルフィマーナトリウムは親油性の薬剤であり、細胞内で主にミトコンドリアに集積する [13]。ポルフィマーナトリウムは体内からの排泄が遅いため、皮膚に残留した薬剤による光毒性 (光線過敏症) の発生を予防するために、4-6 weeks の長期の厳重な遮光期間が設けられている [14]。ポルフィマーナトリウムは商品名ポルフィリンとして、早期肺癌、表在型食道癌、表在型早期胃癌、子宮頸部初期癌および異形成、の治療に認可されている [14]。

第二世代光感受性薬剤であるタラポルフィンナトリウムは、植物クロロフィル由来のク

ロリン環骨格にアスパラギン酸をアミド結合させたポルフィリン系化合物である [15]。タラポルフィンナトリウムの別名として、mono-L-aspartyl chlorin6、また開発段階の呼称として NPe6 (新日本石油化学, 神奈川)、ME2906 (Meiji Seika ファルマ, 東京)、LS11 (Light Sciences, スノコルミー, アメリカ) などがある [15-18]。波長 664 nm に Q 帯、波長 400 nm に Soret 帯の吸収ピークを持つ。励起には波長 664±2 nm の半導体レーザーを用いる。ポルフィマーナトリウムの励起波長 630 nm と比較したとき、664 nm ではヘモグロビンの吸収係数が約 30%小さいため、生体内光侵達長が長く [19, 20]、治療深度は 10 mm 以上である [19]。Q 帯ピーク波長での吸収がモル吸光係数  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  と大きいため、一重項酸素生成量子収率が 0.77 と高い [21]。タラポルフィンナトリウムは水溶性かつ両親媒性の薬剤であり [22]、細胞内にはエンドサイトーシスで取り込まれ、主にライソソームに集積する [19]。タラポルフィンナトリウムは生体からの排泄が比較的早く [23]、光線過敏症を予防するための遮光期間は 2 weeks とポルフィマーナトリウムよりも短い [15]。タラポルフィンナトリウムは商品名レザフィリンとして早期中心型肺癌、原発性悪性脳腫瘍、化学放射線療法または放射線療法後の局所遺残再発食道癌、の治療に認可されている [15]。

第二世代光感受性薬剤のベルテポルフィン、ベンゾポルフィリン誘導体である。ベルテポルフィンの Q 帯の吸収ピークは波長 690 nm にあり、この波長でのモル吸光係数は  $3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、一重項酸素の量子収率は 0.79 である [12, 24, 25]。励起には波長 689±3 nm の半導体レーザーを用いる。親油性の薬剤であり、細胞内では主にミトコンドリアやリポソームに集積する [22, 26]。光線過敏症を予防するための遮光期間は 2-5 days と短い [24]。ベルテポルフィンは商品名ビスダインとして、加齢黄斑変性症における網膜新生血管治療に認可されている (3.2.4 節参照)。

光線力学的診断用に認可を受けている薬剤として、アミノレブリン酸塩酸塩 (ノーベルフアーマ, 東京) がある [27]。光線力学的診断とは、光感受性薬剤を励起した際に発生する蛍光を用いて腫瘍の位置を判定する診断法である。アミノレブリン酸それ自体は光感受性薬剤ではなく、代謝物として生成するプロトポルフィリン IX が光感受性を持つ物質である。波長 400-410 nm の励起により生じる波長 635 nm 付近の赤色蛍光により、腫瘍の位置を特定する。

### 3.2.3 光増感反応を利用した悪性腫瘍治療

3.2.2 節に述べたように、光増感反応を応用した光線力学的治療は主に悪性腫瘍の治療法として用いられている。この治療では、光感受性薬剤を生体へ投与してから数時間-数十時間が経つと、健常組織に対して腫瘍組織の光感受性薬剤濃度にコントラストが発生するという特徴 (集積性) を利用している [3]。光感受性薬剤は、血中で主に低比重リポタンパク (Low density lipoprotein: LDL) と結合して存在している。腫瘍細胞は増殖を維持するために、膜上に LDL レセプターを多く発現しており、LDL と結合したポルフィリン化合物を積極的

に取り込む [13]。一方で、腫瘍組織にはリンパ系組織は未発達ないしは欠如しているため、ポルフィリン化合物の排泄速度が低く、ポルフィリン化合物が滞留する。これらの性質から腫瘍組織に対するポルフィリン化合物の特異的な集積が生じると理解されている [3]。

光増感反応による抗腫瘍効果は、一重項酸素が与える障害による直接的な細胞死と、血流閉止効果により生じる間接的な作用の2つがある [28]。細胞内小器官に集積する光感受性薬剤は、主にアポトーシスによる細胞死を誘導する [29]。細胞膜に集積する光感受性薬剤は、主にネクローシスによる細胞死を誘導する [29]。一方、光増感反応による血流閉止は、光増感反応により障害を受けた血管内皮に、白血球が付着したり、血小板が凝集することで生じる [28]。血流の閉止が起こると腫瘍組織に酸素や養分が送達されなくなるため、腫瘍壊死が発生する。タラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応の場合、血流閉止効果による殺腫瘍効果の方が直接的な細胞死よりも支配的であると報告されている [17]。

#### 3.2.4 光増感反応を利用したその他の治療

光増感反応を利用した治療は、加齢黄斑変性症や感染症、皮膚科疾患などの非悪性疾患への適用拡大が進んでいる [3, 24, 30, 31]。これらの疾患の多くは光感受性薬剤投与後1h以内に光照射を行うことで、主に細胞膜を標的とした障害作用を起こす。加齢黄斑変性症は網膜の中心部である黄斑に異常が生じる疾患である [32]。加齢黄斑変性症のうち、脈絡膜新生血管を伴う滲出型加齢黄斑変性に対して光線力学的治療が適用されている [24]。この治療では、血管閉塞作用を利用し新生血管の閉塞を起こす [24]。新生血管組織では、腫瘍組織と同様に LDL の取り込みが増加しているため、光感受性薬剤が選択的に集積する [24]。励起光の照射を行うと、産生した一重項酸素により新生血管内皮が局所的に障害を受け、血管閉塞が起こる [24]。

感染症に対する光線力学的治療は antimicrobial-PDT や PACT (Photodynamic antimicrobial chemotherapy) と呼ばれ、血液製剤の消毒、ウイルスの不活性化、口腔内感染治療などに用いられる [30]。光感受性薬剤としてメチレンブルーやアミノレブリン酸が一般に用いられる。感染症に対する光線力学的治療で用いられる光感受性薬剤は陽性の電荷を持ち、陰性の細菌膜と結合するが、双極イオン性である健常細胞膜には結合性が弱い [33]。健常細胞へのエンドサイトーシスによる光感受性薬剤の取り込みよりも早期に、光感受性薬剤の細菌膜との結合が生じるため、光増感反応のタイミングを早くすれば、選択的に細菌を死滅させられる [33]。

皮膚科疾患に対する光線力学的治療は、当初腫瘍疾患への応用が検討され、さらに最近では非腫瘍性疾患の脂腺増殖症、サルコイドーシス、尋常性ざ瘡などに対しての応用が注目されている [31]。光線力学的治療は、皮膚科疾患の治療法として非侵襲的で高齢者や全身状態の悪い患者に対しても施行でき、瘢痕や色素沈着を残さないため美容的にも優れているといった利点があることから注目されている [34]。光感受性薬剤としてアミノレブリン

ン酸、メチルアミノレブリン酸、メチレンブルーの使用が検討されている [31]。

### 3.3 光線力学的治療を応用した心房性不整脈のカテーテルアブレーション技術の提案

著者らは、光線力学的治療を応用した心房性不整脈に対する新しいカテーテルアブレーション技術を提案している [35, 36]。本提案の構想を図 3-3 に示す。この治療構想では、非熱的に生じる光増感反応の酸化力を利用する。提案法で採用しているタラポルフィンナトリウムは、一重項酸素の量子収率が 0.77 と高いため (3.2.2 節参照)、与える励起エネルギーに対するロスが少なく、熱がほとんど生じることなく一重項酸素を生成することができる。このため、現行のカテーテルアブレーションで課題となっていた熱に由来する合併症の発生を抑制できる可能性がある。対象の心筋組織は健常組織であるため、元より光感受性薬剤の集積性がない。静脈注射から光照射までの時間を待つのは血中濃度が低下して不合理であるから、光感受性薬剤の投与後 15 min 程度の、薬剤が主に細胞外に分布した状態で光増感反応を行う [37]。不整脈のアブレーション治療では即時的な電気伝導遮断が必要なので、光増感反応により細胞外で発生した一重項酸素が心筋細胞膜を障害するようにデザインした。細胞膜上にあるイオンチャネルが酸化障害を受けて、即時的な電気伝導遮断効果が期待できる。これまで心筋細胞を用いた *in vitro* 実験や、動物の心筋組織を用いた *ex/in vivo* 実験を多数実施し、光増感反応条件の検討や、急性期、慢性期の心筋組織障害検討を行ってきた [35-49]。一重項酸素により酸化障害を受けた心筋細胞膜にはポアが発生し、ポアから細胞内へのイオン流入により細胞が膨張し、最終的に破裂することでネクロシスによる細胞壊死が生じる機構が報告されている [37]。光増感反応開始後 200-600 s で、光増感反応による心筋細胞の電気伝導遮断および壊死が生じると報告されている [44]。今までの検討で判明、あるいは可能性が確かめられた、光増感反応を用いたカテーテルアブレーションで予想される利点を以下に示す。

- 1) 横隔神経障害発生率の低減：神経組織は酸素分圧が低いため、神経での光増感反応効率が低下し、横隔神経が保存される [39]。
- 2) 入力パワーの低減による熱発生の抑制：従来の高周波カテーテルアブレーション (約 80 W/cm [50]) と比較して 1/1000 以下のパワー (0.05 W/cm 以下) で治療できる可能性がある [39]。
- 3) 治療深度制御性の向上：従来法では治療深度は組織の熱伝導状態、例えば血管の位置などに依存し、制御が困難であった。光増感反応では治療領域は励起レーザー光が照射される範囲となり、サブミリオーダーの深度制御が可能である。また、10 mm 以上の大深度アブレーションも可能であるため、心室性の不整脈に適応できる可能性がある。
- 4) 切れ目のない電気伝導遮断線の作成：周方向および長さ方向に均一に光照射を行える拡散型光ファイバーを内装したカテーテルを用いることで、従来の電極間に高周波通

電を行うアブレーション治療と比較して切れ目のない電気伝導遮断線が作成できる。

- 5) 種々の電気伝導遮断線への対応が可能：励起光の照射には柔軟性の高いプラスチック光ファイバーによる拡散体の導入を検討しているため、肺静脈や上大静脈、解剖学的峽部など照射部位の形状に合わせたカテーテル作成ができる。
- 6) 同時に複数部位の治療が可能：ファイバーを複数本同時に挿入し、光感受性薬剤が治療に適切な濃度で分布している時間内に励起光の照射を行うことで、複数の部位を同時に治療することができ、術時間の短縮が可能となる。

上記のように、細胞外光増感反応を応用した心房性不整脈のカテーテルアブレーションは既存のアブレーションデバイスに優る性能を有しており、実用化が期待されている。

### 3.4 結言

本章では、光線力学的治療に用いられている光増感反応の原理について説明した。現在我が国で使用されている光感受性薬剤の特徴および適用疾患について述べた。光線力学的治療が応用されている悪性腫瘍疾患および非悪性疾患について治療原理を述べた。本研究の対象である光線力学的治療を応用した心房性不整脈のアブレーション技術について、治療構想と利点を述べた。

## 参考文献

- [1] 小原實, 荒井恒憲, 緑川克美, *レーザー応用工学*, 東京: コロナ社, 1998, pp. 189-192.
- [2] C. H. Sibata, V. C. Colussi, N. L. Oleinick, and T. J. Kinsella, "Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment," *Braz J Med Biol Res*, vol. 33, pp. 869-880, 2000.
- [3] 加藤治文, *PDT ハンドブック 光線力学的治療のアドバンスとテクニック*, 東京: 医学書院, 2002, pp. 1-10, 84-95.
- [4] M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, "Photosensitized singlet oxygen and its applications," *Coord Chem Rev*, vol. 233, pp. 351-371, 2002.
- [5] J. Moan and Q. Peng, "An outline of the history of PDT," in *Photodynamic therapy*, T. Patrice, Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003, pp. 1-17.
- [6] G. Laustriat, "Molecular mechanisms of photosensitization," *Biochimie*, vol. 68, pp. 771-778, 1986.
- [7] J. Moan and K. Berg, "The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen," *Photochem Photobiol*, vol. 53, pp. 549-553, 1991.
- [8] J. S. Dysart and M. S. Patterson, "Characterization of photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro," *Phys Med Biol*, vol. 50, pp. 2597-2616, 2005.
- [9] D. Kessel, K. Woodburn, C. J. Gomer, N. Jagerovic, and K. M. Smith, "Photosensitization with derivatives of chlorin p6," *J Photochem Photobiol*, vol. 28, pp. 13-18, 1995
- [10] D. Kessel, K. Woodburn, B. W. Henderson, and C. K. Chang, "Site of photodamage in vivo and in vitro by a cationic porphyrin," *Photochem Photobiol*, vol. 62, pp. 875-881, 1995
- [11] D. Kessel and Y. Luo, "Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis," *J Photochem Photobiol*, vol. 42, pp. 89-95, 1998
- [12] R. W. Redmond and J. N. Gamlin, "A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules," *Photochem Photobiol*, vol. 70, pp. 391-475, 1999.
- [13] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, and Q. Peng, "Photodynamic Therapy," *J Natl Cancer Inst*, vol. 90, pp. 889-905, 1998.
- [14] ファイザー株式会社, フォトフリン®静注用 75 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2015年11月改訂 (第11版).
- [15] Meiji Seika ファルマ株式会社, 注射用レザフィリン®100 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2016年6月改訂 (第10版).
- [16] S. Mitra and T. H. Foster, "In vivo confocal fluorescence imaging of the intratumor distribution of the photosensitizer mono-L-aspartylchlorin-e6," *Neoplasia*, vol. 10, pp. 429-438, 2008.
- [17] J. Webber, B. Lesson, D. Fromm, and D. Kessel, "Effects of photodynamic therapy using a

- fractionated dosing of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a murine tumor,” *J Photochem Photobiol B: Biol*, vol. 78, pp. 135-140, 2005.
- [18] T. Yano, H. Kasai, T. Horimatsu, K. Yoshimura, S. Teramukai, S. Morita, H. Tada, Y. Yamamoto, H. Kataoka, N. Kakushima, R. Ishihara, H. Isomoto, and M. Muto, “A multicenter phase II study of salvage photodynamic therapy using talaporfin sodium (ME2906) and a diode laser (PNL6405EPG) for local failure after chemoradiotherapy or radiotherapy for esophageal cancer,” *Oncotarget*, vol. 8, pp. 22135-22144, 2017.
- [19] A. E. O’Connor, W. M. Gallagher, and A. T. Byrne, “Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy,” *Photochem Photobiol*, vol. 85, pp. 1053-1074, 2009.
- [20] W. G. Zijlstra and A. Buursma, “Spectrophotometry of hemoglobin: absorption spectra of bovine oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin,” *Comp Biochem Physiol*, vol. 118B, pp. 743-749, 1997.
- [21] J. D. Spikes and J. C. Bommer, “Photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors,” *J Photochem Photobiol*, vol. 17, pp. 135-143, 1993.
- [22] H. van den Bergh and J. P. Ballini, “Principles of PDT,” in *PDT of Ocular Diseases*, E. S. Gragoudas, J. W. Miller, and L. Zografos, Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, pp. 11-42.
- [23] K. Aizawa, T. Okunaka, T. Ohtani, H. Kawabe, Y. Yasunaka, S. O’Hata, N. Ohtomo, K. Nishimiya, C. Konaka, H. Kato, Y. Hayata, and T. Saito, “Localization of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in mouse tissue,” *Photochem Photobiol*, vol. 46, pp. 789-793, 1987.
- [24] ノバルティスファーマ株式会社, ビスダイン®静注用 15 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2017年4月改訂 (第9版).
- [25] A. C. E. Moor, B. Ortel, and T. Hasan, “Mechanisms of photodynamic therapy,” in *Photodynamic therapy*, T. Patrice, Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003, pp. 19-57.
- [26] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, and J. Golab, “Photodynamic therapy of cancer: An update,” *CA Cancer J Clin*, vol. 61, pp. 250-281, 2011.
- [27] ノーベルファーマ株式会社, アラベル®内服剤 1.5 g, 医薬品インタビューフォーム, 2016年8月改訂 (第5版).
- [28] 加藤治文, *PDT 実践ガイド 光線力学的療法の最新エビデンス*, 東京: メディカルレビュー社, 2017, pp. 1-25.

- [29] N. L. Oleinick, R. L. Morris, and I. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 1, pp. 1-21, 2002.
- [30] M. Wainwright, "Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)," *J Antimicrob Chemother*, vol. 42, pp. 13-28, 1998.
- [31] H. Nakaseko and Y. Matsumoto, "Photodynamic therapy in the dermatological field," *JJSLSM*, vol. 27, pp. 303-308, 2007.
- [32] 本田孔士, *あなたの眼は大丈夫? 中高年の眼の病気*, 東京: 岩波書店, 2003, pp. 115-124.
- [33] D. A. Phoenix, S. R. Dennison, and F. Harris, "Photodynamic antimicrobial chemotherapy," in *Novel antimicrobial agents and strategies*, D. A. Phoenix, F. Harris, and S. R. Dennison, Ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2014, pp. 295-330.
- [34] R. M. Szeimies, S. Karrer, S. Radakovic-Fijan, A. Tanew, P. G. Calzavara-Pinton, C. Zane, A. Sidoroff, M. Hempel, J. Ulrich, T. Proebstle, H. Meffert, M. Mulder, D. Salomon, H. C. Dittmar, J. W. Bauer, K. Kernland, and L. Braathen, "Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: A prospective, randomized study," *J Am Acad Dermatol*, vol. 47, pp. 258-262, 2002.
- [35] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, K. Fukumoto, M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, T. Arai, S. Ogawa, and K. Fukuda, "Nonthermal cardiac catheter ablation using photodynamic therapy," *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 6, pp. 1025-1031, 2013.
- [36] A. Ito, S. Hosokawa, S. Miyoshi, K. Soejima, S. Ogawa, and T. Arai, "The myocardial electrical blockade induced by photosensitization reaction," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 57, pp. 488-495, 2010.
- [37] A. Ito, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai, "Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium," *Photochem Photobiol*, vol. 87, pp. 199-207, 2010.
- [38] A. Ito, S. Miyoshi, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, K. Fukuda, and T. Arai, "Myocardial electrical conduction block induced by photosensitization reaction in exposed porcine hearts in vivo," *Lasers Surg Med*, vol. 43, pp. 984-990, 2011.
- [39] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, K. Nakajima, S. Kashimura, Y. Katsumata, T. Nishiyama, N. Nishiyama, T. Arai, and K. Fukuda, "Electrical superior vena cava isolation using photodynamic therapy in a canine model," *Europace*, vol. 18, pp. 294-300, 2016.
- [40] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, Y. Katsumata, T. Nishiyama, N. Nishiyama, Y. Tanimoto, Y. Aizawa, T. Arai, and K. Fukuda, "Optimal conditions for cardiac

- catheter ablation using photodynamic therapy,” *Europace*, vol. 17, pp. 1309-1315, 2015.
- [41] E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, “Detailed in vitro study of the photosensitization reaction of extracellular talaporfin sodium in rat myocardial cells,” *Lasers Surg Med*, vol. 45, pp. 660-667, 2013.
- [42] E. Ogawa, S. Motohashi, A. Ito, and T. Arai, “Effects of albumin binding on photocytotoxicity of extracellular photosensitization reaction using talaporfin sodium to rat myocardial cells,” *Photodiag Photodynam Ther*, vol. 12, Issue 2, pp. 252-257, 2015.
- [43] E. Ogawa, N. Machida, A. Ito, and T. Arai, “Comparison of myocardial cell lethality 2 hours and 24 hours after talaporfin sodium-induced photosensitization reaction,” *Photodiag Photodynam Ther*, vol. 13, pp. 196-200, 2015.
- [44] E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, “Dependence of damage within 10 min to myocardial cells by a photodynamic reaction with a high concentration of talaporfin sodium outside cells in vitro on parameters of laser irradiation,” *Photodiag Photodynam Ther*, vol. 15, pp. 1-5, 2016.
- [45] E. Ogawa and T. Arai, “Development of a practical animal model of photodynamic therapy using a high concentration of extracellular talaporfin sodium in interstitial fluid: influence of albumin animal species on myocardial cell photocytotoxicity in vitro,” *Lasers Med Sci*, vol. 32, pp. 2105-2109, 2017.
- [46] E. Ogawa, M. Kurotsu, and T. Arai, “Irradiance dependence of the conduction block of an in vitro cardiomyocyte wire,” *Photodiag Photodynam Ther*, vol. 19, pp. 93-97, 2017.
- [47] E. Ogawa, H. Takenoya, and T. Arai, “Temperature influence on myocardial cell cytotoxicity of the extracellular photosensitization reaction with talaporfin sodium and serum proteins at 17-37°C,” *Photomed Laser Surg*, vol. 35, pp. 555-559, 2017.
- [48] M. Kurotsu, M. Yajima, M. Takahashi, E. Ogawa, and T. Arai, “Evaluation of human and bovine serum albumin on oxidation characteristics by a photosensitization reaction under complete binding of talaporfin sodium,” *Photodiag Photodynam Ther*, vol. 12, pp. 408-413, 2015.
- [49] R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, “Phototoxicity of vascular endothelial cells caused by contact with talaporfin sodium for 15-20 min: in vitro and in vivo studies,” *Photomed Laser Surg*, vol. 35, pp. 660-667, 2017.
- [50] M. Scaglione, D. Caponi, M. Anselmino, F. D. Clemente, A. Blandino, F. Ferraris, P. D. Donna, E. Ebrille, F. Halimi, J. F. Leclercq, C. Iunco, C. Vaudagna, F. Cesarani, and F. Gaita, “Pulmonary vein isolation with a new multipolar irrigated radiofrequency ablation catheter (nMARQ™): feasibility, acute and short-term efficacy, safety, and impact on postablation silent cerebral ischemia,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 25, pp. 1299-1305, 2014.

図表

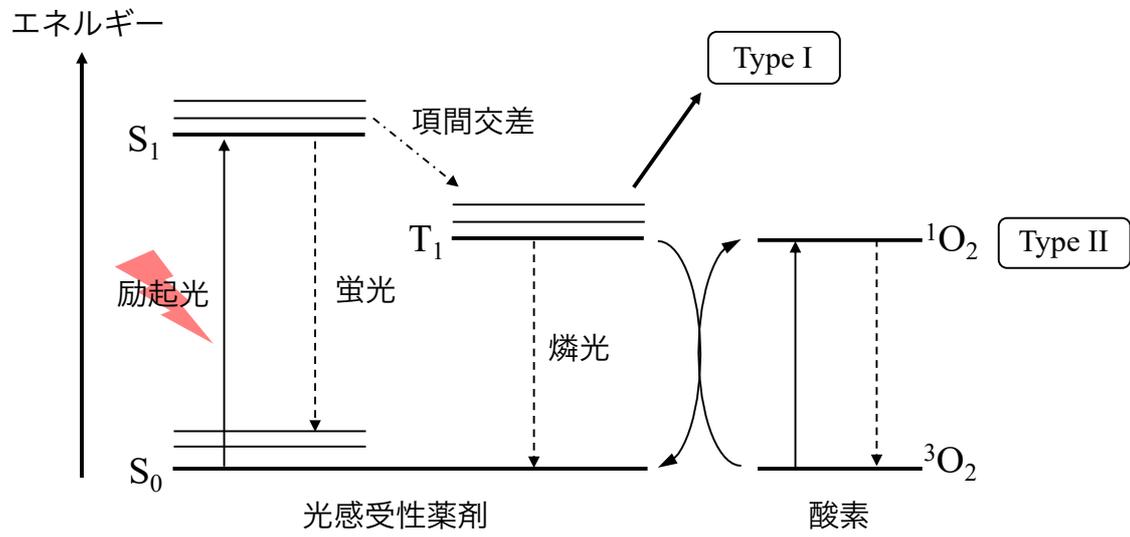


図 3-1 光増感反応のエネルギー機構 [2]

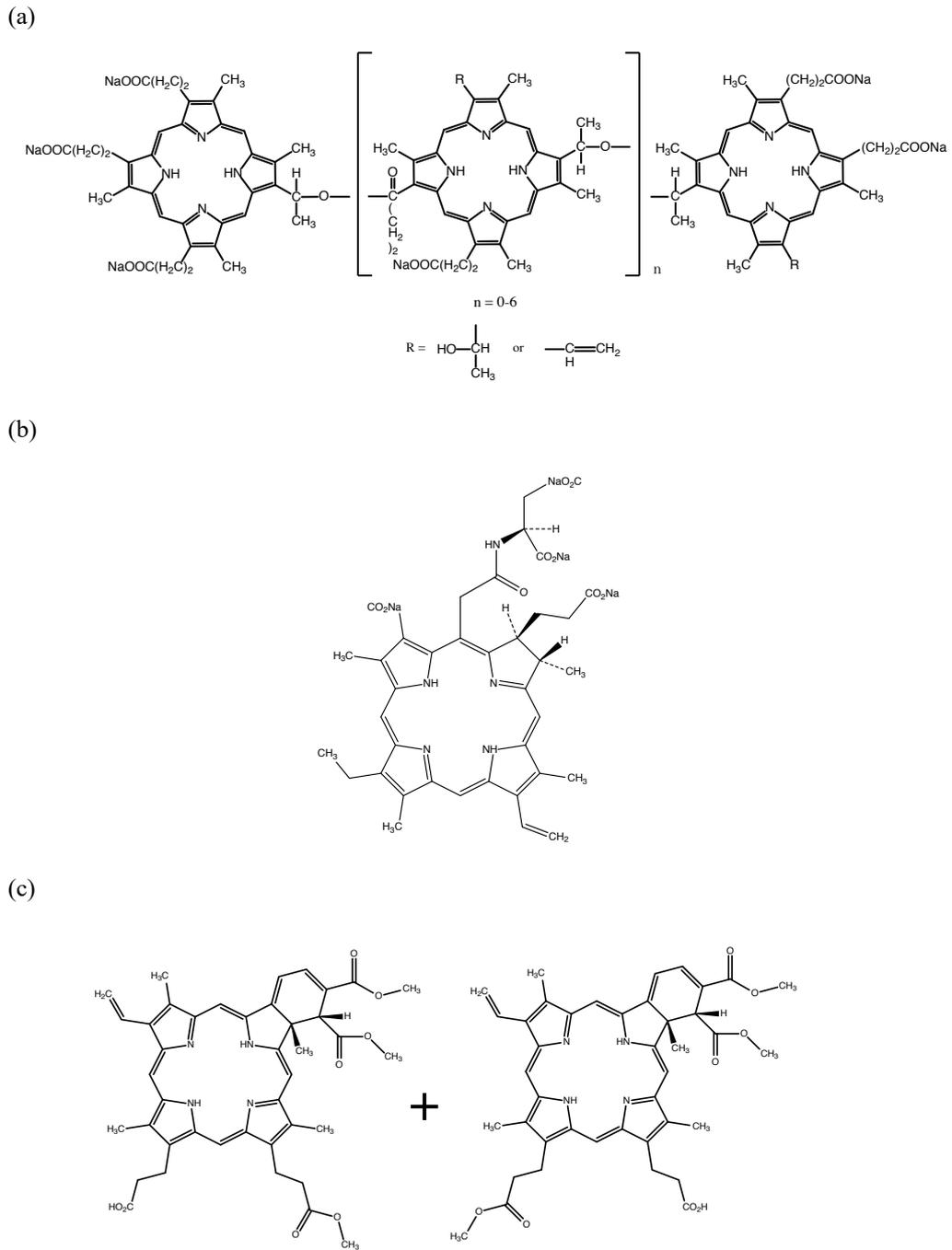


図 3-2 光感受性薬剤の構造式

(a) ポルフィマーナトリウム [14]

(b) タラポルフィンナトリウム [15]

(c) ベルテポルフィン [24]

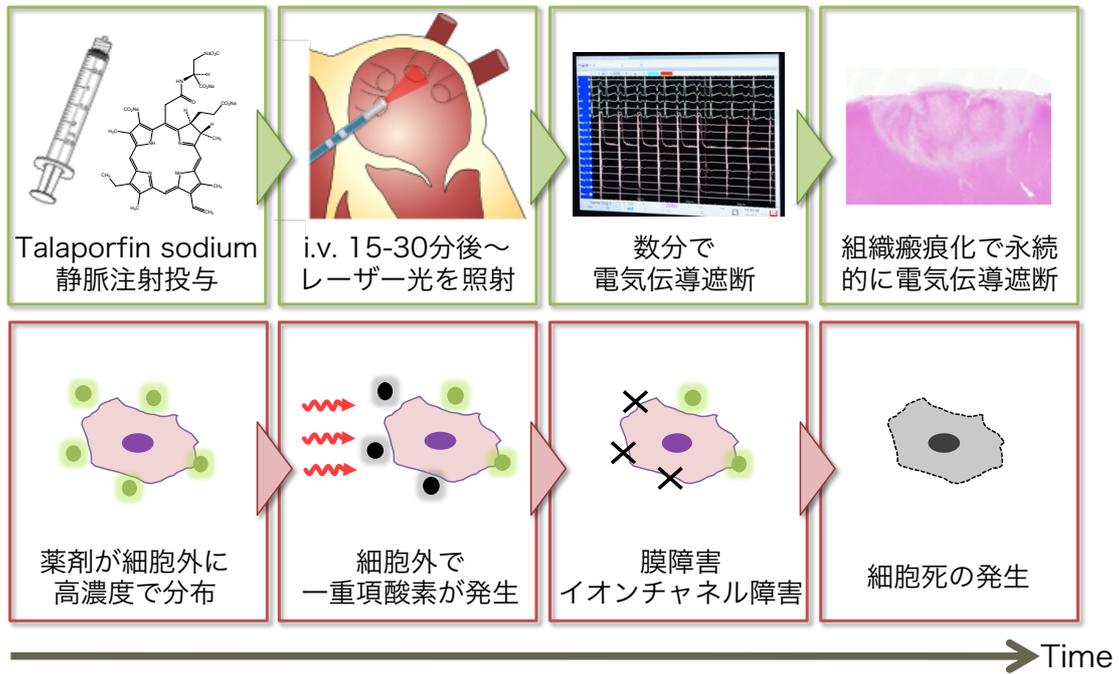


図3-3 光線力学的治療を応用した心房性不整脈のカテーテルアブレーション技術の構想 [41]

## 第 4 章 光線力学的治療による心筋細胞の活動電位障害を研究するための *in vitro* モデルの提案

### 4.1 緒言

頻脈性不整脈のアブレーション治療は、術中の心筋活動電位計測により即時的に治療効果が把握できるという他の疾病治療には無い特徴がある。治療学はエビデンスの段階的な積み上げにより成り立つが、既存の不整脈アブレーション治療法において即時的な効果の調査に適した *in vitro* モデルが無く、検討が欠落している。著者らが提案する新しいアブレーション技術においても、心筋活動電位に対する即時的な酸化障害効果の調査に用いる *in vitro* モデルが存在しないという問題がある。本章では、アブレーション治療における心筋の即時的な活動電位障害に関する *in vitro* 基礎研究の必要性と、その検討に用いる *in vitro* モデルの提案について述べる。

### 4.2 不整脈のアブレーション技術における *in vitro* 心筋細胞活動電位調査の必要性

不整脈のアブレーション治療は、心内心電図や 3 次元マッピングシステムによりリアルタイムの心筋活動電位計測が可能のため (2.4 部参照)、通常の疾病治療とは異なり治療効果を即時的にモニタリングしながら治療を行っている [1, 2]。このため、治療原理の基礎検討において、治療作用に対する即時的な活動電位レスポンスを詳細に検討する必要がある。現在の標準法である高周波アブレーションおよび提案している光線力学的技術を応用したアブレーション技術 (3.3 部参照) の基礎研究の報告をそれぞれ図 4-1 (a), (b) にまとめた [3-30]。心筋の電気伝導に対する即時的な作用の評価は、主に *in vivo* 実験において行われている [3, 4, 16, 17, 19, 21]。 *In vitro* 細胞レベルの実験は細胞の活性評価や死細胞率の計測にとどまり [5, 16, 18, 22-24, 26, 28-30]、活動電位障害調査は行われているものの、報告例は少ない [6, 25, 27]。 *In vitro*、*in vivo*、臨床研究と段階的なエビデンスの積み上げによって成り立っている治療学において *in vitro* から *in vivo* の科学的エビデンスのつながりが欠落していることは、細胞の障害量と活動電位の関係が得られないため問題である。さらに、現状行われている *in vivo* の電気伝導特性の評価モデルは不確定な要素を多く含むという問題がある。動物モデルでは個体および種に解剖学的構造の差異があり、標準的な電気伝導遮断の実験モデルは定まっていない。哺乳類の右心系の解剖学的構造 (三尖弁、上大静脈、下大静脈) はほぼ同一と言えるが、左心系の解剖学的構造 (左心房、肺静脈) は動物種により全く異なり [31, 32]、同一種間でも個体差が大きい [33]。遮断ラインの形成には組織深度方向の障害深さとその均一性、さらに心筋厚みが関与しており、遮断の可否のみではアブレーション作用の正確な評価ができない。特に 1 点ずつ焼灼を行う *point-to-point* アブレーション法では、

アブレーション作用量と電気伝導特性の関係に、1) カテーテル操作に関する術者の手技、2) カテーテルと組織の接触、3) 組織の解剖学的構造、4) カテーテルの形状・柔軟性などカテーテルと心筋表面の接触に関する性能、といった要素が影響を及ぼす [34]。その結果、アブレーション作用による電気伝導の遅れや遮断から定量的な治療作用を評価するのが困難である。以上のように *in vivo* の電気伝導特性評価モデルには最終結果の遮断に関わる複数の不確定な要素があり、既存の報告が治療条件を決めるための科学的治療効果エビデンスとして参考にならない。不整脈のアブレーション治療はモニター技術が発達していて、X線透視装置、心内心電図モニター、3次元電位マッピングナビゲーションシステムの3つに高性能で高価な装置が必要である。このように高度な工学的技術がふんだんに投入されている最新治療にもかかわらず、電気伝導に関する治療効果の *in vitro* 検討という最も重要な科学的エビデンスが欠落している。

著者らは、光線力学的治療を用いた新しい頻脈性不整脈のアブレーション技術を提案している (3.3 部参照)。心筋組織へ酸化障害を与えるという障害原理の点で、提案法は従来の不整脈に対するアブレーション治療法と全く異なる。上記のように、基礎検討の段階で酸化障害作用に対する即時的な活動電位障害を *in vitro* で検討できるようにして、臨床へとつながる最も基礎の部分の科学的エビデンスを固めるべきである。

### 4.3 *In vitro* における活動電位障害検討モデルの設計における課題

心筋細胞の活動電位障害評価における *in vitro* での報告例が少ないという 4.2 部で述べた問題点の原因の一つとして、*in vitro* で心筋の電気伝導を模擬し、作用検討が行える実験系が確立されていないことが挙げられる。2.2.1 節で述べたように、そもそも生体内では心筋細胞同士がギャップジャンクションで結合することにより心筋内の電気伝導が生じている。心筋細胞同士の電気伝導に関連しない作用の影響、例えばイオンチャネルに対する薬効評価や毒性試験を行う場合には、微小電極やパッチクランプ、多電極アレイなどを用いて単一心筋細胞あるいは小規模な集団心筋細胞の活動電位を計測・評価するのが一般的である [35-39]。この系では細胞集団の寸法が心筋細胞の興奮や収縮といった特性に影響を与えるので、注意する必要がある [40-42]。例えば、心筋細胞集団の寸法と拍動間隔の安定性は密接な関係があり、心筋細胞の集団規模やネットワーク形状が異なると同じ化合物 (副作用として心室性不整脈を惹起する抗精神病薬) を適用しても異なる拍動間隔の応答が生じる [43]。*In vitro* 実験において心筋細胞の集団寸法、ネットワーク形状を *in vivo* により近い状態とするため、表 4-1 に示すような種々の 2次元・3次元的な細胞の電気伝導路の作成が報告されている [41, 44-52]。これらのモデルでは、心筋細胞間のギャップジャンクションの分布の均一性が調節できず、結果として心筋細胞ネットワーク内での電気伝導の方向性が調整できないため、*in vivo* 心筋組織の電気伝導を模擬できていない。よって、本研究で扱う心筋活動電位に対する酸化障害の作用評価モデルとして不適當である。光線力学的治療を

用いた頻脈性不整脈のアブレーション技術の基礎検討として、酸化障害作用と心筋活動電位の関係を *in vitro* で研究するためには、単一または小さい心筋細胞集団における新たな評価系を設計するか、あるいは電気伝導の方向性を調整できる 2 次元または 3 次元的な心筋細胞電気伝導路を作成する必要がある。

#### 4.4 光線力学的治療を用いた不整脈のアブレーション技術における心筋細胞の活動電位障害を検討する *in vitro* モデルの提案

本研究では、*in vivo* 心筋組織に対する光増感反応による活動電位障害の調査に用いる、*in vitro* 心筋細胞モデルの作成を目的とする。*In vitro* モデルと *in vivo* モデルを比較することで、*in vitro* モデルが *in vivo* 状況をどの程度反映するかを確認できる。この比較のため、両モデルにおいて測定できる活動電位振幅を評価に採用した。*In vitro* および *in vivo* モデルで活動電位振幅を評価に使用できる理由を 4.4.1 節で述べる。*In vitro* と *in vivo* の比較の際、光増感反応の観点では反応効率に關与する酸素環境の違いが最も懸念される。両モデルでの酸素環境の違いと、*in vitro* モデルで実施した酸素供給の改善について 4.4.2 節で述べる。

##### 4.4.1 *In vitro* および *in vivo* モデルにおける活動電位評価と基準の選定

*In vitro* モデルでは心筋細胞の自発電位の振幅を測定した。心筋細胞は、自発的、連続的に拍動を繰り返す自動能という性質を持っている。一般にイオンチャネル作用薬の薬効は自発電位により評価され、自発電位波形の持続時間、RR 間隔、振幅などがパラメータとして使われている [53-56]。活性酸素を発生させて心筋細胞に酸化障害を与えると、イオンチャネルが不活性化され自発電位が減少すると報告されている [57-59]。このように自発電位測定は基礎実験によく使われる評価方法であり、光増感反応による酸化障害の評価にも用いることができる。単一の心筋細胞から自発電位を計測することもできるが、単一細胞が発する電位は微弱な信号であり、特定のイオンチャネルに注目する場合以外は  $10^2$ - $10^5$  個の心筋細胞が発する電位が計測対象となる [60, 61]。本実験においては  $10^2$ - $10^3$  個の心筋細胞が発する電位を対象とし、5.2.1.1 項および 6.2.1.3 項に述べる 2 種類のできるだけ低侵襲な活動電位計測法を用いた。

本研究の *in vivo* モデルでは心筋組織を伝搬した洞調律の接触電位を測定した。不整脈に対するアブレーション治療では異常な電気信号の遮断が治療の最終結果であり、治療の進行は心筋活動電位波形の振幅の減高 (電位減少) や電位の伝搬遅れから判断している。心筋に対して貫壁性の遮断線が形成されない限り電気信号の遮断は達成されない。4.2 部に述べたように術者のスキルや解剖学的構造のなど複数の要素が貫壁性の遮断線の形成に影響するため、遮断や伝搬遅れから障害作用に対する効果を定量的に知るのは難しい。また、活動電位の伝搬遅れは活動電位が伝わる経路を特定できない限り定量的に評価できない。一方で、心筋と接触した電極カテーテルで計測される活動電位が対象の心筋全層での活動電

位を反映していれば、障害効果は活動電位振幅減少に正確に表れる。そのため、薄い心筋を選んでカテーテルによる心内活動電位計測を行えば、*in vivo* で電位波形振幅の減少に着目して酸化障害作用の評価が可能であると考えられる。本研究において光増感反応で使用する 664 nm 光の心筋組織における光侵達長は、6.4.3 節記載の実効的な減衰係数の逆数から 0.85 mm と計算されるため、この程度の厚みを持つ組織を使用することが望ましい。

本研究では、*in vitro* では心筋細胞の自発電位を、*in vivo* では洞房結節で発生し心筋組織を伝搬した洞調律を測定している。電位の発生起源は異なるが、どちらの活動電位も心筋細胞の脱分極により生じたという点は同じであるため、イオンチャネルの機能を示しており、*in vitro* と *in vivo* の障害作用効果の比較にあたって活動電位振幅に対して同一の基準を適用して差し支えないと判断した。

#### 4.4.2 *In vitro* および *in vivo* モデルにおける酸素環境の違いと *in vitro* にて実施した改善

*In vitro* と *in vivo* の作用検討結果を比較するには、光増感反応の観点では反応効率に関与する酸素環境の違いが最も問題である。*In vitro* モデルにおいて酸素は溶液中に溶解し、物理溶解の形で存在している。これに対して *in vivo* モデルでは、血液中に物理溶解している酸素の他に酸素がヘモグロビンと結合した状態で存在し、これを化学溶解と呼ぶ [62]。一般に、血中の化学溶解酸素量は物理溶解酸素量の 60-100 倍あるため [62]、*in vitro* と比較して *in vivo* モデルでは反応に使用できる酸素がかなり多い。酸素供給がなく、物理溶解酸素しかない *in vitro* 実験系においては光増感反応中に酸素濃度減少あるいは枯渇が生じる [22, 63]。著者らが実施する頻脈性不整脈のアブレーションの基礎検討では、細胞膜を標的とした光増感反応を行うため [16, 18]、細胞の外側に薬剤が高濃度に分布した状態で光増感反応を起こす [16, 18]。そのため、従来の悪性腫瘍治療の基礎検討よりも反応が活発に生じ、*in vitro* 実験系において酸素不足がさらに生じやすくなることが予想される。反応中に酸素不足の恐れのある *in vitro* モデルと、化学溶解で豊富な酸素を持つ *in vivo* モデルで光増感反応による活動電位障害を比較するには、*in vitro* モデルの酸素状態を *in vivo* モデルに近づける必要がある。本実験では *in vitro* モデルにおいて灌流チャンネルを設計し、光増感反応中に反応領域に対して未反応の溶液を流すことで、酸素を連続的に供給するという改善を実施した (6.2.1.2 項参照)。

#### 4.5 結言

本章では、細胞外光増感反応による心筋細胞の活動電位障害を研究するための *in vitro* モデルを提案した。*In vitro* モデルが *in vivo* 状況をどの程度反映するか確認するため、心筋細胞の自発電位および心筋活動電位の振幅に着目し、*in vitro* モデルと *in vivo* モデルを比較する。光増感反応に関して、*in vitro* モデルの酸素環境は *in vivo* 大きく異なるため、灌流チャンネルを用いて溶液を流すことで酸素供給の改善を実施する。

## 参考文献

- [1] 井上博, 奥村謙, *EPS—臨床心臓電気生理検査*, 東京: 医学書院, 2010, pp. 9-38.
- [2] 小林義典, 野上昭彦, *心内局所電位—アブレーションに役立つ特殊電位観察法*, 東京: 南山堂, 2014, pp. 2-11, 74-96.
- [3] T. A. Simmers, J. M. De Bakker, F. H. Wittkamp, and R. N. Hauer, “Effects of heating on impulse propagation in superfused canine myocardium,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 25, pp. 1457-1464, 1995.
- [4] T. A. Simmers, J. M. De Bakker, F. H. Wittkamp, and R. N. Hauer, “Effects of heating with radiofrequency power on myocardial impulse conduction: Is radiofrequency ablation exclusively thermally mediated?,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 7, pp. 243-247, 1996.
- [5] H. Calkins, G. Hindricks, R. Cappato, Y. H. Kim, E. B. Saad, L. Aguinaga, J. G. Akar, V. Badhwar, J. Brugada, J. Camm, P. S. Chen, S. A. Chen, M. K. Chung, J. C. Nielsen, A. B. Curtis, D. W. Davies, J. D. Day, A. d’Avila, N. M. S. de Groot, L. D. Biase, M. Duytschaever, J. R. Edgerton, K. A. Ellenbogen, P. T. Ellinor, S. Ernst, G. Fenelon, E. P. Gerstenfeld, D. E. Haines, M. Haissaguerre, R. H. Helm, E. Hylek, W. M. Jackman, J. Jalife, J. M. Kalman, J. Kautzner, H. Kottkamp, K. H. Kuck, K. Kumagai, R. Lee, T. Lewalter, B. D. Lindsay, L. Macle, M. Mansour, F. E. Marchlinski, G. F. Michaud, H. Nakagawa, A. Natale, S. Nattel, K. Okumura, D. Packer, E. Pokushalov, M. R. Reynolds, P. Sanders, M. Scanavacca, R. Schilling, C. Tondo, H. M. Tsao, A. Verma, D. J. Wilber, and T. Yamane, “2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation,” *Europace*, vol. 20, pp. e1-e160, 2018.
- [6] Y. C. Chen, Y. H. Kao, C. F. Huang, C. C. Cheng, Y. J. Chen, and S. A. Chen, “Heat stress responses modulate calcium regulations and electrophysiological characteristics in atrial myocytes,” *J Mo*, vol. 48, pp. 781-788, 2010.
- [7] D. E. Haines and D. D. Watson, “Tissue heating during radiofrequency catheter ablation: a thermodynamic model and observations in isolated perfused and superfused canine right ventricular free wall,” *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 12, pp. 962-976, 1989.
- [8] D.S. He, M. Bosnos, M. Z. Mays, and F. Marcus, “Assessment of myocardial lesion size during in vitro radio frequency catheter ablation,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 50, pp. 768-776, 2003.
- [9] J. J. Langberg, H. Calkins, R. El-Attassi, M. Borganelli, A. Leon, S. J. Kalbfleisch, and F. Morady, “Temperature monitoring during radiofrequency catheter ablation of accessory pathwats,” *Circulation*, vol. 86, pp. 1469-1474, 1992.
- [10] M.D. Lesh, G. F. Van Hare, L. M. Epstein, A. P. Fitzpatrick, M. M. Scheinman, R. J. Lee, M. A.

- Kwasman, H. R. Grogan, and J. C. Griffin, "Radiofrequency catheter ablation of atrial arrhythmias results and mechanisms," *Circulation*, vol. 89, pp. 1074-1089, 1994.
- [11] S. Nath, J. P. Dimarco, and D. E. Haines, "Basic aspects of radiofrequency catheter ablation," *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 5, pp. 863-876, 1994.
- [12] E. Bugge, A. Nicholson, and S. P. Thomas, "Comparison of bipolar and unipolar radiofrequency ablation in an in vivo experimental model," *Eur J Cardiothorac Surg*, vol. 28, pp. 76-82, 2005.
- [13] F. H. Wittkampf, R. N. Hauer, and E. R. de Medina, "Control of radiofrequency lesion size by power regulation," *Circulation*, vol. 80, pp. 962-968, 1989.
- [14] N. Pavlović, C. Sticherling, S. Knecht, T. Reichlin, A. Mühl, B. Schaer, S. Osswald, and M. Kühne, "One-year follow-up after irrigated multi-electrode radiofrequency ablation of persistent atrial fibrillation," *Europace*, vol. 18, pp. 85-91, 2015.
- [15] M. Haïssaguerre, P. Sanders, M. Hocini, Y. Takahashi, M. Rotter, F. Sacher, T. Rostock, L. Hsu, P. Bordachar, S. Reuter, R. Roudaut, J. Clementy, and P. Jaïs, "Catheter ablation of long-lasting persistent atrial fibrillation: critical structures for termination," *J Cardiovasc Electrophys*, vol. 16, pp. 1125-1137, 2005.
- [16] A. Ito, S. Hosokawa, S. Miyoshi, K. Soejima, S. Ogawa, and T. Arai, "The myocardial electrical blockade induced by photosensitization reaction," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 57, pp. 488-495, 2010.
- [17] A. Ito, S. Miyoshi, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, K. Fukuda, and T. Arai, "Myocardial electrical conduction block induced by photosensitization reaction in exposed porcine hearts in vivo," *Lasers Surg Med*, vol. 43, pp. 984-990, 2011.
- [18] A. Ito, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai, "Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium," *Photochem Photobiol*, vol. 87, pp. 199-207, 2010.
- [19] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, K. Nakajima, S. Kashimura, Y. Katsumata, T. Nishiyama, N. Nishiyama, T. Arai, and K. Fukuda, "Electrical superior vena cava isolation using photodynamic therapy in a canine model," *Europace*, vol. 18, pp. 294-300, 2016.
- [20] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, Y. Katsumata, T. Nishiyama, N. Nishiyama, Y. Tanimoto, Y. Aizawa, T. Arai, and K. Fukuda, "Optimal conditions for cardiac catheter ablation using photodynamic therapy," *Europace*, vol. 17, pp. 1309-1315, 2015.
- [21] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, K. Fukumoto, M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, T. Arai, S. Ogawa, and K. Fukuda, "Nonthermal cardiac catheter ablation using photodynamic therapy," *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 6, pp.1025-1031, 2013.
- [22] E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, "Detailed in vitro study of the photosensitization reaction of

- extracellular talaporfin sodium in rat myocardial cells,” *Lasers Surg Med*, vol. 45, pp. 660-667, 2013.
- [23] E. Ogawa, S. Motohashi, A. Ito, and T. Arai, “Effects of albumin binding on photocytotoxicity of extracellular photosensitization reaction using talaporfin sodium to rat myocardial cells,” *Photodiag Photodynam Ther*, vol. 12, pp. 252-257, 2015.
- [24] E. Ogawa, N. Machida, A. Ito, and T. Arai, “Comparison of myocardial cell lethality 2 hours and 24 hours after talaporfin sodium-induced photosensitization reaction,” *Photodiag Photodynam Ther*, vol. 13, pp. 196-200, 2015.
- [25] E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, “Dependence of damage within 10 min to myocardial cells by aphotodynamic reaction with a high concentration of talaporfinsodium outside cells in vitro on parameters of laser irradiation,” *Photodiag Photodynam Ther*, vol. 15, pp. 1-5, 2016.
- [26] E. Ogawa and T. Arai, “Development of a practical animal model of photodynamic therapy using a high concentration of extracellular talaporfin sodium in interstitial fluid: influence of albumin animal species on myocardial cell photocytotoxicity in vitro,” *Lasers Med Sci*, vol. 32, pp. 2105-2109, 2017.
- [27] E. Ogawa, M. Kurotsu, and T. Arai, “Irradiance dependence of the conduction block of an in vitro cardiomyocyte wire,” *Photodiag Photodynam Ther*, vol. 19, pp. 93-97, 2017.
- [28] E. Ogawa, H. Takenoya, and T. Arai, “Temperature influence on myocardial cell cytotoxicity of the extracellular photosensitization reaction with talaporfin sodium and serum proteins at 17-37°C,” *Photomed Laser Surg*, vol. 35, pp. 555-559, 2017.
- [29] M. Kurotsu, M. Yajima, M. Takahashi, E. Ogawa, and T. Arai, “Evaluation of human and bovine serum albumin on oxidation characteristics by a photosensitization reaction under complete binding of talaporfin sodium,” *Photodiag Photodynam Ther*, vol. 12, pp. 408-413, 2015.
- [30] R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, “Phototoxicity of vascular endothelial cells caused by contact with talaporfin sodium for 15-20 min: in vitro and in vivo studies,” *Photomed Laser Surg*, vol. 35, pp. 660-667, 2017.
- [31] S. J. Crick, M. N. Sheppard, S. Y. Ho, L. Gebstein, and R. H. Anderson, “Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure,” *J Anat*, vol. 193, pp. 105-119, 1998.
- [32] H. Nathan and H. Gloobe, “Myocardial atrio-venous junctions and extensions (sleeves) over the pulmonary and caval veins: anatomical observations in various mammals,” *Thorax*, vol. 25, pp. 317-324, 1970.
- [33] S. Y. Ho, D. Sanchez-Quintana, J. A. Cabrera, and R. H. Anderson, “Anatomy of the left atrium: Implications for radiofrequency ablation of atrial fibrillation,” *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 10, pp. 1525-1533, 1999.

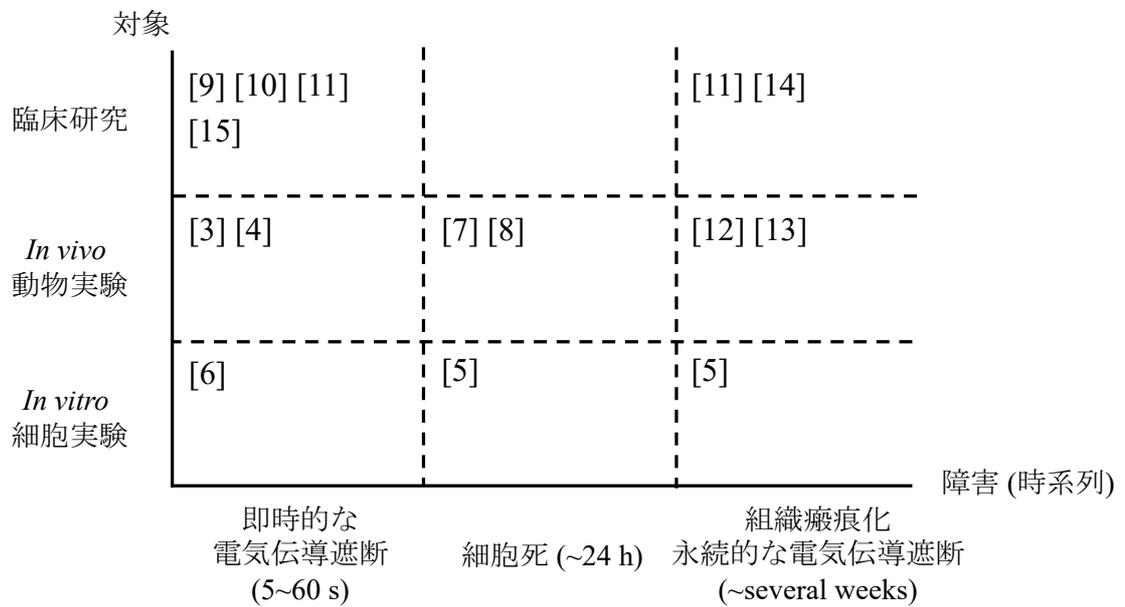
- [34] L. V. Boersma, M. C. Wijffels, H. Oral, E. F. Wever, and F. Morady, "Pulmonary vein isolation by duty-cycled bipolar and unipolar radiofrequency energy with a multielectrode ablation catheter," *Heart Rhythm*, vol. 5, pp. 1635-1642, 2008.
- [35] S. Matsuo, "Experimental studies on the antiarrhythmic mechanism of mexiletine in guinea pig ventricular muscles using microelectrode techniques," *J Nippon Med Sch*, vol. 51, pp. 208-223, 1984.
- [36] J. Okada, T. Yoshinaga, J. Kurokawa, T. Washio, T. Furukawa, K. Sawada, S. Sugiura, and T. Hisada, "Screening system for drug-induced arrhythmogenic risk combining a patch clamp and heart simulator," *Sci Adv*, vol. 1, pp. e1400142-1-7, 2015.
- [37] H. Zhu, K. S. Scharnhorst, A. Z. Stieg, J. K. Gimzewski, I. Minami, N. Nakatsuji, H. Nakano, and A. Nakano, "Two dimensional electrophysiological characterization of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte system," *Sci Rep*, vol. 7, p. 43210, 2017.
- [38] Y. Nakamura, J. Matsuo, N. Miyamoto, A. Ojima, K. Ando, Y. Kanda, K. Sawada, A. Sugiyama, and Y. Sekino, "Assessment of testing methods for drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS cell-derived cardiomyocyte sheet: Multi-site validation study," *J Pharmacol Sci*, vol. 124, pp. 494-501, 2014.
- [39] W. S. Redfern, L. Carlsson, A. S. Davis, W. G. Lynch, I. MacKenzie, S. Palethorpe, P. K. S. Siegl, I. Strang, A. T. Sullivan, R. Wallis, A. J. Camm, and T. G. Hammond, "Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development," *Cardiovasc Res*, vol. 58, pp. 32-45, 2003.
- [40] T. Kaneko, F. Nomura, T. Hamada, Y. Abe, H. Takamori, T. Sakakura, K. Takasuna, A. Sanbuissho, J. Hyllner, P. Sartipy, and K. Yasuda, "On-chip in vitro cell-network pre-clinical cardiac toxicity using spatiotemporal human cardiomyocyte measurement on a chip," *Sci Rep*, vol. 4, p. 4670, 2014.
- [41] U. Egert and H. Hämmerle, "Application of the microelectrode-array (MEA) technology in pharmaceutical drug research," *Sensoren im Fokus neuer Anwendungen*, pp. 51-54, 2002.
- [42] A. Fujita, K. Fujita, O. Nakamura, T. Matsuda, and S. Kawata, "Control of cardiomyocyte orientation on a micro scaffold fabricated by photopolymerization with laser beam interference," *J Biomed Opt*, vol. 11, p. 021015, 2006.
- [43] T. Kaneko, K. Kojima, and K. yasuda, "An on-chip cardiomyocyte cell network assay for stable drug screening regarding community effect of cell network size," *Analyst*, vol. 132, pp. 892-898, 2007.

- [44] I. Suzuki, Y. Sugio, Y. Jimbo, and K. Yasuda, "Individual-cell-based electrophysiological measurement of a topographically controlled neuronal network pattern using agarose architecture with a multi-electrode array," *Jpn J Appl Phys*, vol. 43, pp. L403-L406, 2004.
- [45] K. Kojima, K. Takahashi, T. Kaneko, and K. Yasuda, "Flexible control of electrode pattern on cultivation chamber during cultivation of cells using nondestructive optical etching," *Jpn J Appl Phys*, vol. 42, pp. L980-L982, 2003.
- [46] T. Kaneko, F. Nomura, T. Hamada, Y. Abe, H. Takamori, T. Sakakura, K. Takasuna, A. Sanbuissho, J. Hyllner, P. Sartipy, and K. Yasuda, "On-chip in vitro cell-network pre-clinical cardiac toxicity using spatiotemporal human cardiomyocyte measurement on a chip," *Sci Rep*, vol. 4, pp. 4670-1-8, 2014.
- [47] P. Igelmund, B. K. Fleischmann, I. R. Fischer, J. Soest, O. Gryshchenko, M. M. Bohm-Pinger, H. Sauer, Q. Liu, and J. Hescheler, "Action potential propagation failures in long-term recordings from embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in tissue culture," *Eur J Physiol*, vol. 437, pp. 669-679, 1999.
- [48] S. Kadota, I. Minami, N. Morone, J. E. Heuser, K. Agladze, and N. Nakatsuji, "Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets," *Eur Heart J*, vol. 34, pp. 1147-1156, 2013.
- [49] I. R. Efimov, V. P. Nikolski, and G. Salama, "Optical imaging of the heart," *Circ Res*, vol. 94, pp. 21-33, 2004.
- [50] A. Fujita, K. Fujita, O. Nakamura, T. Matsuda, and S. Kawata, "Control of cardiomyocyte orientation on a micro scaffold fabricated by photopolymerization with laser beam interference," *J Biomed Opt*, vol. 11, pp. 021015-1-5, 2006.
- [51] Y. Haraguchi, T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, and T. Okano, "Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 4765-4774, 2006.
- [52] D. Zhang, I. Y. Shadrin, J. Lam, H. Q. Xian, H. R. Snodgrass, and N. Bursac, "Tissue-engineered cardiac patch for advanced functional maturation of human ESC-derived cardiomyocytes," *Biomaterials*, vol. 34, pp. 5813-5820, 2013.
- [53] K. H. Gilchrist, G. F. Lewis, E. A. Gay, K. L. Sellgren, and S. Grego, "High-throughput cardiac safety evaluation and multi-parameter arrhythmia profiling of cardiomyocytes using microelectrode arrays," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 288, pp. 249-257, 2015.
- [54] Y. J. Wang, B. S. Chen, M. W. Lin, A. A. Lin, H. Peng, R. J. Sung, and S. N. Wu, "Time-dependent block of ultrarapid-delayed rectifier K<sup>+</sup> currents by aconitine, a potent cardiotoxin, in heart-derived H9c2 myoblasts and in neonatal rat ventricular myocytes," *Toxicol Sci*, vol. 106, pp. 454-463, 2008.

- [55] T. Meyer, K. H. Boven, E. Gunther, and M. Fejtl, "Micro-electrode arrays in cardiac safety pharmacology," *Drug Saf*, vol. 27, pp. 763-772, 2004
- [56] L. Sala, D. Ward-van Oostwaard, L. G. Tertoolen, C. L. Mummery, and M. Bellin, "Electrophysiological analysis of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hPSC-CMs) using multi-electrode arrays (MEAs)," *J Vis Exp*, vol. 123, p. e55587, 2017.
- [57] M. Tarr and D. P. Valenzeno, "Modification of cardiac ionic currents by photosensitizer-generated reactive oxygen," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 23, pp. 639-649, 1991.
- [58] M. Tarr and D. P. Valenzeno, "Modification of cardiac action potential by photosensitizer-generated reactive oxygen," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 21, pp. 539-543, 1989.
- [59] R. T. Pallandi, M. A. Perry, and T. J. Campbell, "Proarrhythmic effects of an oxygen-derived free radical generating system on action potentials recorded from guinea pig ventricular myocardium: A possible cause of reperfusion-induced arrhythmias," *Circ Res*, vol. 61, pp. 50-54, 1987.
- [60] M. Uesugi, A. Ojima, T. Taniguchi, N. Miyamoto, and K. Sawada, "Low-density plating is sufficient to induce cardiac hypertrophy and electrical remodeling in highly purified human iPSC cell-derived cardiomyocytes," *J Pharmacol Toxicol Methods*, vol. 69, pp. 177-188, 2014.
- [61] S. Bedut, C. Seminatore-Nole, V. Lamamy, S. Caignard, J. A. Boutin, O. Nosjean, J. P. Stephan, and F. Coge, "High-throughput drug profiling with voltage- and calcium-sensitive fluorescent probes in human iPSC-derived cardiomyocytes," *Am J Physiol Circ Physiol*, vol. 311, pp. H44-H53, 2016.
- [62] 広重力, 加藤正道, *小生理学*, 東京: 南山堂, 1995, pp. 17-33, 97-102.
- [63] M. J. Niedre, A. J. Secord, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, "In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy," *Cancer Res*, vol. 63, pp. 7986-7994, 2003.

図表

(a)



(b)

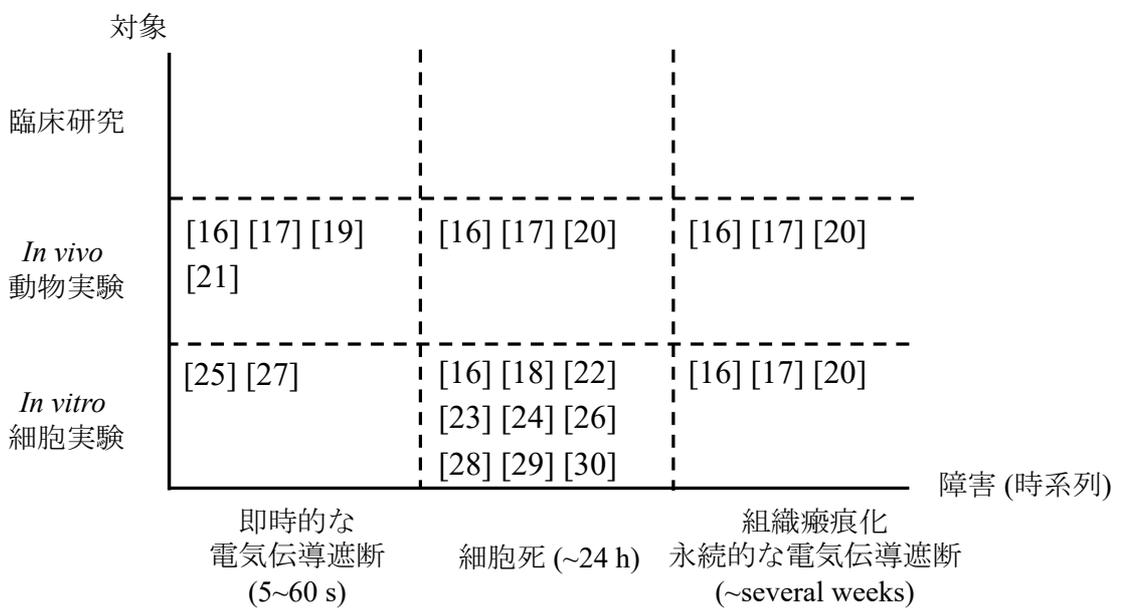


図 4-1 カテーテルアブレーションに関する基礎研究報告のまとめ

(a) 高周波アブレーションの基礎研究の報告

(b) 光線力学的治療を応用したアブレーション技術の基礎研究の報告

縦軸は障害検討モデルの段階、横軸は検討する障害の種類を示す。

表 4-1 2次元、3次元の心筋細胞電気伝導路作成法

方法	用途	文献
多電極アレイシステムを用いた 2次元ネットワークの形成	薬効評価	[41, 44-47]
蛍光色素による2次元 光学マッピング	薬効評価	[48, 49]
微細線状格子による 2次元ネットワーク形成	組織環境の再現	[50]
シリコン型など細胞培養足場を 利用した3次元培養	心臓移植のための 機能調査	[51, 52]

## 第 5 章 多電極アレイを用いた細胞外光増感反応による心筋細胞の接触電位変化の計測

### 5.1 緒言

本章では、50  $\mu\text{m}$  平方の多数の電極がパターンニングされた培養皿上で、培養した細胞の接触電位を計測できる多電極アレイを用い、細胞外光増感反応により生じる酸化障害による心筋細胞の接触電位変化を計測した。多電極アレイで計測した接触電位波形の振幅および形状に大きなバリエーションがあったため、補正を目指して電極上の細胞接着状態と接触電位波形振幅との関係を調査した。

### 5.2 光増感反応による心筋細胞電位変化：多電極アレイを用いた計測

#### 5.2.1 実験方法

##### 5.2.1.1 使用した多電極アレイシステムにおける心筋接触電位計測条件と細胞播種準備

この実験では、細胞の接触電位計測に 64 チャンネル微小電極アレイシステム (MED64, アルファメッドサイエンティフィック, 大阪) を使用した。本システムで用いる培養皿には図 5-1 に示すように 8×8 の 64 個の計測用電極がパターンニングされており、この上で細胞を培養することで細胞接触電位を計測できる。検出電極は一边が 50  $\mu\text{m}$  の正方形で、450  $\mu\text{m}$  ごとに配列されている。検出電極の外側には 4 つの参照電極があり、64 個の検出電極と中心を同じくする一边 10.2 mm の正方形の頂点にそれぞれ位置する。4 つの参照電極電位は平均され、検出電極との電位差が測定される。全ての電極は、電極のインピーダンスを小さくしノイズを低減させる目的で白金黒めっきが施されている。白金黒は細かな粉末状の白金で、海綿状のコロイドを形成するため表面積が広く、その結果低インピーダンスとなる [1]。64 の電極において同時計測された電位を増幅率 47 dB で電圧増幅し、ノイズ除去のため 1-10<sup>4</sup> Hz のバンドパスフィルタを通した。その後、計測電位をシステム付属の専用ソフトでサンプリング周波数 20 kHz、16 bit にてデジタイズし、専用のパソコンに記録した。この多電極アレイシステムを使用した報告例は多いが、細胞や組織の播種や培養の標準的な方法は定められていない。5.2.1 節の実験では、培養皿上での細胞培養に際して正確な電位計測を行うため以下の工夫を実施した。1) 図 5-1 に示すように、参照電極上に細胞が接触せず、計測電極の周辺に均一に細胞を播種するために、参照電極と計測電極を隔てるようにシリコン製の O リング (内径 6.8 mm、線径 1.9 mm) を接着した。2) 細胞の計測電極に対する接着性を高めるためコーティング剤としてタイプ I コラーゲン (Rat tail, Thermo Fisher Scientific, ウォルサム, アメリカ) 溶液を電極上にコーティングした。

### 5.2.1.2 心筋細胞の培養とタラポルフィンナトリウム溶液の調製

日齢 1-4 日の新生仔ラットの心室から採取した浮遊心筋細胞 (心筋細胞培養キット T-2・浮遊, コスモ・バイオ, 東京) を、培養皿に接着した O リングの内部 6.8 mmφ (36 mm<sup>2</sup>) に播種密度 1.7×10<sup>3</sup> cells/mm<sup>2</sup> にて播種した。電極上で細胞が点在したり、細胞の密度が低い場合、接触電位計測において S/N 比の高い信号が得られない。上記の播種密度は予備実験 (不記載) にて播種密度を 7.2×10<sup>2</sup>-8.8×10<sup>3</sup> cells/mm<sup>2</sup> の範囲で変化させたとき、播種領域内に細胞が均一に接着し、半数以上の電極において安定して接触電位計測が行えることを確認して採用した。細胞培養培地 (D-MEM/F-12, Thermo Fisher Scientific, ウォルサム, アメリカ) に 10% ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific, ウォルサム, アメリカ) および 10 U/mL ペニシリン・10 μg/mL ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific, ウォルサム, アメリカ) を混合した溶液を培養用培地として用いた。心筋細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> に設定されたインキュベータ内で培養し、1 日おきに培地交換を行った。心筋細胞は培養後約 3 日目から細胞が密集したクラスターを形成する。さらに数日経つとクラスターごとに拍動するようになる。光増感反応は播種した細胞の全域において拍動が安定した培養 5-7 日目に行った。前述の培養用培地を溶媒とし、タラポルフィンナトリウム (Meiji Seika ファルマ) 溶液を調製した。溶液の濃度は過去の *in vitro* 実験で使用されている 30 μg/ml とした [2]。

### 5.2.1.3 光増感反応の励起光照射系の構築

光増感反応の励起光を培養皿の上方から照射可能な実験系を作成した。実験系の概略図を図 5-1 に示す。励起光を培養皿の上方から照射すると、心筋細胞のある底面に到達する以前に励起光がタラポルフィンナトリウムに吸収され光増感反応が生じる。培養皿の下方から光照射を行えば、細胞のある底面から光増感反応が起きるため、光照射は下方から行う方が望ましい。この実験で上方からの光照射を採用したのは多電極アレイの電極が黒色で光を通さないため、下方から照射すると電極の直上にある細胞に励起光が当たらなくなるためである。タラポルフィンナトリウムの Q 帯吸収ピークである 664 nm に中心波長をもつ連続波長赤色半導体レーザ (Optical Fuel, ソニー, 東京) を光感受性薬剤の励起に用いた。タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトルとこの実験での励起波長を図 5-2 に示す。励起光はコア径 200 μm、NA = 0.37 の石英光ファイバー (WF200/220P37, CeramOptec, ボン, ドイツ) により伝送し、球面平凸レンズ (30 mmφ, FL = 35 mm) (SLSQ-30-35P, シグマ光機, 埼玉) によりコリメートした。コリメート光ビームの光強度は均一でないため、ビームプロファイラ (BeamGage®, Ophir Photonics, エルサレム, イスラエル) を用いて強度の分布を測定し、中心付近の ±10% 強度の光を照射に使用した。この光ビームを 7 mmφ のアパーチャーで切り出して培養皿に接着した内径 6.8 mm の O リング内部全域に励起光照射が行えるようにした。励起光強度はパワーメーター (PS19Q, FieldMaxII-TOP, Coherent, サンタクララ, アメリカ) で計測し 86 mW/cm<sup>2</sup> とした。光増感反応中の溶液温度を 37°C に保つために、培養皿の

下に PID 制御方式により温度を調節する温度制御ユニット (Thermo Plate, 東海ヒット, 静岡) を設置した。

#### 5.2.1.4 光増感反応中の心筋細胞接触電位計測および光増感反応前後の心筋細胞の形態変化観察

培養皿内の培養用培地を吸引除去し、5.2.1.2 項記載の方法で調製した 30  $\mu\text{g/ml}$  のタラポルフィンナトリウム溶液 1 ml を培養皿に注入した。このとき培養皿内の溶液液厚みは 2.9 mm である。タラポルフィンナトリウムが 30  $\mu\text{g/ml}$  のとき、ランバートベールの法則により、培養皿の上から照射した励起光は底面に達するまでに約 6 割減衰すると見積られる [3]。光感受性薬剤が細胞内に取り込まれる前、すなわち細胞外に主に分布した状態で光増感反応を行うために、タラポルフィンナトリウム溶液が心筋細胞へ接触してから光増感反応の励起光照射開始までの時間を 3 min 以内とした [4]。励起光は上記の減衰を考慮し 5.2.1.3 項記載の方法で調節し、86  $\text{mW/cm}^2$  で 600 s 間照射した (N=3)。このとき放射照射量は 51.6  $\text{J/cm}^2$  となる。光感受性薬剤濃度 30  $\mu\text{g/ml}$  のとき、この放射照射量で約 50% の細胞死が起こることが確認されている [2]。心筋細胞の自発拍動により発生する電位の 64 電極同時の計測は、光増感反応開始 60 s 前から行い、600 s 間の光増感反応中および光増感反応終了 60 s 後まで継続して行った。光増感反応による心筋細胞の形態変化を観察するために、反応の前後で倒立型顕微鏡 (IX70, オリンパス, 東京) を用いて細胞の画像を取得した。

## 5.2.2 実験結果

### 5.2.2.1 心筋細胞接触電位波形

図 5-3 (a) に本研究で測定した心筋細胞の自発拍動による接触電位波形のうち、報告されている心筋細胞の接触電位波形と類似の形状の波形を示す [5-7]。接触電位波形は 2 相性で、ベースラインからの鋭い立ち上がりとそれに続く急峻な電位降下 (第 1 相) と、緩やかな立ち上がりと小さいピーク (第 2 相) から成り立っていた。第 1 相の負のピークはナトリウムイオンチャネル電流、第 2 相の 1 つ目のピークは L 型カルシウムイオンチャネル電流、2 つ目のピークはカリウムイオンチャネル電流を反映することがわかっている [5-7]。64 電極での光増感反応前の測定波形の一例を図 5-3 (b) に示す。全電極のうち、図 5-3 に示すような波形が安定して出力される電極は平均すると半分程度であった。それ以外の電極では電位が検出されなかったり、膜電位波形に近い形状の波形が出力されたりした。64 電極のうち図 5-3 のような波形が記録された電極では、拍動のタイミングは全電極でほぼ同期していた。光増感反応の進行に伴い図 5-3 の波形形状が一時的あるいは連続的に変化してしまう場合もあった。

### 5.2.2.2 光増感反応による心筋細胞接触電位変化および心筋細胞形態変化

接触電位波形を解析する電極として、光増感反応開始直前の10拍動における波形の第一相の負のピークの絶対値(以下、第1負ピーク値)が0.5 mV以上の電極を選択した。図5-3で示した形状の波形における第1負ピーク値の、光増感反応開始30 s前から光増感反応時間60 sまでの変化を図5-4に示す。光増感反応開始前の第1負ピーク値は比較的安定しており、30 s間の平均値は $1.14 \pm 0.03$  mVであった。光増感反応開始とともに第1負ピーク値は単調に減少した。図5-5に同一の培養皿内の7個の電極で計測した放射照射量 $10 \text{ J/cm}^2$ までの第1負ピーク値変化を示す。電位は光増感反応開始直前10拍動の第1負ピーク値の平均で正規化している。第1負ピーク値の変化は以下の式(5-1)の指数関数に最小二乗法を用いてフィッティングした。

$$y = \alpha \exp(\beta t) + \gamma \quad (5-1)$$

$t$ は光増感反応の励起光照射時間、 $y$ は正規化された第1負ピーク値である。フィッティングの結果、各係数は $\alpha = 0.87$ 、 $\beta = -0.06$ 、 $\gamma = 0.09$ となり、このとき決定係数 $R^2$ は0.98であった。接触電位が初期値の $1/e$ に達する減衰時間は20.1 sであった。この減衰時間に関する検討は6.4.3節を参照されたい。

図5-6に顕微鏡で観察した光増感反応前後の心筋細胞形態の画像を示す。光増感反応後、特に心筋細胞の密度が薄い部分において細胞の凝集と剥離が観察された。反応後に剥離せず接着していた細胞の一部は膨化していた。

### 5.2.3 考察

#### 5.2.3.1 多電極アレイを用いた光増感反応による接触電位計測で評価できる心筋細胞障害

多電極アレイを用いた接触電位計測は、直接的かつ低侵襲に細胞の電位情報を取得できる方法として、主にイオンチャネルに対する薬効評価や毒性試験に利用されている[8-13]。著者が知る限りでは、酸化障害による細胞障害の評価に多電極アレイが使用された報告はこれまでにない。5.2.1節の実験では図5-4および5-5に示すように、光増感反応による酸化障害による影響が第1負ピーク値に現れた。多電極アレイを用いた計測はパッチクランプや蛍光色素プローブを用いた電位計測法と比較し侵襲性が低いため、光増感反応が心筋細胞電位に与える影響の評価に有用であると考えられる。

光増感反応により接触電位の第1負ピーク値は指数関数的に減少し、その値が初期値の $1/e$ に減衰したのは反応開始から20.1 s後であった。この減衰時間を、5.2.1節の実験と同様に光増感反応によるイオン動態の変化を測定している2つの報告と比較する[14, 15]。比較に用いた2つの報告では蛍光色素により細胞内のカルシウムイオン濃度変化を測定しており、5.2.1節の実験と同タイプの細胞、同じ光感受性薬剤を用いている。5.2.1節の実験と同じ光感受性薬剤濃度(30  $\mu\text{g/ml}$ )、約1.2倍の放射照度(103  $\text{mW/cm}^2$ )で実施された計測では、心筋細胞の周期的な拍動に伴うカルシウムイオン濃度の周期的な変化が光増感反応開始か

ら  $14 \pm 6$  s で消失しており、これはイオンチャネルや細胞膜障害により電位依存性カルシウムイオンチャネルからのカルシウムイオンの流入が停止したためと予想されている [14]。一方で、5.2.1 節の実験の約 0.7 倍の光感受性薬剤濃度 ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) および放射照度 ( $60 \text{ mW/cm}^2$ ) で実施された計測では、細胞膜に空いたポアからの細胞質の細胞外への流出に起因すると予想される細胞内カルシウムイオン濃度の減少が、光増感反応開始から約 450 s で生じていた [15]。このように 5.2.1 節の実験の減衰時間は、報告されているカルシウムイオンチャネル不活性化の発生時間とほぼ一致し、また細胞からのカルシウムイオン流出よりも短かった。5.2.1 節の実験および比較に用いた報告では、細胞外に薬剤が高濃度で分布した状態で光増感反応を行うため、主に細胞の外側で一重項酸素が生じ、細胞膜やイオンチャネルが酸化のターゲットになると考えられる。以上まとめると、5.2.1 節の実験で計測された接触電位変化は光増感反応が心筋細胞に与える障害のうち、細胞膜にポアが生じるよりも軽度のイオンチャネルレベルの障害を反映していると予測される。

### 5.2.3.2 光増感反応による心筋細胞の活動電位に対する酸化障害の進行

5.2.1 節の実験により、心筋細胞接触電位の第 1 負ピーク値が光増感反応の進行とともに減少することが明らかになった。実際、活性酸素種の酸化障害により、活動電位に関わるナトリウムイオンチャネルの機能は低下する [16]。よって、心筋細胞接触電位の第 1 負ピーク値の変化を観察すれば、光増感反応による活動電位障害を測定できる可能性がある。

図 5-5 に示すように、第 1 負ピーク電位はほぼ指数関数的に減少した。一般にある作用が単位時間あたり同じ割合で生じている場合、指数関数的減少が生じる。第 1 負ピーク値の指数関数的減少は、光増感反応による酸化障害の発生割合が一定であることを示していると考えられる。

溶液界面からの拡散のみの酸素供給がある *in vitro* 実験系において、溶液の全体積に対して光増感反応を行う場合、光増感反応速度に対応した酸素濃度減少が生じる [2, 17]。5.2.1 節の実験においては光増感反応の励起光照射体積が溶液体積の約 30% であるため、反応領域周囲より酸素が拡散で供給され、深刻な酸素濃度減少が生じないと予測できる。つまり 5.2.1 節の実験において光増感反応は一定の割合で発生しており、上記で議論した一定割合での活動電位減少を矛盾なく説明することができる。

## 5.3 接触電位波形と心筋細胞接着状態の関係

### 5.3.1 接触電位を用いた計測の問題点

接触電位計測は、心筋細胞電位を低侵襲で計測できる利点を持つが、5.2.2.1 項記載のように出力波形の安定性に関しては問題があった。具体的には、1) 測定される波形振幅および形状にバリエーションがある、2) 光増感反応の進行に伴い波形形状が変化する、という問題がある。細胞の接触電位計測においては、出力される電位波形に電極上の細胞の 3 次

元的な接触状態が影響することが予想される [14, 18, 19]。1) に関して、電極上の細胞の水平面  $(x, y)$  での密度の違いに関係するか検討した。

### 5.3.2 実験方法

光増感反応前に 5.2.1.4 項記載の方法で撮影された心筋細胞の位相差顕微鏡画像を利用した。画像内で心筋細胞が密集している部分は画像の輝度が高くなることを利用し、画像の輝度 (細胞密度) と電位振幅の関係を調査した。白黒の細胞画像の輝度を 8 bit 変換し、輝度を 0-255 で表示した。画像間の正規化のために、1つの画像で黒い電極部分の輝度を 0、細胞が密集し輝度が高くなっている部分の輝度が 255 となるようにした。接触電位法の電極周囲の測定範囲は特定できていないため、電極の幅を  $d$  としたとき、電極と中心を同じくした一辺  $2d$  および  $3d$  の正方形で表される 2つの領域を仮定し輝度の解析領域とした。解析領域内全域で輝度を合計し、輝度の合計値と解析領域内の電極で計測された電位波形振幅との相関を調べた。5.2.2.2 項記載の方法と同様に電位波形の振幅は第 1 負ピークの値を利用した。

### 5.3.3 実験結果

図 5-7 に心筋細胞画像の輝度と第 1 負ピーク電位の絶対値の関係を示す。 $2d$  および  $3d$  どちらの領域においても、輝度の上昇とともに振幅電位が大きくなる右上がりの傾向があった。しかし輝度と振幅の関係に直線近似を行ったところ、決定係数  $R^2$  は輝度領域の一辺  $2d$  および  $3d$  でそれぞれ 0.11、0.18 となり、明確な相関関係は得られなかった。

### 5.3.4 考察

5.3.2 節の実験では、電極上の水平面  $(x, y)$  での細胞密度と接触電位振幅の関係を調査した。画像から解析した輝度と振幅に明確な相関関係がなかったことから、 $xy$  方向の細胞接着密度が電位振幅におよぼす影響は確認できなかった。よって、波形バリエーション (5.3.1 節参照) は電極の法線方向 ( $z$  方向) の細胞接着状況の変化により生じている可能性がある。実際、接触電位計測をシミュレートする回路では、細胞と電極の間に抵抗成分が設置されていることも [18, 19]、 $z$  方向の細胞接着状況が波形形状に影響することを示唆している。また、光増感反応後に観察された細胞の剥離や膨化から、光増感反応に伴う波形バリエーションの発生 (5.3.1 節参照) は光増感反応中の  $z$  方向の接着状況変化から生じているとも予想される。5.2.1 節の実験で与えた光増感反応による障害が、多電極アレイを用いて一般に行われる薬効評価などで与えられる障害よりも強いとするならば、著者が用いた基板表面のコーティングが障害による細胞の膨張や剥離に耐えられず、 $z$  方向の接着状況の変化が生じたと考えられる。 $z$  方向の接着状況変化が波形形状に影響するということは、細胞の接着を維持するか、 $z$  方向の距離を計測し補正を行えば、光増感反応が与える障害を評価できる

可能性がある。細胞の接着状況を維持するためには、細胞が電極により強固に接着するようなコーティングの利用が有効である。コーティング剤のフィブロネクチンや、3次元細胞培養のためのゲルなどの使用が有効である可能性がある。 $z$ 方向の距離を計測し補正する方法としては、まず距離に関しては超音波顕微鏡や共焦点顕微鏡などを用いて計測し [20]、接触電位計測の電気回路モデルに計測した距離を代入して補正することが可能であると考えられる [18, 19]。これらの接着状況の維持および補正の改善は、いずれも多電極アレイの利点である簡便さを打ち消してしまうような方策であり、本研究の範囲内では発展的に行うことを中止した。

#### 5.4 結言

本章では、多電極アレイを用いた心筋細胞接触電位計測により光増感反応による心筋細胞電位変化を計測した。接触電位の第 1 負ピーク値の変化より、心筋細胞の活動電位に対する光増感反応による障害が評価できた。心筋細胞の電極周辺の接着状況のうち、電極に対する法線方向の接着が接触電位振幅および波形に大きく影響している可能性があるため、接着に対する改善が必要と考えられた。これらの改善や補正は本計測法の簡易性、利便性を損なうものであり、本研究では次章に示す別の低侵襲な活動電位計測法を適用することにした。

## 参考文献

- [1] 板倉聖宣, 湯沢光男, *原子と原子が会えるとき 触媒のなぞをとく*, 東京: 仮説社, 2001, pp. 79-81 .
- [2] E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, “Detailed in vitro study of the photosensitization reaction of extracellular talaporfin sodium in rat myocardial cells,” *Lasers Surg Med*, vol. 45, pp. 660-667, 2013.
- [3] M. H. Niemz, *Laser-tissue interactions fundamentals and application*, Berlin: Springer, 2007, pp. 9-44.
- [4] E. Ogawa, N. Machida, A. Ito, and T. Arai, “Comparison of myocardial cell survival 2 h and 24 h after extracellular talaporfin sodium-induced photodynamic reaction,” *Photodiagn Photodyn Ther*, vol. 13, pp. 196-200, 2013.
- [5] T. Meyer, K. H. Boven, E. Gunther, and M. Fejtl, “Micro-electrode arrays in cardiac safety pharmacology,” *Drug Saf*, vol. 27, pp. 763-772, 2004.
- [6] M. D. Halbach, U. Egert, J. Hescheler, and K. Banach, “Estimation of action potential changes from field potential recordings in multicellular mouse cardiac myocyte cultures,” *Cell Physiol Biochem*, vol. 13, pp. 271-284, 2003.
- [7] S. Ingebrandt, C. K. Yeung, M. Krause, and A. Offenhäusser, “Cardiomyocyte-transistor-hybrids for sensor application,” *Biosens Bioelectron*, vol. 16, pp. 565-570, 2001.
- [8] M. Taketani and M. Baudry, *Advances in network electrophysiology*, Berlin: Springer, 2006, pp. 274-290.
- [9] A. V. Sahakian, M. S. Peterson, S. Shkurovich, M. Hamer, T. Votapka, T. Ji, and S. S. Swiryn, “A simultaneous multichannel monophasic action potential electrode array for in vivo epicardial repolarization mapping,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 48, pp. 345-353, 2001.
- [10] Y. Nakamura, J. Matsuo, N. Miyamoto, A. Ojima, K. Ando, Y. Kanda, K. Sawada, A. Sugiyama, and Y. Sekino, “Assessment of testing methods for drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS cell-derived cardiomyocyte sheet: multi-site validation study,” *J Pharmacol Sci*, vol. 124, pp. 494-501, 2014.
- [11] M. Reppel, F. Pillekamp, Z. J. Lu, M. Halbach, K. Brockmeier, B. K. Fleischmann, and J. Hescheler, “Microelectrode arrays: a new tool to measure embryonic heart activity,” *J Electrocardiol*, vol. 37, pp. 104-109, 2004.
- [12] A. Stett, U. Egert, E. Guenther, F. Hofmann, T. Meyer, W. Nisch, and H. Haemmerle, “Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 377, pp. 486-495, 2003.

- [13] A. Natarajan, M. Stancescu, V. Dhir, C. Armstrong, F. Sommerhage, J. J. Hickman, and P. Molnar, "Patterned cardiomyocytes on micro-electrode arrays as a functional high information content drug screening platform," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 4267-4274, 2011.
- [14] A. Ito, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai, "Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium," *Photochem Photobiol*, vol. 87, pp. 199-207, 2011.
- [15] E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, "Dependence of damage within 10 min to myocardial cells by a photodynamic reaction with a high concentration of talaporfin sodium outside cells in vitro on parameters of laser irradiation," *Photodiagn Photodyn Ther*, vol. 15, pp. 1-5, 2016.
- [16] K. Fukuda, S. S. Davies, T. Nakajima, B. H. Ong, S. Kupersmidt, J. Fessel, V. Amarnath, M. E. Anderson, P. A. Boyden, P. C. Viswanathan, L. J. Roberts, and J. R. Balsler, "Oxidative mediated lipid peroxidation recapitulates proarrhythmic effects on cardiac sodium channels," *Circ Res*, vol. 97, pp. 1262-1269, 2005.
- [17] M. J. Niedre, A. J. Secord, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, "In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy," *Cancer Res*, vol. 63, pp. 7986-7994, 2003.
- [18] M. E. Spira and A. Hai, "Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology," *Nat Nanotech*, vol. 8, pp. 83-94, 2013.
- [19] K. Asakura, S. Hayashi, A. Ojima, T. Taniguchi, N. Miyamoto, C. Nakamori, C. Nagasawa, T. Kitamura, T. Osada, Y. Honda, C. Kasai, H. Ando, Y. Kanda, Y. Sekino, and K. Sawada, "Improvement of acquisition and analysis methods in multi-electrode array experiments with iPS cell-derived cardiomyocytes," *J Pharmacol Toxicol Methods*, vol. 75, pp. 17-26, 2015.
- [20] 高田邦明, *初めてでもできる共焦点顕微鏡活用プロトコール*, 東京: 羊土社, 2004, pp. 8-38.
- [21] M. Doi, E. Ogawa, and T. Arai, "Effect of a photosensitization reaction performed during the first 3 min after exposure of rat myocardial cells to talaporfin sodium in vitro," *Lasers Med Sci*, vol. 32, pp. 1873-1878, 2017.

図表

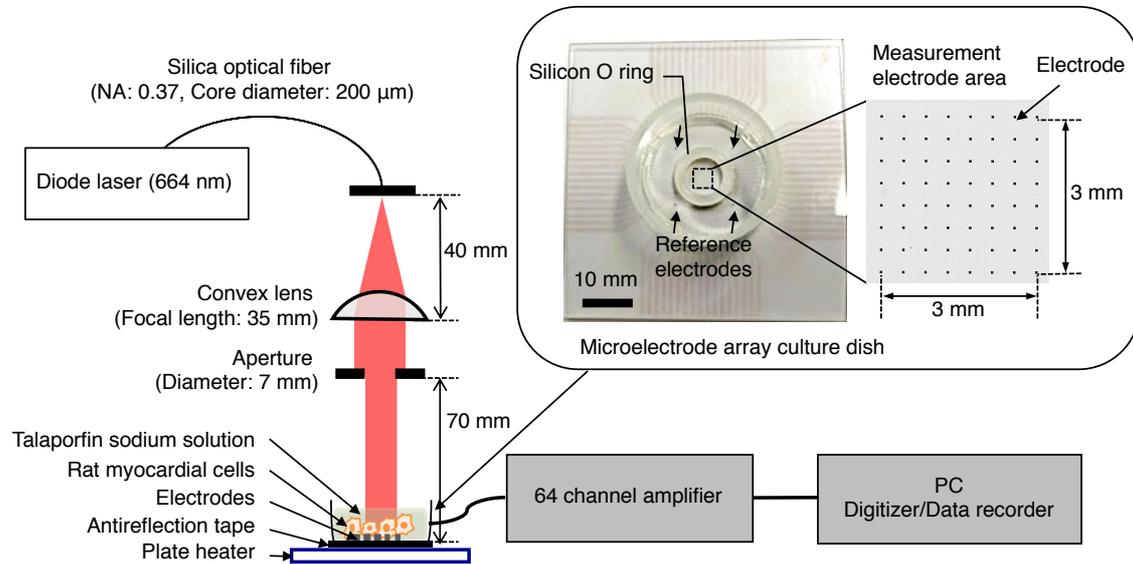


図 5-1 光増感反応中における心筋細胞接触電位計測の実験系

(文献 [21] M. Doi *et al.*, *Lasers Med Sci*, **32**, 1874, 2017 より。Springer Nature より許可を得て引用)

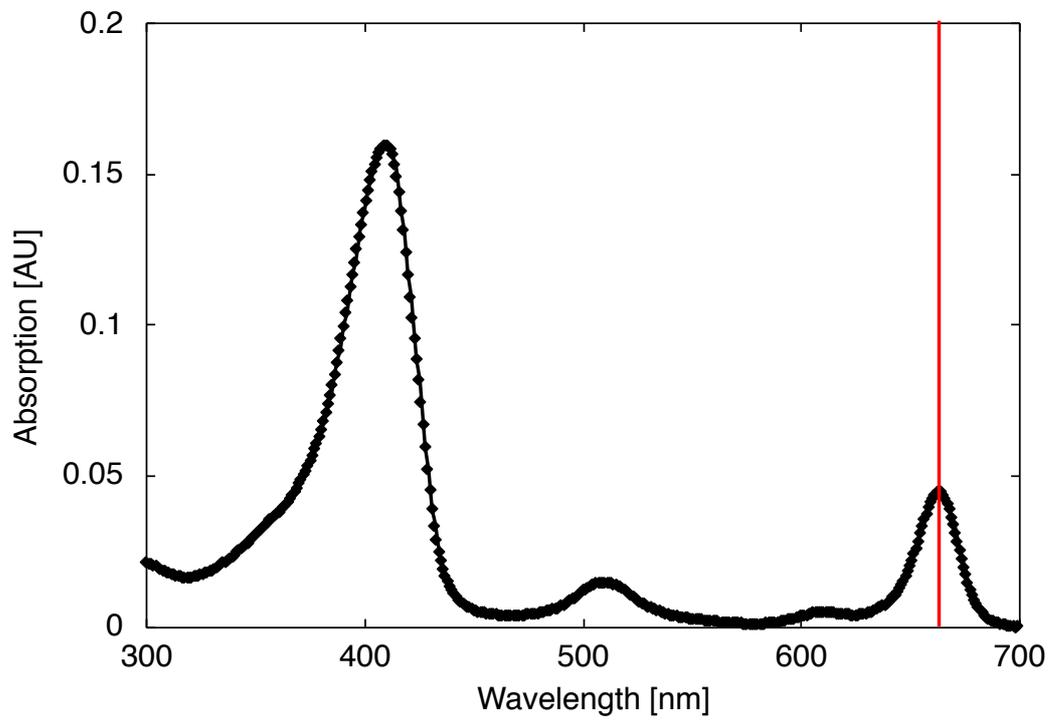
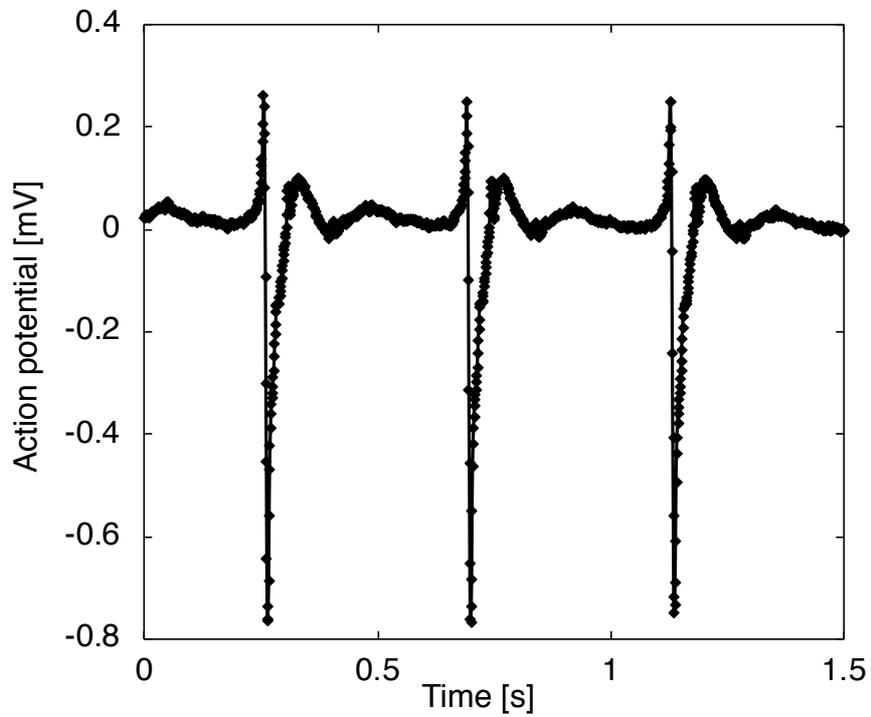


図 5-2 タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトルと 5.2.1 節の実験での励起波長

(a)



(b)

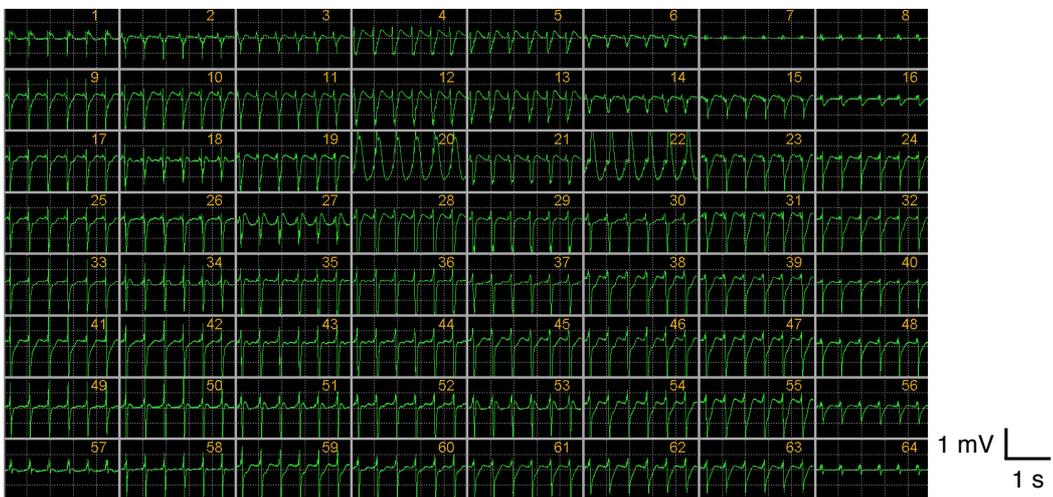


図 5-3 ラット心筋細胞の自発拍動による接触電位波形

(a) 文献報告と類似形状の接触電位波形 (文献 [21] M. Doi *et al.*, *Lasers Med Sci*, **32**, 1875, 2017 より。Springer Nature より許可を得て引用)

(b) 全 64 電極における光増感反応前の測定波形

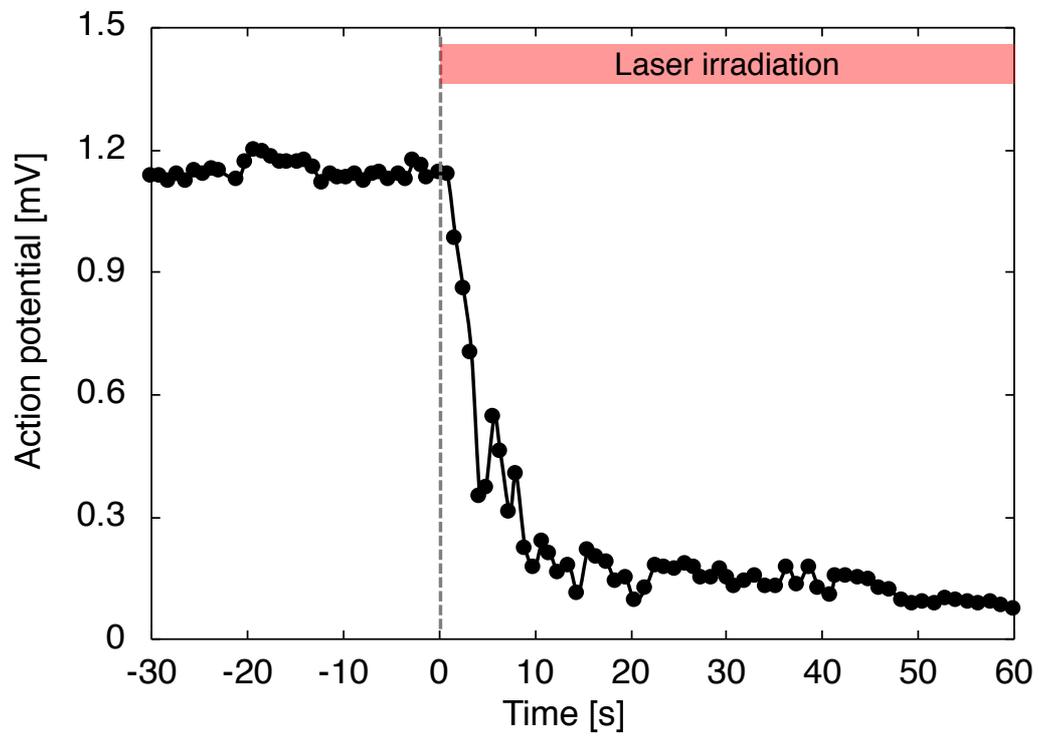


図 5-4 光増感反応前および反応中の心筋細胞接触電位の第1負ピーク変化の代表例

(文献 [21] M. Doi *et al.*, *Lasers Med Sci*, **32**, 1875, 2017 より。Springer Nature より許可を得て引用)

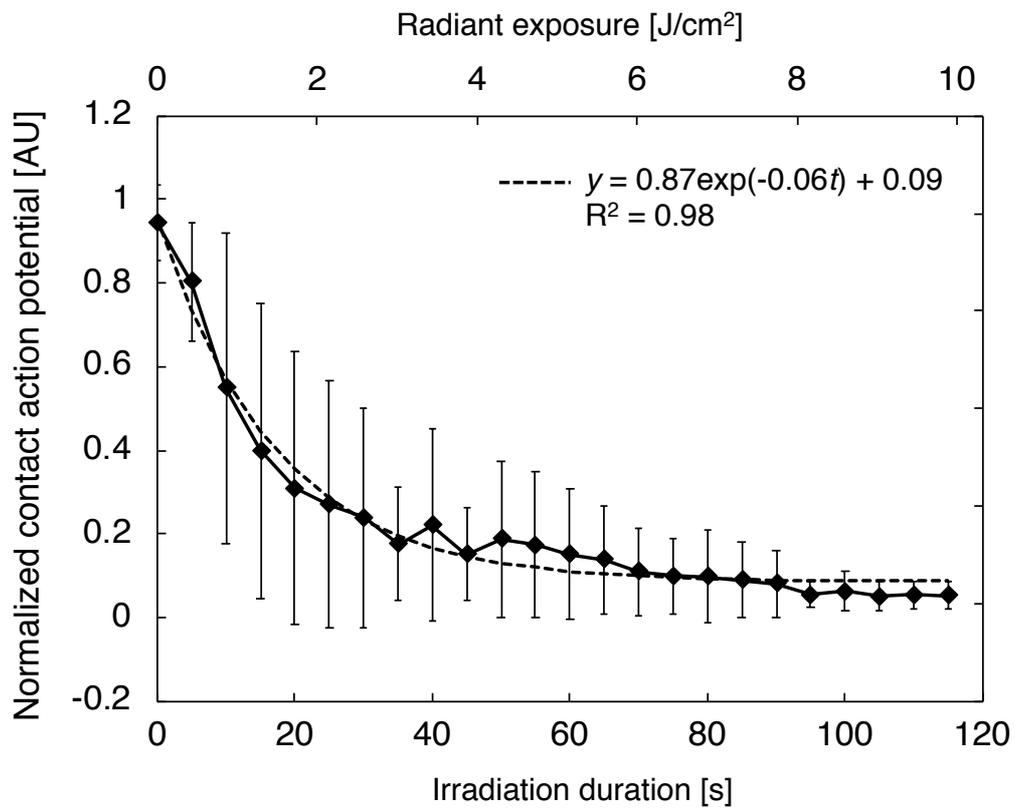


図 5-5 光増感反応中の心筋細胞接触電位の第1負ピーク変化 (N=7)

ただし、計測できた電極のみの結果である。

(文献 [21] M. Doi *et al.*, *Lasers Med Sci*, **32**, 1875, 2017 より。Springer Nature より許可を得て引用)

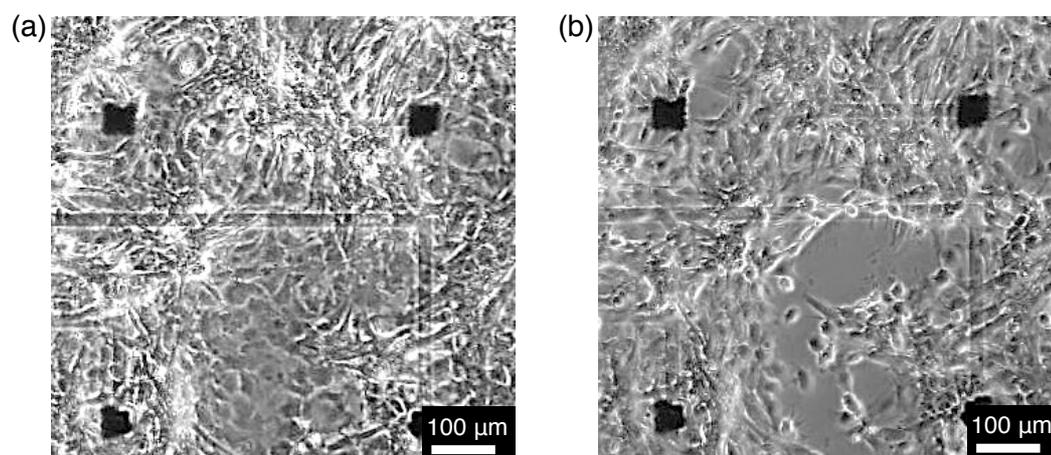


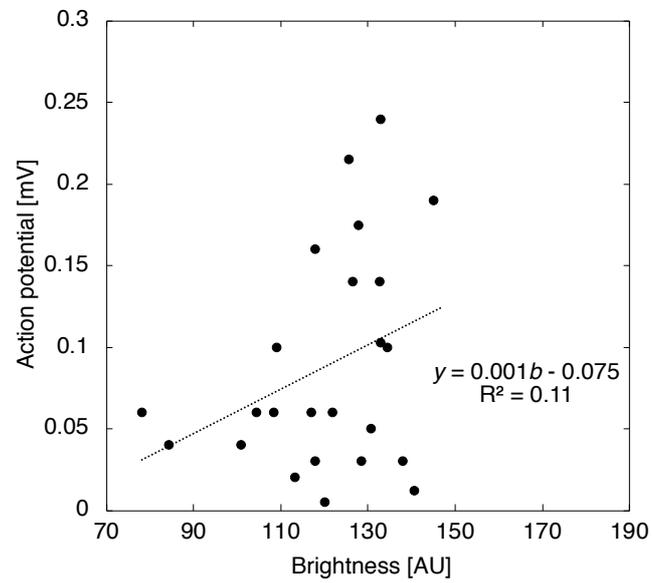
図 5-6 光増感反応前後の心筋細胞形態変化の位相差顕微鏡画像

(a) 光増感反応前

(b) 光増感反応後

(文献 [21] M. Doi *et al.*, *Lasers Med Sci*, **32**, 1876, 2017 より。Springer Nature より許可を得て引用)

(a)



(b)

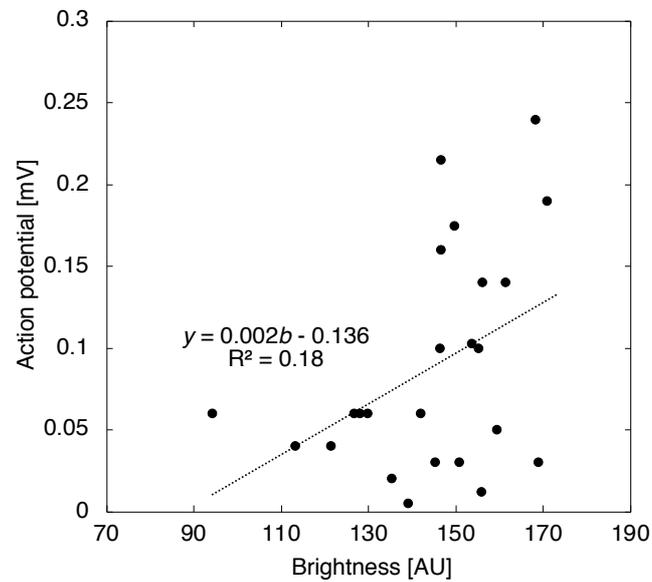


図 5-7 心筋細胞の位相差顕微鏡画像輝度と電位振幅の関係

(a) 輝度の解析領域: 電極の幅を  $d$  としたとき、電極と中心を同じくした一辺  $2d$

(b) 輝度の解析領域: 電極の幅を  $d$  としたとき、電極と中心を同じくした一辺  $3d$

## 第6章 膜電位感受性色素を用いた細胞外光増感反応による心筋細胞の活動電位変化の計測と *in vivo* との比較

### 6.1 緒言

本章では細胞外光増感反応により生じる酸化障害による心筋細胞の即時的な電位変化を測定する手法として、膜電位感受性色素を使用した。光増感反応の観点で *in vitro* モデルと *in vivo* モデルを比較すると、酸素環境が大きく異なっている。*In vitro* モデルの酸素供給を *in vivo* に近づけるために、タラポルフィンナトリウム溶液の灌流系を設計した。光増感反応による活動電位変化を *in vitro* モデルと *in vivo* モデルで比較するために、両モデルで共通に測定できる電位振幅に関する基準を定義した。定義した電位基準を用いて *in vitro* および *in vivo* 実験結果を比較し、提案した *in vitro* 実験系の妥当性を評価した。

### 6.2 光増感反応中の *in vitro* 心筋細胞電位変化

ラット心筋細胞における細胞外光増感反応による電位変化を膜電位感受性色素を用いて測定し、心筋細胞の活動電位に対する障害作用効果を *in vitro* 実験で調査した。

#### 6.2.1 実験方法

##### 6.2.1.1 心筋細胞の培養

5.2.1.2 項記載のものと同一ラット心筋細胞を、35 mmφ の培養皿上に設置した 10 mmφ のカバーガラスに  $1.2 \times 10^3$  cells/mm<sup>2</sup> の密度で播種し、5.2.1.2 項記載の培養用培地を用いて培養した。心筋細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> に設定されたインキュベータ内で培養し、1 日おきに培地交換を行った。心筋細胞がコンフルエントになる培養 3-7 日目に光増感反応を行った。

##### 6.2.1.2 タラポルフィンナトリウム溶液灌流チャンネル系

設計したタラポルフィンナトリウム溶液の灌流チャンネルを図 6-1 (a) に示す。チャンネル内にタラポルフィンナトリウム溶液を流すことで、励起光が照射される光増感反応領域に対して未反応の溶液を連続注入し、酸素および薬剤を連続的に供給することができる。灌流チャンネルの幅は、細胞を培養した 10 mmφ のカバーガラスの端を固定し、かつ培養部分が観察に使用できるように 8 mm とした。灌流チャンネルの長さは、顕微鏡観察に使用する流路の中央にて流れを発達した層流にするために、助走距離を考慮して 40 mm とした。灌流チャンネルの深さは、顕微鏡の水浸対物レンズ (6.2.1.3 項参照) の焦点距離に合わせて 3 mm とした。灌流チャンネルの底面に心筋細胞を培養したカバーガラスを設置した。タラポルフィンナトリウム溶液は 5.2.1.2 項記載の方法で調製し、溶液の濃度は *in vivo* 実験の血漿中薬剤濃度に合わせて 20 μg/ml とした [1]。ポンプは  $0.2 \times 10^{-6}$ -0.7 ml/s で溶液を注入できる

微量シリンジポンプ (YSP-201, ワイエムシィ, 京都) を用いた。灌流する溶液の流速は、予備実験にて 0.4 mm/s と 1 mm/s を比較し、シユアストレスによりカバーガラスから心筋細胞が剥がれず、かつ心筋細胞の自発拍動が停止しない流速として 0.4 mm/s (流量  $9.6 \times 10^{-3}$  ml/s) を採用した。溶液の粘性を  $9.6 \times 10^{-3}$  g/cm $\cdot$ s としたとき、この流れのレイノルズ数は 1.3 であり、溶液流れは完全な層流である [2]。灌流チャンネルの底板の下に温度制御ユニット (Thermo Plate, 東海ヒット, 静岡) を設置し、光増感反応中の細胞付近の溶液温度を  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  に維持した。

### 6.2.1.3 膜電位感受性色素による光増感反応中の心筋細胞活動電位測定

膜電位感受性色素 FluoVolt™ (Thermo Fisher Scientific, ウォルサム, アメリカ) を心筋細胞の膜電位変化の測定に用いた。FluoVolt™ (以下、膜電位色素) は電位変化に伴い蛍光輝度に変化する形式の膜電位感受性色素である [3]。タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトルと本実験での膜電位色素の励起および蛍光測定波長を図 6-2 に示す。タラポルフィンナトリウムの Soret 帯、Q 帯吸収ピークを避けた吸収が小さな波長領域に励起および蛍光ピーク波長 (522 および 535 nm) が存在するため、この膜電位色素を選定した [4]。心筋細胞の経時的な蛍光変化計測のために用いた蛍光観察実験系を図 6-1 (b) に示す。高感度かつ高速で蛍光計測ができるニポウ式共焦点ユニット (CSU-X1, 横河電機, 東京) を搭載した正立型顕微鏡 (BX51WI-FL-IRDIC, オリンパス, 東京) を用いた。顕微鏡の 40 倍の水浸対物レンズ (NA = 0.8, WD = 3 mm) (LUMPlanFL40x, オリンパス, 東京) を通して膜電位色素励起用のアルゴンイオンレーザ (波長 488 nm) (800BL, National Laser, ソルトレイクシティ, アメリカ) を細胞の上方向より照射した。励起条件は対物レンズの焦点面にて約 30 mW/cm $^2$ 、露光時間 20 ms とした。膜電位色素の蛍光は 520-535 nm のバンドパスフィルタ (YOKO520/35, Semrock, ロチェスター, アメリカ) を通し、電子増倍付 CCD カメラ (512 $\times$ 512 pixels) (DU897, Andor Technology, ベルファスト, イギリス) で検出した。検出度向上のため、複数ピクセルの情報を結合させて擬似的に受光面積を増やす手法 (ビニング) を用いた。今回は隣り合った 8 $\times$ 8 の pixel を 1 pixel とみなしたため、蛍光画像は 64 $\times$ 64 pixels となる。蛍光画像は 1 s あたり 49 フレーム、サンプリングレート約 20 ms で記録した。1 枚の蛍光画像画面に平均 60 個の心筋細胞が含まれている。灌流チャンネル内の心筋細胞に推奨値 (1000 倍) で希釈した膜電位色素溶液を加え、室温にて 10 min 間遮光接触させた。膜電位色素溶液を吸引除去し、心筋細胞を PBS (-) にて 1 回洗浄した後、6.2.1.2 項記載の方法で調製したタラポルフィンナトリウム溶液を心筋細胞に加え、溶液は流さずに 37 $^\circ\text{C}$  のインキュベータ内で 15 min 間遮光接触させた。このタラポルフィンナトリウム溶液の接触時間は *in vivo* 実験での薬剤投与から励起光照射開始までの時間に合わせた (6.3.1.1 項参照)。663 $\pm$ 2 nm に中心波長を持つ連続波長半導体レーザ (Rouge-LD, サイバーレーザー, 東京) をタラポルフィンナトリウムの励起に使用した。膜電位色素励起用のレーザ光と同様、40 倍水浸対物レンズを

通して 663 nm 光を照射した。対物レンズの焦点距離 3 mm と開口数 0.8 より、出射ビームは溶液中で上面 4.5 mmφ の逆円錐形になる。細胞培養カバーガラス上の 0.14 mmφ の焦点面にて励起光の放射照度が 5, 10, 15, 30 mW/cm<sup>2</sup> となるようにした (各照射条件で N=5-9)。溶液灌流と励起光照射を同時に開始した。膜電位色素蛍光の 100 s 以上の連続観察は細胞に障害を与えることが予備実験にて明らかであった。そこで、膜電位色素の励起光とタラポルフィンナトリウムの励起光をスイッチングして、膜電位色素の蛍光を間欠的に測定した。照射サイクルを図 6-3 に示す。膜電位色素の励起光を 5.5 s、タラポルフィンナトリウム励起光を 30 s 照射する操作を照射の 1 サイクルとし、このサイクルをタラポルフィンナトリウム励起光の照射時間が 300 s となるまで繰り返した。測定した蛍光画像から以下のプロセスを介して電位波形を得た。蛍光輝度の各ピクセルを 16 bit でデジタル化し、蛍光輝度を画像の全領域で合計して 5.5 s の観察時間にわたって 20 ms のサンプリングレートごとに記録した。この電位波形をフーリエ変換し、10 Hz のハイカットフィルタを通して高周波ノイズを除去した。電位波形のうち、拍動間で輝度の変化率が約±2%の区間をベースラインとし、ベースラインからの上昇開始点と電位ピークとの差を心筋細胞電位の振幅と定義した。計測 1 サイクルの振幅値は、この間に計測される十数回の拍動のうち無作為に選択した 5 拍動での平均振幅とした。タラポルフィンナトリウム励起光の照射開始直前の計測値で電位振幅を正規化した。光増感反応が心筋細胞活動電位に与える効果を評価する基準として、電位振幅が初期値の 1/e に減少するまでに必要な放射照射量 [J/cm<sup>2</sup>] (以下、有効放射照射量) を用いた。有効放射照射量は実質的には光増感反応のエネルギー効率の逆数を示す値である。

#### 6.2.1.4 膜電位感受性色素のフォトブリーチングによる影響の評価

一般に色素を励起するとフォトブリーチングが生じるため、膜電位色素のフォトブリーチングによる影響を検討する 2 つの対照実験を行った。

- 1) 【対照実験 1】膜電位色素の励起光 (488 nm) による膜電位色素のフォトブリーチングの影響：膜電位色素の励起光 (488 nm) と灌流は 6.2.1.3 項記載の実験と同条件で行い、灌流溶液はタラポルフィンナトリウムを含まない培養用培地とし、タラポルフィンナトリウムの励起光 (663 nm) を照射せずに行った。照射サイクルを図 6-4 (a) に示す。6.2.1.3 項記載の実験と同様の方法で膜電位色素の励起光照射時の蛍光強度減少を評価し、心筋細胞の自発拍動間隔の変化からフォトブリーチング由来の一重項酸素による影響を評価した。
- 2) 【対照実験 2】タラポルフィンナトリウムの励起光 (663 nm) による膜電位色素のフォトブリーチングの影響：膜電位色素の励起光 (488 nm) に関する条件を、放射照度約 70 mW/cm<sup>2</sup>、蛍光画像取得 1 s あたり 90 フレーム、サンプリングレート約 10 ms とし、他の条件は 6.2.1.3 項記載の実験と同条件で行った。タラポルフィンナトリウムを含まない

培養用培地を使用し、測定中の溶液の灌流は行わなかった。タラポルフィンナトリウムの励起光 (663 nm) 放射照度を  $120 \text{ mW/cm}^2$  とした。膜電位色素の励起光を 10 s、タラポルフィンナトリウムの励起光を 60 s 照射する操作を照射の 1 サイクルとし、このサイクルをタラポルフィンナトリウムの励起光の照射時間が 300 s となるまで繰り返した。照射サイクルを図 6-5 (a) に示す。対照実験 1 と同様の方法で膜電位色素の励起光照射時の蛍光強度減少およびフォトブリーチング由来の一重項酸素による影響を評価した。また、488 nm および 663 nm 光の吸収エネルギーをタラポルフィンナトリウムの吸収係数および励起光照射時間から推定することにより、タラポルフィンナトリウムの膜電位色素励起光 (488 nm) による光増感反応惹起の影響を評価した。488 nm の吸収エネルギーが 663 nm の約 5% であると見積もられたことから、この影響は無視できると判断した。

## 6.2.2 実験結果

### 6.2.2.1 心筋細胞の膜電位波形と膜電位感受性色素のフォトブリーチングによる影響の評価

図 6-6 に心筋細胞の自発拍動による膜電位色素蛍光輝度の代表的な変化を示す。縦軸の蛍光輝度は 6.2.1.3 項に記載した理由から相対電位とみなせる。計測した電位波形は報告されている心筋細胞の膜電位波形とほぼ同様の形状を示した [5]。対照実験 1, 2 の結果を以下に示す。

- 1) 【対照実験 1】膜電位色素の励起光 (488 nm) による膜電位色素のフォトブリーチングの影響: 図 6-4 (b) に示すように、励起光の照射時間あたり約  $0.34\%/s$  の速度で蛍光輝度が減少し、全体で約 20% 減少した。一方図 6-4 (c) に示す拍動間隔は、観察サイクル開始時の値で正規化すると観察サイクル後は  $1.0 \pm 0.2$  であったため、膜電位色素のフォトブリーチングと同時に発生するであろう一重項酸素の心筋細胞に対する障害は、実験に影響を与えない程度と判断した。
- 2) 【対照実験 2】タラポルフィンナトリウムの励起光 (663 nm) による膜電位色素のフォトブリーチングの影響: 図 6-5 (b) に示すように、663 nm 光を 300 s 間照射した後の蛍光強度減少は約 20% であった。図 6-5 (c) に示す拍動間隔は、観察サイクル開始時の値で正規化すると観察サイクル後は  $1.0 \pm 0.1$  であった。対照実験 2 は、タラポルフィンナトリウムの励起光の効果に加え、対照実験 1 の結果で示した膜電位色素の励起光によるフォトブリーチングの影響を含んでいる。対照実験 2 における 488 nm 光の照射条件は対照実験 1 とほぼ同等である (6.2.1.4 項参照)。対照実験 2 の結果が対照実験 1 とほぼ一致したことから、タラポルフィンナトリウムの励起光によるフォトブリーチングの影響に関して補正の必要はないと判断した。

以上より著者は、光増感反応が心筋細胞電位に与える効果の評価には、測定した蛍光輝度をフォトブリーチングによる減少レートに関して補正して用いた。

### 6.2.2.2 光増感反応による心筋細胞膜電位変化

タラポルフィンナトリウムの励起光照射中の心筋細胞電位の時間変化を図 6-7 に示す。照射時間の経過に伴い心筋細胞電位は単調に減少した。各放射照度における心筋細胞電位の変化を最小二乗法を用いて以下の式 (6-1) にフィッティングした。

$$y = \alpha \exp(\beta t) + \gamma \exp(\delta t) \quad (6-1)$$

$t$  はタラポルフィンナトリウム励起光の照射時間、 $y$  は心筋電位の相対値である。表 6-1 に各放射照度における式 (6-1) の各係数の値とフィッティングの決定係数を示す。細胞の膜電位にはイオンチャンネルにおけるイオン交換が関与するが、酸化に対するイオンチャンネルの反応は、チャンネルの種類によって異なることが知られている [6, 7]。心筋細胞電位の減少が 2 つの指数関数の式にフィッティングできたのは、酸化に対する種々のイオンチャンネルの反応が反映されたためと考えられる。6.2.1.3 項で定義した有効放射照射量の放射照度依存性を図 6-8 に示す。5-30 mW/cm<sup>2</sup> の放射照度内で有効放射照射量が単調に増加した。この増加傾向は、放射照度の増加に伴う光増感反応のエネルギー効率の低下を意味する。図 6-8 における放射照度の最大値 (30 mW/cm<sup>2</sup>) と最小値 (5 mW/cm<sup>2</sup>) の有効放射照射量を比較すると、30 mW/cm<sup>2</sup> の有効放射照射量は 5 mW/cm<sup>2</sup> の約 1.8 倍であった。これを光増感反応効率に言い換えると、30 mW/cm<sup>2</sup> は 5 mW/cm<sup>2</sup> の約 60% のエネルギー効率であった。

## 6.3 光増感反応中の *in vivo* 心筋電位変化

イヌの上大静脈内壁に位置する心筋組織における細胞外光増感反応による電位変化を電極カテーテルを用いて測定し、即時的な電位障害効果を *in vivo* 実験で調査した。

### 6.3.1 実験方法

#### 6.3.1.1 イヌ上大静脈におけるカテーテルの設置と光増感反応条件

体重 9.9 kg、月齢 8 ヶ月のビーグル犬を使用した。動物実験はヘルシンキ宣言を遵守しており、動物実験実施施設 IVTeC (アイビーテック成田ラボ, 千葉) の動物倫理委員会の承認の下で行った。右心房の上部に結合する上大静脈の内壁に位置する薄い心筋組織に対して光増感反応を行った。10 mg/kg のケタミンおよび 2 mg/kg のキシラジンを用いてイヌを鎮静した。その後、イソフルラン 2-5% 含有医療用酸素ガス (1.5-2.0 L/min) を気化器より送気し全身深麻酔を行った。後述するレーザカテーテルを上大静脈へ導入するために、右大腿静脈に順行性に 8 Fr のロングガイディングシース (Fast-Cath<sup>TM</sup> SR0, St. Jude Medical, セントポール, アメリカ) を挿入した。心筋の電位計測に用いる 10 対のバイポーラ電極を持つ環状電極カテーテル (Lasso<sup>®</sup> catheter, Biosense Webster, アーバイン, アメリカ) を上大静脈へ導入するため、右外頸静脈に順行性に 8 Fr のショートシース (Radifocus<sup>®</sup> Introducer II, テルモ, 東京) を挿入した。上大静脈内での電極カテーテルおよびレーザカテーテルの配置を図 6-9 に示す。レーザカテーテルは洞房結節の少なくとも 10 mm 上部に、電極カテーテルはレ

ーザカテーテルの 2-4 mm 上部にそれぞれ固定した。タラポルフィンナトリウムを 0.9%の生理食塩水 (大塚生食注, 大塚製薬, 東京) に溶解した溶液を 2.5 mg/kg の濃度で左大腿静脈からイヌに投与した。663 nm に中心波長を持つ連続波長赤色半導体レーザー (Optical Fuel, ソニー, 東京) をタラポルフィンナトリウムの励起に用いた。タラポルフィンナトリウムが間質中に高濃度で分布していると推定される投与後 15 min 後から、励起光を 180 s 間照射した [8]。10 対の電極カテーテルでの心筋電位の測定は、光増感反応開始約 5 min 前-終了約 5 min 後まで行った。電極カテーテルで計測した心筋の電位波形は、ベースラインから正負方向に振れる多峰性形状をとるため、1 拍動中の最小値から最大値までの全幅を電位波形の振幅と定義した。光増感反応が心筋電位に与える効果を評価する基準として、*in vitro* 実験と同様に有効放射照射量を用いた。

### 6.3.1.2 環状型レーザーカテーテルの構造と放射パワーの設定

レーザー照射に使用した環状側射型レーザーカテーテルを図 6-10 (a) に示す。上大静脈内壁の心筋と接するリング部分外側から拡散光が出射されるように本レーザーカテーテルは設計されている [9]。励起光の照射により数 mm の高さを持つリング形の障害領域が上大静脈内壁の心筋に形成される。レーザーカテーテル断面における構成部品の配置を図 6-10 (b) に示す。レーザーカテーテル先端のリング部分は、5 つのカテーテル環状部貫通ルーメンを持つ透明な Pebax<sup>®</sup>製のチューブと、そのルーメンの内部に挿入された部品で構成されている。中心のルーメンに挿入するニッケル・チタンワイヤーを用いてリングの形状を保持することができる。中心以外の 4 つのルーメンのうち中心を挟んだ 2 つにはそれぞれ光拡散体と、直径可変のためのテンションワイヤーが挿入されており、残りの 2 つは空洞である。光拡散体は柔軟性のある 250  $\mu\text{m}\phi$  のプラスチック光ファイバーで、均一な拡散光が長さ 80 mm のブラスト加工部分から出射される。拡散光の強度は拡散体からの距離の関数となり正確な放射照度の計測が難しいため、放射照度の単位 [ $\text{W}/\text{cm}^2$ ] ではなく、慣習的に単位長さあたりの放射パワー [ $\text{W}/\text{cm}$ ] で表記される [10, 11]。本論文ではこの表記に従っている。レーザーカテーテルからの励起光の単位長さあたりの放射パワーを 25  $\text{mW}/\text{cm}$  とした。予備実験で計測したレーザーカテーテルからの相対放射照度分布を図 6-10 (c) に示す。図 6-10 (b) に示すようにレーザーカテーテル断面の光拡散体が入ったルーメンの中心を通る軸を  $x$  軸、この軸と直行し中心のルーメンの中央を通る軸を  $y$  軸と定義し、相対放射照度分布を表示している。相対放射照度分布のうち最大強度の  $1/e$  となる強度までをメインビームと定義すると、メインビームは  $x$  軸から約 $\pm 30^\circ$ であり、このメインビーム内の平均相対放射強度は最大相対放射照度 (図 6-10 (c) の  $x=0$  での値) の 0.68 倍となる。単位長さあたりの放射パワー 25  $\text{mW}/\text{cm}$  が得られるようにレーザーカテーテルに光を入力した際の、図 6-10 (c) の  $x=0$  での放射照度の実測値を 0.68 倍した値 (34  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) をカテーテル表面の放射照度 [ $\text{mW}/\text{cm}^2$ ] とみなした。

### 6.3.1.3 血中のタラポルフィンナトリウム濃度計測および上大静脈内壁の心筋厚みの計測

血中のタラポルフィンナトリウム濃度計測のため、励起光照射開始時および終了後 5 min 時に静脈血を採取し、血液抗凝固剤である EDTA-2K を含む採血管 (Venoject®, テルモ, 東京) に注入した。血液サンプルを  $1.9 \times 10^3$  g で 5 min 遠心分離し、血漿を分離した。微量分光光度計 (Colibri Microvolume Spectrometer, Titertek-Berthold, プフォルツハイム, ドイツ) を用いて血漿中薬剤の 664 nm の吸光度を測定した。事前に作成した検量線を用いて計測した吸光度をタラポルフィンナトリウム濃度に換算した。イヌを試験の 1 ヶ月後に犠牲死させ、障害領域を観察するために上大静脈を摘出した。上大静脈を 10% のホルマリン溶液で約 1 週間固定した後、展開して障害領域を切り出し、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。倒立型顕微鏡 (FSX100, オリンパス, 東京) を用いて染色標本を観察し、障害領域の心筋厚みを測定した。

### 6.3.2 実験結果

ホルマリン固定後の展開した上大静脈を図 6-11 に示す。肉眼での観察から、上大静脈内壁には血流方向に沿って帯状の薄い心筋組織が分布していることがわかった。HE 染色した組織標本の顕微鏡観察より、上大静脈内壁の障害領域での心筋厚みは 0.50-0.76 mm であった。図 6-12 (a) に、電極カテーテルの 10 対の電極で計測した光増感反応開始前の心筋活動電位波形を示す。上大静脈内壁の心筋組織は帯状に分布し、心筋がついていない部分もあったため、環状電極カテーテルの 10 対の電極のうち電位を出力することができたのは数対の電極であった。大動脈弓と接する方向の上大静脈壁は部分的に厚く、固くなっており、上大静脈断面が三角形に近い形状をしていたため、カテーテルの全周で接触状態が確保できない。電位が出力された数対の電極のうち、連続的に電位が計測できたのは電極カテーテルの 3-4 および 11-12 番電極の 2 対に限られていた。光増感反応の前後にこの 2 対の電極で測定した心筋電位を図 6-12 (b) に示す。両電極対において、光増感反応後に活動電位波形の振幅が減少していた。この 2 対の電極の励起光照射中の電位振幅変化を図 6-13 に示す。連続的に電位計測ができたこの 2 対においても、上記の接触状況より電位は変動を含んでいた。この電位変動にもかかわらず、105 s から 120 s にかけて光増感反応による心筋電位減少が明確に生じた。接触による電位変動の影響を避けるために、電位の正規化にあたっては 0-105 s までの電位の平均値を光増感反応前の代表値とし、この平均電位値が 1 となるように正規化した。グラフ中の各データポイントを直線で結び、初期電位振幅値の  $1/e$  になるのに必要な照射時間を求めたところ、3-4 および 11-12 番電極対で、それぞれ 175 s および 118 s となった。光増感反応前および光増感反応開始 5 min 後で、血漿中のタラポルフィンナトリウム濃度はそれぞれ 21  $\mu\text{g/ml}$  および 16  $\mu\text{g/ml}$  と測定され、これは *in vitro* 実験で用いた濃度 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) の  $\pm 20\%$  に含まれていた。

## 6.4 考察

### 6.4.1 *In vitro* 実験における酸素供給

ヘモグロビンに化学的に溶解している酸素が存在する *in vivo* モデルと、*in vitro* モデルの酸素環境を同じにするのは困難である (4.4.2 節参照)。本節では設計した *in vitro* モデルの酸素供給の改善効果について、光増感反応効率の点から議論する。

反応領域内の酸素、光感受性薬剤、および光感受性薬剤の励起光のバランスが光増感反応の効率に影響をおよぼす。6.2.1.3 項の *in vitro* 実験において、放射照度が  $5 \text{ mW/cm}^2$  から  $30 \text{ mW/cm}^2$  に増加したとき、光増感反応効率が約 40%低下した。通常、励起光強度が増加すると酸素あるいは光感受性薬剤が不足し、光増感反応効率が低下する [12, 13]。 *In vitro* モデルには物理溶解酸素しか存在しないため [14]、励起光強度の増加により酸素減少・枯渇が生じやすい。本 *in vitro* 実験では反応前後の光感受性薬剤濃度の減少が 1-2%であったため、反応中は十分に薬剤が存在しており、光増感反応効率の低下は酸素濃度不足により生じたと考えられる。ここで、6.2.1.3 項の *in vitro* 実験の光増加反応効率の低下を報告例と比較することで酸素改善の効果を検討する。比較には心筋細胞およびタラポルフィンナトリウムを用いた *in vitro* 実験報告を用いる [12]。光増感反応による光感受性薬剤蛍光のブリーチング速度が光増感反応効率に比例するとみなし [15]、報告例の光増感反応効率と酸素濃度減少の関係を求めた。報告例においては、初期値から 70%の酸素濃度減少により 97.5%の光増感反応効率の低下が生じていた。6.2.1.3 項の *in vitro* 実験では 40%の光増感反応効率低下が生じており、減少率は報告例の半分以下である。以上より、6.2.1.3 項の *in vitro* 実験において酸素濃度が低下しているものの、新しい溶液を流すことで酸素濃度低下が少なく、光増感反応効率低下が小さかったと解釈できる。

次に、光増感反応領域に流れを設けることで、どの程度酸素濃度の改善が得られるか、流れの観点から見積もる。流れのある液体中での光化学反応中の酸素濃度は以下の式 (6-2) で記述される [16]。

$$[\text{O}_2] = [\text{O}_2]_0 \exp\left(-\frac{kx}{v}\right) \quad (6-2)$$

$[\text{O}_2]_0$  ( $\text{mol/mm}^3$ ) は光増感反応領域の上流での酸素濃度、 $k$  ( $\text{s}^{-1}$ ) は光増感反応中の酸素の消費レート、 $v$  ( $\text{mm/s}$ ) は流速、 $x$  ( $\text{mm}$ ) は反応領域の幅を表す。放射照度と酸素消費レートが比例関係にあると仮定して、過去の報告から酸素消費レートを 0.15 と算出した [12]。6.2.1.3 項記載のように、タラポルフィンナトリウムの励起光は溶液中で上面  $4.5 \text{ mm}\phi$  の逆円錐形となっているため、反応領域幅  $x$  にはこの逆円錐形の半分の高さでの直径と同じ  $x = 2.25 \text{ mm}$  を用いた。反応領域上流での酸素濃度で正規化した、反応領域内の相対酸素濃度分布を図 6-14 (a) に示す。反応領域内で酸素濃度相対値は単調に減少し、流速  $0.4 \text{ mm/s}$  のとき、下流端では初期値の 40%程度となった。反応領域端 ( $x = 2.25 \text{ mm}$ ) での相対酸素濃度の流速依存性を図 6-14 (b) に示す。灌流による改善効果は、流れがない  $v = 0 \text{ mm/s}$  の酸素濃度を基準と

して比較するのが妥当だが、式 (6-2) では  $v = 0 \text{ mm/s}$  とすると不定になるので、 $0.4 \text{ mm/s}$  の5%に相当する  $v = 0.02 \text{ mm/s}$  を基準とした。式 (6-2) を用いると  $v = 0.4 \text{ mm/s}$  のときの反応領域内の酸素濃度は、 $v = 0.02 \text{ mm/s}$  での濃度の約9.7倍と計算できるため、流れによる十分な反応中酸素濃度の改善が認められる。以上、報告例との比較および溶液流れによる反応領域内での酸素濃度改善の計算より、6.2.1.3 項の *in vitro* 実験系では従来の *in vitro* 系よりも *in vivo* に近づけた酸素環境を実現できた。

流れにより *in vitro* モデルの酸素供給を改善したが、血流のある *in vivo* と同等の酸素供給は実現できていない。*In vitro* で酸素供給量をさらに増やすために、溶液の流速を増加させる方法がある。実施した *in vitro* 実験の流速は、シェアストレスによる心筋細胞の基板からの剥離で決まっている。6.2.1.2 項記載の灌流チャンネルと同オーダの寸法の流路を使用した他の *in vitro* 実験報告では、 $1\text{--}3 \text{ mm/s}$  の流速を用いているため [17, 18]、細胞の接着をより強固にすれば細胞剥離を生ぜずに流速を上昇させる可能性がある。例えば 6.2.1.2 項記載の灌流チャンネルで  $3 \text{ mm/s}$  の流れを用いた場合、6.2.1.3 節記載の実験で用いた  $0.4 \text{ mm/s}$  の約1.4倍の酸素供給ができる。流速を上昇させるには、細胞剥離を防止するため、1) 培養液の粘性を下げる、2) 細胞の基板に対する接着性を上げる、改善が必要である。後者については、5.3.4 節記載の方法と同様の工夫が有効であると考えられる。*In vitro* 反応領域内の酸素供給量を増やす他の方法として、反応溶液中にヘモグロビンを添加して化学溶解量を増やす方法がある。浜田らは、*in vitro* での光増感反応の容器に血中の2%程度の赤血球を添加することで、物理溶解量とほぼ同量の化学溶解酸素が供給できると報告している [19]。ただしこの方法では、溶液吸収の増加により発熱や励起光の不均一分布などが考えられる。

#### 6.4.2 *In vivo* 実験における光感受性薬剤濃度と励起光強度の関係

*In vivo* モデルの酸素供給を考えると、酸素はヘモグロビンに結合して運搬されており、大きな化学溶解量を持つ。光増感反応に必要な酸素は血流により反応領域に豊富に供給されるため、光増感反応による酸素濃度減少および枯渇が生じ難いと考えられる。酸素が豊富に存在する状態では、フォトブリーチングによる光感受性薬剤量の減少が光増感反応効率に強く影響する可能性がある [20]。6.3.1 節の *in vivo* 実験における光感受性薬剤濃度と励起光強度の関係を、光増感反応により電気伝導遮断効果が生じた類似の報告と比較することで、光増感反応効率を検討する [21]。実験条件の違いを確認すると、報告では 6.3.1 節の実験 ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) の約1.5倍の光感受性薬剤濃度 ( $33 \mu\text{g/mL}$ ) と、6.3.1 節の実験 ( $25 \text{ mW/cm}$ ) の約1.7倍の励起光強度 ( $43 \text{ mW/cm}$ ) であった。6.3.1 節の実験と上記報告の光感受性薬剤濃度および励起光強度の比率がほぼ同じであったことから、6.3.1 節の実験における光感受性薬剤および励起光強度のバランスは報告例とほぼ同様だった。よって、酸素が十分に供給されていると仮定すれば、6.3.1 節の実験でも光増感反応が効果的に生じていると考えられる。

### 6.4.3 *In vitro* および *in vivo* 実験における有効放射照射量の比較

*In vitro* と *in vivo* の実験結果を同一基準で比較するために、本第 6 章では有効放射照射量という基準を設定した (6.2.1.3 項参照)。*In vivo* での有効放射照射量を求め、図 6-8 に示す *in vitro* での有効放射照射量と比較する。6.3.2 節記載の *in vivo* 実験結果から、電位振幅が初期の  $1/e$  に減少するまでに必要な光照射時間は 118 s および 175 s である。*In vivo* における有効放射照射量を算出するために、心筋組織内での放射照度を推定する。*In vivo* 実験で用いた上大静脈内側の心筋組織の厚みは最大 0.76 mm であった。電極カテーテルのバイポーラ電極の寸法と対応する電位測定可能な組織深さの関係から [22]、電極カテーテルを用いて測定した心筋電位は被測定心筋全層の電位を反映していると考えられる。180 s の励起光照射時間中に心筋全層において電位が初期値の  $1/e$  以下になっていた。心筋組織の活動電位が心筋全層において、深さ方向に対する依存性がなく計測されていると考え、少なくとも最大厚みの  $1/2$  である 0.38 mm では電気伝導性が消失していたと考えられる。そのため、0.38 mm を以下で代表値として用いる。生体組織中の放射照度  $I(z)$  の減衰は、ランバートベールの法則を用いて

$$I(z) = I_0 \exp(-\mu_{\text{eff}}z) \quad (6-3)$$

と書ける [23]。ここで  $\mu_{\text{eff}}$  は実効的な減衰係数を示し、吸収係数  $\mu_a$  および等価散乱係数  $\mu_s'$  を用いて

$$\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s')} \quad (6-4)$$

と書ける [23]。哺乳類の心筋組織の吸収係数および等価散乱係数はほぼ変化無いと考え、ブタ心筋組織の 664 nm における各係数の文献値 ( $\mu_a = 0.21 \text{ mm}^{-1}$ ,  $\mu_s' = 2.0 \text{ mm}^{-1}$ ) を利用し [24]、式 (6-4) を用いて実効的な減衰係数を  $1.18 \text{ mm}^{-1}$  と算出した。6.3.1.2 項記載のように、単位長さあたりの放射パワー  $25 \text{ mW/cm}$  で、励起光を照射した際のレーザカテーテル表面の放射照度は  $34 \text{ mW/cm}^2$  である。心筋の表面から最大厚み 0.76 mm までの放射照度を上記の減衰係数および式 (6-3) を用いて計算し、上記の光照射時間を乗じて求めた、心筋表面からの深さと有効放射照射量の関係を図 6-15 に示す。代表値とした  $z = 0.38 \text{ mm}$  において放射照度は  $22 \text{ mW/cm}^2$  であり、有効放射照射量は  $2.6\text{-}3.9 \text{ J/cm}^2$  と計算される。*In vitro* の有効放射照射量は、 $22 \text{ mW/cm}^2$  のとき、図 6-8 より約  $6 \text{ J/cm}^2$  である。このように *in vivo* と *in vitro* モデルの有効放射照射量のオーダーが一致したことは、両モデルで同じオーダーの効率で光増感反応が生じていたためと考えられる。よって、酸素環境の改善および電位に関する基準の設定により、*in vivo* 状況を検討できる *in vitro* モデルの設計ができたと思われる。

5.2.2.2 節記載の接触電位計測下の *in vitro* 実験において、 $86 \text{ mW/cm}^2$  で光増感反応を行ったとき、電位が初期値の  $1/e$  に達する減衰時間は 20.1 s であった。放射照度と減衰時間を乗じると有効放射照射量は  $1.7 \text{ J/cm}^2$  と計算され、この有効放射照射量は 6.2.1.3 項の *in vitro* 実験の半分以下と大幅に高効率な値となった。しかし、両 *in vitro* 実験で同じ放射照度で実験を行っておらず、溶液内の酸素環境も異なると考えられるため、比較は難しいと思われる。

#### 6.4.4 本研究の limitation

本研究の limitation は 4 つある。1) *in vitro* 実験において流した溶液の流速をパラメータとした調査を行っていない。また、酸素濃度の実測を行っていない。2) *in vitro* および *in vivo* 両方の実験においてヒト心筋/心筋細胞を用いていない。3) *in vitro* および *in vivo* 実験における電位信号源が異なる。*In vitro* 実験では心筋細胞の自発電位を測定しているのに対し、*in vivo* 実験では洞房結節を発端とし、心筋組織を伝導した電位を測定している。4) *in vivo* 実験を 4 頭のイヌに対して行ったにもかかわらず、心筋電位が連続的に安定して計測できた 1 頭の結果のみの提示にとどまった。この不安定さの原因としては、レーザカテーテルおよび電極カテーテルの心筋に対する接触状況が不安定であったことが挙げられる。また、上大静脈内壁の心筋組織の分布に非常に個体差があったことも一因である。上大静脈内壁にほとんど心筋組織がついていない例もあった。

### 6.5 本研究の新規性と応用

#### 6.5.1 類似研究の文献調査と本研究の新規性

本研究の要点である、*in vivo* と *in vitro* における活動電位を用いた障害の比較評価、および *in vitro* 実験系での酸素供給改善に関して文献的に調査し、本研究の新規性を明確にする。

物理・化学的作用による細胞障害を活動電位で評価した *in vivo* 報告に関して、研究の目的、細胞の種類、作用機構、電位計測法、電位評価基準、の 5 項目に関して調査した。熱による心筋の電位障害や、薬物誘発性の電位障害などを調査した報告があるが [25-31]、本研究と目的が異なり、報告数も少ない。*In vitro* 報告についても、物理・化学的作用による細胞障害を活動電位で評価した報告に関して [6, 7, 32-49]、*in vivo* と同様に上記の 5 項目に関して調査した。光増感反応に使用する薬剤、細胞の種類、電位計測法は異なるものの、本研究と作用機構が同一で、活動電位の振幅を用いて障害評価をしている報告が複数ある [32-38]。本研究では、作用効率を基準として *in vitro* モデルと *in vivo* を比較することで、*in vivo* の作用を推測できるような *in vitro* モデルを作成した。同じ作用に対して *in vitro* 実験と *in vivo* 実験を同時に実施している報告として、光増感反応を用いた抗菌治療の基礎研究がある [50]。この報告では *in vitro* と *in vivo* で同一の反応条件を用いているが、*in vitro* と *in vivo* の光増感反応作用を、光増感反応後の残細胞数で比較している。また、*in vivo* での光強度に関して、組織内の光侵達長を考慮していない。*In vivo* と *in vitro* との酸素環境の違いについても考慮していない。また本研究では、*in vitro* において溶液流れを用いた酸素供給の改善を行っている。類似した流路系が虚血再灌流障害や人工肝臓の *in vitro* モデルにおける酸素供給の制御に一般に用いられているが [51-58]、本研究のように溶液を流しながら色素の蛍光計測を行っている文献は少ない。以上要するに、心筋細胞に対する光増感反応による活動電位障害の検討を行うという観点における、本研究の新規性は以下の 3 項目である。

1) *In vitro* と *in vivo* での光増感反応による障害作用を、反応のエネルギー効率を用いて比

較した点。

- 2) *In vivo* で電位測定、光励起作用の2つの観点から薄い心筋組織を採用し、さらに組織内光強度の計算も含んでいる点。
- 3) *In vitro* において、酸素供給量を貯留系より増やした実験系を使用している点。

### 6.5.2 光線力学的治療の基礎研究における作成した *in vitro* モデルの応用

本第6章で作成した、光線力学的治療による心筋細胞の電位障害を研究するための *in vitro* モデルは、心筋細胞と同様に電位計測による機能の評価が一般的に行われている神経組織に対して応用できる可能性がある。光増感反応による神経組織に対する影響の検討が必要で、本 *in vitro* モデルが適用できる可能性のある光線力学的治療について、以下に述べる。

#### 6.5.2.1 皮膚の光線力学的治療

皮膚に対する光線力学的治療は、腫瘍壊死あるいは免疫調整効果を得るために、主に皮膚癌や炎症性皮膚病に対して実施されている (3.2.4 節参照)。侵襲性が低く、治療後の皮膚の状態が美容的面で優れることから期待されている。一方で、光照射中あるいは照射後の痛みや熱感の発生が課題となっている [59]。これらの副作用の原因は、一重項酸素による神経線維に対する酸化障害や高熱による組織障害である。特に、光感受性薬剤 5-ALA の化学構造が神経伝達物質に類似していることから、末梢神経に取り込まれ、一重項酸素による神経線維障害が発生する [60]。神経活動は電位計測により評価できるので、本研究で用いた電位評価方法が応用可能であると思われる。また、皮膚の光線力学的治療に使用される励起光の照射条件は、50-70 mW/cm<sup>2</sup>、照射時間 140-800 s (炎症性皮膚病の場合) と 6.2.1.3 項記載の *in vitro* 実験条件と同オーダーである [59]。光感受性薬剤 5-ALA の一重項酸素の量子収率は 0.54 であり [61]、本研究で使用したタラポルフィンナトリウムの 0.7 倍である。基礎実験で用いられる薬剤濃度は 20-2000 µg/ml と幅があるが [60]、6.2.1.3 項記載の実験と同様 20 µg/ml の場合、一重項酸素産生量は 0.7 倍程度と概算される。薬剤濃度が 6.2.1.3 項記載の実験と同オーダーであれば、本実験と同オーダーの効率で光増感反応が起こり、酸素消費量も 6.2.1.3 項記載の実験と同程度と考えられるため、6.2.1.2 項で実施した *in vitro* における溶液流れによる酸素供給の改善が有効であると思われる。

#### 6.5.2.2 悪性脳腫瘍の光線力学的治療

悪性脳腫瘍は致死率が高く、予後が不良の腫瘍として知られている [62]。外科的に切除するのが一般的であるが、重要な機能を持つ臓器で全く侵襲不可能な領域も多く、広範囲浸潤性の腫瘍であり、完全治癒切除は困難である。悪性脳腫瘍の再発は腫瘍の浸潤部位から生じるため、我が国の悪性腫瘍に対する光線力学的治療は、腫瘍摘出術後の周囲浸潤部位に関して適用されている [62]。正常な脳の機能を保全しながら浸潤細胞を治療すること

ができるため、期待されている。光増感反応による脳の神経に対する基礎研究で、神経における電位伝達に対する障害について調査している報告は少ない。神経活動は電位計測により評価できるため、本研究での電位評価法を用いて、悪性脳腫瘍に対する光線力学的治療における副作用検討を行うことが可能であると考えられる。

## 6.6 結言

本章では、光増感反応により生じる酸化障害による心筋細胞の即時的な電位変化を *in vitro* で測定する手法として、膜電位感受性色素を使用した。タラポルフィンナトリウム溶液の灌流系を設計し、*in vitro* モデルの酸素供給を改善した。流速 0.4 mm/s で溶液を流すことにより、0.02 mm/s の場合と比較し約 9.7 倍の酸素供給の改善を行うことができた。光増感反応による活動電位変化を *in vitro* モデルと *in vivo* モデルで比較するために、両モデルで共通に測定できる電位振幅に関する基準を定義した。電位振幅が初期値の  $1/e$  に減少するまでに必要なエネルギーを *in vitro* および *in vivo* モデルで比較したところ、エネルギーのオーダーが一致したことから、心筋細胞/心筋の電位に与える効果の観点では、*in vivo* 調査に有効な *in vitro* モデルの設計ができたと思われる。

## 参考文献

- [1] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, K. Nakajima, S. Kashimura, Y. Katsumata, T. Nishiyama, N. Nishiyama, Y. Tanimoto, Y. Aizawa, T. Arai, and K. Fukuda, “Electrical superior vena cava isolation using photodynamic therapy in a canine model,” *Europace*, vol. 18, pp. 294-300, 2015.
- [2] 杉山弘, 遠藤剛, 新井隆景, *流体力学*, 東京: 森北出版, 2-14, pp. 57-58.
- [3] F. Ceriani and F. Mammano, “A rapid and sensitive assay of intercellular coupling by voltage imaging of gap junction networks,” *J Cell Commun Signal*, vol. 11, p. 78, 2013.
- [4] E. W. Miller, J. Y. Lin, E. P. Frady, P. Steinbach, W. B. Kristan, and R. Y. Tsien, “Optically monitoring voltage in neurons by photo-induced electron transfer through molecular wires,” *Proc Natl Acad Sci*, vol. 109, pp. 2114-2119, 2012.
- [5] D. P. Zipes and J. Jalife, *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside*, Amsterdam: Elsevier, 2009, pp. 29-42.
- [6] M. Tarr and D. P. Valenzeno, “Modification of cardiac ionic currents by photosensitizer-generated reactive oxygen,” *J Mol Cell Cardiol*, vol. 23, pp. 639-649, 1991.
- [7] D. P. Valenzeno and M. Tarr, “Membrane photomodification of cardiac myocytes: potassium and leakage currents,” *Photochem Photobiol*, vol. 53, pp. 195-201, 1991.
- [8] S. Mitra and T. H. Foster, “In vivo confocal fluorescence imaging of the intratumor distribution of the photosensitizer mono-L-aspartylchlorin-e6,” *Neoplasia*, vol. 10, pp. 429-438, 2008.
- [9] M. Doi, E. Ogawa, and T. Arai, “Comparison of an in vivo model with an in vitro model based on the electrical potential decrease in the myocardium or myocardial cells by an extracellular photosensitization reaction,” *JJSLSM*, 2018/11/10 accepted.
- [10] H. J. Nyst, R. L. P. Van Veen, I. B. Tan, R. Peters, S. Spaniol, D. J. Robinson, F. A. Stewart, P. C. Lavendag, and H. J. C. M. Sterenberg, “Performance of a dedicated light delivery and dosimetry device for photodynamic therapy of nasopharyngeal carcinoma: phantom and volunteer experiments,” *Lasers Surg Med*, vol. 39, pp. 647-653, 2007.
- [11] M. C. Teichert, J. W. Jones, M. N. Usacheva, and M. A. Biel, “Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model,” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, vol. 93, pp. 155-160, 2002.
- [12] E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, “Detailed in vitro study of the photosensitization reaction of extracellular talaporfin sodium in rat myocardial cells,” *Lasers Surg Med*, vol. 45, pp. 660-667, 2013.
- [13] E. Ogawa, M. Kurotsu, and T. Arai, “Irradiance dependence of the conduction block of an in vitro cardiomyocyte wire,” *Photodiag Photodynam Ther*, vol. 19, pp. 93-97, 2017.

- [14] 広重力, 加藤正道, *小生理学*, 東京: 南山堂, 1995, pp. 89-106.
- [15] J. S. Dysart and M. S. Patterson, "Characterization of photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro," *Phys Med Biol*, vol. 50, pp. 2597-2616, 2005.
- [16] K. J. Laidler, *Reaction kinetics*, Oxford: Pergamon Press, 1963, pp. 25-29.
- [17] A. L. Rops, C. W. Jacobs, P. C. Linssen, J. B. Boezeman, J. F. Lensen, T. J. Wijnhoven, L. P. van den Heuvel, T. H. van Kuppevelt, J. van der Vlag, and J. H. Berden, "Heparan sulfate on activated glomerular endothelial cells and exogenous heparinoids influence the rolling and adhesion of leucocytes," *Nephrol Dial Transplant*, vol. 22, pp. 1070-1077, 2007.
- [18] A. D. van der Meer, K. Vermeul, A. A. Poot, J. Feijen, and I. Vermes, "A microfluidic wound-healing assay for quantifying endothelial cell migration," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 298, pp. H719-H725, 2009.
- [19] R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, "Oxygen-enriched photosensitizer medium with red blood cells to study tissue interaction of photosensitization reaction," *Photomed Laser Surg*, vol. 36, pp. 252-257, 2017.
- [20] R. Bonnett and G. Martinez, "Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy," *Tetrahedron*, vol. 57, pp. 9513-9547, 2001.
- [21] T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, M. Takahashi, E. Ogawa, Y. Katsumata, T. Nishiyama, N. Nishiyama, Y. Tanimoto, Y. Aizawa, T. Arai, and K. Fukuda, "Optimal conditions for cardiac catheter ablation using photodynamic therapy," *Europace*, vol. 17, pp. 1309-1315, 2015.
- [22] A. J. Fuglevand, D. A. Winter, A. E. Patla, and D. Stashuk, "Detection of motor unit action potentials with surface electrodes: influence of electrode size and spacing," *Biol Cybern*, vol. 67, pp. 143-153, 1992.
- [23] 小原實, 荒井恒憲, 緑川克美, *レーザー応用工学*, 東京: コロナ社, 1998, pp. 167-169.
- [24] H. Nakazawa, M. Doi, E. Ogawa, and T. Arai, "Optical coefficient measurements using bulk living tissue by an optical fiber puncture with FOV change," *Proc SPIE*, vol. 10492, pp. 104920P-1-5, 2018.
- [25] T. A. Simmers, J. M. De Bakker, F. H. Wittkampf, and R. N. Hauer, "Effects of heating on impulse propagation in superfused canine myocardium," *J Am Coll Cardiol*, vol. 25, pp. 1457-1464, 1995.
- [26] R. W. Gulch, R. Baumann, and R. Jacob, "Analysis of myocardial action potential in left ventricular hypertrophy of Goldblatt rats," *Basic Res Cardiol*, vol. 74, pp. 69-82, 1979.
- [27] H. Nakaya, Y. Takeda, N. Tohse, and M. Kanno, "Effects of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blockers on the action potential shortening in hypoxic and ischaemic myocardium," *Br J Pharmacol*, vol. 103, pp. 1019-1026, 1991.

- [28] A. G. Kléber, M. J. Janse, F. J. Van Capelle, and D. Durrer, "Mechanism and time course of S-T and T-Q segment changes during acute regional myocardial ischemia in the pig heart determined by extracellular and intracellular recordings," *Circ Res*, vol. 42, pp. 603-613, 1978.
- [29] S. H. Litovsky and C. Antzelevitch, "Rate dependence of action potential duration and refractoriness in canine ventricular endocardium differs from that of epicardium: role of the transient outward current," *J Am Coll Cardiol*, vol. 14, pp. 1053-1066, 1989.
- [30] H. Tritthart, R. Volkmann, R. Weiss, and A. Fleckenstein, "Calcium-mediated action potentials in mammalian myocardium," *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, vol. 280, pp. 239-252, 1973.
- [31] R. R. Fenichel, M. Malik, C. Antzelevitch, M. Sanguinetti, D. M. Roden, S. G. Priori, J. N. Ruskin, R. J. Lipicky, and L. R. Cantilena, "Drug-induced torsades de pointes and implications for drug development," *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 15, pp. 475-495, 2004.
- [32] L. Kunz and G. Stark, "Photofrin II sensitized modifications of ion transport across the plasma membrane of an epithelial cell line: I. electrical measurements at the whole-cell level," *J Membrane Biol*, vol. 166, pp. 179-185, 1998.
- [33] F. Killing, L. Kunz, and G. Stark, "Photomodification of the electrical properties of the plasma membrane: a comparison between 6 different membrane-active photosensitizers," *J Membrane Biol*, vol. 181, pp. 41-46, 2001.
- [34] M. Tarr and D. P. Valenzano, "Modification of cardiac action potential by photosensitizer-generated reactive oxygen," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 21, pp. 539-543, 1989.
- [35] P. Schaffer, H. Ahammer, W. Müller, B. Koidl, and H. Windisch, "Di-4-ANEPPS causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes," *Pflügers Arch*, vol. 426, pp. 548-551, 1994.
- [36] K. G. Specht and M. A. J. Rodgers, "Depolarization of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action," *Photochem Photobiol*, vol. 51, pp. 319-324, 1990.
- [37] K. G. Specht and M. A. J. Rodgers, "Plasma membrane depolarization and calcium influx during cell injury by photodynamic action," *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1070, pp. 60-68, 1991.
- [38] I. E. Kochevar, J. Bouvier, M. Lynch, and C. Lin, "Influence of dye and protein location on photosensitization of the plasma membrane," *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1196, pp. 172-180, 1994.
- [39] Y. C. Chen, Y. H. Kao, C. F. Huang, C. C. Cheng, Y. J. Chen, and S. A. Chen, "Heat stress responses modulate calcium regulations and electrophysiological characteristics in atrial myocytes," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 48, pp. 781-788, 2010.
- [40] D. P. Valenzano and M. Tarr, "Calcium as a modulator of photosensitized killing of H9c2 cardiac cells," *Photochem Photobiol*, vol. 74, pp. 605-610, 2001.

- [41] D. P. Valenzeno and M. Tarr, "GH<sub>3</sub> cells, ionic currents and cell killing: photomodification sensitized by rose bengal," *Photochem Photobiol*, vol. 68, pp. 519-526, 1998.
- [42] M. Tarr and D. P. Valenzeno, "Photomodification of cardiac membrane: chaotic currents and high conductance states in isolated patches," *Photochem Photobiol*, vol. 68, pp. 353-360, 1998.
- [43] M. Tarr, A. Frolov, and D. P. Valenzeno, "Photosensitization-induced calcium overload in cardiac cells: direct link to membrane permeabilization and calcium influx," *Photochem Photobiol*, vol. 73, pp. 418-424, 2001.
- [44] M. Tarr, E. Arriaga, and D. P. Valenzeno, "Progression of cardiac potassium current modification after brief exposure to reactive oxygen," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 27, pp. 1099-1109, 1995.
- [45] M. Tarr, E. Arriaga, K. K. Goertz, and D. P. Valenzeno, "Properties of cardiac I<sub>LEAK</sub> induced by photosensitizer-generated reactive oxygen," *Free Radic Biol Med*, vol. 16, pp. 477-484, 1994.
- [46] R. T. Pallandi, M. A. Perry, and T. J. Campbell, "Proarrhythmic effects of an oxygen-derived free radical generating system on action potentials recorded from guinea pig ventricular myocardium: a possible cause of reperfusion-induced arrhythmias," *Circ Res*, vol. 61, pp. 50-54, 1987.
- [47] K. Fukuda, S. S. Davies, T. Nakajima, B. H. Ong, S. Kuperchmidt, J. Fessel, V. Amarnath, M. E. Anderson, P. A. Boyden, P. C. Viswanathan, L. J. Roberts II, and J. R. Balsler, "Oxidative mediated lipid peroxidation recapitulates proarrhythmic effects on cardiac sodium channels," *Circ Res*, vol. 97, pp. 1262-1269, 2005.
- [48] P. G. Joshi, K. Joshi, S. Mishra, and N. B. Joshi, "Ca<sup>2+</sup> influx induced by photodynamic action in human cerebral glioma (U-87 MG) cells: possible involvement of a calcium channel," *Photochem Photobiol*, vol. 60, pp. 246-248, 1994.
- [49] A. Bhatnagar, S. K. Srivastava, and G. Szabo, "Oxidative stress alters specific membrane currents in isolated cardiac myocytes," *Circ Res*, vol. 67, pp. 535-549, 1990.
- [50] J. A. dos Reis Junior, F. B. de Carvalho, R. F. Trindade, P. N. de Assis, P. F. de Almeida, and A. L. B. Pinheiro, "A new preclinical approach for treating chronic osteomyelitis induced by *Staphylococcus aureus*: in vitro and in vivo study on photodynamic antimicrobial therapy (PAmT)," *Lasers Med Sci*, vol. 29, pp. 789-795, 2014.
- [51] A. L. Rops, C. W. Jacobs, P. C. Linssen, J. B. Boezeman, J. F. Lensen, T. J. Wijnhoven, L. P. van den Heuvel, T. H. van Kuppevelt, J. van der Vlag, and J. H. Berden, "Heparan sulfate on activated glomerular endothelial cells and exogenous heparinoids influence the rolling and adhesion of leucocytes," *Nephrol Dial Transplant*, vol. 22, pp. 1070-1077, 2007.
- [52] R. D. Shepherd, S. M. Kos, and K. D. Rinker, "Flow-dependent Smad2 phosphorylation and

- TGIF nuclear localization in human aortic endothelial cells,” *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 301, pp. H98-H107, 2011.
- [53] A. D. van der Meer, K. Vermeul, A. A. Poot, J. Feijen, and I. Vermes, “A microfluidic wound-healing assay for quantifying endothelial cell migration,” *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 298, pp. H719-H725, 2009.
- [54] B. Prabhakarandian, M. C. Shen, K. Pant, and M. F. Kiani, “Microfluidic devices for modeling cell–cell and particle–cell interactions in the microvasculature,” *Microvasc Res*, vol. 82, pp. 210-220.
- [55] L. Ren, W. Liu, Y. Wang, J. C. Wang, Q. Tu, J. Xu, R. Liu, S. F. Shen, and J. Wang, “Investigation of hypoxia-induced myocardial injury dynamics in a tissue interface mimicking microfluidic device,” *Anal Chem*, vol. 85, pp. 235-244, 2012.
- [56] M. J. Kim, S. C. Lee, S. Pal, E. Han, and J. M. Song, “High-content screening of drug-induced cardiotoxicity using quantitative single cell imaging cytometry on microfluidic device,” *Lab Chip*, vol. 11, pp. 104-114, 2011.
- [57] X. Zhang and M. G. Roper, “Microfluidic perfusion system for automated delivery of temporal gradients to islets of Langerhans,” *Anal Chem*, vol. 81, pp. 1162-1168, 2008.
- [58] J. W. Allen and S. N. Bhatia, “Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: Application to liver zonation,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 82, pp. 253-262, 2003.
- [59] P. Babilas, S. Karrer, A. Sidoroff, M. Landthaler, and R. M. Szeimies, “Photodynamic therapy in dermatology - an update,” *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, vol. 21, pp. 142-149, 2005.
- [60] E. Rud, O. Gederaas, A. Høgset, and K. Berg, “5-aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters,” *Photochem Photobiol*, vol. 71, pp. 640-647, 2000.
- [61] R. W. Redmond and J. N. Gamlin, “A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules,” *Photochem Photobiol*, vol. 70, pp. 391-475, 1999.
- [62] Meiji Seika ファルマ株式会社, 注射用レザフィリン®100 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2016年6月改訂 (第10版).

図表

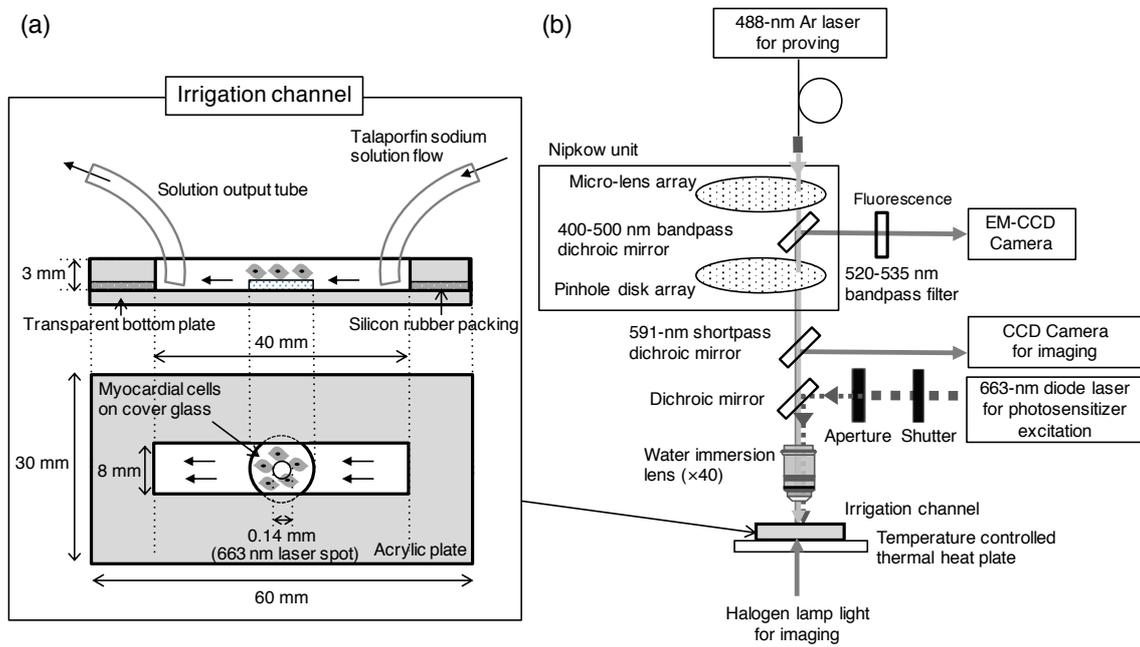


図 6-1 光増感反応による心筋細胞電位変化計測のための *in vitro* 実験系

(a) タラポルフィンナトリウム溶液の灌流チャンネル

(b) 共焦点レーザー顕微鏡を使用した膜電位感受性色素蛍光計測系

(文献 [7] M. Doi *et al.*, *JJSLSM*, 2018/11/10 accepted より。日本レーザー医学会誌より許可を得て引用)

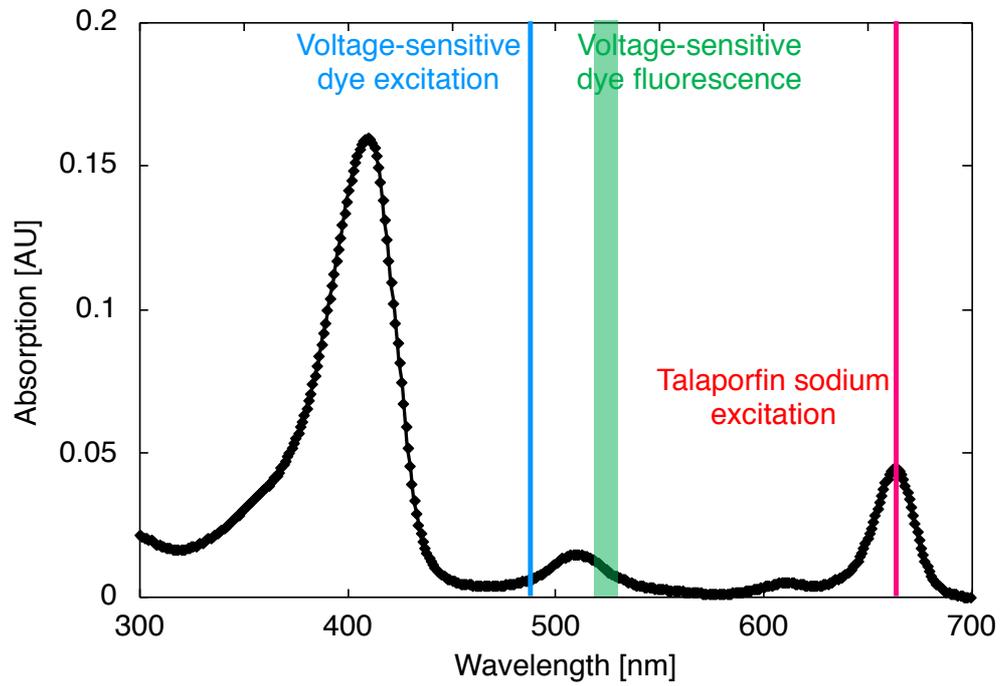


図6-2 タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトルおよび励起波長と膜電位感受性色素の励起波長および蛍光測定波長 (*in vitro* モデル)

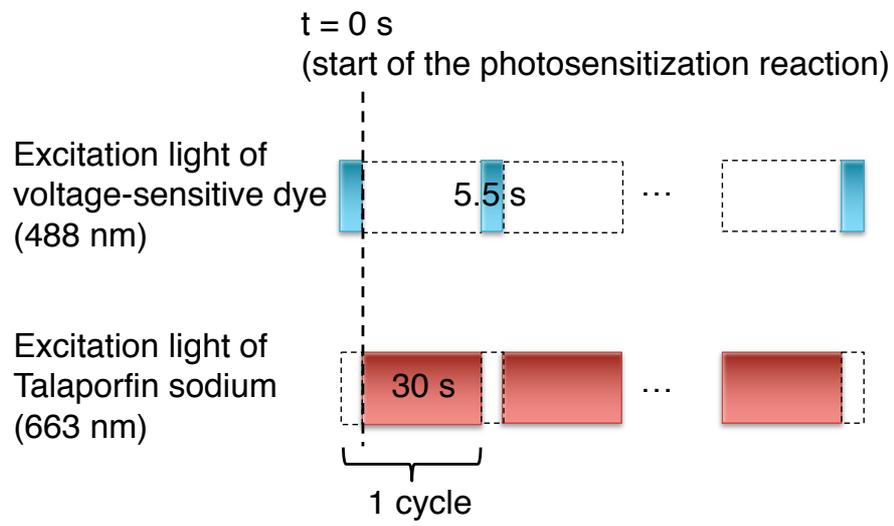


図 6-3 膜電位感受性色素および光感受性薬剤の励起光の照射サイクル (*in vitro* モデル)

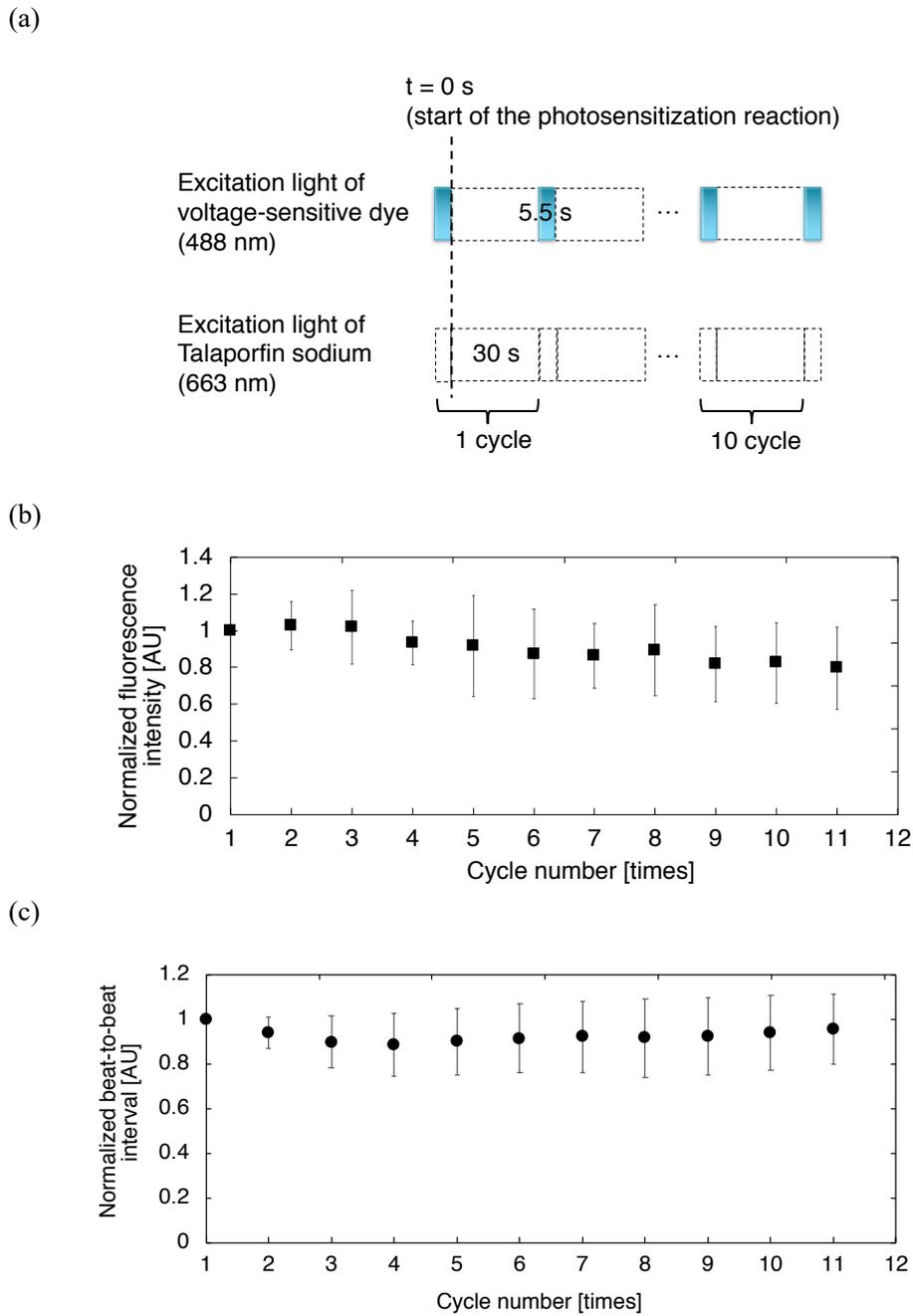


図 6-4 【対照実験 1】 膜電位感受性色素励起光 (488 nm) による膜電位感受性色素のフォトブリーチングの影響 (*in vitro* モデル)

- (a) 対照実験で使用した照射サイクル
- (b) 膜電位色素の蛍光輝度の減少
- (c) 心筋細胞の拍動間隔の変化

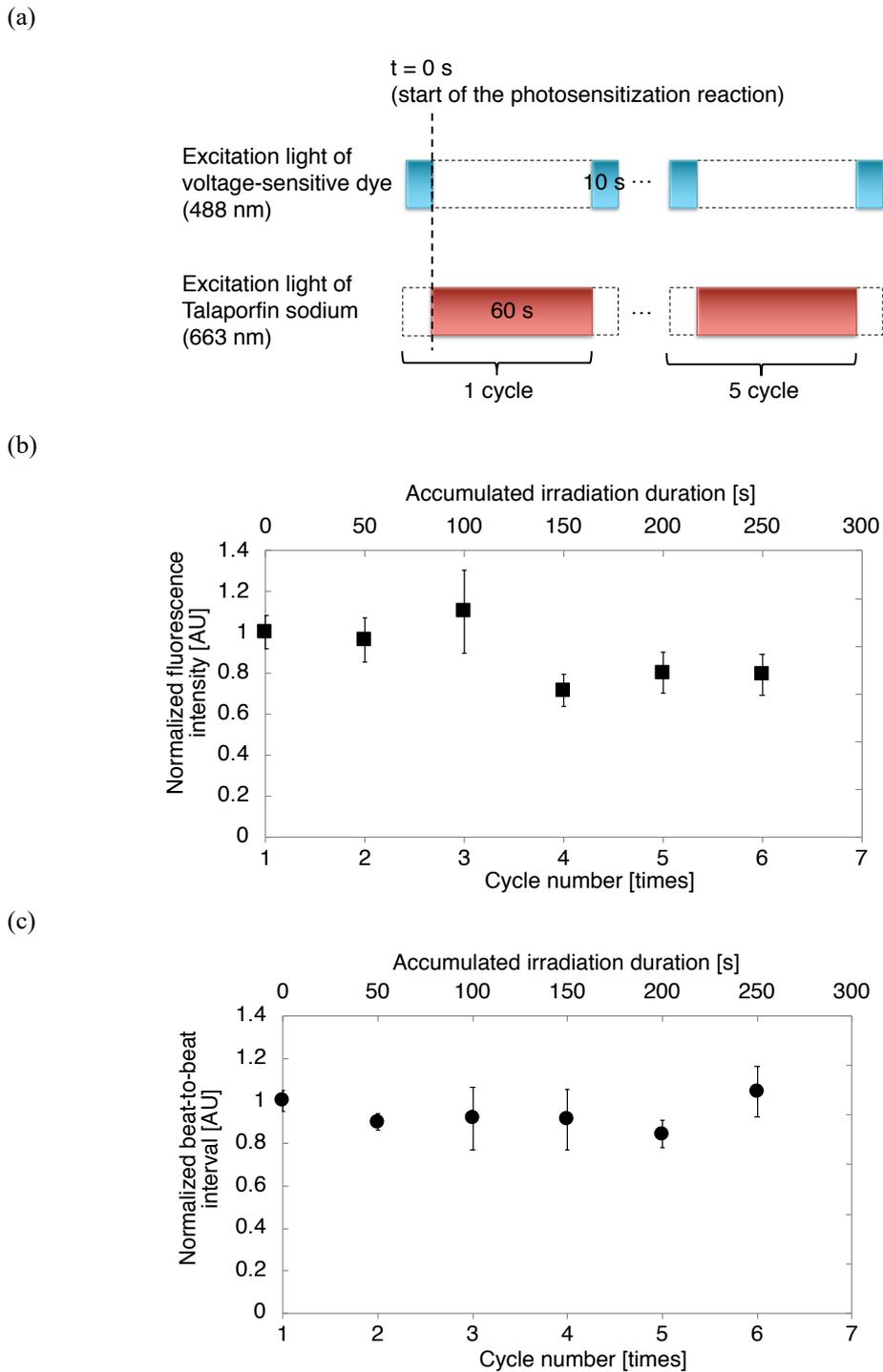


図 6-5 【対照実験 2】 タラポルフィンナトリウム励起光 (663 nm) による膜電位感受性色素のフォトブリーチングの影響 (*in vitro* モデル)

- (a) 対照実験で使用した照射サイクル
- (b) 膜電位色素の蛍光輝度の減少
- (c) 心筋細胞の拍動間隔の変化

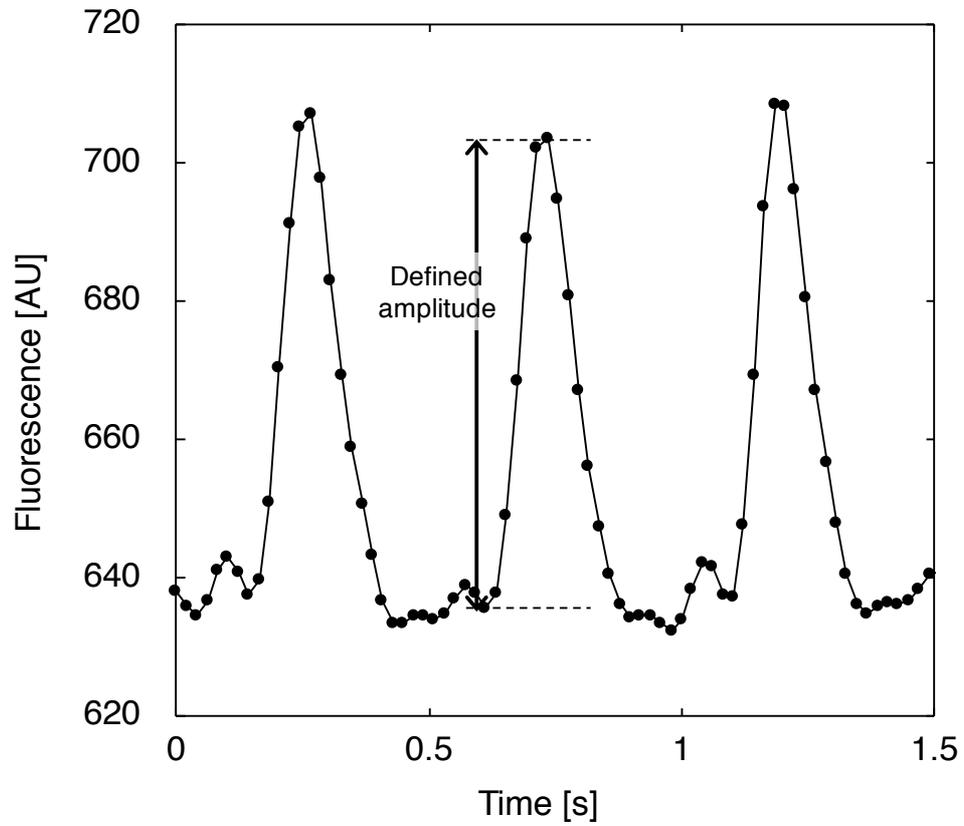


図 6-6 ラット心筋細胞の自発拍動による膜電位感受性色素の蛍光輝度変化 (*in vitro* モデル)

(文献 [7] M. Doi *et al.*, *JJSLSM*, 2018/11/10 accepted より。日本レーザー医学会誌より許可を得て引用)

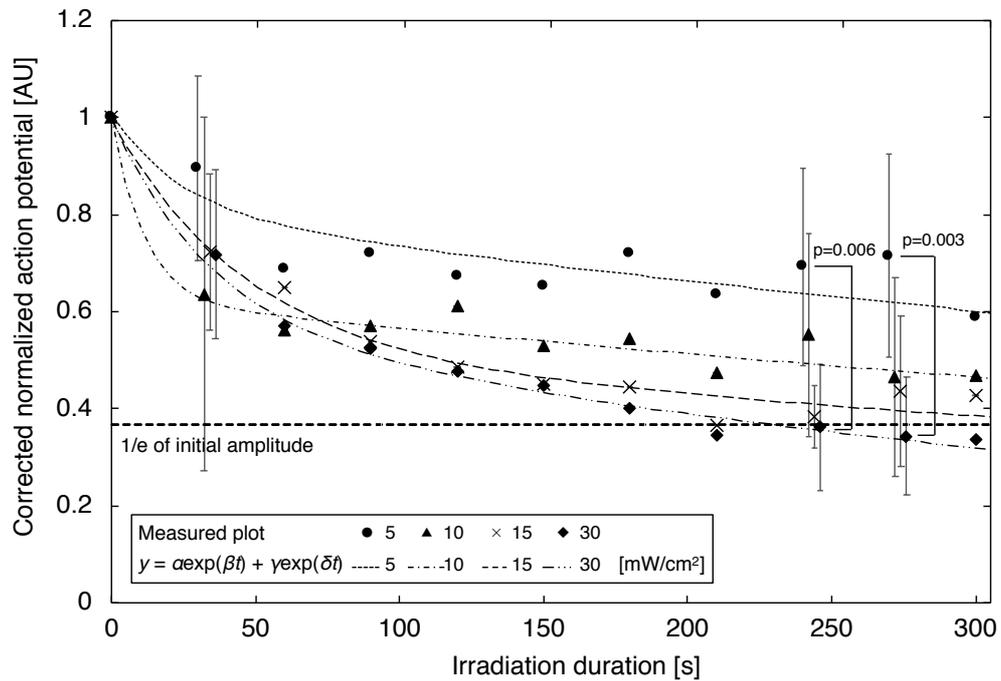


図6-7 膜電位感受性色素で計測した光増感反応によるラット心筋細胞の膜電位変化 (*in vitro* モデル) (N=5-9, 標準偏差を一部のプロットに表示, t 検定による p 値を表示, プロットが重畳する部分は横方向にプロットをずらして表示)

膜電位感受性色素の蛍光輝度変化を心筋細胞の膜電位変化とみなした。

(文献 [7] M. Doi *et al.*, *JJSLSM*, 2018/11/10 accepted より。日本レーザー医学会誌より許可を得て引用)

表 6-1 式 (6-1) の各放射照度における係数および決定係数 (*in vitro* モデル)

	5 mW/cm <sup>2</sup>	10 mW/cm <sup>2</sup>	15 mW/cm <sup>2</sup>	30 mW/cm <sup>2</sup>
$\alpha$	0.808	0.625	0.517	0.576
$\beta$	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002
$\gamma$	0.200	0.375	-0.479	0.424
$\delta$	-0.043	-0.091	-0.022	-0.030
$R^2$	0.79	0.96	0.97	0.99

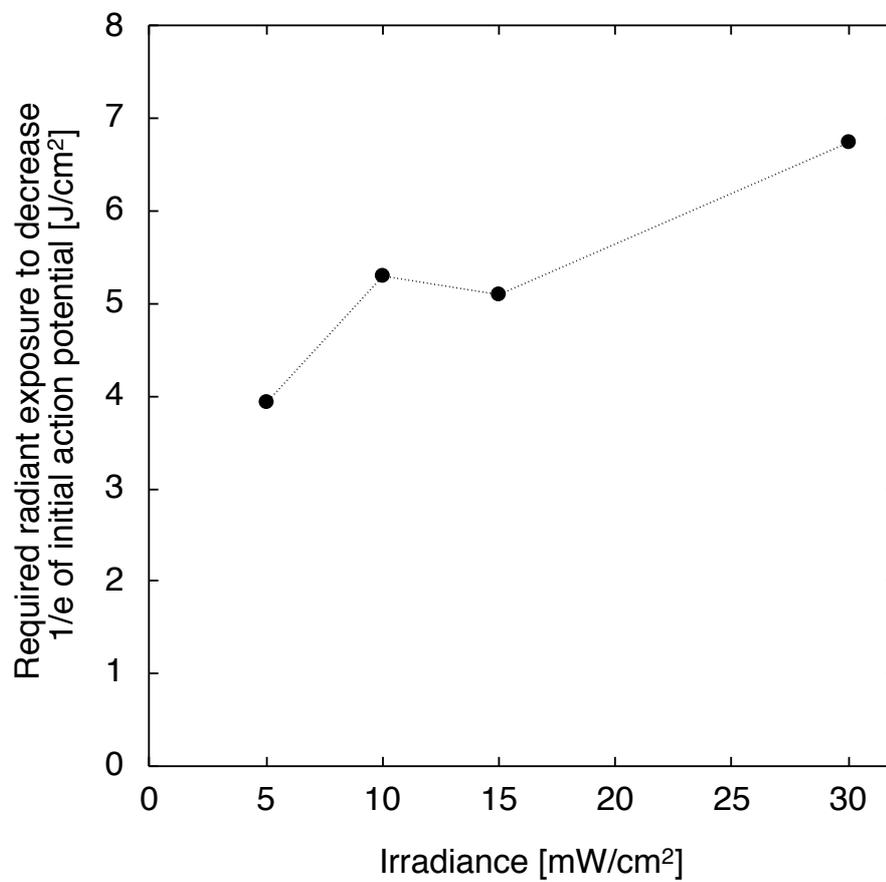


図 6-8 定義した有効放射照射量の放射照度依存性 (*in vitro* モデル)

有効放射照射量の定義は 6.2.1.3 項参照

(文献 [7] M. Doi *et al.*, *JJLSM*, 2018/11/10 accepted より。日本レーザー医学会誌より許可を得て引用)

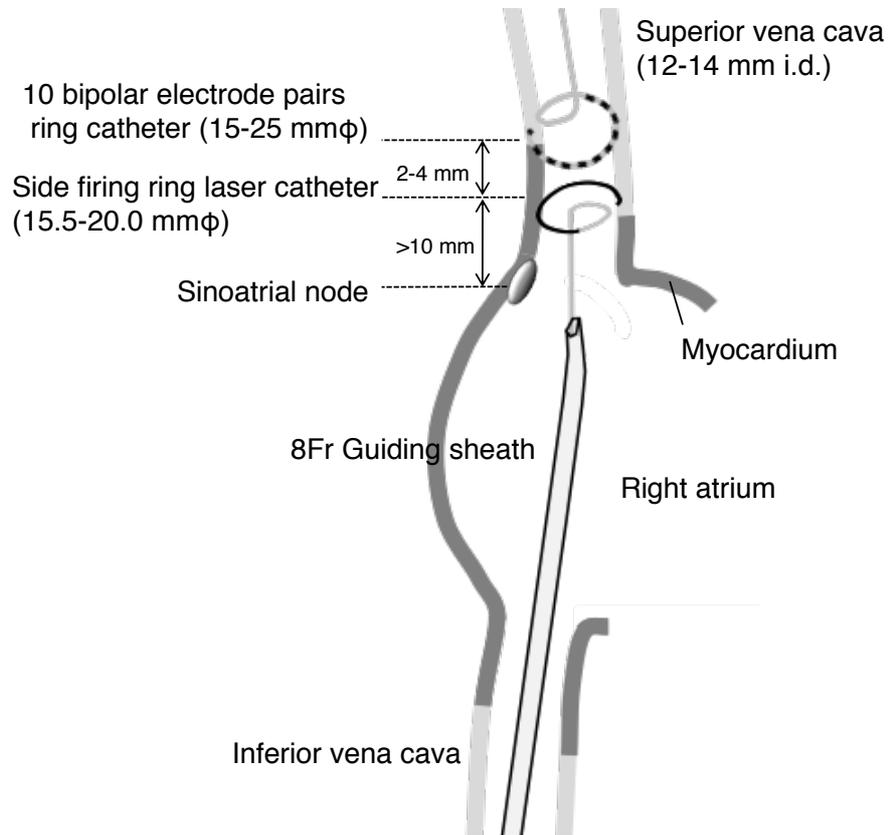


図6-9 イヌの上大静脈における環状電極カテーテルおよび環状レーザーカテーテルの設置状況 (*in vivo* モデル)

(文献 [7] M. Doi *et al.*, *JJSLSM*, 2018/11/10 accepted より。日本レーザー医学会誌より許可を得て引用)

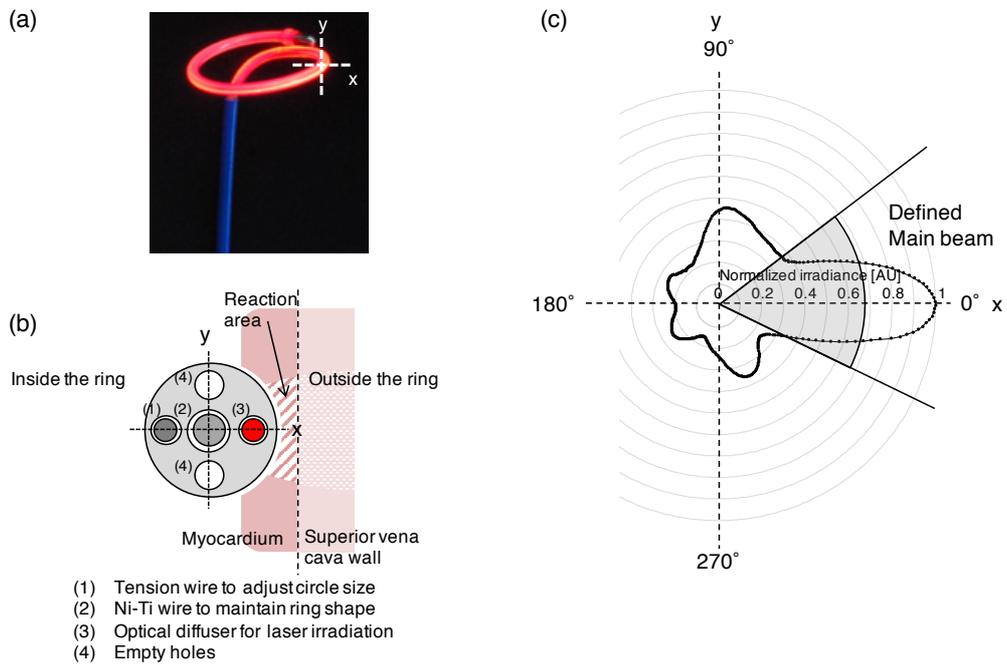


図 6-10 *In vivo* 光増感反応に使用した環状側射型レーザーカテーテル (*in vivo* モデル)

(a) 光照射中のカテーテル

(b) カテーテルの断面構造と心筋への接触

(c) (b)と同様の断面周囲におけるカテーテルからの相対放射照度分布

(文献 [7] M. Doi *et al.*, *JJSLSM*, 2018/11/10 accepted より。日本レーザー医学会誌より許可を得て引用)

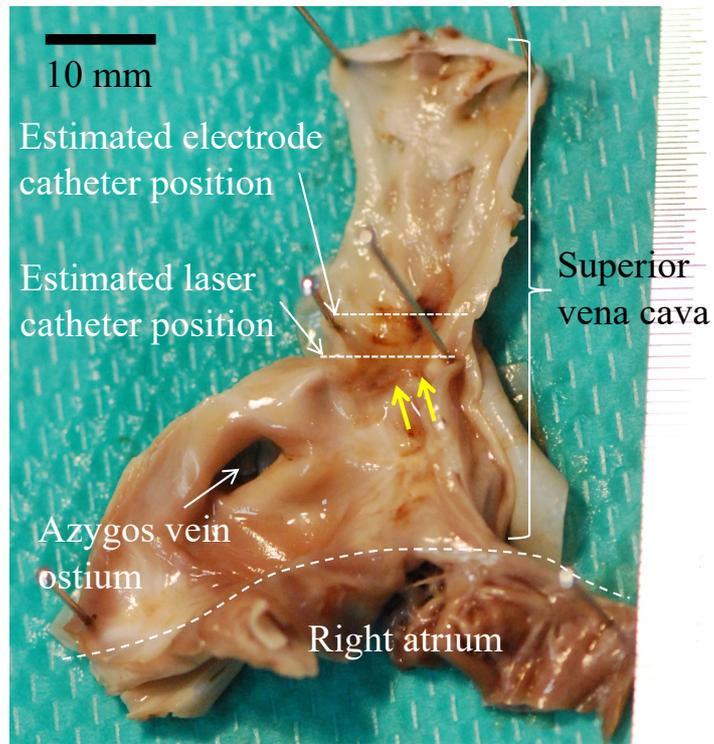


図 6-11 光増感反応を行ったイヌ上大静脈の摘出後の展開写真 (*in vivo* モデル) カテーテル設置の推定位置付近にある、黄色矢印で示した茶色い部分が心筋組織である。

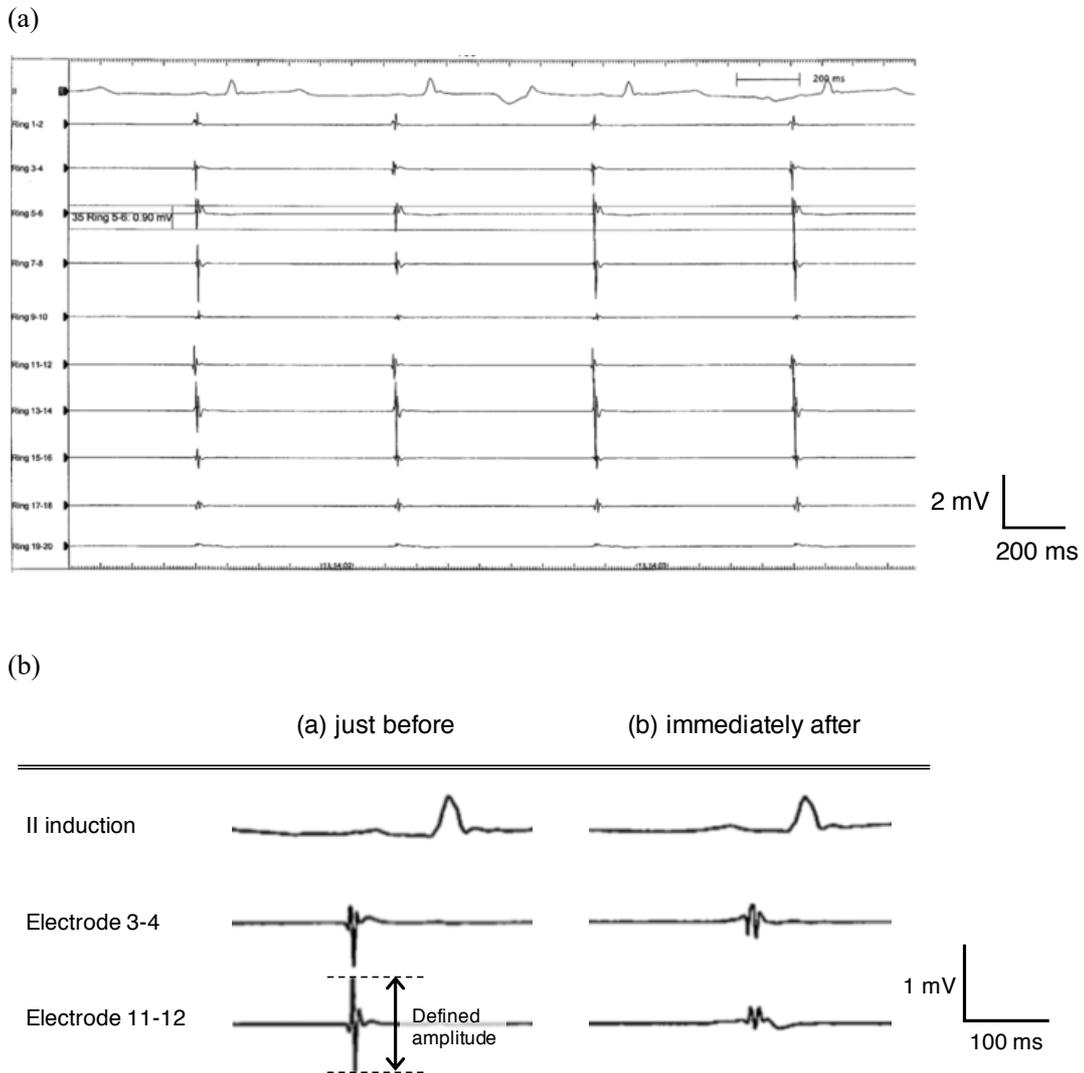


図 6-12 電極カテーテルで計測した光増感反応前後のイヌ上大静脈内側の心筋組織における活動電位波形 (*in vivo* モデル)

(a) 光増感反応開始前の心筋活動電位波形

(b) 電極対 3-4 および 11-12 での光増感反応開始前および光増感反応開始後の活動電位波形。II induction は心電図の第 2 誘導電位を示す。電極カテーテルの 10 対の電極のうち、電位が時間的に安定して計測できた 2 電極の結果を表示 (文献 [7] M. Doi *et al.*, *JJSLSM*, 2018/11/10 accepted より。日本レーザー医学会誌より許可を得て引用)

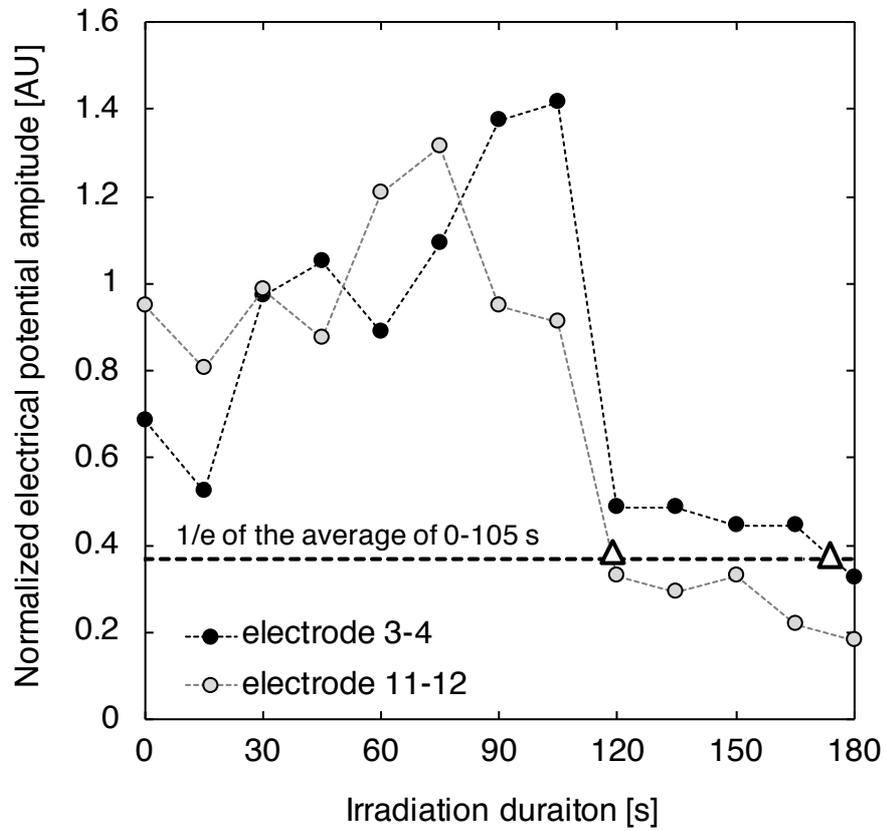


図 6-13 光増感反応によるイヌ上大静脈内側の心筋組織における洞調律伝導電位変化 (*in vivo* モデル)

(文献 [7] M. Doi *et al.*, *JJSLSM*, 2018/11/10 accepted より。日本レーザー医学会誌より許可を得て引用)

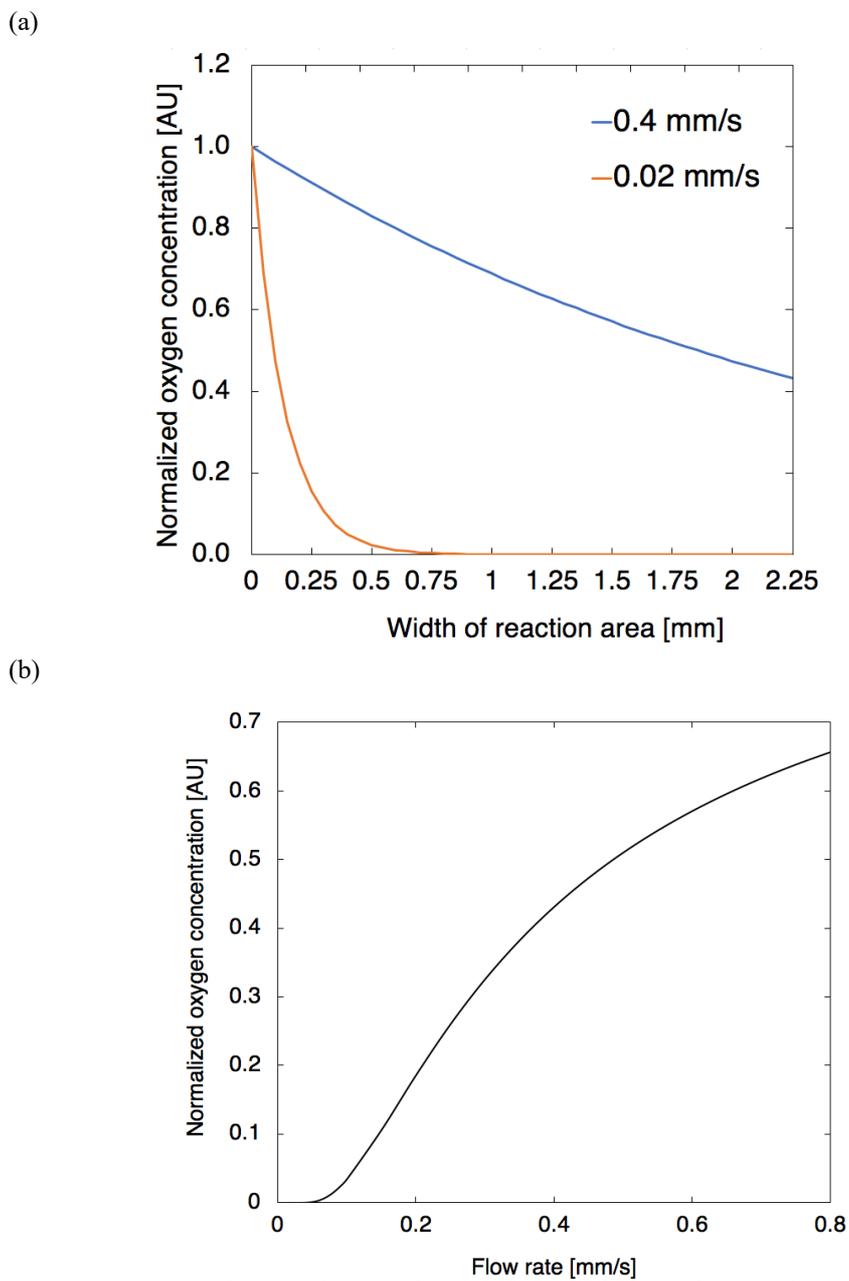
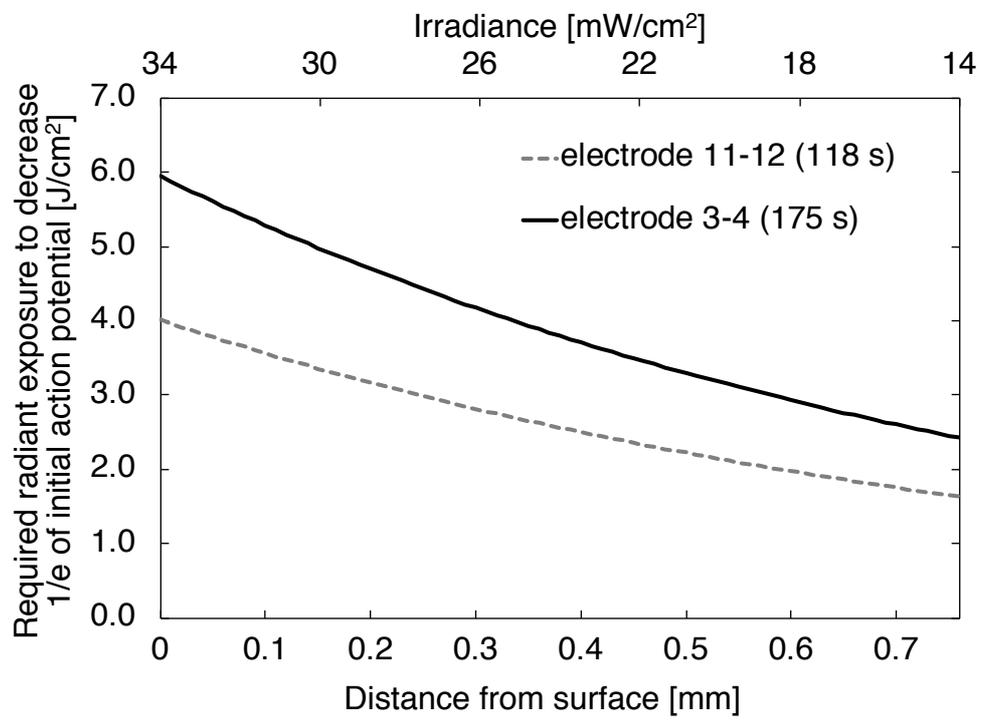


図 6-14 溶液流れによる酸素濃度の改善 (*in vitro* モデル)

(a) 反応領域入口の濃度にて正規化した反応領域内の正規化酸素濃度分布

(b) 反応領域出口 ( $x = 2.25$  mm) における正規化酸素濃度の流速依存性

図 6-15 心筋表面からの深さと有効放射照射量の関係 (*in vivo* モデル)

## 第7章 結論

本論文では、*in vivo* 心筋組織に対するタラポルフィンナトリウムを用いた光増感反応による即時的な活動電位障害を調査する、*in vitro* 心筋細胞モデルに関して検討した。この *in vitro* モデルの有用性を検証するために、*in vivo* 実験法として薄い心筋組織と、レーザー照射、電位計測共に環状カテーテルを用いた系を設計した。さらに、共通に測定できる電位の減衰に、同じ基準を設けて用いた。

第2章では、心房性不整脈に対する非薬物治療であるカテーテルアブレーションの課題について述べた。第3章では、光増感反応の原理とそれを応用した光線力学的治療について説明した。我が国で使用されている光感受性薬剤のうち、本研究で用いているタラポルフィンナトリウムに関して、その特性および適用疾患について述べた。さらに本研究の対象であるタラポルフィンナトリウムを用いた光線力学的治療を応用した心房性不整脈のアブレーション治療について、治療構想と利点をまとめた。第4章では、光増感反応による心筋細胞の活動電位障害を研究するための *in vitro* モデルを提案した。著者は、溶液流れにより *in vitro* モデルにおける酸素供給を改善し、低侵襲な計測法で実施した *in vitro* 心筋細胞活動電位調査および独自に設定した電位評価基準と組み合わせることで、新しい *in vitro* モデルを提案した。第5章では、低侵襲な細胞活動電位計測法である多電極アレイを用いた *in vitro* 接触電位計測により、これまで測定報告の無かった光増感反応による心筋細胞活動電位の変化を測定した。接触電位計測では、電極に対する垂直方向の細胞接触性が不安定なためと思われる測定波形のバリエーションが生じたため、本研究に適さないと判断した。第6章では、接触電位計測よりも侵襲性がやや高いが、本研究の *in vitro* 実験に採用すべき低侵襲な電位計測法である、膜電位感受性色素の蛍光計測法を用いて活動電位を測定した。酸素供給の改善の見積もりでは、流速 0.4 mm/s で溶液を流すことにより、0.02 mm/s の場合と比較し約 9.7 倍の改善が得られることがわかった。この *in vitro* モデルとの比較に用いる *in vivo* モデルとして、光増感反応による貫壁性の障害が実現可能で、かつ電位計測が心筋全層で実施できるようなイヌ上大静脈壁の厚さ 1 mm 以下の心筋組織を採用した。安定した接触が可能な環状カテーテルをレーザー照射および電位計測に用いて光増感反応および接触電位計測を行うことを提案し、洞調律伝導電位の減少を調査した。光増感反応による活動電位障害を *in vitro* モデルと *in vivo* モデルで比較するために、両モデルで共通に測定できる電位振幅に関する基準を定義した。電位振幅が初期値の  $1/e$  に減少するまでに必要なエネルギーを *in vitro* および *in vivo* モデルで比較したところ、それぞれ約  $6 \text{ J/cm}^2$  および  $2.6\text{-}3.9 \text{ J/cm}^2$  となり、オーダーが一致した。この結果より、*in vitro* および *in vivo* において同オーダーの効率で光増感反応障害が起きていると考えられた。本研究で提案した *in vitro* モデルの、皮膚および悪性脳腫瘍に対する光線力学的治療への適用拡大に関して述べた。

以上本研究では、*in vitro* モデルにおける酸素環境の改善および、共通の電位基準を用いた両実験の比較により、これまで作用条件の関連付けの行えなかった *in vitro* モデルと *in vivo* モデルにおいて、同オーダーの光増感反応障害効率を実現することで関連付けが行えることを示した。これにより、光増感反応による酸化作用に対する即時的な *in vivo* 心筋活動電位障害を検討できる、*in vitro* 心筋細胞モデルが作成できた。このモデルは活動電位障害に対する光増感反応の影響を検討するのに有用と考えられる。

## 付録

### A 用語および記号説明

#### A.1 光照射および光計測に関する用語および記号説明

##### A.1.1 用語説明

本論文では、以下の表 A-1 に定義する放射照度 (Irradiance) および放射照射量 (Radiant exposure) を用いて光照射条件を表記した。光生物学および光化学の分野における光計測および光照射に関する用語について、国際照明委員会 (International Commission on Illumination; CIE) の推奨する定義を以下に示す [1]。単位は SI 単位系ではなく慣用表現を用いた。また本論文では 6.3.1.2 項記載の理由から、光拡散体からの拡散光の放射強度を、下記に示す慣習的な表現を用いて表記している。

表 A-1 光照射に関する用語説明一覧

用語	定義
放射照度 [W/cm <sup>2</sup> ] (Irradiance)	ある面に対して単位面積あたり垂直に入射する 単位時間に伝播する光エネルギーの量
放射照射量 [J/cm <sup>2</sup> ] (Radiant exposure)	放射照度の時間積分値
拡散光の放射強度 [W/cm]	単位長さあたりの放射パワー

##### A.1.2 記号説明

本論文では、生体内での光伝搬に関する下記の表 A-2 の係数について、SI 単位系ではなく慣用表現を用いている。

表 A-2 光学記号の一覧

Symbol	Definition	Unit
$\mu_a$	吸収係数 (Absorption coefficient)	mm <sup>-1</sup>
$\mu_s$	散乱係数 (Scattering coefficient)	mm <sup>-1</sup>
$\mu_s'$	等価散乱係数 (Reduced scattering coefficient)	mm <sup>-1</sup>
$\mu_{eff}$	減衰係数 (Attenuation coefficient)	mm <sup>-1</sup>

参考文献

- [1] E. R. Cohen, T. Cvitas, J. G. Frey, B. Holmstrom, K. Kuchitsu, R. Marquardt, I. Mills, F. Pavese, M. Quack, J. Stohner, H. L. Strauss, M. Takami, and A. J. Thor, *物理化学で用いられる量・単位・記号*, 日本化学会監修, 産業技術総合研究所計量標準総合センター訳, 東京: 講談社サイエンティフィク, 2007, pp. 41-47.

## 著者論文目録

### 1 原著論文

#### 1.1 本研究に関連する論文

- (1) M. Doi, E. Ogawa, and T. Arai, “Effect of a photosensitization reaction performed during the first 3 min after exposure of rat myocardial cells to talaporfin sodium in vitro,” *Lasers Med Sci*, vol. 32, pp. 1873-1878, 2017.
- (2) M. Doi, E. Ogawa, and T. Arai, “Comparison of an in vivo model with an in vitro model based on the electrical potential decrease in the myocardium or myocardial cells by an extracellular photosensitization reaction,” *Journal of the Japan Society for Laser Surgery and Medicine*, accepted for publication on 10 November 2018.

#### 1.2 国際会議論文（査読付きの full-length papers）

- (1) M. Doi, E. Ogawa, and T. Arai, “Evaluation of electrical propagation delay with cardiomyocytes by photosensitization reaction in vitro,” *Proc SPIE*, vol. 10062, pp. 100620N-1-6, 2017.
- (2) H. Nakazawa, M. Doi, E. Ogawa, and T. Arai, “Optical coefficient measurements using bulk living tissue by an optical fiber puncture with FOV change,” *Proc SPIE*, vol. 10492, pp. 104920P-1-5, 2018.
- (3) H. Nakazawa, M. Doi, E. Ogawa, and T. Arai, “Modified optical coefficient measurements using a single high-NA fiber with detection parameter changes at a tip,” *Proc SPIE*, vol. 10820, pp. 1082020-1-6, 2018.

### 2 学会

#### 2.1 国際会議発表

- (1) M. Doi, E. Ogawa, and T. Arai, “Evaluation of electrical propagation delay with cardiomyocytes by photosensitization reaction in vitro,” *SPIE BiOS 2017* (San Francisco, USA, 2017.1.31).
- (2) H. Nakazawa, M. Doi, E. Ogawa, and T. Arai, “Optical coefficient measurements using bulk living tissue by an optical fiber puncture with FOV change,” *SPIE BiOS 2018* (San Francisco, USA, 2018.1.30).
- (3) H. Nakazawa, M. Doi, E. Ogawa, and T. Arai, “Modified optical coefficient measurements using a single high-NA fiber with detection parameter changes at a tip,” *SPIE/COS Photonics Asia 2018* (Beijing, China, 2018.10.12).

## 2.2 国内学会発表

- (1) 土井万理香, 黒津真璃子, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外光増感反応による心筋細胞電気伝導路における電気伝導遮断,” 第 54 回日本生体医工学会 (名古屋, 2015.5.9).
- (2) 土井万理香, 黒津真璃子, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外光増感反応による心筋細胞の電気伝導遮断効果: 細胞外電位計測を用いた検討,” 第 25 回日本光線力学学会 (東京, 2015.7.11).
- (3) 土井万理香, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “光増感反応による心筋細胞の即時的な表面電位変化の測定,” 第 36 回日本レーザー医学会 (宇都宮, 2015.10.24).
- (4) 土井万理香, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外光増感反応が心筋細胞へ与える急性障害: 細胞外接触電位と膜電位感受性色素の併用による評価,” 第 55 回日本生体医工学会 (富山, 2016.4.28).
- (5) 土井万理香, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外からの光増感反応が心筋細胞に与える電気生理学的障害: 刺激伝搬時間による障害評価,” 第 26 回日本光線力学学会 (横浜, 2016.6.25).
- (6) 小川恵美悠, 大槻麗奈, 浜田梨沙, 土井万理香, 荒井恒憲, “タラポルフィンナトリウム静注後の組織への薬剤移行連続測定と皮膚光線曝露による紅斑発生: 動物モデルによる検討,” 第 26 回日本光線力学学会 (横浜, 2016.6.25).
- (7) 土井万理香, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外光増感反応による心筋細胞の電気伝導障害: 多点平面微小電極法による評価,” 第 37 回日本レーザー医学会 (旭川, 2016.10.21).
- (8) 中澤春奈, 土井万理香, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “バルク組織の光ファイバー穿刺による光学定数計測法,” 第 56 回日本生体医工学会 (仙台, 2017.5.5).
- (9) 中澤春奈, 土井万理香, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “心筋バルク組織の光学定数測定,” 第 27 回日本光線力学学会 (京都, 2017.7.14).
- (10) 土井万理香, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “心筋細胞に対する光線力学治療: 膜電位感受性色素と多点平面微小電極法による障害評価,” 第 38 回日本レーザー医学会総会 (横浜, 2017.11.11).
- (11) 中澤春奈, 土井万理香, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “ファイバー穿刺によるバルク試料のレーザービーム伝搬計測,” 第 38 回日本レーザー医学会総会 (横浜, 2017.11.11).
- (12) 中澤春奈, 土井万理香, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “光ファイバー穿刺によるバルク生体組織光学定数計測,” 第 57 回日本生体医工学会 (札幌, 2018.6.19).
- (13) 土井万理香, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外からの光増感反応による電気生理学的効果の比較: *in vivo* 心筋モデルおよび *in vitro* 心筋細胞モデル,” 第 39 回日本レーザー医学会総会および第 28 回日本光線力学学会 (東京, 2018.11.1).
- (14) 中澤春奈, 土井万理香, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “光ファイバー穿刺によるバルク組織の光学定数測定法,” 第 39 回日本レーザー医学会総会および第 28 回日本光線力学学会 (東京, 2018.11.2).

- (15) 小川恵美悠, 秋元治朗, 深見真二郎, 林省吾, 河野道宏, 土井万理香, 浜田梨沙, 中澤春奈, 熊谷寛, 荒井恒憲, “ヒト Cadaver 脳組織における in situ 光強度減衰実測および光線力学的治療深度の推定,” 第 39 回日本レーザー医学会総会および第 28 回日本光線力学学会 (東京, 2018.11.2).

## 謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院 理工学研究科基礎理工学専攻 後期博士課程在学中に、同大学理工学部荒井恒憲教授の指導のもとに行ったものである。

本研究を進めるに当たり、多くのご指導とご支援を賜りました荒井恒憲教授に心より感謝申し上げます。医工連携・産学連携の一端に携わらせていただき、多くの知見と経験を得ることができました。

本学位論文をまとめるにあたり、副査としてご指導とご意見をくださいました岡田英史先生、内山孝憲先生、塚田孝祐先生に深く感謝申し上げます。

慶應義塾大学医学部循環器内科の木村雄弘先生、高月誠二先生には、実験や医学的観点での研究討論に際して、多くのご指導とご支援を賜りました。感謝申し上げます。

株式会社アライ・メッドフoton研究所の皆様には、多くの学びの機会を提供いただきました。感謝申し上げます。

北里大学医療衛生学部の小川恵美悠先生には、研究を実施するにあたり多くの助言と相談の機会を頂戴致しました。心より感謝申し上げます。

同じ研究グループとして研究に関する討論を行い、多くの場面で支えてくださった、宇野優子さん、添川泰大さん、高橋晴香さん、中澤春奈さん、また既に社会でご活躍中の荒井研究室卒業生の高橋芽意さん、黒津真璃子さん、矢島正大さん、竹ノ谷洋海さん、松崎亮太さん、本間理恵さん、森永謙二郎さん、大槻麗奈さん、野辺平歩さん、宮下晶さん、に感謝いたします。同期として共に研究生活を過ごし、いつも激励の言葉をくれた浜田梨沙さんに感謝しています。これまで荒井研究室での研究生活をともに過ごした全ての先輩方、同期の方、後輩に感謝しています。

荒井恒憲教授秘書の鈴木れいさんには、常日頃から温かいご支援とご配慮をいただき、研究生活を支えてくださいました。心より感謝申し上げます。

最後に、私の研究生活をいつも温かく見守り、様々な面から支え、励ましてくれた家族に心からの感謝を示し、謝辞と致します。