

Review

**Natriuretic Peptides in Embryonic Stem Cell-Derived
Cardiomyocytes and Their Receptors in the CNS.**

Essam M. Abdelalim and Ikuo Tooyama

Molecular Neuroscience Research Center, Shiga University of Medical Science,
Setatsukinowa-cho, Otsu, Shiga 520-2192, Japan.

Abstract

The natriuretic peptides (NPs) are a family of related hormones that play important roles in the cardiovascular homeostasis, cell growth and neuroendocrine functions. Recently, they have emerged as potentially important clinical biomarkers in heart failure. The heart secretes two major natriuretic peptides: atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP), while C-type natriuretic peptide (CNP) is mainly secreted from the brain and blood vessels. The physiological effects of NPs are initiated by binding to natriuretic peptide receptors (NPRs), which are widely distributed in several organs. This review describes: the expression of natriuretic peptides in the cardiomyocytes differentiated from ES cells and their role in the cardiomyocyte development. We also describe the detailed distribution of NPRs in the central nervous system and their possible functions in various brain regions.

Keywords: natriuretic peptides; ES cells; development; brain; neuroedocrine.

Introduction

The natriuretic peptides (NPs) are a family of three peptide hormones: atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), and C-type natriuretic peptide (CNP) [1-4]. NPs are released into the circulation from cardiac cells to act as hormones in the control of fluid volume homeostasis and blood pressure by causing natriuresis, diuresis, vasorelaxation and inhibition of the renin–angiotensin–aldosterone system [5]. In addition, cell-based studies have shown that ANP and BNP exhibit important autocrine and paracrine functions such as modulating myocyte growth, apoptosis and proliferation in smooth muscle cells [6] and cardiac myocytes [7], and suppress cardiac fibroblast proliferation [8] and extracellular matrix secretion [8-9]. Their local production or presence in various extracardiac tissues suggests additional activities, including roles as neuropeptides [10-21]. The physiological effects of natriuretic peptides are initiated by binding to cell surface receptors. These include natriuretic peptide receptor type A (NPR-A), which is sensitive to ANP and

BNP [22], natriuretic peptide receptor type B (NPR-B), which is highly specific for CNP [23], and natriuretic peptide receptor type C (NPR-C), which may comprise up to 95% of the total NPR population [24] and is known to bind all the natriuretic peptides with similar affinity [5]. The hormone binding to NPR-A and NPR-B results in activation of guanylyl cyclase and production of cGMP, which is believed to be the second messenger for a number of biological responses associated with natriuretic peptides [22, 25, 26]. The NPR-C has been involved in peptide clearance, removing natriuretic peptides [27], and in the mediation of natriuretic peptide-induced inhibition of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) synthesis, and activation of phospholipase C without affecting cGMP levels [28-29].

In this review, we focus on the ability of ES cells to differentiate into functional cardiomyocytes, which have the ability to produce natriuretic peptides in vitro. In addition, we discuss the distribution of NPRs in the brain and their possible functions in various types of neurons.

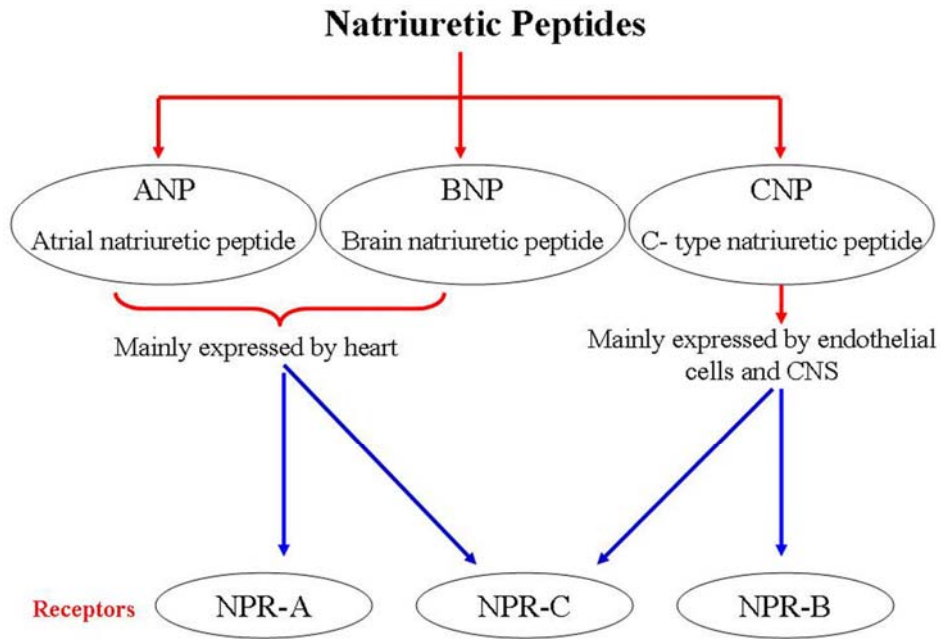


Figure 1. Schematic showing the types of natriuretic peptides and their receptors.

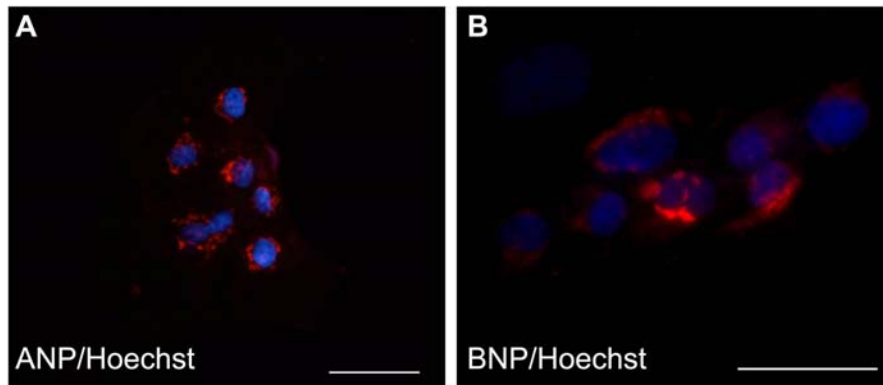


Figure 2. Expression of ANP and BNP in ES cell-derived cardiomyocytes. Note, the perinuclear localization of ANP and BNP. Bar = 50 μ m.

Natriuretic peptides in ES cell-derived cardiomyocytes

The heart is the first functioning organ in the embryo and any impairment of its function leads to early lethality [30].

Cardiomyocytes do not regenerate after birth, and they respond to mitotic signals by increasing in the size (hypertrophy) rather than by cell division (hyperplasia) [31]. Recently, embryonic stem (ES) cells and adult cardiac stem cells have been

proposed as transplantable cell candidates that would avoid the problems caused by other types [32-35]. Although, adult cardiac stem cells are capable of differentiating into cardiomyocytes [34-35], and to proliferate to some extent *in vitro*, the rarity of cardiac-specific stem cells makes them difficult to isolate from biopsy specimens and poses a problem for their future clinical application [36]. On the other hand, transplanted ES cell-derived cardiomyocytes have been shown to survive, proliferate and connect with host myocardium [37]. Therefore, the generation of functional cardiomyocytes from ES cells has potential applications including myocardial repair through cell transplantation. One of the important functions of cardiomyocytes is their production of natriuretic peptides, which secreted into circulation to perform several functions in the body [5] (Fig. 2). Previously, we could differentiate monkey ES cells into functional cardiomyocytes that can produce natriuretic peptides [38, Fig. 2]. Furthermore, it has been reported that myocardial tissue produced after ectopic transplantation of mice ES cell-

derived cardiomyocytes showed natriuretic peptides expression *in vivo* [39]. These data suggest that natriuretic peptides can be expressed after transplantation of ES cell-derived cardiomyocytes to perform its important *in vivo* function in maintaining the cardiovascular homeostasis [6].

The presence of natriuretic peptides at early stages of ES cell-derived cardiomyocyte development suggests the involvement of natriuretic peptides in cardiomyocyte development. *In vivo*, ANP and BNP levels in fetal ventricles have been reported to be greater than in the adult ventricle [41-42]. It is known that natriuretic peptide receptors are expressed in the heart itself [24]. It has been reported that ANP increases the proliferative activity, expression of contractile proteins and DNA synthesis of cultured chick embryo cardiomyocytes through receptor-mediated pathway [43]. Other studies using a locker of NPR-A and NPR-B showed inhibitory effect of endogenous natriuretic peptides on cardiomyocytes hypertrophy [7]. More recent data

suggested that ANP might antagonize cardiomyocyte hypertrophy-promoting effects of vasoactive peptides and / or growth promoting factors [44]. These studies suggest that ANP has mitogenic action on embryonic cardiomyocytes and inhibitory function on hypertrophy of adult cardiomyocytes.

Interestingly, mice with targeted deletion of BNP exhibit a different phenotype than ANP-deficient mice. Mice without BNP do not have hypertension or cardiac hypertrophy; instead they show focal ventricular fibrotic lesions with a remarkable increase in factors, which implicated in the generation and progression of ventricular fibrosis [45]. Therefore, the BNP may have a role as a local, paracrine antifibrotic factor within the heart. These findings suggest complementary roles of ANP and BNP in the regulation of myocardial structure. The precise reason remains unknown. However, a possibility is speculated that there may be a separate unknown receptor for BNP in cardiac fibroblasts [45]. Thus, the *in vitro* expression of natriuretic peptides observed in the ES cell– derived

cardiomyocytes, together with their elevated levels seen *in vivo* during normal heart formation [46], suggest a paracrine and/or autocrine function for natriuretic peptides during *in vivo* embryonic cardiac development as well as *in vitro* ES cell– derived cardiomyocyte development. These observations suggest that cardiac natriuretic peptides may play a role in the regulation of cardiomyocyte development *in vivo* and *in vitro*.

Cardiac gene expression of both ANP and BNP is increased in animal models of myocardial infarction [47], heart failure [48] and hypertrophy [49]. Therefore, the appearance of increased ANP expression in adult ventricles has become a marker for the embryonic gene program during the development of ventricular hypertrophy [50]. Overexpression of the NPR-A gene in the heart reduced cardiac myocyte size. Coincident with the reduction in myocyte size, ANP was reduced significantly at both mRNA and peptide levels by the overexpression of NPR-A. Thus, cardiac overexpression of NPR-A reduced cardiomyocyte size and

ventricular ANP expression, suggesting a role of NPR-A/cGMP signaling pathway in the regulation of cardiac myocyte

hypertrophy and ANP mRNA expression [51].

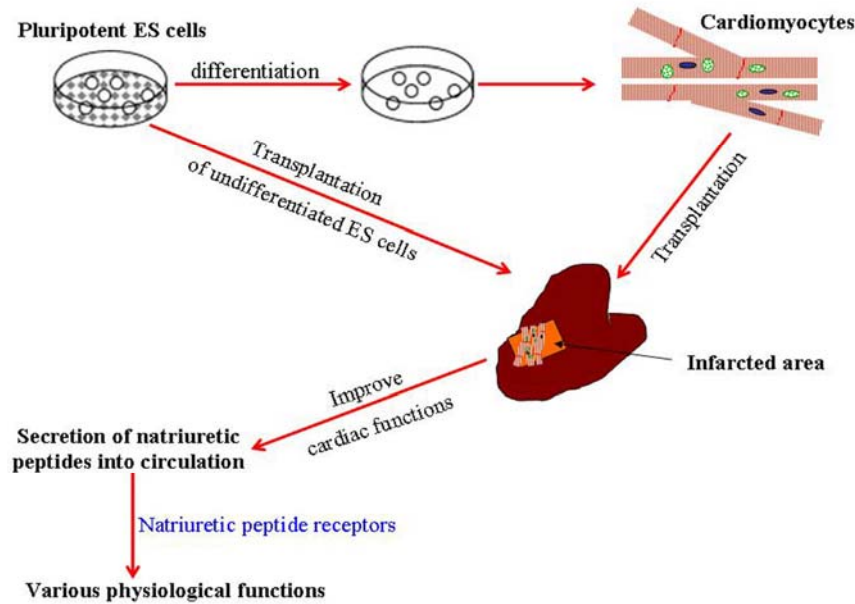


Figure 3. Proposed model for transplantation of ES cell-derived functional cardiomyocytes into infarcted heart. Pluripotent ES cells differentiate into functional cardiomyocytes *in vitro* then transplanted into infarcted region. Another method, undifferentiated ES cells are directly transplanted into infarcted regions, and then they differentiate into functional cardiomyocytes *in vivo*. As a result of successful transplantation, cardiac functions are improved leading to secretion of natriuretic peptides into the circulation to regulate cardiovascular homeostasis.

The data presented here suggest that the production of fully functional cardiomyocytes, which can produce NP hormones from ES cell is important for proper development of cardiomyocytes and for their application in cell therapy (Fig. 3).

Natriuretic peptide receptors (NPRs) in the brain

We have reported that NPR-A (Fig. 4A) and NPR-C (Fig. 4B) were localized to neurons in specific nuclei of the brain stem [20-21]. In addition to our reports, the NPRs were found in various regions in the CNS (Table 1), and in several species including, rat, guinea pig, human, monkey, and cat [13-16]. Neuronal NPR-A mRNA

was observed in the mitral cell layer of the olfactory bulb, medial habenula, area postrema, and glia cells [14]. In rat, NPR-B mRNA is expressed in the limbic cortex, neocortex, olfactory bulb, hippocampus, amygdala, preoptic-hypothalamic neuroendocrine circuits, ventral tegmental area, substantia nigra, in motor nuclei of cranial nerves, in brainstem nuclei controlling autonomic function, and pituitary gland (14-15, 52). NPR-C mRNA is expressed in many rat brain regions, including the frontal and retrosplenial granular cortices, medial preoptic nucleus, ventral cochlear nucleus, choroid plexus, deep layers of the neocortex and limbic cortex, posterior cortical amygdala, ventral subiculum, amygdalohippocampal area, and dentate gyrus in the rat brain [13]. In monkey brain, in situ hybridization analysis has demonstrated that NPR-C mRNA is localized to neurons in cerebral cortex and cerebellum [53], suggesting a species difference in cerebellar NPR-C expression. Moreover, in the forebrain, NPR-C shows a lack of overlap with the distribution of NPR-A and NPR-B mRNAs [13, 15].

Although several studies showed the expression of NPR mRNAs in the CNS [17-18, 54-55], a few studies demonstrated their protein expression in the CNS [20-21, 52]. NPR-A protein was observed in several regions, including the oculomotor nucleus, red nucleus, locus coeruleus, parabrachial nucleus, the principal trigeminal sensory nucleus, dorsal motor nucleus of the vagus, the hypoglossal nucleus, the gracile nucleus, the cuneate nucleus, the nucleus ambiguus, the reticular formation, the lateral reticular nucleus, and the inferior olivary nucleus. In rat, NPR-B immunoreactivity were found to be localized in the ventral tegmental area, substantia nigra, caudate-putamen, nucleus accumbens, frontal cortex, hippocampus, cortex, cerebellum [52]. NPR-C protein was observed in several regions of the brainstem, including the periaqueductal gray, red nucleus, locus coeruleus, dorsal tegmental nucleus, nucleus of the trapezoid body, ventrolateral pons including A5, cranial motor nuclei, dorsal motor nucleus of the vagus, nucleus ambiguus, and

ventrolateral medulla including A1 and inferior olivary nucleus [21].

The distribution of natriuretic peptide receptor immunoreactivities in the brainstem showed a close anatomical relationship among them. The presence of both guanylyl cyclase receptors (NPR-A and NPR-B) in the same regions suggests the action of ANP, BNP and CNP in these regions, which indicate similar functions of natriuretic peptide hormones in the same regions. On the other hand, the presence of NPR-B and NPR-C in the same regions may suggest a role of NPR-C in limiting the CNP in these areas for local action, or a synergetic role of NPR-B and NPR-C in modulating CNP functions.

In the retina, NPR-A and NPR-B are also localized to neuronal elements, including bipolar cells and amacrine cells, in addition to the two plexiform layers and Müller glial cells [55, 56]. Double labeling experiments in rat retina have revealed expression of NPR-A and NPR-B in dopaminergic amacrine cells, whereas cholinergic amacrine cells express NPR-

B [56], suggesting that natriuretic peptides have different regulatory systems in dopaminergic and cholinergic amacrine cells in rat retina.

Several studies demonstrated that NPRs are localized to glial cells in several regions of the brain [58-62]. It was reported that NPR-A and NPR-B are found only in non-neuronal elements in both mixed cultures of the CNS and brain slices. Also, incubation of astrocytes in culture with ANP increases intracellular cGMP levels [58]. NPR-A is predominantly expressed in SHR (spontaneously hypertensive rat) and WKY (Wistar-Kyoto, normotensive) rat astrocyte glial cultures [63]. NPR-B mRNA has been demonstrated in astrocyte cultures [64]. However, in situ hybridization study on rat brain didn't detect NPR-B glial signal [14]. Cultured astrocytes also express abundant NPR-C [63]. In bullfrog retinal Müller glial cells, receptor of ANP is also functionally expressed [66]. Taken together, these findings suggest that natriuretic peptides have functions in glial cells.

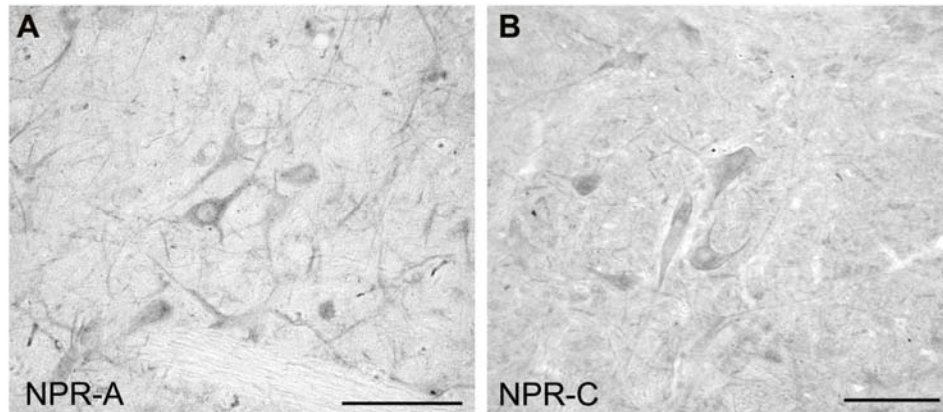


Figure 4. Examples of the localization of NPR-A and NPR-C immunoreactivities in the neurons of the brainstem. Bar = 50 μ m.

Possible function of NPRs in the CNS

The important role of the ANP/NPR-A system in the physiological regulation of arterial blood pressure and volume has been emphasized in various genetic mouse models. Targeted deletion of the peptide (ANP^{-/-}) or its receptor (GC-A^{-/-}), leads to severe, chronic arterial hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death [67-69]. In contrast, overexpression of ANP or NPR-A elicits a "dose-dependent" fall in arterial blood pressure [71]. ANP and NPR-A transcripts were found to be up-regulated for prolonged periods in rat cerebral cortex following acute cortical spreading depression [70]. It is of interest

that NPR-C appears to mediate the mitogenic action of natriuretic peptides in Schwann cells [16, 29, 72]. Mice lacking the NPR-C gene *Npr3* show reduced blood pressure and skeletal deformities associated with a considerable increase in bone turnover [73]. In addition, the elimination of NPR-C by antisense has also been reported to attenuate inhibitory effects of CNP on evoked neurotransmitter efflux in PC12 cells [18]. The anti-proliferative actions of ANP on astrocytes are reported to be mediated by NPR-C [54]. In rat hypothalamus, CNP inhibits the calcium current in magnocellular neurosecretory cells through its effect on NPR-C [57]. Natriuretic peptides inhibit

the stimulated proliferation of astrocytes
via actions at NPR-C [54], and enhance

the survival of PC12 and embryonic basal
forebrain cells [74].

	NPR-A	NPR-B	NPR-C
Telencephalon			
- Main olfactory bulb	+++	++	-
- Anterior olfactory nucleus	-	++	-
- Amygdala	-	+++	++
- Cortex	+	+++	+++
- Basal forebrain	-	+	-
- Basal ganglia	-	++	-
- Hippocampus	+	++	+
Diencephalon			
- Hypothalamus	+	+++	+
- Thalamus	-	++	-
Circumventricular organs			
- Area postrema	++	++	-
- median eminence	-	+++	-
- subfornical organ	+++	+++	-
Cerebellum	+	+	+
Brainstem			
A) Midbrain			
- Periaqueductal gray	-	+++	++
- Oculomotor nucleus	++	++	++
- Trochlear nucleus	-	+++	++
- Red nucleus	+++	+	+++
- Dorsal raphe nucleus	-	+	+
- Substantia nigra	-	+	-
B) Pons			
- Pontine nucleus	+	+++	+++
- A5 region	-	+	++
- Facial nucleus	-	++	+++
- Abducens nucleus	-	+++	+
- Parabrachial nucleus	++	+++	+
- Vestibular nucleus	-	+	++
- Trigeminal motor nucleus	+	+++	+++
- Locus coeruleus	+	-	+++
- Cochlear nucleus	-	+++	++
C) Medulla			
- Spinal trigeminal nucleus	+	+++	-
- Hypoglossal nucleus	+++	+++	+++
- Dorsal motor nucleus of vagus	+++	++	++
- Nucleus ambiguus	+++	++	++
- Ventrolateral medulla	-	++	+++
- Solitary nucleus	-	+	-
- Cuneate nucleus	+++	++	-
- Lateral reticular nucleus	++	++	+++
- Inferior olive	+++	+++	++

Table 1. Distribution of NPRs in the brain.

In the monkey brainstem, NPR-A immunoreactivity overlaps with cholinergic neurons in the parabrachial nucleus, the dorsal motor nucleus of the vagus, the hypoglossal nucleus, and the nucleus ambiguus [20]. Also, a large proportion of cholinergic neurons in the cranial motor nuclei and dorsal tegmental nucleus express NPR-C [21]. Furthermore, NPR-B has been detected in brainstem motor nuclei [14], suggesting its presence in cholinergic neurons. These data suggest a possible function of all natriuretic peptides in cholinergic neurons.

Previous reports have shown the role of central cholinergic pathways in the secretion of hormones involved in fluid and electrolyte balance [75]. For example, cholinergic stimulation of the anteroventral third ventricle induces an increase in plasma ANP as well as a marked elevation of peptide content in the medial basal hypothalamus, neuro and adenohypophysis [75]. Furthermore, cholinergic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus are preganglionic parasympathetic neurons that send axons to visceral organs such as the heart and

kidney. Also, some of the cholinergic neurons in the nucleus ambiguus project to the heart, and thereby play an important role in cardiac regulation of arterial blood pressure [76, 77]. Microinjection of ANP into the nucleus ambiguus causes a marked bradycardia [78]. These findings, along with the previous results showing the presence of NPRs in cholinergic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus and nucleus ambiguus [20-21], suggest the involvement of natriuretic peptides in cardiovascular control through activation of cholinergic neurons expressing natriuretic peptide receptors.

A previous study has also demonstrated that natriuretic peptides and their receptors are expressed in the eye [56, 79-80], and recently all natriuretic peptide hormones and NPR-B were detected in cholinergic retinal amacrine cells [56, 81]. These observations suggest that natriuretic peptides also play a role in regulating eye functions through cholinergic neurons in the brainstem.

NPRs were detected in regions contain catecholaminergic neurons. NPR-A was

seen in the locus coeruleus which did not overlap with TH-positive neurons [20]. However, NPR-C immunoreactivity was observed in several catecholaminergic cell groups, including the A6, A5, A1, C3 and C1 cell groups. Furthermore, it has been reported that some of these nuclei contain NPR-B mRNA [14]. Since NPR-B is a specific receptor for CNP, these data suggest that NPR-C may bind CNP, but not ANP or BNP, in catecholaminergic neurons of these regions.

The interactions of natriuretic peptides with catecholaminergic neurons have been well documented in previous studies. Locus coeruleus neurons have a pressor function. For example, the selective stimulation of noradrenergic cell bodies in the locus coeruleus elicits decreases in blood pressure, renal sympathetic activity and heart rate [82-84]. Furthermore, the ventrolateral medulla contains catecholaminergic neurons which are known to be important in cardiovascular control. Natriuretic peptides induce significant increases in TH mRNA through a cGMP-dependent phosphodiesterase pathway and protein

kinase G-dependent mechanisms, which in turn results in stimulation of catecholamine synthesis in PC12 cells [85]. Furthermore, in spontaneously hypertensive rats, local microperfusion of ANP or an NPR-C agonist into the anterior hypothalamus reduces the release of noradrenalin from nerve terminals, an effect accompanied by an increase in arterial blood pressure [86]. All these results suggest that natriuretic peptides regulate cardiovascular function, partly by modulating catecholaminergic neurons.

In addition to the established roles for natriuretic peptides in regulating neuroendocrine and cardiovascular functions, and fluid-electrolyte balance [5], NPs and NPRs were found in regions not related to the mentioned functions. A previous study showed that CNP inhibits dopamine release by stimulation of NPR-B receptors and the increase in intracellular GMP concentration [87]. In addition, CNP can regulate cocaine-induced dopamine release and expression of immediate early genes in brain neurons [52]. Interestingly, CNP has been found to improve learning and consolidation of

learning in a passive avoidance paradigm and dopamine has been shown to be one of the mediating neurotransmitters in the effect of CNP on learning [88]. Recent reports have shown that only the natriuretic peptides binding to NPR-C inhibit adrenergic neurotransmitter efflux [17-18]. Moreover, natriuretic peptides and their receptors, NPR-A and NPR-B, have been found in dopaminergic retinal amacrine cells [56, 81]. Taken together, these results suggest that CNP may regulate the activity of catecholaminergic neurons in several regions of the rat brainstem through binding to NPR-C. The functional significance of NPRs in several regions in the brain remains to be elucidated.

Perspectives

Genetic models and pharmacological studies have shown that the NPs play

important roles in the regulation of cardiovascular homeostasis, skeletal growth. In addition, the NP signaling system may be important for cardiomyocyte development as shown by their expression at early stages of heart development and in ES cell-derived cardiomyocytes, and their expression after transplantation is important to maintain cardiac functions. On the other hand, NPRs are widely distributed throughout the brain in regions related to cardiovascular control and in other regions related to other functions, suggesting the involvement of NP system in broad range of functions in the brain. A better understanding of the functions and regulation of NP system may provide an opportunity to clarify their roles during development and in the CNS.

References

- [1] Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332:78-81, 1988.
- [2] Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Brain natriuretic peptide-32: N-terminal six amino acid extended form of brain natriuretic peptide identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 726–732, 1988.
- [3] Brenner BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev* 70:665-699, 1990.
- [4] Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 168:863-870, 1990.
- [5] Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 339:321-328, 1998.
- [6] Abell TJ, Richards AM, Ikram H, Espiner EA, Yandle T. Atrial natriuretic factor inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:1392– 1396, 1989.
- [7] Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension* 35:19-24, 2000.
- [8] Redondo J, Bishop JE, Wilkins MR. Effect of atrial natriuretic peptide and cyclic GMP phosphodiesterase inhibition on collagen synthesis by adult cardiac fibroblasts, *Br. J. Pharmacol.* 124:1455–1462, 1998.
- [9] Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK, Noser JA, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC, Chen HH, Burnett JC. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases, *Circ Res* 91: 1127–1134, 2002.

- [10] Brown J, Zuo Z. C-type natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide receptors of rat brain. *Am J Physiol* 264:R513-R523, 1993.
- [11] Minamino N, Aburaya M, Kojima M, Miyamoto K, Kangawa K, Matsuo H. Distribution of C-type natriuretic peptide and its messenger RNA in rat central nervous system and peripheral tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 197:326-335, 1993.
- [12] Herman JP, Langub MC, Watson RE. Localization of C-type natriuretic peptide mRNA in rat hypothalamus. *Endocrinology* 133:1903-1906, 1993.
- [13] Herman JP, Dolgas CM, Marcinek R, Langub MC. Expression and glucocorticoid regulation of natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C) mRNA in rat brain and choroid plexus. *J Chem Neuroanat* 11:257-265, 1996.
- [14] Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol* 369:165-187, 1996.
- [15] Langub MC Jr, Watson RE Jr, Herman JP. The C-type natriuretic receptor is the predominant natriuretic receptor mRNA expressed in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 7:305-309, 1995.
- [16] DiCicco-Bloom E, Lelièvre V, Zhou X, Rodriguez W, Tam J, Waschek JA. Embryonic expression and multifunctional actions of the natriuretic peptides and receptors in the developing nervous system. *Dev Biol* 271:161-175, 2004.
- [17] Trachte GJ. Depletion of natriuretic peptide C receptors eliminates inhibitory effects of C-type natriuretic peptide on evoked neurotransmitter efflux. *J Pharmacol Exp Ther* 294:210-215, 2000.
- [18] Trachte G. Neuronal regulation and function of natriuretic peptide receptor C. *Peptides* 26:1060-1067, 2005.
- [19] Abdelalim EM, Takada T, Torii R, Tooyama I. Molecular cloning of BNP from heart and its immunohistochemical

localization in the hypothalamus of monkey. *Peptides* 27:1886-1893, 2006.

[20] Abdelalim EM, Osman AHK, Takada T, Torii R, Tooyama I. Immunohistochemical mapping of natriuretic peptide receptor-A in the brainstem of *Macaca fascicularis*. *Neuroscience* 145:1087-1096, 2007.

[21] Abdelalim EM, Masuda C, Bellier JP, Saito A, Yamamoto S, Mori N, Tooyama I. Distribution of natriuretic peptide receptor-C immunoreactivity in the rat brainstem and its relationship to cholinergic and catecholaminergic neurons. *Neuroscience* 155: 192-202, 2008..

[22] Garbers DL. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 71:1-4, 1992.

[23] Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252:120-123, 1991.

[24] Maack T. Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol* 54:11-27, 1992.

[25] Garg R, Pandey KN. Angiotensin II-mediated negative regulation of Npr1 promoter activity and gene transcription. *Hypertension* 41:730-736, 2003.

[26] Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27: 47-72, 2006.

[27] Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA, Lewicki JA. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 238:675-678, 1987.

[28] Anand-Srivastava MB, Sairam MR, Cantin M. Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/cAMP system. *J Biol Chem* 265:8566-8572, 1990.

[29] Murthy KS, Teng BQ, Zhou H, Jin JG, Grider JR, Makhoul GM. G(i-1)/G(i-2)-dependent signaling by single-

transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol* 278:G974-G980, 2000.

[30] Leu M, Ehler E, Perriard JC. Characterization of postnatal growth of the murine heart, *Anat. Embryol.* 204: 217 – 224, 2001.

[31] Pan J, Fukuda K, Saito M, Matsuzaki J, Kodama H, Sano M, Takahashi T, Kato T, Ogawa S. Mechanical stretch activates the JAK/ STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Cir. Res.* 84:1127 – 36, 1999.

[32] Fijnvandraat AC, van Ginneken AC, de Boer PA, Ruijter JM, Christoffels VM, Moorman AF, et al. Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube. *Cardiovasc Res* 58:399–409, 2003.

[33] Hidaka K, Lee JK, Kim HS, Ihm CH, Iio A, Ogawa M, et al. Chamberspecific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *FASEB J* 17:740–2, 2003.

[34] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kaistura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114:763 –76, 2003.

[35] Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12313– 12318, 2003.

[36] Fukuda K. Progress in myocardial regeneration and cell transplantation. *Circ J* 69: 1431-1448, 2005.

[37] Min JY, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP, Xiao YF. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* 92:288–96, 2002.

[38] Abdelalim, E. M. Takada, T., Toyoda, F., Omatsu-kanbe, M., Matsuura, H., Tooyama, I., Torii, R. In vitro expression

of natriuretic peptides in cardiomyocytes differentiated from monkey embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 340: 689-95, 2006.

[39] Johkura K, Cui L, Yue F, Nitta K, Takei S, Okouchi Y, Asanuma K, Ogiwara N, Sasaki K. Natriuretic peptides in ectopic myocardial tissues originating from mouse embryonic stem cells. *Microsc Res Tech* 66: 165 – 172, 2005.

[40] Hersey R, Nazir M, Whitney K, Klein R, Sale R, Hinton D, Weisz J, Gattone VH. Atrial natriuretic peptide in heart and specific binding in organs from fetal and newborn rats. *Cell Biochem Funct* 7:35-41, 1987.

[41] Irons CE, Sei CA, Glembotski CC. Regulated secretion of atrial natriuretic factor from cultured ventricular myocytes. *Am J Physiol* 264:H282-H285, 1993.

[42] Cameron VA, Ellmers LJ. Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. *Endocrinology* 144: 2191-2194, 2003.

[43] Koide M, Akins RE, Harayama H, Yasui K, Yokota M, Tuan RS. Atrial natriuretic peptide accelerates proliferation of chick embryonic cardiomyocytes in vitro. *Differentiation.* 61:1-11, 1996.

[44] Hayashi D, Kudoh S, Shiojima I, Zou Y, Harada K, Shimoyama M, Imai Y, Monzen K, Yamazaki T, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocyte hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphate-1. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 310-319, 2004.

[45] Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M, Nakao K. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4239–4244, 2000.

[46] Semmekrot B, Guignard JP. Atrial natriuretic peptide during early human development. *Biol Neonate* 60: 341-349, 1991.

- [47] Cameron V, Rademaker M, Ellmers L, Espiner E, Nicholls M, Richards A. Atrial (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) expression after myocardial infarction in sheep: ANP is synthesized by fibroblasts infiltrating the infarct. *Endocrinology* 141: 4690-4697, 2000.
- [48] Luchner A, Stevens T, Borgeson D, Redfield M, Wei C, Porter J, Burnett J. Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. *Am J Physiol* 274: H1684-H1689, 1998.
- [49] Kawakami H, Okayama H, Hamada M, Hiwada K. Alteration of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide gene expression associated with progression and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats. *Clin Sci* 90: 197-204, 1996.
- [50] Day M, Schwartz D, Wiegand R, Stockman P, Brunnert S, Tolunay H, Currie M, Standaert D, Needleman P. Ventricular atriopeptin: unmasking of messenger RNA and peptide synthesis by hypertrophy or dexamethasone. *Hypertension* 9: 485-491, 1987.
- [51] Kishimoto I, Rossi K., Garbers D.L. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2703-2706, 2001.
- [52] Thiriet N, Jouvert P, Gobaille S, Solov'eva O, Gough B, Aunis D, Ali S, Zwiller J. C-type natriuretic peptide (CNP) regulates cocaine-induced dopamine increase and immediate early gene expression in rat brain. *Eur J Neurosci* 14:1702-1708, 2001.
- [53] Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG. Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissue. *Mol Cell Biol* 11:3454-3462, 1991.
- [54] Prins BA, Weber MJ, Hu RM, Pedram A, Daniels M, Levin ER. Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor. Potential role in the

inhibition of astrocyte proliferation. *J Biol Chem* 271:14156-14162, 1996.

[55] Yu YC, Cao LH, Yang XL. Modulation by brain natriuretic peptide of GABA receptors on retinal ON-type bipolar cells. *J Neurosci* 26: 696-707, 2006.

[56] Abdelalim EM, Masuda C, Tooyama I. Expression of natriuretic peptide-activated guanylate cyclases by cholinergic and dopaminergic amacrine cells of the rat retina. *Peptides* 29: 622-628, 2008.

[57] Rose AR, Anand-Srivastava MB, Giles WR, Bains JS. C-type natriuretic peptide inhibits L-type Ca^{2+} current in rat magnocellular neurosecretory cells by activating NPR-C receptor. *J Neurophysiol* 94:612-621, 2005.

[58] Friedl A, Harmening C, Schmalz F, Schuricht B, Schiller M, Hamprecht B. Elevation by atrial natriuretic factors of cyclic GMP levels in astroglia-rich cultures from murine brain. *J Neurochem* 52: 589-597, 1989.

[59] Goncalves J, Grove KL, Deschepper CF. Generation of cyclic guanosine monophosphate in brain slices incubated with atrial or C-type natriuretic peptides: comparison of the amplitudes and cellular distribution of the responses. *Regul Pept* 57: 55-63, 1995.

[60] Levin ER, Frank HJ, Gelfand R, Loughlin SE, Kaplan G. Natriuretic peptide receptors in cultured rat diencephalons. *J Biol Chem* 265:10019-10024, 1990.

[61] Simonnet G, Allard M, Legendre P, Gabrion J, Vincent JD (1989). Characteristics and specific localization of receptors for atrial natriuretic peptides at non-neuronal cells in cultured mouse spinal cord cells. *Neuroscience* 29:189-199, 1989.

[62] Teoh R, Kum W, Cockram CS, Young JD, Nicholls MG. Mouse astrocytes possess specific ANP receptors which are linked to cGMP production. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 16: 323-327, 1989.

- [63] Tang W, Paulding WR, Summers C. ANP receptors in neurons and astrocytes from spontaneously hypertensive rat brain. *Am J Physiol* 265: C106–C112,1993.
- [64] Deschepper CF, Picard S. Effects of C-type natriuretic peptide on rat astrocytes: Regional differences and characterization of receptors. *J Neurochem* 62:1974–1982, 1994.
- [65] Beaumont K, Tan PK. Effects of atrial and brain natriuretic peptides upon cyclic GMP levels, potassium transport, and receptor binding in rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 25: 256–262, 1990.
- [66] Cao LH, Yang XL. Natriuretic peptide receptor-A is functionally expressed on bullfrog retinal Muller cells. *Brain Res Bull* 71:410-15, 2007.
- [67] Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 378:65-68, 1995.
- [68] Lopez MJ, Garbers DL, Kuhn M. The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. *J Biol Chem* 272:23064–23068, 1997.
- [69] Shi SJ, Nguyen HT, Sharma GD, Navar LG, Pandey KN. Genetic disruption of atrial natriuretic peptide receptor-A alters renin and angiotensin II levels. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F665-F673, 2001.
- [70] Wiggins AK, Shen PJ, Gundlach AL. Atrial natriuretic peptide expression is increased in rat cerebral cortex following spreading depression: possible contribution to sd-induced neuroprotection. *Neuroscience* 118:715-726, 2003.
- [71] Oliver PM, John SW, Purdy KE, Kim R, Maeda N, Goy MF, Smithies O. Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2547-2551,1998.
- [72] Anand-Srivastava MB, Trachte GT. Atrial natriuretic factor receptors and

- signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev* 45:455-497, 1994.
- [73] Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamaguchi M, Smithies O. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7403-7408,1999.
- [74] Fiscus RR, Tu AW, Chew SB. Natriuretic peptides inhibit apoptosis and prolong the survival of serum-deprived PC12 cells. *Neuroreport* 12:185–189, 2001.
- [75] Antunes-Rodrigues J, Favaretto AL, Ballejo G, Gutkowska J, McCann SM. ANP as a neuroendocrine modulator of body fluid homeostasis. *Rev Bras Biol* 56:221-231, 1996.
- [76] Massari VJ, Johnson TA, Gatti PJ. Cardiotopic organization of the nucleus ambiguus? An anatomical and physiological analysis of neurons regulating atrioventricular conduction. *Brain Res* 679:227-240,1995.
- [77] Gatti PJ, Johnson TA, Massari VJ. Can neurons in the nucleus ambiguus selectively regulate cardiac rate and atrioventricular conduction? *J Auton Nerv Syst* 57:123-127, 1996.
- [78] Ermirio R, Ruggeri P, Cogo CE, Molinari C, Calaresu FR. Neuronal and cardiovascular responses to ANF microinjected into nucleus ambiguus. *Am J Physiol* 260:R1089-R1094, 1991.
- [79] Fernandez-Durango R, Nunez DJ, Brown MJ. Messenger RNAs encoding the natriuretic peptides and their receptors are expressed in the eye. *Exp Eye Res* 61:723-729, 1995.
- [80] Kuribayashi K, Kitaoka Y, Kumai T, Munemasa Y, Kitaoka Y, Isenoumi K, Motoki M, Kogo J, Hayashi Y, Kobayashi D, Ueno S. Neuroprotective effect of atrial natriuretic peptide against NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Res* 1071:34-41, 2006.
- [81] Jin Y, Zhong YM, Yang XL. Natriuretic peptides are localized to rat

retinal amacrine cells. *Neurosci Lett* 421:106-109, 2007.

[82] Sved AF, Felsten G. Stimulation of the locus coeruleus decreases arterial pressure. *Brain Res* 414:119-132, 1987.

[83] Miyawaki T, Kawamura H, Komatsu K, Yasugi T. Chemical stimulation of the locus coeruleus: inhibitory effects on hemodynamics and renal sympathetic nerve activity. *Brain Res* 568:101-108, 1991.

[84] Anselmo-Francil JA, Rocha MJA, Peres-Polon VL, Moreira ER, Antunes-Rodrigues J, Franci CR. Role of the locus coeruleus on blood pressure response and atrial natriuretic peptide secretion following extracellular volume expansion. *Brain Res Bull* 50:173-177, 1999.

[85] Takekoshi K, Ishii K, Isobe K, Nomura F, Nammoku T, Nakai T. Effects of natriuretic peptides (ANP, BNP, CNP) on catecholamine synthesis and TH mRNA levels in PC12 cells. *Life Sci* 66:303-311, 2000.

[86] Peng N, Oparil S, Meng QC, Wyss JM. Atrial natriuretic peptide regulation of noradrenaline release in the anterior hypothalamus area of spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* 98:2060-2065, 1996.

[87] Jouvert P, Revel MO, Lazaris A, Aunis D, Langley K, Zwiller J. Activation of the cGMP pathway in dopaminergic structures reduces cocaine-induced EGR-1 expression and locomotor activity. *J Neurosci* 24:10716-10725, 2004.

[88] Telegdy G, Kokavszky K, Nyerges A. Action of C-type natriuretic peptide (CNP) on passive avoidance learning in rats: involvement of transmitters. *Eur J Neurosci* 11:3302-3306, 1999.

児童虐待への臨床法医学的取り組み

高瀬泉¹⁾, 中川季子¹⁾, 坂口生夫¹⁾, 山本好男¹⁾²⁾, 西克治¹⁾

1) 滋賀医科大学 社会医学講座 法医学部門

2) 三重大学 創造開発研究センター

A Clinical Forensic Approach to Child Abuse Intervention

Izumi TAKASE¹⁾, Tokiko NAKAGAWA¹⁾, Ikuo SAKAGUCHI¹⁾,

Yoshio YAMAMOTO¹⁾²⁾ and Katsuji NISHI¹⁾

1) Department of Legal Medicine, Shiga University of Medical Science

2) Mie University Research Center for Creation

Abstract We have been intervening in Shiga Prefecture child abuse cases since autumn 2006. Herein are presented notable injuries that we feel will be helpful to clinicians to diagnose whether a child was abused. Case 1: 10 year-old girl. Subscalp hematoma and swelling on the right cheek were found. Additionally, partial ligature marks on the nape were observed and subcutaneous hemorrhage on the left cheek, bilateral lower limbs, and the back, were also found. The girl said that she had been straddled, beaten and strangled by her mother. Case 2: 6-month-old girl. At the first medical examination, her parents complained that her anterior fontanelle had been swollen for more than 1 week, but had no idea as to the cause of the swelling. Subacute and chronic hematoma around the frontal and bilateral region were observed by CT (computed tomography), without a skull fracture. These findings suggested the strong possibility that she had been shaken furiously by someone close to her. We present important information and observations that come from our experience in examining abused children, which we hope will be beneficial for clinical forensic approaches to child abuse. Furthermore, the importance of cooperation among related professionals is reemphasized.

Keywords child abuse, clinical forensic medicine, the cause of the injury, cooperation

はじめに

近年、児童虐待に対する社会的関心の高まりとともに、児童相談所における児童虐待相談対応件数は増加の一途をたどっている。厚生労働省統計によると、平成 18 年には全国の児童相談所で 37,323 件に対応している [1]。滋賀県では、同年の虐待相談の状況として 711 件と報告しているが、これは平成 14 年の 2 倍以上である（厚生労働省統計では養護相談での件数を扱っているが、滋賀県ではそれ以外で虐待の事実が判明した件数も含む） [2]。

法医学は検察や警察からの嘱託を受けて、ご遺体を解剖し、死因や死因の種類（大きく病死および自然死、外因死、その他不詳の死に大別される）などを決定する仕事であり、当部門では年間約 90 件前後の司法および行政解剖を行っている。こうした日々の業務には、損傷がいかんしてできたか（例えば、自己転倒か第三者の行為によるか、どのような凶器が使用されたか）、

損傷がいつ生じたかなどを鑑定し、裁判にも耐えうる書類を作成することも含まれる。従来、法医学と言えば、死者に対する学問の側面が強かったが、1969 年 von Cesare Gerin は「臨床法医学」を提唱し、虐待や性犯罪などによる被害者、交通事故や労働災害の患者など法的手続きを必要とする者に医学的な視点から指導および助言等を行う必要性を示した [3]。こうした考えは、欧米で広く取り入れられている。日本では、臨床法医学を実践する法医学者はごくわずかであるが、我々はその重要性を強く認識し、その社会に果たせる役割について検討してきた。平成 18 年秋からは関係諸機関と連携しつつ、滋賀県における被虐待児の損傷鑑定に携わっている。また、平成 19 年度には滋賀県知事と滋賀医科大学学長との間で「児童虐待に伴う診断指導委託」について正式に契約が交わされ、本格的なプロジェクトとして現在に至っている。

本稿では具体的な虐待被疑事例を提示し、対応の実際を示すことで、臨床法医学の役割に言及するとともに

に、被虐待児の診察に関わる可能性のある臨床医の意見書作成等の一助になればと考える。さらに、多職種連携を必要とする児童虐待問題への今後の取り組みおよび課題について検討したい。

事例概要と方法

1. 事例 1

[概要] 10歳女児。身長 144 cm, 体重 31 kg。頭部および右頬部に腫脹, 項部に表皮剥脱, 左頬部, 両下肢および背部に皮下出血を認めた。本児の話では馬乗りになった母親に顔面および頭部を殴打され, 頸を絞められたという。

(1) 認知および診察までの経緯

本プロジェクト設立に関して議論するため, 子ども家庭相談センターへ出向いたところ, 早速, 一時保護された児童の診察を依頼された。

(2) 診察の流れ

まず, 子ども家庭相談センターの職員より家族構成や事例の概要などを聴いた。そして, 同センターの診察室で女性職員立ち会いのもと, 診察を開始した。筆者は「どこか痛いところない?」と尋ねて全ての損傷の位置および分布を確認した。この際, 突然の依頼であり, 写真撮影道具一式を持参していなかったため, 翌日, 再度診察することとなった。翌日も前日と同様の環境で診察を行った。

2. 事例 2

[概要] 6ヶ月女児。初診時, 保護者は「痙攣を起こしてミルクをもどした」「1週間くらい前から大泉門が腫れてきた, 2,3日前から哺乳力が低下した」と夜間救急を受診したが, その損傷機序についてはあくまでも「分からない」とのことであった。

(1) 認知および診察までの経緯

まず, 子ども家庭相談センターの児童福祉司より当法医学部門に鑑定依頼の電話が入った。その際, 筆者は児童の家庭環境や入院までの経緯について簡単な説明を受けた。その後, 同児童福祉司が本児の入院先である A 病院の担当医と日程調整を行い, 10日後に筆者が同病院へ出向くこととなった。

(2) 診察の流れ

当日, 筆者は同児童福祉司と同病院で待ち合わせ, 担当医に会う前に事例の詳細な経過について聴いた。そして, 同職員立ち会いのもと, 担当医から画像所見の提示とともに本児の入院後の経過について説明を受けた。この段階で既に損傷が生じてから相当程度の時間が経過していたため, 筆者は本児を直接診察することなく, 画像所見を中心に鑑定を行うこととなった。

結果

1. 事例 1

(1) 全身概観および損傷所見

やや痩せ型。診察開始時, 表情は硬く口数も少なかったが, 次第に笑顔も見られるようになった。

頭部では, 頭頂後頭部やや左側寄りに約 3 cm 大の腫脹部を触れた。顔面では, 左頬下部ほぼ中央に 1×0.5 cm 大淡赤褐色変色斑を 1 個認めた。右頬は全体に腫脹し, 淡青色調を示した【図1】。項部では, ほぼ中央に長さ 1 cm の破線状の表皮剥脱を認め, 同部およびその下方約 1 cm に淡赤色線状変色帯を認めた【図2】。左下肢では, 左膝に 1.5 cm 大の淡赤紫色変色斑を 1 個認めた。右下肢では, 右鼠径部外側の腸骨翼に 7.5×2 cm 大の淡緑色から紫赤色変色を認めた【図3】。背部では, ほぼ中央に 1 cm 大程度の淡赤色変色斑を 1 個認めた。

(2) 成傷機転および自他為の別

頭部の腫脹はその位置から自他為のいずれの可能性も考えられた。左頬の変色斑は手指等による圧迫で生じたと考えられた。右頬の腫脹および変色は手掌程度の平面をもつ物体による打撲で生じたと考えられた。項部の線状表皮剥脱と周囲に出血を伴う蒼白帯は幅 1 cm 程度の索条物で皮膚に皺が寄るほど頸部を圧迫されて生じたと考えられた。左膝の変色斑は突出部の損傷であり, 自他為のいずれの可能性も考えられた。腸骨翼の変色はその位置および分布から自己転倒などより他為による打撲で生じたと考えられた。背部の変色斑はその位置および性状から比較的平らな面に一定時間圧迫されて生じたと考えられた。いずれの損傷もその辺縁は不明瞭で, 淡褐色あるいは黄褐色調を帯び, 治癒過程が進行していることから, 受傷後 2 週間程度経過していると推定された。

(3) 保護者による虐待の可能性

本児にみられた損傷の多くは他為によりほぼ同期に生じたと考えられた。本児童は少なくとも右頬を殴打され, 比較的重量のある者の上から乗られるなどして, 右鼠径部外側や背部ほぼ中央を床などに強く押さえつけられたと考えられた。索条物による頸部の圧迫については, 特に項部で力が強く作用しており, 同部付近に結紮部が存在したと考えられた。また, 一定時間比較的強い力が作用していることから, 他為によって生じたと考えた。

2. 事例 2

(1) 損傷所見

まず, 全身骨の X 線写真に明らかな骨折および仮骨形成や骨折後の癒合などを認めなかった。

次に, 初診時の頭部 CT 写真【図 4】で前頭から両側頭部を覆う低吸収域を認めたが, その程度は全

体に脳脊髄液よりやや高く、また、その内部はやや不均一であった。また、左前頭部では被膜形成（赤い矢印）を認めた。さらに、MRIで脳実質内の傷害を、眼科にて両眼底に出血を認めた。ただし、頭皮下血腫および頭蓋骨の明らかな骨折を認めなかった。約1ヶ月後のMRI【図5】T1およびT2強調像では硬膜下腔に層状構造を認めた。

（2）成傷機転および自他為の別

上記損傷は頭部に直接打撃が加わったよりは頭蓋骨と脳に比較的大きな加速度が加わり、両者の運動の‘ずれ’から脳表面の血管が破綻して生じたと考えられた。そして、血腫の性状より初診時の数日から数週間程度以前に生じたと推定された。また、本児の受傷当時の月齢では自己転倒は考えられないこと、さらに、自宅内の転落でこのような損傷が生じるとは考えにくいことから、他者により頭部が激しく揺さぶられて生じた可能性が示唆された。

（3）保護者による虐待の可能性

上述のとおり、通常の家生活の中で広汎な硬膜下血腫が生じるとは考えにくいこと [4-8]、入院先の主治医の話から本児に出血傾向をきたすような疾病は存在しないことなどから、保護者など身近な大人が危害を加えた可能性が高いと考えた。すなわち、いわゆる‘Shaken Baby Syndrome’あるいは‘Shaken Impact Syndrome’の範疇に含まれると判断した。

考察

1. 事例1

問題点として、まず、写真撮影の際に筆者が硬い定規を使用したことが挙げられる。現在は、巻き尺のようなより軟らかい物を使用して、児童の不快感を少しでも軽減するように配慮している。

次に、この事例では診察時に既に受傷後約2週間が経過していた。そのため、特に項部や頬部などで所見が不明瞭になり、写真撮影にも苦慮した。したがって、より早い段階で介入する必要性を強く認識した。

2. 事例2

本事例のように、保護者などが損傷の原因に触れなかったり、説明の辻褄が合わなかったりする場合には対応が非常に困難である。しかし、法医学者が介入することで保護者などが自身の行為を認め、指導に従うようになるなど、その言動が大きく変化することも多い。

3. 診察にあたっての留意事項

児童は身近な大人から虐待を受け、心身ともに傷ついている上に（一次被害）、対応にあたる医療、行政、司法等の専門職員の不適切な言動でさらに不快な経験をする（二次被害）[9-11] 可能性がある。したがって、

我々は以下の点などに留意する必要があると考える。

- 1）事前に子ども家庭相談センター職員から事件の概要や家庭環境などについて聴く
- 2）児童が少しでもリラックスできる場や雰囲気をつくる（例として、児童子ども家庭相談センターの職員や看護師など安心できる人に付き添ってもらい、事件に関係のない会話をする、マスコットやぬいぐるみなどを使う）
- 3）児童には診察に必要な最低限の情報のみ聴く（例として「痛いところない？」など）
- 4）診察前および診察中に逐次同意を得る
- 5）身体はもちろん、衣服にも必要以上に手を触れない（年長児の場合、児童自らの手で髪の毛を上げる、衣服をまくるなど協力してもらう）

4. 今後の取り組みおよび課題

臨床医は患者と信頼関係を構築し、損傷を治療する。一方、法医学者は損傷機転を判断し、鑑定書などを作成する。そのため、互いに連携し、役割分担することでより良い対応を行えるばかりでなく、各医療者の負担も軽減されるのではないかと考える。さらに、本学は地域医療の充実や全人的医療の実現をその使命としており、独自のシステムを構築するに最適な基盤が既に存在するものと考えられる。また、本学では臨床心理士研修コースが開設されており、児童の心理的なケアについても連携していければと考えている。

さらに、他機関との連携では、特に写真による損傷鑑定を依頼される場合、その質が問題となる。普段、証拠写真などを撮る機会の多い警察を除き、子ども家庭相談センターの職員などが撮影する場合には巻き尺などを必ず入れること、損傷の接写に加え、身体における位置や分布が分かるよう引いて撮ることなどをお願いしている。

以上のように、関係機関とのさらなる連携を図るため、多職種による定期的な勉強会などが必要ではないかと考える。

まとめ

まず、児童虐待が疑われた2事例を提示し、損傷所見のとり方、成傷機転の推定などにおける臨床法医学的視点について言及した。さらに、診察での留意点や今後の課題について検討し、臨床医や他の専門職種とのさらなる連携構築のため、定期的な勉強会等が必要ではないかと提起した。

文献

- [1] 厚生労働省ホームページ：2008年12月現在 <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kodomo/dv15/index.html>.
- [2] 滋賀県ホームページ：2008年12月現在

<http://www.pref.shiga.jp/e/kodomokatei/kosodatehometpage/child-abuse/files/gyakutaisoudankensuuh18k akutei.pdf>.

- [3] 佐藤喜宣. 臨床法医学テキスト. 東京, 中外医学社, 1-2, 2008.
- [4] Helfer RE, Slovis TL, Black M. Injuries resulting when small children fall out of bed. *Pediatrics*, 60:533-535, 1977.
- [5] Nimityongskul P, Anderson LD. The likelihood of injuries when children fall out of bed. *J Pediatr Orthop*, 7:184-187, 1987.
- [6] Duhaime AC, Alario AJ, Lewander WJ, Schut L, Sutton LN, Seidl TS, Nudelman S, Budenz D, Hertle R, Tsiaras W, Loporchio S. Head injury in very young children: Mechanisms, injury types, and ophthalmologic findings in 100 hospitalized patients younger than 2 years of age. *Pediatrics*, 90:179-185, 1992.
- [7] Lyons TJ, Oates RK. Falling out of bed: A relatively benign occurrence. *Pediatrics*, 92:125-127, 1993.
- [8] Tarantino CA, Dowd D, Murdock TC. Short vertical falls in infants. *Pediatr Emerg Care*, 15:5-8, 1999.
- [9] 加茂登志子. 【虐待のプライマリ・ケア 子ども虐待・DV・高齢者虐待】DV被害者の医療現場における対応と治療. *治療*, 87:3239-3244, 2005.
- [10] 米山奈奈子. DV被害女性が体験した支援と回復に関する一考察-回復過程における支援の現状と医療機関の役割-. *秋田大学医学部保健学科紀要*, 13:23-33, 2005.
- [11] 友田尋子. DV被害者に看護師ができること-二次被害から守る-. *看護学雑誌*, 68:1038-1041, 2004.

抄録

我々は平成 18 年秋より滋賀県における被虐待児の損傷鑑定に携わってきた。今回は臨床医にも役立つと考えられる損傷を提示する。

[事例 1] 10 歳女兒。頭部および右頬部に腫脹，項部に表皮剥脱，左頬部，両下肢および背部に皮下出血を認めた。本児の話では馬乗りになった母親に顔面および頭部を殴打され，頸を絞められたという。[事例 2] 6 ヶ月女兒。初診時，保護者は「1 週間くらい前から大泉門が腫れてきた」と話したが，その損傷機序は不明とのことであった。CT で亜急性および慢性の硬膜下血腫を前頭から両側頭部に認めたが，頭蓋骨には明らかな骨折を認めなかった。本児は身近な大人に頭部を激しく揺さぶられた可能性が高いと考えられた。我々はこれまでの経験から，今後の児童虐待問題への臨床法医学的取り組みに有用かつ重要な知見を提示するとともに，関係諸機関の連携の重要性を再度強調したい。

キーワード：児童虐待，臨床法医学，損傷鑑定，多職種連

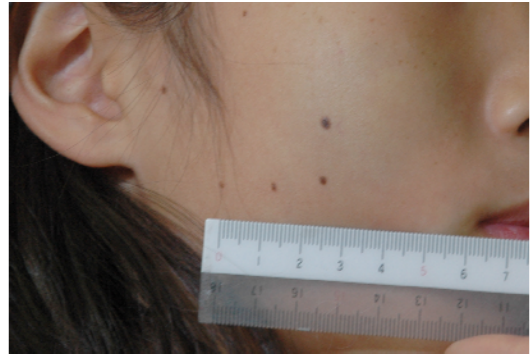


図 1 腫脹し，淡青色調を示す右頬



図 2 破線状の表皮剥脱と蒼白帯

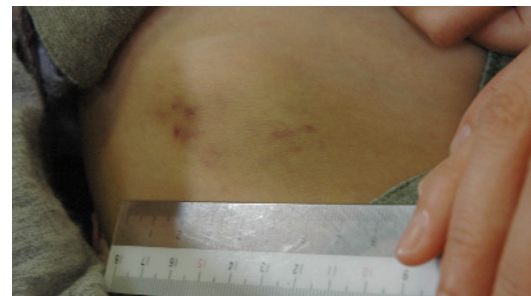


図 3 腸骨翼の皮下出血

図 4 初診時の CT

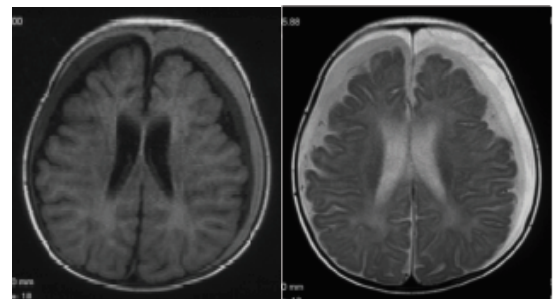


図 5 約 1 ヶ月後の MRI (T1 強調像) (T2 強調像)

細動発生に關与する病態生理

林 秀樹

滋賀医科大学

リハビリテーション科

Pathophysiology Regarding the Generation of Fibrillation

Hideki HAYASHI

Shiga University of Medical Science

Department of Rehabilitation Medicine

要約

心房細動は血栓塞栓症の原因となり、心室細動は致死的不整脈である。いずれの細動疾患も、心臓内を不規則に動いている複数の細動波によって特徴づけられる。どのようにして細動波が発生しさらに維持されるのかというメカニズムを知ることは、これらの細動疾患を治療するうえで極めて重要である。細動波は、一つの興奮波が分裂して複数の興奮波に変化する (wavebreak) ことで生じる。心筋の活動電位持続時間は先行する拡張期時間が長いと延長し、それが短いと短縮する。この現象は *restitution theory* として知られ wavebreak の発生様式を説明している。光学マッピングやコンピューターシミュレーションを用いて解析された活動電位では、この *restitution theory* が細動の発生と密接に関係していることが示されている。さらに、三次元的構造をもつ心臓は解剖学的・電気生理学的な点において均一な成分から構成されていない。これらの不均一性は *restitution theory* とは別に wavebreak を生じさせやすくし、細動の発生に密接に關与する。病的心では不均一性が増大しており、細動はさらに発生しやすくなる。これは臨床上、突然死の発生率が正常心に比べ病的心において高いことと合致している。この総説では、現時点での細動発生に関する理論をまとめ、今後の研究分野の方向性について述べる。

Abstract

Atrial fibrillation causes thromboembolism, whereas ventricular fibrillation is lethal. Both diseases are characterized by multiple wavelets meandering in the atria or the ventricles. It is important to study the underlying mechanism of how the fibrillation ensues and then how it lasts, because we should treat patients who develop fibrillation based on plausible mechanisms. When a single propagating wave breaks up into multiple waves, fibrillation results. Electrophysiological restitution properties of action potential duration (APD) and conduction velocity (CV) posit that APD and CV vary depending on preceding diastolic interval (defined as repolarization interval between 2 successive action potentials). When APD becomes sufficiently short following short diastolic interval, wavebreak can occur, leading to the generation of fibrillation. The validation of this theory has been supported by experiments using optical mapping and computer simulations using mathematical model. In addition, the heart is three-dimensionally heterogeneous in terms of anatomical structure and electrophysiological property. These heterogeneities tend to increase a propensity to develop wavebreak. Furthermore, diseased heart consists of a greater degree of heterogeneity than normal heart, so that fibrillation is more likely to occur in diseased heart. This is consistent with that the incidence of sudden death is higher in diseased heart than normal heart. This article reviews currently understood pathophysiology regarding fibrillation and mentions future researches.

Keyword: Fibrillation, Reentry, Heterogeneity, Restitution, Calcium

はじめに

細動は、心電図上電位の小さい不規則な波形によって診断される。従って、細動では規則的で正常なリズムが失われている。1964年 Moe らは¹、心房細動ではいくつかの興奮波が同時に存在することをコンピューターを用いて示し、multiple wavelets theory を提唱した。後にマッピング技術が進歩し、この theory が正しいことが証明された。その後、細動発生に関する研究の焦点は次の二つに向けられてきた：1) どのようにして細動が発生するのか。2) 発生した細動がどのようにして続き停止するのか。細動のメカニズムを考える上では主に次の観点から研究が行われてきた：1) 心臓活動電位の特性とその伝搬様式、2) 解剖学的・電気生理学的な不均一性、3) 細胞内カルシウムの動態。

細動

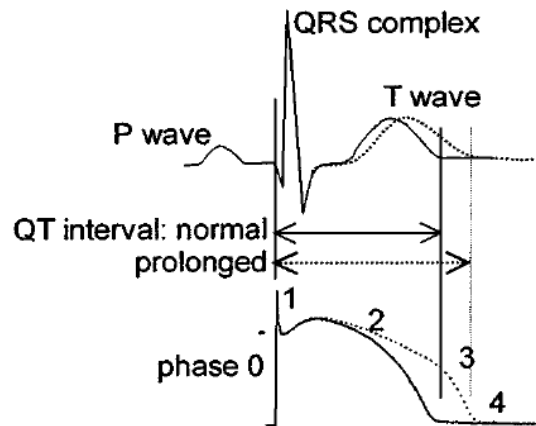
古典的に細動の機序は、複数興奮波の共存または異常自動能の亢進と考えられてきた。興味深いことに、現在においてもどちらの機序がより正確なのか、より重要であるのかという議論が続いている^{2, 3}。前者では、複数興奮波が同時に存在するためには、1つの興奮波が分裂する必要がある、”興奮波の分裂 (wavebreak)” が細動の発生と維持の本質と考えられている。一方、後者では、自動能亢進によって興奮波が頻回に発生した場合、伝播する過程で興奮波が分裂し、興奮波の分裂は Doppler 効果による副産物と考えられている。いずれの場合にも、細動中に興奮波の分裂が起こっている。では、どのようにして興奮波の分裂が起こるのであろうか。

不応期と伝導

まず、興奮伝播を考える上で心筋細胞の活動電位について知ることが必須である (図1)⁴。心筋細胞はナトリウムイオンが細胞内に急速流入することにより静止膜電位 (約 -90 mV) より約 +30 mV のレベルまで急速に脱分極する (Phase 0)。脱分極後にカリウムイオンが細胞外に流出することで再分極がおこり (Phase 1, 2, 3) 膜電位は静止状態 (-90 mV) に戻る (Phase 4)。この静止状態は次の脱分極への準備状態でもある。したがって、ひとたび心筋細胞が脱分極すると、その後一定期間は続いて脱分極することができない (all-or-none response)。これが、不応期 (refractory period) である。細動中のように不規則な興奮を繰り返す場合において、活動電位は all-or-none response を示すわけではないがこの原則はあてはまる。一方、心筋細胞の興奮は心臓内を伝播する必要がある。興奮伝播 (conduction) は不応期を脱した心筋細胞に向か

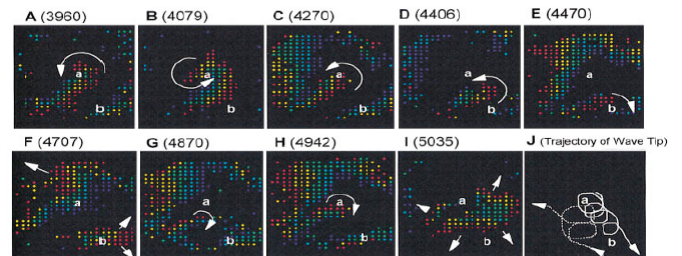
ってのみ可能である。したがって、心臓の興奮伝導パターンは第一に不応期によって決定され、conduction は不応期の従属する因子である。光学マッピングの技術を用いて心室細動を観察すると、興奮波は再分極が終了したとことに向かって進入を繰り返すか、興奮がおさまっていないところでは伝導ブロックが生じている (図2)^{5, 6}。

図1. 心電図と心筋活動電位の関係



文献4より引用。

図2. 心室細動の electrical mapping



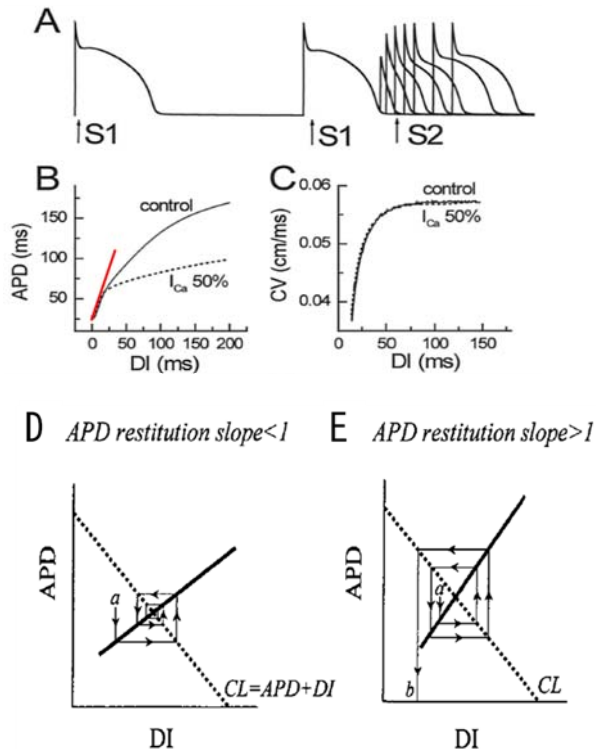
赤；興奮前面、青；興奮後面。黒い部分は完全に再分極した状態を表す。赤と青が接するところが wavebreak である。興奮は、旋回、直進、途絶など不規則な動きをする。矢印は伝播方向を示す。文献 5 より引用。

Restitution Theory

QT 間隔が先行する RR 間隔に影響を受けるように、心筋細胞の APD は活動電位に先行した拡張期の時間 (diastolic interval; DI) によって規定される。図3に示すように、連続する活動電位 (S1S2) の間隔 (coupling interval; CI) が短縮すると、DI は短縮する。DI が短縮するほど、APD は短縮する⁷。両者の関係は、自然対数に近似される非線形的な相関性を示す。この活動電位の特性は restitution と呼ばれ、1968年に Nolasco らによって始めて提唱された⁸。近

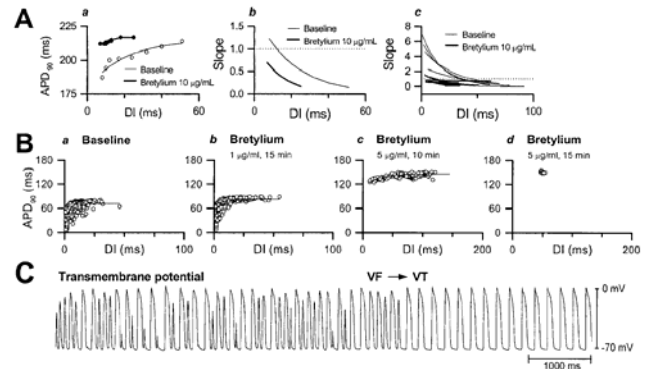
似された曲線の傾き、すなわち slope of restitution curve が 1 より大きい時、DI が短縮すると APD は十分に短縮し、興奮旋回 (reentry) を起こしやすくなる。一方、それが 1 より小さい時、DI が短縮しても APD は十分に短縮しないため、reentry を起こすことができない。この理論を実証するために行われた動物実験では、restitution slope > 1 の場合に細動が発生し、restitution slope < 1 の場合には細動は発生しないことが示されている²。ブタの右心室筋を用いた実験では、薬剤を用いて restitution slope < 1 とした場合には、細動が停止することが認められている (図 4)⁹。また、数学を用いたコンピューターシミュレーションにおいても同様の結果が得られている¹⁰。このように、restitution theory は心臓における細動の発生や停止に密接に関与することが考えられている。

図 3. Restitution theory



A; 基本刺激 (S1) のあとに期外刺激 (S2) を加えた場合、S1-S2 間隔と活動電位持続時間 (APD) の関係を示す。B, C; restitution property。S1-S2 間隔すなわち diastolic interval (DI) が短縮すると、APD は短縮し (B) 伝導速度 (CV) は低下する (C)。B の赤線は restitution curve の slope を示す。D, E; APD restitution slope の傾きと wavebreak の関係。APD restitution slope が 1 より小さい時には、DI が短縮しても APD はある値に収束する (D)。一方、APD restitution slope が 1 より大きい時には、DI が短縮によって APD は 0 まで短縮する (E)。したがって、wavefront と waveback が接することとなる (wavebreak の発生) 文献 9 より引用。

図 4. Restitution slope の心室細動に対する効果

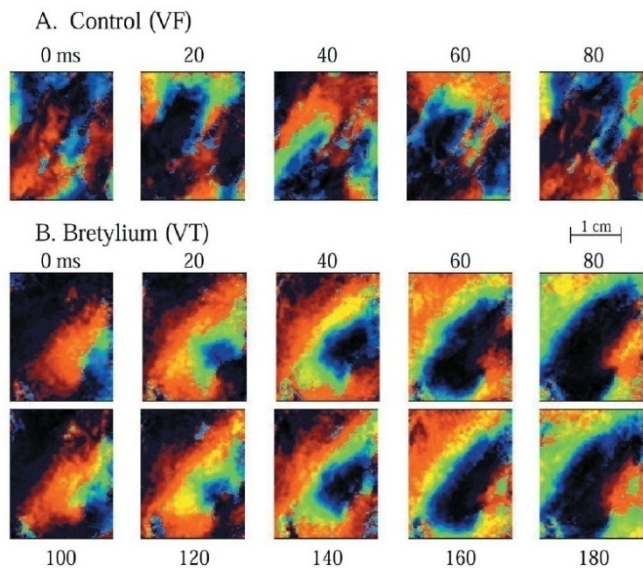


A; Bretylium は restitution slope を 1 より小にする。B; Bretylium の濃度依存性効果。C; Bretylium の作用で心室細動 (VF) は心室頻拍 (VT) に変化した。文献 10 より引用。

Wavebreak

血液などの流体が流れる場合に、層流と乱流がある。前者では流速は均一であるが、後者では異なる流速を持った流れが入り乱れている。層流が乱流へと変化するように、心臓内を伝播する興奮波が分裂 (wavebreak) した時に複数の興奮波が発生し細動となる。心筋細胞は再分極の後で興奮性を獲得するため、興奮前面 (wavefront) が興奮後面 (waveback) に接することができる時に wavebreak が起こる。この状態に至るには二つの興奮波が十分に近づき活動電位持続時間が十分に短縮する必要がある。図 5 は、wavebreak と restitution theory の関係を示している。心室細動中の様子を光学マッピングを用いて示している。Wavebreak は、心室細動中には常に見られるが、Bretylium という薬剤で restitution slope < 1 としたところ、心室細動は心室頻拍に変化した。これは、図 4 に示したように restitution slope > 1 の考えと符合する。これらの理論は興奮が伝播することを前提としている。もし、異所性自動能がもし非常に短い DI を伴って発生した場合には、同様に wavebreak が発生する。従って、wavebreak は細動が生じるのに必須条件である。

図5. 心室細動(VF)と心室頻拍(VT)の光学マッピング



A; 心室細動(VF)の光学マッピング。赤; 興奮前面、青; 興奮後面。B; Bretylium によって生じた心室頻拍(VT)。文献 10 より引用。

Heterogeneity

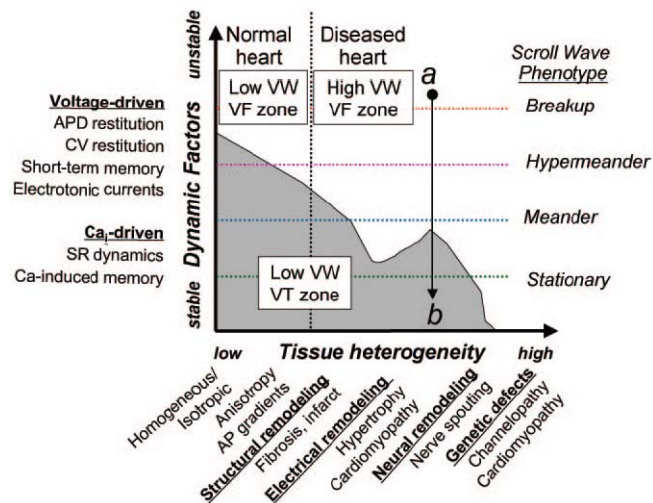
上述したように、restitution theory という電気生理学的特性によって wavebreak が起こり細動は発生する。加えて、heterogeneity は wavebreak の発生を促進する。Heterogeneity は Electrical Heterogeneity と Anatomical Heterogeneity に大別される(図6)¹¹。

Electrical Heterogeneity (電気的不均一性): 心臓内にはもともと不応期のばらつき (dispersion of refractoriness) が存在する。プルキンエ線維の APD は固有心筋のそれよりも長く、CV は固有心筋のそれよりも速い。このプルキンエ線維は自動能を発生しやすい。心内膜の APD は心外膜のそれよりも長い。心内膜と心外膜の間にある M 細胞は固有心筋のなかで最も長い APD を持つ(transmural refractory dispersion)。空間的に APD の不均一性 (heterogeneity) が十分に大きい場合、電位勾配にしたがって興奮の再進入 (reentry) が起こり wavebreak を発生させることがある。さらに、心筋梗塞のような器質的異常がある場合には、梗塞心筋と非梗塞心筋とでは APD, CV, そしてイオン電流が異なり、reentry を起こしやすい基盤を形成している。このように、空間的に電気的不均一性があると細動を発生しやすくなる。

Anatomical Heterogeneity (解剖的不均一性): 正常な心臓においても、乳頭筋、心筋線維の配列、gap junction の分布など構造的不均一が存在する。乳頭筋にはプルキンエ線維が密に存在し、心筋線維や gap junction は興奮伝搬に密接に関係している。器質的心

疾患に存在する心筋細胞の肥大や線維化は、正常心筋に比べて伝導性が低下している。従って、病的心では解剖学的不均一性が増大しており、細動を発生させる基盤が存在している。

図6. Heterogeneity



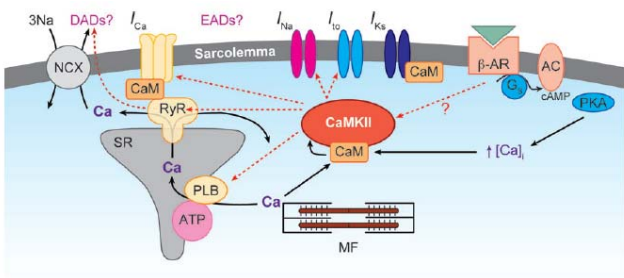
縦軸; 電氣的 heterogeneity、横軸; 解剖学的 heterogeneity。両者とも心室細動が発生しやすい (vulnerable window; VW)に関与している。文献 11 より引用。

細胞内カルシウム

生理的条件下では、細胞内カルシウムは収縮期に増加し拡張期に減少する¹²。細胞内カルシウムは細胞膜にあるイオンチャネル、イオン交換系や細胞内の筋小胞体におけるカルシウムの貯蔵の影響を受けている。カルシウムはL型カルシウムチャネルから心筋細胞内に入り、筋小胞体内に貯蔵された多くのカルシウム放出を誘発する (Ca-induced Ca release)。これによって、活動電位の Phase 2 におけるプラトー相を形成する。その後、細胞内カルシウムの大部分は筋小胞体に取り込まれ、一部の細胞内カルシウムは細胞膜にあるナトリウム-カルシウム交換系から細胞外に出る。筋小胞体への取り込みには ATPase (SERCA) による ATP の加水分解を要する(図7)¹²。このようなカルシウムホメオスタシスが乱れると、細動を発生させる状態をつくる。異常な細胞内カルシウムの増加は撃発活動 (triggered activity) の原因となる¹³。これは、カテコラミンによる刺激状態下で発生しやすい。また、カルシウム電流を抑制すると restitution slope は 1 より小となる。さらに、筋小胞体を介するカルシウムサイクリングを ryanodine (リアノジン受容体をブロック) と thapsigargin (SERCA をブロック) でブロックすると、restitution slope は 1 より小となる(図8)¹⁴。このように、細動発生には細胞内カルシウム

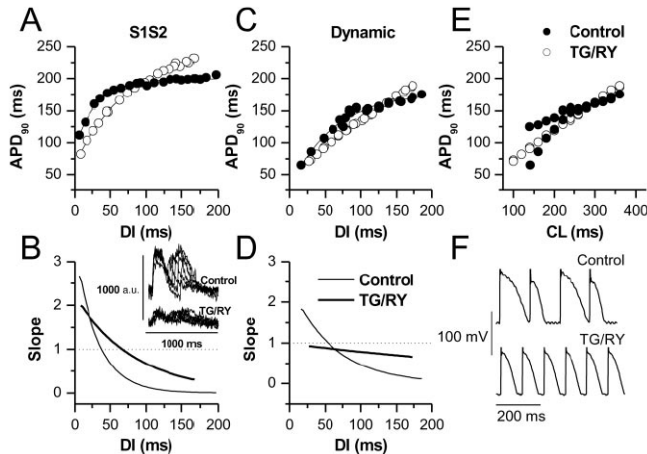
が重要であることが考えられる。光学マッピングを用いた動物実験では、ペースングまたは心室頻拍中には、細胞内カルシウムは活動電位の後を追う形で変化していた (voltage-gated Ca release)。一方、心室細動中には細胞内カルシウムと活動電位の相互関係は減少し、膜電位に関係のない SR からのカルシウム放出 (non-voltage-gated Ca release) が起こっていると考えられた¹⁵。したがって、この膜電位に関係のない SR からのカルシウム放出が心室細動の維持に関与していると考えられる。

図7. 細胞内カルシウムサイクリング



SR; 筋小胞体, RyR; リアノジン受容体, NCX; Na-Ca 交換系, PLB; フォスホランバン, CaM; カルモジュリン。文献 13 より引用。

図8. 細胞内カルシウムサイクリングが restitution slope に与える影響



Thapsigargin (TG) と ryanodine (RY) によって筋小胞体のカルシウムサイクリングがない状態にした場合、APD の restitution slope はコントロールに比べ平坦となった。文献 14 より引用。

治療

1991 年に発表された Cardiac Arrhythmia Suppression Trial では¹⁶、心室細動発生の引き金となる心室期外収縮の抑制を目的とした抗不整脈薬治療は突然死を減少させることはできず、逆に抗不整脈薬 (flecainide など) を内服していた患者の予後はそれ

を内服していなかった患者の予後よりも悪化した。Sicilian Gambit では¹⁷、不整脈発生の基盤となるもの (例えば、イオンチャンネルや β 受容体など) にターゲットをあてる治療法が提唱された。しかし、未だ細動に対する薬物療法は有効かつ安全という領域に達してはいないのが現状である。理論的には、restitution slope を flat にする薬物治療は細動の発生を防ぐと考えられる。しかし、実験で restitution slope < 1 とする薬物濃度と臨床でのそれとは大きな乖離がある。現在、新たな抗不整脈薬が開発されつつあり、それらの有効性が期待される¹⁸。心室細動の発生に関わる心筋梗塞部位とその周辺を心筋細胞シートで覆い組織を再構築する試みがなされている。この治療法は、heterogeneity を減らし心収縮力を回復させることが期待できるが現在研究段階である。細胞シートを用いるにあたって、技術面と安全面での検討が必要とされる。骨髄幹細胞 (stem cell) を梗塞心に注入し心筋細胞を再生することが試みられている。この治療法では、どのような細胞に分化するのか、分化した組織と元々の組織の間の heterogeneity、再生されたに神経支配が異常に増加する (nerve sprouting) などの問題が残されている。一方、iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells) を正常な心筋細胞に分化させ、それが正常に機能するという組織補完が可能となれば細動の治療は一変すると考えられる。

おわりに

心房細動も心室細動も生命にかかわる重大な疾患である。高齢化社会では、両細動疾患が増加していくことが予測される。これら疾患の新たな治療法を開発するにあたって、細動発生に関与する病態生理学の理解が必須である。

文献

1. Moe GK, Rheinboldt WL, Abildskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J* 1964;64:200-220.
2. Weiss JN, Chen PS, Wu TJ, Siegeman C, Garfinkel A. Ventricular fibrillation: new insights into mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1015:122-132.
3. Jalife J, Berenfeld O, Skanes A, Mandapati R. Mechanisms of atrial fibrillation: mother rotors or multiple daughter wavelets, or both? *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9:S2-12.
4. Roden DM, Balser JR, George AL, Jr., Anderson ME. Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol* 2002;64:431-475.
5. Kim Y-H, Garfinkel A, Ikeda T, Wu T-J, Athill

CA, Weiss JN, Karagueuzian HS, Chen P-S. Spatiotemporal complexity of ventricular fibrillation revealed by tissue mass reduction in isolated swine right ventricle. Further evidence for the quasiperiodic route to chaos hypothesis. *J Clin Invest* 1997;100:2486-2500.

6. Lee M-H, Qu Z, Fishbein GA, Lamp ST, Chang EH, Ohara T, Voroshilovsky O, Kil JR, Hamzei AR, Wang NC, Lin S-F, Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS, Chen P-S. Patterns of wave break during ventricular fibrillation in isolated swine right ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(1):H253-H265.

7. Weiss JN, Chen PS, Qu Z, Karagueuzian HS, Lin SF, Garfinkel A. Electrical restitution and cardiac fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13(3):292-295.

8. Nolasco JB, Dahlen RW. A graphic method for the study of alternation in cardiac action potentials. *J Appl Physiol* 1968;25:191-196.

9. Weiss JN, Chen P-S, Qu Z, Karagueuzian HS, Garfinkel A. Ventricular fibrillation : how do we stop the waves from breaking? *Circ Res* 2000;87:1103-1107.

10. Garfinkel A, Kim Y-H, Voroshilovsky O, Qu Z, Kil JR, Lee M-H, Karagueuzian HS, Weiss JN, Chen P-S. Preventing ventricular fibrillation by flattening cardiac restitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6061-6066.

11. Weiss JN, Qu Z, Chen PS, Lin SF, Karagueuzian HS, Hayashi H, Garfinkel A, Karma A. The dynamics of cardiac fibrillation. *Circulation* 2005;112(8):1232-40.

12. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415(6868):198-205.

13. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 2008;70:23-49.

14. Goldhaber JL, Xie LH, Duong T, Motter C, Khuu K, Weiss JN. Action potential duration restitution and alternans in rabbit ventricular myocytes: the key role of intracellular calcium cycling. *Circ Res* 2005;96(4):459-466.

15. Omichi C, Lamp ST, Lin SF, Yang J, Baher A, Zhou S, Attin M, Lee MH, Karagueuzian HS, Kogan B, Qu Z, Garfinkel A, Chen PS, Weiss JN. Intracellular Ca dynamics in ventricular fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1836-H1844.

16. Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, Peters RW, Obias-Manno D, Barker AH, Arensberg D, Baker A, Friedman L, Greene HL, Huther ML, Richardson DW, The CAST Investigators. Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J Med*

1991;324:781-788.

17. Task Force of the Working Group on Arrhythmias of the European Society of Cardiology. The Sicilian Gambit. A new approach to the classification of antiarrhythmic drugs based on their actions on arrhythmogenic mechanisms. *Circulation* 1991;84(4):1831-1851.

18. Conway E, Musco S, Kowey PR. New horizons in antiarrhythmic therapy: will novel agents overcome current deficits? *Am J Cardiol* 2008;102(6A):12H-19H.

Correspondence: 滋賀医科大学
リハビリテーション科 林 秀樹
〒520-2121 大津市瀬田月輪町
E-mail: hayashih@belle.shiga-med.ac.jp