

●一般演題

片肺全摘周術期重症出血性ショックモデルにおける 不整脈発生機序と人工酸素運搬体 (HbV) の抗不整脈効果 — Optical Mapping による検討 —

防衛医科大学校集中治療部 高瀬 凡平・東村 悠子・真崎 暢之
防衛医科大学校免疫微生物学 木下 学
入間ハート病院 高瀬 凡平・林 克己・久田 哲也
木村 一生・永田 雅良
奈良県立医科大学 酒井 宏水

要 約

周術期出血は胸部肺外科手術の主な合併症である。人工酸素運搬体(Liposome-encapsulated hemoglobin vesicles[HbV])の左片肺全摘切除出血性ショックラットモデルにおける蘇生効果および抗不整脈作用をOptical Mapping解析(OMP)で検討した。SDラット($n = 40$)を対象に左片肺全摘モデルを作成した。大腿動脈脱血蘇生による50%血液交換モデルを作成した。Sham群(NL), 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)を作成し、右室/肺動脈圧と動脈平均血圧(MBP)を記録した。脱血蘇生後心摘出し、不整脈誘発法(EPS)を含むOMPを実施した。

左片肺全摘で右室/肺動脈縮期圧は上昇した(18 ± 2 vs. 52 ± 4 mmHg, $p < 0.01$)。動脈脱血蘇生後20分間で、HbV群・wRBC群ではMBPは正常に保たれたが、ALB群では有意に低下した(MBP: HbV群, wRBC群 vs. ALB群; 125 ± 30 , 128 ± 28 vs. 68 ± 20 mmHg, $p < 0.05$)。脱血蘇生中のモニター心電図の心室性不整脈頻度はALB群で有意に多く、OMP・EPSでも頻回に誘発さ

れた。OMPの催不整脈指標であるAction potential duration dispersion増加抑制とEPSによる致死性不整脈抑頻度はHbV群とwRBC群では同程度であった。

結語：左片肺全摘周術期出血性ショックモデルにおいて、致死性心室性不整脈が惹起しやすいことが認められ、Action potential duration dispersion増加がその機序と示唆された。また、HbVには血行動態保持と抗不整脈作用があり、本知見はHbV臨床治験の実施に有用と考えられる。

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ものの、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。われわれは、これまで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^{1,2)}。HbVの第I相臨床試験はわが国ですでに安全に終了しており³⁾、さらなる臨床試験が現在企画進行中である。現在、HbVがどのような臨床的状況で最も有効に活用できるか、検討している。

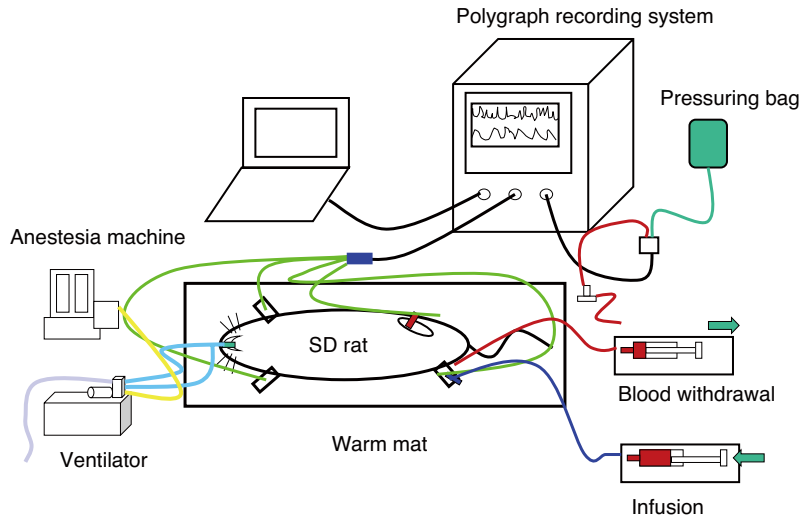


図1 反復性(30%脱血)動脈性出血ショックラットモデルの計測プロトコール

一方、周術期出血は胸部肺外科手術の主要な合併症の1つであり、出血性ショックから急性循環不全、さらには死に至るまでの大量出血が起こりうる。また、全肺切除症例の0.3～1.8%が輸血を必要とすると報告されている^{4, 5)}。これまで、肺外科周術期のHbVの有用性に関しては実験的に検討されているものの^{6～8)}、血行動態維持作用や肺外科時に頻回認められる不整脈に対する予防作用等に関しては十分検討されていない。また、催不整脈作用の機序も明らかでない。

われわれはこれまで、心摘出・ランゲンドルフ灌流心と心筋活動電位を測定できるdi-4-ANEPPSで染色する光工学的手法(Optical mapping analysis : OMP)を用いて、HbVの致死性不整脈抑制作用を検討してきた^{9～11)}。

そこで、臨床治験を想定し、左片肺全摘切除ラット出血性ショックモデルにおけるHbVの蘇生効果および抗不整脈作用をOptical Mapping解析(OMP)・心室性不整脈発生頻度から検討し、左片肺全摘切除ラット出血性ショックモデルにおける催不整脈性の機序について考察した。

1 対 象

1) モデル作成法

Sprague-Dawleyラット(male, 8 weeks old, 250～300 g, $n = 40$)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、右側臥位にて左開胸して、左の肺動脈主幹部を結紮し、左肺を全摘出した。胸腔ドレーン挿入後閉胸し、胸腔内陰圧とした。次いで、femoral arteryを穿刺し、femoral artery catheter(26G Catheter)を留置した。心電図モニター記録と血圧値(直接法による平均血圧 : 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、直後に同catheterから同量の蘇生液をbolus投与した(30%自然動脈出血・直後同量の蘇生液動脈内投与, 4回連続施行した[肺動脈損傷出血性ショックモデル ; 約50%出血性



図2 左片肺全摘除法

ショックモデルに相当], 図1)。

脱血前・左片肺全摘出前に、右頸静脈から右心室または肺動脈にMicro-catheterを挿入し、左片肺全摘術前術後の右室圧/肺動脈圧を記録測定モニターした(MBPと同じ測定方法)。出血性ショックからの蘇生は、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、正常群およびSham群でも各指標を測定した(各群、 $n=8$)。体血圧測定は、蘇生後少なくとも約15分間経過観察した(図1, 2)。

2) OMPと不整脈誘発法およびHbVの抗不整脈効果の検討

本研究は急性実験である。上記蘇生3群およびSham群にて検討した。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_2 [2], NaCl [140], KCl [4.5], dextrose [8], MgCl_2 [1], HEPES [10, pH 7.4], 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。

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(APD)持続時間(ms)をcommercialized software (Ultima-6006: Sei Media, Inc., Tokyo, Japan)にて解析した。

興奮伝搬様式が異常であるか否かの判定には、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、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⁾。

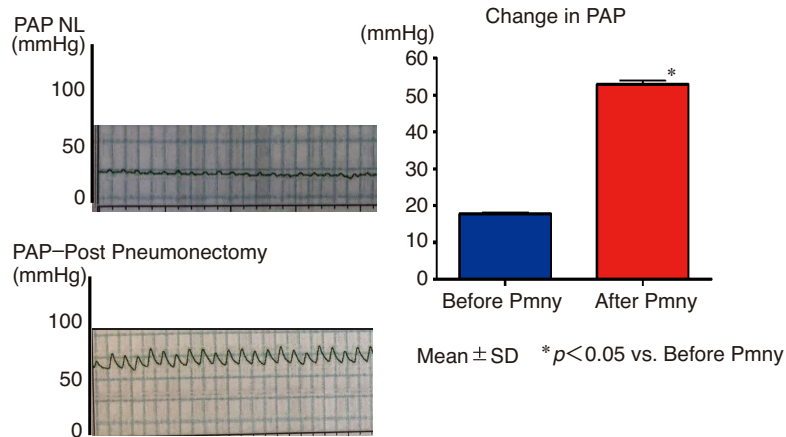


図3 肺動脈圧波形と左片肺全摘切除前後の右室/肺動脈収縮期圧変化

PAP：肺動脈圧，NL：正常群，Pmny：左片肺全摘切除

3) 本研究モデルにおけるHbVの心室性不整脈発生頻度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四肢誘導心電図モニター記録(VIVIDi:GE Healthcare, Japan)とラット心電図モニター装置で測定記録した。心室性不整脈(心室性期外収縮[PVC]・非持続性心室頻拍[NSVT:30秒間以内の心室頻拍])の頻度を測定して各群で比較検討した¹²⁾。

4) 統計学的検討

各群において、興奮伝播時間、APD dispersion値および各心室性不整脈数は平均±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頻度を、異常有りまたは無しの定性的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

左片肺全摘手術の右室圧/肺動脈収縮期圧への影響を図3に示した。肺動脈圧の圧波形と右室圧/肺動脈収縮期圧の変化を示した。右室/肺動脈収縮期圧は左片肺全摘にて 18 ± 2 mmHg

から 52 ± 4 mmHgまで有意に上昇した($p<0.01$)。

蘇生液3群におけるMBPの変化の比較の典型例を図4に示した。4回の自然動脈出血および同蘇生液投与により、HbV群および洗浄赤血球群では、蘇生後のMBPはそれぞれ 125 ± 30 mmHgおよび 128 ± 28 mmHgと正常値に保たれていたものの、5%アルブミン群では 68 ± 20 mmHgまで蘇生後MBPの低下が認められた($p<0.05$, 図4)。

2) OMPと不整脈誘発法における左片肺全摘の影響とHbVの抗不整脈効果

左片肺全摘手術により、右心室・左心室自由壁へのAPD値には延長する傾向は認められるものの、有意の影響はなかった。しかし、右心室の興奮伝播時間は左片肺全摘手術により遅延する傾向が認められ、APD dispersion値は有意に延長した。この所見は、5%アルブミン群、HbV群、洗浄赤血球群、Sham群でも認められた(Table 1)。

5%アルブミン群、HbV群、洗浄赤血球群、Sham群の4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%アルブミン群の左心室で他の3群に比較し延長する傾向が認められたものの、他の3群間で有意差は認められなかった。同様に、右心室のAPD

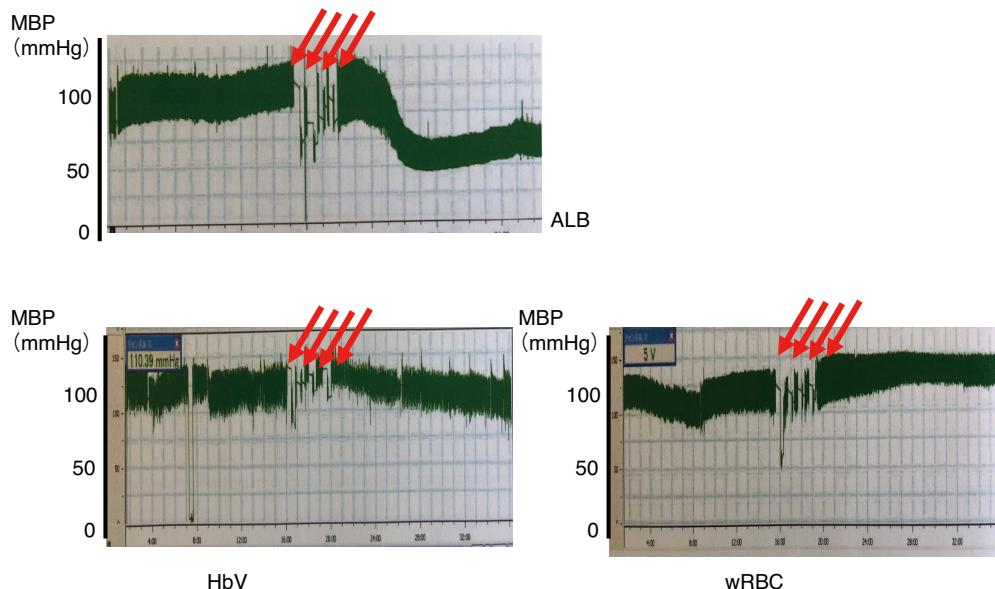


図4 本モデルにおける各蘇生群の平均血圧に及ぼす影響(典型例の提示)

MBP：平均血圧，ALB：5%アルブミン群，HbV：HbV群，wRBC：洗浄赤血球群

矢印は脱血・蘇生を示す。

dispersion 値に関しては，上記4群間で有意差は認められなかった。しかし，左心室のAPD dispersion 値は5%アルブミン群で他の3群に比較し有意に延長していた(**Table 1**)。

図5に5%アルブミン群，HbV群，洗浄赤血球群のAPDの興奮伝搬様式とAPD dispersion 値の典型例を示した。

また，不整脈誘発法におけるHbVの抗不整脈効果の検討では，5%アルブミン群で全例致死性不整脈(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，誘発率は有意に抑制されていた(図6)。

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記録した結果を図7に示した。本実験実施中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%アルブミン群に比較し，有意に抑制されていた。

3 考 察

本研究結果では，左片肺全摘除ラット出血性ショックモデルを作成し，HbVの蘇生効果および抗不整脈作用を，直接法による体血圧の経時的測定とOMP・心室性不整脈発生頻度測定による催不整脈特性・心室性不整脈発生予防効果により検討した。

その結果，本研究により左片肺全摘除ラット出血性ショックモデルで，HbVには洗浄赤血球と同程度の出血性ショック蘇生効果があることが示唆される。また，左片肺全摘除術では，出血性ショックを合併すると，右室圧/肺動脈圧の上昇による右心室圧負荷と出血性ショックによる血行動態破綻による心循環系機能不全により，心室性不整脈が惹起され，致死性不整脈が誘発されと考えられている¹³⁾。HbVには洗浄赤血球と同程度の心室性不整脈発生抑制作用と致死性不整脈誘発抑制作用があると示唆される。

さらに，左片肺全摘除ラット出血性ショックモデルでOMPにてAPD dispersion増加を認

Table 1 Electrophysiological properties obtained by optical mapping system with electrophysiological study in right and left ventricles

Variables	NL group (n = 5)	NL-Pneumo- nectomy group (n = 5)	ALB-Pneumo- nectomy group (n = 5)	HbV-Pneumo- nectomy group (n = 5)	wRBC Pneumo- nectomy group (n = 5)
Condt time in RV (ms)	7.6 ± 2.2	17.9 ± 17.0 [#]	11.5 ± 4.3 [#]	9.4 ± 3.0 [#]	12.8 ± 5.5 [#]
in LV (ms)	5.5 ± 1.5	9.0 ± 4.0	10.5 ± 7.7 [#]	6.6 ± 2.3	5.8 ± 3.8
Condt pattern (% normal pattern; RV/LV)	100/100	0 ^{**} /100	0 ^{**} /0 [*]	0 ^{**} /100	0 ^{**} /100
APD in RV (ms)	18.5 ± 3.5	25.4 ± 8.0	21.0 ± 4.4	20.3 ± 3.1	19.0 ± 3.4
in LV (ms)	18.7 ± 4.8	20.9 ± 4.9	17.9 ± 2.4	17.1 ± 3.0	17.9 ± 1.2
APDd in RV (ms)	11.8 ± 1.9	29.6 ± 14.2 ^{**}	27.3 ± 12.7 ^{**}	28.2 ± 8.6 ^{**}	29.3 ± 12.7 ^{**}
in LV (ms)	11.0 ± 2.8	12.0 ± 4.5	25.0 ± 8.9 [*]	13.9 ± 2.2	11.8 ± 4.2
VT/VF induction (%)	0	100 [*]	0	20	0

NL : normal controls, ALB : 5% albumin, HbV : hemoglobin-vesicles, wRBCs : washed red blood cells, NL-Pneumonectomy group (Sham group), 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 and frequency (%).

* $p < 0.01$ indicates significance compared to normal controls, HbV, and wRBCs groups. ** $p < 0.01$ indicates significance compared to normal controls. # $p < 0.1$ indicates to tend large compared to normal controls

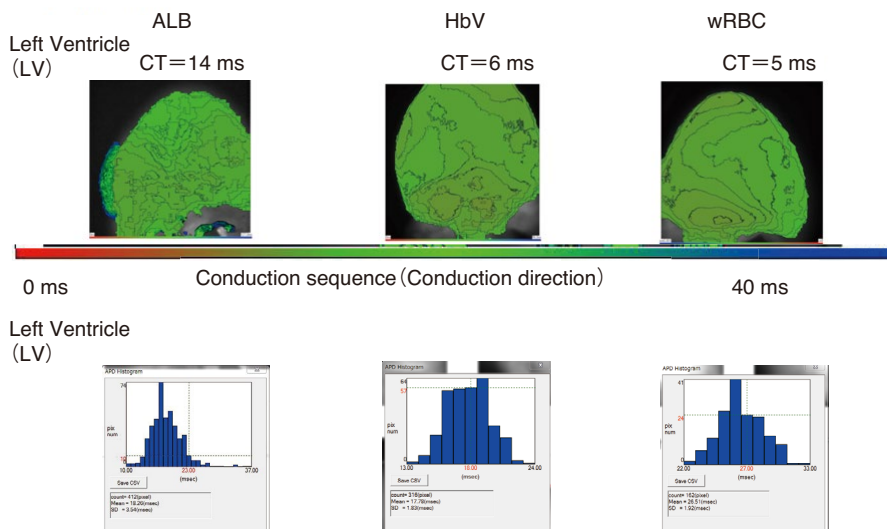


図5 活動電位の伝搬速度と電波様式およびAPD不均一性 (APD dispersion [ms]) の各群での比較
略語は図4と同じ。

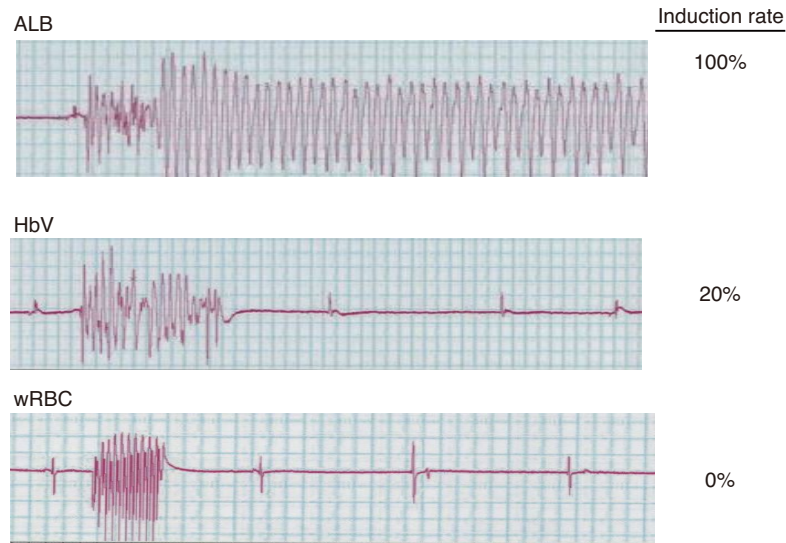
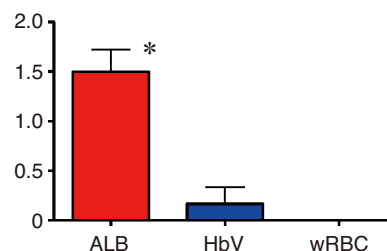
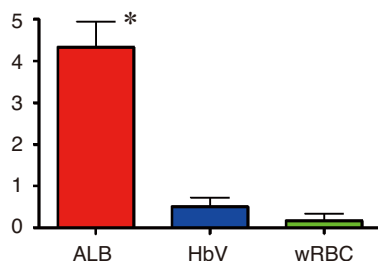
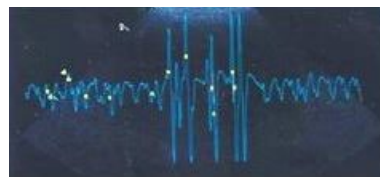
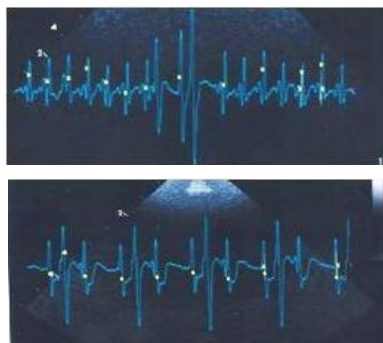


図6 電気生理検査における致死性頻拍性不整脈発生率の比較
略語は図4と同じ。

Premature Ventricular Contractions
(PVC)

None-Sustained Ventricular
Tachycardia (NSVT)



Mean ± SD * $p < 0.05$ ALB vs. the other groups

図7 非誘発性心室性不整脈抑制作用の比較および心電図波形の実例
略語は図4と同じ。

め、出血性ショックにて血行動態が破綻した5%アルブミン蘇生群のみで有意に頻度の高い致死性不整脈誘発・心室性不整脈発生が認められたことから、出血性ショックによる心筋不全、とくに電氣的リモデリングであるAPDの不均一性が、左片肺全摘切除ラット出血性ショックモデルにおける催不整脈性機序の一つであると示唆される^{9~13)}。

本研究結果では、5%アルブミン群に比較し、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(PVC・NSVT)の抑制効果も認められた。これらの結果は、左片肺全摘切除に伴う肺動脈損傷による急性出血・出血性ショックに対しても、HbVを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が確保されることを示唆する。HbVには洗浄赤血球と同等の効率的な救命効果があることが考えられる。

先行研究では、左片肺全摘切除等で惹起される肺高血圧で右心室負荷が起こるとされ、この右心室負荷が致死性不整脈を誘発されやすくと報告されている^{13~17)}。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^{18, 19)}。また、30%出血モデルによる実験的shock heart syndromeでは、HbVには洗浄赤血球と同等の抗不整脈効果があることをわれわれは報告してきた^{11, 12)}。よって、左片肺全摘切除時の肺動脈損傷による出血性ショック時のHbVの抗不整脈効果の機序は、これまでの心筋低酸素状態の改善を介した電気生理学的リモデリングの改善、すなわちAPD dispersion増加抑制で示される心筋再分極異常の予防によると考えられる。また、致死性不整脈の発症のtriggerとなる心室性不整脈の抑制は、HbVの抗出血性ショック作用によると考えられる²⁰⁾。

現在、HbVの臨床第I相臨床試験が終了している³⁾。HbVの臨床試験を推進するうえで、肺外科手術時の出血性ショック等も有効なHbVの適応と考えられ、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であることが示唆される。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Azuma H, 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.
- 4) Ferguson MK, et al. Prediction of major cardiovascular events after lung resection using a modified scoring system. *Ann Thorac Surg* 2014;97: 1135-40.
- 5) McKenna RJ Jr, et al. Video-assisted thoracic surgery lobectomy: experience with 1,100 cases. *Ann Thorac Surg* 2006;81:421-5.
- 6) Kohno M, et al. Acute 40% exchange-transfusion with hemoglobin-vesicles in a mouse pneumonectomy model. *PLoS One* 2017;12:e0178724.
- 7) Nakano K, et al. Using hemoglobin vesicles to treat operative hemorrhagic shock after pneumonectomy in dog models: an experimental study. *Biomed Res* 2024;45:91-101.
- 8) Hashimoto R, et al. Immediate effects of systemic administration of normal and high O₂-affinity haemoglobin vesicles as a transfusion alternative in a rat pneumonectomy model. *BMJ Open Respir Res* 2020;7:e000476.
- 9) Takase B, 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.
- 10) Takase B, 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.
- 11) 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.
 - 12) Takase B, et al. Liposome-Encapsulated Hemoglobin Vesicle Improves Persistent Anti-arrhythmogenesis through Improving Myocardial Electrical Remodeling and Modulating Cardiac Autonomic Activity in a Hemorrhagic Shock-Induced Rat Heart Model. *Curr Med Sci* 2023;43: 232–45.
 - 13) Tanaka Y, et al. Right ventricular electrical remodeling and arrhythmogenic substrate in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:426–36.
 - 14) Bandorski D, et al. Incidence and prognostic significance of malignant arrhythmias during (repetitive) Holter electrocardiograms in patients with pulmonary hypertension. *Front Cardiovasc Med* 2023;10:1084051.
 - 15) Sykora M, et al. Hypertension Induces Pro-arrhythmic Cardiac Connexome Disorders: Protective Effects of Treatment. *Biomolecules*. 2023;13:330.
 - 16) Chowdhury B, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces mortality and prevents progression in experimental pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;524: 50–6.
 - 17) Strauss B, et al. Right predominant electrical remodeling in a pure model of pulmonary hypertension promotes reentrant arrhythmias. *Heart Rhythm* 2022;19:113–24.
 - 18) 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.
 - 19) Sato H, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase on cardiac dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *Shock* 2007;28:291–9.
 - 20) Huikuri HV, et al. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 2001;345:1473–82.