

●一般演題

## 出血性ショック心臓における覚醒時24時間心電図記録による不整脈発生と心拍変動変化

### —人工酸素運搬体の効果—

防衛医科大学校集中治療部 高瀬凡平・東村悠子・東谷卓美・眞崎暢之

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

目的：遷延する出血性ショック蘇生後の心機能異常を示す出血性ショック心臓(SHS)の電気生理学的特徴をこれまで報告してきた。SHSにおける慢性期のoptical mappingによる催不整脈性を検討するとともに、覚醒後の24時間心拍変動(HRV)変化を検討し、人工赤血球(HbV)の抗不整脈効果の機序を調べることを目的とした。

方法：SHSにおける慢性期催不整脈性とHRVを検討するために、Sprague-Dawleyラットに30%脱血し、5%アルブミン(5%ALB,  $n=8$ )とHbV(HbV,  $n=8$ )および洗浄赤血球(wRBC,  $n=8$ )で蘇生した。蘇生後覚醒させ、24時間以上生存させた後、心臓を摘出しLangendorff灌流モデルとした。正常ラットを対照群(NL,  $n=8$ )として、optical mapping解析(OMP)と不整脈誘発を実施した。また、NLラットと生存しているラットを覚醒下にTelemetry解析システムで24時間心電図を記録し、frequency domain HRVを記録した。

結果：OMP解析では、5%ALBにおいてaction potential duration dispersion(APDd)は、HbV, wRBC, NLに比較し有意に延長していた( $26\pm 8$ , vs.  $16\pm 4$ ,  $15\pm 3$ ,  $14\pm 2$  ms;  $p<0.05$ )。

一方、5%ALBでは致死性不整脈(VT/VF)が誘発されたのに対し、HbV, wRBC, NLでは誘発されなかった。24時間Telemetry解析では、total spectraを反映するHRV指標が、5%ALBで有意に大きかった(Total entropy;  $37\pm 11$  vs.  $10\pm 1$ ,  $29\pm 6$ ,  $22\pm 12$  ms<sup>2</sup>/Hz,  $p<0.05$ )。また、LF/HFも5%ALBでHbV, NLに比較し高値である傾向が認められ、心室性不整脈頻度も5%ALB群で高かった。

結語：SHSでは、蘇生後・生存後も心室電気的リモデリングを介して致死性不整脈を惹起しやすいことが示唆された。また、その修飾因子として、覚醒時心臓自律神経機能の異常が関与する可能性が示唆された。HbVはこれら病的変化改善に有効であることが考えられる。

#### 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、血液型適合検査の必要性や保存期間が短い等の種々の問題点がある。近年、血液代替物として赤血球輸血療法に替わるさまざまな人工酸素運搬体(人工赤血球)が開発されている<sup>1~3)</sup>。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

液代替物としての有用性を報告し<sup>4~7)</sup>、現在わが国において第I相臨床試験を実施している。

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関係すると報告されている<sup>8, 9)</sup>。これまで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、心疾患の増加が報告されている<sup>10)</sup>。したがって人工酸素運搬体の抗不整脈効果は重要であり、HbVにおいても同様の副作用が懸念される。

また、これまでいわゆる“出血性ショック心臓症候群(shock heart syndrome[SHS])”では、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>11~13)</sup>。このSHSでは致死性不整脈が頻発し、その急性期および慢性期において、われわれはHbVには不整脈抑制作用があると報告してきた<sup>14, 15)</sup>。しかし、慢性期SHSにおける抗不整脈機序についての詳細はいまだ不明である。そこで、SHSの慢性期ラットモデルにおいて、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で染色して解析する光工学的手法(Optical mapping analysis)<sup>16, 17)</sup>実験を実施した。さらに催不整脈性に関与する覚醒時の心臓自律神経活動を反映する心拍変動指標(HRV)、自然発生心室性不整脈頻度測定実験を実施した。これによりHbVの慢性期抗不整脈効果を確認し、慢性期SHSのHbV抗不整脈効果機序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,  $n = 56$ )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、以下のプロトコルで致死性出血性ショックモデルを作成した。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)、②HbV(HbV群)および③洗浄赤血球(洗浄赤血球群)蘇生液で蘇生した。また、④正常群も作成した(各群、正常群とも $n = 8$ )。また、ラットTelemetry心電図測定用プローブ(PhysioTel and Dataquest<sup>TM</sup>, Data Sciences International)を、ラット背部に植え込み、覚醒時Telemetry心電図測定用とした。ラットは覚醒させ、通常の飼育条件で最低1週間以上生存させた。

### 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 $[10]$ ,  $\text{MgCl}_2[1]$ , 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名で目視判定し、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5×5mm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APD60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、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, 100V; 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週間生存させ、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, 電気生理学的検査を実施し、HbVの致死性不整脈抑制効果を検討した(各群,  $n=8$ )。

### 4) HRV・自然発生心室性不整脈頻度測定法

急性モデル作成後6～7日目、覚醒中の24時間、ラットTelemetry心電図を記録した。CC5誘導心電図を記録し、RR間隔からラット用HRV測定ソフト(MemCalc/Tarawa: Suwa Trust Inc., Tokyo, Japan)により、24時間平均心拍数と周波数解析HbV指標を測定した。低周波数

(LF, 0.10–0.60 Hz), 高周波数(HF, 0.60–2.00 Hz), 総周波数密度(Total entropy)をオンラインで計測し、LF/HFも算出した。また、トレンドグラムと実波形から24時間記録中の心室性期外収縮(PVC)と非持続性心室頻拍(NSVT: PVC 3連続以上)の頻度を目視にてカウントした。

### 5) 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) 急性期および慢性期におけるOptical mapping analysis 法による興奮伝搬様式・伝播速度およびAPD不均一性(APD dispersion)と不整脈誘発率の結果

30%出血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80%、②HbV群と③洗浄赤血球群で全例生存した。24時間生存したラットは、その後約2週間以上生存した(実験実施期間は中央値10日間)。実験計画により慢性期のOptical mapping analysisの成績は中央値10日目に記録した。

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播速度は5%アルブミン群で洗浄赤血球群と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%アルブミン群で20 ms以上と延長し、HbV群と洗浄赤血球群に比較して、有意に延長していた。さらに、致死性不整脈誘発率は、

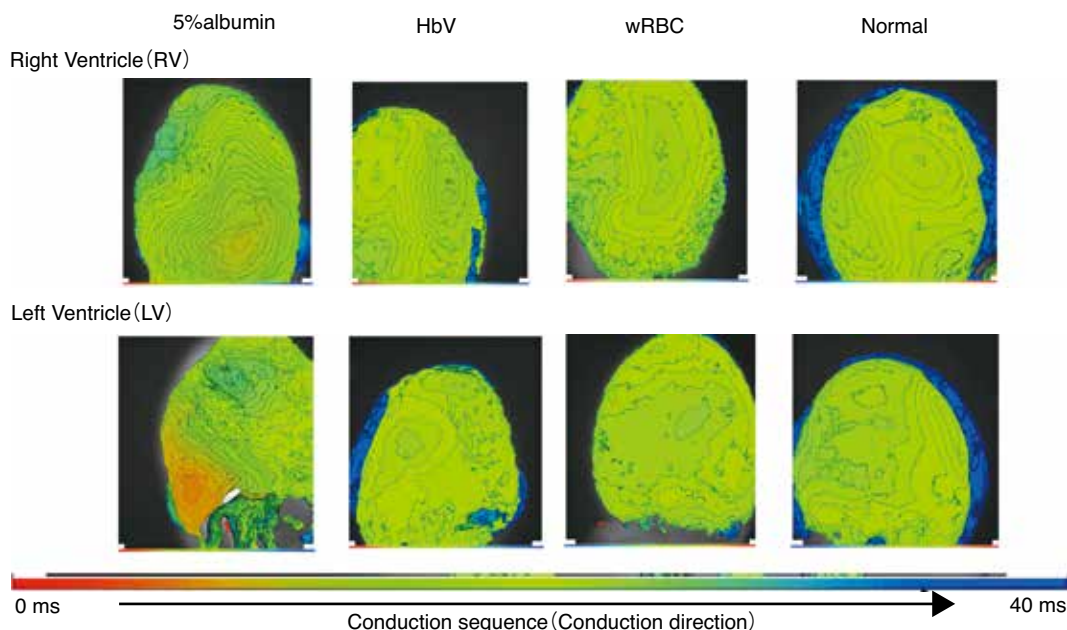


図1 慢性期 Optical Mapping 解析興奮伝搬比較

5%albuminn：5%アルブミン群, HbV：HbV群, wRBC：洗浄赤血球群, Normal：正常群

5%アルブミン群で100%であったのに対し、HbV群と洗浄赤血球群では誘発されなかった<sup>14)</sup>。

## 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

①生存5%アルブミン群、②HbV群と③洗浄赤血球群で、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、HbV群と洗浄赤血球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、HbV群と洗浄赤血球群で比較すると、5%アルブミン群で延長傾向が認められたものの、有意差は認められなかった ( $16.6 \pm 10.4$  ms vs.  $8.6 \pm 5.7$  ms,  $7.1 \pm 2.7$  ms,  $7.0 \pm 2.6$  ms [正常群],  $p < 0.1$ , 図1)。一方、APD dispersionは、5%アルブミン群で、HbV群と洗浄赤血球群に比較し、有意に延長していた ( $26 \pm 8$  ms vs.  $16 \pm$

4 ms,  $15 \pm 3$  ms,  $14 \pm 2$  ms [正常群],  $p < 0.01$ ; 図2)。

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、HbV群や洗浄赤血球群では、VT/VFは誘発されなかった (図3)。

## 3) HRVとPVC・NSVT頻度測定結果

5%アルブミン群、HbV群と洗浄赤血球群で24時間平均心拍数に差は認められなかった (平均  $335 \pm 30$  bpm)。5%アルブミン群の Total entropyは、他の群に比較し有意に高値 ( $37 \pm 11$  vs.  $10 \pm 1$ ,  $29 \pm 6$ ,  $22 \pm 12$  ms<sup>2</sup>/Hz,  $p < 0.05$ , 図4)で、5%アルブミン群の LF/HF値はHbV群よりも高い傾向が認められた (図4)。また図5に示したように、5%アルブミン群ではPVCやNSVTが認められたが、HbV群、洗浄赤血球群では認められなかった (NSVT頻度/24時間; 5%アルブミン群 vs. HbV群, 洗浄赤血球群,  $2.8 \pm 1.1$  vs.  $0.4 \pm 0.2$ ,  $0.4 \pm 0.2$  頻度/24時間;  $p < 0.01$ )。

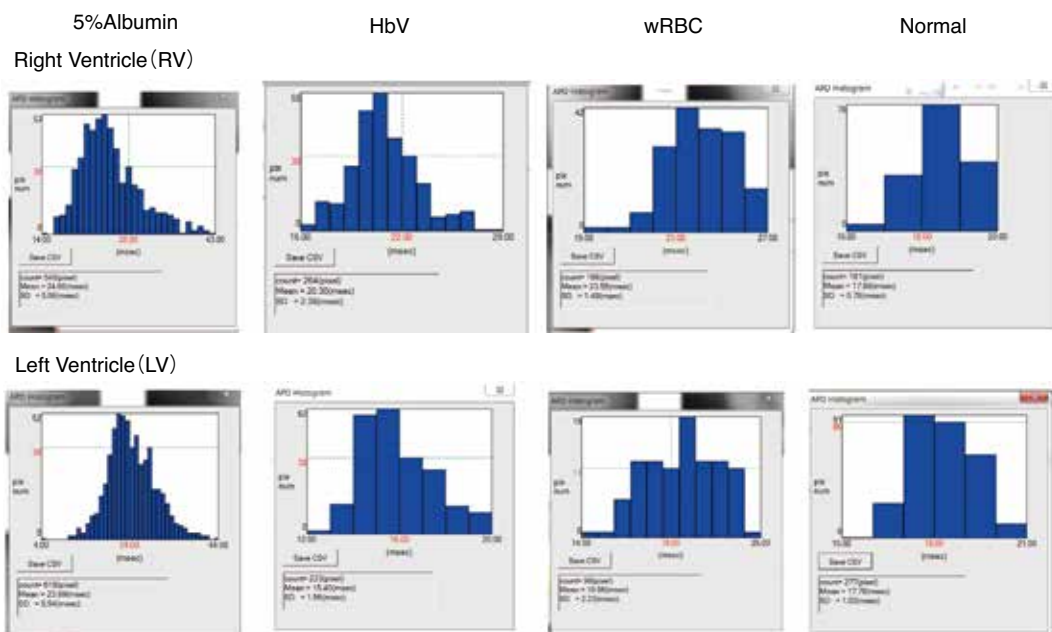


図2 慢性期Optical Mapping解析APDd比較

Optical Mapping解析：Optical mapping analysis, APDd：action potential duration dispersion, 他の略語は図1と同じ。

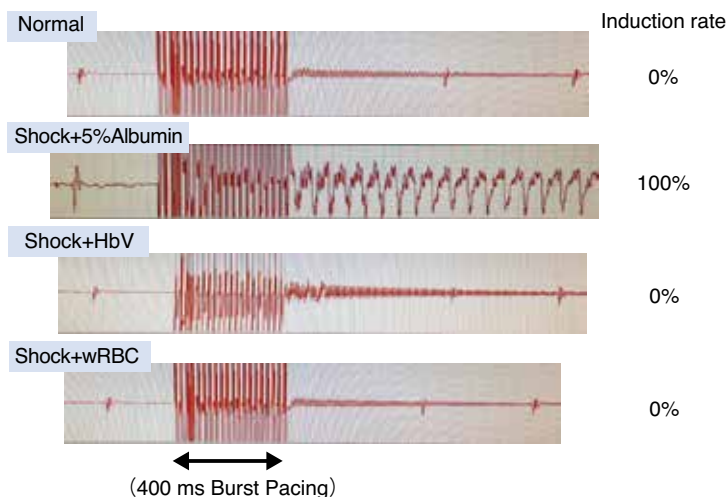


図3 慢性期致死性不整脈誘発頻度 (SHS約1週間後)

SHS：shock heart syndrome, 他の略語は図1と同じ。

### 3 考 察

本研究ではラット SHS モデル(30%出血)において、急性期と同様に慢性期でも、Optical mapping analysisを用いた検討方法で、HbVに

は抗不整脈効果があることが確かめられた。すなわち、HbVは慢性期でもAPD dispersion延長を抑制し、致死性不整脈誘発を有意に抑制した。本研究では、さらに不整脈の発生機序である

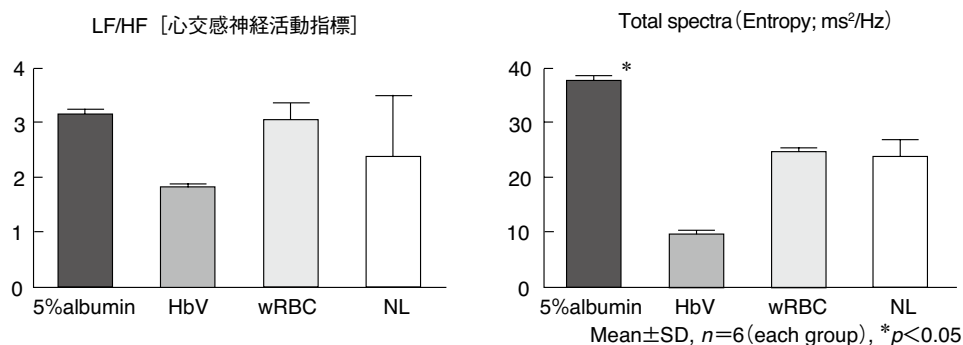


図4 覚醒時24時間心電図：心臓自律神経機能へのHbVの影響

NL：正常群，他の略語は図1と同じ。

5%Albmin蘇生群における覚醒時24時間心電図モニター所見-1 5%Albmin蘇生群における覚醒時24時間心電図モニター所見-2

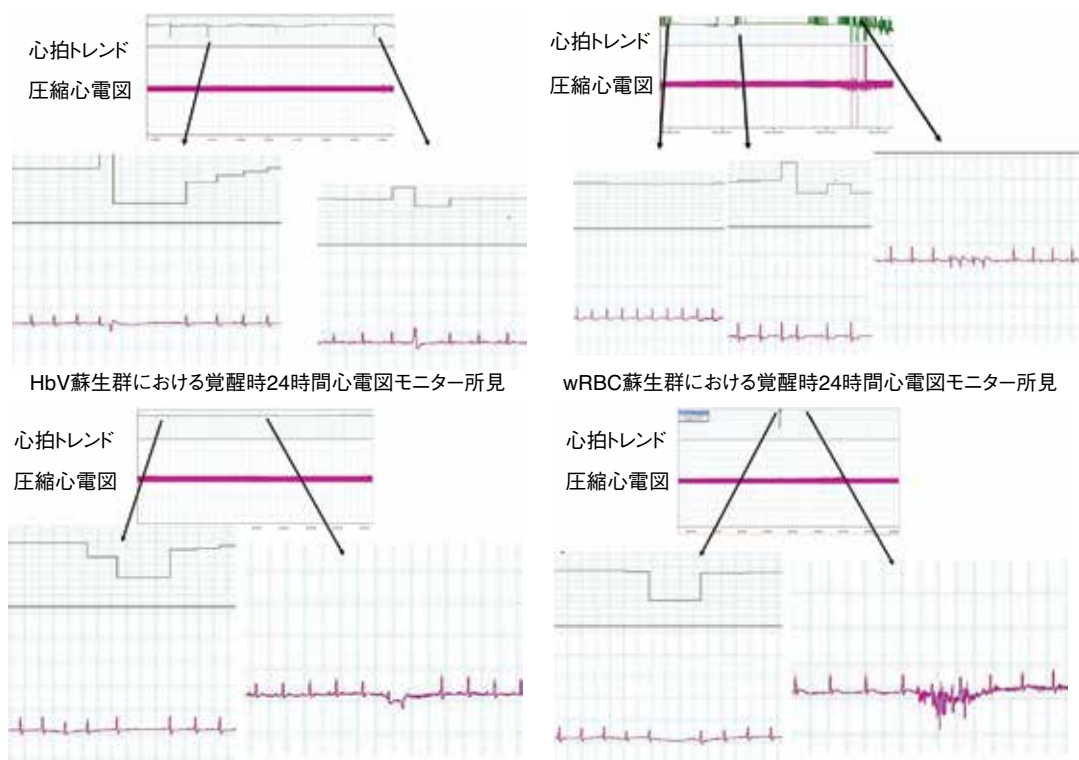


図5 覚醒時自然発生不整脈(SHS約1週間後)

SHS：shock heart syndrome，他の略語は図1と同じ。

不整脈発生修飾因子の心臓自律神経機能をラット覚醒時HRVで検討し，また不整脈発生トリガーとされる自発的心室性不整脈(PVS/NSVT)の頻度に関しても新たに検討を加えた。その結

果，慢性期ラットSHSにおいて，HbVは洗浄赤血球と同等のHbV安定効果と心室性不整脈抑制効果を示した。慢性期ラットSHSにおけるHbVの抗不整脈機序には，Optical mapping



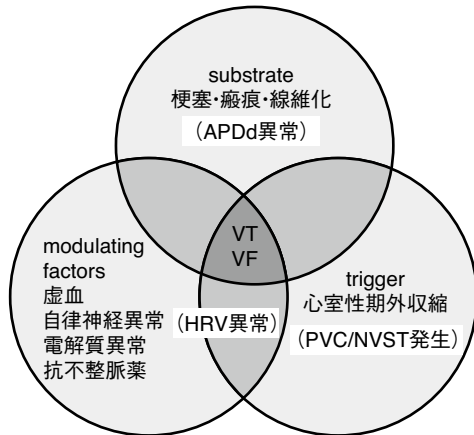


図6 心室頻拍・細動発生に関与する因子

Substrate：不整脈器質，modulating factors：不整脈修飾因子，trigger：不整脈トリガー，VT：ventricular tachycardia，VF：ventricular fibrillation，APDd：action potential dispersion，HRV：heart rate variability，PVC：ventricular premature contraction，NSVT：non-sustained ventricular tachycardia

analysisで検討した電氣的リモデリング(不整脈器質)の改善効果に加え，心臓自律神経調整機能(不整脈修飾因子)および自発的心室性不整脈抑制(不整脈トリガー)効果があることが認められた。不整脈の発生機序は，①不整脈器質，②不整脈修飾因子，③不整脈トリガーが一般的に関与されるとされており<sup>18)</sup>，SHSにおいてHbVは，これらすべての抗不整脈因子に改善的に働くと考えられる(図6)。

一方，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13～24時間と想定される。今回，われわれの研究で得られたSHS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。ラットにおいて約10日間が慢性期とできるか否かについては議論の多いところではあるものの，上記のラットの代謝速度を考慮すると約10日間は，ヒトでは約40日間と推定され，亜急性期と考えるよりも慢性期としても妥当と考えられる。

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>8, 9)</sup>。また，30%出血モデルによる実験的SHS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>7, 14)</sup>。そのため，実験的SHS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である。

また，HbVの第I相臨床治験が2020年11月からわが国で開始されている。Hemopure，Polyhemの第III相臨床治験で，致死性不整脈も含めた心臓副作用によりHemopureおよびPolyhemの臨床適応が認められなかった<sup>19～21)</sup>ことを考慮すると，本研究で認められたHbVの慢性期抗不整脈効果は，今後HbVの臨床治験を進めるうえで有用であると示唆された。

## 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 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, Malavalli A, Wooldridge J, et al. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509-16.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Sakai H, Sou K, Horinouchi H, et al. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. *Artif Organs* 2009;33:139-45.
- 7) Hagiwara 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.
- 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) Adachi T, Hori S, Miyazaki K, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates myocardial ischemia in hemorrhagic shock in constant pressure model. *Shock* 1998;9:204–9.
  - 12) 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.
  - 13) Siegel HW, Downing SE. Reduction of left ventricular contractility during acute hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1970;218:772–9.
  - 14) 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.
  - 15) 高瀬凡平, 東村悠子, 朝比奈はるか, ほか. 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. *Ther Res* 2019;40:709–16.
  - 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 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.
  - 18) Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 2001;345:1473–82.
  - 19) Jahr JS, Mackenzie C, Pearce LB, et al. HBOC-201 as an alternative to blood transfusion: efficacy and safety evaluation in a multicenter phase III trial in elective orthopedic surgery. *J Trauma* 2008;64:1484–97.
  - 20) Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, et al. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. *J Am Coll Surg* 1998;187:113–20.
  - 21) Jahr JS, Akha AS, Holtby RJ. Crosslinked, polymerized, and PEG-conjugated hemoglobin-based oxygen carriers: clinical safety and efficacy of recent and current products. *Curr Drug Discov Technol* 2012;9:158–65.