

●一般演題

光工学的手法によるリポソーム封入酸素運搬体の致死性出血性ショック(85%出血後蘇生)実験モデルにおける抗不整脈効果に関する検討

防衛医科大学校集中治療部 高瀬凡平・橋本賢一・東村悠子
防衛医科大学校救急部 朝比奈はるか
奈良県立医科大学 酒井宏水

要 約

出血性ショックにおいて、リポソーム封入酸素運搬体(Liposome-encapsulated hemoglobin [HbV])は保存血輸血と同等の蘇生効果が報告されている。しかし、85%血液をHbVに置換した際の効果や心筋保護の詳細は不明である。85%出血における生存率と抗不整脈効果を実験的に検討した。

方法：SDラット($n=33$)のfemoral artery, veinから脱血・蘇生液投与を同時に施行し85%出血性ショックモデルを作成した。蘇生液は5%albumin(ALB群), HbV(HbV群)および洗浄赤血球(wRBC群)とした。15ラット(各群 $n=5$)で24時間後の生存率を検討し、18ラット(各群 $n=6$)で蘇生後、心筋を摘出・ランゲンドルフ灌流心と心筋活動電位を可視化できるdi-4-ANEPPSで染色し、光工学的手法(OMP)にて、活動電位の伝搬様式・伝搬速度、および再分極過程の均一性を示す指標(action potential duration dispersion[APDd])を測定した。電気生理学的検査であるburst pacingにて致死性心室性不整脈(VT/VF)誘発の有無とOMP指標との関係も検討した。

結果：ALB群では24時間後生存しているラットはいなかった。HbV群、wRBC群では80%以

上で生存した。OMP解析では、ALB群でHbV群、wRBC群に比べ伝導様式の異常と伝導速度の遅延が認められる傾向があり、ALB群で全例VT/VFが誘発された。HbV群、wRBC群では誘発されなかつた。APDdは、ALB群で他の2群に比し延長していた(28 ± 8 vs. 12 ± 3 , 12 ± 1 ms; $p < 0.05$)。

結語：致死性出血性ショックラットモデルにて、HbVは、APDdの延長抑制効果を介して、wRBCと同等の予後改善効果と抗不整脈効果が認められると示唆された。

はじめに

赤血球輸血療法は、重症出血性ショック症例の病態を安定させる有効な治療法である。しかし、現在の赤血球輸血療法には、血液型適合検査の必要性や保存期間が短いという制限がある。近年、赤血球輸血療法に代わる、血液代替物としてさまざまな人工酸素運搬体(人工赤血球)が開発されており^{1~3)}、いくつかは臨床応用される段階にまで開発されている^{4,5)}。これら人工酸素運搬体のなかで、われわれは、リポソーム封入酸素運搬体(Liposome-encapsulated hemoglobin [HbV])を開発し、血液代替物として、極めて有用であることを報告してきた^{6~9)}。

Bonpei Takase, et al. : Effect of liposome encapsulated hemoglobin (HbV) on arrhythmogenesis in 85 percent hemorrhagic rat model: Assessed by optical mapping analysis

一方、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の遷延が、出血性ショックを伴って頻繁に認められるとされている^{10, 11)}。また、先行研究では、出血性ショックが重症化するに伴って、致死性心室性不整脈の頻度が増加することも報告されている^{12, 13)}。致死性心室性不整脈の発生は、重症出血性ショックの治療において、臨床的問題となると考えられる。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40 mmHg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¹⁴⁾。この“出血性ショック心臓”的蘇生後にも、致死性心室性不整脈が出現する。われわれは、その機序やHbVの治療効果を報告した¹⁵⁾。

さらに、心筋を摘出・ランゲンドルフ灌流心と心筋活動電位を可視化できるdi-4-ANEPPSで染色し解析する光工学的手法(Optical mapping analysis)は、活動電位の伝搬様式・伝搬速度、および再分極過程の均一性を示す指標である活動電位(action potential duration [APD])の不均一性(APD dispersion [ms])を測定することが可能である。Optical mapping analysisと電気生理学的検査(burst pacingにて致死性心室性不整脈誘発)を組み合わせた手法は、致死性心室性不整脈の発生機序の解明や、致死性心室性不整脈治療評価に有用であることが報告されている^{16~18)}。

われわれの開発したHbVは、重症出血性ショックで、保存血輸血と同等の蘇生効果を有すると実験的に報告されている¹⁹⁾。しかし、85%血液をHbVに置換した際の蘇生効果や抗不整脈効果等の心筋保護効果の詳細は不明である。本研究では、85%出血における生存率と抗不整脈効果を実験的に検討した。

1 方 法

1) 実験モデル作成法

Sprague-Dawley ラット(male: 8 weeks old,

250–300 g, n = 33)を対象とした。短時間の sevoflurane(SevofraneR, Abbot Japan, Osaka, Japan)吸入後、腹腔に50 mg/kgの sodium pentobarbital(Nembutal, Abbott Lab., North Chicago, IL, USA)と皮下に atropine sulfate(0.01 mg/kg, TCI Inc., Tokyo, Japan)を投与し、麻酔管理とした。麻酔下に気管内挿管し、人工呼吸下で、femoral arteryとfemoral veinを穿刺し、femoral artery catheter留置とfemoral veinからinferior vena cavaにcatheterを挿入した。心電図モニター記録と血圧値(平均血圧: MBP)をラット用モニタ装置(PhysioTel and DataquestTM, Data Sciences International, St Paul, MN, USA)で測定するとともに、femoral artery catheterから脱血し、femoral vein catheterから蘇生液を同時投与(0.5 mL/min)し、85%の血液交換出血性ショックモデル(85%出血モデル)を作成した(図1)。蘇生液は、①5%アルブミン(5%アルブミン群)、②HbVに5%アルブミンを混合した蘇生液(HbV群)および③洗浄赤血球に5%アルブミンを混合した蘇生液(洗浄赤血球群)を作成した(各群, n = 5)。

2) 光工学的手法(Optical mapping analysis)と不整脈誘発法

ラットを上記と同じ方法にて、上記3群において麻酔後、85%出血モデルを作成した(各群, n = 6)。ただし、5%アルブミン群では予備実験で65%以上交換脱血すると死亡率が高く(>90%)なるため65%出血モデルとし、HbV群と洗浄赤血球群では、85%出血モデルを作成した。作成直後、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度に保温したTyrode溶液(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溶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感受性蛍色素(di-4-ANEPPS [15 μmol/L])を約40 mL, 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-

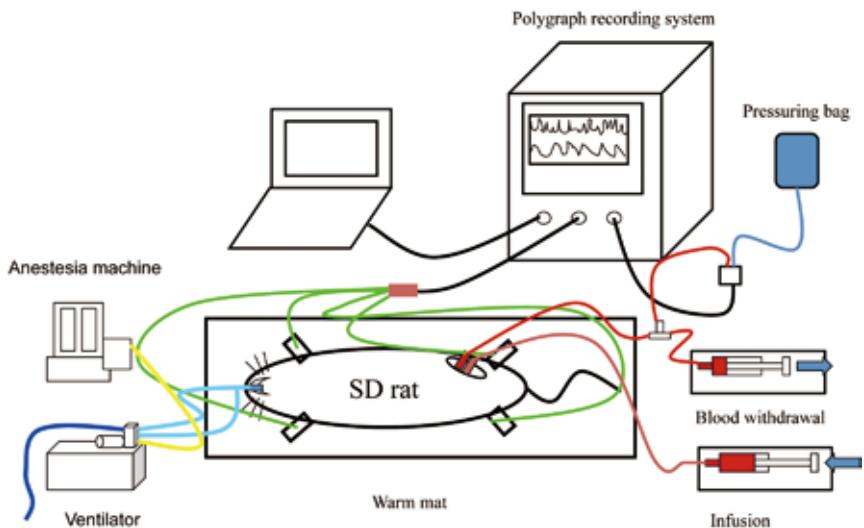


図1 85%出血モデルの作成プロトコール

ALB : 5%アルブミン群, HbV : HbV群, wRBC : 洗浄赤血球群

butanedione monoxime (Wako Chemical, Tokyo, Japan, 20 mM) を灌流した。Optical mapping analysis は high-quality charge couple 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搬様式と伝播時間 (ms), 得られたAPD持続時間(ms)をcommercialized software (Ultima-6006; Sei Media, Inc., Tokyo, Japan)にて解析した。左心室心膜面の約 5×5 mmの閑心部位(ほぼ左心室自由壁の中央)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 60 ms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不均一性(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変化を比較した。

さらに、催不整脈性を調べるために、右心室・左心室の3カ所、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, 40-ms interval : 20 trains)を各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。

3) 本研究モデル(85 % 出血モデル)におけるHbVの生存率に及ぼす影響と抗不整脈効果の検討

85%出血モデル作成中の心電図モニター記録とMBPより、85%出血モデル作成中の死亡率を算出した。すなわち、MBPが測定不能となり、心電図モニター記録にて致死性不整脈(頻脈性不整脈[VT/VF]や徐脈性不整脈[advanced block/pulseless electrical activity])が認められたとき、ラットの死亡と定義した。また、鼠径部縫合後、麻酔覚醒させ、通常の飼育環境で6時間ごとにラットの生存を確認し、85%出血モデル後の5%アルブミン群、HbV群および洗浄赤血球群の生存率とした。

本プロトコールで、生存しているラットの心臓を摘出し、上記のOptical mapping analysisと不整脈誘発法により、各群心臓の電気特性とVT/VF誘発率と自然発生VT/VF率を記録した。

4) 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致死性不整脈誘発を、異常あり、または異常なしの定性的2分類でその頻度を各群ごとに検討し比較した。群間の比較には

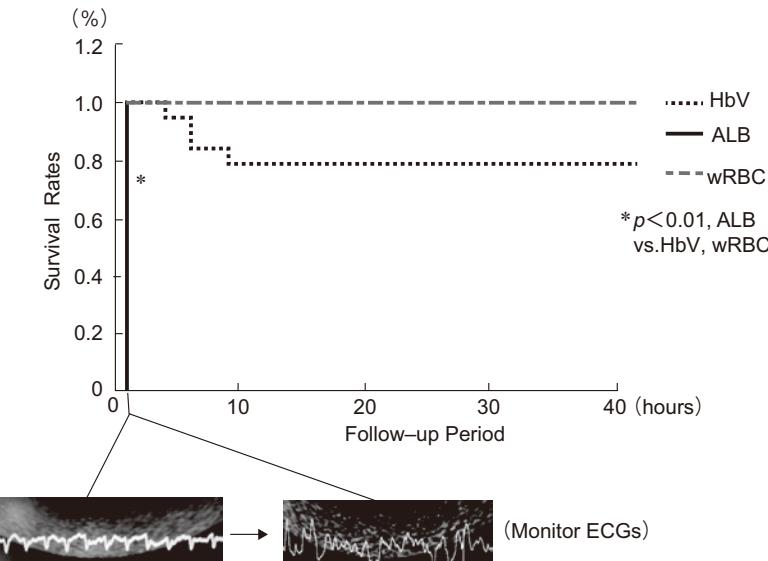


図2 各蘇生群における生存率の比較

5% albumin : 5% アルブミン群, HbV群, wRBC : 洗浄赤血球群

下段心電図モニター : 5% アルブミン群で認められた洞調律心電図と心室細動心電図を示す。

ANOVA法にて検定し, Bonferroni post hoc補正を実施した。頻度の検定には χ^2 検定を実施した。また、生存率の比較には, Kaplan-Meier法を用い, log-rank test で検定した。 $p < 0.05$ を推計学的に有意とした。

2 結 果

1) 本研究モデル(85%出血モデル)における生存率と致死性不整脈発生率

85%出血モデルにおける各群の生存率は, 85%出血モデル作成終了時点では, 5%アルブミン群で0% (全ラット死亡), HbV群および洗浄赤血球群で全ラット生存していた。その後, 麻酔覚醒12時間以降, HbV群の生存率は80%であり, 洗浄赤血球群では全ラット生存していた(図2)。85%出血モデル作成中のMBPは, 3群とも65%出血交換までは $MBP > 60 \text{ mmHg}$ を保っていたものの, 5%アルブミン群ではその後, 急激に40 mmHg以下に低下し, 5%アルブミン群のラットは全ラット, 85%出血モデル作成終了時に死亡していた。この間, 40%に自然発生VT/VFが認められた(図2, 3)。12時間以

降の生存率は, 5%アルブミン群に比べHbV群および洗浄赤血球群で明らかに良好で, HbV群と洗浄赤血球群では有意差は認められなかった。

2) Optical mapping analysis 法による興奮伝搬様式・伝搬速度およびAPD不均一性(APD dispersion)と不整脈誘発の結果

3群のラットから摘出された心臓の興奮伝搬様式・伝搬速度をOptical mapping analysis法にて検討した結果を図4に示した。正常ラットの洞調律における左心室の伝搬様式は, 図4-1のHbV群(HbV)や洗浄赤血球群(wRBC)と同様の様式(正常伝導様式)であり, また興奮伝播時間は $7 \pm 3 \text{ ms}$ である¹⁵⁾。また, HbV群と洗浄赤血球群の左室伝導時間は, それぞれ $6 \pm 4 \text{ ms}$ および $7 \pm 3 \text{ ms}$ であり, 正常伝導時間であった。一方, 5%アルブミン群の伝導時間は, $9 \pm 8 \text{ ms}$ と延長傾向が認められた(図4-2)。

さらにAPD dispersionは, HbV群および洗浄赤血球群で報告されている正常値($7 \pm 3 \text{ ms}$)¹⁵⁾と有意差を認めなかつたのに対し(HbV群: $12 \pm 3 \text{ ms}$, 洗浄赤血球群: $12 \pm 1 \text{ ms}$), 5%アルブ

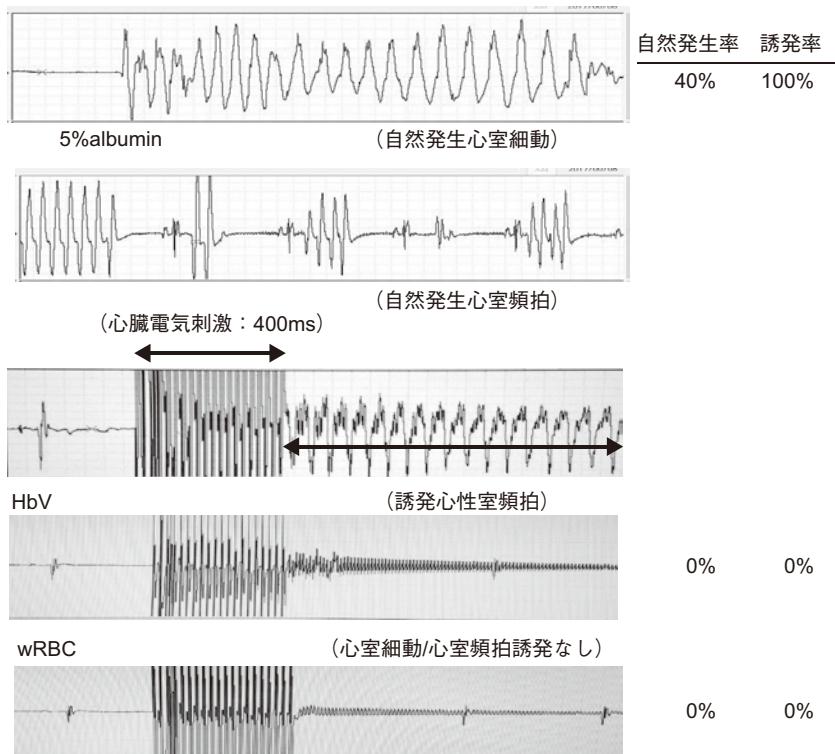


図3 Optical mapping analysis 法における頻拍性不整脈発生率の比較
5% albumin : 5%アルブミン群, HbV : HbV群, wRBC : 洗浄赤血球群

ミン群では全ラットで20ms以上に延長し、28±8 msと有意($p < 0.05$)かつ著明に延長していた(図5-1, 図5-2)。

致死性不整脈の誘発性の検討では、5%アルブミン群ラットでは全ラットでVT/VFが容易に誘発された(図3)。しかし、HbV群ラットや洗浄赤血球群ラットでは、VT/VFは誘発されなかった(図3)。

3 考 察

本研究実験の85%出血モデルは、5%アルブミンで蘇生置換しても全ラット死亡する致死性モデルであることが明らかになった。その死亡の原因の約40%が自然発生VT/VFであった。また、HbVには洗浄赤血球と同様の死亡率減少が認められたことから、HbVには、85%出血モデルのような致死性重症出血性ショックにおいて、洗浄赤血球と同様の蘇生効果があることが

認められた。また、Optical mapping analysisと不整脈誘発法を組み合わせた検討からは、HbVが洗浄赤血球投与と同様のVT/VF誘発抑制が認められ、85%出血モデルにおいて、HbVは抗不整脈効果を有することが示唆された。さらに、このことは、85%出血モデルのような致死性重症出血性ショックにおいて、HbVには蘇生効果機序として、一部抗不整脈効果を介している可能性が示唆される。

5%アルブミン群では24時間後生存しているラットはいなかった。一方、HbV群および洗浄赤血球群では生存率80%以上であった。このことは、HbVには、洗浄赤血球と同程度の致死性重症出血性ショック蘇生効果があることを示している。また、Optical mapping analysisと不整脈誘発法の解析では、85%出血モデルでの5%アルブミン群では、HbV群および洗浄赤血球群に比べ伝導速度の遅延と伝導様式の異常が認め

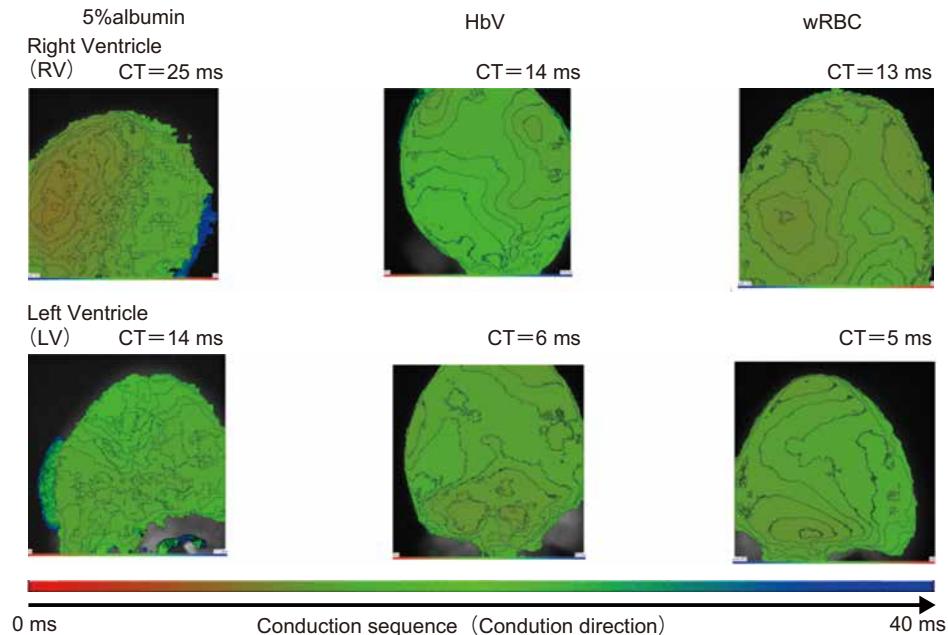


図4-1 Optical mapping analysis 法における各蘇生群の両心室伝搬様式の比較

5% albumin : 5% アルブミン群, HbV : HbV群, wRBC : 洗浄赤血球群

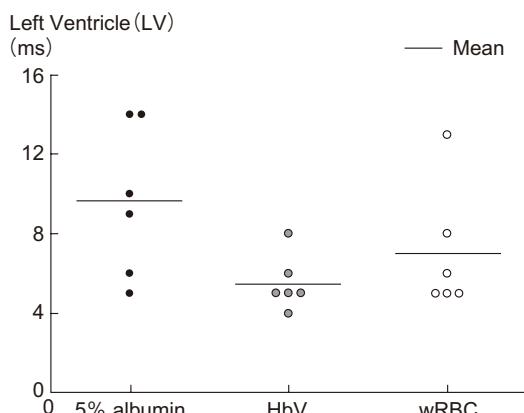


図4-2 Optical mapping analysis 法における各蘇生群の左心室伝搬速度の比較

5% albumin : 5% アルブミン群, HbV : HbV群, wRBC : 洗浄赤血球群

られる傾向が認められた。さらに、5% アルブミン群で全例 VT/VF が誘発されたのに対し、HbV 群および洗浄赤血球群では誘発されなかつた。再分極過程の不均一性の指標である APD dispersion は、HbV 群および洗浄赤血球群で 5%

アルブミン群に比し延長が抑制される結果が得られた。これらは、HbV に洗浄赤血球と同等の抗不整脈効果があることを支持する成績である。

これまで、MBP が 40 mmHg を下回るような、致死性重症出血性ショックでは、自然発生 VT/VF の頻度が増加することが報告されている^{12, 13)}。本研究の 85% 出血モデルの 5% アルブミン群で、約 40% の症例で自然発生 VT/VF が認められた。このことは、先行研究と一致する。また、自然発生 VT/VF や VT/VF 易誘発性には、不整脈基質の存在と、修飾因子の存在およびトリガーとなる心室性期外収縮の発生が必要とされている²⁰⁾。これまでにわれわれは、“出血性ショック心臓”において、致死性重症出血性ショックが、伝導蛋白である心筋 Gap junction の connexin 43 障害を惹起したり、心筋細胞の損傷をきたすことを報告した¹⁵⁾。これらの心筋組織変化は、不整脈の基質となりうる。また、貧血による心筋虚血は、不整脈誘発の典型的修飾因子である。さらに、心筋細胞においては興

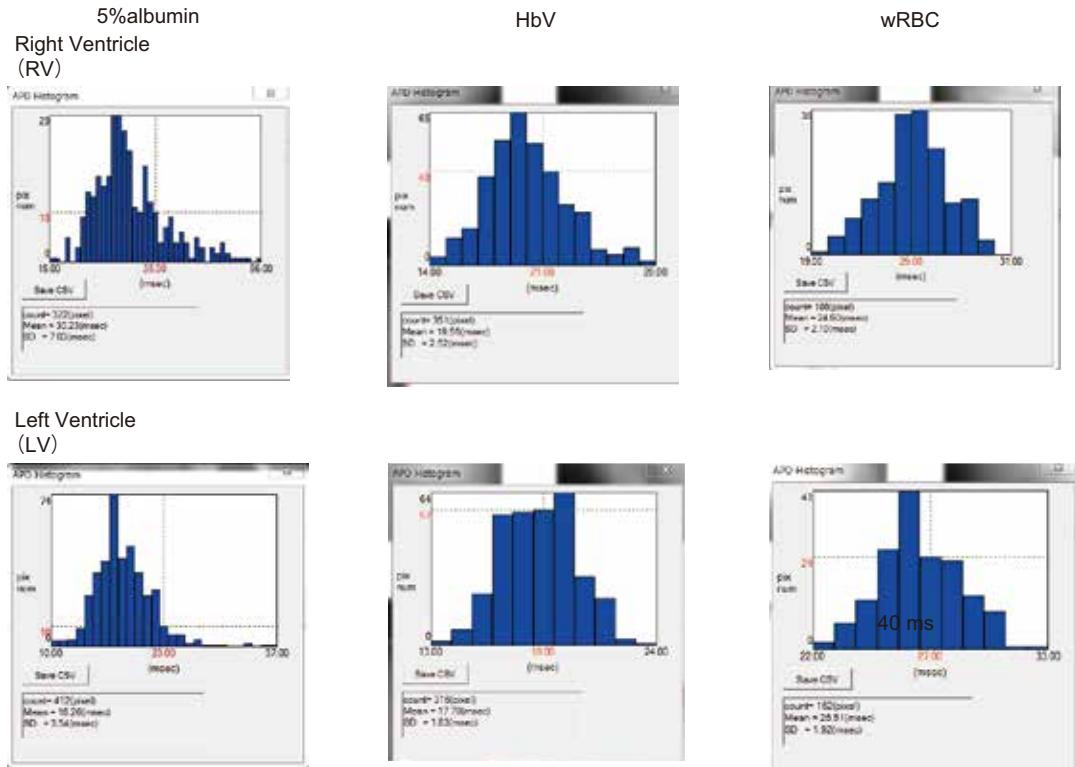


図5-1 Optical mapping analysis 法での各蘇生群のaction potential duration dispersionの比較
5% albumin : 5% アルブミン群, HbV : HbV群, wRBC : 洗浄赤血球群

奮伝導障害は、容易に再分極異常をきたしやすいと考えられ、APD dispersionの延長が“出血性ショック心臓”や致死性重症出血性ショックで認められることは容易に推測される。

これらの結果は、致死性重症出血性ショックの蘇生・救命においてHbVの有用性を示すものであり、今後HbVが臨床応用されるうえで有用な知見と考えられる。

以上、致死性出血性ショックラットモデルにて、HbVは、少なくともAPD dispersionの延長抑制効果を介して、洗浄赤血球と同等の予後改善効果と抗不整脈効果が認められる可能性があることが示唆された。

本研究発表は、第53回埼玉不整脈ペーシング研究会において優秀賞を受賞した。

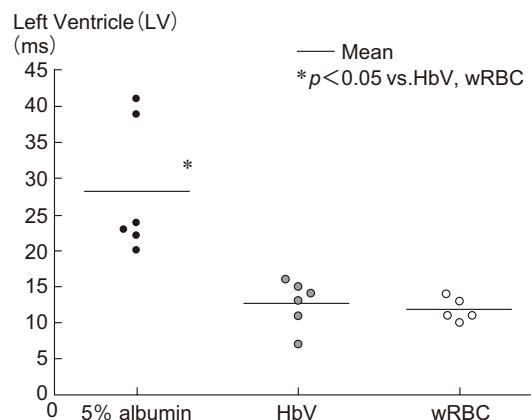


図5-2 Optical mapping analysis 法での各蘇生群のaction potential duration dispersion 値の比較

5% albumin : 5% アルブミン群, HbV : HbV群, wRBC : 洗浄赤血球群

文 献

- 1) Sakai H, Takeoka S, Park SI, et al. Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjug Chem* 1997;8:23–30.
- 2) Tsai AG, Vandegriff KD, Intaglietta M, et al. Targeted O₂ delivery by low-P₅₀ hemoglobin: a new basis for O₂ therapeutics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1411–9.
- 3) Vandegriff KD, Malavalli A, Wooldridge J, et al. MP4, a new nonvasoactive PEG–Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509–16.
- 4) Björkholm M, Fagrell B, Przybelski R, et al. A phase I single blind clinical trial of a new oxygen transport agent (MP4), human hemoglobin modified with maleimide-activated polyethylene glycol. *Haematologica* 2005;90:505–15.
- 5) Ogata Y, Goto H, Kimura T, et al. Development of neo red cells(NRC) with the enzymatic reduction system of methemoglobin. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1997;25:417–27.
- 6) Sakai H. Overview of potential clinical applications of hemoglobin vesicles(HbV) as artificial red cells, evidenced by preclinical studies of the academic research consortium. *J Funct Biomater* 2017;8:E10.
- 7) Seishi Y, Horinouchi H, Sakai H, et al. Effect of the cellular-type artificial oxygen carrier hemoglobin vesicle as a resuscitative fluid for prehospital treatment: experiments in a rat uncontrolled hemorrhagic shock model. *Shock* 2012;38:153–8.
- 8) Sakai H, Sou K, Horinouchi H, et al. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. *Artif Organs* 2009;33:139–45.
- 9) Doherty DH, Doyle MP, Curry SR, et al. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nat Biotechnol* 1998;16:672–6.
- 10) Handrigan MT, Bentley TB, Oliver JD, et al. Choice of fluid influences outcome in prolonged hypotensive resuscitation after hemorrhage in awake rats. *Shock* 2005;23:337–43.
- 11) Siegel HW, Downing SE. Reduction of left ventricular contractility during acute hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1970;218:772–9.
- 12) Letson HL, Dobson GP. Small volume 7.5% NaCl with 6% Dextran-70 or 6% and 10% hetastarch are associated with arrhythmias and death after 60 minutes of severe hemorrhagic shock in the rat in vivo. *J Trauma* 2011;70:1444–52.
- 13) Sato H, Tanaka T, Kasai K, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase on cardiac dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *Shock* 2007; 28: 291–9.
- 14) Miyazaki K, Hori S, Inoue S, et al. Characterization of energy metabolism and blood flow distribution in myocardial ischemia in hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1997;273:H600–7.
- 15) Takase B, Higashimura Y, Hashimoto K, et al. Myocardial electrical remodeling and the arrhythmogenic substrate in hemorrhagic shock-induced heart: anti-arrhythmogenic effect of liposome-encapsulated hemoglobin(HbV) on the myocardium. *Shock* 2018 Sep 19. doi: 10.1097/SHK.000000000001262.
- 16) Jaimes R 3rd, Walton RD, Pasdois P, et al. A technical review of optical mapping of intracellular calcium within myocardial tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016;310:H1388–401.
- 17) Tanaka H, Matsuyama TA, Takamatsu T. Towards an integrated understanding of cardiac arrhythmogenesis – Growing roles of experimental pathology. *Pathol Int* 2017;67:8–16.
- 18) Tanaka Y, Takase B, Yao T, et al. Right ventricular electrical remodeling and arrhythmogenic substrate in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;43:426–36.
- 19) Nagami Y, Kinoshita M, Takase B, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin transfusion rescues rats undergoing progressive hemodilution from lethal organ hypoxia without scavenging nitric oxide. *Ann Surg* 2008;248:310–9.
- 20) Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 2001;345:1473–82.