

●一般演題

動脈性出血性ショックモデルにおける人工赤血球(HbV)の心保護作用と抗不整脈作用に関する検討

人間ハート病院 高瀬凡平・林 克己・久田哲也・永田雅良
防衛医科大学校集中治療部 高瀬凡平・東村悠子・眞崎暢之
防衛医学センター外傷研究部門 朝比奈はるか
防衛医科大学校免疫微生物学教室 木下 学
奈良県立医科大学化学教室 酒井宏水

要 約

人工赤血球(HbV)の第1相臨床試験が終了した。HbVの動脈性出血における蘇生・抗不整脈・心保護作用についてラットモデルで検討した。方法：SDラットの自然動脈出血モデルで出血同量の蘇生液投与を5回繰り返した(65%出血)。5%アルブミン蘇生群(ALB群)、HbV蘇生群(HbV群)および洗浄赤血球蘇生群(wRBC群)で、心筋障害指標の心筋トロポニンI(cTnI)・心筋組織のHIF1 α 発現測定および光工学的方法(OMP)による電気生理学的解析を検討した。結果：ALB群に比較し、HbV群ではwRBC群と同程度の蘇生率を示し、cTnIも正常に保たれた(Peak cTnI：186 \pm 47 vs. 91 \pm 24, 64 \pm 25 pg/mL, $p < 0.05$)。HIF1 α 発現もHbV群・wRBC群で抑制された。OMPの致死性不整脈誘発率も同様に抑制された。結語：HbVは動脈損傷による急性出血に迅速に投与することにより、心筋保護作用と抗不整脈作用を有すると示唆された。

はじめに

出血性ショックの有効な治療は輸血療法である。しかし、わが国では保存血の確保が困難であり、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。最近、血液代替物として赤血球輸血療法に代わる、人工酸素運搬体(人工赤血球)が種々開発されており^{1,2)}、いくつかは臨床応用されている^{3,4)}。

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^{5,6)}。また、HbVの第1相臨床試験がわが国で安全に終了した⁷⁾。今後、テロ等による動脈性出血性ショックにおけるHbVの有用性が期待されている。そのため、本HbVの動脈性出血における蘇生効果やその心臓保護作用をさらに詳細を検討することは有用である。

また、これまでにわれわれは、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 : OMP)を用

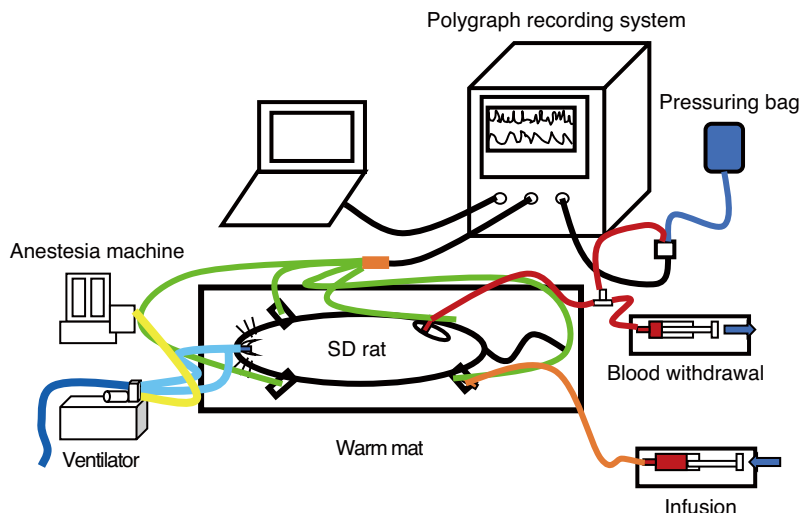


図1 反復性(30%脱血)動脈性出血ショックラットモデルの作成プロトコール

いて、HbVの致死性不整脈抑制作用を検討してきた^{8~10)}。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])を測定し、HbVの効果を検討している^{11, 12)}。さらに、心筋障害指標の心筋トロポニンI(cTnI)・心筋組織のHIF1 α 発現測定は、HbVの心筋保護作用評価に有効である¹³⁾。

そこで、今回の研究の目的は、有事・大規模災害・テロ等で起こる反復性動脈性出血ショックラットモデル(動脈損傷モデル)におけるHbVの心筋保護作用(cTnI, HIF1 α)と抗不整脈作用(OMP, APDd)に及ぼす効果について検討することである。

1 対象

1) モデル作成法

Sprague-Dawleyラット(male, 8 weeks old, 250~300 g, $n=54$)を対象とした。短時間のsevoflurane(Sevofrane[®], Abbott 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 DataquestTM, Data Sciences International, St Paul, MN, USA)で測定するとともに、femoral artery catheterから自然動脈出血(脱血, 30%)を実施し、直後に対側の末梢静脈から同量の蘇生液をbolus投与した(30%自然動脈出血・直後同量の蘇生液静脈内投与, 5回連続施行, 動脈損傷モデル, total希釈65%, 図1)。蘇生液は、①5%アルブミン(5%アルブミン蘇生群)、②HbV(HbV蘇生群)および③洗浄赤血球(洗浄赤血球群)蘇生液で蘇生した(各群, $n=18$)。血圧測定は、蘇生後少なくとも約15分間経過観察した。

2) OMPと不整脈誘発法およびHbVの抗不整脈効果の検討

急性実験では、上記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(CaCl₂ 2 mmol/L, NaCl 140 mmol/L, KCl 4.5 mmol/L, dextrose 8 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L,

HEPES 10 mmol/L[pH 7.4])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。

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播様式と伝播時間(ms), 得られた活動電位(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、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, 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⁹⁾。

3) 本研究モデルHbVの非誘発性心室性不整脈に及ぼす影響の検討

各蘇生群の動脈損傷モデルにおける自然発生心室性不整脈の頻度を心電図モニター記録と血圧測定ラット用モニター装置で検出し、その頻度を各群で比較検討した。

4) 血中心筋トロポニンI(cTnI)・心筋組織のHIF1 α 発現の測定法

cTnI測定は、ポリアニオン性高分子の存在下において心筋トロポニンI測定試薬・抗体(抗心筋型トロポニンI抗体, 2ステップサンドイッチ法, 富士レビオ株式会社, Japan)を用いてcTnI量を測定した。心筋組織のHIF1 α 測定は、心筋をホルマリン固定したのち免疫染色にて実施した(Norcross, GA, USA)。

5) 統計学的検討

各群の興奮伝播時間, APD dispersionおよびcTnI値は平均±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。 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

3 結 果

1) 血行動態への影響

3群蘇生液によるMBPの変化の比較の典型例を図2に示した。5回の自然動脈出血および静脈内蘇生液投与により、洗浄赤血球群およびHbV群では、蘇生後のMBPはそれぞれ約120±10 mmHgに保たれていたものの、5%アルブミン蘇生群では、約50±10 mmHgまで蘇生後MBPが低下した。

2) OMPと不整脈誘発法におけるHbVの抗不整脈効果

5%アルブミン蘇生群, HbV群, 洗浄赤血球群でOMPによる両心室の洞調律における興奮伝播速度を比較したところ、5%アルブミン蘇生群で他の2群に比較し延長する傾向が認められたものの、3群間で有意差は認められなかった。

図3に示したように、左室, 右室ともに、APD dispersionは5%アルブミン蘇生群で他の2群よりも有意に延長していた(左室: 21±5 vs. 10±8, 13±9 ms, $p < 0.05$, 右室: 22±9 vs. 14±8, 18±5 ms, $p < 0.05$)。また、不整脈誘発法に

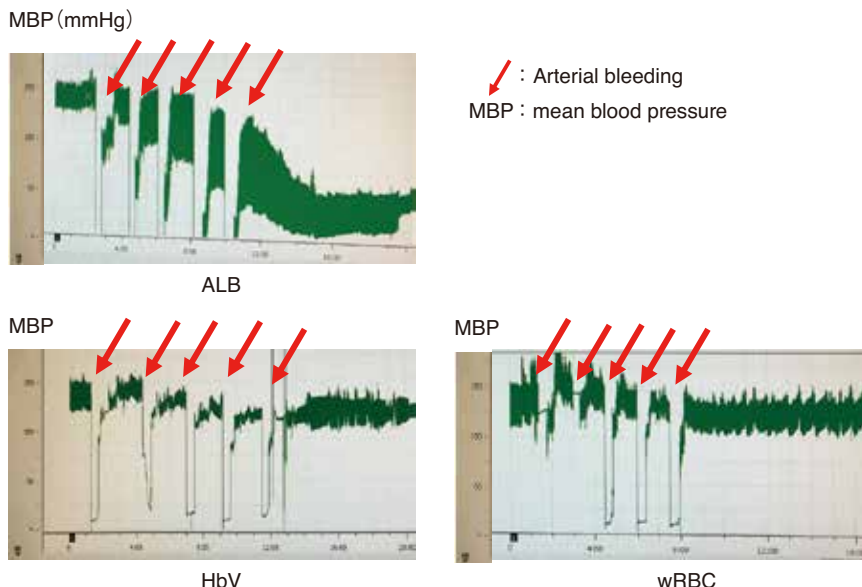


図2 本モデルにおける各蘇生群の平均血圧に及ぼす影響(典型例の提示)
 MBP：平均血圧, ALB：5%アルブミン蘇生群, HbV：HbV蘇生群, wRBC：洗浄赤血球蘇生群

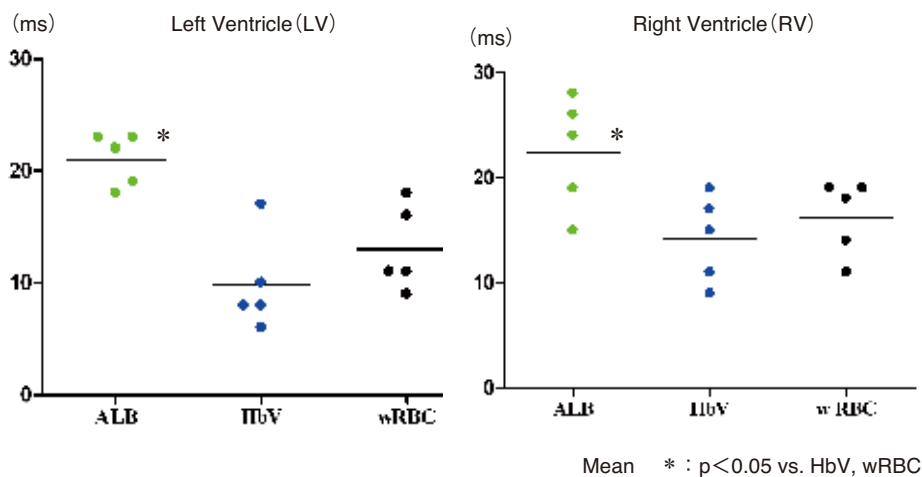


図3 APD不均一性 (APD dispersion [ms]) の各群での比較
 略語は図2と同じ。

におけるHbVに抗不整脈効果の検討では、5%アルブミン蘇生群で全例に致死性不整脈(持続性心室性頻拍・心室細動)が誘発された。一方で、HbV群および洗浄赤血球群では全例に致死性不整脈は誘発されなかった(図4)。

3) 本研究モデルにおけるHbVの非誘発性心室性不整脈抑制作用

各蘇生群の動脈損傷モデルにおける自然発生心室性不整脈の頻度を心電図モニターで記録した結果を図5に示した。血圧測定ラット用モ

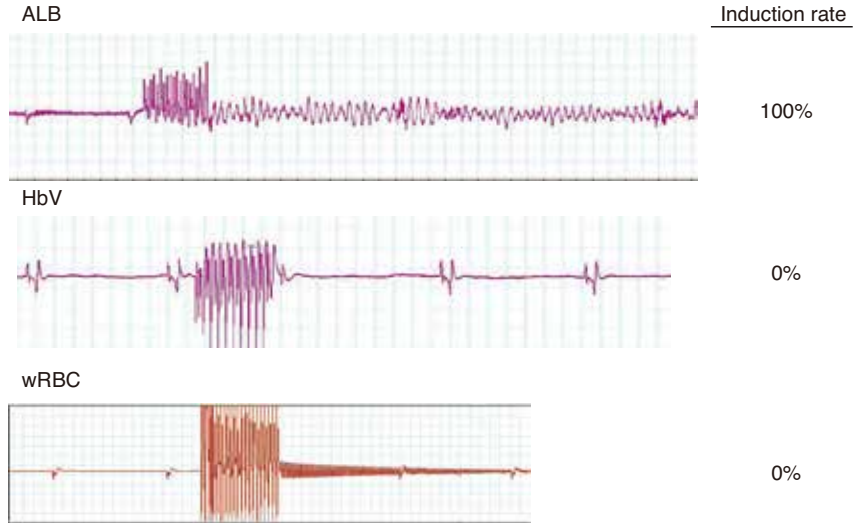


図4 電気生理学的検査における致死性頻拍性不整脈発生率の比較
略語は図2と同じ。

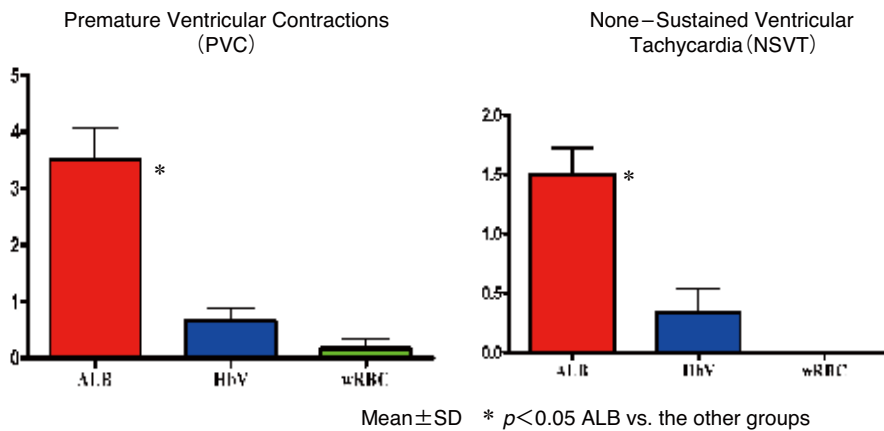


図5 非誘発性心室性不整脈抑制作用の比較
略語は図2と同じ。

ニター装置で検出し、その頻度を各群で比較検討した。本実験実施間のモニター心電図で記録された心室性期外収縮頻度(PVC)および非持続性心室性頻拍(NSVT)頻度は、HbV群および洗浄赤血球群で5%アルブミン蘇生群に比較し、有意に抑制されていた。

4) 血中cTnI値の比較および心筋組織のHIF1 α 発現頻度

心筋障害の指標であるcTnIでは、5%アルブ

ミン蘇生群に比較し、HbV群は洗浄赤血球群と同様の抑制効果を示した(Peak cTnI: 186±47 vs. 91±24, 64±25 pg/mL, $p < 0.05$)。HIF1 α の発現率も5%アルブミン蘇生群に比較し、HbV群では洗浄赤血球群と同等の発現抑制が認められた。

3 考 察

5%アルブミン蘇生群に比較し、HbV群では

洗浄赤血球群と同程度の蘇生後平均血圧が有意に維持された。OMPで解析した活動電位の不均一性 (APD dispersion) および致死性不整脈誘発率も同様に抑制された。また、HbV群では洗浄赤血球群と同等の自然発生心室性不整脈発生 (PVC・NSVT) の抑制効果も認められた。さらに、心筋障害の指標である cTnI と HIF1 α の発現率も、5% アルブミン蘇生群に比較し、HbV群は洗浄赤血球群と同様の抑制が認められた。これらの結果から、HbVは、動脈損傷による急性出血に対しても迅速に投与することにより、洗浄赤血球と同程度の心筋保護作用と抗不整脈作用を有し、洗浄赤血球と同等の効率的な救命効果があると示唆される。

これらのことは、本実験モデルの5% アルブミン蘇生群では、急性出血性ショックで心筋の低酸素状態や心筋障害状態が発生していることを支持するものである。本実験モデルの急性出血性ショックで、HbVや洗浄赤血球の投与がなく、5% アルブミン投与のみでは、心筋細胞での低酸素状態が発生していると考えられる。

先行研究によると¹⁴⁾、動脈損傷による急性出血性ショックで心筋の低酸素状態が発生すると心筋細胞におけるナトリウムチャンネル (Nav1.5) に影響を及ぼすとされている。心筋低酸素状態は、ナトリウムチャンネル (Nav1.5) の活性を抑制し、ナトリウムチャンネル依存性心筋細胞活動電位の脱分極時活動電位の脱分極立ち上がり速度を延長すると報告されている。このことは、本研究の5% アルブミン蘇生群では、急性出血性ショックで心筋細胞の低酸素状態での心筋活動電位の伝搬速度が延長していることを支持する。さらに、ナトリウムチャンネル (Nav1.5) は、心筋細胞の低酸素状態ではナトリウム電流の延長をきたすと報告されている。したがって、心筋細胞の低酸素状態でナトリウムチャンネル (Nav1.5) に異常をきたすと、心筋細胞で活動電位が延長することになる。これらは、本研究で認められた5% アルブミン蘇生群での APD dispersion の有意な延長を支持するものである。HbV群が洗浄赤血球群と同程度に APD

dispersion 延長や致死性不整脈・PVC・NSVT 発生を抑制した効果は、HbV投与により心筋細胞の低酸素状態を改善させるナトリウムチャンネル (Nav1.5) を介した機序が示唆される。

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、大量出血の進行とともに致死性不整脈の頻度が増加するとされている^{11,15)}。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、これまでわれわれの研究で報告してきた¹²⁾。よって、動脈損傷による本急性出血性ショックの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⁾。

現在、HbVの臨床第一相臨床試験が終了している⁷⁾。また、最近では、銃撃テロや地域紛争による銃創による動脈出血の治療が注目されている。本研究結果は、HbVの臨床治験を今後進展させるうえで有用と考えられる。

文 献

- 1) 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.
- 2) Vandegriff KD, Malavalli A, Wooldridge J, et al. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509-16.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Azuma H, Amano T, Kamiyama N, et al. First-in-human phase 1 trial of hemoglobin vesicles as artificial red blood cells developed for use as a transfusion alternative. *Blood Adv* 2022;6:5711-5.
 - 8) Takase B, Higashimura Y, Asahina H, et al. Intraosseous infusion of liposome-encapsulated hemoglobin(HbV) acutely prevents hemorrhagic anemia-induced lethal arrhythmias, and its efficacy persists with preventing proarrhythmic side effects in the subacute phase of severe hemodilution model. *Artif Organs* 2022;46:1107-21.
 - 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;45:1391-404.
 - 10) Takase B, Higashimura Y, Asahina H, et al. Persistent Anti-arrhythmogenic Effect of Liposome-Encapsulated Hemoglobin(HbV) on the Myocardium Through Improving Myocardial Electrical Remodeling and Modulating Cardiac Autonomic Activity in a Hemorrhagic Shock-Induced Rat Heart Model. *Cur Med Sci* 2023 Mar 8. doi:10.1007/s11596-023-2706-9.
 - 11) Sato H, Tanaka T, Kasai K, Kita T, Tanaka N. Role of p38 mitogen-activated protein kinase on cardiac dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *Shock* 2007;28:291-9.
 - 12) 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.
 - 13) Qian M, Liu Y. Cardioprotective action of aprepitant in a rat model of ischemia-reperfusion induced myocardial injury: role of PI3K-Akt-GSK-3 β -HIF-1 α signaling pathway. *Acta Cir Bras* 2022;37:e371004.
 - 14) Fearon IM, Brown ST. Acute and chronic hypoxic regulation of recombinant hNa(v) 1.5 alpha subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:1289-95.
 - 15) 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.
 - 16) Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 2001;345:1473-82.