

心筋細胞モデルのパラメタ変化による 遅延後脱分極発生への影響調査

武下大毅^{†1} 嶋吉隆夫^{†2} 松田哲也^{†1}

重大な心臓病態の一つに不整脈がある。特に薬剤投与の副作用による不整脈の発生は大きな問題となっており、未然に副作用の危険性を調べることは重要である。従来では危険性を調べるために動物実験を行われてきたが、近年ではコンピュータシミュレーションにより、比較的低コストで効率的にデータを得ることが有効な手段となっている。本稿では、心筋細胞モデルにパラメタ変化を加えたシミュレーションにより、不整脈の一原因である遅延後脱分極 (DAD) を再現する。DAD に大きく関連するパラメタから、薬剤投与を想定するパラメタと個体別の生理状態を想定するパラメタを選択し、それぞれを変化させたときの DAD 発生の有無を自動判定により調査した。その結果、各パラメタ変化が DAD 発生に与える影響の大きさを解析した。

Study of Risks of Delayed Afterdepolarization in Varying Parameters of a Ventricular Myocyte Model

DAIKI TAKESHITA,^{†1} TAKAO SHIMAYOSHI^{†2}
and TETSUYA MATSUDA^{†1}

One of serious cardiac diseases is cardiac arrhythmia. It is important to investigate risks of the cardiac arrhythmia by drug side effects before medications. Although animal experiments have been employed to investigate the risks, in recent years, computer simulation is becoming an effective technique to obtain data efficiently at comparatively low cost. In this paper, the delayed afterdepolarization (DAD), which is a cause of arrhythmia, is reproduced by simulation with varying parameters of a ventricular myocyte model. The parameters are selected from model parameters which are deeply relating to DAD, for representing drug dosing and individual physiological conditions. Generations of DAD were evaluated by an automatic DAD detection method introduced in this study. From the result, influenced by each parameter change to the risk of DAD was analyzed.

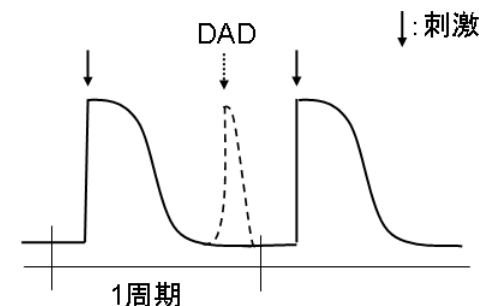


図1 遅延後脱分極 (DAD)
Fig.1 Delayed After Depolarization

1. はじめに

不整脈は、心臓の正常な収縮と拡張のリズムが失われることで、血液を送り出す作用 (ポンプ作用) が正しく行われなくなり、場合によっては死に至る重大な疾患である。その原因は様々であるが、心筋細胞レベルの現象に起因するものとして活動電位波形の異常がある。ここで活動電位波形とは、細胞内外のイオンの流れであるイオン電流により生じる細胞内外の電位差変化であり、イオン電流は選択的にイオン物質を通すイオンチャネルにより運ばれる。心筋細胞では電位変化によって収縮が発生する。細胞間の電位差による刺激が隣の細胞に次々に伝導することで、心臓全体が同期して収縮し、ポンプ作用が成立する。正常な細胞は、電気刺激により電位がある閾値を超えると自動的に立ち上がり、これを脱分極と呼ぶ。その後、再び元の電位 (静止膜電位) に落ち着くことを再分極という。しかし異常が生じると、図1のように、再分極後に次の刺激が与えられるまでに自発的に脱分極する場合があり、この現象を遅延後脱分極 (Delayed After Depolarization, DAD) という。DAD は不整脈の原因の一つである¹⁾。

薬剤投与による副作用として、イオンチャネルのブロックにより DAD が発生する²⁾。その例として、遺伝子により発現するタンパクであるカリウムイオン (K^+) を通すイオンチャ

^{†1} 京都大学大学院情報学研究科
Graduate School of Informatics, Kyoto University

^{†2} 財団法人京都高度技術研究所
ASTEM Research Institute of Kyoto

ネルをブロックする抗不整脈薬が、不整脈を引き起こす場合がある²⁾。DAD が発生する過程は複雑であり、薬剤の投与量や成分量、薬剤を投与する人の生理状態や遺伝的形質によって、DAD 発生の可能性が異なる。製薬段階において、未然に様々な条件下における DAD 発生の危険性を知ることは重要である。

従来では、動物の心臓から心筋細胞を単離するなどして実験、観測が行なわれてきた。しかし、実験にコストを要する問題や、実験誤差や細胞間個体差などにより実験条件を完全に制御した精密な結果を得ることが非常に困難だという問題がある。これらの問題に対して、心筋細胞モデルを用いたコンピュータシミュレーションが有効である。心筋細胞モデルとは心筋細胞動態のメカニズムを数式により表現したものであり、実際に観測されたデータと同等な計算機上で再現できる。シミュレーションの利点として、実験に比べてコストがかからず、複数のパラメータ変化させた実験が効率良く実行でき、統一的なデータが得られることが挙げられる。

本稿では、薬剤投与や個人差による DAD 発生の可能性を細胞モデルを用いたシミュレーションにより解析する。その方法として、不整脈や DAD に関連が大きいパラメータをモデルから選択し、各パラメータの値を変化させたときの DAD 発生の有無を調査する。選択するパラメータは、薬剤の効果を想定するものと、薬剤を投与する状況を想定するものに分ける。それらの組み合わせにより各パラメータ数通り変化させて実験条件を作り、各条件においてシミュレーション実験を行ったときに、活動電位波形に DAD が現れるかを自動判定により調べる。その結果からパラメータの変化が DAD 発生に与える影響を考察する。

2. DAD 発生メカニズム

DAD が発生するのは、細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度が異常に高くなるカルシウム過負荷 (Ca^{2+} overload) と呼ばれる状態が原因であると考えられている¹⁾³⁾。 Ca^{2+} 過負荷状態では、心筋細胞内にある筋小胞体という細胞内小器官から突発的に細胞内に Ca^{2+} が放出され、この放出に反応して内向きの電流 (一過性内向き電流) が細胞内に流れることにより、膜電位が自発的に上昇し DAD が発生する。

Ca^{2+} 過負荷になる過程は複雑であり、複数存在するが、その 1 つとして、細胞内ナトリウムイオン (Na^+) 濃度が異常に高くなるナトリウム過負荷 (Ca^{2+} overload) がある。心筋細胞には、細胞内に Na^+ を取り入れて、細胞外に Ca^{2+} を排出する Na/Ca 交換系と呼ばれる膜タンパクが存在するが、 Na^+ 過負荷状態では、 Na/Ca 交換系の働きが小さくなり、さらには細胞内に Ca^{2+} を取り入れて、細胞外に Na^+ を排出する逆の働きを引き起こす。

これにより、 Ca^{2+} 過負荷状態になると考えられている⁴⁾⁵⁾。また、 Na/Ca 交換系を流れる電流は、一過性内向き電流の一つと推定されている¹⁾。

イオンチャネル等により運ばれるイオン量は細胞内外の濃度差に依存する。このため細胞外イオン濃度は細胞内イオン濃度に影響を与える。またイオンチャネル等の膜タンパクにはその働きが細胞外イオン濃度により変化するものがある。これらにより、細胞外イオン濃度は DAD 発生の可能性に影響を与える。また、細胞外イオン濃度は病態や個人差によって変化しやすい。

3. 心筋細胞モデル

シミュレーションに用いる心筋細胞モデルについて説明する。筋細胞モデルには、電気生理活動が正確に再現できる Kyoto モデル⁶⁾ を用いる。Kyoto モデルでは、心筋細胞を構成する各要素の動態が常微分方程式で表されており、細胞内外の電位差 (膜電位, V_m) の時間変化は以下のように定義される。

$$\frac{dV_m}{dt} = \frac{-(I_{tot} + I_{ext})}{C_m} \quad (1)$$

C_m は膜容量と呼ばれる定数である。 I_{tot} は総イオン電流、 I_{ext} は刺激電流を表し、細胞内から外へ向かって流れる外向き電流が正の値となる。刺激電流は一定間隔で与えられ、刺激時以外は 0 である。イオン電流はイオンチャネルやポンプなどにより流される電流が各々種類別に定義されており、それらの電流を総和したものが I_{tot} である。

その一つである I_{Kr} は遅延整流 K^+ 電流の速い成分という K^+ を通すイオンチャネルの 1 種による電流である。Kyoto モデルでは以下の式で定義される。

$$I_{Kr} = G_{Kr} \cdot C_m \cdot (V_m - E_K) \cdot p(\text{open}) \quad (2)$$

E_K は細胞内外の K^+ 濃度によって決まる平衡電位、 $p(\text{open})$ はこのチャネルの開口確率であり、それぞれ式により定義されている。 G_{Kr} はチャネルコンダクタンスであり、以下の式で定義される。

$$G_{Kr} = A_{Kr} \cdot \left(\frac{[K^+]_o}{5.4} \right)^{0.2} \quad (3)$$

$[K^+]_o$ は細胞外 K^+ 濃度を表し、 A_{Kr} は定数 (= 0.00864) である。

また、 I_{NaK} は、細胞内に K^+ 流入し、細胞外に Na^+ を排出する Na/K ポンプと呼ばれる膜タンパクにより運ばれる電流であり、以下の式で定義される。

$$I_{NaK} = A_{NaK} \cdot C_m \cdot s \quad (4)$$

s は状態を表す値であり、数式で定義されている。 A_{NaK} は定数 (= 21.0) である。

実際の心筋細胞において、1 個のイオンチャネルやポンプは 1 個のタンパク質からなり、それらが細胞膜上に複数存在している。よって (3) 式や (4) 式は各イオンチャネル、ポンプで流れる電流を総じて表していることになる。

Kyoto モデルでは、細胞内イオン濃度はイオンによる変化が常微分方程式により定義されているのに対し、細胞外イオン濃度は定数であり、その標準値は、細胞外 Na^+ 濃度 $[Na^+]_o = 140(mM)$ 、細胞外 K^+ 濃度 $[K^+]_o = 5.4(mM)$ である。

Kyoto モデルでは DAD を発生させることが可能である。 Ca^{2+} overload 状態のとき、 Na/Ca 交換系で流れる電流 I_{NaCa} などの一過性内向き電流によって (1) 式の dV_m/dt が正の値になり、 V_m が自発的に上昇する。

4. DAD 発生シミュレーション

4.1 パラメタ選択

本研究では薬剤投与による DAD 発生の危険性の個人差を調査することを目的に、細胞モデルのパラメタ変化による DAD 発生の可能性を解析する。そこで、不整脈や DAD 発生に関係の大きいパラメタの中から薬剤の効果想定するパラメタと、個人の生理状態状態を想定するパラメタを選択し、薬剤効果を想定するパラメタと生理状態を想定するパラメタの組み合わせに対して、各パラメタの値を変化させて実験を行い、DAD 発生の有無を調べる。

薬剤誘発性不整脈の原因として知られている hERG タンパクを流れる電流は I_{Kr} である²⁾。E4031 と呼ばれる抗不整脈薬が I_{Kr} をブロックする薬剤として知られている²⁾。そこで、 I_{Kr} のブロックを想定し、 I_{Kr} の大きさを定める A_{Kr} を変化させるパラメタとして選択し、値を標準値から下げる方向に変化させる。

I_{NaK} が小さくなることで Na^+ overload 状態になることが知られている⁴⁾⁵⁾。 I_{NaK} が抑制される状況として、ジギタリスという強心剤の投与による影響がある²⁾。そこで、 I_{NaK} の抑制を想定し、 I_{NaK} の大きさを定める A_{NaK} を変化させるパラメタとして選択し、値を標準値から下げる方向に変化させる。

一方生理状態を表すパラメタとして、細胞外イオン濃度である $[Na^+]_o, [K^+]_o$ を選択する。 $[Na^+]_o$ は Na/K ポンプや Na/Ca 交換系などの働きに影響を与え、 $[K^+]_o$ は I_{Kr} や Na/K ポンプの働きに影響を与える。

4.2 DAD 自動判定手法

本研究では効率良く調査を進めるために、シミュレーション中に DAD 発生の有無を自動

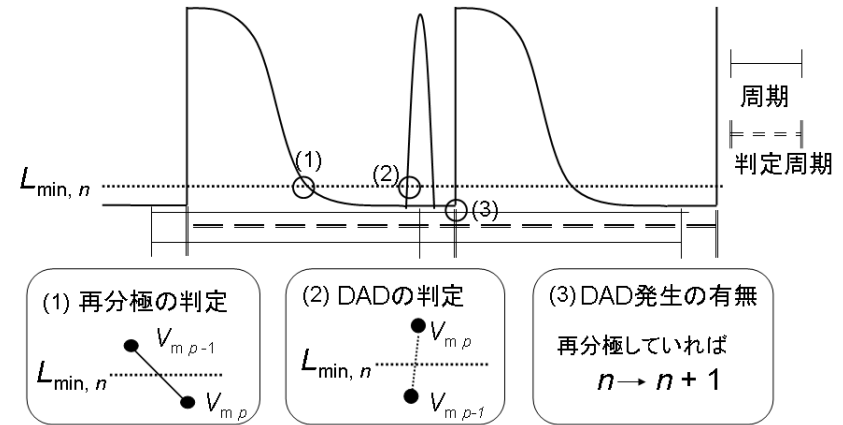


図 2 DAD 自動判定手法

Fig. 2 Schematic diagram of DAD auto detection

判定する手法を導入する。DAD 自動判定手法の概要を図 2 に示す。 V_m が刺激により脱分極し、再分極した後に、自発的に V_m が上昇することが DAD の定義である。自動判定手法では以下の方法で DAD 発生を判定する。

判定は、刺激が与えられてから次の刺激が与えられるまでの間を判定周期として行う。ここで、 $V_{m,p}, V_{m,p-1}$ は、間隔 Δp 毎に得られる V_m の現在値と 1 つ前の値である。 $V_{m,p-1}, V_{m,p}$ の間隔 Δp は、データ出力する際の記録間隔と等しく、積分計算に用いるタイムステップ Δt との大小関係は、 $\Delta t \leq \Delta p$ である。 $L_{min,n}$ は第 n 判定周期で再分極の判定と DAD の判定に用いる値であり、第 $n-1$ 判定周期での V_m の最小値 $V_{m,min,n-1}$ と任意の値 $X (> 0)$ を用いて、以下の式で定義される。

$$L_{min,n} = V_{m,min,n-1} + X \quad (5)$$

それぞれの判定アルゴリズムを述べる。

- (1) 再分極の判定を行う。 $V_{m,p-1} > L_{min,n}$ かつ $V_{m,p} \leq L_{min,n}$ が成り立てば、再分極したと判定する。一度再分極すれば、以降はその判定周期での再分極判定は行わない。
- (2) 再分極したと判定された後に、 $V_{m,p-1} < L_{min,n}$ かつ $V_{m,p} \geq L_{min,n}$ が成り立てば、DAD が発生したと判定する。
- (3) 次の刺激が入る直前までに、DAD 発生していれば、その判定周期に DAD 発生が開

始したとする．また，再分極していれば， $n \rightarrow n + 1$ として $L_{\min, n}$ ， $V_{m, \min, n-1}$ を更新する．

5. 実験

5.1 実験方法

DAD 自動判定手法を用いて，パラメタ変化による DAD 発生の有無を調査する．また，DAD 発生危険性の指標として，DAD が最初に発生した周期の数を記録対象とする．さらに，DAD がシミュレート時間以内に発生しない場合も評価するために， Ca^{2+} overload 状態の指標として $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加量を調べるために，各周期毎の細胞内 Ca^{2+} イオン $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の最大値 $\max[\text{Ca}^{2+}]_i$ ，最小値 $\min[\text{Ca}^{2+}]_i$ を記録する．

5.2 実験条件

薬剤投与を想定するパラメタ A ， B と，生理状態を表すパラメタ a ， b を，以下の通り定める．なお，細胞外液イオン濃度の変化範囲はヒトの細胞外液の非致死範囲⁷⁾を参考にした．また総条件数は， $6 \times 5 \times 4 = 120$ 通りである．

- $A \cdots A_{\text{Kr}}$ を 50% (0.00432) ~ 100% (0.00832, 標準値)，10% (0.000832) 刻みで 6 通り
 - $B \cdots A_{\text{NaK}}$ を 50% (10.5) ~ 100% (21.0, 標準値)，10% (2.1) 刻みで 6 通り
 - $a \cdots [\text{Na}^+]_o$ を 110mM ~ 170mM，15mM 刻みで 5 通り (標準値 140mM)
 - $b \cdots [\text{K}^+]_o$ を 2.7mM ~ 8.1mM，1.35mM 刻みで 5 通り (標準値 5.4mM)
- シミュレーションに関しての，共通条件は以下の通りである．
- シミュレート時間 \cdots 500,000ms (500 周期数)
 - 刺激間隔 \cdots 1000ms (各周期の 50ms 時点で刺激が入る)
 - タイムステップ $\Delta p \cdots$ 0.01ms
 - 記録間隔 $\Delta t \cdots$ 1ms
 - $X \cdots$ 3.0mV

5.3 実験結果

DAD が発生した一例として A_{NaK} が 45%， $[\text{Na}^+]_o$ が 170mM の場合を図 3 に示す．図 3 左図では，85000ms 付近とそれ以降で DAD が発生していることが確認できる．しかし実際には一周期前の 83 周期目で DAD が発生したと判定された．図 3 の右図は 84 周期目の刺激が入る 84050ms 付近の V_m の変化であり，刺激が入る直前に V_m が $L_{\min, n}$ を越えている．

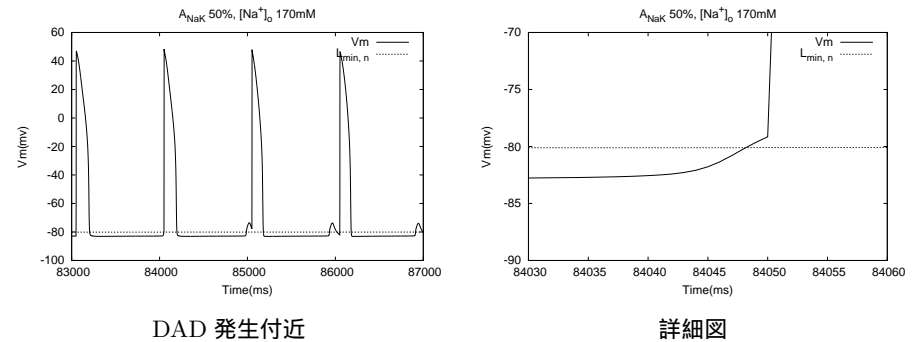


図 3 DAD 発生の一例 ($A_{\text{NaK}} = 45\%$ ， $[\text{Na}^+]_o = 170\text{mM}$)
Fig. 3 Action Potential in occurring DAD ($A_{\text{NaK}} = 45\%$ ， $[\text{Na}^+]_o = 170\text{mM}$)

各組み合わせについてパラメタ変化させたときの最初に DAD が発生した判定周期を図 4 に示す．一律的に白色で図示している場合では，シミュレーション終了までに DAD が発生しなかったことを意味する． A - a の組み合わせでは全ての場合で DAD が発生しなかった． B - a の結果では A_{NaK} が小さくなるほど DAD の発生が早く，また， $[\text{Na}^+]_o$ が高くなるほど DAD の発生が早い．同様に， B - b の結果においては A_{NaK} が小さくなるほど DAD の発生が早く， $[\text{K}^+]_o$ が低くなるほど DAD の発生が早い．

最終周期における $\max[\text{Ca}^{2+}]_i$ ， $\min[\text{Ca}^{2+}]_i$ を図 5，図 6 に示す．ただし，DAD が発生した条件では一律的に白色で図示している．これは，DAD が発生すると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が長周期変動する場合があります．最終周期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を図示すると，DAD が発生しないときの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ との比較が困難になるためである． A - a の結果では， $[\text{Na}^+]_o$ が高いほど $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加している．また， $[\text{Na}^+]_o$ による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の違いと比べて， A_{Kr} による違いは小さい． A - b の結果では， $[\text{K}^+]_o$ が低いほど $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加しており，また， $[\text{K}^+]_o$ による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の違いと比べて， A_{Kr} による違いは小さい． B - a の結果では， A_{NaK} が小さくなる方向， $[\text{Na}^+]_o$ が高くなる方向に従って， $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加している． B - b の結果では，概ね A_{NaK} が小さくなる方向， $[\text{K}^+]_o$ が低くなる方向に従って， $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加している．

6. 考察

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加する条件で DAD が発生していることから，Kyoto モデルでは，2 章の DAD 発生のメカニズムと同様に， Ca^{2+} overload により DAD が発生することが確認で

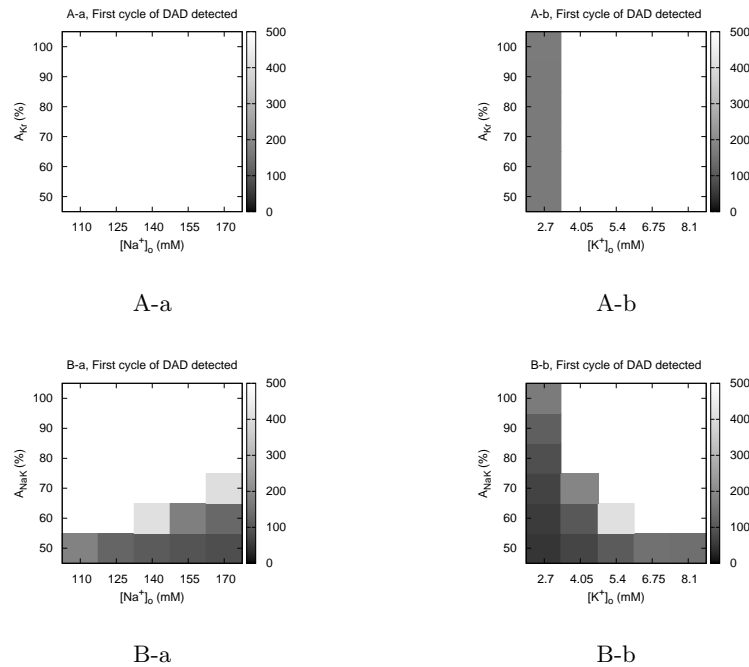


図 4 DAD 発生周期番号
 Fig.4 First cycle of DAD detect

きた。Ca²⁺ overload につながる Na⁺ overload については、本稿の実験では細胞内 Na⁺ 濃度に影響を与える I_{NaK} に関連するパラメタ A_{NaK}, [Na⁺]_o, [K⁺]_o を変化させており、[Ca²⁺]_i の結果から、パラメタの値によっては Na⁺ overload が発生している。

A-a, A-b では、[Na⁺]_o, [K⁺]_o の値による [Ca²⁺]_i の変化に比べて、A_{Kr} による [Ca²⁺]_i の変化は小さかった。また、[Na⁺]_o, [K⁺]_o が標準値において、A_{Kr}, A_{NaK} の 50% と 100% のとき [Ca²⁺]_i の値の差を比較すると、A_{Kr} の max[Ca²⁺]_i の差は 4.7×10^{-6} , min[Ca²⁺]_i の差は 1.75×10^{-8} であり、A_{Kr} の max[Ca²⁺]_i の差は 4.0×10^{-3} , min[Ca²⁺]_i の差は 2.8×10^{-3} であった。このことから、本稿の条件では、A_{Kr} は A_{NaK} はよりも DAD 発生に与える影響は小さいといえる。

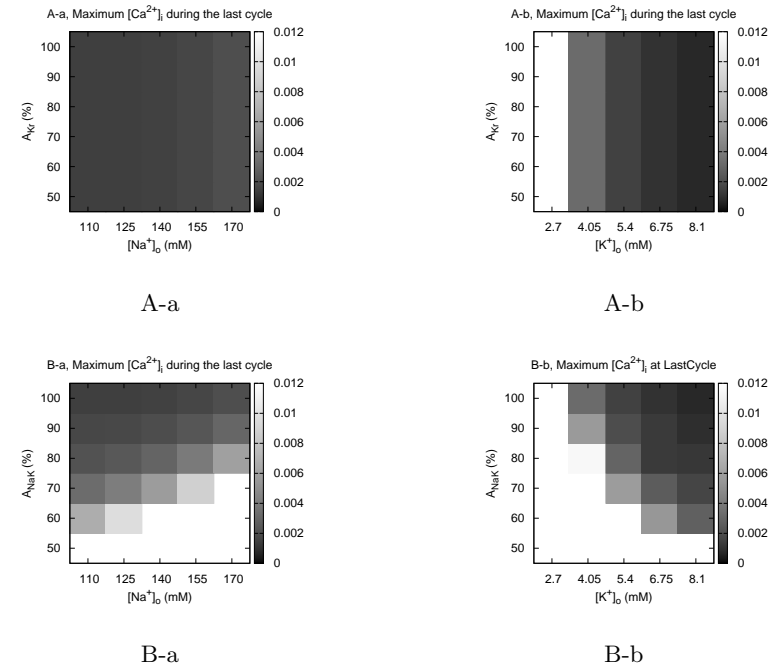


図 5 最終周期における
 細胞内 Ca²⁺ 濃度の最大値
 Fig.5 Maximum [Ca²⁺]_i during the last cycle

B-a, B-b では、A_{NaK} が小さくなるほど [Ca²⁺]_i が増加するとともに DAD の発生が早くなり、[Na⁺]_o, [K⁺]_o の標準値においても A_{NaK} の値によっては DAD が発生している。よって、I_{NaK} の抑制は本稿の条件では DAD 発生に与える影響は大きい。本稿で用いた条件以外でも I_{NaK} の抑制が DAD 発生に与える影響は小さいと考えられる。

A-a, B-a では、[Na⁺]_o が高くなるほど [Ca²⁺]_i が増加し、DAD の発生が早くなる。これらの結果から、[Na⁺]_o が高い状態では DAD が発生する可能性が高いといえる。また A-b, B-a では、[K⁺]_o が小さくなるほど、[Ca²⁺]_i が増加し、DAD の発生が早く、[K⁺]_o が低い状態で DAD が発生する可能性が高いといえる。[Na⁺]_o と [K⁺]_o を比較すると、[Na⁺]_o が最も高い 170mM の場合と [K⁺]_o が最も低い 2.7mM の場合で、DAD が発生した条件数を

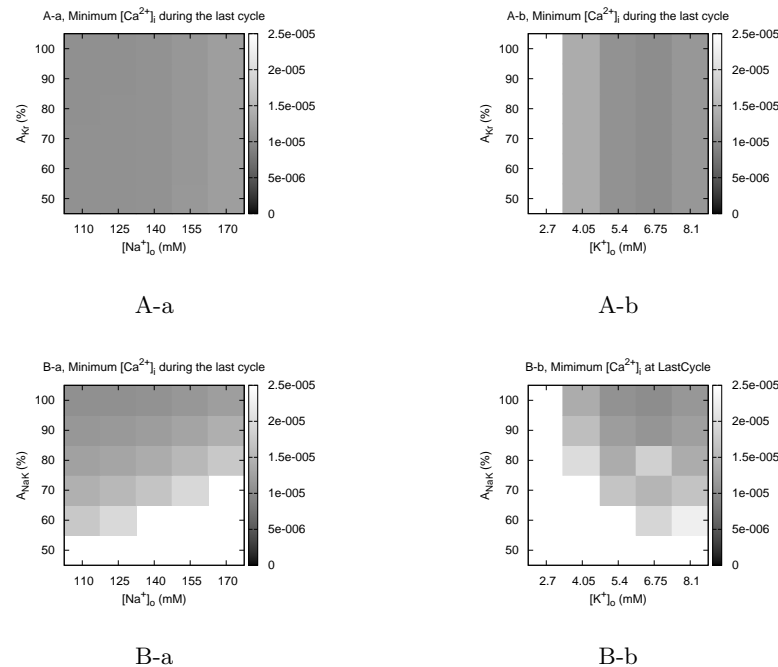


図 6 最終周期における
細胞内 Ca^{2+} 濃度の最小値

Fig. 6 Minimum $[Ca^{2+}]_i$ during the last cycle

比較すると $[K^+]_o = 2.7\text{mM}$ の方が多い。よって、それぞれの非致死範囲において、 $[K^+]_o$ は $[Na^+]_o$ よりも DAD 発生に与える影響は大きいと考えられる。

7. ま と め

本稿では、心筋細胞モデルにおいて、DAD に関連が大きいパラメタ選択し、パラメタの値の変化が DAD 発生に与える影響をシミュレーションによって調査した。薬剤の効果を想定するパラメタとして I_{Kr} , I_{NaK} の大きさを定める A_{Kr} , A_{NaK} , 生理状態を表現するパラメタとして $[Na^+]_o$, $[K^+]_o$ を選択し、それらの各組み合わせにおいてパラメタを変化させて、DAD 自動判定手法を用いて DAD 発生の有無を調査した。その結果、 Ca^{2+} overload

による DAD 発生が再現できていることを確認した。結果から本稿の条件においては、 A_{Kr} が DAD 発生に与える影響は小さく、 A_{NaK} が与える影響は大きいことが分かった。また、 $[Na^+]_o$ が高い状態、 $[K^+]_o$ が低い状態では、DAD が発生する可能性が高いことが分かった。

製薬段階で利用可能な指標を提示するために、得られたシミュレーション結果を定量的に表現する方法の考案と、シミュレーションから結果出力までをシステム化することが今後の課題である。

参 考 文 献

- 1) 稲田紘他：なぜ不整脈は起こるのか -心筋活動電位からスパイラルリントリーまで-, コロナ社 (2006).
- 2) 倉智嘉久：心筋細胞イオンチャンネル, 文光堂 (2000).
- 3) Clusin, W.T.: Calcium and Cardiac Arrhythmias:DADs, EADs, and Alternans, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, Vol.40, No.3, pp.337-375 (2003).
- 4) Faber, G.M. and Rudy, Y.: Action Potential and Contractility Changes in $[Na^+]_i$ Overloaded Cardiac Myocytes: A Simulation Study, *Biophysical Journal*, Vol.78, pp.2392-2404 (2000).
- 5) Noble, D. and Varghese, A.: Modelling of sodium-overload arrhythmias and their suppression, *Can J Cardiol*, Vol.14, pp.97-100 (1998).
- 6) Matsuoka, S., Sarai, N., Karatomi, S., Ono, K. and Noma, A.: Role of Individual Ionic Current Systems in Ventricular Cells Hypothesized by a Model Study, *Japanese Journal of Physiology*, Vol.53, No.2, pp.105-123 (2003).
- 7) Guyton, A.C., Hall, J.E., 早川弘一監訳：ガイトン臨床生理学 第1版, 医学書院 (1999).