

●一般演題

## 重症出血性ショックモデル(85%血液交換)の 亜急性期における人工酸素運搬体(HbV)の抗不整脈効果の機序 —心拍変動解析を用いた検討—

防衛医科大学校集中治療部/入間ハート病院 高瀬 凡平

防衛医科大学校集中治療部 東村 悠子・真崎 暢之

防衛医科大学校救急部 朝比奈はるか

防衛医科大学校免疫微生物学講座 木下 学

奈良県立医科大学化学講座 酒井 宏水

### 要 約

人工酸素運搬体(Liposome-encapsulated hemoglobin vesicles[HbV])は出血性ショックモデルで抗不整脈効果を示す。しかし亜急性期の効果・機序は明らかでない。亜急性期85%血液交換ラットモデルでの抗不整脈機序を心臓自律神経活動(heart rate variability[HRV]), 心機能およびOptical Mapping解析(OMP)から検討した。方法: SDラットの骨髄輸血と大腿動脈脱血による85%血液交換モデルを, HbV投与群(HbV群), 洗浄赤血球投与群(wRBC群)および5% albumin投与群(ALB群)で作成し, 生存ラットを4週間後まで観察した。4週間後に覚醒時のHRVと不整脈を24時間測定し, 心臓超音波法にて左室駆出率(LVEF)を確認した。不整脈誘発法(EPS)を含むOMPを実施した。HRVはLF, HF, LF/HFを求めた。亜急性期では50%血液交換ラットモデルでの5% albumin投与群(ALB50群)を作成した。結果: 亜急性期においてHbV群・wRBC群では, ALB50群に比較して心室性不整脈の抑制とLF/HF上昇抑制を認めた(HbV群, wRBC群 vs. ALB50群;  $0.3 \pm 0.5$ ,  $0.3$

$\pm 0.2$  vs.  $3.5 \pm 1.1$ ,  $p < 0.05$ )。LVEFはHbV群でwRBC群と同程度保たれ, OMPでのAction potential duration dispersion (APDd)とEPSでの致死性不整脈抑制度はHbV群とwRBC群で同程度であった。結語: HbVは致死性の出血性ショック(85%血液交換モデル)の亜急性期において抗不整脈効果が認められた。機序としてHbVによる心臓自律神経調整機能・心機能保持効果および電気的リモデリング(APDd)改善効果が示唆された。

### はじめに

重症出血性ショックの有効治療としては赤血球輸血療法が実臨床では実施されている。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等の問題点が多く, 制限がある。このため赤血球輸血療法にかわる各種の血液代替物療法が報告されてきた<sup>1,2)</sup>。これまでわれわれは, リポソーム封入酸素運搬体(Liposome-encapsulated hemoglobin[HbV])の開発を通じ, HbVの有用性を示し<sup>3,4)</sup>, わが国においてphase I臨床治験を実施している。

一般的に出血性ショック疾患では、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>5, 6)</sup>。また、HbVと同様の人工酸素運搬体における臨床試験で、その副作用として心疾患・不整脈惹起作用が報告され、注目されている<sup>7, 8)</sup>。したがってHbVの抗不整脈効果は重要であり、HbVの催不整脈副作用が懸念される。

そこで、重症出血性ショック病態における急性期のみならず亜急性期から慢性期におけるHbVの抗不整脈効果を検討することは、HbVの臨床試験を行ううえで重要である。すでにわれわれは、重症出血性ショックモデルで急性期のHbVの不整脈抑制作用を報告してきた<sup>9, 10)</sup>。しかし、亜急性期における抗不整脈性やその機序についての詳細はいまだ不明である。そこで、重症出血性ショック実験の亜急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: OMP)<sup>11, 12)</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および心機能評価実験を実施した。これによりHbVの亜急性期抗不整脈効果を確認し、亜急性期におけるHbV催不整脈予防効果やHbVの不整脈性副作用の有無を確認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(雄; 約8週齢; 250～300 g,  $n = 70$ )を対象とした。短時間のセボフルラン(SevofraneR, Abbot Japan, Osaka, Japan)吸入後、腹腔に50 mg/kgのペントバルビタールナトリウム(Nembutal, Abbott Lab., North Chicago, IL, USA)と皮下にアトロピン硫酸酸(0.01 mg/kg, TCI Inc., Tokyo, Japan)を投与し、セボフルランを併用し麻酔管理とした。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から脱血した。対側の脛骨を穿刺し23G穿刺針を骨髓に留置し、骨髓補液ルートとして確保した。骨髓補液ルートから蘇生液を投与し蘇生液交換実験モデルを作成した。

femoral artery catheterから0.5 mL/minの速度で脱血し、同時に対側の脛骨骨髓から蘇生液を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。蘇生液は、①5%アルブミン(ALB群)、②HbV(HbV群)蘇生液および③洗浄赤血球(wRBC群)蘇生液で蘇生した。また、④50%血液交換ラットモデルも作成し、50%血液交換ラットモデルでの5%アルブミン蘇生群(ALB50群)においてOMPを検討した(各群; 急性期・亜急性期各群,  $n = 6$ )。

また、ラットTelemetry心電図測定用プローベ(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(図1)。ラットは覚醒させ、通常の飼育条件で最低4週間以上生存させた。ALB群では急性期に24時間以上生存ラットが生存できないため、negative control群として作成したALB50群を亜急性期の検討に用いた。

### 2) 光工学的手法(OMP)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①～③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(CaCl<sub>2</sub>[2], NaCl[140], KCl[4.5], dextrose [10], MgCl<sub>2</sub>[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-

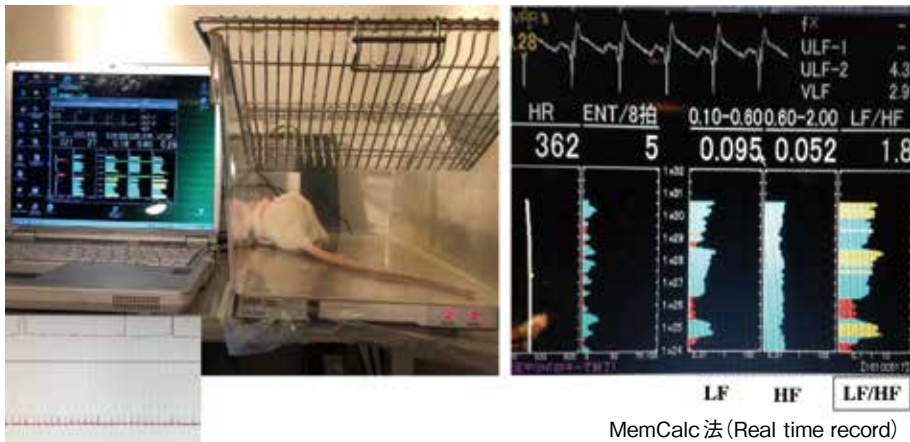


図1 蘇生群後覚醒時24時間心電図モニター記録と心拍変動記録方法

LF：低周波数心拍変動指標，HF：高周波心拍変動指標，LF/HF：低周波数心拍変動指標・高周波心拍変動指標比

butanedione monoxime (Wako Chemical, Tokyo, Japan, 20 mM) を灌流した。OMP 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)、得られた活動電位持続時間(action potential duration: APD) (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5×5 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<sub>60</sub>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、すなわち心室心尖部、心室基部、心室流出路を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。

亜急性期の生存ラットについても、同様にOMP解析と致死性不整脈誘発実験を②～④群で実施した。

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

亜急性期生存実験では、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4週間生存させて、中央値28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OMP、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,  $n = 6$ )。

### 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27～28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, 0.10–0.60Hz)、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) 心臓超音波法による心機能評価(左室駆出率測定[left ventricular ejection fraction; LVEF]測定)

心機能評価(LVEF測定)のため、2D心臓超音波を10MHz linear array transducer 装備のGEMedical 超音波システム(VIVIDi : GE Healthcare Japan, 埼玉, 日本)にて記録した。M-mode法を用いて、乳頭筋レベルの長軸像から得られた左心室の収縮末期および拡張末期径からLVEFを米国心エコー検査学会が推奨する標準化された方法に従って記録した<sup>13)</sup>。各測定指標およびLVEF測定は、少なくとも3連続心拍で計測し平均値を求めた。LVEFは、Teichholz法<sup>14)</sup>を用いた。

#### 6) 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85%血液交換モデルにおける血行動態と24時間生存率

85%血液交換モデルの生存率と血行動態の結果を表1に示す。各群の24時間生存率は、HbV群およびwRBC群では全ラット生存し、その後も4週間以上生存した。しかし、ALB群では24時間後まで生存したラットは認められなかった。その際の85%血液交換モデル作成前と作成終了時の平均血圧を表1に示した。ALB群では平均血圧は30 mmHg以下に低下した。一方で、HbV群およびwRBC群では平均血圧は60

mmHg以上に保たれていた。85%血液交換モデルでは、ALB群のラットは全例24時間生存しなかったため、方法で示したように、50%血液交換モデル(ALB50群)を作成した。ALB50群では、24時間後の生存率は100%で全例4週間以上生存した。ALB50群のラットを、亜急性期のコントロール群とした。

### 2) OMPと不整脈誘発法によるHbVの急性期・亜急性期抗不整脈効果

急性期のALB群、HbV群およびwRBC群の洞調律における右室・左室の伝播時間、興奮伝搬様式、APD持続時間、APD dispersionおよび致死性不整脈誘発率を表1にまとめた。右室・左室の伝播時間、興奮伝搬様式、APD持続時間に関しては、3群間で有意差は認められなかった。しかし、心室の電気的リモデリング指標で不整脈発生に関与するとされるAPD dispersionは、HbV群およびwRBC群に比べ、ALB群で右室・左室ともに有意に延長していた。致死性不整脈誘発率の比較では、ALB群で全例致死性不整脈が誘発されたのに対し、HbV群およびwRBC群では、致死性不整脈誘発は認められなかった。

亜急性期におけるALB50群、HbV群およびwRBC群の洞調律における右室・左室の伝播時間、興奮伝搬様式、APD持続時間、APD dispersionおよび致死性不整脈誘発率を表2にまとめた。右室・左室の伝播時間、興奮伝搬様式、APD持続時間に関しては、3群間で有意差は認められなかった。しかし、心室の電気的リモデリング指標で不整脈発生に関与するとされるAPD dispersionは、HbV群およびwRBC群に比べ、ALB50群で右室・左室ともに有意に延長していた。亜急性期でも、急性期と同様に致死性不整脈誘発率の比較でも、ALB50群で全例致死性不整脈が誘発されたのに対し、HbV群およびwRBC群では、致死性不整脈誘発は認められなかった。

### 2) HRV・自然発生心室性不整脈頻度

亜急性期において、覚醒中の24時間ラット Telemetry心電図を記録された結果では、HbV

表1 平均血圧および左右心室における電気生理学的計測結果：急性期

	ALB群 (n = 6)	HbV群 (n = 6)	wRBC群 (n = 6)
BW(g)	367±23	364±24	366±25
MBP pre (mmHg)	133±17	132±16	134±17
MBP post (mmHg)	26±8 *	64±11	69±10
Condt time	in RV(ms)	13.5±5.6	9.9±6.0
	in LV(ms)	17.0±15.0	7.3±6.7
Condt pattern (% normal pattern : RV/LV)	0 / 0 *	100 / 100	100 / 100
APD	in RV(ms)	24.2±7.3	21.8±4.8
	in LV(ms)	23.6±8.4	19.6±5.3
APDd	in RV(ms)	21.0±6.2 *	12.2±5.0
	in LV(ms)	25.2±9.8 *	12.5±7.4
VT/VF induction (%)	100 *	0	0

ALB : 5% albumin, HbV : hemoglobin-vesicles, wRBCs : washed red blood cells, BW : body weight, MBP pre : mean artery blood pressure before blood withdrawal, MBP post : mean artery blood pressure after resuscitation, Condt Time : right/left ventricular conduction time, Condt pattern : conduction pattern in the right ventricular(RV)/left ventricular(LV) free wall, APD : action potential duration, APDd : action potential duration dispersion in the right ventricular (RV)/left ventricle (LV), VT/VF induction : induction rate of ventricular tachycardia/ventricular fibrillation by burst stimulus to the right/left ventricular free wall

Results are presented as mean ± standard deviation. \*  $p < 0.01$  indicates significance compared to normal controls, HbV, and wRBC群

表2 左右心室における電気生理学的計測結果：亜急性期

	ALB50群 (n = 6)	HbV群 (n = 6)	wRBC群 (n = 6)
BW(g)	367±24	362±25	360±22
Condt time	in RV(ms)	13.5±5.6	7.2±4.0
	in LV(ms)	10.8±7.0	7.5±5.6
Condt pattern (% normal pattern : RV/LV)	0/0 *	100/100	100/100
APD	in RV(ms)	24.2±8.2	21.8±5.8
	in LV(ms)	23.6±9.4	20.6±4.9
APDd	in RV(ms)	21.0±7.2 *	12.2±5.1
	in LV(ms)	24.2±4.0 *	13.6±7.1
VT/VF induction (%)	100 *	0	0

ALB : 5% albumin, HbV : hemoglobin-vesicles, wRBCs : washed red blood cells, BW : body weight, Condt Time : right/left ventricular conduction time, Condt pattern : conduction pattern in the right ventricular(RV)/left ventricular(LV) free wall, APD : action potential duration, APDd : action potential duration dispersion in the right ventricular(RV)/left ventricle(LV), VT/VF induction : induction rate of ventricular tachycardia/ventricular fibrillation by burst stimulus to the right/left ventricular free wall

Results are presented as mean ± standard deviation. \*  $p < 0.01$  indicates significance compared to normal controls, HbV, and wRBC群

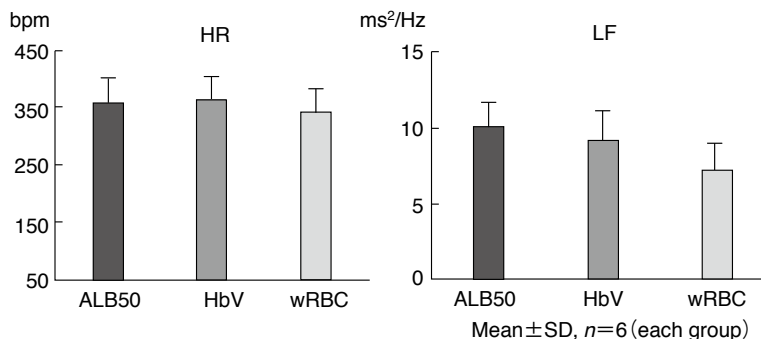


図2 覚醒時24時間平均心拍数と心臓自律神経機能(HRV)：HbVの影響-1  
ALB50：ALB50群(5%アルブミンによる50%血液交換モデル), HbV：HbV群,  
wRBC：wRBC群

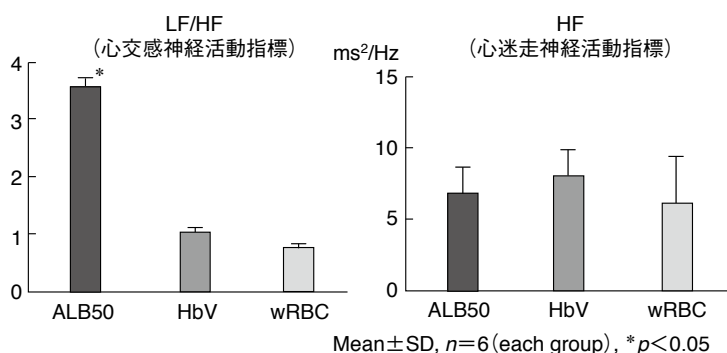


図3 覚醒時24時間心電図心臓自律神経機能(HRV)：HbVの影響-2  
ALB50：ALB50群(5%アルブミンによる50%血液交換モデル), HbV：HbV群, wRBC：wRBC群

群・wRBC群では、ALB50群に比較してPVC・NSVT抑制が認められた(NSVT：HbV群, wRBC群 vs. ALB50群：0.2±0.2, 0.1±0.2 vs. 5.2±1.1 episodes/day,  $p < 0.05$ )。また、図2, 3に示したようにALB50群, HbV群およびwRBC群の3群では、平均心拍数およびHRVのうちLF・HFに有意差は認められなかった。しかし、LF/HFに関してはALB50群に対し、HbV群およびwRBC群で有意な上昇抑制効果を認めた(HbV群, wRBC群 vs. ALB50群：0.3±0.5, 0.3±0.2 vs. 3.5±1.1%,  $p < 0.05$ )。

### 3) LVEF測定結果

亜急性期のLVEFの比較を図4に示した。HbV群およびwRBC群のLVEFはALB50群に比

し有意に良好であった(HbV群, wRBC群 vs. ALB50群；86±5, 85±5 vs. 67±7%,  $p < 0.05$ )。

### 3 考 察

本研究では、致死性出血性モデルである85%血液交換ラットモデルにおいて急性期には、HbVはwRBCと同様の蘇生効果を示し、致死性不整脈誘発の抑制効果が確認された。亜急性期にも同様の抗不整脈効果がHbVには認められた。さらに、覚醒中の24時間ラットTelemetry心電図を記録では、HbVは自然発生心室性不整脈頻度抑制効果を示し、またHRV調整効果とLVEF保持効果を示した。これらは、急性期のみならず亜急性期においても、HbVが心筋電気

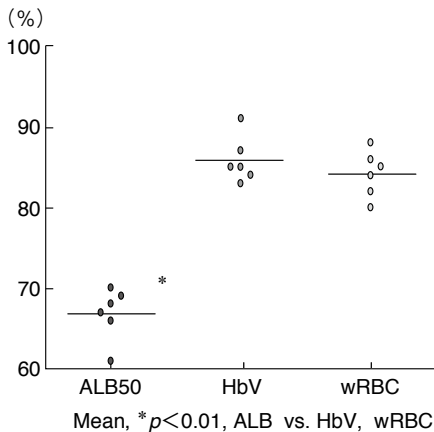


図4 蘇生後亜急性期心エコー検査による左心機能測定 (LVEF)

ALB50：ALB50群(5%アルブミンによる50%血液交換モデル), HbV：HbV群, wRBC：wRBC群

的リモデリング抑制効果を介して貧血誘発催不整脈性に対して抑制効果を示しただけでなく、不整脈発生の修飾因子である心臓自律神経機能(HRV)調整効果および心機能(LVEF)保持効果、不整脈発生のトリガーである心室性不整脈(NSVT)抑制効果をも有することが示唆された。

不整脈発生抑制には、不整脈基質(電気的リモデリング)・不整脈修飾因子(HRV, LVEF)・不整脈トリガー(NSVT)の改善が重要である<sup>15)</sup>。亜急性期において、HbVにこれらに対する改善効果が認められたことは、出血性貧血状態において、HbVの抗不整脈効果は亜急性期にも持続することを示したものである。また、少なくとも85%血液交換ラットモデルにおいて、HbVは亜急性期において催不整脈副作用を惹起しないことを示すと考えられる。HbVのヒトにおける半減期は約72時間とされている。したがって、ラットではHbVの代謝はさらに短いと推定される。HbVの効果が亜急性期にも持続した機序として、①HbVに催不整脈副作用が認められないこと、および②HbV中に含まれる人ヘモグロビン中の鉄成分が再利用されて、ラット自身の造血機能により亜急性期でも貧血状態が回避さ

れていること等が推測される。

これまでHemopureやPolyheme等の人工酸素運搬体において、臨床治験の段階で、心循環器系副作用等が認められ、臨床応用が中止された<sup>6,7)</sup>。これらを考慮すると、亜急性期におけるHbVの抗不整脈効果発現は、HbVが臨床応用された際の副作用回避の観点から重要と考えられる。

これまでわれわれは、急性期重症出血性モデルでのHbVの抗不整脈作用を報告してきた<sup>9,10)</sup>。本研究では、新たにHbVの亜急性期抗不整脈効果が確認された。亜急性期におけるHbV催不整脈予防効果や、HbVの不整脈性副作用が認められないことが確認されたことは、本研究が非臨床試験ではあるものの、現在進行中であるわが国のHbVの臨床治験を行ううえで有用な知見と考えられる。

## 文 献

- 1) 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.
- 2) Vandegriff KD, Malavalli A, Wooldridge J, et al. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509-16.
- 3) 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.
- 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;8:10.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
  - 9) Takase B, Higashimura Y, Asahina H, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin (HbV) transfusion rescues rats undergoing progressive lethal 85% hemorrhage as a result of an anti-arrhythmogenic effect on the myocardium. *Artif Organs* 2021 Jul 4. doi: 10.1111/aor.14033.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) Tanaka H, Matsuyama TA, Takamatsu T. Towards an integrated understanding of cardiac arrhythmogenesis-Growing roles of experimental pathology. *Pathol Int* 2017;67:8-16.
  - 13) van de Bovenkamp AA, Enait V, de Man FS, et al. Validation of the 2016 ASE/EACVI Guideline for Diastolic Dysfunction in Patients With Unexplained Dyspnea and a Preserved Left Ventricular Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc* 2021:e021165.
  - 14) Boluyt MO, Converso K, Hwang HS, et al. Echocardiographic assessment of age-associated changes in systolic and diastolic function of the female F344 rat heart. *J Appl Physiol* (1985) 2004;96:822-8.
  - 15) Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 2001;345:1473-82.