

● 一般演題

出血性ショック心臓における致死性不整脈の
機序に関する実験的検討

—活動電位不均一性と Connexin43 変化について—

防衛医科大学校集中治療部 高瀬 凡平・東村 悠子・木村 一生
防衛医学研究センター医療工学研究部門 田中 良弘・服部 秀美・石原 雅之

要 約

出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し、いわゆる“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈するとされている。しかし、致死性不整脈の発生機序に関する検討は少ない。そこでわれわれは、実験的に検討した。

方法：SD rat ($n = 32$)に30%出血性ショック状態を作製し、非蘇生群、洗浄赤血球蘇生群、生理食塩水蘇生群、5%アルブミン蘇生群の4群間で心筋を摘出Tyrode液で灌流後Na channel感受性色素を用いたoptical mapping system (OMP)で興奮伝播・活動電位持続時間不均一性(action potential duration dispersion: APD dispersion)、致死性不整脈性を検討した。また、心筋組織のconnexin43 (Cx43)発現を免疫組織染色にて検討した。

結果：蘇生群では、3群とも全例蘇生に成功した。しかし、生理食塩水群、5%アルブミン群ではOMPで著明な左心室伝導遅延とburst pacingによる心室細動が全例で誘発されたのに対し、洗浄赤血球蘇生群では、伝導遅延・心室細動誘発ともに認められなかった。生理食塩水群、5%アルブミン群では著明にAPD dispersion値が増大したが、洗浄赤血球群では正常に保た

れていた。connexin43発現は生理食塩水群、5%アルブミン群では異常が認められたものの、洗浄赤血球群では正常に保たれていた。

結語：出血性ショック心臓では、左心室伝導遅延とAPD dispersion増大およびconnexin43発現異常を惹起し、電気的不安定性から致死性不整脈が誘発されることが示唆された。洗浄赤血球治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。

はじめに

これまでの多くの研究や臨床診療において心筋機能障害や心不全は遷延する出血性ショックに伴って頻繁に認められるとされている^{1,2)}。これらは、出血性ショックからの一時的回復後の予後不良および出血性ショック時の致死的心行動態破綻にかかわる。先行研究によると、出血性ショックに伴う心筋虚血や心筋低酸素状態が出血性ショック時の致死性心筋機能障害を惹起すると報告されている³⁾。出血性ショックの心臓への致命的障害を回避するためには、出血性ショックからの迅速な回復や心筋への重篤な虚血や低酸素血症を未然に防ぐ有効な治療が必要である⁴⁾。

また、出血性ショック・蘇生は、心筋全体の虚血・再還流である。さらに、平均全身血圧が

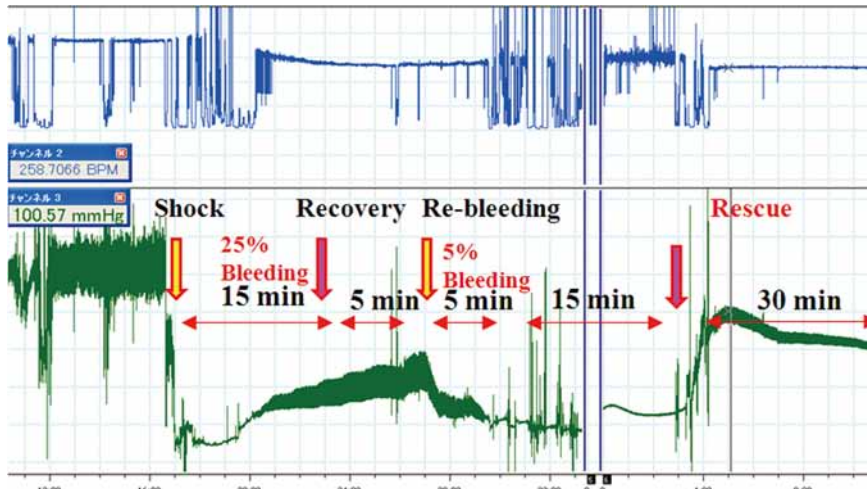


図1 出血性ショックモデルの作製プロトコル

40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生し、いわゆる“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈するとも報告されている⁵⁾。しかし、“出血性ショック心臓”の蘇生後の致死性不整脈出現やその病態に関する検討は少ない。

そこで、実験的に30%出血性ショック状態を作製し、5%アルブミン、生理食塩水、洗浄赤血球で蘇生した3群で心筋を摘出しTyrode液で灌流後Na⁺ channel 感受性色素を用いたoptical mapping systemで興奮伝播・活動電位持続時間不均一性(APD dispersion)および致死性催不整脈誘発性を検討するとともに、心筋組織の心筋興奮伝導蛋白であるconnexin43発現⁶⁾を免疫組織染色し、非蘇生群を対照群として、出血性ショック心の不整脈発生機序を検討することを本研究の目的とした。

1 方 法

Sprague-Dawley rats (male ; 8 weeks old ; 250～300 g ; $n=32$)の皮下にketamine hydrochloride (5mg/kg)を投与し麻酔した。麻酔下に気管内挿管し、人工呼吸下でabdominal aorta catheterを挿入して、血圧測定するとともにabdominal aorta catheterから脱血し、以下のプ

ロトコルで致死性出血性ショックモデルを作製した(図1)。すなわち、循環血液量25%を15分で脱血、5分間放置後再出血モデルとして、5%を5分かけて再脱血(Total 30% blood loss : 不可逆性ショック)を実施した。その後15分間放置したのち、脱血量と同量で①5%アルブミン(5%アルブミン群)、②生理食塩水(生理食塩水群)および③洗浄赤血球(洗浄赤血球群)蘇生した。また、④非蘇生群も対照群として作製した(各群、 $n=8$)。

1)optical mapping analysis 法と不整脈誘発法

ラットを麻酔後、正中切開にて開胸し、迅速に心臓を摘出した。大動脈から冠動脈洞にカニューレを挿入した。酸素化し37°Cに保温したTyrode液(CaCl₂ [2], NaCl [140], KCl [4.5], dextrose [10], MgCl₂ [1], and HEPES [10, pH 7.4], in mmol/L)にてただちに灌流した。さらに、Tyrode液を一定容量で灌流している水槽に心臓を固定し、大動脈に挿入したカニューレからNa感受性蛍光色素(di-4-ANEPPS 15 μ mol/L)を約40mL、2分間かけて灌流染色した。さらに、心臓の拍動を停止させるため2,3-butanedione monoxime (Wako Chemical, Tokyo, Japan, 20 mM)を灌流した。optical mapping analysisはhigh-quality charge couple

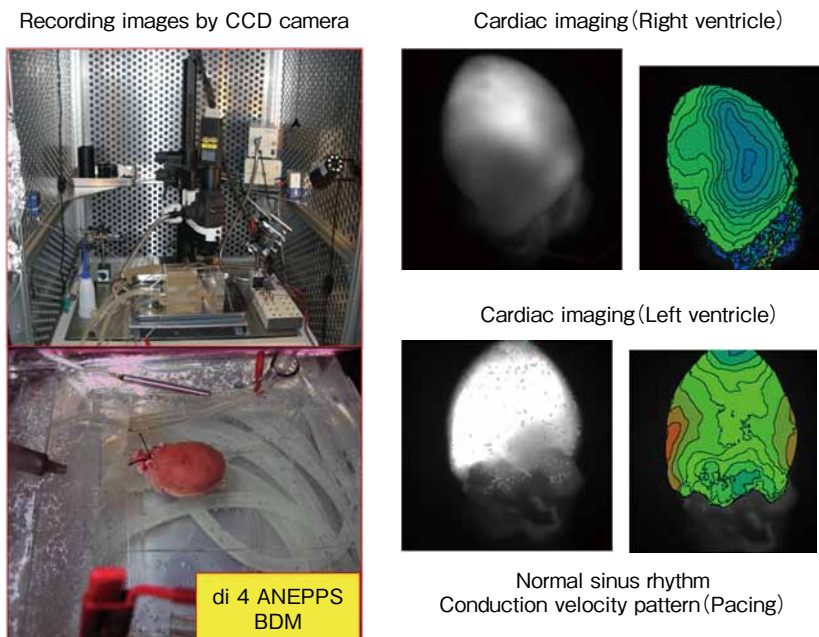


図2 optical mapping systemと洞調律における左心室および右心室の正常な興奮伝播速度と伝播様式

device (CCD) camera (Leica 10447050, Geneva, Switzerland) を用いて4秒間撮像した。撮像は心筋が洞調律であることを確認してから、左心室、右心室外膜面の興奮伝播時間(ms)と伝播様式、得られた活動電位持続時間(APD)をcommercialized software (Ultima-6006; Sei Media, Inc., Tokyo, Japan)にて解析した(図2)。右心室心膜面の約5×5mmの関心部位(ほぼ右心室自由壁の中央)を任意に設定し、この部位におけるAPDの分布のヒストグラムと、APDの実波形を記録した。APDはAPD 60msを使用した。ヒストグラムより、最大APDと最小APDの差からAPD dispersion (ms)を決定し、出血性ショック蘇生後摘出心臓における、経時的APD dispersionの変化を比較した(図3)。

さらに、催不整脈性を調べるために、右心室・左心室の3ヵ所、すなわち右心室心尖部、心臓基部、右室流出路を20回の連続刺激(burst pacing, 5, 50, 100 V; 40ms interval, 20 trains) 各voltageにて3回ずつ施行し、致死性不整脈の誘発の有無を検討した(図4A)。

2) connexin43に関する免疫組織学的検討

摘出心臓を4% paraformaldehyde phosphate buffer solution (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) にて48時間固定した。それぞれの標本は、70% ethanolにて脱水しparaffin固定した。組織学的検討では、心筋伝導蛋白であるconnexin43の心筋組織内発現の程度を定性的に評価するため、免疫組織染色を施行した。すなわち、anti-connexin43 monoclonal antibody (1:2,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を用いて、心筋組織内の心筋 gap-junction 蛋白connexin43の発現を検討した。

3) 統計学的検討

各群において、興奮伝播時間およびAPD dispersionは平均±標準偏差で表した。興奮伝播様式およびconnexin43の発現様式は、異常あり、または、なしの定性的2分類でその頻度を検討し、致死性不整脈誘発頻度に関しても誘発の有無につき各個体ごとに検討し、その頻度を比較した。群間の比較にはANOVA法にて検定し、Bonferroni post hoc補正を実施した。頻度

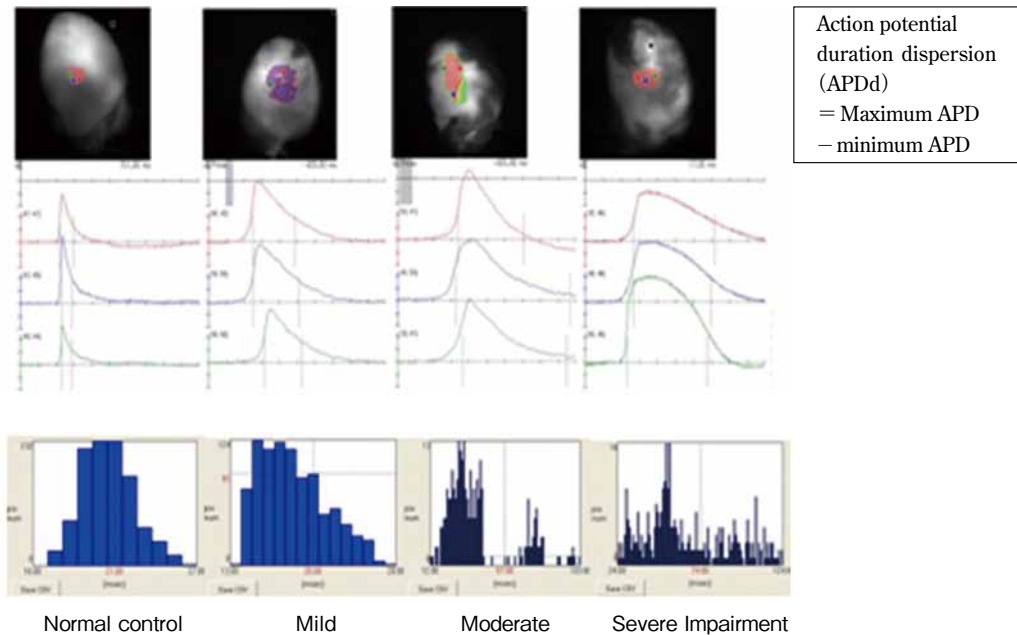


図3 optical mapping systemにおける action potential duration dispersion 計測法と正常例および異常例の所見

の検定には χ^2 検定を実施した。 $p < 0.05$ を推計学的に有意とした。

2 結 果

1) optical mapping analysis 法による興奮伝播時間・伝播様式およびAPD dispersionと不整脈誘発の結果

非蘇生群では全例ラットは心室細動または徐脈性不整脈を惹起し、その後心停止をきたした(図4B)。他の3群では、各蘇生液により全ラットの血行動態はショック状態から蘇生された。これら3群のラットから摘出された心臓の興奮伝播時間・伝播様式を optical mapping system にて検討した結果を図5に示した。

正常ラットの洞調律における左心室の興奮伝播時間は 24 ± 1 ms であり、伝播様式は図2に示したパターンであった。一方、5%アルブミン群および生理食塩水群では、ショック状態から蘇生されたにもかかわらず、興奮伝播時間はそれぞれ 35 ± 3 ms および 39 ± 3 ms と有意かつ著明に延長しており、伝播様式の明らかに正常パ

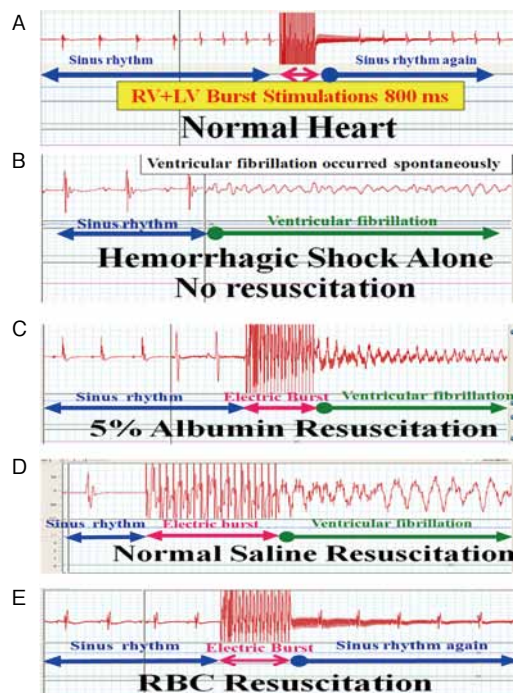


図4 非蘇生群、各蘇生群における左心室への burst pacing による致死性不整脈誘発による致死性不整脈発現様式

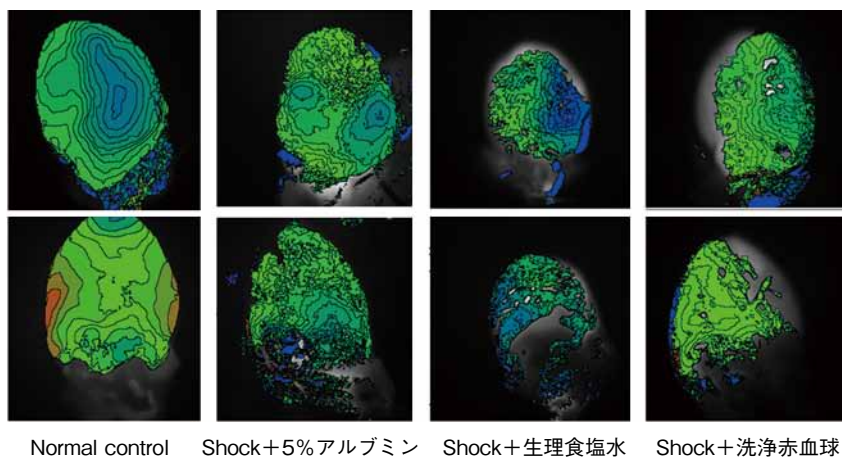


図5 心筋興奮伝播時間と伝播様式の比較

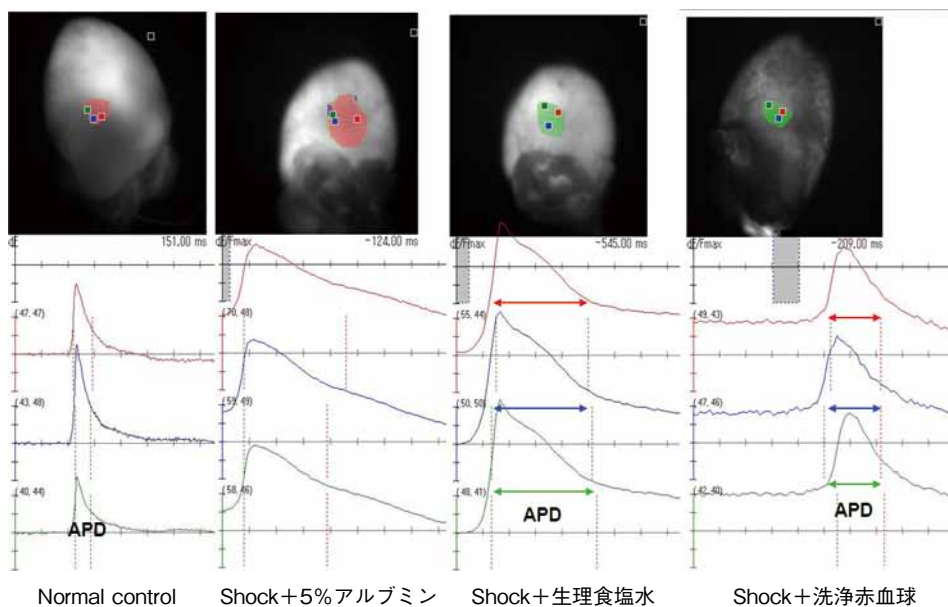


図6 action potential duration dispersionの比較

ターンと異なっていた(図5)。しかし、洗浄赤血球群で蘇生したラットでは、全例が正常興奮伝播時間(22 ± 3 ms)であり、かつ、正常伝播様式であることが認められた。さらにAPD dispersionは、洗浄赤血球群で全ラットが、図3で示したnormal controlと差を認めなかったのに対し(normal control vs 洗浄赤血球群； $14 \pm$

2 ms vs 13 ± 3 ms, NS), 5%アルブミン群および生理食塩水群では全ラットで、図3で示したmoderateまたはsevere impairment patternを示し、APD dispersionはそれぞれ 34 ± 27 msおよび 38 ± 9 msと有意($p < 0.05$)かつ著明に延長していた。また、APDそのものも正常ラット、洗浄赤血球群に比較し、5%アルブミン群および生

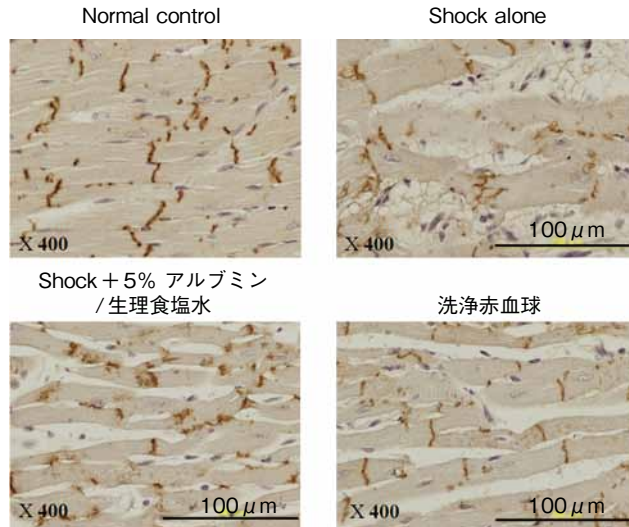


図7 左心室心筋における connexin43 発現所見

理食塩水群では著明に延長していることが認められた(図6)。

致死性不整脈の誘発性の検討では、正常ラットの摘出心臓では通常不整脈が誘発されない両心室への burst pacing(図4A)にて、5%アルブミン群および生理食塩水蘇生群の全ラットで致死性心室性不整脈(心室細動・心室頻拍)が容易に誘発された(図4C, D)。しかし、洗浄赤血球群蘇生群ラットでは、正常ラットと同様に致死性不整脈は誘発されなかった(図4E)。

2) 心筋における connexin43 の発現(免疫組織学的検討)

左心室における connexin43 の発現を免疫組織学的に検討した。図7に示したように、視覚的定性的に connexin43 発現量・発現様式の異常の有無を検討した。その結果、正常ラットの左心室心筋における connexin43 の正常な発現量・発現様式と比較し、5%アルブミン群および生理食塩水群では明らかに connexin43 の発現量・発現様式は異常であり、洗浄赤血球群では正常に保たれていた。

3 考 察

今回の実験研究では、“出血性ショック心臓”

において、洗浄赤血球蘇生が致死性不整脈誘発の抑制効果があり、その機序として心筋興奮伝播時間と伝播様式・APDの均一性・心筋 gap junction の伝導蛋白 connexin43 等を正常に保つ作用が貢献している可能性があることが示唆された。

本研究では、非蘇生群の全ラットが死亡する致死性再出血による出血性ショックモデル(30%脱血)を用いた、いわゆる“出血性ショック心臓”において、通常臨床現場で用いられる5%アルブミン蘇生群、生理食塩水蘇生群および洗浄赤血球蘇生群における、致死性不整脈の誘発頻度やその機序を、摘出心臓に対する optical mapping system と burst pacing による致死性不整脈誘発法で検討した。その結果、5%アルブミン群および生理食塩水群では血行動態は正常に復し、蘇生に成功したものの、摘出心臓における optical mapping system では興奮伝播異常・再分極不均一性を示す APD dispersion の増加が認められ、かつ、不整脈の発生機序に関係する心筋 gap junction の伝導蛋白 connexin43 の発現低下が認められるとともに、致死性不整脈の誘発の頻度が増加していた。これらの異常変化は、洗浄赤血球蘇生群では認められなかつ

た。

これまでの報告では、急性出血性ショックに伴い、侵襲の大きさに伴った心筋障害が惹起され、出血性ショック早期の死亡率に関与しているとされている^{4, 7, 8)}。これらの心筋障害には、血流の低下および貧血による心筋虚血そのものの影響に加え、“出血性ショック心臓”に固有の2次の血流障害や代謝異常が関与する可能性を示唆する報告もある^{5, 9, 10)}。したがって、“出血性ショック心臓”では、単に5%アルブミンや生理食塩水による蘇生では、その回復は不十分と考えられる。洗浄赤血球治療群で、致死性不整脈やその病因となるoptical mapping system解析指標、心筋gap junctionの伝導蛋白connexin43の発現は保たれた。このことは、出血性ショック治療において、血行動態の改善のみならず、貧血を改善することにより“出血性ショック心臓”の心筋組織に十分な酸素供給を行うことが重要と考えられる。

本研究を、臨床現場における“出血性ショック心臓”の治療に直結させるには十分とはいえないものの、出血性ショック後に遷延する血行動態の不安定性や心不全・致死性不整脈の発生予防に、十分な酸素運搬作用が治療上重要であることを示唆する結果と考えられた。

文 献

- 1) Rubin LJ. Introduction: Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guideline. *Chest* 2004;126:7S-10S.
- 2) Kuriyama T. Clinical aspect of precapillary pulmonary hypertension, *Nihon Kyobu Sikkan Gakkai Zasshi (Jpn Respir Disease)* 1992;30:3-11.
- 3) Umar S, Lee JH, da Lange E, Iorga A, Partow-Navid R, Bapat A, et al. Spontaneous ventricular

fibrillation in right ventricular failure secondary to chronic pulmonary hypertension. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;5:181-90.

- 4) Koura T, Hara M, Takeuchi S, Ota K, Okada Y, Miyoshi S, et al. Anisotropic conduction properties in canine atria analyzed by high-resolution optical mapping: preferential direction of conduction block changes from longitudinal to transverse with increasing age. *Circulation* 2002;105:2092-8.
- 5) Miyazaki K, Hori S, Inoue S, Adachi T, Bessho M, Kuwahira I, et al. Characterization of energy metabolism and blood flow distribution in myocardial ischemia in hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1997;273:H600-7.
- 6) Sasano C, Honjo H, Takagishi Y, Uzzaman M, Emdad L, Shimizu A, et al. Internalization and dephosphorylation of connexin43 in hypertrophied right ventricles of rats with pulmonary hypertension. *Circ J* 2007;71:382-9.
- 7) Nagami Y, Kinoshita M, Takase B, Ogata Y, Saitoh D, Kikuchi M, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin transfusion rescues rats undergoing progressive hemodilution from lethal organ hypoxia without scavenging nitric oxide. *Ann Surg* 2008;248:310-92.
- 8) Shono S, Kinoshita M, Takase B, Nogami Y, Kaneda S, Ishihara M, et al. Intraosseous transfusion with liposome-encapsulated hemoglobin improves mouse survival after hypohemoglobinemic shock without scavenging nitric oxide. *Shock* 2011;35:45-52.
- 9) Adachi T, Hori S, Miyazaki K, Nakagawa M, Inoue S, Ohnishi Y, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates myocardial ischemia in hemorrhagic shock in constant pressure model. *Shock* 1998;9:204-9.
- 10) Nakagawa M, Hori S, Adachi T, Miyazaki K, Inoue S, Suzuki M, et al. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels prevent extension of myocardial ischemia to subepicardium during hemorrhagic shock. *Shock* 2008;30:178-83.