

●一般演題

85%血液交換モデルにおける人工酸素運搬体(HbV)の慢性期抗不整脈効果

— Optical Mapping解析を用いた検討—

防衛医科大学校集中治療部 高瀬 凡平・東村 悠子・眞崎 暢之
奈良県立医科大学 酒井 宏水

要 約

人工酸素運搬体(Liposome-encapsulated hemoglobin vesicles：HbV)は、輸血血液の代替物として出血性ショックの治療効果があると実験的に報告されており、出血性ショック時の急性の抗不整脈効果もこれまで認められている。しかし、慢性効果についての報告はない。そこで、85%血液交換ラットモデルでHbVの慢性期抗不整脈効果を検討した。

方法：SDラットの骨髓輸血と大腿動脈脱血により、85%血液交換モデルを、HbV投与群(HbV群)、洗浄赤血球投与群(washed RBC群)および5% albumin投与群(ALB群)で作成し、Optical Mapping解析(OMP)と電気生理学的刺激法(EPS)にて、HbVの急性期抗不整脈効果を検討し、さらにHbVの蘇生効果を確認するとともに、生存したラットに対して慢性期(約2週間後)のHbVの抗不整脈効果をOMPとEPSにて検討した。

結果：急性期では、action potential duration dispersion(APDd)がALB群に対してHbV群・washed RBC群で有意に低値、EPSにおいても、HbV群はwashed RBC群と同程度の抗不整脈効果が認められた。また、HbV群の蘇生・生存率はwashed RBC群と同程度であった。慢性期でも、HbV群とwashed RBC群のAPDdは同程度

であり、EPSによる致死性不整脈誘発率も同程度であった。

結語：HbVは、致死性の85%血液交換モデルにおいて、急性期のみならず慢性期においても抗不整脈効果が持続することが示唆される。

はじめに

輸血療法は出血性ショックの有効な治療である。しかし、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等の問題点がある。また、わが国では保存血の確保が困難である。最近、血液代替物として赤血球輸血療法にかわる、人工酸素運搬体(人工赤血球)が種々開発されており^{1~3)}、いくつかは臨床応用されている^{4,5)}。われわれは、これら人工酸素運搬体のなかで、リボ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^{6~9)}。

先行研究では、出血性ショックを惹起すると、出血の程度と致死性不整脈の発現とは密接に関係すると報告されている^{10,11)}。また、臨床試験にまで開発された人工酸素運搬体の副作用として、心疾患の発症や心臓死の増加が報告されている¹²⁾。HbVの抗不整脈効果は重要であるが、同様の副作用が懸念される。

われわれはこれまでに、出血性ショックや

85%血液交換ラットモデルにおいて、急性期でHbVに抗不整脈効果があることを報告してきた¹³⁾。しかし、慢性効果に関しての報告は少ない。そこで、85%血液交換ラットモデルで、HbVの慢性期抗不整脈効果を検討した。

また、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、活動電位の伝播様式・伝播速度、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^{14,15)}。

そこで、85%血液交換ラットモデルでHbVの慢性期抗不整脈効果を検討するためにOptical mapping analysisと電気生理学的検査法を用いて、HbVの慢性期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, $n=57$)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 DataquestTM, Data Sciences International, St Paul, MN, USA)で測定するとともに、femoral artery catheterから0.5 mL/minの速度で脱血し、同時に対側のtibial boneから蘇生液を0.5 mL/minの速度で骨髓投与し、

85%血液交換ラットモデルを作成した(図1)。蘇生液は、①5%アルブミン(5%アルブミン群)、②洗浄赤血球(洗浄赤血球群)蘇生および③HbV(HbV群)蘇生液で蘇生した。また、④正常群(対照群)においてもOptical mapping analysisを検討した(各群, $n=6$, 正常群の急性期・慢性期各 $n=6$)。

2) 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(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 μ mol/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-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播様式と伝播時間(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。興奮伝播様式の異常性の判定には、正常伝播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

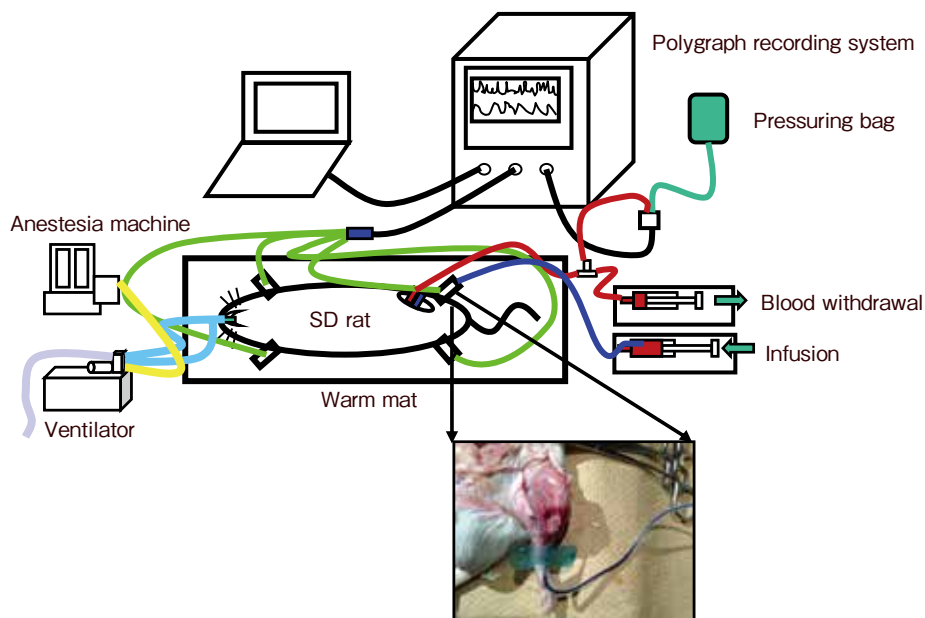


図1 骨髓輸血による85%血液交換ラットモデルの作成プロトコール

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，40-ms interval：20 trains)を各voltageにて各3回施行し，致死性不整脈の誘発の有無を検討した(図3)。

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

急性期生存率の検討では，まず85%血液交換ラットモデル作成24時間後の生存率を確認した。その後，最低2週間生存させ，中央値14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。

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 χ^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， χ^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による興奮伝播様式・伝播速度および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

85%血液交換ラットモデルにおける各群の24時間後生存率は，①5%アルブミン群で0%(全ラット死亡)，②洗浄赤血球群で全例生存および③HbV群では80%のラットが生存していた。24時間生存したラットはその後約2週間以上生存した(中央値14日間)。

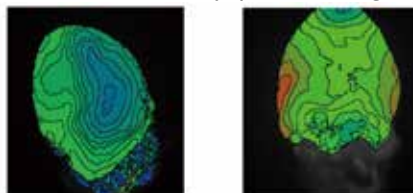
急性期における，Optical mapping analysisおよび電気生理学的検査による結果は，以前の報告と同様の結果であった。すなわち，5%アルブミン群は，全例異常と判定され，右室および左室の伝播速度は5%アルブミン群で洗浄赤血球

A) Recording images by CCD camera



B) Cardiac Imaging(RV and LV)

Normal sinus rhythm
Conduction velocity pattern(Pacing)



C) Action Potential Duration Dispersion
(APDd) = Maximum APD - Minimum APD

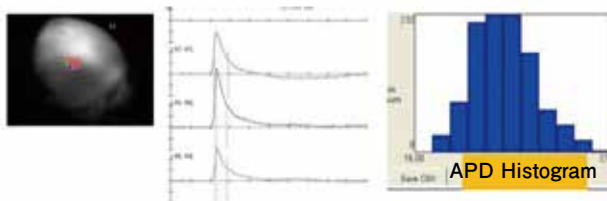


図2 Optical mapping analysisの概要

A：CCD cameraによる興奮伝播・活動電位記録様式，B：正常の興奮伝播様式，C：Action potential duration (APD) dispersionの測定法

A) di-4 ANEPPS, BDM

Recording images by CCD camera



Lethal arrhythmia induction by LV Burst stimulation

5 V ⇒ 50 V ⇒ 100 V × 20 trains × 40 ms × 3 times (total 11 times)

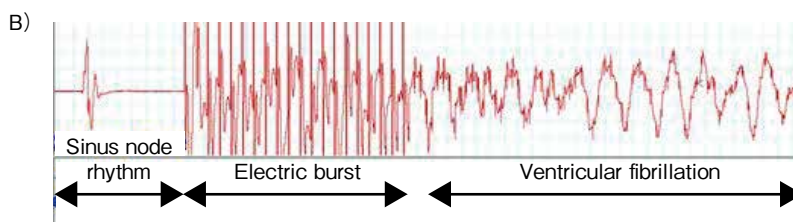


図3 電気生理検査法 (EPS) と致死性不整脈誘発記録法

OMP：Optical mapping analysis

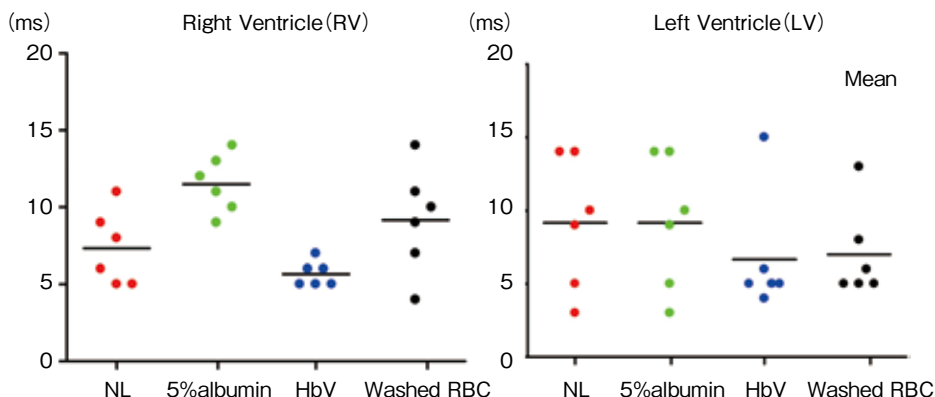


図4-1 各群における急性期興奮伝播時間の比較

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

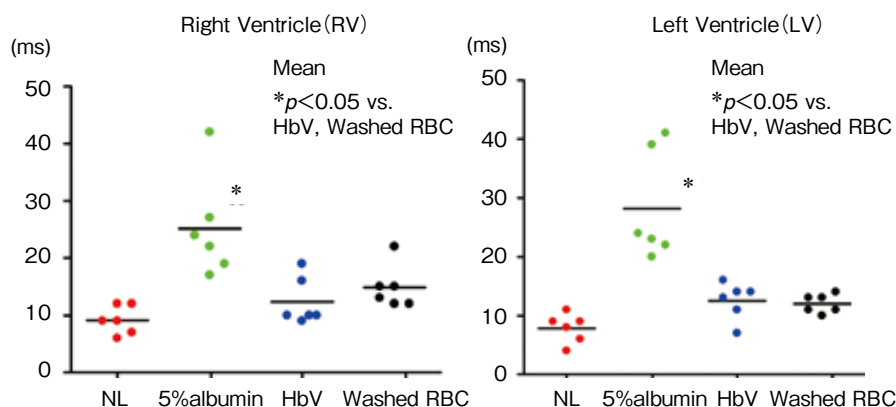


図4-2 各群における急性期Action potential duration (APD) dispersionの比較

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

群およびHbV群に比較し，延長する傾向が認められた。また，APD dispersionの平均値は，5%アルブミン群において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(図4-1，4-2)。

急性期では，5%アルブミン群で全例致死性不整脈が誘発されるか自然発症致死性不整脈が認められたものの，洗浄赤血球群・HbV群では，致死性不整脈誘発は認められなかった(図5)。

2) 慢性期におけるOptical mapping analysisによる興奮伝播様式・伝播速度およびAPD不均一性(APD dispersion)と不整脈誘発の結果

①洗浄赤血球群，②HbV群および③正常群

で，興奮伝播様式，伝播速度および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播様式は，①洗浄赤血球群，②HbV群および③正常群では全例正常と判定された。左室の伝播速度は，洗浄赤血球群およびHbV群で正常値であることが認められた(図6-1)。一方，APD dispersionも，洗浄赤血球群・HbV群で正常値を示した(図6-2)。

慢性期，致死性不整脈の誘発性の検討では，洗浄赤血球群・HbV群において，致死性不整脈は誘発されなかった(図7)。

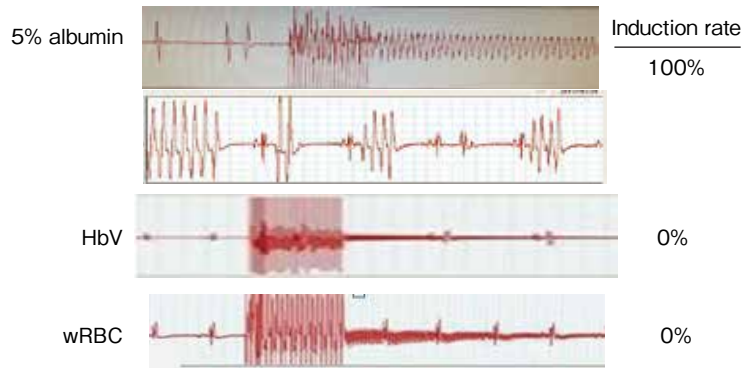


図5 急性期電気生理学的検査における頻拍性不整脈発生率の比較
5% albumin：5%アルブミン群, HbV：HbV群, wRBC：洗浄赤血球群

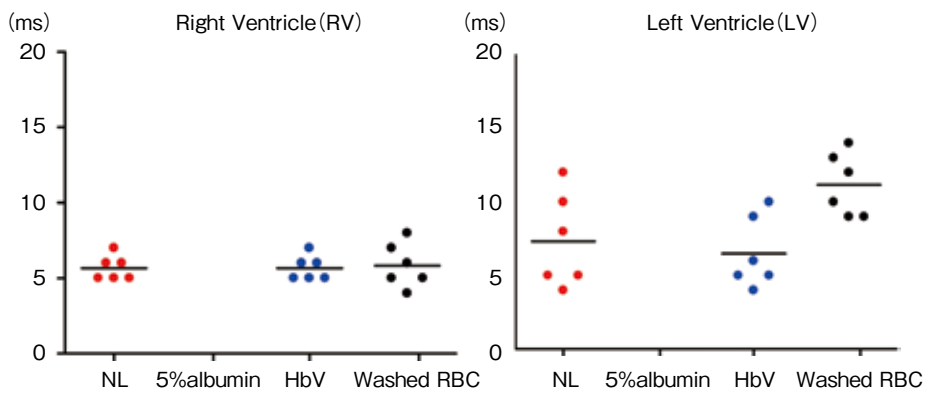


図6-1 各群における慢性期興奮伝播時間の比較
NL：正常群, 5% albumin：5%アルブミン群, HbV：HbV群, Washed RBC：洗浄赤血球群

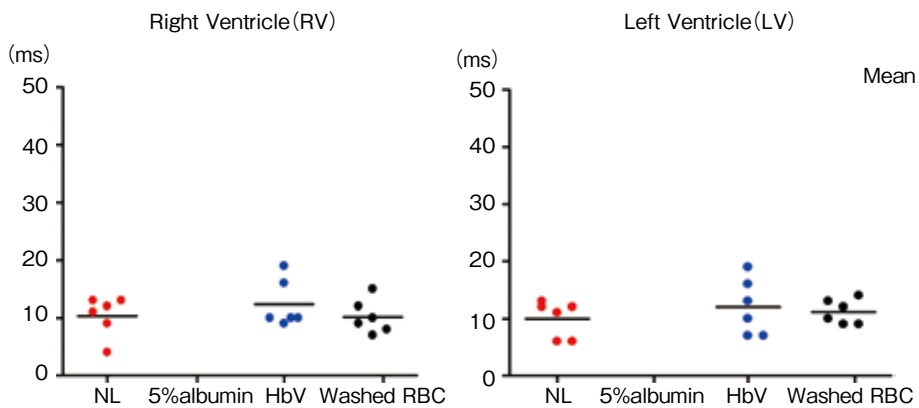


図6-2 各群における急性期Action potential duration (APD) dispersionの比較
NL：正常群, 5% albumin：5%アルブミン群, HbV：HbV群, Washed RBC：洗浄赤血球群

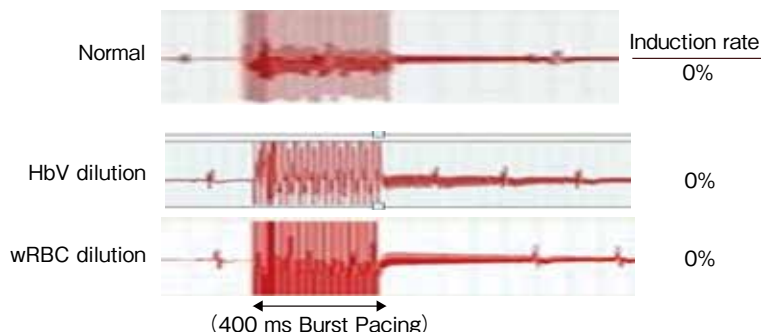


図7 慢性期電気生理検査における頻拍性不整脈発生率の比較
5% albumin：5%アルブミン群，HbV：HbV群，wRBC：洗浄赤血球群

3 考 察

本研究では、85%血液交換ラットモデルで容易に誘発または自然発症する致死性不整脈に対して、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85%血液交換ラットモデルにおける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。

これまでの出血と致死性不整脈との関連に関する先行研究では、大量出血が進行するにつれて致死性不整脈の頻度が増加するとされている^{10,11)}。また、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、これまでのわれわれの研究で報告してきた^{9,13)}。そこから85%血液交換ラットモデルにおける慢性期のHbVの抗不整脈効果は容易に予測できる。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に関与すると報告されている¹⁶⁾。よって、HbVの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る。これらの先行研究

は、HbVに急性期のみならず慢性期にも抗不整脈効果があることを支持するものと示唆される。しかし、明確な機序は本研究からはいまだ不明である。われわれは、これまでに30%出血モデルshock heart syndromeにおけるHbVの急性効果について、心筋の刺激伝導蛋白であるconnexin43の障害程度や心筋細胞の障害程度を検討した¹³⁾。HbVの抗虚血効果や貧血に伴う抗酸化作用により、これらの障害を回避することも機序の一つとして推測される。さらに、HbVが代謝された後、HbV中の鉄の再利用も慢性期の抗不整脈効果に関与する可能性も示唆される。

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) 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.
 - 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) Hagsawa K, Kinoshita M, Takase B, 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) 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.
 - 11) 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.
 - 12) Chen JY, Scerbo M, Kramer G. A review of blood substitutes: examining the history, clinical trial results, and ethics of hemoglobin-based oxygen carriers. *Clinics (Sao Paulo)* 2009;64:803–13.
 - 13) 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* 2019;52:378–86.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 2001;345:1473–82.