

## ●一般演題

# 出血性ショック心臓の催不整脈性作用に及ぼす人工赤血球の慢性効果

防衛医科大学校集中治療部 高瀬 凡 平・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

平均全身血圧が40 mmHg以下に低下遷延すると発症する“出血性ショック心臓症候群(shock heart syndrome)”は、致死性の病態を呈する。“shock heart syndrome”におけるリポソーム封入酸素運搬体(HbV)の慢性抗不整脈効果を検討した。

**方法：**SDラット( $n=47$ )で、femoral arteryから脱血・蘇生液投与を施行し30%再出血性ショックモデルを作成した。蘇生液は5%アルブミン(ALB群)、洗浄赤血球(wRBC群)およびHbV(HbV群)とした。26ラットで約1~2週間後の生存率を検討し、生存ラットの心筋(各群 $n=7$ )を摘出してランゲンドルフ灌流心として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群の生存率は、wRBC群・HbV群に比較し有意に低かった。OMP解析では、ALB群でwRBC群・HbV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。wRBC群・

HbV群では誘発されなかった。APDdは、ALB群で他の2群に比し延長していた( $23.3 \pm 9.7$  ms vs  $12.9 \pm 2.7$  ms,  $15.3 \pm 4.2$  ms,  $p < 0.01$ )。

**結語：**“shock heart syndrome”ラットモデルにて、HbVは慢性期においても、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ことが示唆された。

## はじめに

赤血球輸血療法は、重症出血性ショックの有効治療である。しかし、赤血球輸血療法には、種々の問題点がある(血液型適合検査の必要性や保存期間が短い等)。近年、血液代替物として赤血球輸血療法にかわる、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<sup>1~3)</sup>、いくつかは臨床応用されている<sup>4,5)</sup>。われわれは、これら人工酸素運搬体のなかで、リポソーム封入酸素運搬体(Liposome-encapsulated hemoglobin[HbV])を開発し、血液代替物としての有用性を報告してきた<sup>6~9)</sup>。

ことに、これまでいわゆる“出血性ショック心臓症候群(shock heart syndrome)”は、多くの基礎研究や臨床診療にて、遷延する出血性ショックの蘇生後の、心機能不全の病態が認識されてきた<sup>10~12)</sup>。すなわち、心筋機能障害や心不全の遷延が、出血性ショックに伴って頻繁

Bonpei Takase, et al : Chronic anti-arrhythmogenic effect of liposome-encapsulated hemoglobin(HbV) on the myocardium through improving myocardial electrical remodeling and the arrhythmogenic substrate in hemorrhagic shock-induced heart

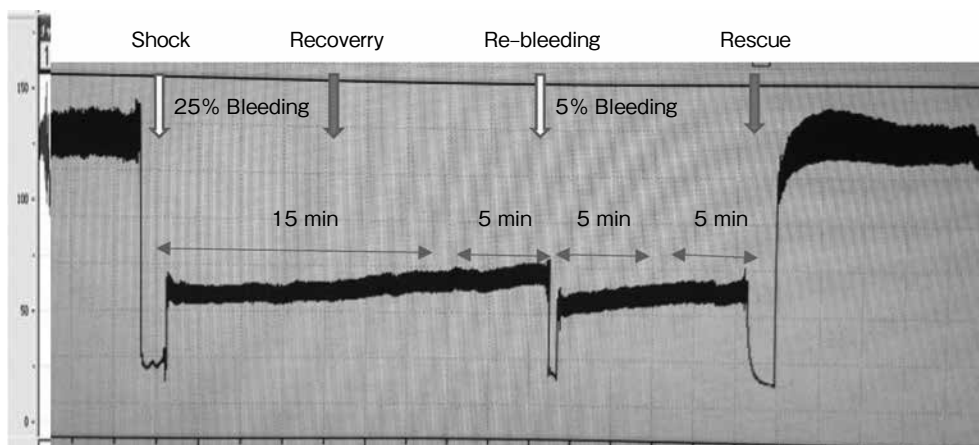


図1 30%出血性ショック shock heart syndrome の作成プロトコール

に認められ、致死性不整脈も頻発するとされる。この shock heart syndrome における致死性不整脈の発生に対して、HbV が急性期に有効であることをこれまでに報告してきた<sup>13)</sup>。

しかし、HbV のヒトにおける体内の半減期は約72時間で、蘇生後の慢性期の効果に関してその詳細は不明である。また、心筋を摘出し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<sup>14,15)</sup>。

そこで、shock heart syndrome において HbV の抗不整脈効果を慢性期で実験的に検討するために Optical mapping analysis と電気生理検査法を用いて、HbV の抗不整脈効果を検討することを本研究の目的とした。

## 1 方 法

### 1) 実験モデル作成法

Sprague-Dawley ラット (male: 8 weeks old,

250～300 g,  $n = 47$ ) 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 を穿刺し、femoral artery catheter を留置した。心電図モニター記録と血圧値 (平均血圧; MBP) をラット用モニター装置 (PhysioTel and Dataquest<sup>TM</sup>, Data Sciences International, St Paul, MN, USA) で測定するとともに、femoral artery catheter から脱血し、同じく femoral artery catheter から蘇生液を投与し蘇生した。

出血性ショックモデル作成は、femoral artery catheter から脱血し、以下のプロトコールで致死性出血性ショックモデルを作成した (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 shock) を実施した。その後、脱血量と同量の①5% アルブミン (5% アルブミン群)、②洗浄赤血球 (洗浄赤血球群) および③HbV (HbV 群) 蘇生液で蘇生した。また、④非蘇生群 (対照群) も作成した (各群:  $n = 7$ , 非蘇生群:  $n = 5$ )。

## 2) 光工学的手法(Optical mapping analysis)と不整脈誘発法およびHbVの急性期抗不整脈効果の検討

急性実験では、上記4群においてモデルを作成直後、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( $\text{CaCl}_2$ [2],  $\text{NaCl}$ [140],  $\text{KCl}$ [4.5], dextrose[10],  $\text{MgCl}_2$ [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  $\mu\text{mol/L}$ ])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 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。興奮伝搬様式の異常性の判定には、正常伝搬様式と伝播様式が異なることを定性的に、共同研究者2人で目視判定し、2名が一致して異常としたとき、興奮伝播様式異常と判定した。また、左心室心膜面の約5×5 mmの関心部位(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(図2)、出血性ショック蘇生後摘出心臓における、APD dispersion値を比較した。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(図2-1～2-4)。

## 3) 本研究モデルHbVの生存率に及ぼす影響と慢性期抗不整脈効果の検討

慢性生存実験では、まず30%出血モデル作成24時間後の生存率を確認した。その後、最低1週間生存せしめ、中央値10日後に、再度急性実験と同様の麻酔、呼吸管理下に、迅速に心臓を摘出し、急性期と同様のOptical mapping analysis、電気生理検査を実施し、HbVの致死性不整脈抑制効果を検討した。ただし、慢性期では、本研究にかぎり、左室(LV)自由壁でのみの検討とした。

## 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、異常ありまたはなしの定性的2分類でその頻度を各群間で検討し比較した。群間の比較にはANOVA法にて検定し、Bonferroni post hoc補正を実施した。頻度の検定には $\chi^2$ 検定法を実施した。また、生存率の比較には、24時間後に生存しているラットの個体数を調査し、 $\chi^2$ 検定法にて検定した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

## 2 結 果

### 1) 急性期における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と24時間後の生存率

30%出血モデルにおける各群の24時間後生存率は、5%アルブミン群で57.1%、洗浄赤血球群およびHbV群で全例生存し、非蘇生群で全例死亡していた。24時間生存したラットは、その後約2週間生存した(中央値10日間)。

急性期における、Optical mapping analysisおよび電気生理検査による結果は、以前報告したと同様の結果であった。すなわち、5%アルブミン群および非蘇生群の興奮伝搬様式は全例異常と判定され、右室および左室の伝搬速度は5%アルブミン群および非蘇生群で洗浄赤血球群およびHbV群に比較し、延長する傾向が認められ

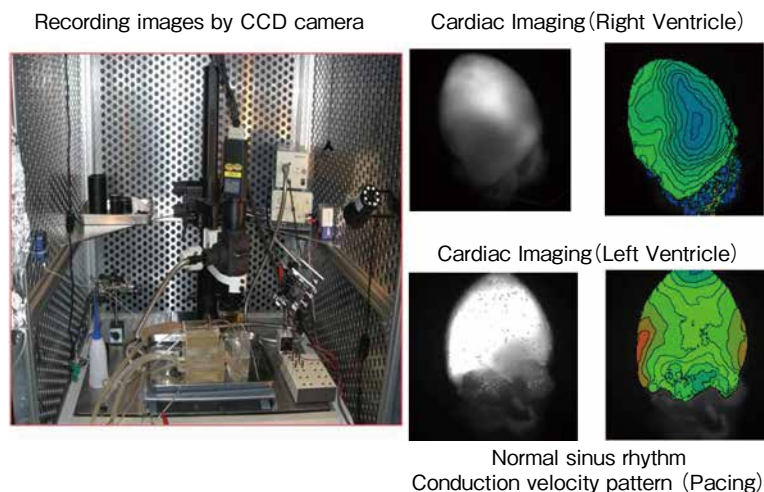


図2-1 Optical mapping analysisと電気生理検査

Optical mapping analysisの概要

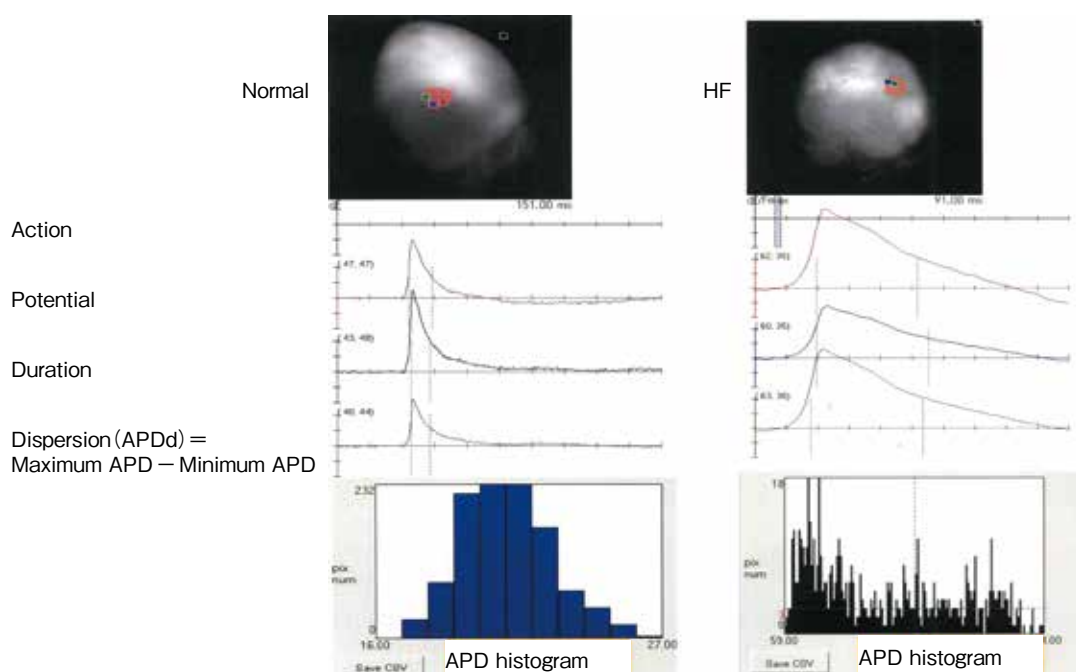


図2-2 Optical mapping analysisと電気生理検査

APD dispersionの測定例と異常例(心不全：heart failure)

た。また、APD dispersionの平均値は、5%アルブミン群および非蘇生群において20 ms以上と延長し、洗浄赤血球群およびHbV群に比較し、有意に延長していた。

2) 慢性期における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  
生存5%アルブミン群、洗浄赤血球群および

di-4 ANEPPS, BDM

Recording images by CCD camera



Lethal arrhythmia induction by LV Burst stimulation  
5V → 50V → 100V × 20 trains × 40 ms × 3 times (total 11 times)

図2-3 Optical mapping analysisと電気生理検査  
電気生理検査測定法

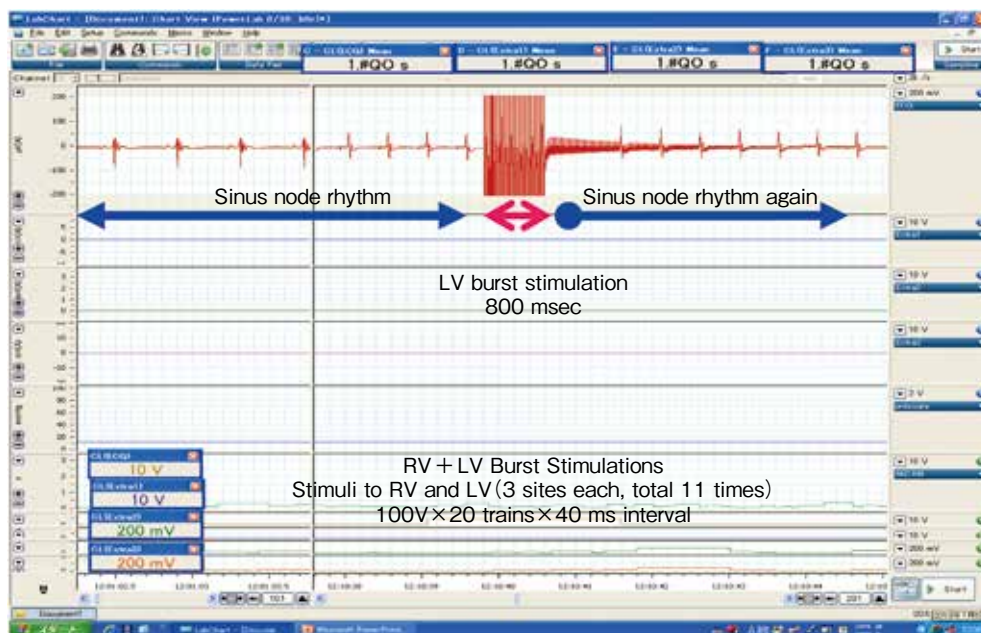


図2-4 Optical mapping analysisと電気生理検査  
電気生理検査の刺激波形(正常例)

HbV群で、興奮伝搬様式、伝搬速度およびAPD dispersion 値を比較検討した。

3群のラットから摘出された心臓の左室の興奮伝搬様式は、生存5%アルブミン群では全例

異常と判定され、洗浄赤血球群およびHbV群では全例正常と判定された。左室の伝搬速度は、5%アルブミン群で洗浄赤血球群およびHbV群よりも延長傾向が認められたものの、有意差は

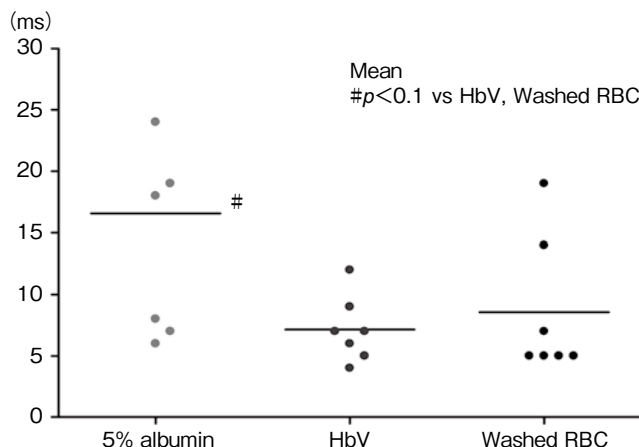


図3 Optical mapping analysis 法における各蘇生群の左心室伝導速度の比較

OMP：Optical mapping analysis, LV：左心室, CT：伝導時間, 5% albumin：5%アルブミン群, HbV：HbV群, washed RBC：洗浄赤血球群

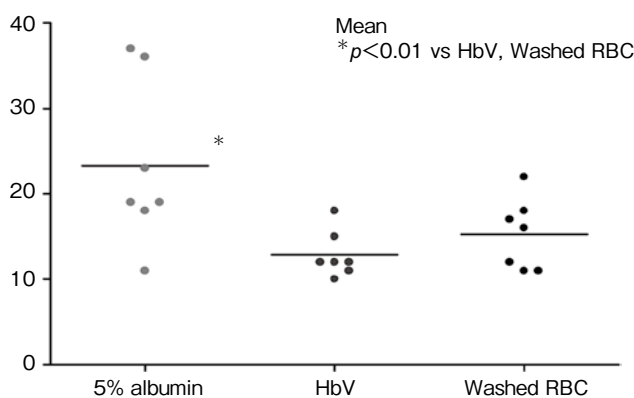


図4 Optical mapping analysis法における各蘇生群のAPD dispersionの比較

OMP：Optical mapping analysis, LV：左心室, CT：伝導時間, APD dispersion：action potential duration dispersion, 5% albumin：5%アルブミン群, HbV：HbV群, washed RBC：洗浄赤血球群

認められなかった ( $16.6 \pm 10.4$  ms vs  $8.6 \pm 5.7$  ms,  $7.1 \pm 2.7$  ms,  $p < 0.1$ , 図3)。一方, APD dispersion は, 5%アルブミン群で, 洗浄赤血球群および HbV群に比較し, 有意に延長していた ( $23.3 \pm 9.7$  ms vs  $15.3 \pm 4.2$  ms,  $12.9 \pm 2.7$  ms,  $p < 0.01$ , 図4)。

致死性不整脈の誘発性の検討では, 5%アル

ブミン群では全ラットで致死性不整脈(VT/VF)が容易に誘発された。しかし, 洗浄赤血球群蘇生群やHbV群では, VT/VFは誘発されなかった(図5)。



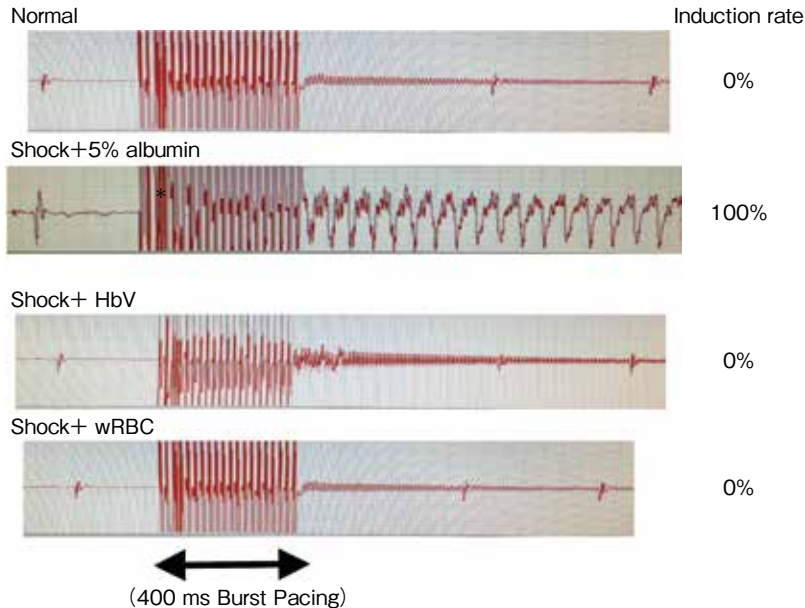


図5 電気生理検査における頻拍性不整脈発生率の比較

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

### 3 考 察

本研究では、ラット30%出血モデルによる shock heart syndrome の催不整脈作用に対して、HbVは急性期のみならず、慢性期においても、抑制効果が認められた。同時に測定した Optical mapping analysis の結果からは、APD dispersion の延長抑制がHbV作用の効果機序を示唆する結果が得られた。HbVの体内半減期はヒトにおいて約72時間とされており、ラットの代謝速度を考慮すると、HbVのラット体内の代謝時間はさらに短く、約24～48時間と想定される。今回、われわれの研究で得られた shock heart syndrome におけるHbVの慢性抗不整脈効果は、HbVの半減期以降も持続する可能性を示唆する。

これまでの出血性ショックと致死性不整脈との先行研究では、出血性ショックの病態が重症化するに伴い、致死性不整脈の頻度が増加するとされている<sup>16,17)</sup>。そのため、30%出血モデルによる実験的 shock heart syndrome に対して、HbVには洗浄赤血球と同等の抗不整脈効果

があることをこれまで、われわれの研究において報告してきた<sup>9,13)</sup>。このことから、実験的 shock heart syndrome における慢性期のHbVの抗不整脈効果は容易に予測できる知見と考えられる。また、臨床例の検討ではAPD dispersion で示される再分極異常は、致死性不整脈の発症機序に深く関与していると報告されている<sup>18)</sup>。この報告から、HbVの shock heart syndrome における慢性期抗不整脈効果の機序の一つとして、再分極異常の抑制も考えうると示唆される。これらの先行研究は、本研究のHbV群における抗不整脈効果があることを支持するものと考えられる。

Study limitation：本研究では、shock heart syndrome において、Optical mapping analysis におけるAPD dispersion の程度と致死性不整脈の誘発程度の因果関係を直接定量的に調べていない。すなわち、APD dispersion の異常の程度と電気生理検査による致死性不整脈誘発の難易度とを直接比較検討することが今後必要となると考えられる。また、われわれの30%出血モデ

ル shock heart syndrome における HbV の急性効果について、以前心筋の刺激伝導蛋白である connexin 43 の障害程度や心筋細胞の障害程度を検討した<sup>13)</sup>。しかし、本慢性研究では、これら病理学的検討は現在進行中で、今回は十分に検討できなかった。これらの本研究の限界は、今後の再検討事項として、継続的に実験を実施することが必要と考えている。

## 文 献

- 1) Sakai H, 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, et al. Targeted O<sub>2</sub> delivery by low-P50 hemoglobin: a new basis for O<sub>2</sub> therapeutics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1411-9.
- 3) Vandegriff KD, et al. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509-16.
- 4) Björkholm M, 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) Doherty DH, et al. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nat Biotechnol* 1998;16: 672-6.
- 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, 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, et al. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. *Artif Organs* 2009;33: 139-45.
- 9) Haggisawa K, et al. Efficacy of resuscitative transfusion with hemoglobin vesicles in the treatment of massive hemorrhage in rabbits with thrombocytopenic coagulopathy and its effect on hemostasis by platelet transfusion. *Shock* 2018;50: 324-30.
- 10) Adachi T, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates myocardial ischemia in hemorrhagic shock in constant pressure model. *Shock* 1998;9: 204-9.
- 11) Miyazaki K, et al. Characterization of energy metabolism and blood flow distribution in myocardial ischemia in hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1997; 273:H600-7.
- 12) Siegel HW, et al. Reduction of left ventricular contractility during acute hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1970;218:772-9.
- 13) Takase B, 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* 2019; 52:378-86.
- 14) Jaimes R 3rd, et al. A technical review of optical mapping of intracellular calcium within myocardial tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016;310: H1388-401.
- 15) Tanaka Y, et al. Right ventricular electrical remodeling and arrhythmogenic substrate in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;43:426-36.
- 16) Letson HL, et al. 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.
- 17) Sato H, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase on cardiac dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *Shock* 2007;28:291-9.
- 18) Huikuri HV, et al. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 2001;345:1473-82.