

分担課題：ヘモグロビン小胞体(HbV)の出血性ショックにおける有用性に関する研究

分担研究者 高瀬 凡平 防衛医科大学校 附属病院 集中治療部・准教授
(臨床教育教授)

研究協力者 木下 学 防衛医科大学校・准教授

研究要旨

出血性ショックにより平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生しいわゆる“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈するとされている。しかし、致死性不整脈の発生機序に関する検討は少ない。そこで、実験的に検討した。方法：SD rat (n=32) に30%出血性ショック状態を作成し、非蘇生群、洗浄赤血球(RBC)蘇生群、生理食塩水蘇生群、5%アルブミン蘇生群の4群間で心筋を摘出Tyrode液で灌流後Na⁺ channel 感受性色素を用いたOptical mapping system (OMP)で興奮伝播・活動電位持続時間不均一性(Action potential duration dispersion: APDd) 致死性不整脈性を検討した。また、心筋組織のconnexin 43(Cx43)発現を免疫組織染色にて検討した。蘇生群では、3群とも全例蘇生に成功した。しかし、生理食塩水、5%アルブミン群ではOMPで著明な左心室伝導遅延とburst pacingによる心室細動が全例で誘発されたのに対し、RBC蘇生群では、伝導遅延・心室細動誘発ともに認められなかった。生理食塩水、5%アルブミン群では著明にAPDd値が増大したが、RBC群では正常に保たれていた。Cx43発現は生理食塩水、5%アルブミン群では異常が認められたものの、RBC群では正常に保たれていた。以上より、出血性ショック心臓では、左心室伝導遅延とAPDd増大及びCx43発現異常を惹起し、電気的不安定性から致死性不整脈が誘発されると示唆された。RBC治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。また、このモデルは、HbVの有効性を評価するのに適したものと考えられる。

A. 研究目的

これまでの多くの研究や臨床診療において心筋機能障害や心不全は遷延する出血性ショックに伴って頻繁に認められるとされている。これらは、出血性ショックからの一時的回復後の予後不良及び出血性ショック時の致死性的血行動態破綻に関わる。先行研究によると出血性ショックに伴う心筋虚血や心筋低酸素状態が出血性ショック時の致死性心筋機能障害を惹起すると報告されている。出血性ショックの心臓への致命的障害を回避するために

は、出血性ショックの心臓への致命的障害を回避するためには、出血性ショックからの迅速な回復や心筋への重篤な虚血や低酸素血症を未然に防ぐ有効な治療が必要である。

また、出血性ショック・蘇生は、心筋全体の虚血・再還流である。さらに、平均全身血圧が40mmHg以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生しいわゆる“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈すると報告されている。しかし、“出血性ショック心臓”の蘇生後の致死性

不整脈出現やその病態に関する検討は少ない。そこで、実験的に30%出血性ショック状態を作成し、5%アルブミン、生理食塩水、洗浄赤血球で蘇生した3群で心筋を摘出Tyrode液で灌流後Na⁺ channel感受性色素を用いたOptical mapping systemで興奮伝播・活動電位持続時間不均一性及び致死性不整脈誘発性を検討するとともに、心筋組織の心筋興奮伝導蛋白であるconnexin43発現を免疫組織染色し、非蘇生群を対照群として、出血性ショック心の不整脈発生機序を検討することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

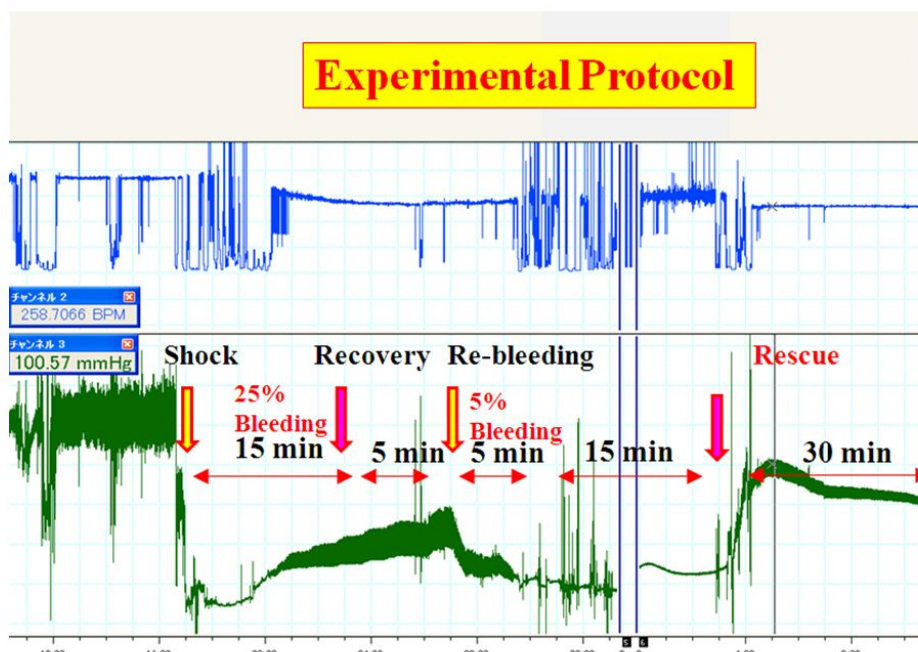
Sprague-Dawley rats (male; 8 weeks old; 250-300 g; n = 32)の皮下にketamine hydrochloride (5 mg/kg)を投与し麻酔した。麻酔下に気管内挿管し、人工呼吸下で、abdominal aorta catheter挿入、血圧測定するとともにabdominal aorta catheterから脱血し、以下のプロトコールで致死性出血性ショックモデルを作成した(図1)。すなわち、循環血液量25%を15分で脱血、5分間放置後再出血モデルとして、5%を5分かけて再脱血(Total 30% blood loss : 不可逆性Shock)を実施した。その後15分間放置したのち、脱

血量と同量 5%アルブミン(5%アルブミン群)、生理食塩水(生理食塩水群)及び 洗浄赤血球(洗浄赤血球群)蘇生した。また、非蘇生群も対照群として作成した(各群、n=8)。

(1) Optical mapping analysis 法と不整脈誘発法

Ratsを麻酔後、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)にて直ちに灌流した。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感受性蛍光色素(di-4-ANEPPS [15 μmol/L])を約40ml、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時間(ms)と伝播様式、得られた活動電位持続時間

図1

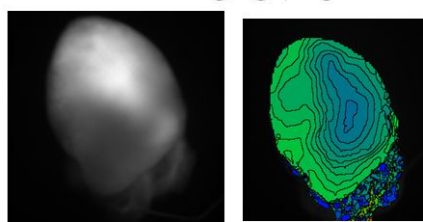
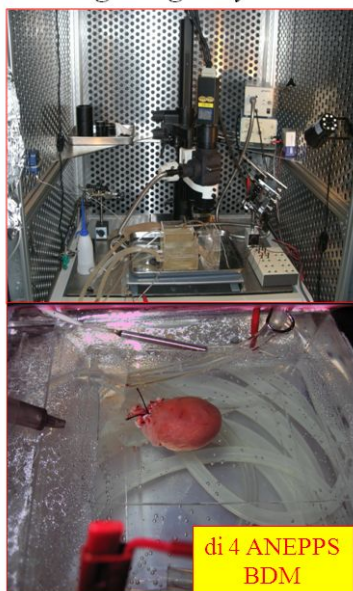


(APD)を commercialized software (Ultima-6006; Sei Media, Inc., Tokyo, Japan)にて解析した(図2)殊に、右心室心膜面の約5x5mmの関心部位(ほぼ右心室自由壁の中央)を任意に設定し、この部位におけるAPDの分布のヒストグラムと、APDの実波形を

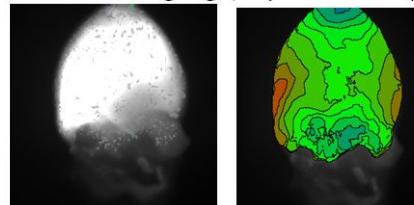
記録した。APDはAPD 60msを使用した。ヒストグラムより、最大APDと最小APDの差からAPD不均一性 (APD dispersion [ms]) を決定し、出血性ショック蘇生後摘出心臓における、経時的APD dispersion変化を比較した(図3)。

図2 Optical Mapping (Activation Map)

Recording images by CCD camera Cardiac Imaging (Right Ventricle)



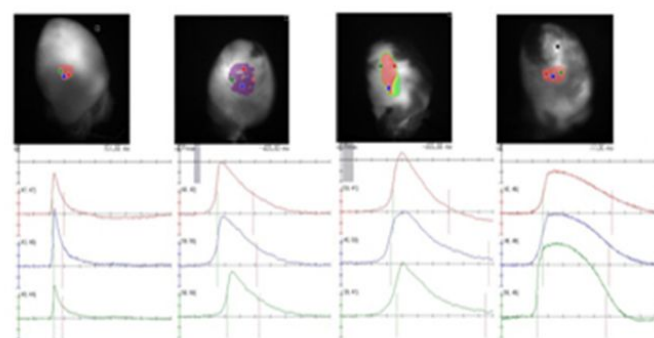
Cardiac Imaging (Left Ventricle)



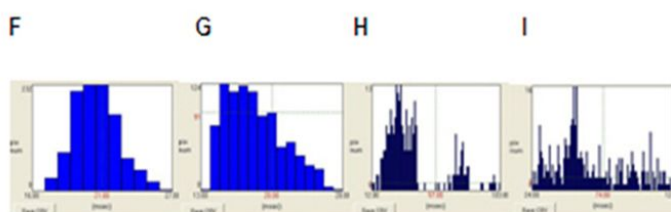
Normal sinus rhythm

Conduction velocity *pattern (Pacing)

図3 Optical Mapping (Measures of Action Potential Duration Dispersion)



Action Potential duration dispersion (APDd)
= Maximum APD - minimum APD



Normal Control

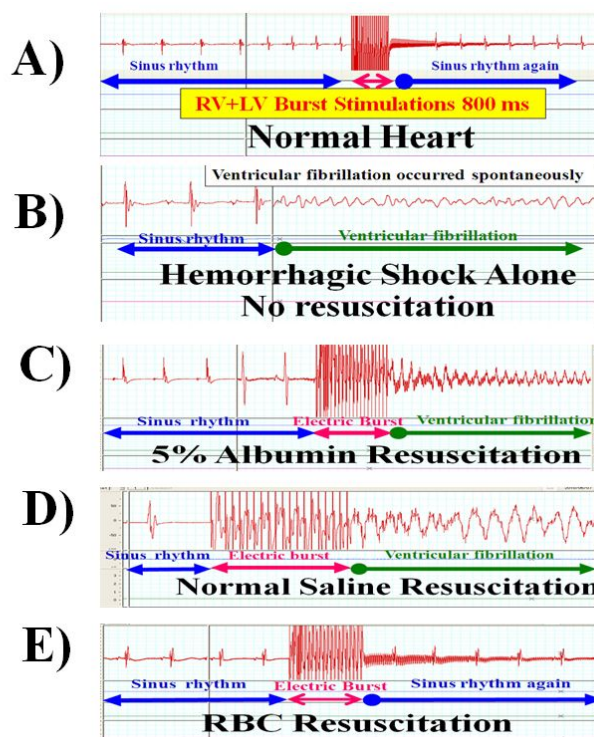
Mild

Moderate

Severe Impairment

図4

Induction of Lethal Arrhythmias by Burst Stimulation to the Ventricles



さらに、催不整脈性を調べるために、右心室・左心室の3箇所、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）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（図4 - A）。

(2) Connexin43に関する免疫組織学的検討

摘出心臓を 4% paraformaldehyde phosphate buffer solution (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) にて48時間固定した。それぞれの標本は、70% ethanolにて脱水しparaffin固定した。組織学的検討では、心筋伝導蛋白であるconnexin43の心筋組織内発現の程度を定性的に評価するため、免疫組織染色を施行した。すなわち、Anti-connexin43 monoclonal antibody (1:2,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を用いて、心筋組織内の心筋 gap-junction 蛋白 connexin 43の発現を検討した。

(3) 統計学的検討

各群において、興奮伝播時間及びAPD dispersionは平均±標準偏差で表した。興奮伝播様式及びconnexin43の発現様式は異常の有無を、異常有りま

たは無しとの定性的2分類でその頻度を検討し、致死性不整脈誘発頻度に関しても誘発の有り無しにつき各個体毎に検討し、その頻度を比較した。群間の比較にはANOVA法にて検定し、Bonferroni post hoc補正を実施した。頻度の検定にはカイ二乗検定を実施した。P<0.05を統計学的に有意とした。

C . 結果

(1) Optical mapping analysis 法による興奮伝播時間・伝播様式及びAPD不均一性と不整脈誘発の結果

非蘇生群では全例Ratsは心室細動または徐脈性不整脈を惹起し、その後心停止を来した（図4 - B）。他の3群では、各蘇生液により全Rats血行動態はショック状態から蘇生された。これら3群のRatsから摘出された心臓の興奮伝播時間・伝播様式をOptical mapping systemにて検討した結果を図5に示した。

正常Ratsの洞調律における左心室の興奮伝播時間は $24 \pm 1\text{ms}$ であり、伝播様式は図2に示したpatternであった。一方、5%アルブミン群及び生理食塩水群では、ショック状態から蘇生されたにもかかわらず、興奮伝播時間はそれぞれ、 $35 \pm 3\text{ms}$

図5

Comparison of Activation Map

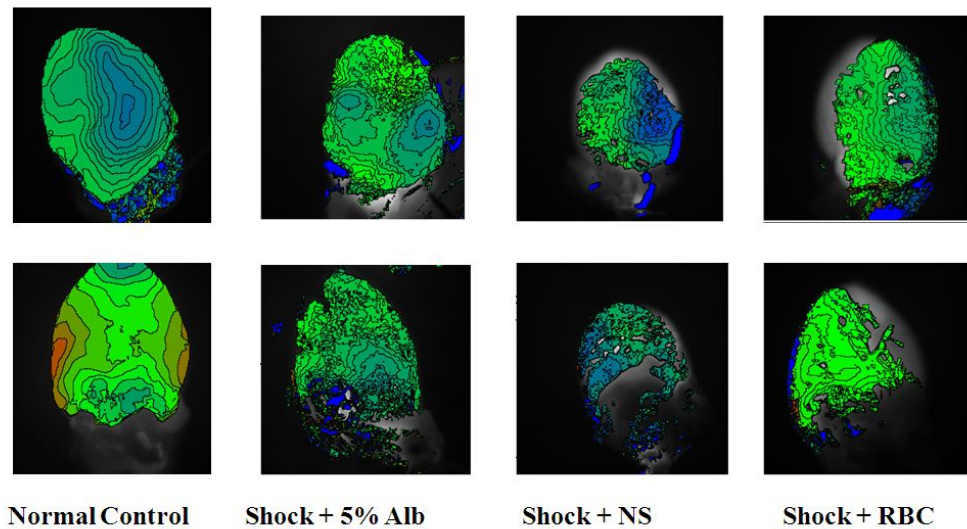
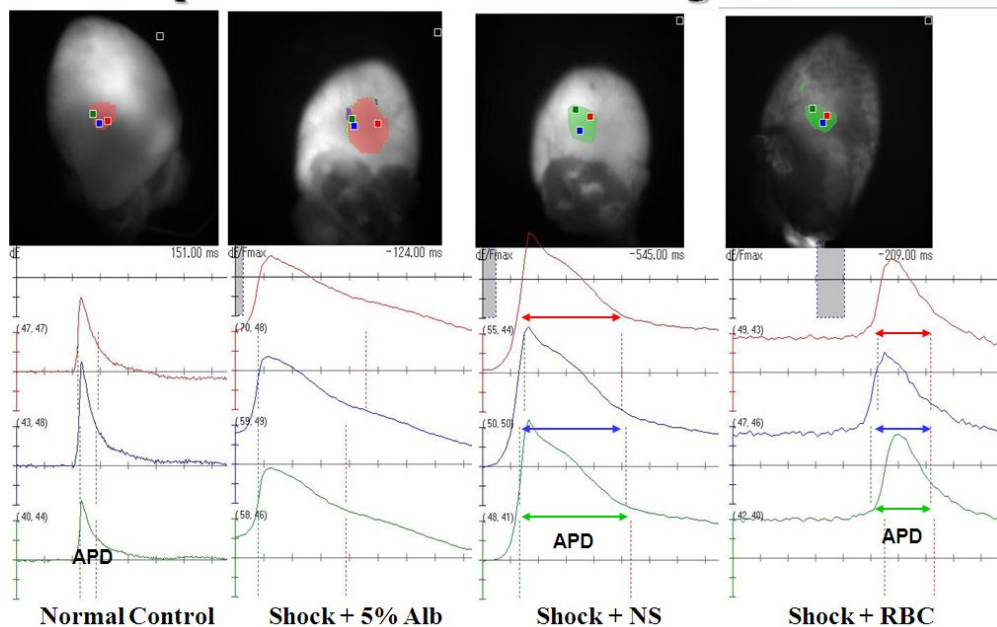


図6 Comparison of Action Potential Duration Dispersion after Hemorrhagic Shock



及び $39 \pm 3\text{ms}$ とそれぞれ有意かつ著明に延長しており、伝播様式の明らかに正常patternと異なっていた(図5)。しかし、洗浄赤血球群で蘇生したRatsでは、全Rats正常興奮伝播時間($22 \pm 3\text{ms}$)であり、かつ、正常伝播様式であることが認められた。さらにAPD dispersionは、洗浄赤血球群で全Rats、図3で示したnormal controlと差を認めず (normal

control vs. 洗浄赤血球群; $14 \pm 2\text{ms}$ vs. $13 \pm 3\text{ms}$, NS) なかったのに対し、5%アルブミン群及び生理食塩水群では、全Ratsで、図3で示したmoderateまたはsevere impairment patternを示し、APD dispersionはそれぞれ $34 \pm 27\text{ms}$ 及び $38 \pm 9\text{ms}$ と有意 ($P < 0.05$) かつ著明に延長していた。また、活動電位持続時間そのものも正常Rats、洗浄赤血球群に比較し、5%

アルブミン群及び生理食塩水群では著明に延長していることが認められた (図6)。

致死性不整脈の誘発性の検討では、正常Ratsの摘出心臓では通常不整脈が誘発されない両心室へのburst pacing (図4 - A) にて、5%アルブミン群及び生理食塩水群蘇生群Ratsでは全Ratsで致死性心室性不整脈 (心室細動・心室頻拍) が容易に誘発された (図4 - C、D)。しかし、洗浄赤血球群蘇生群Ratsでは、正常Ratsと同様に致死性不整脈は誘発されなかった (図4 - E)。

(2) 心筋におけるconnexin43の発現 (免疫組織学的検討)

左心室におけるconnexin43の発現を免疫組織学的に検討した。図7に示した如く、視覚的定性的にconnexin43発現量・発現様式の異常の有無を検討した。その結果、正常Rats左心室心筋におけるconnexin43の正常発現量・発現様式に比較し、5%アルブミン群及び生理食塩水群では明らかにconnexin43の発現量・発現様式は異常であり、洗浄

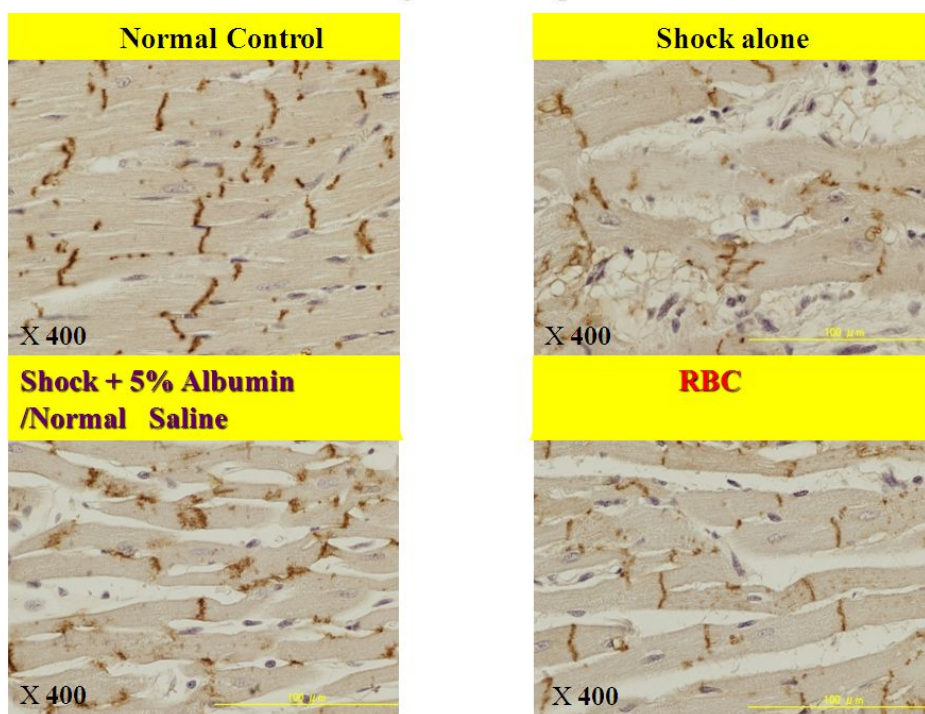
赤血球群では正常に保たれていた。

D. 考察

今回の実験研究は、“出血性ショック心臓”において、洗浄赤血球蘇生が致死性不整脈誘発の抑制効果があり、その機序として心筋興奮伝播時間と伝播様式・活動電位持続時間の均一性・心筋Gap junctionの伝導蛋白connexin43等を正常に保つ作用が貢献している可能性があることが示唆された。

本研究では、非蘇生群が全Rats死亡する致死性再出血による血性ショックモデル (30%脱血) を用いた、いわゆる“出血性ショック心臓”において、通常臨床現場で用いられる5%アルブミン蘇生群、生理食塩水蘇生群及び洗浄赤血球蘇生群における致死性不整脈の誘発頻度やその機序を摘出心臓に対するOptical mapping systemとburst pacingによる致死性不整脈誘発法で検討した。その結果、5%アルブミン群及び生理食塩水群では血行動態は正常に復し、蘇生に成功したものの、摘出心臓におけるOptical mapping systemでは興奮伝播異常・再分極

図7 Findings of Immunohistochemistry
Connexin43: Gap junction protein in the LV



不均一性を示すAPD dispersion増加が認められ、かつ、不整脈の発生機序に係る心筋Gap junctionの伝導蛋白connexin43の発現低下が認められるとともに、致死性不整脈の誘発の頻度が増加していた。これらの異常変化は、洗浄赤血球蘇生群では認められなかった。

これまでの報告では、急性血性ショックに伴い、侵襲の大きさに伴った心筋障害が惹起され、血性ショック早期の死亡率に関与しているとされている。これらの心筋障害には、血流の低下及び貧血による心筋虚血そのものの影響に加え、“出血性ショック心臓”に固有の2次的血流障害や代謝異常が関与する可能性を示唆する報告もある。従って、“出血性ショック心臓”では、単に5%アルブミンや生理食塩水による蘇生では、その回復は不十分と考えられる。洗浄赤血球治療群で、致死性不整脈やその病因となるOptical mapping system解析指標、心筋Gap junctionの伝導蛋白connexin43の発現が保たれた。このことは、血性ショック治療において、血行動態の改善のみならず、貧血を改善することにより“出血性ショック心臓”の心筋組織に充分は酸素供給を行うことが重要と考えられる。

本研究を、臨床現場における“出血性ショック心臓”の治療に直結させるには充分とはいえないものの、血性ショック後に遷延する血行動態の不安定性や心不全・致死性不整脈の発生予防に、充分な酸素運搬作用が治療上重要であることを示唆する結果と考えられた。

E . 結論

出血性ショック心臓では、左心室伝導遅延とAPDd増大及びCx43発現異常を惹起し、電気的不安定性から致死性不整脈が誘発されると示唆された。RBC治療はこれら指標の保持と予防効果を有した。このモデルは、HbVの有効性を評価するのに適したものと考えられる。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究業績

(原著論文)

1. Tanaka Y, Takase B, Yao T, Ishihara M. Right ventricular electrical remodeling and arrhythmogenic substrate in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49:426-36.
2. 高瀬凡平、東村悠子、木村一生、田中良弘、服部秀美、石原雅之. 出血性ショック心臓における致死性不整脈の機序に関する実験的検討. *Therapeutic Research* 2013;34:1060- 1066.

(学会発表)

1. Takase B, Tanaka Y. Myocardial Electrical Remodeling and Arrhythmogenic Substrate in Hemorrhagic Shock-Induced Heart. (American Heart Association Annual Scientific Session 2013, Dallas US A 2013/11/15-20)
2. Takase B, Tanaka Y, Ishihara M. Pressure overload causes right ventricular lethal arrhythmias: analysis by optical mapping in pulmonary artery banding and pneumonectomy model. (American Heart Association Annual Scientific Session 2013, Dallas US A 2013/11/15-20)
3. Takase B, Tanaka Y, Higshimura Y, Hattori H, Ishihara M. Significant role of action potential duration dispersion and connexin 43 in lethal arrhythmogenesis in hemorrhagic shock heart. (第28回日本不整脈学会学術大会, Tokyo 2013/7/4-6)
4. 高瀬凡平、東村悠子、田中良弘、木下 学. 出血性ショック心臓における致死性不整脈発生機

序及び人工酸素運搬体による治療効果に関する検討. 第20回日本血液代替物学会年次大会. 奈良県新公会堂. 2013年12月6-7日.

H . 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
該当なし。