

実践報告

看護学生による心筋梗塞モデルマウスを用いた 超音波検査法の手技に関する評価

Evaluation of Measurement by Echography using Myocardial Infarcted Mouse: Trail by nursing student

荻野千菜美¹⁾ 千葉由美²⁾ 峯岸慎太郎³⁾ 石上友章⁴⁾

Chinami Ogino Yumi Chiba Shintaro Minegishi Tomoaki Ishigami

キーワード: 心筋梗塞、モデルマウス、超音波検査法、評価、手技

key Words : myocardial infarction, model mouse, echography, evaluation, measurement

はじめに

心筋梗塞(MI)モデルマウスの実験において、超音波検査法(エコー)は、最も重要かつ不可欠な評価の一つである。本研究の目的は、検者が看護学生の初学者の場合のエコーを用いた手技の評価について検討することである。

方法

Sham群とMI群で各3匹のC57BL/6の12週齢雄マウスを用いた。研究期間は、2017年4月から12月であった。エコー評価手技については、事前に専門医よりインストラクションを受けた。そして、検者は、IVSTd、IVSTs、LVIDd、LVIDs、LVPWTd、LVPWTs、EDV、ESV、EF、FSの測定を行うためにエコーを実施した。さらに、エコー評価によりSham群とMI群の振り分けを行った。この本研究は、横浜市立大学の動物実験委員会にて承認を受けた。

結果

検者はエコー評価よりSham群とMI群を振り分けることができた。MI作製の施術前後の平均体重については、Sham群で順に25.27±0.55g、24.77±1.16gとなっており、MI群では23.97±1.59g、23.67±0.90gであった。心筋梗塞は、心臓を廓清後のMasson's trichrome染色によりSham群とMI群の2群の振り分けを行った。施術前後のEFの平均値は、Sham群で73.9±1.7%、75.5±4.4%となっており、MI群では73.5±2.2%、53.2±1.2%となっていた。検者は、これらの群間の違いを検出することができた。EF以外の他の項目における計測値の信頼性や安定性に関しては、先行論文の値を参照した場合、測定値にいくつかの逸脱した値が観察された。

【Abstract】

Purpose

In the experiment of a mouse with myocardial infarction (MI), echography (Echo) is one of the most important and essential evaluations. The purpose of this study was to consider the evaluation of training about Echo for the nursing student beginner as an experimenter.

Methods

We used three C57BL/6, 12 weeks male mice each in the sham group and in MI group. The duration of the study was from April to December 2017. The skill of Echo evaluation was instructed by a medical doctor in advance. And the experimenter conducted Echo to calculate IVSTd, IVSTs, LVIDd, LVIDs, LVPWTd, LVPWTs, EDV, ESV, EF, and FS before and after the operation, and additionally tried to select to Sham and MI group. This study was approved by the animal ethical board in Yokohama City University.

Received: October. 31, 2018

Accepted: March. 11, 2019

1) 横浜市立市民病院

2) 横浜市立大学大学院医学研究科看護学専攻がん・先端成人看護学

3) Cardiovascular and Metabolic Disorders, Duke-NUS Medical School

4) 横浜市立大学医学部循環器・腎臓・高血圧内科学教室

Results

The experimenter could select Sham and MI group exactly. Average weight before and after the making MI operation was 25.27 ± 0.55 g and 24.77 ± 1.16 g in Sham Group, and 23.97 ± 1.59 g and 23.67 ± 0.90 g in MI Group respectively. Heart ischemia was observed among the mice of MI group by Masson's trichrome staining after isolated heart. Average value of EF before and after the operation was $73.9 \pm 1.7\%$ and $75.5 \pm 4.4\%$ in Sham Group, and $73.5 \pm 2.2\%$ and $53.2 \pm 1.2\%$ in MI Group. The experimenter could search the differences between these groups. Regarding reliability and stability of measuring values in other items except for EF, some deviated values were observed for measurement scores when referring to values in the prior papers.

I. はじめに

心疾患は日本における死因の第2位で、平成28年の年間総死亡数は急性心筋梗塞が35,926人であった(厚生労働省, 2016)。また、心筋梗塞の推計罹患状況は、平成26年患者調査で総患者数7万5千人と報告されている(厚生労働省, 2014)。現在、急性心筋梗塞に対しては、血栓溶解療法や経皮的冠動脈形成術(percutaneous transluminal coronary angioplasty: PTCA)といった閉塞した血管を開通させる再灌流法が主流であり、血栓溶解薬として組織型プラスミノゲンアクチベーター(tissue-plasminogen activator: t-PA)等も使用された標準的治療が行われている(木村ら, 2013)。近年では、新たな治療法として、自己の筋芽細胞や骨髄由来の細胞、心筋幹細胞を用いた細胞移植治療法が臨床応用されているほか(清水, 2016)、iPS由来細胞シートを用いて心筋再生を促す新治療の開発も進められており、その進歩は著しい(澤, 2016)。

臨床では罹患患者への円滑な治療と同時に、患者の日常生活レベルの早期回復を促すために、多職種協働により心機能向上を目的とした安全、かつ効果効率的なベッドサイドアプローチや心臓リハビリテーション等が必要不可欠である(Antman, et al., 2004; Smith, et al., 2011; 木村ら, 2013; Dane, et al., 2014)。これら患者の全身機能を把握したり、医療介入に対する身体的効果や反応を測定・評価したりするための諸検査の値は臨床判断の重要な指標となる(木村ら, 2013)。中でも心臓超音波検査法(以下、心エコー)は、局所壁運動異常や左室収縮・拡張機能を経時的に把握することが可能な検査法であり、非侵襲的に実施でき、局所壁運動異常による急性心筋梗塞の診断率は90%を超える等の有用性が示されている(木村ら, 2013; 坂田, 2017)。

心疾患の罹患患者数はいまだに多く、新たな治療開発や分子レベルのメカニズム解明等のために、ヒトへの臨床応用を目的としたトランスレーショナルリサーチが進められている。心筋梗塞モデルマウスを用いた実験研究も数多く行われており、近年では、運動や栄養等に関連した看護支援にも応用しうる研究が散見されるようになってきているが、看護領域での研究は国内外ともに殆ど見られない。心筋梗塞そのものは生体に侵襲的であり、心筋梗塞モデルを用い一定の条件下で比較検討することは、新たな医療介入の安全性や新たな知見を得ることにつながることから、看護領域でもヒト対象では困難な研究方法として実施が可能である。

動物実験において心エコーは、心機能の経時的評価として

用いられている(菅野ら, 2013)。心エコーは、臨床及び動物を用いた実験研究の場で幅広く使用される検査法であるが、後者においては、医師以外にも看護職などといった資格上の規制を受けず実施することが可能な評価法であるとともに、心臓関連の機能評価のために必要不可欠な汎用性のある検査法の一つである。

実際の心エコーの評価手技については、看護学の基礎教育において学ぶ機会はないが、学部で実施する動物実験において使用可能なツールである。動物実験においても心エコーによる機能評価は、即時性が高く、繰り返し施行でき(菅野ら, 2013)、数値化することで経時変化等を探索し、心臓の状態を客観的数値として把握することができる。しかしながら、心エコーは手技によって画像のクリアさ等の質の違いがあるといわれており、適切に手技を実施することで、最終的に適切な測定値を得ることに繋がる。つまり、動物実験において心エコーは看護学生にも実施可能な技術といえるが、評価未経験者が初めて動物実験に携わる場面では、できるだけ適切なデータが収集できるよう心エコーの手技を修得する場が必要となる。

そこで、本研究では、看護学生が動物実験で利用可能な心エコーを、初学者として技術修得するための方法論を探索することを目的に検討した。

II. 方法

1. 対象

動物は、C57BL/6雄12週齢マウス合計6匹を使用し、Sham(擬似)群3匹と心筋梗塞(Myocardial infarction: 以下MI)モデルマウス群(以下、MI群)3匹の2群に分けた。C57BL/6マウスは、The Jackson Laboratory(米国ジャクソン研究所)から2002年に日本チャールズ・リバー株式会社に導入された近交系実験動物である。腫瘍発生が低率でヒトの疾患モデルとして最も広く使用される。遺伝子的なバックグラウンドが揃えられ個体差が少ない特徴がある。

2. 研究期間

研究期間は、2017年4月～12月であった。

3. 方法

1) 心エコーによる評価

心エコーは、初めて経験する看護学生4年次生1名が実施した。心エコーによる実際の測定は、Sham群、MI群ともに、MI作製の施術1日前(以後1時点目)、MI施術1週後(以後2時点目)の2定点で測定した。マウス1匹の測定回数は、インストラクションで教示された最低4回以上とした。使用機器は、

TOSHIBA Aplio Model SSA-700A で、具体的な心エコー測定法は、下記の通り手順を踏んだ。

(1) 専門医によるインストラクション

心エコーの測定法は、同大学内の日本循環器学会認定循環器専門医の資格を有し、過去にマウスを対象とした心エコーを実施したことのある医師よりインストラクションを受けた。インストラクションの具体的な内容は、下記の通りである。

- ①同一実験において同一検者が評価を実施する(検者によって微妙な手技の違いがあり、測定値が変わるため)。
- ②プローブの持ち方、ならびにあて方:プローブは鉛筆を握るように持ち、ゼリーをプローブに十分つけて、脱毛したマウスの胸部に圧迫しすぎないように密着してあてる。プローブは、手首を用い操作する。画像は左室長軸断面像を捉えた後、内径が最大になるよう位置をおおよそ決める。その際のポイントとして、卵の白身が黄身を覆うような画像となるようにする。その後、Mモードに切り替え、上部と下部の壁の動きが上下でそろるようにする。これらがずれている場合には、異なる方向からプローブを当てている可能性があるためプローブのあて方を修正する。
- ③麻酔が効いてくると心拍数が低下するため、麻酔量と心拍数をモニタリングし、心拍が低下気味になってきたら、麻酔量を調整する。
- ④Mモードにおける測定のためのプロットは、検者自身のルールを明確にし、終始、それらを遵守する。
- ⑤論文投稿した際、元データ等が求められることがあるので、毎回きちんと測定する。

検者が試行し、その改善点等の指導を受け、確実に施行できたことの確認を得た。

(2) 検者による評価

本実験は、以下の方法で測定を実施した。

- ①マウスの体重測定を行う。
- ②マウスを麻酔用の簡易容器に入れ、イソフルラン麻酔薬にて濃度 4.0% (200ml/min) から吸入開始し、30 秒ごとに 3.5%、3.0%、2.5%、2.0% (2.0%は最終 30 秒を維持) と減量する。
- ③麻酔がかかったことを確認し、マウスを処置台に固定する。この時、鼻マスクにて 1.0-1.5%イソフルランを 200ml/min で吸入維持する。また固定の際は、体幹を正中維持しながら、四肢を大の字に広げ、テープで固定した。
- ④開始前に、胸部を除毛した。
- ⑤1.0-1.5%でイソフルランを鼻マスクにて吸入し、睡眠を維持しながら測定を行った。画像は左室長軸断面像とし、測定値は Mモード画面から得た。なお、心拍数は 450-550/min を維持し、適宜、麻酔濃度を調整しながら実施した。
- ⑥心エコーが終了したら、37 度に設定した Neo-Hotplate H1-1000 の上で、マウスの覚醒を待ち、耳標をつけ、ケージに戻した。

測定内容は、IVSTd、IVSTs、LVIDd、LVIDs、LVPWTd、

【略語一覧】

IVSTd: intraventricular septal thickness in diastole (心室中隔拡張壁厚)
 IVSTs: intraventricular septal thickness in systole (心室中隔収縮壁厚)
 LVIDd: left ventricle internal diameter in diastole (左室拡張末期径)
 LVIDs: left ventricle internal diameter in systole (左室収縮末期径)
 LVPWTd: left ventricular posterior wall thickness in diastole (左室拡張後壁厚)
 LVPWTs: left ventricular posterior wall thickness in systole (左室収縮後壁厚)
 EF: ejection fraction (左室駆出率)
 FS: fractional shortening (左室内径短縮率)

LVPWTs の 6 項目で、さらに EF、FS については、Cubed 法を用いて求めた。EDV、ESV、EF、FS の計算式は、以下の通りである。

EDV 左室拡張終期容量 (Cubed 法) = LVIDd³

ESV 左室収縮末期容量 (Cubed 法) = LVIDs³

EF = (EDV - ESV) / EDV

FS = (LVIDd - LVIDs) / LVIDd × 100

また、検者は、2 回の測定ともに、どのマウスが Sham 群か MI 群かについてわからない状態で心エコーによる評価を行った。

2) 心筋梗塞モデルマウスの作製法

MI マウスは、有識者(心筋梗塞モデルマウスを作製し実験研究を行っている看護領域の研究者)が 3 匹をランダムに選び、MI の施術を行った (Tarnavski, et al., 2004)。検者も施術のアシストを行ったが、マウスを特定できる行為は行わなかった。以下、その手順を示す。

- ①マウスの体重測定を行う。
- ②マウスを麻酔用の簡易容器に入れ、イソフルラン麻酔薬にて濃度 4.0% (200ml/min) から吸入開始し、30 秒ごとに 3.5%、3.0%、2.5%、2.0% と減量する。
- ③マウスを処置台に固定し、覚醒前にサーフロー留置針の外筒を気管挿管する。挿管時、声帯を傷つけないよう留意するとともに呼吸状態を確認する。
- ④麻酔は 1.0-1.5%/min で気化器 (Univentor400 Anaesthesia Unit) による管理を行うとともに、人工呼吸器 (シナノ製 SN-480-7) にて呼吸の同期、疼痛反射の消失を確認する。
- ⑤開胸時は、開胸器を用いて第 3-4 肋間を開き、その後、実体顕微鏡下にて 7-0 プロリン糸にて 1 針で左心耳より約 1.5mm の左前下行枝 (Left Anterior Descending coronary artery: 以下 LAD とする) を結紮し、MI を作製した。また Sham 群では、針貫通による心筋へのダメージや癒着といった外科的侵襲の条件を MI 群と同様にするために、開胸後、MI 作製時に用いた同じサイズの糸つき針にて LAD を傷つけないよう心筋への貫通のみを行った。
- ⑥閉胸の際は、肋間を 5-0 プロリン糸で 1 針の結紮にて閉鎖後、皮膚も 5-0 プロリン糸にて 3 針で等間隔に結紮した。麻酔を Off にして、自発呼吸、覚醒の確認後、人工呼吸器を外し、抜管した。
- ⑦37 度に設定した Neo-Hotplate H1-1000 の上で保温しながら、十分に覚醒したことを確認し、ケージに戻した。

3) 廓清心による心筋梗塞の有無の確認

2時点目の心エコー測定後に、開胸して心臓を廓清し、結紮部位と心筋梗塞の状態を肉眼的に確認した。

さらに、取り出した心臓は、ホルマリン、アルコール固定後、パラフィン包埋、組織薄切片を作製し、Masson's trichrome 染色で繊維化の有無を確認した。

4) 分析方法

取得した心エコーのデータをエクセルに入力し、今回は、IVSTd、IVSTs、LVIDd、LVIDs、LVPWTd、LVPWTs の 6 項目について標本の平均値と標準偏差を求めた。これらの平均値が、先行文献の指標値 (Tanaka, et al:1996;菅野ら, 2013: Minegishi, et al:) として示された IVSTd 0.70 ± 0.10 、LVIDd 3.73 ± 0.50 、LVIDs 2.22 ± 0.45 、LVPWTd 0.71 ± 0.08 (Tanaka, et al:1996)、IVSTd 0.82 ± 0.02 、IVSTs 1.21 ± 0.03 、LVIDd 4.28 ± 0.07 、LVIDs 3.00 ± 0.08 、LVPWTd 0.73 ± 0.02 、LVPWTs 0.92 ± 0.02 (Minegishi, et al:2017) の範囲、あるいは手技の誤差範囲 (LVPWTs) であることが確認できた。マウス 1 匹あたりの平均値から近い測定値を測定1時点目、2時点目ともに各群 1 匹あたり 3 回分合計 9 回分の測定値を選択した。これらの手続きを踏んだ理由として、検者が一人で行った観測値を整理することで、検者の実施したデータから著しく逸脱した測定値を把握したり、今回、インストラクションを行った専門医の指示によるプロトコールに従ったよりばらつきが少なく安定し信頼できるデータを採用し、今回の分析の基準とするためである。

その後、Sham 群、MI 群それぞれについての 1 時点目全 9 回分の標本平均値を 2 時点目の全 9 回分の標本平均値と比較し、各マウスの 3 回の測定値において、不適となる可能性のある測定値を推察し、採用しうる測定値の割合をもって手技の適切性を検討した。Sham 群と MI 群を振り分けは、検者の測定値を踏まえ行い、実際の心筋梗塞の有無について2時点目の測定後の心臓廓清時に肉眼的観察を行うとともに、切片により定性的に確認した。

本研究は、横浜市立大学動物実験委員会にて承認を得た課題の一部として実施した (承認番号 F-A-15-044)。

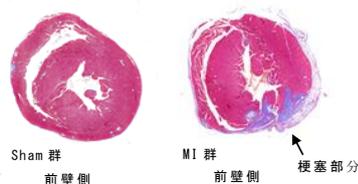


写真 心筋梗塞の有無の確認例 (Masson's trichrome 染色)

III. 結果

1. 心筋梗塞の有無の確認

検者が心エコーを実施した6匹のマウスについて、心エコーの1時点目と2時点目の測定値の変動から、変動の見られなかったマウスを Sham 群、2時点目に心機能の低下が認められたマウスを MI 群に振り分け、さらにこれらの組織薄切片を作製し、Masson's trichrome 染色で繊維化の有無を確認し、繊維化のないものを Sham 群、繊維化の見られたものを MI 群として特定し、検者が測定値によって振り分けた2群のマウスが正しく選別出来ていたことが確認された。

1時点目	測定値	IVSTd (mm)	IVSTs (mm)	LVIDd (mm)	LVIDs (mm)	LVPWTd (mm)	LVPWTs (mm)	EF (%)	FS (%)
		Sham-1	1 0.58 2 0.79 3 0.63 m±SD 0.67 ± 0.11	1.21 1.26 1.26 1.24 ± 0.03	4.00 3.89 3.63 3.84 ± 0.19	2.63 2.53 2.11 2.42 ± 0.28	0.63 0.68 0.58 0.63 ± 0.05	1.00 1.00 1.16 1.05 ± 0.09	71.9 72.9 81.3 75.4 ± 5.16
Sham-2	1 0.74 2 0.84 3 0.74 m±SD 0.77 ± 0.06	1.21 1.11 1.21 1.18 ± 0.06	4.42 4.05 4.00 4.05 ± 0.08	2.58 2.58 2.68 2.61 ± 0.06	0.47 0.53 0.84 0.82 ± 0.20	0.74 1.11 1.21 1.32 ± 0.06	76.4 74.2 70.3 73.6 ± 3.09	38.0 36.3 33.0 35.6 ± 2.54	
Sham-3	1 0.68 2 0.63 3 0.63 m±SD 0.65 ± 0.03	1.21 1.16 1.05 1.14 ± 0.08	3.74 3.95 3.84 3.84 ± 0.11	2.32 2.53 2.53 2.46 ± 0.12	0.95 0.79 0.74 0.83 ± 0.11	1.42 1.21 1.21 1.28 ± 0.12	76.9 74.2 71.9 74.3 ± 2.50	38.0 35.9 34.1 36.0 ± 1.95	
MI-1	1 0.63 2 0.63 3 0.74 m±SD 0.67 ± 0.06	1.11 0.79 1.00 0.97 ± 0.16	4.42 4.53 4.32 4.42 ± 0.11	2.41 3.58 3.22 3.44 ± 0.13	0.74 0.63 0.68 0.68 ± 0.06	0.89 0.89 1.16 0.98 ± 0.16	72.7 76.6 78.0 75.8 ± 2.75	35.1 38.2 39.1 37.5 ± 2.10	
MI-2	1 0.53 2 0.63 3 0.58 m±SD 0.58 ± 0.05	1.00 1.37 1.16 1.18 ± 0.19	4.00 4.11 3.84 3.88 ± 0.14	2.74 2.58 2.42 2.56 ± 0.19	0.58 0.47 0.63 0.56 ± 0.08	0.89 0.95 0.63 1.02 ± 0.17	67.2 75.4 71.2 73.3 ± 5.33	31.5 37.2 38.3 35.7 ± 3.65	
MI-3	1 0.58 2 0.58 3 0.63 m±SD 0.59 ± 0.03	1.16 1.11 1.16 1.14 ± 0.03	3.53 4.05 3.89 3.82 ± 0.27	2.05 2.53 2.42 2.64 ± 0.41	0.74 0.63 0.68 0.67 ± 0.12	1.21 1.11 1.26 1.12 ± 0.15	79.5 75.8 76.3 74.9 ± 3.41	41.9 37.5 37.8 36.8 ± 2.78	
全体	m±SD 0.66 ± 0.08	1.14 ± 0.13	4.00 ± 0.26	2.64 ± 0.41	0.67 ± 0.12	1.12 ± 0.15	74.9 ± 3.41	36.8 ± 2.78	
2時点目	測定値	IVSTd (mm)	IVSTs (mm)	LVIDd (mm)	LVIDs (mm)	LVPWTd (mm)	LVPWTs (mm)	EF (%)	FS (%)
		Sham-1	1 0.53 2 0.74 3 0.68 m±SD 0.65 ± 0.11	1.05 1.21 1.37 1.26 ± 0.16	4.37 3.84 3.95 3.95 ± 0.28	2.89 2.53 2.42 2.61 ± 0.25	0.79 0.89 0.79 0.82 ± 0.06	1.26 1.32 1.37 1.32 ± 0.06	71.1 71.9 77.4 73.5 ± 3.43
Sham-2	1 0.58 2 0.68 3 0.68 m±SD 0.65 ± 0.06	1.26 1.16 1.05 1.16 ± 0.11	3.84 3.58 3.79 3.74 ± 0.14	2.63 2.16 2.53 2.44 ± 0.25	0.84 0.68 0.74 0.75 ± 0.08	1.16 1.26 1.16 1.19 ± 0.06	68.4 78.3 70.4 72.4 ± 5.23	31.5 39.7 33.2 34.8 ± 4.33	
Sham-3	1 0.63 2 0.63 3 0.74 m±SD 0.68 ± 0.06	1.26 1.26 1.37 1.33 ± 0.06	3.84 3.94 3.47 3.61 ± 0.20	2.32 2.32 1.95 2.12 ± 0.19	0.58 0.58 0.74 0.70 ± 0.11	1.00 1.00 1.37 1.19 ± 0.19	78.9 78.9 83.3 80.6 ± 2.39	39.6 43.8 43.2 41.2 ± 2.27	
MI-1	1 0.53 2 0.79 3 0.68 m±SD 0.67 ± 0.13	1.00 1.26 1.16 1.14 ± 0.13	4.63 4.79 4.58 4.67 ± 0.11	3.53 3.74 3.63 3.63 ± 0.11	0.53 0.47 0.63 0.54 ± 0.08	0.79 0.74 0.74 0.76 ± 0.03	53.5 50.5 54.3 52.8 ± 2.00	22.6 21.0 23.1 22.0 ± 1.10	
MI-2	1 0.74 2 0.63 3 0.79 m±SD 0.72 ± 0.08	1.42 0.89 1.26 1.19 ± 0.27	4.84 4.63 4.79 4.75 ± 0.11	3.63 3.53 3.63 3.60 ± 0.06	0.53 0.58 0.47 0.53 ± 0.06	0.68 0.95 0.84 0.82 ± 0.14	57.5 55.6 56.4 55.5 ± 0.95	23.8 24.2 24.2 24.3 ± 0.61	
MI-3	1 0.53 2 0.79 3 0.68 m±SD 0.67 ± 0.13	1.00 1.26 1.16 1.14 ± 0.13	4.63 4.79 4.58 4.67 ± 0.11	3.53 3.74 3.63 3.63 ± 0.11	0.53 0.47 0.63 0.54 ± 0.08	0.79 0.74 0.74 0.76 ± 0.03	51.5 55.6 50.0 52.4 ± 2.90	27.5 23.8 20.7 24.0 ± 3.40	

2. 体重および心エコーによる測定値

1 時点目の全 6 匹の 18 回分の標本平均値は、IVSTd が $0.66 \pm 0.08\text{mm}$ 、IVSTs が $1.14 \pm 0.13\text{mm}$ 、LVIDd が $4.00 \pm 0.26\text{mm}$ 、LVIDs が $2.64 \pm 0.41\text{mm}$ 、LVPWTd が $0.67 \pm 0.12\text{mm}$ 、LVPWTs が $1.12 \pm 0.15\text{mm}$ であった。なお、各項目の全測定値については、表 1 の通りである。

1) Sham 群

Sham 群 3 匹の平均体重は、1 時点目 $25.27 \pm 0.55\text{g}$ 、2 時点目 $24.77 \pm 1.16\text{g}$ であった。マウスの個体番号は、Sham1 から 3、MI 1 から 3 で示した。

(1) 拡張期における値

① IVSTd の値 (図 a)

Sham 群の IVSTd の全 9 回測定分の平均値 ± 標準偏差をみると 1 時点目 $0.68 \pm 0.05\text{mm}$ 、2 時点目 $0.68 \pm 0.03\text{mm}$ であった。そのうち平均値 ± 標準偏差より外れている値は、1 時点目では Sham-1、2 の 2 回分の測定値 (0.79mm 、 0.84mm) と 2 時点目では Sham-1 の 3 回分の測定値 (0.53mm 、 0.58mm 、 0.74mm) であった。

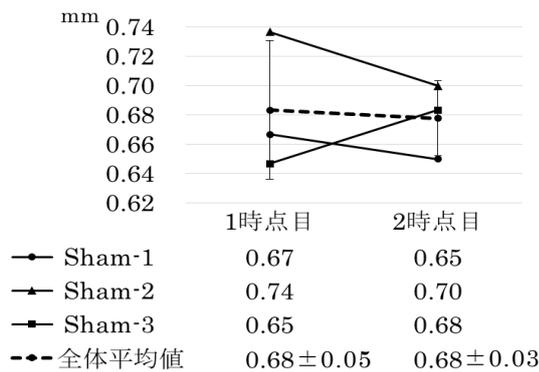


図 a. Sham 群の IVSTd の 1 時点目、2 時点目の平均値

②LVIDd の値

LVIDd の全 9 回測定分の平均値 ± 標準偏差をみると 1 時点目 3.88 ± 0.07 mm、2 時点目 3.78 ± 0.24mm であった。そのうち平均値 ± 標準偏差より外れている値は、1 時点目では Sham-1、2 の 5 回分の測定値 (3.63mm、4.00mm(2 回分)、4.05mm、4.16mm) と 2 時点目では Sham-1、3 の 3 回分の測定値 (3.47mm、3.53mm、4.37mm) であった。

③LVPWTd の値

LVPWTd の全 9 回測定分の平均値 ± 標準偏差をみると 1 時点目 0.72 ± 0.10mm、2 時点目 0.76 ± 0.06mm であった。そのうち平均値 ± 標準偏差より外れている値は、1 時点目では Sham-1、2、3 の 5 回分の測定値 (0.47mm、0.53mm、0.58mm、0.84mm、0.95mm) と 2 時点目では Sham-1、2、3 の 4 回分の測定値 (0.58mm、0.68mm、0.84mm、0.89mm) であった。

(2) 収縮期における値

①IVSTs の値 (図 b)

IVSTs の全 9 回測定分の平均値 ± 標準偏差をみると 1 時点目 1.19 ± 0.05 mm、2 時点目 1.19 ± 0.16 mm であった。収縮期における IVSTs うち平均値 ± 標準偏差より外れている値は、1 時点目では Sham-1、2、3 で 4 回分の測定値 (1.05mm、1.11mm、1.26mm(2 回分))、2 時点目では Sham-1、2、3 の 3 回分の測定値 (1.37mm(3 回分)) であった。

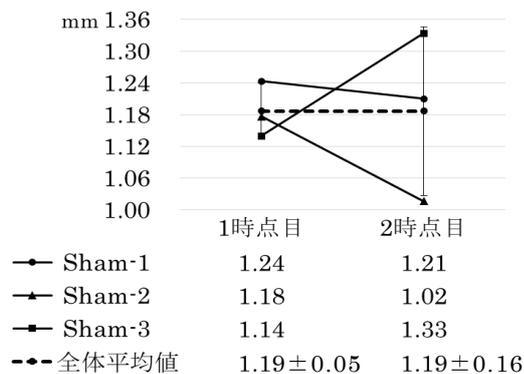


図 b. Sham 群の IVSTs の 1 時点目、2 時点目の平均値

②LVIDs の値

LVIDs の全 9 回測定分の平均値 ± 標準偏差をみると 1 時点目 2.49 ± 0.09mm、2 時点目 2.38 ± 0.24mm であった。そのうち平均値 ± 標準偏差より外れている値は、1 時点目では Sham-1、2、3 で 3 回分の測定値 (2.32mm、2.63mm、2.68mm) と 2 時点目では Sham-3 の 4 回分の測定値 (1.95mm、2.11mm、2.63mm、2.89mm) であった。

③LVPWTs の値

LVPWTs の全 9 回測定分の平均値 ± 標準偏差をみると 1 時点目 1.14 ± 0.12mm、2 時点目 1.26 ± 0.06mm であった。そのうち平均値 ± 標準偏差より外れている値は、1 時点目 2 時点目で Sham-1、3 の 3 回分の測定値 (1.00mm(2 回分)、1.42mm) と 2 時点目では Sham-1、2、3 で 5 回分の測定値 (1.00mm、1.16mm(2 回分)、1.37mm(2 回分)) であった。

(3) EF・FS の値 (図 c)

EF の全 9 回測定分の平均値 ± 標準偏差をみると 1 時点目 73.9 ± 1.7%、2 時点目 75.5 ± 4.4% であった。そのうち平均値 ± 標準偏差より外れている値は、1 時点目では Sham-1、2、3 の 5 回分の測定値 (70.3%、71.9%、76.4%、76.9%、81.3%) と 2 時点目では Sham-2、3 の 2 回分の測定値 (68.4%、83.3%) であった。1 時点目と 2 時点目で比較してみると、Sham-3 において差がみられ他 2 匹に比べて大きかった。

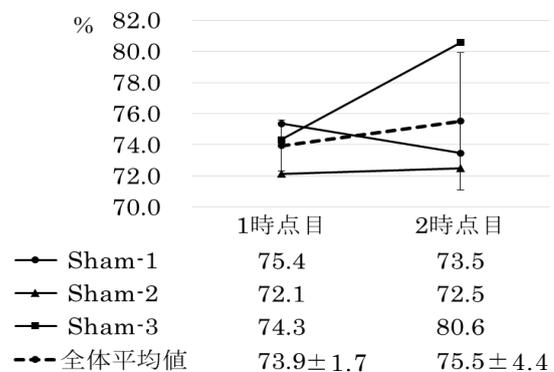


図 c. Sham 群の EF の 1 時点目、2 時点目の平均値

FS の全 9 回測定分の平均値 ± 標準偏差をみると 1 時点目 35.8 ± 1.3%、2 時点目 37.2 ± 3.4% であった。そのうち全体の平均値 ± 標準偏差より外れている値は、1 時点目では Sham-1、2、3 の 6 回分の測定値 (33.0%、34.1%、34.3%、38.0%(2 回分)、41.9%) と 2 時点目では Sham-2、3 の 3 回分の測定値 (31.5%、33.2%、43.8%) があつた。1 時点目と 2 時点目で比較してみると、Sham-3 においてその差は他 2 匹に比べて大きかった。

2) MI 群

MI 群 3 匹の平均体重は、1 時点目 23.97 ± 1.59g、2 時点目 23.67 ± 0.90g であった。

(1)拡張期における値

①IVSTdの値(図d)

IVSTdの全9回測定分の平均値±標準偏差をみると1時点目 0.61±0.04 mm、2時点目 0.66±0.01mmであった。そのうち平均値±標準偏差より外れている値は、1時点目では MI-1、2の全9回分の測定値であった。

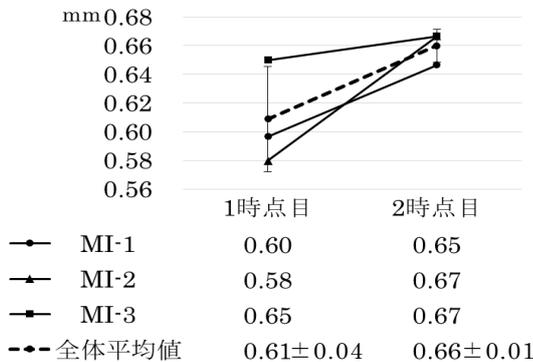


図 d. MI 群の IVSTd の 1 時点目、2 時点目の平均値

②LVIDdの値

LVIDdの全9回測定分の平均値±標準偏差をみると1時点目 3.99±0.02mm、2時点目 4.56±0.12mmであった。そのうち平均値±標準偏差より外れている値は、1時点目では MI-1、2、3の8回分の測定値(3.53mm、3.84mm、3.89mm、4.05mm、4.11mm、4.32mm、4.42mm、4.53mm)と2時点目では MI-1の4回分の測定値(4.79mm(3回分)、4.84mm)であった。

③LVPWTdの値

LVPWTdの全9回測定分の平均値±標準偏差をみると1時点目 0.62±0.06mm、2時点目 0.62±0.07mmであった。そのうち平均値±標準偏差より外れている値は、1時点目では MI-1、2、3の3回分の測定値(0.47mm、0.74mm(2回分))と2時点目では MI-1、2、3の6回分の測定値(0.47mm(3回分)、0.53mm(3回分))であった。

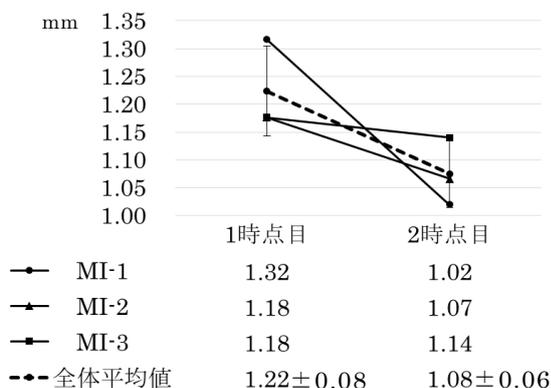


図 e. MI 群の IVSTs の 1 時点目、2 時点目の平均値

(2)収縮期における値

①IVSTsの値(図e)

IVSTsの全9回測定分の平均値±標準偏差をみると1時点目 1.22±0.08mm、2時点目 1.08±0.06mmであった。そのうち平均値±標準偏差より外れている値は、1時点目では MI-1、2、3の5回分の測定値(0.79mm、1.00mm、1.11mm(2回分)、1.37mm)と2時点目では MI-1、2、3の9回分の測定値であった。

②LVIDsの値

LVIDsの全9回測定分の平均値±標準偏差をみると1時点目 2.56±0.07mm、2時点目 3.53±0.09mmであった。そのうち平均値±標準偏差より外れている値は、1時点目では MI-1、2、3の7回分の測定値(2.05mm、2.37mm、2.42mm、2.74mm、3.32mm、3.42mm、3.58mm)、2時点目では MI-1、2、3の6回分の測定値(3.63mm(4回分)、3.74mm(3回分))であった。

③LVPWTsの値

LVPWTsの全9回測定分の平均値±標準偏差をみると1時点目 1.04±0.02mm、2時点目 0.85±0.11mmであった。そのうち平均値±標準偏差より外れている値は、1時点目では MI-1、2、3で全9回分の測定値、2時点目では MI-2の1回分の測定値(0.68mm)であった。

(3)EF・FSの値(図f)

EFの全9回測定分の平均値±標準偏差をみると1時点目 73.5±2.2%、2時点目 53.2±1.2%であった。そのうち平均値±標準偏差より外れている値は、1時点目では MI-1、2、3の7回分の測定値(67.2%、75.8%、76.3%、76.6%、77.2%、78.0%、79.5%)と2時点目では MI-1、2、3の7回分の測定値(50.0%、50.5%、51.5%、55.6%(2回分)、56.4%、57.5%)があった。

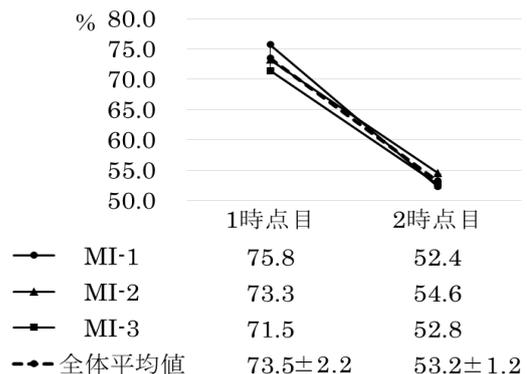


図 f. MI 群の EF の 1 時点目、2 時点目の平均値

FSの全9回測定分の平均値±標準偏差をみると1時点目 35.9±1.5%、2時点目 22.4±0.7%であった。そのうち平均値±標準偏差より外れている値は、1時点目では MI-1、2、3の7回分の測定値(31.5%、37.5%、37.8%、38.2%、38.3%、39.1%、41.9%)と2時点目では MI-1、2、3の7回分の測定値(20.7%、21.0%、23.8%(2回分)、24.2%、25.0%、27.5%)であった。

IV. 考察

看護学生であり初学者である検者が心エコーの技術を修得するための方法論について結果から考察する。

1. 心エコーによる測定の信頼性・安定性について

心エコーによる評価は、IVSTd、IVSTs、LVIDd、LVIDs、LVPWTd、LVPWTs について、6匹の1時点目の全18回分の標本平均値、Sham群、MI群の1、2時点目の各9回分の標本平均値で検討した。1時点目は心筋梗塞の施術前ということで、全マウスのデータをまとめて確認した。その結果、6項目について先行文献の平均値±標準偏差の範囲内か、あるいは手技の誤差範囲(LVPWTs)であることが確認できたことから初学者ではあったもののある程度の手技があると判断した。なお、平均体重は、Sham群、MI群ともに1、2時点目を比較し大きな違いはみられなかった。

今回の研究結果をみると、元のデータがSham群、MI群の1時点目、2時点目の各々全9回の平均±標準偏差から外れた値を示しているものがみられた。同種同様のマウスに関するTanakaら、Minegishiらのデータでは、IVSTdの値は順に $0.70 \pm 0.10\text{mm}$ 、 $0.82 \pm 0.02\text{mm}$ と示されており(Tanaka, et al., 1996;菅野ら, 2013;Minegishi, et al., 2017)、さらに、これらを基準として参照した場合、IVSTdのSham群の1時点目の 0.84mm 、MI群の1時点目 0.74mm の値は含まれることになるが、Sham群の2時点目 0.53mm 、 0.58mm は不適の可能性が高いと考えられた。さらに、IVSTsについても見るとMinegishiらは $1.21 \pm 0.03\text{mm}$ とし(Minegishi, et al., 2017)、Sham群の1時点目 1.05mm 、 1.11mm 、 1.26mm 、2時点目 1.37mm 、MI群の1時点目 0.79mm 、 1.00mm 、 1.11mm 、 1.37mm は不適の可能性が高いことが考えられた。LVIDdについても、Tanakaら、Minegishiらのデータでは、順に $3.73 \pm 0.50\text{mm}$ 、 $4.28 \pm 0.07\text{mm}$ と示されていることから(Tanaka, et al., 1996;菅野ら, 2013;Minegishi, et al., 2017)、Sham群の1時点目 3.63mm 、2時点目 3.47mm 、 3.53mm 、 4.37mm 、MI群の 4.42mm 、 4.53mm 、 3.53mm は不適の可能性が高いと考えられた。LVIDsでは、Tanakaら Minegishiらのデータでは $2.22 \pm 0.45\text{mm}$ 、 $3.00 \pm 0.08\text{mm}$ で、これらを基準とするとSham群の1時点目の 2.68mm 、2時点目の 1.95mm 、 2.11mm 、 2.89mm 、MI群1時点目では 2.05mm 、 2.74mm 、 3.32mm 、 3.42mm 、 3.58mm が不適の可能性があった。LVPWTdについても、Tanakaら、Minegishiらのデータでは、順に $0.71 \pm 0.08\text{mm}$ 、 $0.73 \pm 0.02\text{mm}$ となっており、Sham群の1時点目 0.47mm 、 0.53mm 、 0.58mm 、 0.84mm 、 0.95mm 、2時点目 0.58mm 、 0.84mm 、 0.89mm 、MI群の1時点目 0.47mm は不適の可能性が高いと考えられた。LVPWTsでは、Minegishiらは $0.92 \pm 0.02\text{mm}$ とし、Sham群の1時点目 1.00mm 、 1.42mm と2時点目 1.00mm 、 1.16mm 、 1.37mm 、MI群の1時点目 0.89mm 、 1.16mm 、 1.21mm 、 1.26mm は不適の可能性が高いと考えられた。

以上、各群で各項目を合計9回測定を行っているが、IVSTdでは1-2回、IVSTsは1-4回、LVIDdは1-3回、LVIDs1-5回、

LVPWTdとLVPWTsは1-5回の不適測定値が生じる可能性があることが示された。

群別に各項目の全9回分の平均値について、1時点目と2時点目の差をみると、Sham群では最大 0.12mm の差がLVPWTsに見られ、個体別の測定値で差が一番大きかったのは、LVIDsの 0.33mm であった。

特にLVIDの違いが著しいことから、ばらつきの生じた原因として、測定時のプローブのあて方やMモード画像におけるプロットの仕方にずれが生じたためと考えられる。しかし、マウスの心臓は非常に小さく、プローブは 0.1mm あるいはそれ以下での微細な操作が必要とされることから(菅野ら, 2013)、初学者にとって微細な操作に慣れるまで時間を要することが考えられた。さらに、実際に使用する医療機器の種類や開発された時期等によっても精度が異なり、プロットの位置が少しずれることでも、機器の精度上、示される距離が 0.1mm 程度しか変動しない等、医療機器や測定環境の違いによって先行文献との値のずれを生じる可能性があるため、先行文献との比較にはこれらの点が値に影響していることを考慮し、実際の測定値を慎重に扱う必要がある。

結果から各項目の9回の測定中最大5回の不適データを生じる可能性があることが示された。一方で、比較的、測定しやすい項目があることもわかった。看護学生の初学者であっても専門医のインストラクションによって、ある程度適切な測定値を得ることは可能であることが示された。心エコーは、対象動物の心臓の構造を理解しながら、プローブを適切な部位にあて、微細な操作を適切に行うための練習を重ねることが重要であると考えられた。また、初学者が専門医等のインストラクションを受けたとしても、データ収集の際は、以上のような割合で不適なデータが生じる可能性を考え、測定回数を増やす等の対応も必要になると考えられた。

2. 心機能評価について

マウスの左室収縮機能の指標として、EF、FSが用いられる(小山, 2012)。EFとFSの各群の全体平均値をみると、Sham群では、EFが1時点目 73.9% 、2時点目 75.5% 、FSが1時点目 35.8% 、2時点目 37.2% で、差はほぼ見られず安定し、先行文献と同様の値が得られた(Duran, et al., 2013; Minegishi, et al., 2017)。

また、MI群では、EFの全体平均値は1時点目 73.5% 、2時点目 53.2% 、FSの全体平均値は1時点目 35.9% 、2時点目 22.4% で、2時点目の値は先行文献よりやや高値であったが(Duran, et al., 2013)、いずれの測定値も2時点目で下降がみられ、明らかな心機能低下を示した。

心筋梗塞の有無は、2時点目の開胸時の肉眼的評価、および切片にて確認することで、最終的にSham群とMI群の特定を行った。その結果、初学者の検者であっても正しくMI群のマウスが検出できていたことが確認された。初学者がマウスの心エコーを行う際、先に示したように測定回数を増やすことが必要であると思われるが、麻酔の影響や計測のための時間等、

対象動物と検者の双方の負担や影響を考慮すると、より確実な測定のために、繰り返し訓練を積み重ね、使用できるデータを効率よく得られるようにする必要がありと考えられた。

3. 看護領域でのエコーによる評価の必要性と課題

現在、看護学においては、卒前教育でエコーの演習を行う機会はほとんどないが、近年、看護支援に応用しうる運動や栄養関連の研究が散見されるようになってきており、臨床でも看護職がエコーを扱う場面がある(佐々木, 2013)。看護領域の研究においてもトランスレーショナルリサーチが行われるようになってきており、どの職種も実施可能な動物の心エコーによる評価手技を身に着ける必要性が生じる場面は、今後、広がるのではないかと考える。

今回の研究結果から初学者であっても専門医のインストラクションによりある程度、適切な測定のための技術修得が可能性であることがわかった。また、動物実験では検者が1名で実施することが原則であり、そのため1名の場合であっても、自己評価を行うための方法として、実測値や先行文献との測定値を比較したりすることにより検査値の外れ値を見出し、評価の信頼性がある程度確認でき、適切な測定値をおおよそ得ることが可能とわかった。本実験は対象動物への麻酔の影響が生じやすく、麻酔が心機能にも影響することがあるため、短時間でより精度の高い測定を可能とするために、今回のような方法を採用し、自己の技術を振り返ったり、あるいは他者からの指導を継続的に受けることがどう有効かといったさらなる評価の方法について探索する必要があると考える。

研究の限界と課題

今回は検者1名による少数例での検討に留まった。初学者の条件は特に設けていなかったが、実際、他の学生や長い経験を有する臨床医であっても動物実験のエコーを行う場合、実施が困難なこともあった。動物実験に携わるエコーの検者は1名が継続して行わなければならないという現状がある。動物実験を大規模に行う際には、複数名の検討の必要性も生じるかもしれない。実際、麻酔下でエコーを実施するため、時間を要しての評価はマウスへの心機能への影響の点からはあまり好ましくない。今後、継続的な専門家からの指導を受けることでの評価がどう変化するか、あるいは複数回の自己評価によって測定値がどのように安定してくるか等、技術向上のためのいくつかの方法論についても、今後、検討する必要があると考える。

謝辞

本研究を実施するにあたり、今回、医療機器の使用を快く許して頂いた横浜市立大学医学部循環制御医学の石川義弘教授、並びにご協力を頂いた教室員の皆様に心より感謝申し上げます。

また、本研究は動物の尊い生命の犠牲のもとで行われました。ここに深く感謝の意を表します。

文献

- Antman E.M., Anbe D.T., Armstrong P.W., Bates E.R., Green L.A., Hand M.,...Jacobs A.K. (2004): ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction—executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients With Acute Myocardial Infarction), *Circulation*, 110, 588–636.
- Dane J.Y., Michael C.I., Clayton M.E., Timothy D.N., & Loren E.W. (2014): In vitro effects of exercise on the heart, *Life Sci*, 116, 67–73.
- Duran J.M., Makarewich C.A., Sharp T.E., Starosta T., Zhu F., Hoffman N.E.,...Houser S.R. (2013): Bone-derived stem cells repair the heart after myocardial infarction through transdifferentiation and paracrine signaling mechanisms, *Circ Res*, 113(5), 539–52.
- 木村一雄, 浅井徹, 小川久雄, 奥村 謙, 木村 剛, 後藤 葉一, ...山本 剛(2013): ST 上昇型急性心筋梗塞の診療に関するガイドライン (2013年改訂版) http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2013_kimura_h.pdf
- 厚生労働省(2016): 平成 28 年人口動態統計(確定数)の概況: 死因簡単分類別に見た性別死亡数・死亡率 http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei16/dl/11_h7.pdf (2017年11月14日)
- 厚生労働省: 平成 26 年(2014)患者調査の概況: 推計患者数, 総数—入院—外来・年次・傷病大分類別 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/dl/kanja.pdf> (2017年11月14日)
- 小山秀一(2012): 心疾患動物に対する心エコー検査, *MP アグロジャーナル*, 2-5.
- Minegishi S., Ishigami T., Kawamura H., Kino T., Chen L., Nakashima-Sasaki R., ... Tamura K. (2017): An isoform of Nedd4-2 Plays a pivotal role in electrophysiological cardiac abnormalities, *Int J Mol Sci*, 18 (6). pii: E1268.
- 坂田好美(2017): 心臓超音波、心エコー検査 *Echocardiography*, 杏林医学会誌, 48(1), 39–44.
- 佐々木新介(2013): 臨床看護で使用されている超音波機器に関する実態調査, *ヒューマンケア研究会誌*, 5(1), 69–72.
- 澤芳樹(2016): 再生医療の進歩と臨床応用 心筋再生, *J Clin Rehabil*, 25(2), 161–165.
- 清水達也(2016): 循環器領域のトランスレーショナルリサーチ, *心臓*, 48(8), 983–984.
- Smith S.C.Jr., Benjamin E.J., Bonow R.O., Braun L.T., Creager M.A., Franklin B.A., ... Taubert K.A. (2011): AHA/ACC secondary prevention and risk reduction therapy for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease:

2011 update: a guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation, *Circulation*, 124,2458-2473.

菅野茂, 局博一, 桑原正貴, 中田義禮(2013):動物の心電図・心エコー・血圧・病理学検査:心エコー検査, 株式会社アドスリー, 145-167.

Tanaka N., Dalton N., Mao L., Rockman H.A., Peterson K.L., Gottshall K.R., ...Rossthe J. (1996): Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse, *Circulation*, 94, 1109-1117.

Tarnavski O., Martina J.R., Schinke M., Nie Q., Kong S., Izumo S. (2004): Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies, *Physiol Genomics* 16, 349-360.