

ラットにおける経静脈性心筋コントラストエコー図法の有用性

Usefulness of Intravenous Myocardial Contrast Echocardiography in Rats

小林 春香
別府慎太郎
平山 秀男
矢倉佐知子
柏木 寧
茅野 博行
石蔵 文信

Haruka KOBAYASHI, BS
Shintaro BEPPU, MD, FJCC
Hideo HIRAYAMA, BS
Sachiko YAGURA, BS
Yasushi KASHIWAGI, BS
Hiroyuki KAYANO, MD
Fuminobu ISHIKURA, MD, FJCC

Abstract

Objectives. Few intravenous myocardial contrast echocardiography trials have evaluated myocardial perfusion in small animals. The feasibility of using intravenous myocardial contrast echocardiography to assess the ischemic area in rats was investigated.

Methods. Fourteen open chest Wistar male rats were examined. Intravenous myocardial contrast echocardiography was performed by fundamental and intermittent mode using a high frequency (5 - 12 MHz) transducer (SONOS 5500) with injection of NC100100 (20% dilution) into the femoral vein. The mechanical index was set to 1.6. Baseline-subtracted video intensity (256 level) was measured in the anterior, posterior, septal and lateral walls of the left ventricle. The left anterior descending artery was ligated in 16 rats. The area at risk was evaluated by myocardial contrast echocardiography and compared to the area of defect by Evans Blue staining.

Results. All wall segments were clearly opacified (anterior 63.8 ± 24.7 , posterior 27.0 ± 11.0 , septal 44.5 ± 11.6 , lateral 52.3 ± 19.1), although the baseline-subtracted video intensity of the posterior wall was low. The area at risk was clearly observed, and there was a good correlation with the nonperfused area by Evans Blue staining ($y = 1.13x - 3.54$, $r = 0.98$).

Conclusions. Intravenous myocardial contrast echocardiography can detect the perfusion defect even in rats using a high frequency transducer and suitable setup of equipment.

J Cardiol 2001; 37(4): 209 - 214

Key Words

Contrast echocardiography Ischemia Experimental medicine
Coronary circulation (myocardial perfusion)

はじめに

マウス，ラットなどの小動物は，従来の生理実験に用いられたイヌ，ブタなどの大・中動物に比べて繁殖・飼育も容易であることから，これらの小動物を利用した虚血性心疾患の研究が盛んである。しかし，

ラットやマウスにおける心筋梗塞やリスクエリアの計測にはさまざまな試み¹⁾はあるものの，対象が小さいゆえに十分な精度が確立されておらず，死後染色法^{2,3)}に依存しているのが現状である。

高周波超音波装置を用いると，小動物でも良好な心エコー図が記録できるため，その左室壁運動評価や心

大阪大学医学部 保健学科: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-7

School of Allied Health Sciences, Osaka University, Faculty of Medicine, Osaka

Address for correspondence: BEPPU S, MD, FJCC, School of Allied Health Sciences, Osaka University, Faculty of Medicine, Yamadaoka 1-7, Suita, Osaka 565-0871

Manuscript received December 27, 2000; revised February 6, 2001; accepted February 7, 2001

BS = bachelor of science

室容積計測に用いられている^{4,5)}。心筋灌流評価には、心筋コントラストエコー図法が期待できるが⁶⁾、小動物を対象にした方法論や精度に関する十分な知見が得られていない。

そこで本研究の目的は、ラットにおける経静脈性心筋コントラストエコー図法による心筋染色の可能性、冠動脈結紮による虚血領域の定量的評価を検討することにある。

対象と方法

1. 実験1: 心筋コントラストエコー図法の方法論

ウィスター系雄性ラット14匹(7-10週齢, 体重180-250g)を対象とした。ネブタール(1.0ml/kg)の腹腔内投与により麻酔, 仰臥位に固定した。気管内挿管後, 従量式レスピレーター(シナノ, SN-480-7)に接続し, 1回換気量を2.5-3.0ml, 換気回数を70-80/minとした。大腿静脈を切開し, シリコンチューブ(内径0.5mm, 長さ約4.5cm)を留置した。傍胸骨縁に沿って開胸し, 心外膜を切開して心臓を露出させた。

使用した超音波装置はAgilent Technologies製SONOS 5500で, 探触子は扇形走査型高周波ワイドバンド対応のS12探触子(5-12MHz)を用いた。ラットの心臓は小さく, 探触子を直接心臓表面に接触させると近距離音場の問題があるため, 探触子の先端に超音波診断用ゲルを満たしたゴム製薄膜袋を約2.5cm長に装着し, これを探触子と心臓間のスペーサーとして用い, 良好な画像を得られるようにした。左室中央部短軸像が明確に得られるように, 探触子を支持器で固定した。ラットの心臓は短軸径1cmと非常に小さいため, 本装置に搭載されている音響的ズームを使用して拡大描出した。画像は単純な拡大であるために, それにより空間分解能が改善するわけではないが, 肉眼的観察には非常に有用であった。

心筋コントラストエコー図法のための装置側の設定は, 基本波モードとし, 収縮末期同期の間欠送信法(5-6心拍に1回照射; ラットは頻拍であるので, 約50-60照射/minに相当)とした。超音波造影剤として, フッ化炭素ガスを主成分とするNC100100(Nycomed Imaging AS)を用い, 0.15mlを大腿静脈に留置したチューブよりボラス投与した。この際, チューブが非常に細いために, 注入による過剰な圧が造影剤の微小気泡に加わらないように, 約1秒で緩徐注入した。

フラッシュ用の後追い注入, 造影剤自体の持続投与は過大な容量負荷を危惧して行わなかった。至適濃度, 装置側の至適音圧の検討のために, 別途予備実験を行った。すなわち, NC100100の濃度を2%, 5%, 100%の3種類に, mechanical index(MI)を0.3, 1.0, 1.6(最大値)の3段階に変化させた。濃度を5%にした場合, MIが高いほど左室前壁の染色度は上昇した(MIが0.3, 1.0, 1.6でそれぞれの輝度値は13, 46, 79)。MIを1.6に固定した場合, NC100100の濃度が高いほど染色度は大きいが(2%, 5%, 100%において輝度値は67, 79, 116), 高濃度では左室前壁および心腔内の造影剤による音響陰影のため後壁は染色されなかった。それゆえ, 本実験では造影剤濃度を5%とし, 超音波音圧をMI 1.6として検討した。

心筋コントラストエコー画像はビデオテープに記録し, オフラインにてTomTec製Color Cardiology Work Stationを用いて, 心筋染色度をグレースケール256階調で輝度解析した。左室前壁, 後壁, 側壁, 中隔の4カ所に関心領域を置き, 超音波造影剤流入後の最高輝度値から流入前の基本輝度値を引いたものを輝度上昇度として求めた。

2. 実験2: 虚血領域の定量評価

ウィスター系雄性ラット16匹(9-13週齢, 体重 371.6 ± 44.8 g)を対象とした。実験1と同様に心筋コントラストエコー図法施行後, 左冠動脈⁷⁾の前室間枝分岐点より近位を完全結紮し, 同様に心筋コントラストエコー図法を施行した。その後30% Evans Blue(10ml/kg)を大腿静脈より注入し, 心臓を摘出した。摘出心臓は生理食塩水で洗浄後, 10%中性ホルマリンで固定し, 心筋コントラストエコー図と同一断面の左室短軸切片を作成した。ホルマリン固定した切片より, Evans Blue非染色部分面積(非灌流領域)の左室壁全面積に対する割合を求め, 心筋コントラストエコー図像より求めた超音波造影剤の非染色部分面積の左心室壁全面積に対する割合と比較検討した。

3. 統計処理

すべての統計学的数値は平均 \pm 標準偏差で表し, 測定値の群間比較の検定はpaired *t*検定を行い, $p < 0.05$ を有意差の判定とした。また2指標の相関は最小2乗法により回帰直線を求めた。



Fig. 1 Myocardial contrast echocardiography in an open chest rat
 All images were recorded by fundamental and intermittent mode. Mechanical index was set at 1.6.
Left: Baseline. *Middle*: Myocardial contrast echocardiography. *Right*: Myocardial contrast echocardiography after ligation of the left coronary artery.

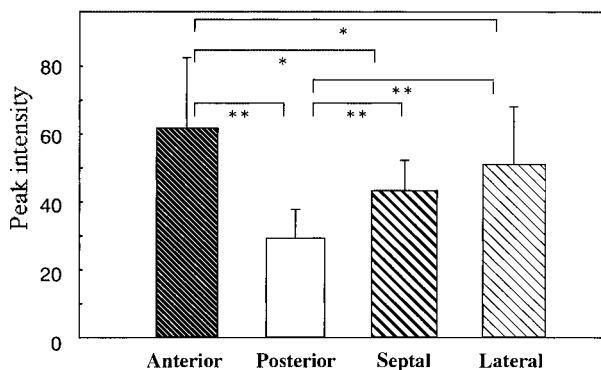


Fig. 2 Baseline subtracted peak intensity at the anterior, posterior, septal and lateral walls of the left ventricle
 All images were recorded by fundamental and intermittent mode. Mechanical index was set at 1.6.
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$.

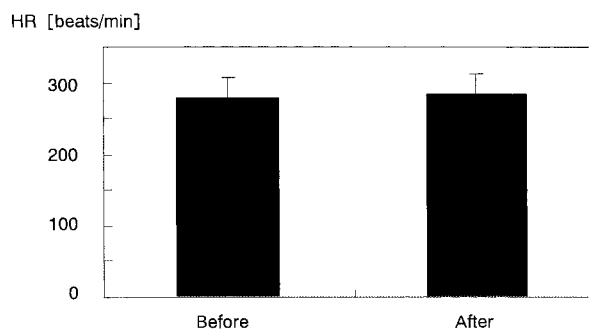


Fig. 3 Heart rate before and after administration of the contrast agent
 Heart rate before administration was 276 ± 31 beats/min, heart rate after administration was 283 ± 29 beats/min.
 HR = heart rate.

結 果

1. 実験 1

すべてのラットで良好な心筋染影を肉眼で確認でき (Fig. 1), 輝度上昇度は左室前壁 63.8 ± 24.7 , 後壁 27.0 ± 11.0 , 中隔 44.5 ± 11.6 , 側壁 52.3 ± 19.1 であった (Fig. 2). 後壁部分の輝度上昇度は他の部位に比べて有意に低かった. なお心拍数は, 超音波造影剤投与前 $276 \pm 31/\text{min}$, 投与後 $283 \pm 29/\text{min}$ で, 投与前後での有意差はなかった (Fig. 3).

2. 実験 2

冠動脈結紮を施行した16匹中15匹において, 心筋コントラストエコー図法により, 心筋染影欠損部が検出でき (Fig. 4), その欠損部の位置, 範囲は剖検で判定した虚血部分のそれに一致した. 染影欠損のみられなかった1匹では, 剖検でも虚血領域は認められなかった. 虚血領域の左室壁全体に対する割合は, 良い相関 ($y = 1.13x - 3.54, r = 0.98$)を示した (Fig. 5).

考 案

今回の検討で, ラットにおいても経静脈性心筋コントラストエコー図法が可能であることが示された. 非



Fig. 4 Demonstration of perfusion defects
 Left: Myocardial contrast echocardiography. Right: Evans Blue staining.

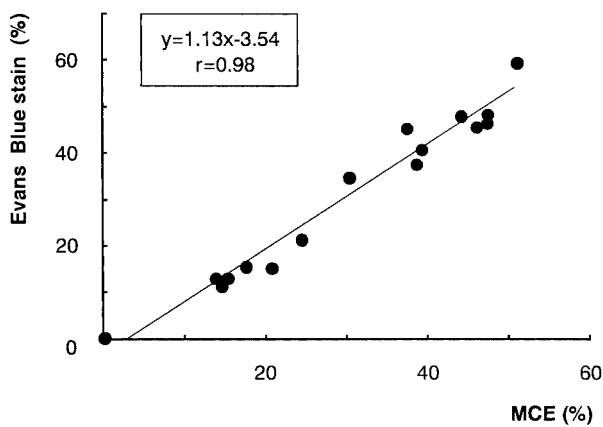


Fig. 5 Correlation between perfusion defects by myocardial contrast echocardiography and Evans Blue staining
 MCE = myocardial contrast echocardiography.

灌流領域を心筋非染影領域として表すことができ、心筋灌流を極めて少ない侵襲で定量的に評価できる可能性が示唆された。その際いくつかの工夫を試し、検討した。その第1は、高周波探触子を使用したとはいえ、探触子を直接心表面に置いた場合には明確な心断層像が得られなかった。それゆえ、スペーサーとして手術用ゴム製手袋の指部分を利用することにより明瞭な画像が得られた。第2は造影剤の投与量で、0.15ml程度であれば心拍数には変化がなく、過大な容量負荷にならないことが示された。

一般に心筋コントラストエコー図法に対しては、基

本波モードよりもハーモニックモードが用いられる。対象がラットのような小動物では高い空間分解能を必要とするため、高周波探触子が必須であるが、高周波探触子にはハーモニックモードの技術が用意されていない。それゆえ、必然的にハーモニックモードを利用できないが、基本波モードでも十分な心筋染影が得られ、虚血領域も肉眼的に検出できたことは注目に値する。また心拍数300近いラットにおいて、心拍同期の間欠送信法とはいえ、1-2 frame/secの短い送信間隔でも十分な心筋染影画像が得られたことも注目できる。通常ヒトでは、ハーモニック法や数秒に1回送受信する間欠送信が必要である。なぜラットでは基本波モードで短い送信間隔での心筋染影が得られるかは不明である。一つには、用いた超音波造影剤が音圧に対して抵抗性があるのか、または、高周波数の超音波の使用が、1-2 μmの付近に粒度分布が多い微小気泡の検出に適していた可能性がある。今回の設定での間欠送信でも心筋が十分染影されたことより、工夫によっては壁運動評価のためのリアルタイム心筋コントラストエコー図法が可能かもしれない。

本実験の対象が小動物であるために、経静脈性心筋コントラストエコー図法を施行する際の制限がいくつか発生している。第1に造影剤注入用のシリコンチューブの内径は0.5mmと非常に小さく、かつ注入には細小のシリンジを用いたため、超音波造影剤注入時に高い圧力が付加されると推測され、微小気泡の崩

壊も示唆される。注入量を大きくすることや、持続注入することで解決されうるが、全体注入量が増え負荷が大きくなるなど、小動物ゆえに実際にこれらの方法を取り入れることは困難であろう。第2に超音波造影剤注入量を僅少にするために、持続投与ではなくポース投与しているため、左室後壁の音響陰影の出現は避けられず、後壁の輝度上昇度は低下した。音響陰影の出現を低減させるため、今後さらに投与方法や投与濃度、投与速度などを検討する必要がある。

経静脈性心筋コントラストエコー図法により、心筋虚血領域が剖検心と良い対応を示した点は評価できる。Scherrer-Crosbieら⁸⁾によるマウスでの心筋虚血領域の心筋コントラストエコー図法による評価でも、Evans Blue非染色領域と良い対応を示している。しかし、超音波照射後の検討の場合には、超音波照射により直接エネルギーを受け組織の透過性、活性が高くなり、超音波造影剤の微小気泡崩壊によるキャピテーションが発生することから、真の虚血領域よりも超音波照射後のほうがEvans Blue染色範囲が広くなること示唆されているので⁹⁾、超音波の影響という意味で、別途検討が必要であろう。

対象としたラットの心臓が小さいため、超音波記録に際しての技術的問題点があった。超音波探触子先端に装着した指サックの直径は2cm、心臓の長軸径は約

1.5cmであり、任意の短軸像を描出するのは困難である。今回の検討では左室中央部に設定したが、それよりも心尖部での評価は事実上難しいと思われる。

本研究の意義

ラットにおいて、経静脈性心筋コントラストエコー図法を用いて心筋灌流の観察・評価が可能であることは大きな意味がある。臨床的には冠動脈閉塞後、すなわち急性心筋梗塞後の心筋灌流の経時的変化、それに対する冠動脈再疎通や側副血行路の影響、さらには再疎通療法開始前の薬剤療法の効果判定など、重要な問題でありながら未解決である項目は多い。これらの解決には動物実験が不可欠であるが、心筋灌流の状況は今までは剖検心でのみ診断された。すなわち、一時期のみの評価からすべてを推測していた。しかし、心筋コントラストエコー図法により *in situ* の状態で任意の時期に反復評価できる利点が生かせる途が開かれ、これらの問題点の解決に近づく可能性が高い。

結 語

ラットにおいて、経静脈性心筋コントラストエコー図法により十分な心筋染影が得られ、冠動脈閉塞による非灌流領域の正確な定量的評価が可能であった。

要 約

目 的: 経静脈性心筋コントラストエコー図法によりラットにおける心筋染影の可能性、さらには心筋虚血領域の定量評価の可能性を検討する。

方 法: 対象は麻酔開胸したウィスター系ラット14匹で、SONOS 5500、セクター型S12探触子(5-12MHz)を使用して検討した。探触子先端にゼリーを満たしたゴム薄膜を装着した探触子を心表面に当て、支持器により位置方向を固定した。基本波モード、mechanical index 1.6、5-6心拍に1回の間欠送信に設定し、20倍希釈のNC100100を用い、0.15mlを大腿静脈から注入して、コントラストエコー画像のビデオ記録(256階調グレースケール)から心筋の輝度上昇度を求めた。つぎに麻酔開胸ラット16匹で、左冠動脈結紮により虚血領域を作成し、その非染影面積をEvans Blue染色法と対比した。

結 果: 左室心筋染影の輝度上昇度は前壁 63.8 ± 24.7 、後壁 27.0 ± 11.0 、中隔 44.5 ± 11.6 、側壁 52.3 ± 19.1 であった。冠動脈結紮による非染影領域はEvans Blue染色による虚血領域と良い相関($y = 1.13x - 3.54$, $r = 0.98$)を示した。

結 論: 経静脈性心筋コントラストエコー図法により、ラットの虚血領域を定量的に評価することができる。

J Cardiol 2001; 37(4): 209-214

文 献

- 1) Firschke C, Lindner JR, Goodman NC, Skyba DM, Wei K, Kaul S: Myocardial contrast echocardiography in acute myocardial infarction using aortic root injections of microbubbles in conjunction with harmonic imaging: Potential application in the cardiac catheterization laboratory. *J Am Coll Cardiol* 1997; **29**: 207 - 216
- 2) Hutter JJ, Mestral R, Tam EK, Sievers RE, Dillmann WH, Wolfe CL: Overexpression of heat shock protein 72 in transgenic mice decrease infarct size in vivo. *Circulation* 1996; **94**: 1408 - 1411
- 3) Michael LH, Entman ML, Hartlay CJ, Youker KA, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM: Myocardial ischemia and reperfusion: A murine model. *Am J Physiol* 1995; **269**(Suppl): H2147 - H2154
- 4) Gardin JM, Siri FM, Kitsis RN, Edwards JG, Leinwand LA: Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice. *Circ Res* 1995; **76**: 907 - 914
- 5) Manning WJ, Wei JY, Katz SE, Litwin SE, Douglas PS: In vivo assessment of LV mass in mice using high-frequency cardiac ultrasound: Necropsy validation. *Am J Physiol* 1994; **266**(Suppl): H1672 - H1675
- 6) Skyba DM, Jayaweera AR, Goodman NC, Ismail S, Camarano G, Kaul S: Quantification of myocardial perfusion with myocardial contrast echocardiography during left atrial injection of contrast: Implications for venous injection. *Circulation* 1994; **90**: 1513 - 1521
- 7) Johns TNP, Byron JO: Experimental myocardial infarction: A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 1954; **140**: 675 - 682
- 8) Scherrer-Crosbie M, Steudel W, Ullrich R, Hunziker PR, Liel-Cohen N, Newell J, Zaroff J, Zapol WM, Picard MH: Echocardiographic determination of risk area size in a murine model of myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1999; **277**(Suppl): H986 - H992
- 9) Tachibana K, Tachibana S: Gene transfection with sonoporation. *in* 2nd International Kyoto Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, 2000; p 43 (abstr)