

ミニブタを用いたステント評価モデルの確立とその応用  
ーステント内狭窄の経時的な解析ー

脳神経外科学

石川 治

## 目次

	頁
I. 要旨	1
II. 序文	4
A. ステント治療の概要	5
B. ステント治療の歴史と現況	7
C. フッ素添加 DLC (diamond-like carbon) コーティングステント	15
D. 従来の動物モデルの概要と検討課題	17
1. 動物の特徴	17
2. 留置血管と time point 設定	20
E. 本研究の動物モデル	23
III. 目的	27
IV. 予備実験による検討	
A. 予備実験 (1)	28
B. 予備実験 (2)	30
IV. 材料と方法	
A. 材料	34
1. 動物	34

2. ステント	36
a. 金属ステント (BMS; bare metal stent)	36
b. フッ素添加 DLC コーティングステント (F-DLC coated stent)	37
3. 血管内超音波 (IVUS; intravascular ultrasound)	38
B. 実験方法	41
1. 術前処置	41
2. 頸動脈への外科的処置	42
3. ステント留置術	44
4. 閉創、術後処置	46
5. フォローアップ	46
6. 病理標本の作製	48
C. 評価項目	50
1. 動物の健康状態の評価	50
a. ミニブタ健康スコア	50
b. 体重測定	52
c. 血液学的評価	52
2. IVUS による解析	53
3. 病理学的評価	58

a. 定性的評価	58
b. 面積狭窄率	58
c. 損傷スコア、炎症スコア、組織被覆率	59
4. 統計解析	62
<b>V. 結果</b>	
A. 実験手技および動物の健康状態	63
1. 手術時間と実験手技	63
a. 手術時間	63
b. 総頸動脈アプローチの回数	64
2. 動物の健康状態	64
a. ミニブタ健康スコア	64
b. 体重の変化	64
c. 血液学的評価	65
B. IVUS による繰り返しの測定結果	67
1. スtent内狭窄の経時的変化	67
2. IVUS 計測値の信頼性に関する検討	68
C. スtent間の比較：長期フォローアップ群（12 週群）	70
1. スtent留置の条件	70

2. 外腸骨動脈ステントの IVUS 解析	72
a. 体積狭窄率の経過およびピーク値	72
b. 面積狭窄率の経過およびピーク値	74
3. 内腸骨動脈ステントの IVUS 解析	76
a. 体積狭窄率の経過およびピーク値	76
b. 面積狭窄率の経過およびピーク値	78
4. 狭窄率の性別解析	80
5. 病理学的評価	84
a. ステント間の比較	84
b. 追加の解析	87
D. ステント間の比較：短期フォローアップ群（2 週群、4 週群）	92
1. ステント留置の条件	92
2. IVUS による解析	94
3. 病理学的評価	94
<b>VI. 考察</b>	99
A. 研究結果のまとめ	99
B. 動物モデルの検証	101
1. ミニブタによる経時的評価の有用性と妥当性	101

2. 繰り返しの測定	102
3. スtent比較条件の妥当性	105
4. 抗血小板剤の使用に関して	106
5. 腸骨動脈と冠動脈の違い	107
6. ミニブタの性差	108
7. IVUS 測定の信頼性	109
8. 本動物モデルの限界	112
C. 今後の展望	114
1. 動物モデル	114
2. フッ素添加 DLC コーティングステント (F-DLC coated stent)	115
VII. 結論	117
VIII. 引用文献	118
IX. 謝辞	130

## 略語集

---

BMS = bare metal stent : 金属ステント

DES = drug-eluting stent : 薬剤溶出性ステント

F-DLC = fluorinated diamond-like carbon

: フッ素添加ダイヤモンドライクカーボン

IVUS = intravascular ultrasound : 血管内超音波

%VO = Percent in-stent volume obstruction

: ステント内で新生内膜体積の占める割合

%AS = Percent area stenosis

: ステント横断面における新生内膜断面積の占める割合

MLA = minimum lumen area : 最小内腔面積

---

## I. 要旨

近年、狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患に対してステント治療が盛んに行われているが、ステント留置後の経過中に認められる再狭窄とステント血栓症の問題が未解決である。そのため、主にブタ冠動脈を用いた動物実験により新規ステントの開発が行われてきたが、これまでは病理標本による解析研究が中心であり、同一個体内における経時的変化を検討することは行われてこなかった。

本研究では体格の成長に伴う血管周囲組織の変化が乏しい成体の実験用ミニブタを使用し、同一個体に対して血管内超音波（IVUS：intravascular ultrasound）により測定を繰り返すことにより、ステント留置後の血管壁や血管内腔の経時的な変化を評価する動物モデルの作製を試みた。評価対象はこれまで *in vitro* 試験にて良好な抗血栓性が示されているフッ素添加 DLC コーティングステント（F-DLC coated stent：fluorinated diamond-like carbon coated stent）を使用し、従来の金属ステント（BMS：bare metal stent）に対する有効性を検討した。

ゲッチング系の成体のミニブタ（13.4–31.5 kg）12 頭を使用し、血管径や血管の性状が左右ほぼ同等の外腸骨動脈および内腸骨動脈に、F-DLC coated stent と BMS を左右の血管に留置し、比較条件を均一化した。ステント留置後は繰り返し



返し頸動脈からカテーテルを挿入する方法により、12 週フォローアップ群の 8 頭に対して 2 週間ごとに 12 週目まで IVUS による測定を行い、ステント内の新生内膜増殖や血栓の付着を評価した。また、ミニブタの健康状態悪化がステント留置後の評価に影響することが予備検討で判明したことから、繰り返しの侵襲によるミニブタの健康状態の変化を調べるために、ミニブタ健康スコアや血液検査、体重測定を並行して評価した。上記の 2 週間ごとの IVUS および健康状態評価に加え、以下の病理検査を行った。すなわち、12 週目の IVUS 終了後に病理標本を採取し、また急性期の病理評価を補足する目的にて 2 週フォローアップ群と 4 週フォローアップ群に 2 頭ずつ割り当て、従来の方法と同様にストラット周囲の炎症や組織被覆化、血栓の付着を評価した。

本研究の結果、12 週フォローアップ群ではミニブタの健康状態を悪化させることなく、繰り返しの頸動脈処置および IVUS 測定が可能であった。IVUS 測定の結果、各ステントにおける新生内膜の増殖から軽度退縮までの経時的変化を確認し、ステントを評価する代表値である狭窄率のピーク値を同定し得た。ステント間の比較では、狭窄率の経時的変化のパターンが F-DLC coated stent において BMS よりも有意に低くなり ( $p<0.05$ )、期間中のピーク値も F-DLC coated stent が有意に低値となる結果であった (外腸骨動脈: F-DLC coated stent vs. BMS =  $22.8 \pm 14.7$  % vs.  $40.4 \pm 24.2$  %,  $p=0.031$ ; 内腸骨動脈:  $24.3 \pm 15.9$  % vs.  $32.9 \pm$

13.6 %,  $p=0.039$ )。病理標本による評価では、12 週目において F-DLC coated stent の炎症が BMS に比べて軽度となる傾向を認めた。また急性期評価群では両ステントともに炎症が軽度であり、ストラットの組織被覆障害を認めなかった。IVUS と病理標本による全ての評価において、ステントや新生内膜への血栓付着を認めなかった。

本研究の結果により、ミニブタは繰り返しの手術操作に耐えうる動物であり、ステント留置後の変化を経時的に評価することにより、各ステントにおける狭窄率のピーク値が同定されることが確認された。ステント留置後の新生内膜増殖の経時的変化はステントの種類によって異なり、従来のようなある時点を定めての病理評価では、ステント留置後の正確な解析は困難である。したがって、本動物モデルによる繰り返しの評価は異なるステントを比較する点で有用と考えられる。さらに、本研究では左右対称の血管を使用して比較条件を均一にすることによって、F-DLC coated stent の BMS に対する再狭窄抑制効果を確認することが可能となり、また良好な抗炎症性や抗血栓性、組織被覆化が示唆される結果となった。今後のさらなる検証が必要ではあるが、各種ステントの開発において本動物モデルが応用されることが期待される。

## Ⅱ. 序文

本研究の目的は血管内ステント（以下ステントと表記）の有効性を経時的に評価する動物モデルの確立である。評価対象としたステントは、フッ素添加 DLC（fluorinated diamond-like carbon）を表面被覆した F-DLC コーティングステントであり、コントロールとして金属ステント（BMS ; bare metal stent）を用いた。ステント留置後に血管内超音波（IVUS ; intravascular ultrasound）により血管壁や血管内腔の変化を繰り返し観察し、ステントの有効性を経時的に評価するとともに、動物モデルの妥当性に関する検討を行った。

## A. ステント治療の概要

心血管系疾患や脳卒中などの循環器系疾患は、現在日本人の死因の約 3 割を占める。その中でも狭心症や心筋梗塞、脳梗塞といった動脈硬化を原因とする虚血性疾患が微増傾向にあり、食生活や生活習慣の変化により今後さらに増加することが懸念される。これらの疾患は、動脈硬化によるプラークの増殖などで血管狭窄を来し、その遠位の組織に十分な血流が供給されなくなるために発症するが、ステントはこの狭窄した血管を内側から拡張して血流の改善を図る医療機器である。代表的なものは冠動脈ステントであり、ほかに下肢血管に使用する末梢血管用ステント、頸部血管に対する頸動脈ステントなどがある。いずれもプラットフォームは、ステンレスやニッケルチタン合金などの金属でできた網目の筒状構造をしている（図 1）。

実際のステント治療では、先端の風船部の外側にステントを載せたステント付きバルーンカテーテルを体表に近い血管から挿入し、まず血管の狭窄部まで誘導する。続いてバルーンを膨らませてステントを拡張し、血管の内壁に密着させる。ステントを確実に血管内に留置した後、バルーンカテーテルのみを抜去する（図 2）。

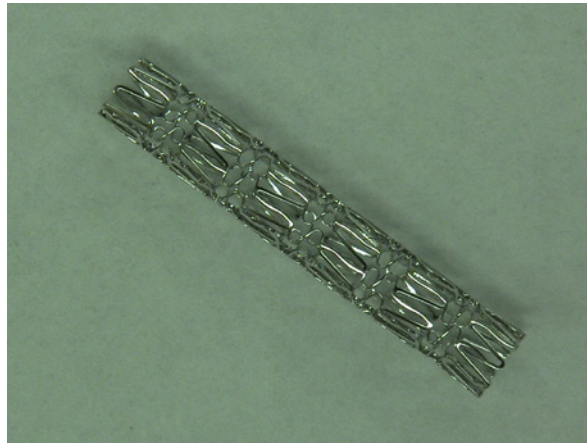


図1. ステント（血管内ステント）

ステントとは人体の管状の部分を管腔内部から広げる医療機器のことをいう。血管内ステントは、ステンレスやニッケルチタン合金などの金属でできた網目の筒状構造をしている。写真は本研究で使用した金属ステント（ステンレス製）。

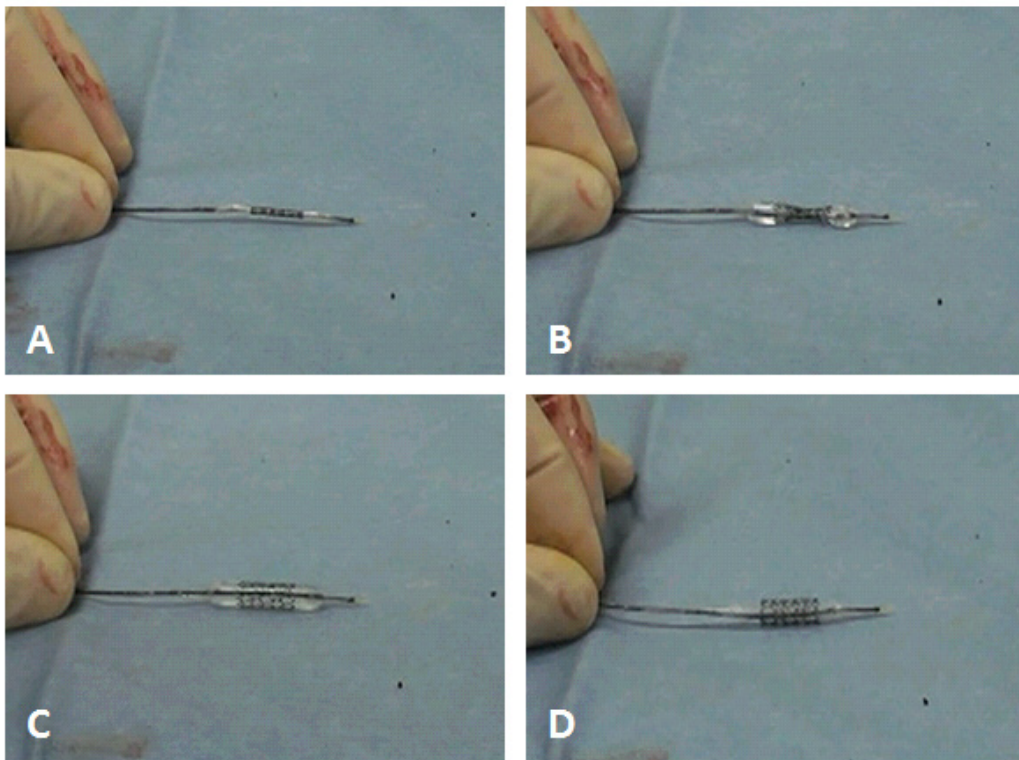


図2. ステント拡張の様子（写真は本研究で使用したコーティングステント）

- A. ステントはバルーンカテーテル先端の風船部に載せられている。
- B. バルーンと共にステントが拡張され始めた状態。
- C. ステントが拡張された状態。
- D. バルーンを収縮させるとステントはバルーンカテーテルから分離される。

## B. ステント治療の歴史と現況

ステント治療に先立ち、狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患に対する治療の開始は、1946 年の Vineberg による内胸動脈を心筋に縫い付ける外科的治療が最初である<sup>1</sup>。その後、冠動脈バイパス術が 1967 年に開始され、急速に普及した。冠動脈バイパス術は、現在特にステント非適応例などに対して施行されている。

一方、外科的治療に比べその低侵襲性や利便性から、カテーテルを用いた血管形成術が大きな発展を遂げてきた。これは、肘や鼠径部からカテーテルを血管の中に挿入して行う治療であり、開胸術のような身体に対する大きな侵襲を回避できる。まずバルーンカテーテルを用いて狭窄部を血管の中から拡張するバルーン血管形成術が 1976 年に Gruntzig によって開始された<sup>2</sup>。しかし、バルーンによる拡張は血管壁に亀裂を生じさせるリスクがあり、治療後の急性期に血管が閉塞する急性冠動脈閉塞を起こすことがあった<sup>3</sup>。また、慢性期にも血管径が徐々に縮小する陰性リモデリングという現象や新生内膜の増殖（後述）により、術後 3－6 ヶ月で 4 割程度の症例に再狭窄を来した<sup>4</sup>。なお、再狭窄とは内腔が正常血管に比べて 50%以上狭窄する場合をいう。これらを解決する方法として金属ステントが登場した。

金属ステント（BMS；bare metal stent）は 1986 年に Sigwart らによって初めて臨床応用され<sup>5</sup>、日本では 1993 年 2 月に認可された。以降、術後に急性冠動脈閉塞を発症する症例は著明に減少し、術後 3－6 ヶ月に再狭窄を来す症例の割合（再狭窄率）も症例の 3 割程度に改善した<sup>6-8</sup>。その結果、治療適応が拡大して治療件数は増加したが、ステント留置後の再狭窄の問題は依然解決困難な課題として残り、その主たる原因が新生内膜の増殖であることも明らかにされた（図 3）。新生内膜増殖の機序に関しては後述する。

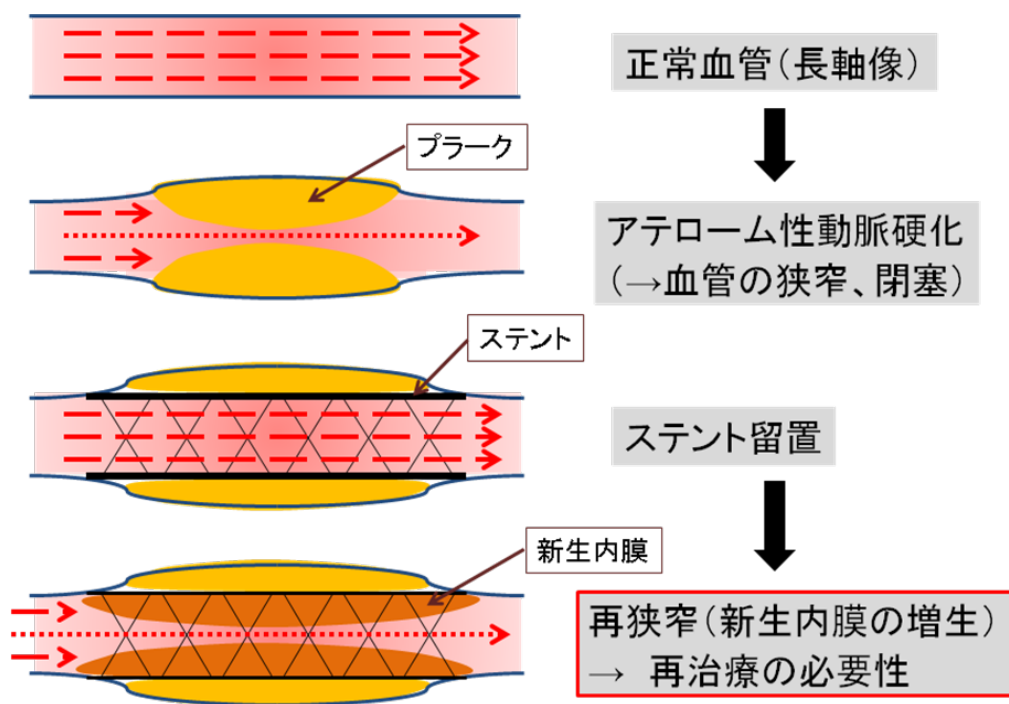


図 3. ステント留置後の再狭窄

その後、再狭窄抑制を目的として各種ステントが研究開発されてきた(表 1)。

各種の生体適合性材料やヘパリンをコーティングしたステントが開発されたが、いずれも in vitro study では有効性を認めるものの、動物実験やヒトへの使用では再狭窄の抑制効果を認めなかった。

表 1. 各種ステントの研究開発 (再狭窄率の比較)

Study	ステントの種類	ヒトでの再狭窄率 (Targeted stent vs. BMS)
Unverdorben, 2003 <sup>9</sup> Sick, 2004 <sup>10</sup> Haase, 2003 <sup>11</sup> Airoldi, 2004 <sup>12</sup> Meireles, 2007 <sup>13</sup> Kastrati, 2000 <sup>14</sup>	生体適合性材料コーティング <sup>※</sup> Silicon carbide coated stent Carbon coated stent DLC coated stent Gold coated stent	37% vs. 21% ; n.s. 23.5% vs. 15.9% ; n.s. 18.1% vs. 20.6% ; n.s. 31.8% vs. 35.9% ; n.s. 24.3% vs. 21.8% ; n.s. 49.7% vs. 38.1% ; p=0.003
Buller, 1999 <sup>15</sup>	抗凝固剤コーティング Heparin coated stent †	55% vs. 70% ; p<0.01 †
Schampaert, 2004 <sup>16</sup> Schofer, 2003 <sup>17</sup> Colombo, 2003 <sup>18</sup>	薬剤溶出性ステント Sirolimus eluting stent Pacritaxel eluting stent	2.3% vs. 52.3% ; p<0.001 5.9% vs. 42.3% ; p<0.001 2.3% vs. 17.9% ; p<0.0001

DLC = diamond-like carbon、n.s. = not significant

† : vs. balloon angioplasty

これらの中で再狭窄の抑制に著しい効果を認めたのは薬剤溶出性ステント (DES ; drug-eluting stent) である。DES は従来の BMS の表面に再狭窄抑制効果



のための薬剤を含有したポリマーをコーティングしたステントであり、病変部へ留置後に同薬剤が徐々に局所で溶出する仕組みになっている。薬剤の種類やポリマーの種類、溶出期間（2週間～4ヶ月）が各々の DES で異なっている。なかでも、免疫抑制剤や抗癌剤など細胞増殖抑制作用をもつ薬剤の効果は著明であり、動物実験において4週目の新生内膜増殖の著明な抑制効果を認めた<sup>19-21</sup>。ヒトにおける大規模な多施設共同ランダム化試験でも DES 群において著明な再狭窄率の低下を認めたため（表 1）<sup>16-18, 22, 23</sup>、2003 年以降日本でも種々の DES が認可されている。

DES の導入により、ステント留置後の再狭窄の問題は劇的な改善をみせた。上記 study の4年間のフォローアップでも再狭窄による再治療率が7-10% 程度であり、BMS の20-24%に比べて有意に減少した<sup>24</sup>。しかし死亡や心筋梗塞の発生頻度が BMS 群と同等（10-12%）であり臨床転帰の改善効果は認めなかった。また1年後以降の遅発性ステント血栓症（後述）は DES において多く認める傾向にあった（DES 1.2-1.3%、BMS 0.6-0.9%）。本邦でも2003 年以降 BMS に代わり DES の使用が急増したが、2006 年頃よりステント血栓症の問題が社会的な問題となり<sup>25, 26</sup>、BMS の使用が見直されてきている。だが、現在も DES は依然として汎用されており、本邦における年間使用本数は、2009 年度で BMS 9 万本に対して DES 24 万本である。

上記のように、①BMS 留置後の新生内膜増殖による再狭窄、および ②DES 留置後のステント血栓症の 2 つが大きな問題であり、その解決がステントの有効性や安全性に関わる重要な課題となっている。さらに問題なのは、これらの合併症が動物実験では認識されず、ヒトに使用されて初めて判明したことである。動物実験による正確な評価や長期的な観察が事前に可能であれば、より安全性が担保されと考えられる。

既述したごとく、ステント留置後の再狭窄は新生内膜の増殖を主体とする。この現象は、1) ステントストラットの存在、2) 血管内皮の損傷、3) ステントストラットおよび血管内皮の損傷部位への血栓の付着、を契機とする。これらにより白血球（好中球、マクロファージ）が活性化され、各種サイトカインや成長因子が発現し、中膜平滑筋細胞が内膜側へ遊走し増殖反応が起こることにより、細胞外基質を巻き込んだ厚い新生内膜が形成される<sup>27-29</sup>。こうしてステント留置後に内腔が 50－75%以上狭窄する場合に再治療が必要となることが、BMS 留置後の主要な課題であった（図 4）。

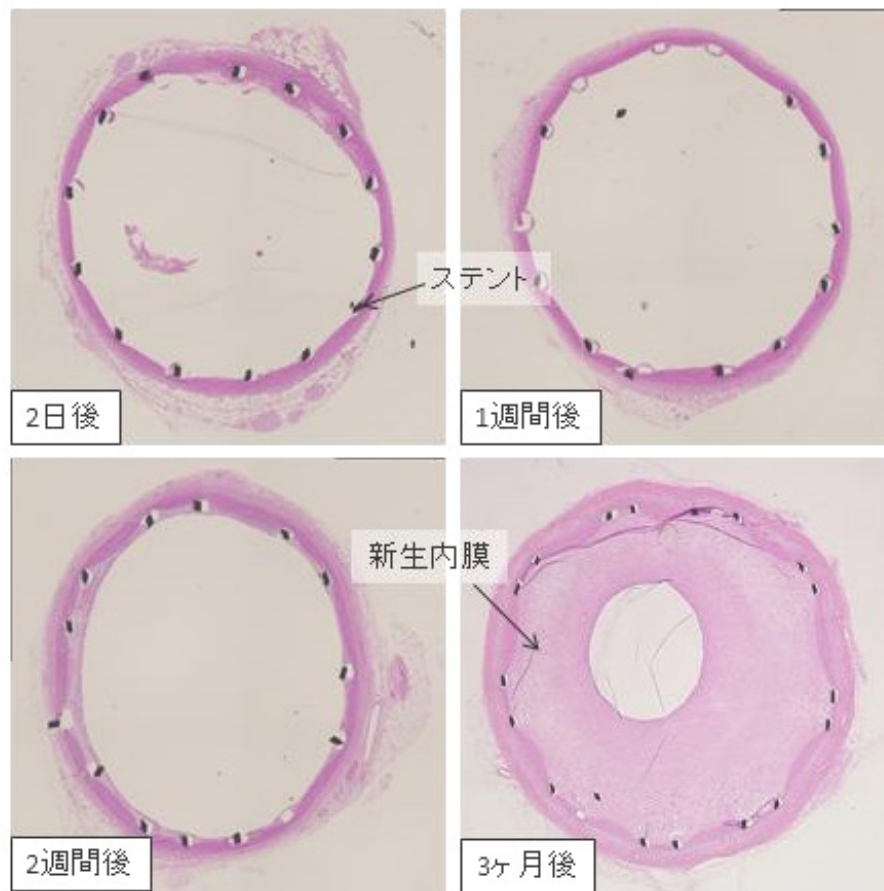


図 4. BMS 留置後の新生内膜増殖（畜産ブタ）

写真は畜産ブタの冠動脈である。冠動脈へのステント留置の予備実験として BMS を留置した。

一方、ステント血栓症とはステント内に形成された血栓により血管が閉塞し、急性心筋梗塞を発症する致死的な重大合併症である。ステントストラットが血管内腔に露出していると発生しやすい。血管内皮細胞による内皮化（ステントが血管内皮細胞で覆われること）はステント血栓症の抑制において重要である<sup>30</sup>。BMS は留置後 1 ヶ月間ではまだ内皮化されないためステント血栓症のリスクがあるが、その後内皮化されるとそのリスクは格段に減少する。一方、DES

は再狭窄を劇的に改善するが、同時に薬剤により内皮細胞の再生反応も抑制するため、ステントストラットが内皮化されず血管内腔に露出されたままの状態となり、ステント血栓症の危険が 1 ヶ月を超えて長期的に続くことになる<sup>31-33</sup>。またこれ以外にも DES の薬剤による中膜の障害（中膜壊死）がステントの血管壁からの離脱を誘発して、遅発性ステント血栓症を誘発することも報告されている<sup>34,35</sup>。

さらに DES の慢性期の合併症として、晩期再狭窄のリスクが指摘されている<sup>36</sup>。DES 留置部では薬剤やポリマーの影響により BMS に比べて高度の炎症反応が惹起され、さらに炎症反応が遷延化することが原因の一つと考えられている<sup>33,37</sup>。

以上の各種ステントの特徴および今後期待されるステントの特徴を表 2 に示す。現在新たな DES やコーティングステントが開発されているが、その共通する目標は、1) 内皮を中心とした組織にステントが被覆され（ステント血栓症の予防）、かつ 2) 過度の再狭窄を来さないことである。

表 2. 各種ステントの特徴と今後期待されるステント

BMS	利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>急性冠動脈閉塞の予防</li> <li>バルーン拡張術に比べ再狭窄を改善</li> </ul>
	欠点	<ul style="list-style-type: none"> <li>新生内膜の増殖による再狭窄</li> </ul>
Coated	利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>抗血栓性、抗炎症性が期待される</li> </ul>
	欠点	<ul style="list-style-type: none"> <li>ヒトでの再狭窄は BMS と同等</li> </ul>
DES	利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>新生内膜増殖を抑制し、再狭窄を著明に改善</li> </ul>
	欠点	<ul style="list-style-type: none"> <li>遅発性ステント血栓症による突然死</li> <li>内皮再生、内皮被覆の障害、中膜壊死</li> <li>晩期再狭窄</li> <li>血管壁の炎症が遷延、ポリマーによる hypersensitivity</li> </ul>
次世代		<ul style="list-style-type: none"> <li>新世代 DES <ul style="list-style-type: none"> <li>薬剤の種類、量を最適化</li> <li>生体適合性を有するポリマー</li> </ul> </li> <li>新世代 Coated stent <ul style="list-style-type: none"> <li>抗血栓性、抗炎症性の向上による再狭窄の改善</li> </ul> </li> </ul>
BMS = 金属ステント (bare metal stent)、Coated = コーティングステント (Coated stent)、DES = 薬剤溶出性ステント (drug-eluting stent)		

### C. フッ素添加 DLC (diamond-like carbon) コーティングステント

DLC (ダイヤモンドライクカーボン) とは主に炭素と水素で構成される非晶質のカーボン薄膜材料のことであり、1970 年代より工業分野でコーティング材として使用されてきた。DLC は低摩擦や低摩耗、高硬度、化学的安定性など様々な特性を有するため、特に切削工具や摺動部材に用いられている。1990 年代よりバイオマテリアル分野への応用研究が始まり、DLC のすぐれた生体適合性や血小板吸着の抑制効果<sup>38, 39</sup>、タンパク質吸着抑制効果<sup>40</sup>が報告された。ステントへの応用に関しては 2000 年頃から報告されており、DLC コーティングによる抗血栓性効果や新生内膜増殖の抑制効果が、血液回路を用いた *in vitro* 実験<sup>41</sup>や動物実験<sup>42</sup>などにより明らかとされた。これらの結果に基づき DLC 系コーティングステントが発売されたが、臨床使用においては従来の BMS と比べて著明な再狭窄抑制効果を認めなかった<sup>12, 13, 43</sup>。

しかし、前述のごとく DES によるステント血栓症や遅発性再狭窄が大きく問題視されるに従い、DLC のような無機材料によるステント表面の改質に注目が集まっている。特に、基材の表面をフッ素化することにより疎水性や柔軟性、抗血栓性の性質が向上する<sup>44, 45</sup>ことが着目され、DLC にフッ素を組み込んだフッ素添加 DLC (F-DLC) の研究が開始された。報告によると、ヒト血液を用い

た *in vitro* 実験にて、F-DLC は膜内のフッ素含有量を調節することにより BMS の素材であるステンレスや DLC に比べて血小板付着を有意に抑制し、またラットの皮下に F-DLC coated disc を埋め込んだ実験では、ステンレス製の disc に比べて周囲の炎症反応を過度に惹起しないことが確認されている<sup>46</sup>。さらに F-DLC は DLC に比べ血小板の活性化を抑制する効果や、タンパク質、とくにフィブリンの吸着を減少させる効果を有することも *in vitro* 実験にて確認された<sup>47</sup>。

一方、ステントへの DLC 系コーティングは、ステント拡張時のコーティングの剥離やひび割れが問題視されてきた<sup>48</sup>。しかし近年、フッ素含有による柔軟性の向上と、珪素を含有した中間層を追加して表面自由エネルギーを調整することにより、F-DLC 膜の基材への接着性が向上し、ステント拡張時の剥離やひび割れの問題が解決されている<sup>49</sup>。そのため、この F-DLC coated stent が生体の血管内で再狭窄を抑制するか否かを動物実験で評価することが期待されていた。

#### D. 従来の動物モデルの概要と検討課題

ステントの動物実験には、これまでマウスやラット、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ブタ、サルが使用されてきた<sup>50,51</sup>。なかでも、ブタ冠動脈モデルとウサギ腸骨動脈モデルが古くから汎用されている。現在ステントの安全性を評価する動物モデルとしてブタ冠動脈モデルが確立しているが、ステント留置後の経時的な観察に基づく有効性の正確な評価に適したモデルが確立していないことが重大な問題と考えられる。以下、従来の動物実験方法の概略を解説する。

##### 1. 動物の特徴：

畜産ブタ（以下ブタと表記）やミニブタは、個体としての生理機能や凝固系機能、および心血管系構造のサイズや走行、血流に関してヒトと類似しているといわれている<sup>52,53</sup>。事実、ブタやミニブタの冠動脈はバルーン拡張後に血管が徐々に収縮する陰性リモデリング反応やBMS留置後の新生内膜増殖反応が病理学的にヒトと類似しており<sup>54,55</sup>、古くからステント留置後再狭窄を評価するモデルとして確立している。但し、ブタ、ミニブタともに動脈硬化の疾患モデルの作成には多大な費用と時間、労力が必要であり、また一定した動脈硬化病変を作製することが困難なため、現状では実験に使用可能な系は確立していない。そのため正常冠動脈による評価が行われている。



ウサギは体格が小さいため実験動物として扱いやすい (3–5 kg)。冠動脈は細くステントの留置が困難であるが、腸骨動脈がヒト冠動脈とサイズが類似しているため冠動脈ステントを腸骨動脈に留置する実験がよく行われている。ウサギではステントストラットが内皮により被覆される時期がブタ (14 日) より遅く、よりヒト (28 日) に近いといわれており、主に内皮化の時期の比較を目的とした実験に使用される<sup>55, 56</sup>。また、ウサギには動脈硬化の疾患モデルがあり、正常血管と動脈硬化血管の両方がモデルとして使われる<sup>57-59</sup>。しかし、新生内膜の形状は薄く、ステントの再狭窄の評価には適していない。そのため、ステントの再狭窄を比較するモデルは、ウサギよりもブタかミニブタが適しているといわれている。

ブタでもヒトでも、新生内膜は時間の経過とともにその形態を変化させる。例えば、**BMS** 留置後に増殖した新生内膜は、急性期を過ぎるとゆっくりと退縮傾向に転じると考えられている。この現象は平滑筋細胞と共に新生内膜を構成する細胞外マトリックスに含まれるコラーゲン **type III** とプロテオグリカンがリモデリングにより **type I** へ置き換わるためとされている<sup>60</sup>。但し、ブタとヒトでは、新生内膜増殖の **time course** が大きく異なる。すなわち、ヒト冠動脈では 6 ヶ月から 1 年の間に新生内膜増殖のピークを迎え、その後 1–2 年間で 22% 程度の退縮を認めるが、ブタ冠動脈においては **BMS** 留置後 1 ヶ月で増殖がピークと

なり、6 ヶ月後には 25%程度の退縮を認めるといわれている<sup>60-63</sup>。したがって、ブタ冠動脈はヒトに比べて 5-6 倍ほど速い time course を辿ることになる。その理由は、ヒトに比べてステント留置部の炎症が高度であるため、新生内膜増殖が短期間に進むと考えられている<sup>56, 60</sup>。

そのため、動物実験では新生内膜増殖の time course にあわせて長期間の観察を行う必要があり、この間に動物の体格が変化しない種を用いることが重要となってくる<sup>55, 64</sup>。しかし、ブタは成体だと大きくて扱いにくく、2-3 ヶ月程度の子ブタ（20-30 kg）が使用されるが、体格の成長が速く（6 ヶ月で 100 kg に達する）、臓器や留置した血管そのもののサイズも著しく変化するため、長期観察には適さないといわれている<sup>55, 64</sup>。

これまでの動物実験がどのような方法で行われてきたか、その代表的なものを表 3 に示す。ブタ冠動脈が用いられることが多く、DES の実験に関しては内皮化の判定が重要になるためウサギ腸骨動脈も使用されている。ブタ冠動脈はヒトと同様 3 本の主要な血管から成るが、そのうち 1-3 本が使用されており、観察期間は 4 週目が圧倒的に多い。

表 3. 冠動脈ステント研究に関する代表的な動物実験の方法

Study	Animal	Stent	Control	Artery	stent /animal	Follow-up
Hardhammar, 1996 <sup>65</sup>	ブタ	Heparin coated	BMS	冠動脈 1 本 (LAD)	1 stent	4 weeks (n=20), 12 weeks (n=20)
De Scheerder, 2000 <sup>42</sup>	ブタ	DLC coated	BMS	冠動脈 3 本中 2 本	2 stents	6 weeks (n=20)
Edelman, 2001 <sup>66</sup>	ブタ	Gold coated	BMS	冠動脈 3 本中 2 本	2 stents	4 weeks (n=35)
Suzuki, 2001 <sup>19</sup>	ブタ	SES	BMS	冠動脈 3 本	3 stents	1 week (n=4), 4 weeks (n=10)
Heldman, 2001 <sup>67</sup>	ミニブタ	PES	BMS	冠動脈 1 本 (LAD)	1 stent	4 weeks (n=43)
Farb, 2001 <sup>20</sup>	ウサギ	PES	BMS	外腸骨動脈片側 or 両側	1-2 stents	4 weeks (n=41)
Klugherz, 2002 <sup>21</sup>	ウサギ	SES	BMS	外腸骨動脈両側	2 stents	4 weeks (n=19)
Nakazawa, 2007 <sup>56</sup>	ブタ	DES 3 types	BMS	冠動脈 (詳細不明)	不明	30 days, 90 days, 180 days; (n 不明)

BMS = bare metal stent、LAD = left anterior descending artery、DLC = diamond-like carbon、SES = sirolimus-eluting stent、PES = paclitaxel-eluting stent、DES = drug-eluting stent

## 2. 留置血管と time point 設定、評価手段

ヒト冠動脈の血流支配領域は個人差が大きく、右冠動脈優位型（60%）、左冠動脈優位型（20%）、左右均衡型（10%）といった形態をとるが、ブタの冠動脈においても血管の優位性は多様であり、血管による血流の不均一性が示されている<sup>68,69</sup>。しかし、表 3 にあげた各 study では、ステントを留置する血管径が均一に調整されていても、血流のバラツキに関する検討はされていない。

ステントを評価する **time point** は、新生内膜の増殖がピークとなる 4 週目が最も多く選択されており、続いて慢性期は 3 ヶ月目、あるいは 6 ヶ月目で評価されている<sup>55</sup>。主な評価方法は病理所見であり、血管撮影や血管内超音波 (**IVUS**; **intravascular ultrasound**) を行ったとしても、その直後に動物を安楽死させて病理標本を作成してしまうため、**time point** ごとに異なる動物群における評価が行われている。

これまでの動物モデルにおける最も大きな問題点は、同一個体の継続的な観察や評価がなされていないことである。そのため狭窄率の経時的な変化を正確に同定することが基本的に困難となる。その典型的な一例を示す (図 5)。白杵の **BMS** は 1 ヶ月から 3 ヶ月にかけて新生内膜面積の減少を認めたにも関わらず、6 ヶ月後には増加しており<sup>56</sup>、通常の **BMS** の新生内膜増殖の **time course** とは明らかに異なると思われる。新生内膜の増殖および退縮は本来なだらかな経過を辿ることが予想されるが、従来の実験方法では **time point** ごとに動物群が異なるため、新生内膜量の経時的変化を正確に評価することは難しい。

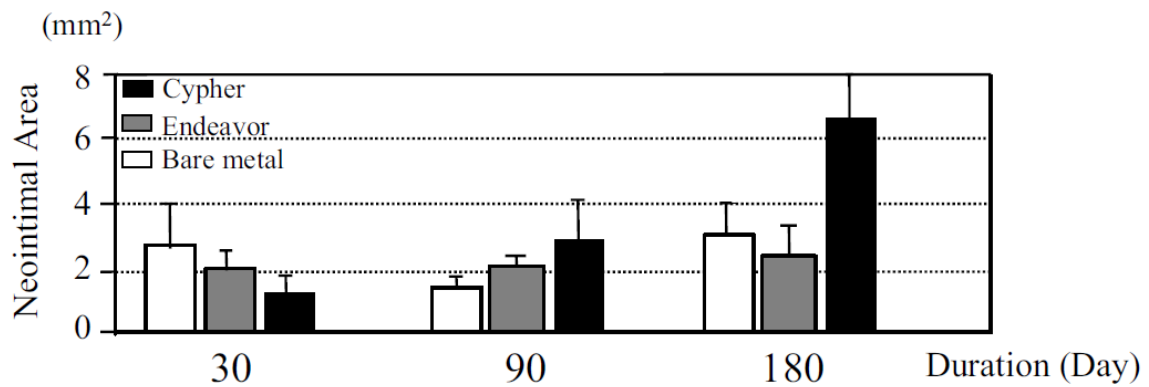


図 5. 新生内膜面積の経時的変化の例（文献 56 より引用）

各ステント留置後 30 日、90 日、180 日目における新生内膜面積の経過。白枠の金属ステント（BMS; bare metal stent）の新生内膜面積は、3 ヶ月後に縮小したがその後 6 ヶ月目には増加している。

Cypher と Endeavor は DES（drug-eluting stent）の商品名

## E. 本研究の動物モデル

本モデルでは、まず動物は長期観察しても体格変動が小さい実験用ミニブタ<sup>50, 70</sup>を選択した。ステント留置後の再狭窄を正確に比較するためには、左右対称の血管による可及的同一条件下での評価が重要と考え、腸骨動脈にステントを留置した。表 4 に、現行の代表的なモデルである「ブタ冠動脈モデル」と、我々の考案した「ミニブタ腸骨動脈モデル」の特徴を比較する。

左右の外腸骨動脈及び内腸骨動脈を使用することにより、一個体内に最大で 4 本のステント留置が可能であり、左右 2 ペアで異なるステントの有効性を比較することができる (図 6)。ペアごとの比較により個体差の影響を最小限にでき、正確なステントの評価が可能となる。

表 4. ブタ冠動脈モデルとミニブタ腸骨動脈モデル

	ブタ冠動脈モデル	ミニブタ腸骨動脈モデル
動物	ブタ ・大型 (30kg–100kg 以上) ・成長が速い	ミニブタ ・中型 (15kg–30kg) ・成長が緩やか ・長期実験に適している
留置血管	冠動脈 ・血管走行、血流が不均一	外腸骨動脈、内腸骨動脈 ・左右対称 ・2 ペア
ステント数	1–3 本 / 個体 ・留置血管の性質が不均一	4 本 / 個体 ・左右対称血管での比較が可能
評価時期	1 ヶ月、3 ヶ月 or 6 ヶ月  ・別々の個体群 ・個体差の影響大	およそ 2 週間隔で自由に time point を設定できる ・同一個体を繰り返し評価 ・新生内膜の変化を追跡可能 ・狭窄のピークを同定可能 ・個体差の bias を削減 ・個体数の減少
評価方法	病理標本による評価 血管撮影 ときに IVUS	IVUS が主体 最終フォローアップ時に病理標本作製 別個体を用いれば各 time point で病理評価を追加することも可能

IVUS = intravascular ultrasound : 血管内超音波

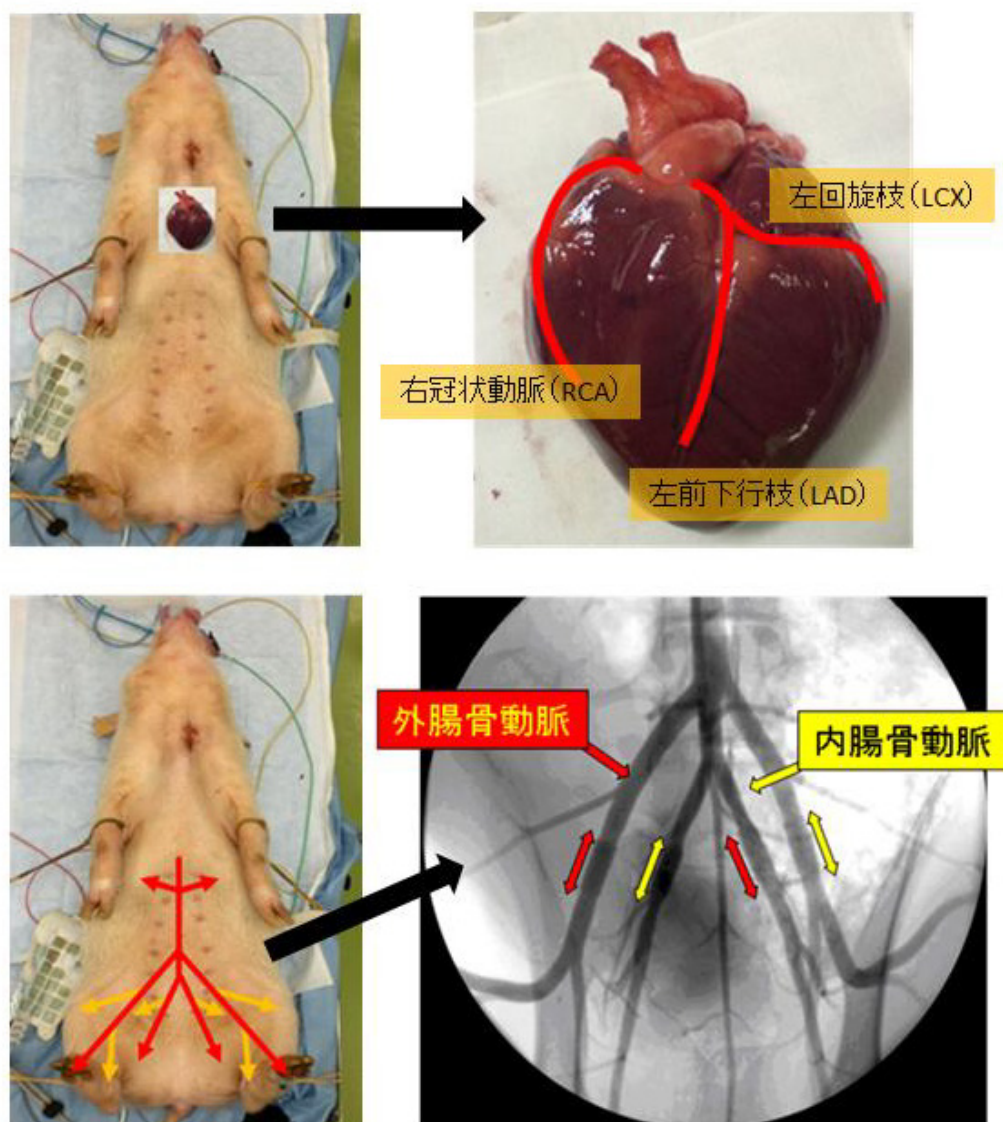


図 6. ミニブタの冠動脈（上段）と腸骨動脈（下段）

ミニブタ冠動脈はヒトと同様 3 本の主要な血管を有するが、各血管の解剖学的構造や血流は不均一である。一方、腸骨動脈は両側の外腸骨、内腸骨動脈が存在し、解剖学的に左右対称である。1 頭に左右 2 ペアで合計 4 本のステント留置が可能となり、左右近似条件下でのステント比較が可能となる。写真は本研究で使用したミニブタである。



しかし、上述のごとく左右対称の血管を使用したとしても、各ステントの辿る time course はステント留置手技の微妙な違いやステント種により当然変化する<sup>71,72</sup>。そのため、従来のようにある特定の time point で横断的に評価したのでは、得られた狭窄率がその後上昇あるいは低下していく可能性があり、各ステント再狭窄のピークを捉えることが困難である。本研究では、同一個体に対して血管内超音波（IVUS ; intravascular ultrasound）を繰り返し用いて、新生内膜増殖の経時的な変化を評価することで、各血管に留置したステントの個別の狭窄率のピーク値を知ることができ、その比較が可能となる。

また、本モデルでは、病理学的にステントストラットによる血管壁損傷の程度や、ストラット周囲の白血球浸潤の程度、およびストラットの組織被覆の程度、血栓の付着に関して従来動物モデルと同様に評価する。さらに病理学的に血管内腔面の損傷の有無を評価し、IVUS 計測値の妥当性についても検討する。

### Ⅲ. 目的

本研究は、ステントの有効性を経時的に評価すること、すなわちステント留置後の新生内膜や血管内腔の経時的な狭窄変化を解析できる動物モデルの確立を目的とする。ゲッチング系ミニブタの左右対称な腸骨動脈に 2 種類のステントを留置し、その後は血管内超音波（IVUS; intravascular ultrasound）を繰り返し用いて各ステントの新生内膜増殖のピークや退縮などの変化を経時的に観察し、両者を比較する。

本モデルは従来のものとは異なり、同一個体に対して繰り返し麻酔やカテーテル操作などの侵襲を加えるため、ミニブタ健康スコアや体重測定、血液検査などの経時的な変化を観察し、本モデルの妥当性についても検討した。

#### IV. 予備実験による検討

動物実験でステント留置後の再狭窄を繰り返し測定した報告例は文献を渉猟し得た限りでは存在しなかった。そのため、本実験に先立って予備実験を行い、血管内へ繰り返しアプローチする方法や、本実験における観察期間の設定について検討した。また予備実験では腸骨動脈と冠動脈の血流測定を行い、血流の均一性に関する検討も行った。

##### A. 予備実験（1）

###### 1. 目的

ステント留置後の経時的な再狭窄の変化を評価するためには、繰り返し血管内にカテーテルを挿入する必要があるため、まず繰り返しの測定方法に関する検討をおこなった。

###### 2. 方法

畜産ブタ（LWD ブタ）4 頭、体重約 30kg、月齢不詳を使用した。左頸部を開いて左総頸動脈にカテーテルの進入ルート器具であるシースを挿入。シース

を利用してカテーテル類を血管内に挿入し、左右の外腸骨動脈に BMS を留置した。手技終了後はシースを血管内に留置したまま閉創して体内に残した状態とした。以降、2 週間間隔に血管内超音波（IVUS : intravascular ultrasound）により狭窄率の測定を行う方針とした。

### 3. 結果

前半の 2 頭では 2 週目の IVUS 測定はシースを通して可能であったが、敗血症および創部閉鎖不全を来し、4 週目の実験前に死亡した。そのため後半の 2 頭に対しては、感染予防として内頸静脈より中心静脈カテーテルを留置したままとし、毎日抗生剤（セフメタゾールナトリウム 1g）の静注を行ったが、同様に敗血症を来し約 1 か月後に死亡した。

### 4. 考察

以上の結果により、体内にシースやカテーテルなどの異物を残したままにすると、動物の健康状態悪化をもたらす可能性が高くなることが推測されたため、以降の実験は異物を体内に残さずに測定ごとにシースの挿入および抜去を行う方針とした。

## B. 予備実験（2）

### 1. 目的

実験ごとに頸動脈にシースの挿入および抜去を行う方法を確立することと、ステント留置後再狭窄の経時的変化を予め測定して観察期間を決定することを目的とした。さらに腸骨動脈と冠動脈の血流を測定し、血流の均一性に関する検討を行った。

### 2. 方法

クラウン系ミニブタ（Japan Farm Co., Kagoshima, Japan）8頭：雄3頭、雌5頭、体重  $24.1 \pm 3.2$  kg、月齢  $9.8 \pm 1.7$  ヶ月を使用した。ステント留置や IVUS 測定後、毎回シースを抜去して頸動脈の縫合を行い、血流を保つことで次回の測定時にも同じ血管を使えるように工夫した。抗生剤の投与は実験中の 2 回のみ（手術開始時と閉創時にセフメタゾールナトリウム 1g を静注）とした。両側の外腸骨動脈および内腸骨動脈に左右異なるように F-DLC coated stent と BMS を留置し、以降 2 週間間隔に IVUS 測定を行った。基本的に本実験と同様の方法にて実験を施行し、8 週目までフォローアップを行う方針とした。

また、ステントを留置する前に、全 8 頭に対して腸骨動脈の血流測定を行い、

2 頭に対して冠動脈の血流測定を行った。血流量は Doppler guidewire (FloWire; Volcano, Rancho Cordova, CA, USA) を目的部位に挿入して測定された平均血流速度 (APV = average peak velocity) を元に、 $\text{Flow volume} = 0.5 \times \text{APV} \times \text{血管断面積}$  (IVUS 測定値) により算出される<sup>73</sup>。左右腸骨動脈の血流の相関関係は級内相関係数を用いて解析した。

### 3. 結果

全 8 頭において予定通り実験を完遂することが可能であった。2 週間間隔の頸部処置ならびに IVUS 測定も完遂し、動物の食欲減衰やうい瘦を認めなかった。前半の 4 頭 (オス 1 頭、メス 3 頭) に対する IVUS による繰り返しの測定の結果、新生内膜は 8 週経過しても退縮傾向を認めなかったため、後半の 4 頭 (オス 2 頭、メス 2 頭) は 12 週目までフォローアップ期間を延長した。その結果、外腸骨動脈と内腸骨動脈に留置した BMS において、平均するとそれぞれ 10 週目、8 週目に新生内膜増殖のピークを同定することが可能であった (図 7)。F-DLC coated stent の狭窄率は BMS と同様であったが、後日の電子顕微鏡による観察でコーティングの剥離が確認され、ステントが未完成であることが確認された。

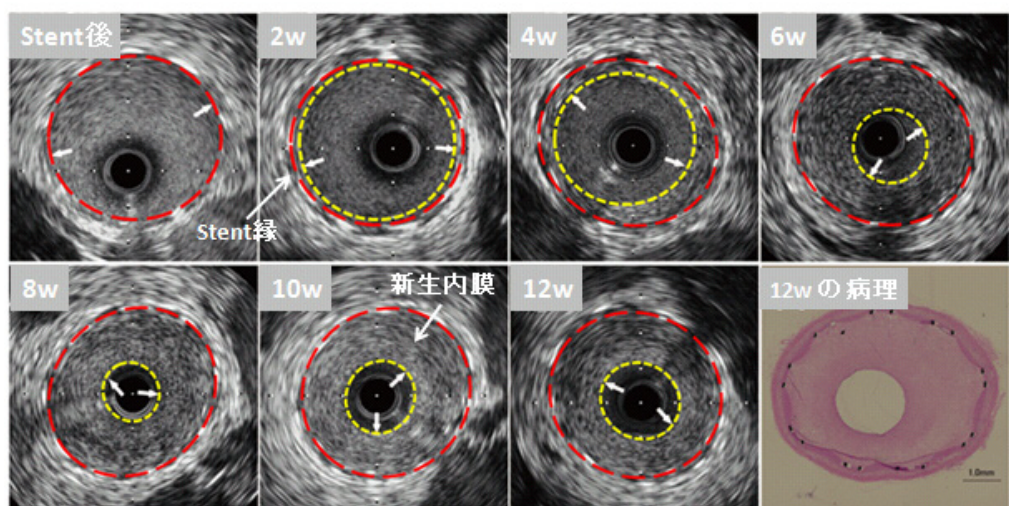


図 7. 内腸骨動脈に留置した BMS の IVUS 経過例（予備実験の結果）  
新生内膜の増殖が 8 週でピークとなり、その後軽度退縮している。

腸骨動脈の血流測定結果を図 8 に示す。ミニブタの腸骨動脈は肉眼解剖学的に左右対称であるが、クラウン系ミニブタ 8 頭の外腸骨動脈と内腸骨動脈における血流量を実際に測定したところ、左右がほぼ対称であることが確認された（級内相関係数：外腸骨動脈  $r = 0.93$ 、内腸骨動脈  $r = 0.96$ ）。

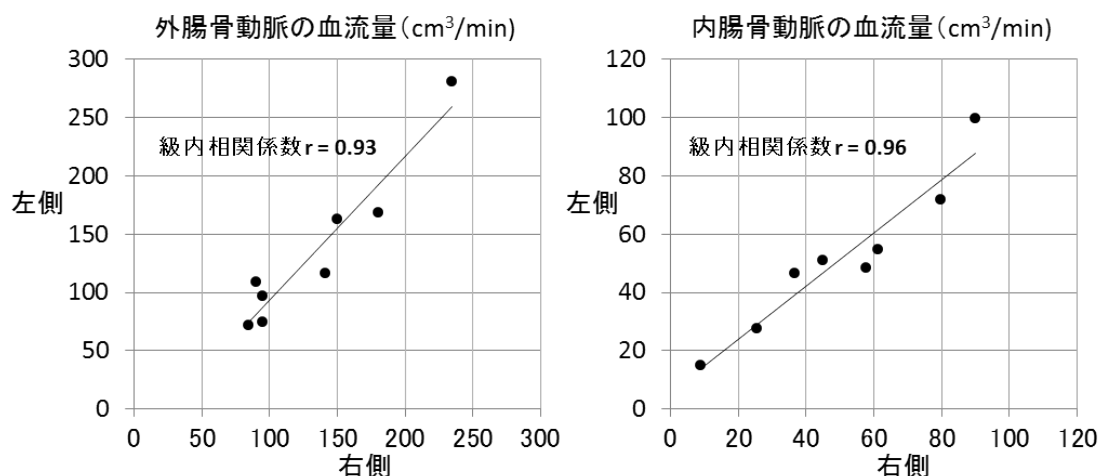


図 8. ミニブタ 8 頭における左右の外腸骨動脈と内腸骨動脈の血流（予備実験）  
血流測定の結果、外腸骨動脈と内腸骨動脈において左右の血流は均一であることが示された。

一方、冠動脈血流を測定した結果を図 9 に示す。2 頭のみのデータのため推測の域を出ないが、主要な 3 血管の血流は大きく異なることが推測された。

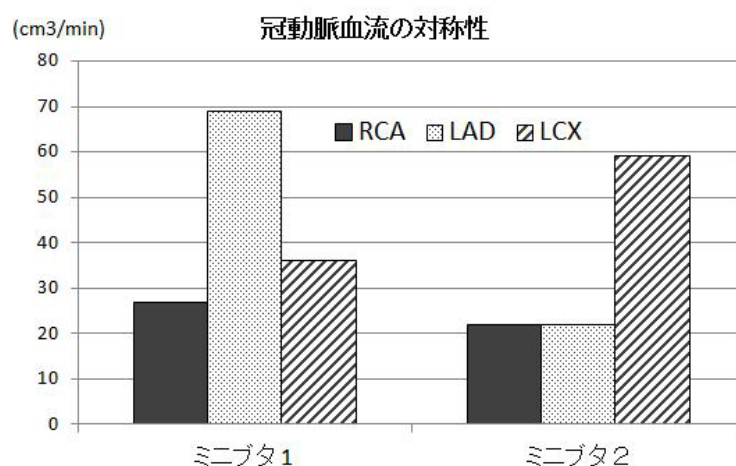


図 9. ミニブタ 2 頭の冠動脈血流

冠動脈の血流はそれぞれ大きく異なることが示唆された。

RCA = right coronary artery、LAD = left ascending artery、LCX = left circumflex artery

#### 4. 考察

以上の結果より、頸動脈に挿入したシースを測定終了後に毎回抜去し、血管縫合して血管を温存することによって、繰り返しの測定が可能になることが示唆された。また、本実験での観察期間は、新生内膜が軽度退縮傾向を示した後の 12 週間（3 ヶ月）のフォローアップで充分と思われた。さらにミニブタの腸骨動脈は冠動脈と異なり、血流が対称性であることが確認され、2 種類の異なるステントの狭窄率比較に適していると考えられた。



## V. 材料と方法

### A. 材料

#### 1. 動物：

ゲッチング系ミニブタ (Ellegaard, Dalmose, Denmark) 12 頭を使用 (図 10)。

オス 6 頭、メス 6 頭。術前体重  $22.9 \pm 4.8$  kg、月齢  $14.7 \pm 5.5$  ヶ月。

予備実験の結果をもとに、観察期間を 12 週間 (3 ヶ月間) と設定した。また、従来のモデルで急性期評価の **time point** として汎用されている 2 週群、4 週群も追加して、必要な病理標本を補足した。即ち、長期フォローアップ群としての 12 週群に 8 頭、短期フォローアップ群としての 4 週群および 2 週群に 2 頭ずつ振り分け、合計 3 群とした (表 5)。実験スケジュールを表 6 に示す。



図 10. ゲッチンゲン系ミニブタ

表 5. 使用動物一覧

No.	性別	月齢	体重 (kg)	評価群 (週)
1	M	18	28.9	12
2	M	19	26.6	12
3	M	20	23.8	12
4	M	25	31.5	12
5	F	10	21.0	12
6	F	10	23.5	12
7	F	11	21.3	12
8	F	11	24.0	12
9	M	9	13.4	4
10	F	11	21.6	4
11	M	21	18.1	2
12	F	11	20.6	2

表 6. 実験スケジュール

	Stenting	2 週	4 週	6 週	8 週	10 週	12 週
12 週群 (N=8)	4 本 / 1 頭	IVUS	IVUS	IVUS	IVUS	IVUS	IVUS 病理
4 週群 (N=2)	4 本 / 1 頭	IVUS	IVUS 病理				
2 週群 (N=2)	4 本 / 1 頭	IVUS 病理					

N = 動物数、IVUS = intravascular ultrasound

## 2. ステンント

評価対象として *in vitro* で優れた抗血栓性が証明されているフッ素添加 DLC (diamond-like carbon) コーティングステント (F-DLC coated stent) を適用し、コントロールとして従来の金属ステント (BMS ; bare metal stent) を用い、両者の狭窄率を比較した。

### a. 金属ステント (BMS; bare metal stent)

本研究では、コントロールの BMS として KW39 stent (Kawasumi Laboratories, Inc., Tokyo, Japan) を使用した。KW39 stent は 316L ステンレス製のヒト冠動脈用チューブ型ステントであり、すでに治験が終了している<sup>74</sup>。

KW39 stent system は冠動脈用であるため直径 2.5 mm から 4.0 mm のサイズ対応であったが、今回の実験のために直径 4.5 mm から 6.0 mm のステントを事前

に追加で作成した（図 11）。拡張時の規定圧は 8–10 atm であり、血管サイズによりステントサイズと拡張圧を決定するコンプライアンス表が用意されている。

b. フッ素添加 DLC コーティングステント (F-DLC coated stent)

F-DLC coated stent は、コントロールとなる KW39 stent をプラットフォームとし、表面に F-DLC 膜をコーティングして作製したものである (ONWARD-GIKEN Advanced Coating Technology Institute, Ishikawa, Japan)。アセチレンやフロン 116 の混合気体を原料として高周波プラズマ CVD (chemical vapor deposition) 装置を用いてコーティングされている（図 11）。

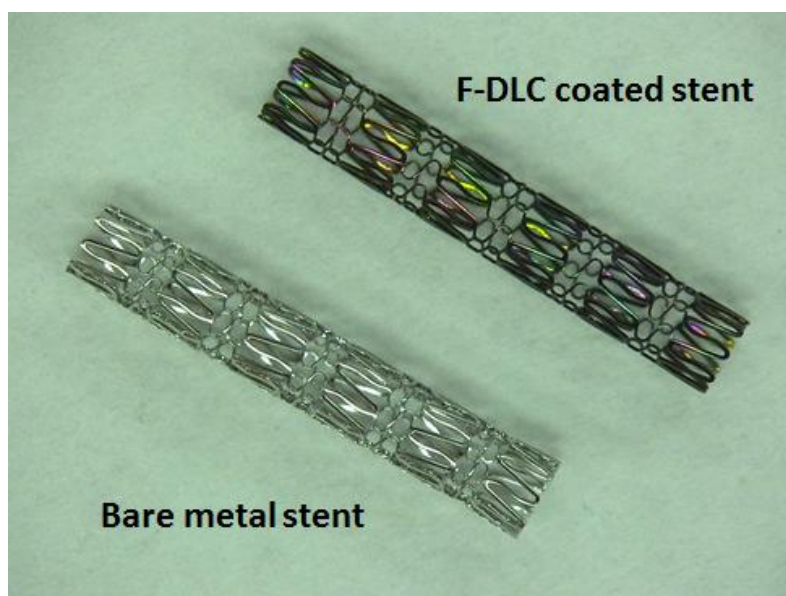


図 11. F-DLC coated stent と BMS (KW39 stent)

### 3. 血管内超音波 (IVUS: Intravascular ultrasound)

本研究では、ヒト臨床で主に使用されている IVUS システム (iLab; Boston Scientific, Natick, USA) を用いている (図 12)。イメージングカテーテル (Atlantis SR Pro; Boston Scientific) の先端部に周波数 45MHz の超音波発信器が組み込まれており、角度 1° につき 256 本の超音波走査線が存在する。これが 1800 rpm の速度で回転することでトランスデューサを介して血管の断面像が得られる。焦点距離は 2 mm、距離分解能 100  $\mu\text{m}$ 、方位分解能 200  $\mu\text{m}$  であり、直径 6 mm までの血管に使用可能である。目的部位の遠位部から近位部へ一定の速度で超音波発信器が移動する自動プルバックシステムを使用すると、連続的な血管断面図が得られ、ステントや血管内腔の体積測定が可能となる。全ての画像データ記録は DVD に保存され、オフラインでの解析も可能である。本研究では、IVUS システムに付属している専用ソフトウェア (iReview; Boston Scientific) を用いてステント内側縁及び血管内腔外側縁を描画し、それぞれステント面積と血管内腔面積を求め、その差を新生内膜の断面積とした (図 12)。

これまでの動物実験による狭窄率の評価手段としては、主に血管撮影と病理評価が用いられている (図 13)。血管撮影は内腔のみを 1 次元的に観察するものであるため、新生内膜量を把握することは不可能であり、また狭窄率も過小評価となりやすいといわれる<sup>75</sup>。病理評価は組織学的に炎症などの詳細な観察を行

うには適しているが、灌流固定でも血管の縮みは避けられないため新生内膜量が過大あるいは過小評価されるリスクがある<sup>76</sup>。さらに一つのステントから作製できる病理標本は多くても4-5枚に限られ、ステント全長における連続的な評価を行うことは困難である。

一方、IVUSは生体内でステント留置部周辺を含めて病変全体を三次元的に構築するため、新生内膜や狭窄率の評価にはIVUSが最適といわれ<sup>77,78</sup>、病理評価と異なり動物を安楽死する必要がなく、使用する動物を減らせることも利点である。但し、観察中の操作でカテーテルが病変部を通過する際に血管内腔面を損傷し、新生内膜の増殖反応に影響を及ぼす可能性があるため、とくに細い血管においてはカテーテル操作に十分な注意を払う必要があるといわれている<sup>55</sup>。

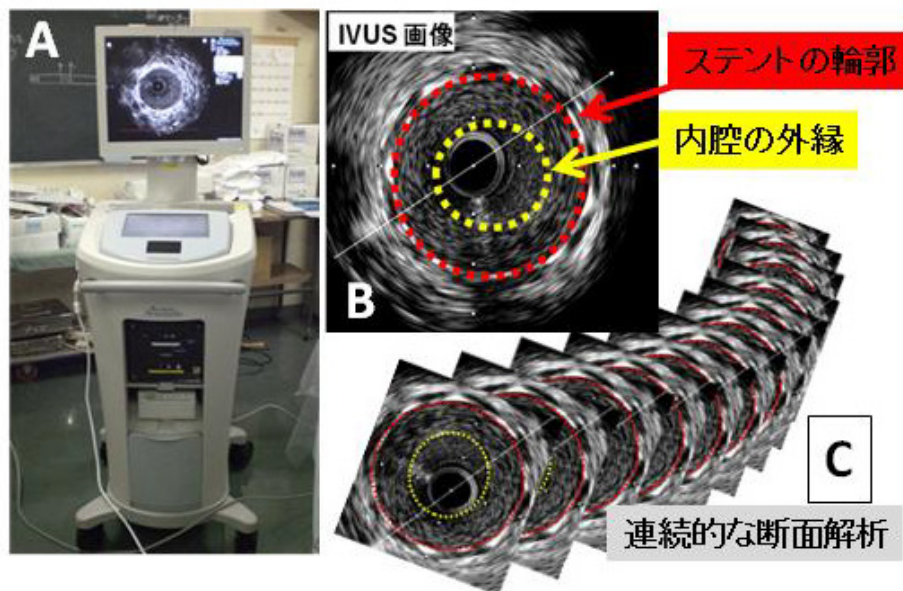


図 12. IVUS システム

- A. IVUS システム (iLab)
- B. IVUS より得られる血管断面図。ステントや血管内腔の輪郭が描出される。
- C. 目的部位全長にわたる連続的な断面解析が可能。

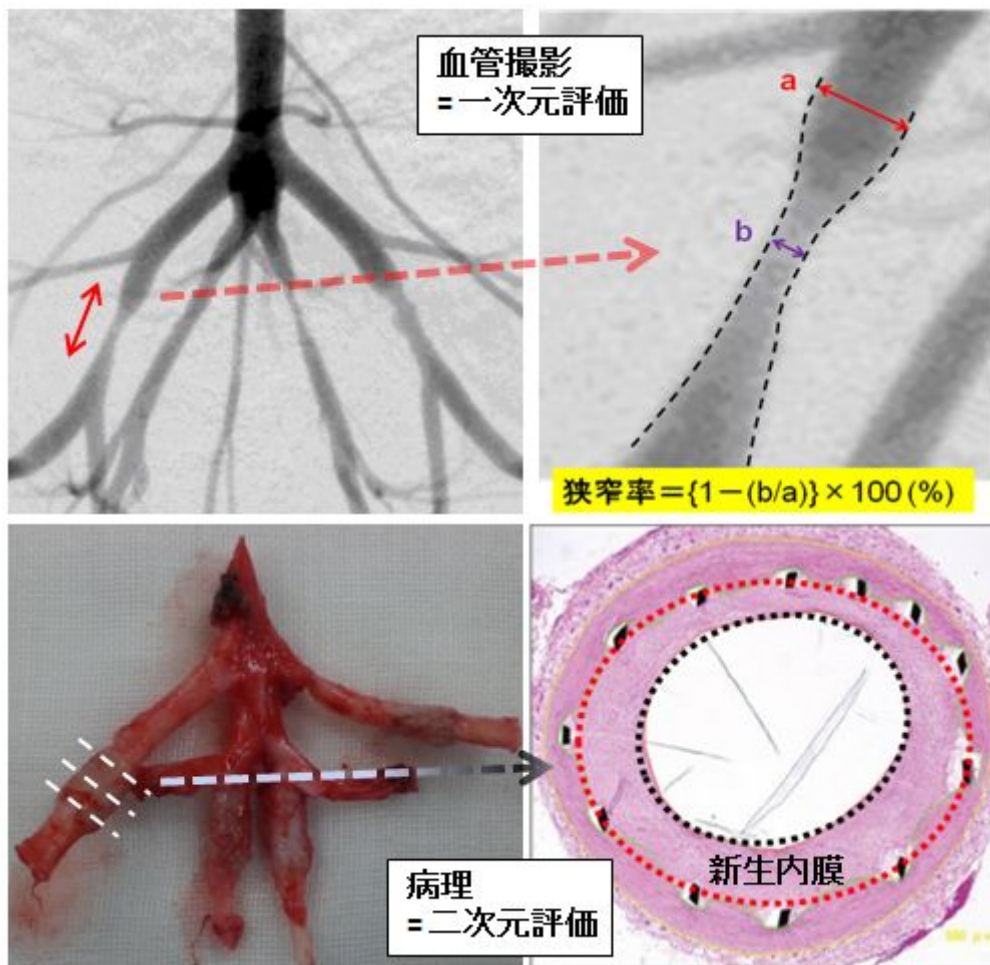


図 13. 血管撮影と病理学的評価

血管撮影（上段）は一次元的な観察で、血管内腔のみ描出可能で、新生内膜の量は評価できない。病理評価（下段）は詳細な組織学的観察には適しているが、処理の際に血管が縮むことは避けられないため、新生内膜量が変化する。

## B. 実験方法

実験においては東京大学動物実験実施マニュアルを遵守し、医学系研究科動物実験委員会によって承認された実験計画に基づいて実施した（承認番号：医-H08-022）。動物の周術期管理、及び IVUS や病理評価の手順や評価項目は、基本的に従来動物モデルにおける標準的な方法に準じている<sup>53, 55, 79-81</sup>。周術期の管理は実験動物医学の専門獣医師（DJCLAM; diplomate of the Japanese College of Laboratory Animal Medicine）の指導管理のもとに行った。

### 1. 術前処置

ステント留置術の 1 週間以上前に東京大学生命科学実験棟へ動物を搬入し、以降の飼育及び実験は当施設にて行った。食餌はミニブタ用の普通食ペレット（実験用小型ブタ用固型飼料 MP; ORIENTAL YEAST, Tokyo, Japan）を 1 日 1 回、400-500 g/日を給餌した。実験の bias を最小限に抑えるため、抗血小板薬の内服は行っていない。

手術当日は絶食とし、麻酔前投薬としてミダゾラム 0.5 mg/kg（Astellas, Tokyo, Japan）とキシラジン 2.0 mg/kg（Bayer, Leverkusen, Germany）の筋肉注射を行った。全身麻酔の維持にはイソフルラン 0.5–1.5%（Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka, Japan）にて調節した。直径 6.0–7.0 mm の気管チューブを経口挿管し、



人工呼吸器（Pro-45, Acoma, Tokyo, Japan）に接続した。耳静脈より点滴ラインを確保し、生理食塩水を 100 mL/h の速度で drip した。抗生剤はセフメタゾールナトリウム 1g（Daiichisankyo; Tokyo, Japan）を手術開始時と閉創時に経静脈的に投与した。手術中のモニターとして四肢誘導心電図、心拍数、血圧（尻尾の正中仙骨動脈）、酸素飽和度、直腸温を装着しバイタルサインの管理を行った（図 14）。

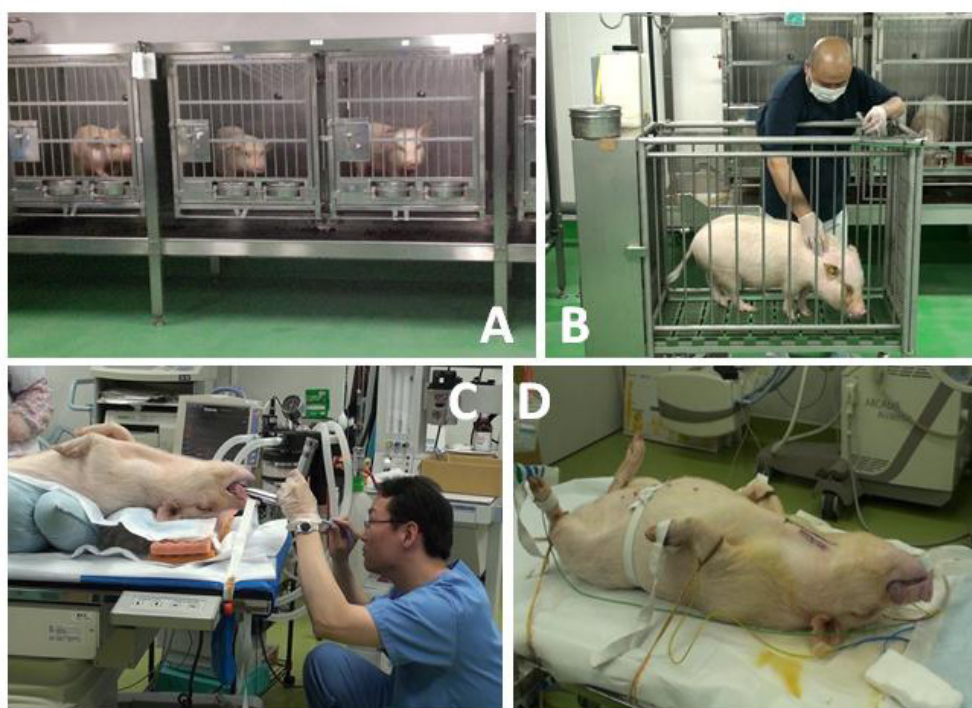


図 14. ミニブタの術前処置

A. ミニブタの飼育環境、B. 麻酔前投薬の筋注、C. 経口挿管、D. Set up 完了

## 2. 頸動脈への外科的処置

全ての外科的処置及びカテーテル手技は清潔環境下に施行した。仰臥位にて

頸部正中から左へ約 2–3 cm の部位に 5 cm の斜切開を置いた。左胸骨乳突筋と胸骨舌骨筋の間を進入し、頸動脈鞘に到達。左総頸動脈を血管テープにて確保後、逆行性に 7 Fr シースを穿刺し血管内に留置した（図 15）。シースより血液を 5mL 採取（血液検査用）し、ヘパリン 100 単位/kg（Ajinomoto, Tokyo, Japan）を静脈注射し全身のヘパリン化を行った。その後は 1 時間おきにヘパリン 40 単位/kg を追加投与した。

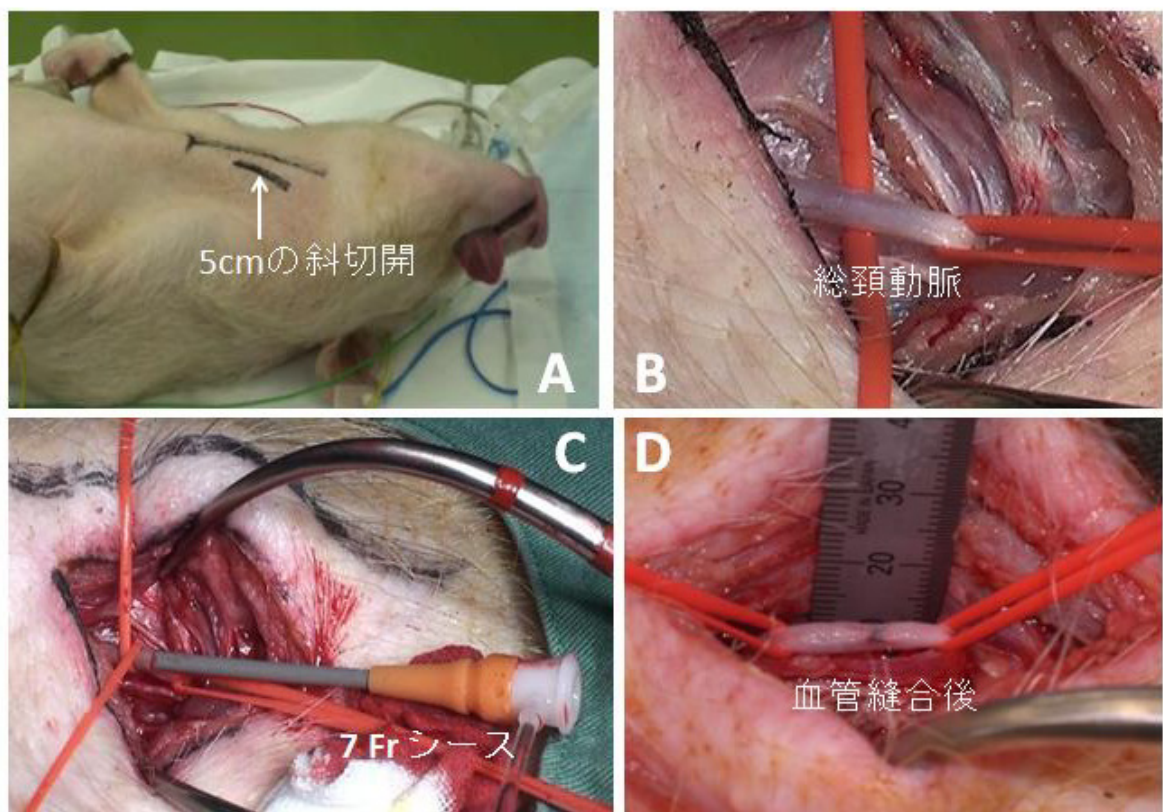


図 15. 総頸動脈へのシース留置

A. 皮切。B. 総頸動脈確保。C. シースの留置。D. 血管縫合。

### 3. ステンント留置術

手技は全て臨床仕様の C-arm X 線イメージングシステム (ARCADIS Avantic; Siemens, Munich, Germany) による透視下にて施行した。まず頸部に留置されたシースを通して 7 Fr ガイディングカテーテル (Envoy; Cordis, Miami, FL, USA) を腹部大動脈末梢部に誘導し血管撮影を施行。左右の外腸骨動脈及び内腸骨動脈が描出され、それらをガイド下にして各血管に 2.1 Fr マイクロカテーテル (Tangent; Kawasumi Laboratories, Inc., Tokyo, Japan) を導入してニトログリセリン 0.2 mg (Nipponkayaku, Tokyo, Japan) を動注し、IVUS 操作による血管攣縮を予防した。続いて IVUS カテーテルを各血管に誘導し、ステント留置前の血管径を測定した。ステント留置を行う部位は、分枝血管が存在しないところで、かつ左右の血管径が同等となるよう設定した。ステントのコンプライアンス表を参照して、使用するステントサイズと拡張圧を決定した。元の血管径に対するステント径の比 (ステント血管径比 =  $\text{Stent/artery ratio}$ ) はステント評価時のスタンダードとされる 1.0~1.1 に設定した<sup>55</sup>。BMS と F-DLC coated stent を左右の外腸骨動脈および内腸骨動脈に合計 4 本留置したが、ステントをカテーテル内に挿入するまでの操作は助手が行うため、術者 (研究者) はどちらにどのステントを留置したかを認識できない。さらに X 線透視にてもステントの種類の判別は困難であるため、全ての実験が終了するまで術者はステントの種類を判別

できない。血管撮影にて急性閉塞の有無を確認し、続けて再び IVUS を導入。ステントより 5mm 遠位部から自動プルバック 0.5 mm/s を施行し、血管解離など合併症の有無の確認やステント径の計測を行った（図 16, 17）。



図 16. 手術室の様子  
A. C-arm 透視下での手技。B. IVUS 測定。C. 自動プルバック装置。

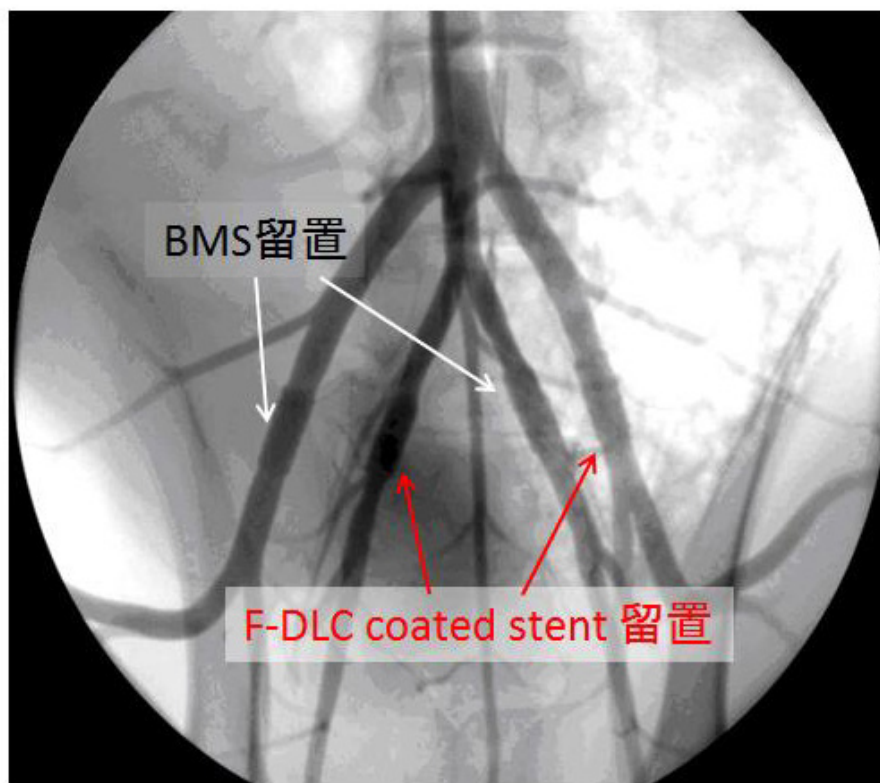


図 17. ステント留置直後の血管撮影  
外腸骨動脈及び内腸骨動脈に左右異なるステントをそれぞれ留置した。

#### 4. 閉創、術後処置

IVUS のデータを確認後、カテーテルおよび頸動脈シースを抜去し、頸動脈を閉塞させないように注意しながらシース刺入孔の縫合を行った (図 15D)。その後、頸部の筋層、皮下、皮膚を層々縫合して手術を終了とした。抗生剤はセフメタゾールナトリウム 1g を手術開始時と閉創前に静注投与した。麻酔からの覚醒を確認した後に抜管し、飼育室へ帰室とした。手術当日は禁食、翌日より通常の給餌とした。

#### 5. フォローアップ

ステント留置後は 2 週間間隔で 12 週目まで (12 週群 8 頭)、4 週目まで (4 週群 2 頭)、2 週目まで (2 週群 2 頭) のフォローアップを行った。全身麻酔管理下に前回の創部を切開して総頸動脈を確保するが、前回手術操作を行った部分は組織の癒着の影響で剥離困難なため、前回穿刺した位置よりやや近位部を新たに穿刺して 6 Fr シースを留置した (図 18)。左総頸動脈に対してシース留置が困難と判断された場合は右総頸動脈へのアプローチに切り替えた。各ステント留置部位 (合計 4 血管) に対して IVUS を施行。ステントより 5mm 遠位部から 5mm 近位部まで、0.5 mm/s の速度にて自動プルバックを行った (図 19)。IVUS カテーテルの操作は、まずステント内を通して遠位部まで誘導し、自動プルバ



ック終了後にゆっくりとカテーテルを引き戻すが、その際にカテーテルによる血管内腔面の損傷を来さないよう、ステント内での無駄なカテーテル操作を避け、1往復の操作となるよう心がけた。検査終了後は初回と同様にシース刺入孔の縫合を行った。この時点で総頸動脈が既に閉塞している場合には結紮処理とした。閉創は初回と同様に行った。

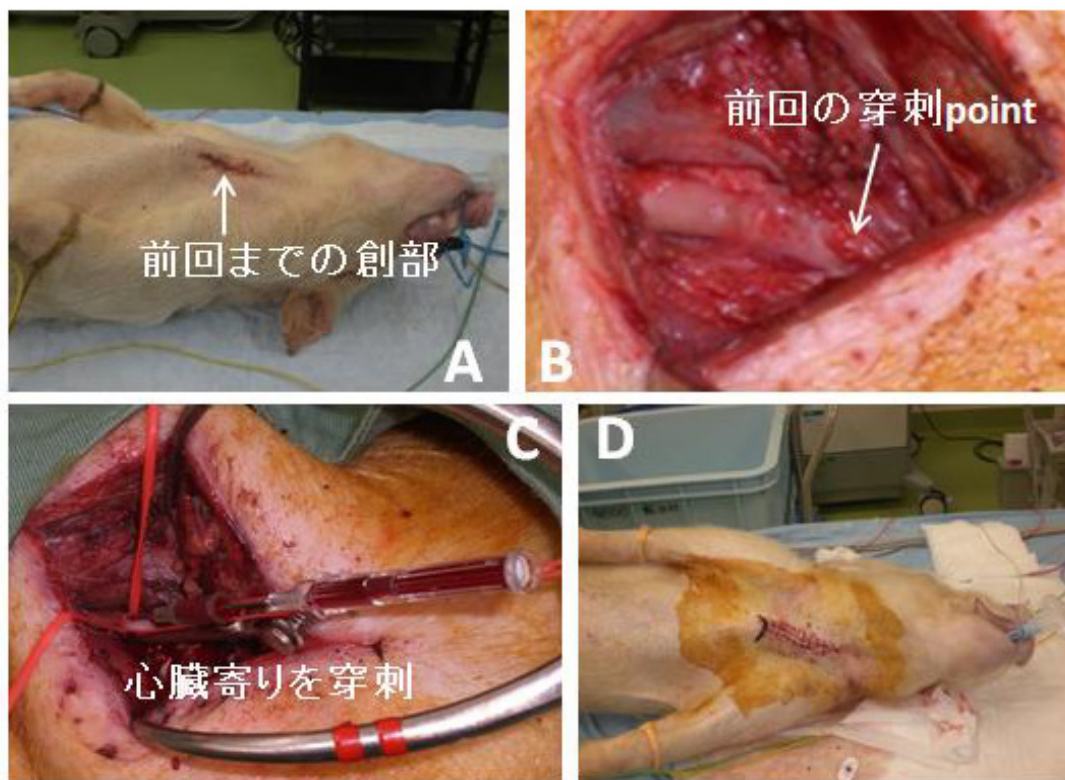


図 18. フォローアップ時の頸部処置

A. 2週間前の創部は治癒している。B. 前回穿刺部の癒着。C. 心臓寄り（近位部）の正常部を穿刺。D. 閉創。

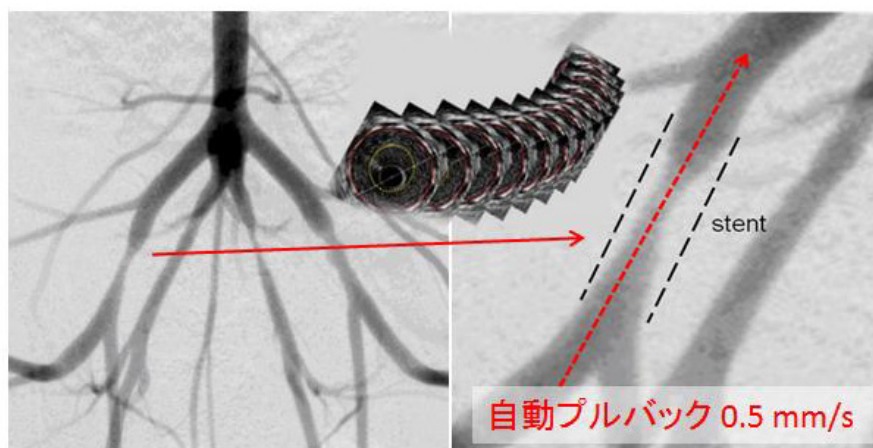


図 19. IVUS フォローアップ：

## 6. 病理標本の作製

最終フォローアップ時の IVUS 終了後に、病理標本を採取した。IVUS 検査終了後、腹部を正中切開し、腹部大動脈を確保する。腹部大動脈を結紮処理し、その下流にヘパリン加生理食塩水 1000 mL、続けて 10% 中性緩衝ホルマリン液を 1000 mL、約 100 mmHg の圧で流して灌流固定を施行した。後大静脈（ヒトの下大静脈に相当）を切開して排液を行う。全身麻酔下の脱血処理により安楽死となる。両後肢（ヒトの下肢に相当）の筋収縮及び硬直を確認した後、両側の外腸骨動脈と内腸骨動脈に留置されてあるステントを断端 5 mm 以上の余裕を持たせて血管ごと摘出して、ホルマリン液に浸漬した。検体を樹脂包埋し、タングステンカーバイド製マイクローム刃によりステントごと血管を薄切り（5  $\mu\text{m}$ ）して切片を作製、続いてヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。

一つのス TENT 血管につき 3 ヶ所の標本を作製した（ス TENT 内 3 ヶ所：ス TENT の中央部と両端より 2mm）（図 20）。

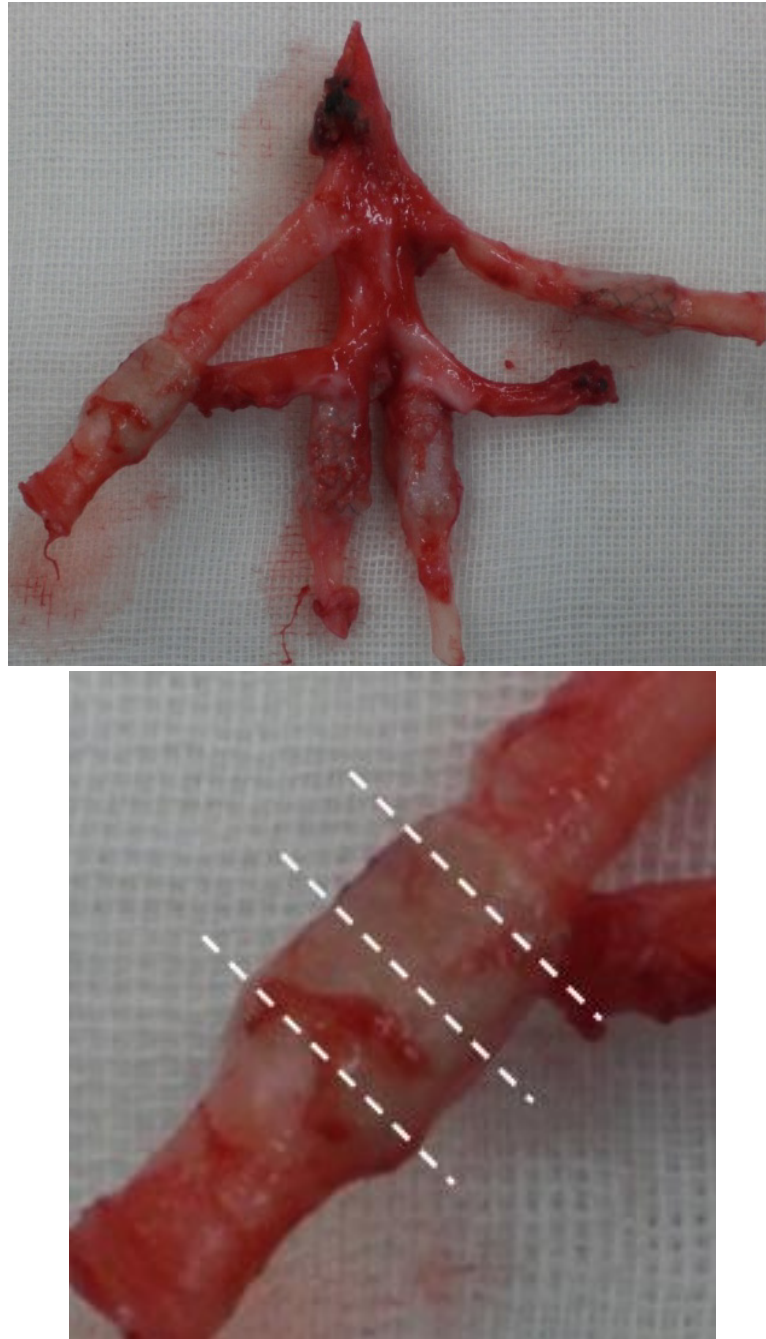


図 20. ス TENT 血管の摘出、病理標本の作製  
1 つのス TENT 血管に対して 3 断面の標本（中央部と両端から 2mm）を作製。



## C. 評価項目

### 1. 動物の健康状態の評価

本研究では 2 週間間隔で全身麻酔、頸動脈処置、IVUS 検査を繰り返し施行するため、これらの侵襲によりミニブタの健康状態が悪化し、新生内膜増殖に影響をもたらす可能性がある。さらに本研究では頸動脈閉塞による脳梗塞発症のリスクもあるため、観察期間中随時以下の健康状態の評価を行った。

#### a. ミニブタ健康スコア

これまで動物の健康状態を評価する健康スコアとして、イヌの実験でも用いられる Clinical Behavior Score<sup>82</sup> と、ミニブタ脳梗塞モデル実験で用いられる Neurological grading Score<sup>83</sup> がある。今回はこれらを改変してミニブタ健康スコア (Total score 0-21) を作成し、実験期間中ミニブタの健康状態のチェックを行った (表 7)。

表 7. ミニブタ健康スコア

Signs	Description	Score
Appetite	All food consumed	0
	More than 50% food consumed	1
	50% food consumed	2
	Less than 50% food consumed	3
	No food consumed	4
Standing position	Normal standing position	0
	Unstable when standing	1
	Standing with support (leaning against wall)	2
	Stands up on stimulation	3
	Lying down: unresponsive to stimulation	4
Head position	Immobile	5
	Head erect	0
	Head raised on stimulation	1
	Unable to raise head	2
Utterance	Normal spontaneous vocalization	0
	Vocalizes on stimulation	1
	No vocalization	2
Motor function		
Forelimb	No motor disturbances	0
	Some contralateral weakness (instability during movement)	1
	Moderate contralateral paresis (instability on standing)	2
	Severe contralateral paresis	3
	Complete contralateral paralysis	4
Hindlimb	No motor disturbances	0
	Some contralateral weakness (instability during movement)	1
	Moderate contralateral paresis (instability on standing)	2
	Severe contralateral paresis	3
	Complete contralateral paralysis	4
Total		0-21

食欲や姿勢、活気、四肢の麻痺などの項目よりなる（Clinical Behavior Score<sup>82</sup> および Neurological grading Score<sup>83</sup> の改変）。

b. 体重測定

2週間おきの実験ごとに、麻酔前投薬を投与後に体重測定を行った。

c. 血液学的評価

2週間おきの実験ごとに、頸動脈にシースを留置した直後にシース腔より血液を5 mL 採取し血液検査を行った。血算値は VetScan HM2 (Abaxis, CA, USA)、血液生化学は VetScan VS2 (Abaxis)、血液凝固系は Coag 2V (Wako, Osaka, Japan) を用いて計測した (図 21)。評価項目を表 8 に示す。

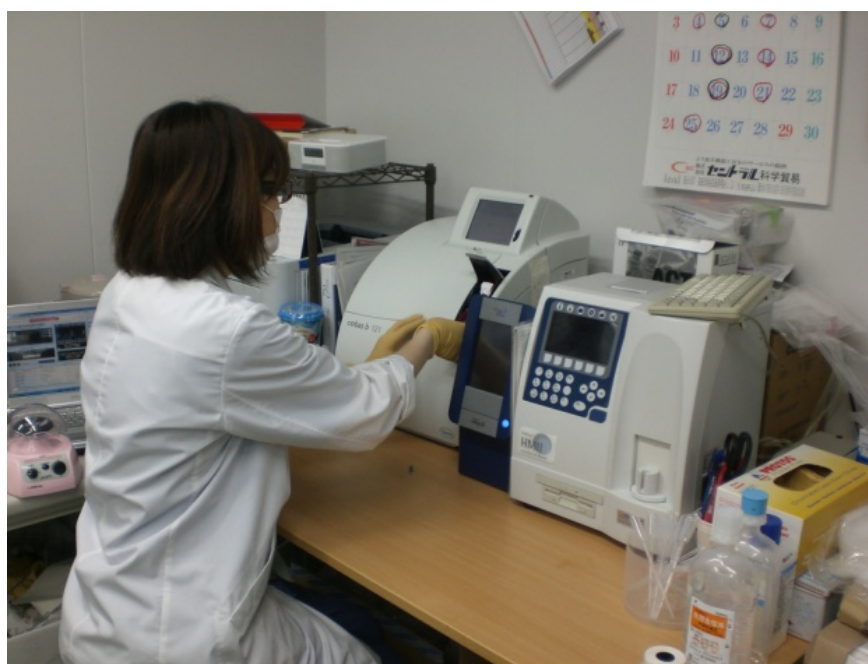


図 21. 血液検査装置

表 8. 血液検査項目

血算値	Hb, hemoglobin (g/dL); WBC, white blood cell count (/ $\mu$ L); PLT, platelet count ( $\times 10^4$ / $\mu$ L)
肝胆系機能	ALP, alkaline phosphatase (IU/L); ALT, alanine aminotransferase (IU/L); AMY, amylase ( $\times 10^2$ IU/L); TB, total bilirubin (mg/dL)
腎機能、電解質	CRE, creatinine (mg/dL); Na, serum sodium (mEq/L); K, serum potassium (mEq/L)
栄養状態、血糖値	ALB, albumin (g/dL); BS, blood sugar (mg/dL)
凝固系機能	PT, prothrombin time (sec); APTT, activated partial thromboplastin time (sec); FIB, fibrinogen (mg/dL)

## 2. IVUS による解析

ステントの近くに太い分枝血管が隣接することもあるため、IVUS の解析はステント内部に限定して行った。なお、描画解析は、専用ソフトウェア（iReview; Boston Scientific）を用いて、動物名やフォローアップ週、ステントの種類、血管名などのデータは全て blind にした上で行っている（図 22）。

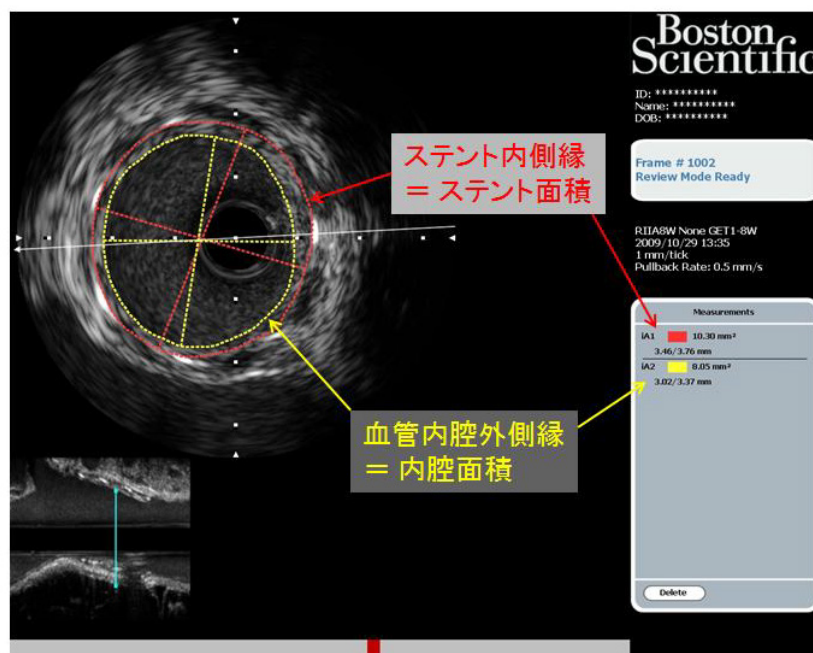


図 22. IVUS 専用ソフトウェア（iReview）による解析

算出データの一覧を表 9 に示す。面積データを 1 mm 間隔で解析し積分することにより各体積が得られる (Simpson 法)<sup>80, 81</sup>。IVUS による三次元的な解析から得られる最も重要なデータは %VO ; % in-stent volume obstruction (体積狭窄率) である (図 23 上)。%VO はステント全長にわたる 3 次元的新生内膜量の評価であり、ステントの有効性評価項目として一般的に用いられている。

しかし、臨床的にはステント全体の評価よりも、最大狭窄部位の程度の方が血流不全の有無に関連するため重要である。臨床では血管撮影により MLD ; minimum lumen diameter (最小内腔径) や %DS ; % diameter stenosis (径狭窄率) として評価されるが、本研究では血管撮影ではなく IVUS を行っているため、類似の評価項目として最も狭窄した局所の断面積を示す MLA ; minimum lumen area (最小内腔面積) の断面における %AS ; % area stenosis (面積狭窄率) = %AS at MLA を評価した (図 23 下)。この値が臨床的な狭窄率に相当する。以上の 2 種類の狭窄率評価項目 (%VO と %AS at MLA) の比較は、基本的に外腸骨動脈および内腸骨動脈のそれぞれにわけて解析を行った。さらに性別ごとの解析も追加して行った。

表 9. IVUS 計測により得られる代表データ

---

体積の評価

Stent, Lumen Volume (mm<sup>3</sup>) = ステント、血管内腔の体積

Neointimal Volume (mm<sup>3</sup>) = 新生内膜の体積

%VO ; Percent in-stent volume obstruction = 体積狭窄率 (%)

= (新生内膜体積 / ステント体積) × 100

- ・ステント内の新生内膜が占める体積の割合

---

断面積の評価

MLA ; Minimum lumen area = 最小内腔面積 (mm<sup>2</sup>)

- ・ステント内の内腔断面積の最小値

%AS ; Percent area stenosis = 面積狭窄率 (%)

= (新生内膜面積 / ステント面積) × 100

- ・本研究では MLA ポイントの狭窄率を算出 (%AS at MLA)

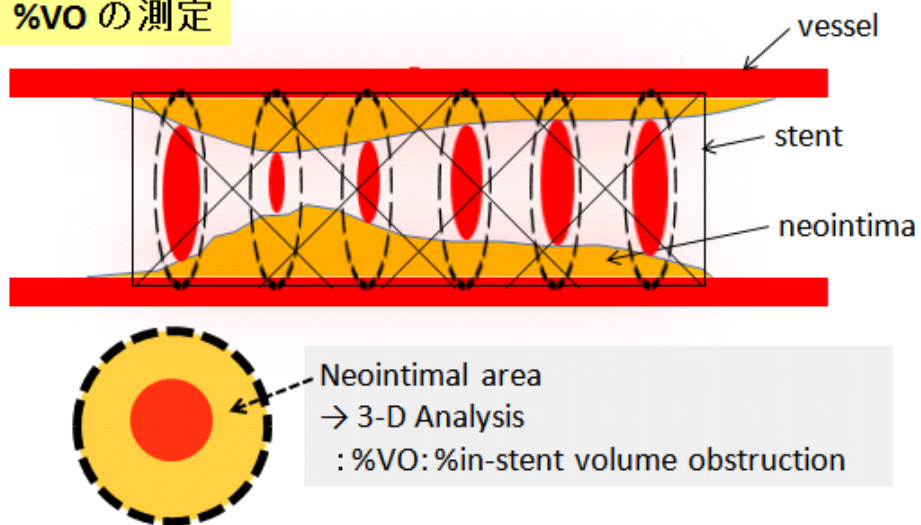
---

定性的評価

血栓の有無 : ステントあるいは新生内膜に付着する血栓の有無を評価

---

### %VO の測定



### %AS (at MLA) の測定

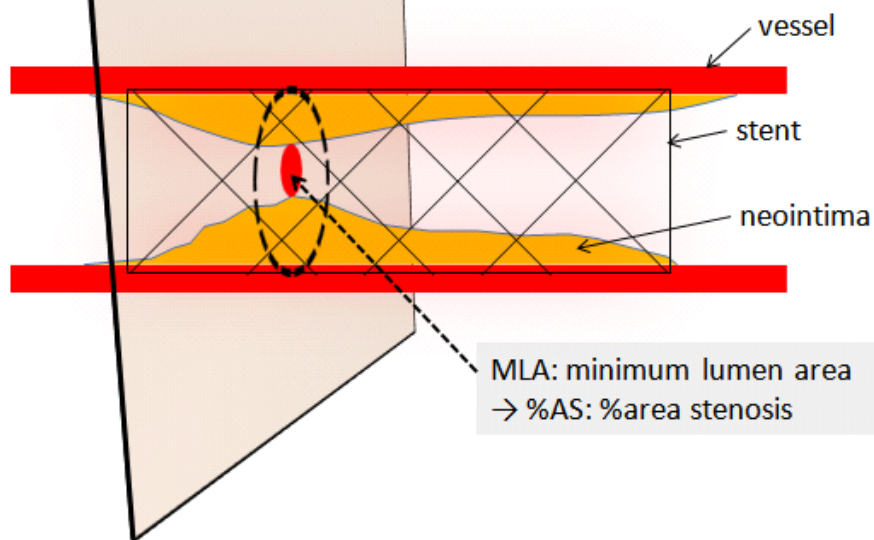


図 23. %VO と %AS at MLA

上 : %VO = スtent 全長にわたる 3 次元的な新生内膜体積の狭窄率

下 : %AS at MLA = 最大狭窄部位を示す断面における面積狭窄率

以上の狭窄率評価に加え、ステントや新生内膜に付着する血栓の有無を定性的に評価した。血栓の診断は IVUS に関する ACC (American College of Cardiology) clinical expert consensus document<sup>80</sup> に準じているが、血栓は以下の特徴を有する。

1. 血管内腔に分葉状もしくは有茎性、層状に観察される塊
2. 内腔に向かって凸な形状を示す
3. 拍動周期による変形や可動性を有する
4. 一般的に低輝度であるが、時に高輝度ともなる
5. 内部性状は顆粒状、もしくはちらつき像を呈する
6. 内部への切れ込みや、内部の微小管腔の中に血流を認める

また、本研究では IVUS 測定値の信頼性に関して、検者内信頼性および検者間信頼性を検討した。ランダムに抽出した 10 の IVUS 元データを、血管名を blind にした状態で Simpson 法によりステント体積と血管内腔体積、狭窄率を算出した値を比較した。検者内信頼性は同一検者（検者 1 = 研究者）が 1 週間間隔で 2 回測定したものを比較し、検者間信頼性は検者 1 と検者 2（実験協力者）の測定値を比較した。級内相関係数を用いて統計的に検討した（IBM SPSS Statistics version 19 ; SPSS Inc., IBM, Somers, New York, USA）。



### 3. 病理学的評価

#### a. 定性的評価

血管内腔面の組織を全周性に注意深く観察し、付着する血小板血栓やフィブリン血栓の有無を確認した。血栓が存在した場合にはその性質を詳細に記述した。さらに IVUS カテーテルの操作により血管内腔面に粗大な損傷や亀裂が生じているか否かを併せて評価し、損傷の性質を詳細に記述した。

#### b. 面積狭窄率

病理の画像解析は、恣意性を排除するため画像解析専門施設（Bozo Research Center Inc., Tokyo, Japan）に依頼した。画像解析装置（LUZEX AP; NIRECO, Tokyo, Japan）を用いて、内弾性板面積及び血管内腔面積を測定し（図 24）、その差が新生内膜面積となり面積狭窄率（histological %AS）が下記のように算出される。

3 つの切片より得られた値を平均化し代表値とした。

Histological %AS（面積狭窄率）＝（新生内膜面積／内弾性板面積）×100（%）

Histological %AS をステント間で比較するとともに、追加解析として、病理標本の採取直前に施行した IVUS から得られる %VO 値との相関関係の検討を行った。

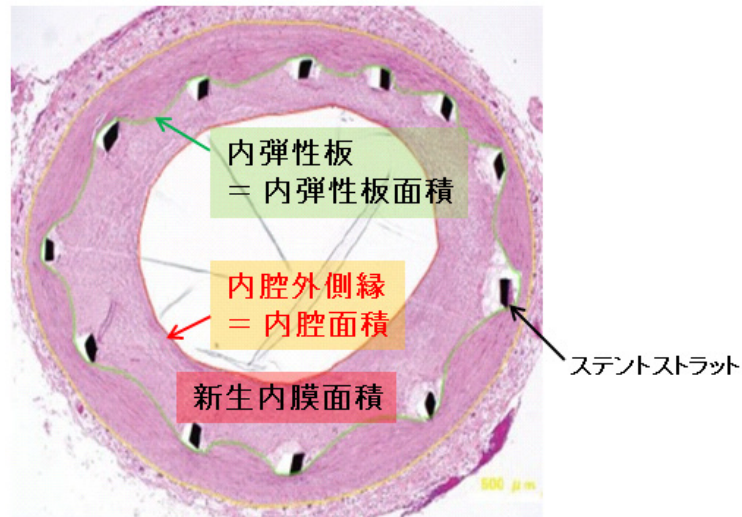


図 24. 病理標本による断面積評価

#### c. 損傷スコア、炎症スコア、組織被覆率

ステントの各ストラット周囲の損傷および炎症、組織被覆の程度を半定量的に解析した（Bozo Research Center Inc.）（表 10、図 25, 26）。

損傷スコア：Injury score (0–3)<sup>84</sup> はストラットによる血管壁の損傷の程度を示す。血管壁の損傷は新生内膜増殖に影響を及ぼすため、ステントの有効性を比較する際は過拡張を避け（Score 2 未満）、かつステント間で同等であることが望ましい。12 週群では損傷スコアと狭窄率の相関の有無についても検討した。

炎症スコア：Inflammation score (0–3)<sup>85</sup> はストラット周囲の炎症細胞浸潤の程度を示し、ステントの抗炎症性の性質を評価する項目である。

組織被覆率：%Strut tissue coverage (%) はステントストラットが内皮様細胞や新生内膜組織により被覆されているものの割合を示した<sup>56</sup>。以上の評価項目は、3 つの切片より得られた値を平均化し代表値とした。

表 10. ステントストラット周囲の半定量的評価

損傷スコア：Injury score

- 0：ストラットによる内弾性板の貫通はない。
- 1：ストラットが内弾性板を貫通する。中膜は圧排のみで貫通はみられない。
- 2：ストラットが内弾性板及び中膜を貫通する。  
外弾性板は圧排のみで貫通はみられない。
- 3：ストラットが内弾性板及び中膜を経て外弾性板を貫通し、時折外膜に達する。

炎症スコア：Inflammation score

- 0：ストラット周囲に炎症性細胞がみられない。
- 1：ストラットを取り囲む領域の一部分に少数のリンパ球や組織球がみられる。
- 2：ストラット周囲に多数のリンパ球や組織球がみられるが、全周性ではない。
- 3：ストラット全周性に多数のリンパ球や組織球がみられる。

組織被覆率：%Strut tissue coverage

内皮様細胞や新生内膜組織により被覆されているストラットの割合（％）。

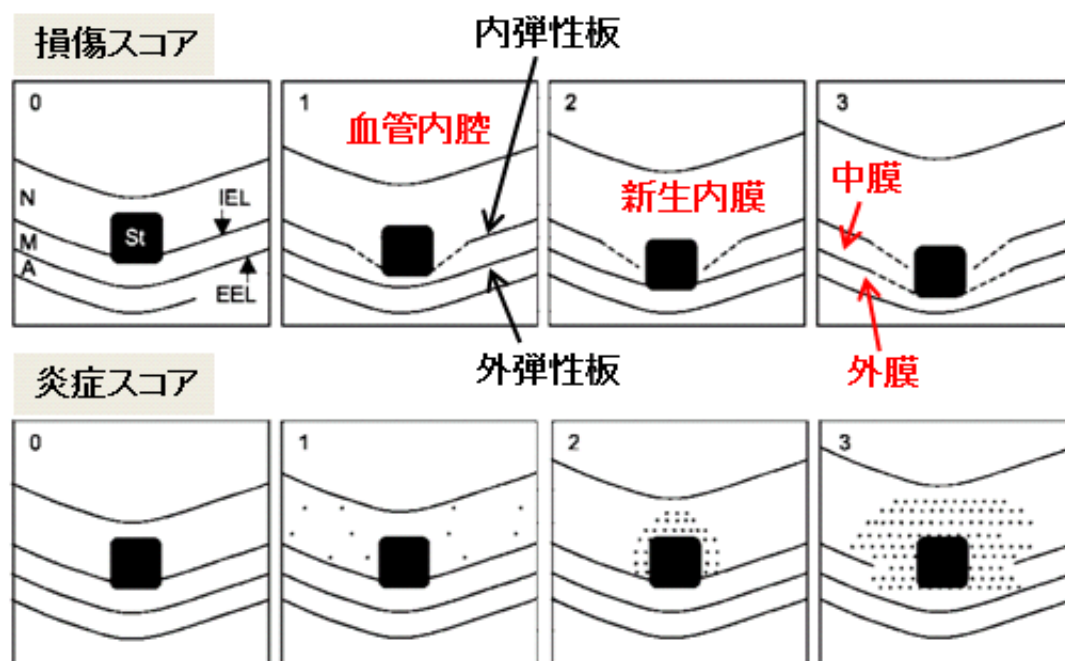
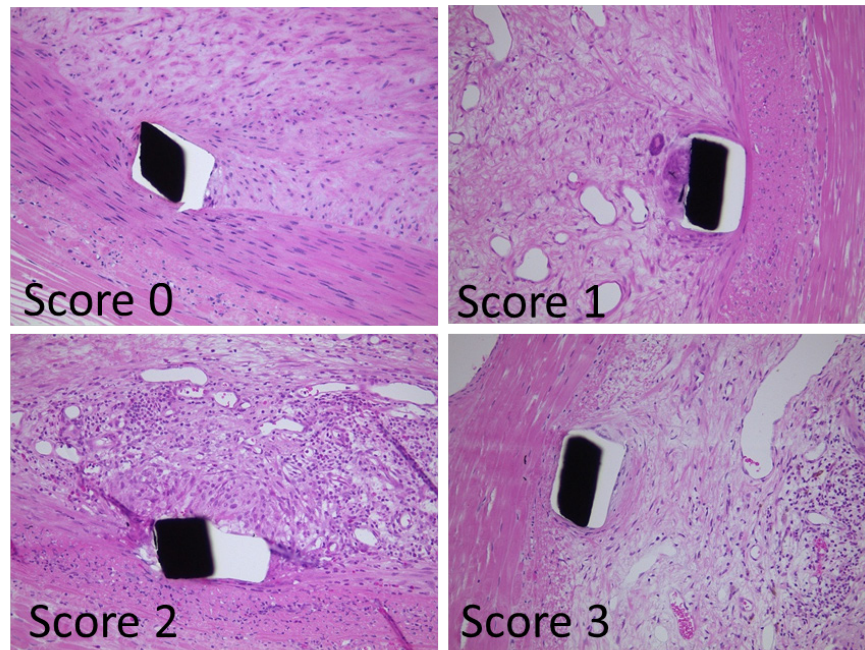


図 25. 損傷スコアと炎症スコアの模式図（文献 53 より引用）

損傷スコア(0-3)



炎症スコア(0-3)

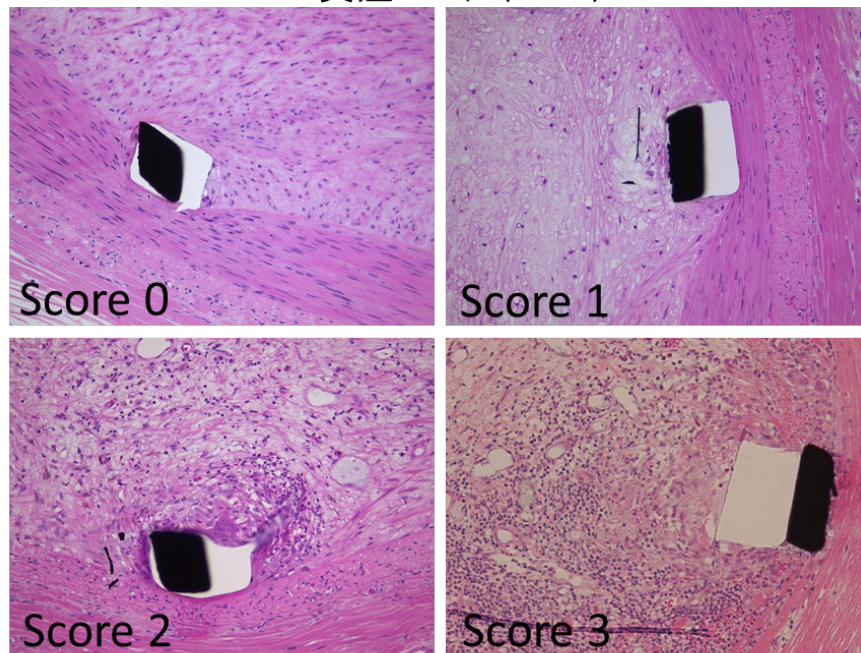


図 26. 損傷スコアと炎症スコアの代表写真（本研究結果の一部を抜粋）

#### 4. 統計解析

連続変数は平均±標準偏差にて表示した。対応のあるペアごとの 2 群間の検定にはウィルコクソンの符号順位検定 (Wilcoxon signed-rank test) を適用し、 $n < 6$  の時は Paired t-test を用いた。2 種類の連続変数の相関関係はピアソンの積率相関係数 (Pearson product-moment correlation coefficient) にて評価した。経時的な繰り返しのデータの比較には、2-way repeated measures ANOVA を使用し、群間の差を検定した。解析ソフトは JMP version 9.0.0 (SAS Institute Inc., NC, USA)、または IBM SPSS Statistics version 19 (SPSS Inc., IBM, Somers, New York, USA) を使用した。P 値 0.05 未満の場合を有意差ありとした。

## VI. 結果

全ての実験は予定通り完遂され、動物の健康状態も良好で問題なかった。以下、実験結果を項目別に示す。

### A. 実験手技および動物の健康状態

#### 1. 手術時間と実験手技

##### a. 手術時間

手術時間を表 11 に示す。ステント留置術及び剖検時は 3 時間弱、フォローアップ時は 1 時間強の手術時間であった。

表 11. 手術時間

手術総時間	ステント留置	158.3 ± 16.6 分
	フォローアップ時	69.2 ± 12.7 分
	剖検時	160.7 ± 27.2 分
<hr/>		
手術開始から シース留置まで	初回	13.2 ± 4.2 分
	フォローアップ時	21.6 ± 8.1 分

#### b. 総頸動脈アプローチの回数

シース留置はフォローアップ時に組織の癒着により難渋することもあったが、頸動脈走行の解剖学的な理解があれば頸動脈を繰り返し使用することは十分可能であった。12 週フォローアップ群ではステント留置時から剖検時まで合計 7 回の頸動脈アプローチを施行することが可能であった。左総頸動脈の使用回数は平均 5–6 回 ( $5.4 \pm 1.1$  回) であった。総頸動脈の血栓化は 3–4 回目の使用時 ( $3.5 \pm 1.8$  回目) に発覚したが、血栓化していてもシースの留置は可能であった。

### 2. 動物の健康状態

#### a. ミニブタ健康スコア

1 週間に 4–5 回程度、ミニブタ健康スコア (0–21) による評価 (表 7) を行い、摂食量や活気、四肢の運動などをチェックした。実験翌日のみ Score 2 (食餌摂取が半量) になることはあったが、実験翌日以外は全期間を通して Score 0 であり、全てのミニブタにおいて活気の低下や四肢麻痺の出現など、全身状態の悪化あるいは脳梗塞の兆候を認めなかった。

#### b. 体重の変化

体重測定の結果を表 12 に示す。12 週群の体重変化は  $-1.5 \pm 2.2$  kg、4 週群は



−0.8 ± 1.8 kg、2 週群は 0 ± 0.3 kg であった。12 週フォローアップ群に関しては前半群（個体 1－4）に限定すると −3.2 ± 1.9 kg の変化であったが、後半群（個体 5－8）は食餌の量を増やした結果（前半群：400g/日、後半群：500g/日）、+0.1 ± 0.9 kg の変化となり、期間中の体重は一定であった。

表 12. 体重の変化

No.	性別	月 齢	術前体重 (kg)	評価群 (週)	最終体重 (kg)	体重変化 (kg)
1	M	18	28.9	12	23.0	−5.9
2	M	19	26.6	12	23.8	−2.8
3	M	20	23.8	12	21.6	−2.2
4	M	25	31.5	12	29.9	−1.6
5	F	10	21.0	12	21.5	+0.5
6	F	10	23.5	12	23.1	−0.4
7	F	11	21.3	12	22.4	+1.1
8	F	11	24.0	12	23.2	−0.8
9	M	9	13.4	4	11.3	−2.1
10	F	11	21.6	4	22.1	+0.5
11	M	21	18.1	2	17.8	−0.3
12	F	11	20.6	2	20.9	+0.3

#### c. 血液学的評価

結果を図 27－29 に示す。 12 週群と 4 週群においては、実験期間を通して全て正常範囲内であり、有害となるような変化を認めなかった。2 週群では白血球数が 2 週目に著明に増加した（4,260 → 10,770 / $\mu$ L）。



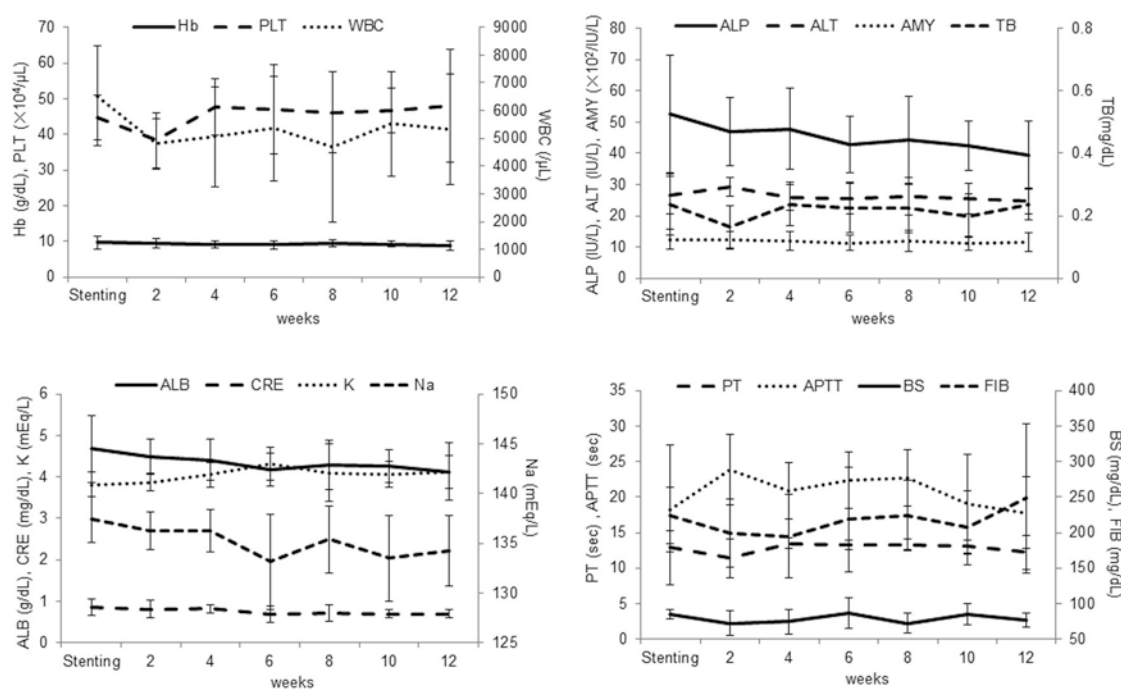


図 27. 血液検査の経過：12 週フォローアップ群（8 頭）

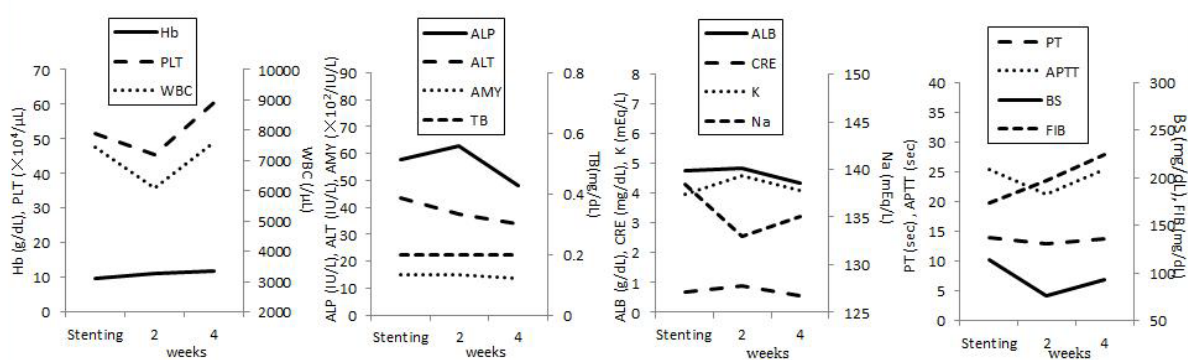


図 28. 血液検査の経過：4 週フォローアップ群（2 頭）

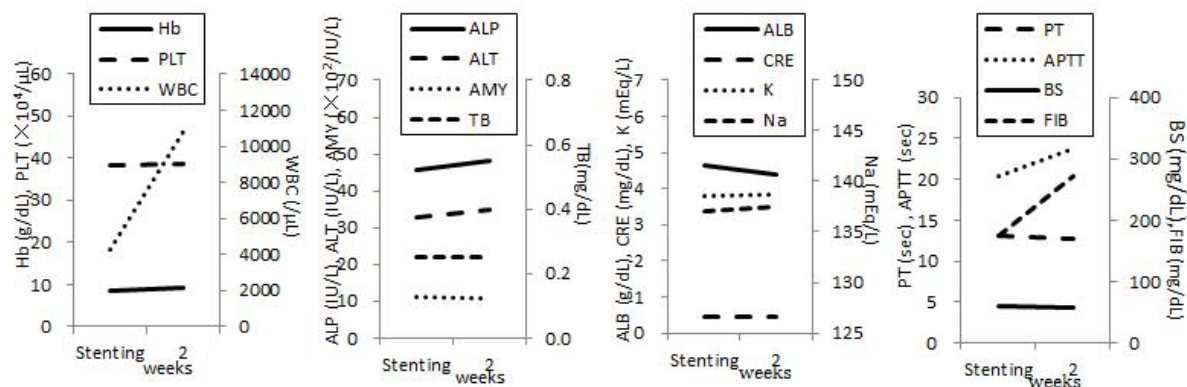


図 29. 血液検査の経過：2 週フォローアップ群（2 頭）

## B. IVUS による繰り返しの測定結果

### 1. スtent内狭窄の経時的变化

全 30 スtentにおける個々の %VO (% in-stent volume obstruction ; 体積狭窄率) の経過を図 30 に示した。期間中の %VO ピークを●点で示し、ペアとなる stent を同色で表示している。

25/30 (83%) の stent で期間中に狭窄率のピーク値を同定することができた。外腸骨動脈においては 4 スtent (F-DLC coated stent 1、BMS 3)、内腸骨動脈では 1 スtent (BMS) が 12 週目でも狭窄率の微増を示し、期間中の %VO ピークを同定できなかった。しかしグラフの曲線よりほぼプラトーに達しているものと推測されたため、12 週目の値を近似的なピーク値とした。また、グラフより同じ血管に同種の stent を置いた場合でも、個体により狭窄率の程度及び経過が大きく異なることが示唆された。

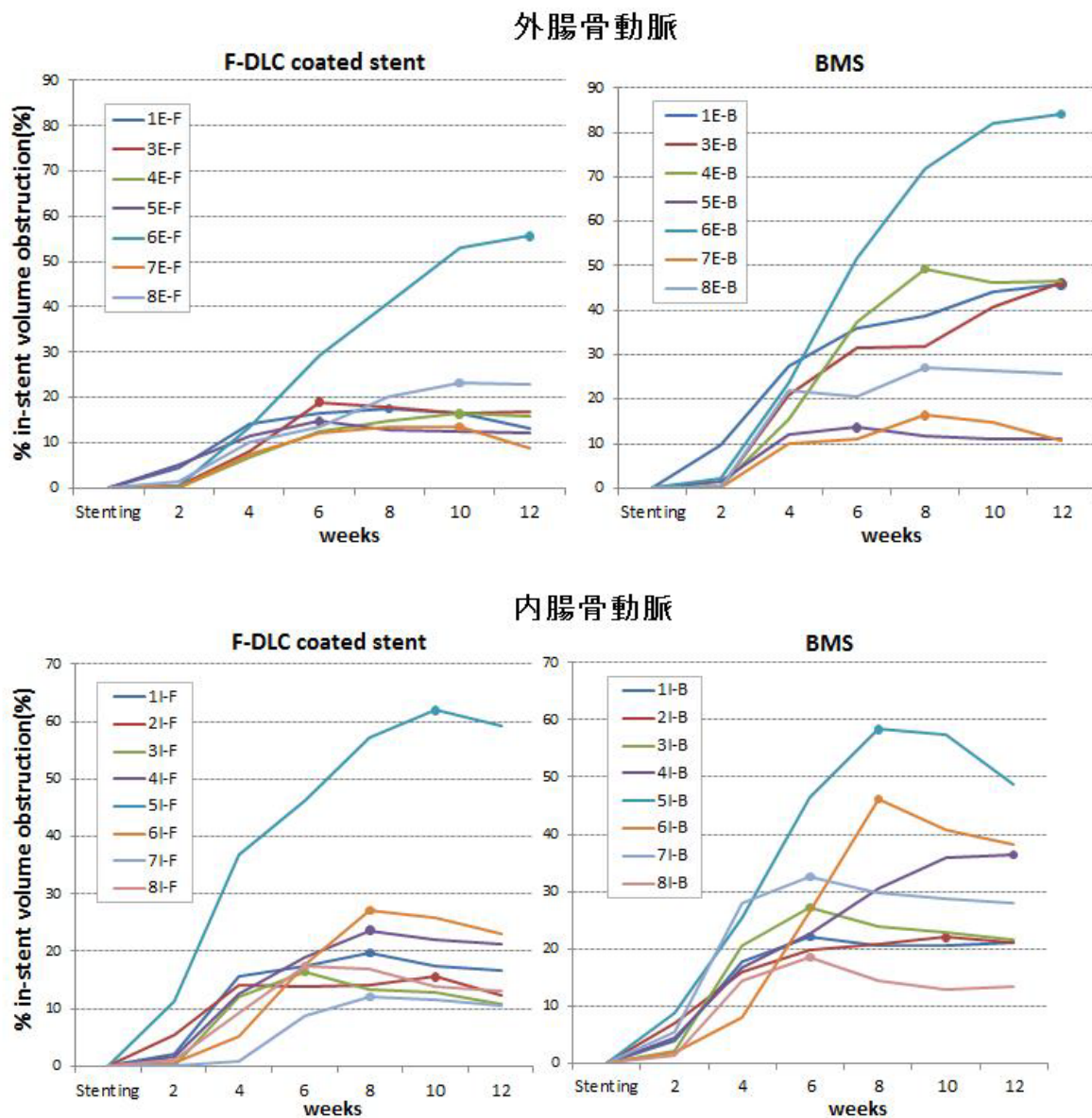


図 30. 外腸骨動脈（上段）、内腸骨動脈（下段）における %VO の経過  
各ステントにおける %VO の経過を個別に表示した。ステントにより狭窄率の  
程度及びピークのタイミングが大きく異なることがわかる。●がピークを示す。

凡例の説明：数字が個体 No.

E/I は外腸骨動脈（external iliac artery）／内腸骨動脈（internal iliac artery）

F/B は F-DLC coated stent／BMS

例) 1E-F = 個体 No.1 外腸骨動脈の F-DLC coated stent

4I-B = 個体 No.4 内腸骨動脈の BMS

## 2. IVUS 計測値の信頼性に関する検討

IVUS 測定 of 検者内および検者間信頼性の結果を図 31 に示す。解析の結果、級内相関係数  $r$  は全て 0.99 以上であった。なお、本研究では検者 1（研究者）の測定値を使用した。

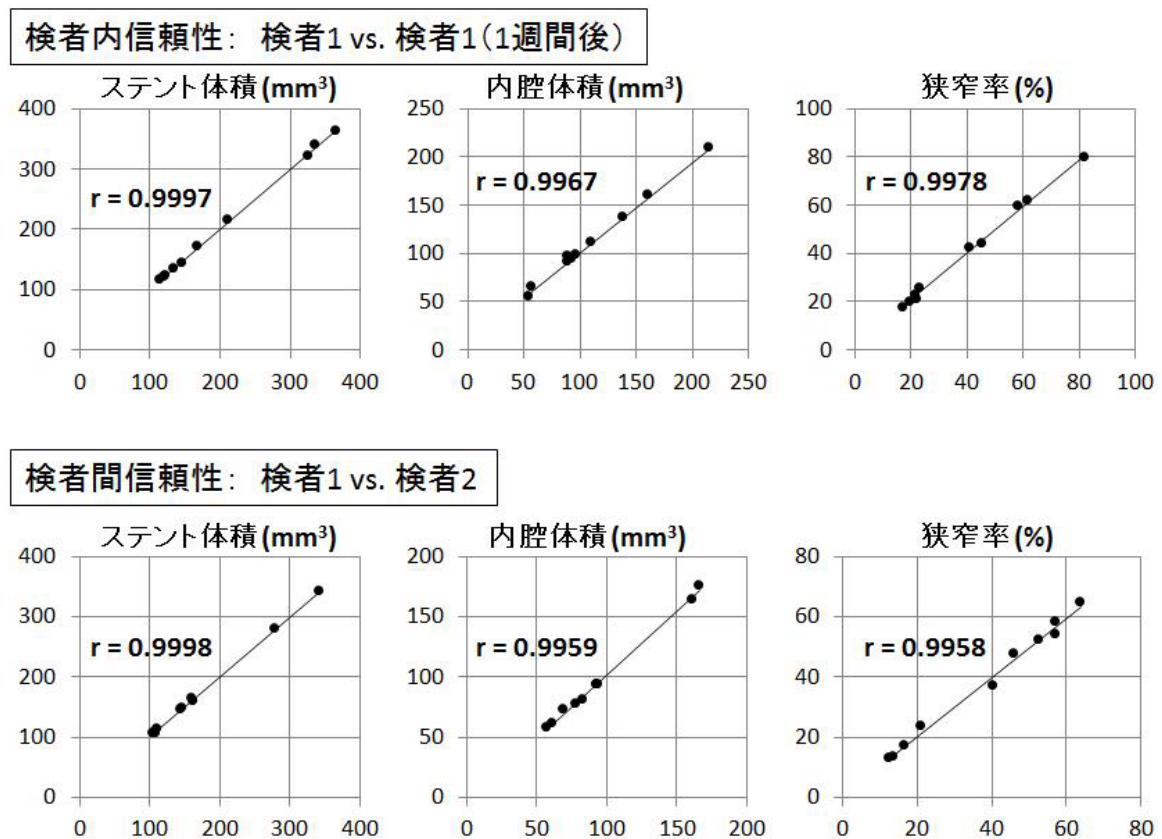


図 31 IVUS 計測値の信頼性に関する検討

上段が検者内信頼性（10 IVUS data を研究者が 1 週間間隔で 2 回解析）、下段が検者間信頼性（10 IVUS data を研究者と実験協力者が解析）の結果を示す。グラフ内の  $r$  は級内相関係数である。

### C. ステント間の比較：長期フォローアップ群（12 週群）

#### 1. ステント留置の条件

ミニブタ 8 頭の両側外腸骨動脈及び内腸骨動脈に、F-DLC coated stent と BMS をそれぞれランダムに左右に 1 本ずつ留置した。但し、No.2 の個体の 2 週目のフォローアップで、外腸骨動脈に留置した F-DLC coated stent の高度の変形と血管壁への圧着不良を認めたため、ペアとなる対側外腸骨動脈の BMS とともに評価対象から除外した。表 13 に評価対象のステント数、表 14 と図 32 に血管別の背景データを示す。

表 13. 12 週フォローアップ群のステント数（ミニブタ 8 頭）

	F-DLC coated stent	BMS
外腸骨動脈	7 本	7 本
内腸骨動脈	8 本	8 本

表 14. ステント留置時のデータ

	F-DLC coated stent	BMS	p value
外腸骨動脈			
留置前の血管径 (mm)	4.8±0.4	4.8±0.5	0.94
使用したステント径 (mm)	5.2±0.6	5.2±0.5	1.0
ステント血管径比	1.09±0.04	1.08±0.05	0.69
内腸骨動脈			
留置前の血管径 (mm)	3.5±0.3	3.6±0.3	0.46
使用したステント径 (mm)	3.8±0.4	3.9±0.4	0.81
ステント血管径比	1.05±0.05	1.05±0.04	0.38

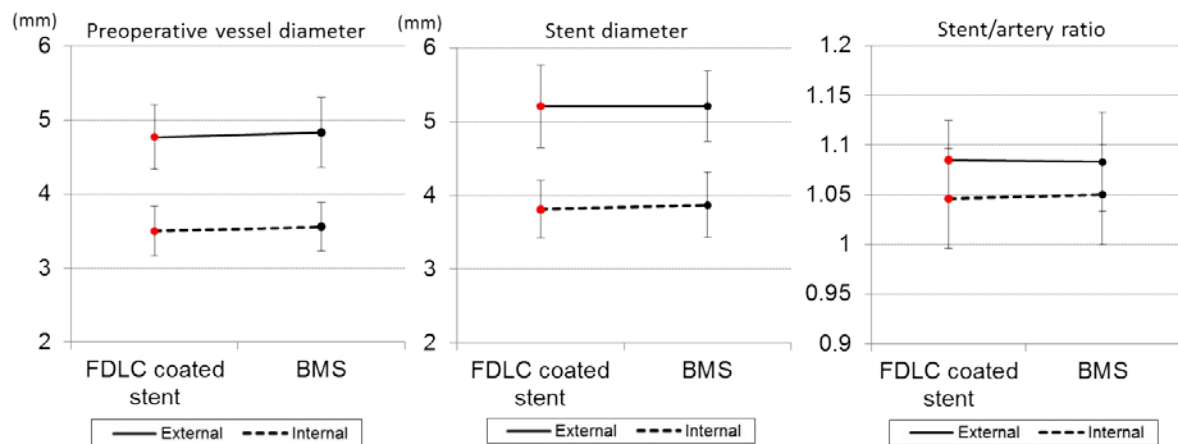


図 32. ステンツ留置時の条件

外腸骨動脈および内腸骨動脈のそれぞれにおいて、留置前の血管径や使用したステントの径、留置後のステント血管径比はステント間で差を認めなかった ( $p>0.05$  by Wilcoxon signed-rank test)。

External = 外腸骨動脈、Internal = 内腸骨動脈

外腸骨動脈および内腸骨動脈のそれぞれにおいて、F-DLC Coated stent と BMS の留置前の血管径や使用したステントのサイズ、ステント留置直後のステント血管径比 (Stent/artery ratio) は同様であった ( $p>0.05$ )。狭窄率に影響を与える以上の因子に関して、ステント間で差を認めなかった。

## 2. 外腸骨動脈ステントの IVUS 解析

### a. 体積狭窄率 (%VO) の経過およびピーク値

外腸骨動脈に留置したステントの %VO を平均化したグラフを図 33 に示す。全体の経過を比較すると F-DLC coated stent において有意に %VO の低下を認めた ( $p=0.011$  by 2-way repeated measure ANOVA)。なお、平均してみると F-DLC coated stent は 10 週目に狭窄率のピークを認めたが、BMS では期間中に新生内膜の退縮を認めなかった。

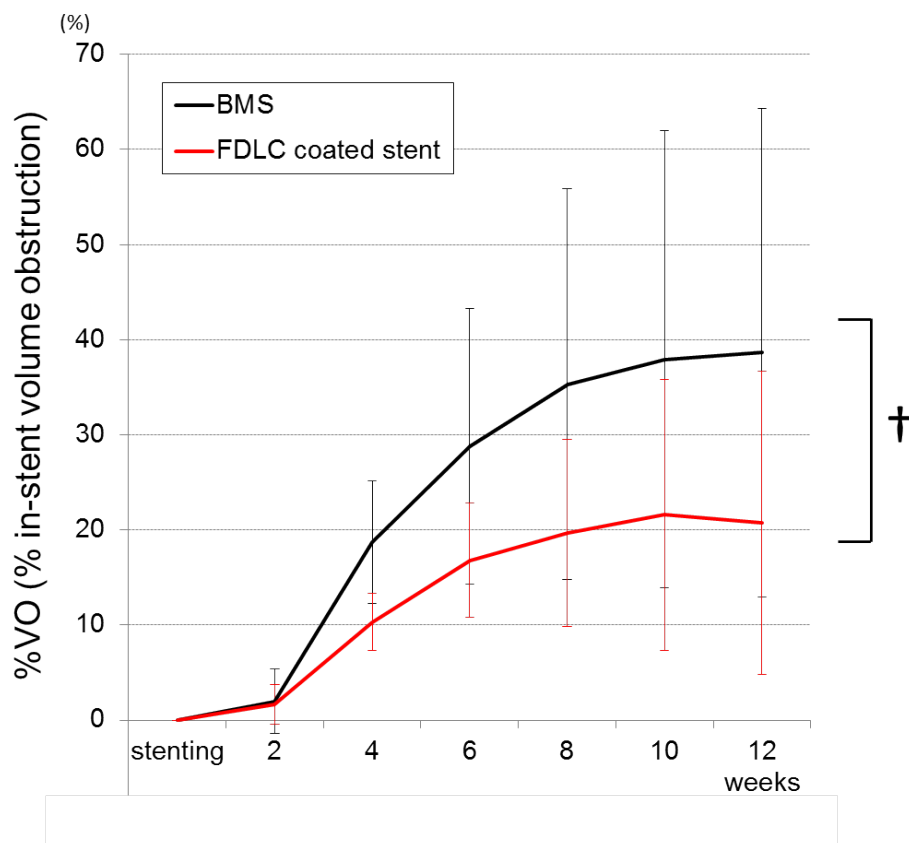


図 33. %VO の経時的変化 (外腸骨動脈)

F-DLC coated stent の %VO 経過は、BMS と比較して有意に低値であった ( $p=0.011$  by 2-way repeated measure ANOVA)。

† :  $p<0.05$

また、図 30 のグラフから、観察期間中におけるそれぞれのステントの代表値、すなわち狭窄率ピーク値が同定可能となり、ペアごとの比較を行った結果を図 34 に示す。ステント間で比較した結果、F-DLC coated stent の有意な %VO ピーク値の低下を認めた (F-DLC coated stent vs. BMS =  $22.8 \pm 14.7\%$  vs.  $40.4 \pm 24.2\%$ ;  $p=0.031$ )。

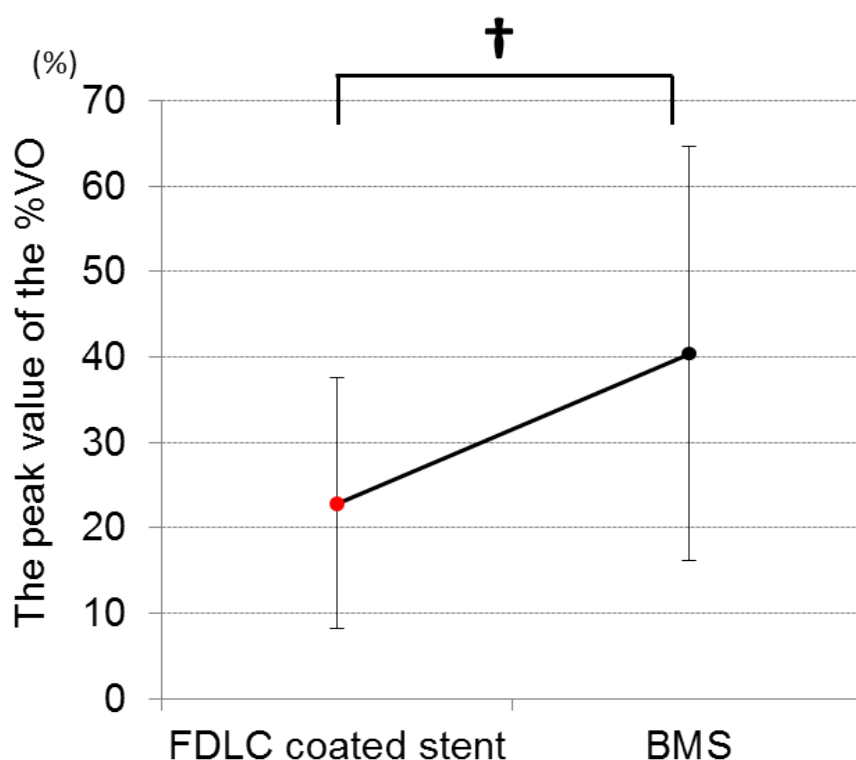


図 34. %VO のピーク値 (外腸骨動脈)

F-DLC coated stent の%VO ピーク値は、BMS と比して有意に低値であった (F-DLC coated stent vs. BMS =  $22.8 \pm 14.7\%$  vs.  $40.4 \pm 24.2\%$ ;  $p=0.031$  by Wilcoxon signed-rank test)。

† :  $p<0.05$



b. 面積狭窄率（%AS at MLA）の経過およびピーク値

ステント内の最小内腔面積（MLA；minimum lumen area）を示す血管断面にて、面積狭窄率：%AS at MLA を計測した。血管撮影による狭窄率と同様に、最も狭窄している部位の狭窄率を表している。ステント別に %AS at MLA を平均化したグラフを図 35 に示す。全体の経過を比較すると、F-DLC coated stent において有意に %AS at MLA の低下を認めた（ $p=0.010$ ）。F-DLC coated stent、BMS ともに明らかな狭窄率のピークを認めなかったが、12 週目でほぼプラトーに達しているものと推測される。

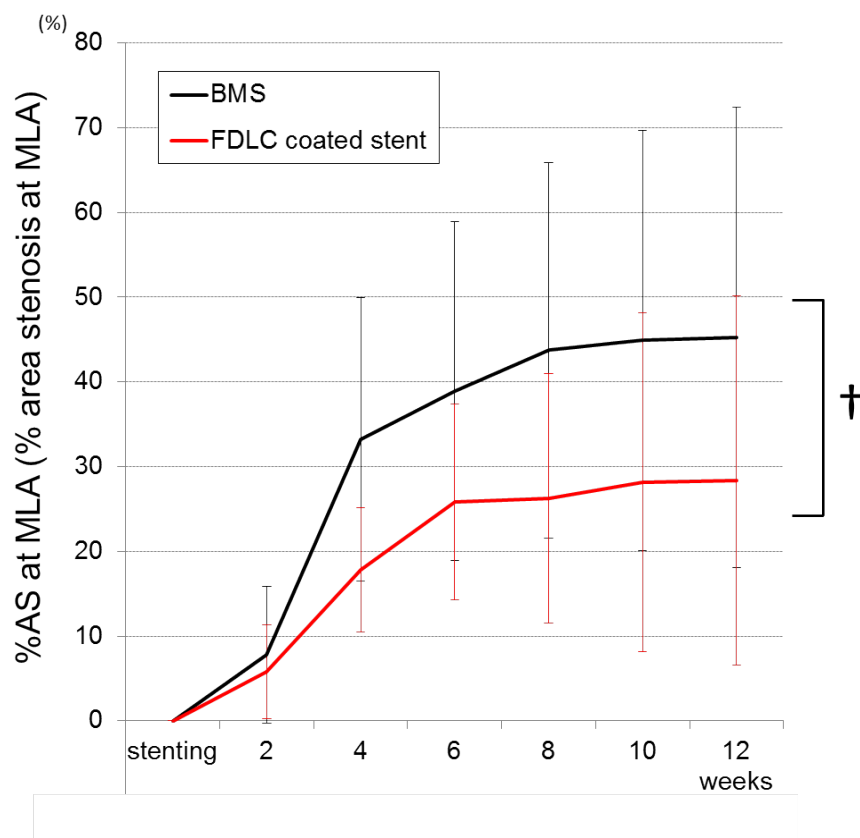


図 35. %AS at MLA の経時的変化（外腸骨動脈）

F-DLC coated stent の %AS at MLA 経過は、BMS と比較して有意に低値であった（ $p=0.010$ ）。 †： $p<0.05$

%AS at MLA に関しても、%VO と同様に期間中のピーク値を同定してステント間の比較を行った (図 36)。ステントをペアとして比較した結果、F-DLC coated stent の有意な %AS at MLA ピーク値の低下を認めた (F-DLC coated stent vs. BMS =  $31.5 \pm 20.3$  % vs.  $48.8 \pm 24.4$  %;  $p=0.016$ )。

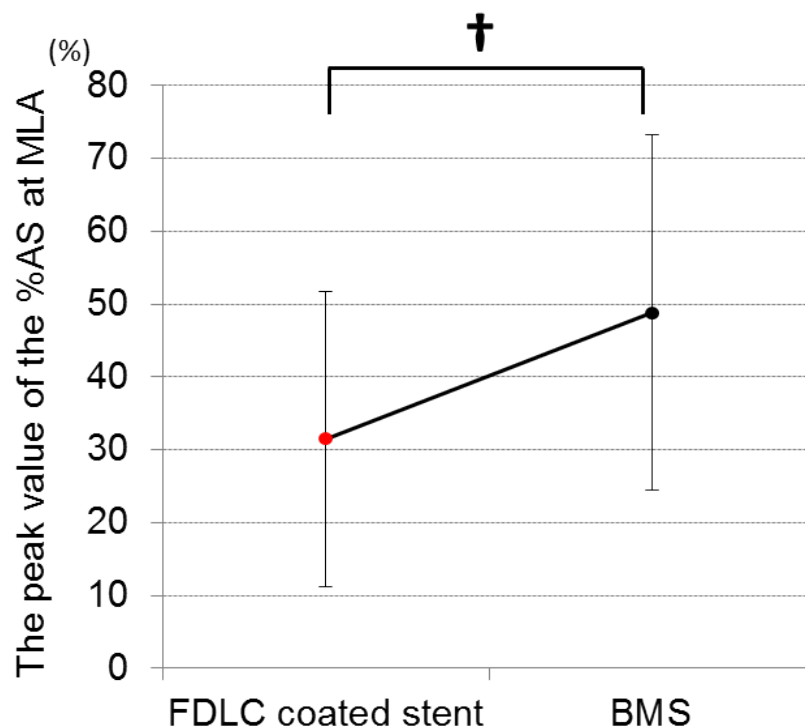


図 36. %AS at MLA のピーク値 (外腸骨動脈)

F-DLC coated stent の %AS at MLA ピーク値は、BMS と比して有意に低値であった (F-DLC coated stent vs. BMS =  $31.5 \pm 20.3$  % vs.  $48.8 \pm 24.4$  %;  $p=0.016$ )。

† :  $p<0.05$

### 3. 内腸骨動脈ステントの IVUS 解析

#### a. 体積狭窄率 (%VO) の経過およびピーク値

内腸骨動脈に留置したステントの %VO を平均化したグラフを図 37 に示す。

全体の経過を比較すると F-DLC coated stent において有意に %VO の低下を認めた ( $p=0.021$  by 2-way repeated measure ANOVA)。なお、平均してみると F-DLC coated stent と BMS とともに 8 週目に狭窄率のピークを認めた。

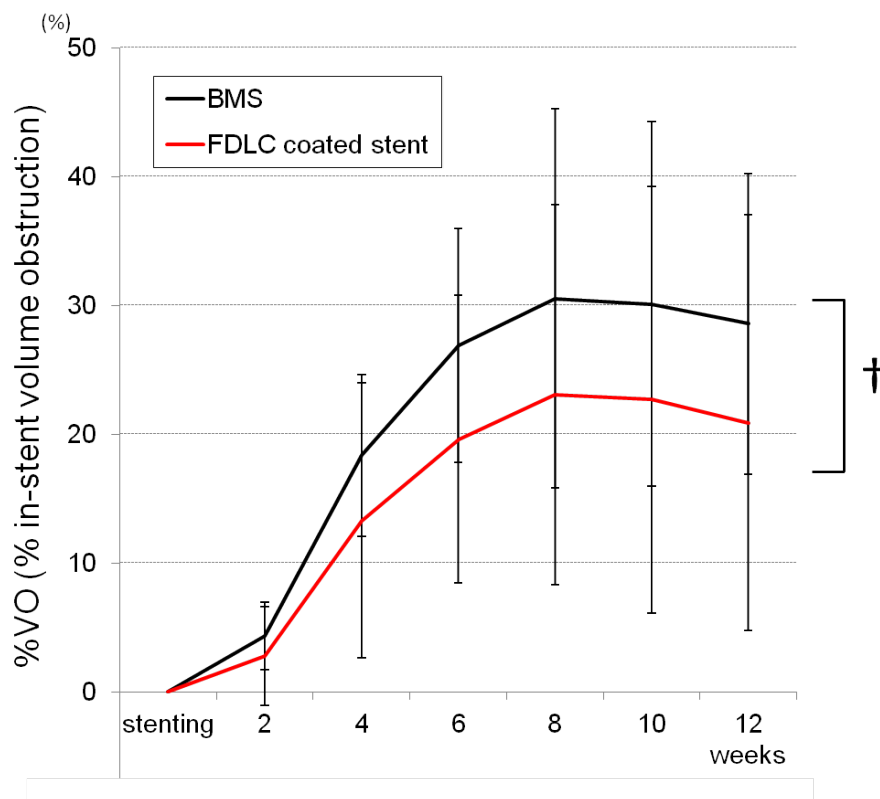


図 37. %VO の経時的変化 (内腸骨動脈)

F-DLC coated stent の %VO 経過は、BMS と比較して有意に低値であった ( $p=0.021$ )。

† :  $p<0.05$

また、繰り返しの測定から同定された狭窄率ピーク値に対し、ペアごとの比較を行った結果を図 38 に示す。ステント間で比較した結果、F-DLC coated stent の有意な %VO ピーク値の低下を認めた (F-DLC coated stent vs. BMS =  $24.3 \pm 15.9\%$  vs.  $32.9 \pm 13.6\%$ ;  $p=0.039$ )。

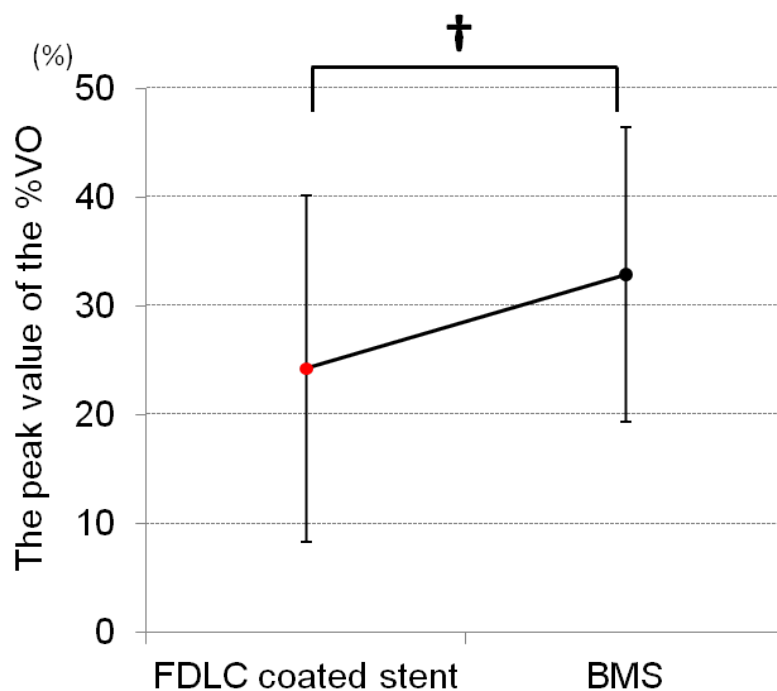


図 38. %VO のピーク値 (内腸骨動脈)

F-DLC coated stent の%VO ピーク値は、BMS と比して有意に低値であった (F-DLC coated stent vs. BMS =  $24.3 \pm 15.9\%$  vs.  $32.9 \pm 13.6\%$ ;  $p=0.039$ )。

† :  $p<0.05$

b. 面積狭窄率（%AS at MLA）の経過およびピーク値

ステント別に %AS at MLA を平均化したグラフを図 39 に示す。全体の経過を比較すると、F-DLC coated stent において有意に %AS at MLA の低下を認めた（ $p=0.007$ ）。F-DLC coated stent では 8-10 週目に、BMS では 8 週目に狭窄率のピークを認めた。

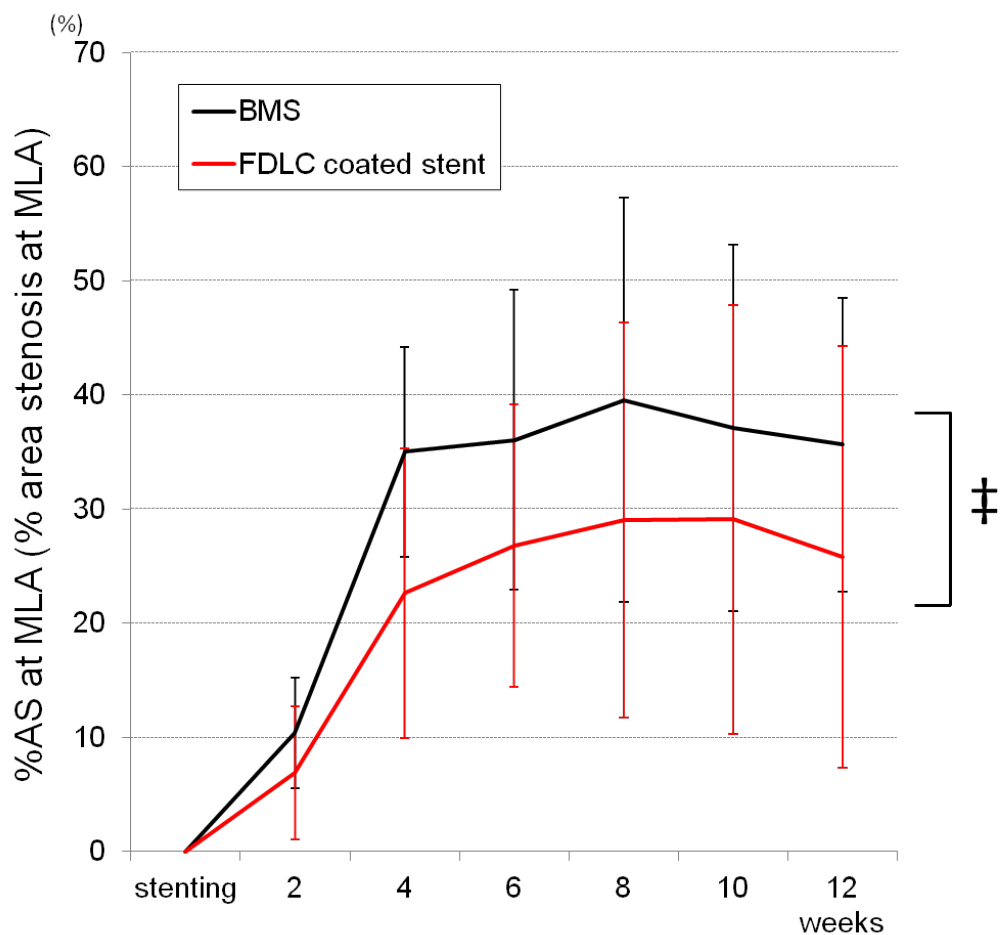


図 39. %AS at MLA の経時的変化（内腸骨動脈）

F-DLC coated stent の %AS at MLA 経過は、BMS と比較して有意に低値であった（ $p=0.007$ ）。

‡ :  $p<0.01$

期間中のピーク値を同定してステント間の比較を行った結果（図 40）、F-DLC coated stent の有意な %AS at MLA ピーク値の低下を認めた（F-DLC coated stent vs. BMS =  $32.0 \pm 17.7\%$  vs.  $43.1 \pm 15.5\%$ ;  $p=0.016$ ）。

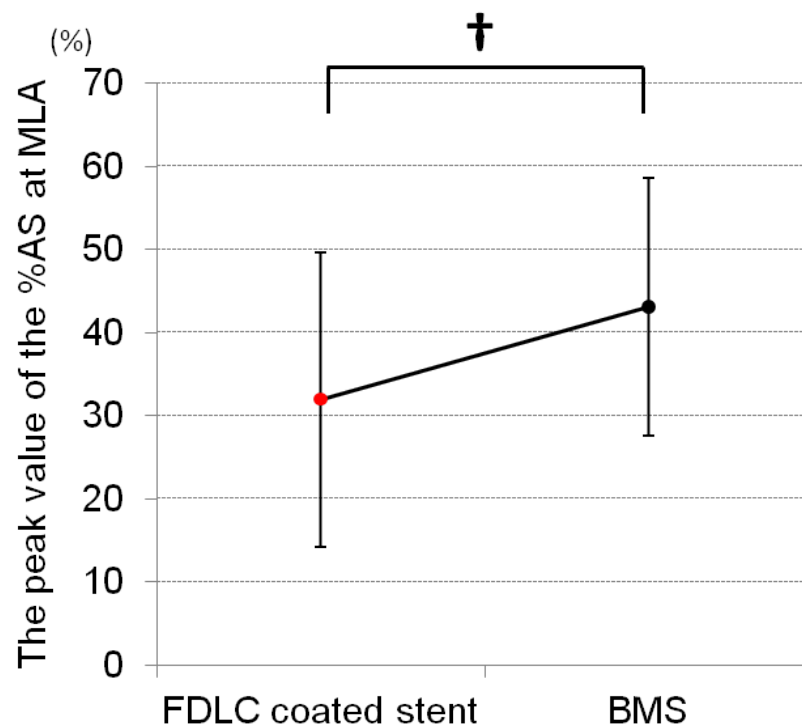


図 40. %AS at MLA のピーク値（内腸骨動脈）

F-DLC coated stent の %AS at MLA ピーク値は、BMS と比して有意に低値であった（F-DLC coated stent vs. BMS =  $32.0 \pm 17.7\%$  vs.  $43.1 \pm 15.5\%$ ;  $p=0.016$ ）。

† :  $p < 0.05$

#### 4. 狭窄率の性別解析

12 週フォローアップの IVUS 評価群全 8 頭（オス 4 頭、メス 4 頭）に対して性別ごとにわけて解析を行った。オス外腸骨動脈のステント 2 本が評価対象から除外されているため、外腸骨動脈はオス 3 頭、メス 4 頭、内腸骨動脈は雌雄とも 4 頭ずつの解析となる（表 15）。図 41 に示す通り、%VO ピーク値に関しては、外腸骨動脈と内腸骨動脈ともにオスにおいて F-DLC coated stent の狭窄率が BMS に比べ有意に低値となったが、メスではステント間の狭窄率に有意差を認めなかった。図 42 の %AS at MLA ピーク値の比較では、オスの外腸骨動脈のみで F-DLC coated stent の狭窄率が有意に低値となったが、ほかの解析ではステント間の狭窄率に有意差を認めなかった。

表 15. 性別に分けた狭窄率の比較

	オス	メス
外腸骨動脈	3 頭 FDLC vs. BMS = 3 本 vs. 3 本	4 頭 FDLC vs. BMS = 4 本 vs. 4 本
内腸骨動脈	4 頭 FDLC vs. BMS = 4 本 vs. 4 本	4 頭 FDLC vs. BMS = 4 本 vs. 4 本

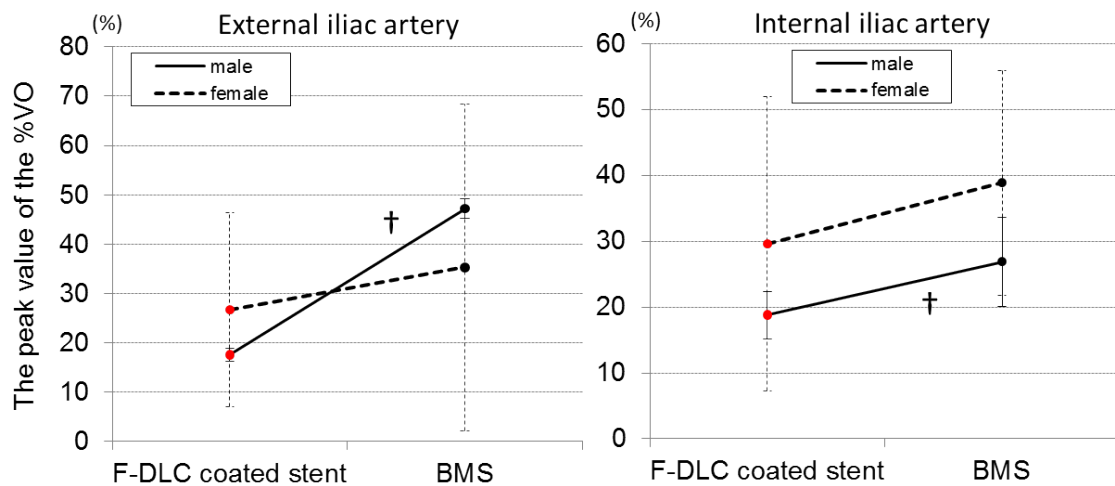


図 41. 性別に分けた狭窄率の比較 (%VO)

外腸骨動脈では、オスでステント間の狭窄率に有意差を認めたが (F-DLC coated stent vs. BMS =  $17.6 \pm 1.3$  % vs.  $47.2 \pm 1.9$  %;  $p=0.004$ )、メスでは有意差を認めなかった ( $26.7 \pm 19.6$  % vs.  $35.3 \pm 33.1$  %;  $p=0.29$ )。内腸骨動脈でもオスで有意差を認めたが ( $18.8 \pm 3.6$  % vs.  $26.9 \pm 6.8$  %;  $p=0.042$ )、メスでは有意差を認めなかった ( $29.6 \pm 22.4$  % vs.  $38.9 \pm 17.1$  %;  $p=0.23$ )。

† :  $p<0.05$

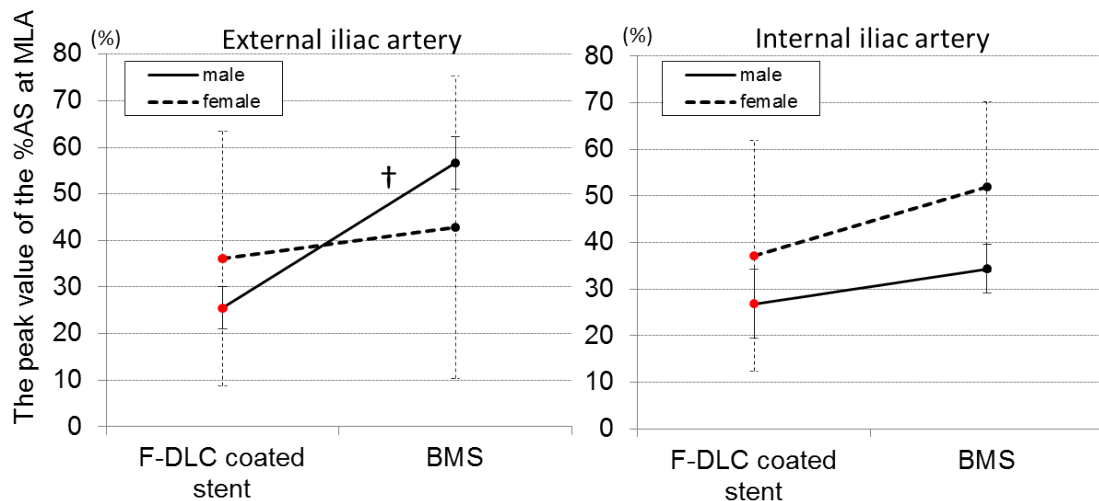


図 42. 性別にわけた狭窄率の比較 (%AS at MLA)

外腸骨動脈では、オスで有意差を認めたが (F-DLC coated stent vs. BMS =  $25.5 \pm 4.5$  % vs.  $56.7 \pm 5.6$  %;  $p=0.005$ )、メスでは有意差を認めなかった ( $36.1 \pm 27.4$  % vs.  $42.8 \pm 32.5$  %;  $p=0.11$ )。内腸骨動脈でオス ( $26.8 \pm 7.4$  % vs.  $34.3 \pm 5.2$  %;  $p=0.10$ )、メス ( $37.1 \pm 24.7$  % vs.  $51.9 \pm 18.2$  %;  $p=0.13$ ) ともに有意差を認めなかった。

† :  $p<0.05$



また、F-DLC coated stent と BMS にわけて、性別による狭窄率の違いを検討した（表 16）。本解析のみ、対応のない 2 群間の比較となる（Student t-test）。結果を図 43、44 に示すが、全ての群において性別間の狭窄率(%VO と %AS at MLA)に有意な差を認めなかった ( $p>0.05$ )。

表 16. 狭窄率の性別比較

	F-DLC coated stent	BMS
外腸骨動脈	オス vs. メス = 3 本 vs. 4 本	オス vs. メス = 3 本 vs. 4 本
内腸骨動脈	オス vs. メス = 4 本 vs. 4 本	オス vs. メス = 4 本 vs. 4 本

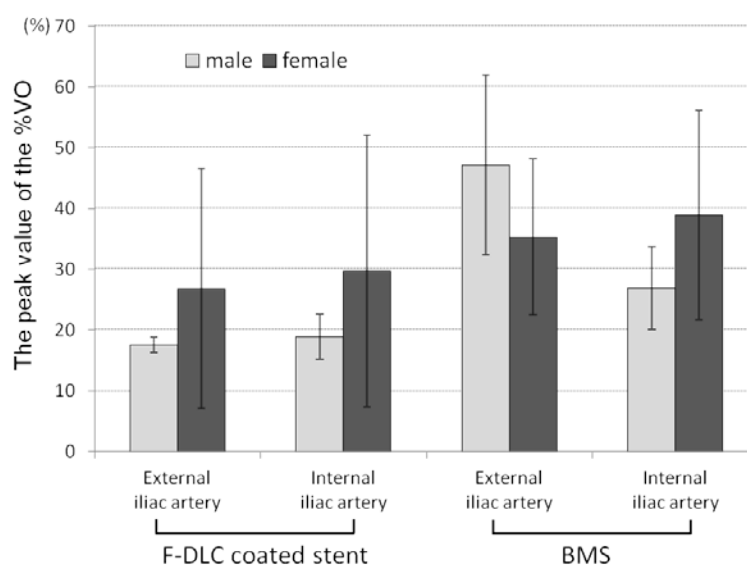


図 43. 狭窄率の性差 (%VO)

F-DLC coated stent では、外腸骨動脈（オス vs. メス =  $17.6 \pm 1.3$  % vs.  $26.8 \pm 19.7$  %;  $p=0.47$ ）、内腸骨動脈（ $18.9 \pm 3.7$  % vs.  $29.7 \pm 22.4$  %;  $p=0.38$ ）、BMS では外腸骨動脈（ $47.2 \pm 14.8$  % vs.  $35.3 \pm 12.8$  %;  $p=0.57$ ）、内腸骨動脈（ $26.9 \pm 6.8$  % vs.  $38.9 \pm 17.2$  %;  $p=0.24$ ）であり、全ての群において%VO に有意な性差を認めなかった。

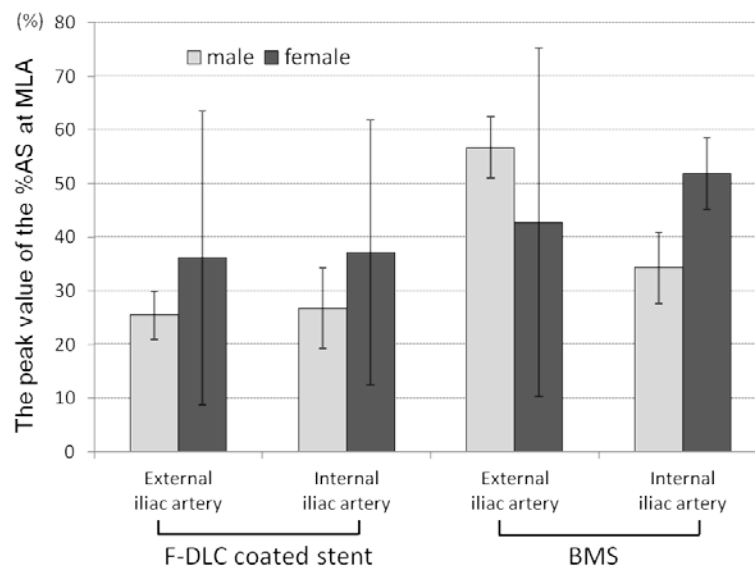


図 44. 狭窄率の性差 (%AS at MLA)

F-DLC coated stent では、外腸骨動脈（オス vs. メス =  $25.5 \pm 4.5$  % vs.  $36.2 \pm 27.4$  %;  $p=0.54$ ）、内腸骨動脈（ $26.8 \pm 7.5$  % vs.  $37.2 \pm 24.7$  %;  $p=0.45$ ）、BMS では外腸骨動脈（ $56.7 \pm 5.7$  % vs.  $42.8 \pm 32.5$  %;  $p=0.51$ ）、内腸骨動脈（ $34.3 \pm 6.7$  % vs.  $51.9 \pm 6.7$  %;  $p=0.11$ ）であり、全ての群において%AS at MLA に有意な性差を認めなかった。

## 5. 病理学的評価

### a. ステント間の比較

12 週目の IVUS 検査終了後、ステント血管を摘出し病理評価を行った（全 30 ステント）。外腸骨動脈ステント（F-DLC coated stent 7 本、BMS 7 本）の結果を表 17 と図 45 に示す。病理標本を詳細に観察した結果、両ステント群の全ての標本において、明らかな血小板血栓やフィブリン血栓の新生内膜面への付着を認めなかった。また、IVUS による血管内腔面の粗大な損傷も認めなかった。損傷スコア：Injury score（F-DLC coated stent vs. BMS =  $0.13 \pm 0.21$  vs.  $0.15 \pm 0.28$ ;  $p=0.55$ ）や炎症スコア：Inflammation score（ $0.02 \pm 0.03$  vs.  $0.21 \pm 0.47$ ;  $p=0.38$ ）はステント間で差を認めなかった。面積狭窄率（histological %AS）では統計学的有意差はないが、F-DLC coated stent において低値となる傾向を認めた（ $34.2 \pm 20.1$  vs.  $44.3 \pm 28.7$ ;  $p=0.09$ ）。両ステント群において、全てのステントストラットが内皮様組織や新生内膜にて覆われていた（組織被覆率：%Strut tissue coverage = 100%）。

表 17. 外腸骨動脈ステントの病理学的解析

	F-DLC coated stent	BMS	p 値
血栓の有無	(－)	(－)	
血管内腔面の損傷	(－)	(－)	
損傷スコア	0.13±0.21	0.15±0.28	0.55
炎症スコア	0.02±0.03	0.21±0.47	0.38
面積狭窄率 (%)	34.2±20.1	44.3±28.7	0.09
組織被覆率 (%)	100	100	

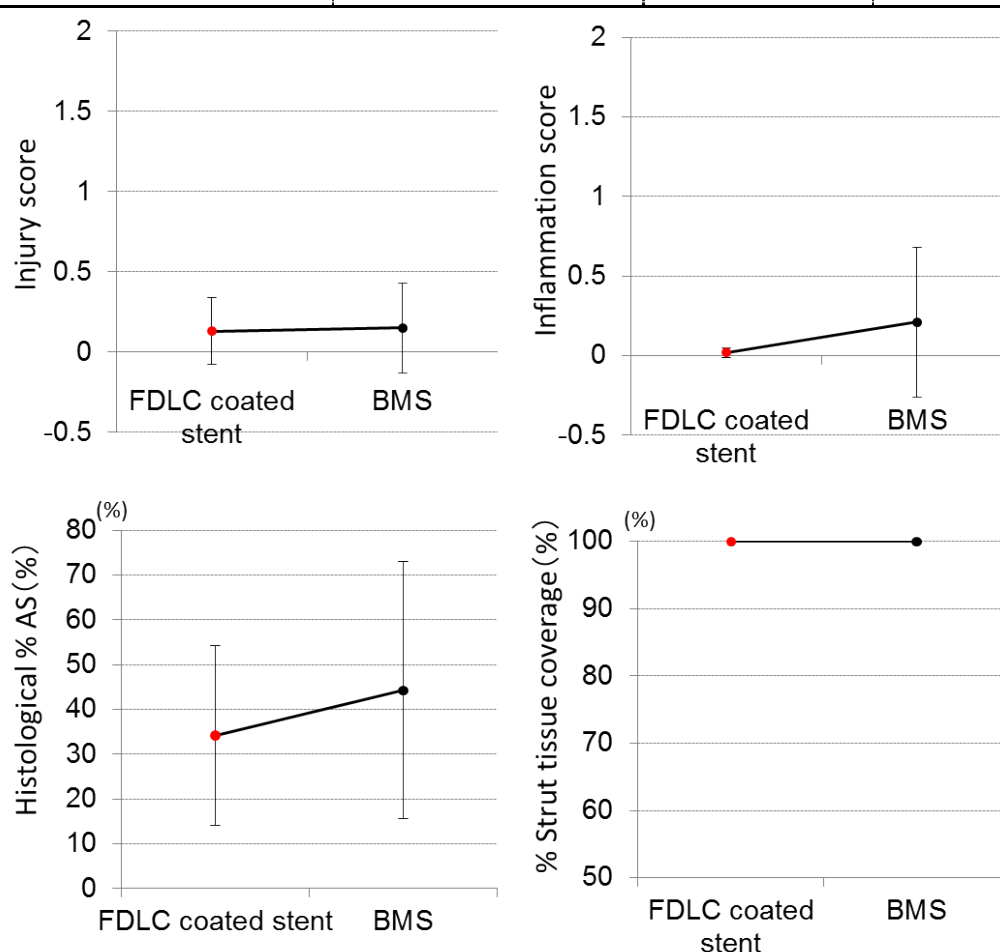


図 45. 外腸骨動脈ステントの病理学的解析

損傷スコアおよび炎症スコアはステント間で差を認めなかった ( $p>0.05$ )。面積狭窄率では有意差はないが、F-DLC coated stent において低値となる傾向にあった ( $34.2\pm20.1$  vs.  $44.3\pm28.7$ ;  $p=0.09$ )。ストラットの組織被覆率は両ステント群において 100%であった。

続いて、内腸骨動脈ステント（F-DLC coated stent 7 本、BMS 7 本）の結果を表 18 と図 46 に示す。病理標本を観察した結果、両ステント群の全ての標本において、明らかな血小板血栓やフィブリン血栓の新生内膜面への付着を認めなかった。また、IVUS による血管内腔面の粗大な損傷も認めなかった。損傷スコア（F-DLC coated stent vs. BMS =  $0.02 \pm 0.04$  vs.  $0.13 \pm 0.24$ ;  $p=0.25$ ）はステント間で差を認めなかったが、炎症スコアでは有意差はないが F-DLC coated stent で低値となる傾向を認めた（ $0.01 \pm 0.02$  vs.  $0.07 \pm 0.06$ ;  $p=0.09$ ）。面積狭窄率（histological %AS）は F-DLC coated stent において有意な狭窄率の低値を認めた（ $34.7 \pm 17.3$  vs.  $40.9 \pm 15.5$ ;  $p=0.039$ ）。両ステント群において、全てのステントストラットが内皮様組織や新生内膜にて覆われていた。

表 18. 内腸骨動脈ステントの病理学的解析

	F-DLC coated stent	BMS	p 値
血栓の有無	(－)	(－)	
血管内腔面の損傷	(－)	(－)	
損傷スコア	$0.02 \pm 0.04$	$0.13 \pm 0.24$	0.25
炎症スコア	$0.01 \pm 0.02$	$0.07 \pm 0.06$	0.09
面積狭窄率 (%)	$34.7 \pm 17.3$	$40.9 \pm 15.5$	0.039 †
組織被覆率 (%)	100	100	

† :  $p<0.05$

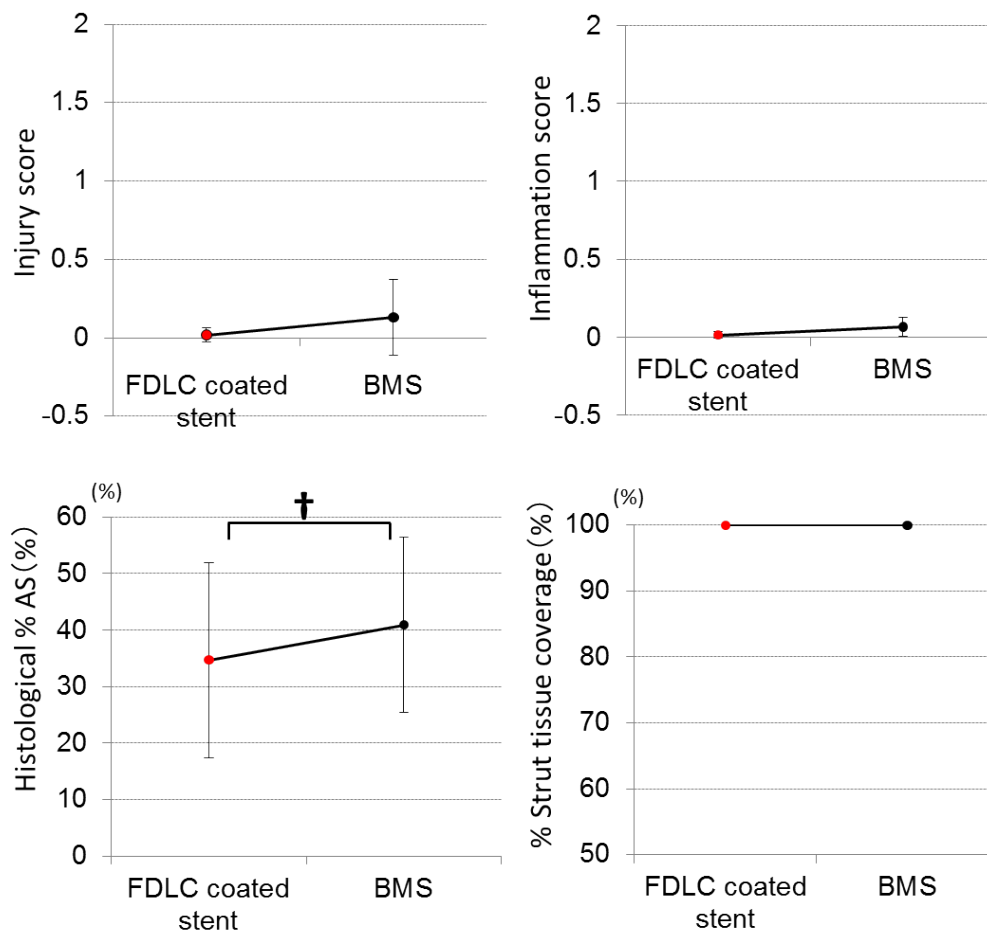


図 46. 内腸骨動脈ステントの病理学的解析

損傷スコアはステント間で差を認めなかったが ( $p>0.05$ )、炎症スコアでは有意差はないが F-DLC coated stent において低値となる傾向を認めた ( $0.01 \pm 0.02$  vs.  $0.07 \pm 0.06$ ;  $p=0.09$ )。面積狭窄率は F-DLC coated stent において有意な狭窄率の低値を認めた ( $34.7 \pm 17.3$  vs.  $40.9 \pm 15.5$ ;  $p=0.039$ )。ストラットの組織被覆率は両ステント群において 100%であった。

#### b. 追加の解析

12週目の狭窄率測定は、IVUS と病理の2通りの方法で解析を行っているため、外腸骨動脈と内腸骨動脈のそれぞれにおいて、病理解析より得られた狭窄率 (histological %AS) と、同時期 (12 週目) の IVUS 測定により得られた狭窄率

(%VO) の相関関係を検討した。その結果を図 47 に示すが、両測定値の間に統計学的に有意な相関関係を認め、IVUS 測定値の良好な信頼性が示唆された ( $p<0.0001$ )。

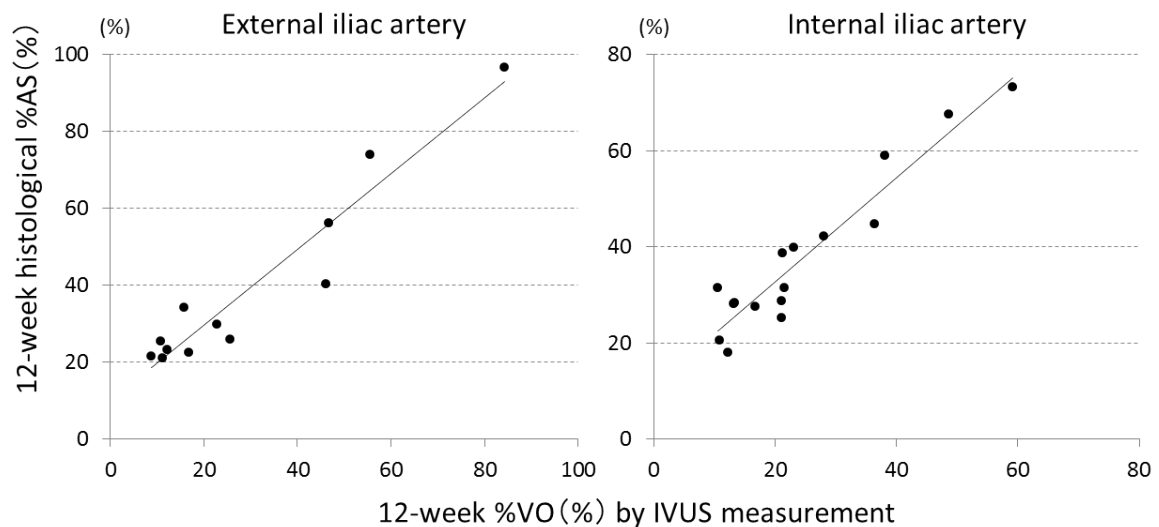


図 47. 病理解析による狭窄率と IVUS 測定より得られる狭窄率の関係  
 外腸骨動脈 ( $\text{histological \%AS} = 0.99 \times \% \text{VO} + 9.9$ ; 自由度調整  $R^2=0.92$ ,  $p<0.0001$ )、  
 内腸骨動脈 ( $\text{histological \%AS} = 1.1 \times \% \text{VO} + 11.0$ ; 自由度調整  $R^2=0.90$ ,  $p<0.0001$ )  
 の両血管において、病理解析と IVUS 測定による狭窄率の間に相関関係を認めた。

また、損傷スコアの解析結果により、ステント間で留置時の血管壁損傷の程度に差がないことが確認されたが、一方、血管壁損傷が狭窄率に与えた影響を検討することも重要である。F-DLC coated stent と BMS のそれぞれにおいて、損傷スコアと histological %AS の間の相関を解析した結果、図 48 の通り有意な相関関係を認めなかった ( $p>0.05$ )。さらに血管別にわけて解析した場合においても表 19 の通りそれぞれの群において有意な相関関係を認めなかった ( $p>0.05$ )。

この結果により、ステント留置時の血管壁損傷が、ステント間の比較に与える影響は小さいものと推測される。

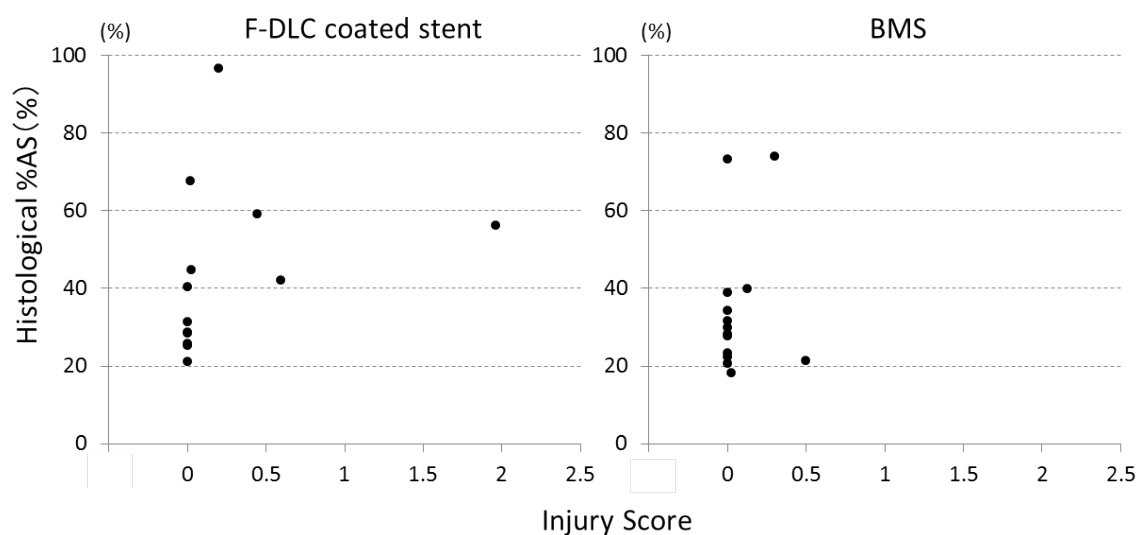


図 48. 損傷スコアと面積狭窄率の関係

F-DLC coated stent と BMS の双方において、損傷スコアと面積狭窄率の間に有意な相関を認めなかった (F-DLC coated stent; 自由度調整  $R^2=0.10$ ,  $p<0.28$ ; BMS; 自由度調整  $R^2=0.03$ ,  $p<0.58$ )。

表 19. 損傷スコアと面積狭窄率の相関関係 (ステントおよび血管別の解析)

		自由度調整 $R^2$	p 値
外腸骨動脈	F-DLC coated stent	0.07	0.63
	BMS	0.09	0.57
内腸骨動脈	F-DLC coated stent	0.002	0.91
	BMS	0.12	0.39

Statistical analysis by Pearson product-moment correlation coefficient



12 週間の長期フォローアップ群における結果をまとめると以下の通りである。

- 同一個体に対する繰り返しの処置により、各ステントにおけるステント内狭窄の進行から退縮までの連続的な **time course** を観察しえた。
- 事前に 3 ヶ月と設定した観察期間中に、全 30 ステント中 25 ステント (83%) において狭窄率のピークが同定された。残り 5 ステントのうち 4 ステントは **BMS** であり、3 ヶ月後も狭窄率の微増を認めた。狭窄率のピーク値ならびに狭窄率がピークを示すタイミングはステントにより大きく異なる傾向を示した。
- **F-DLC coated stent** と **BMS** のステント留置時の条件は同様であった。繰り返しの **IVUS** 測定の結果、外腸骨動脈および内腸骨動脈の双方において、**F-DLC coated stent** の狭窄率 (**%VO** と **%AS at MLA**) が **BMS** に比して有意に低い経過を辿ることが確認された。狭窄率のピーク値も **F-DLC coated stent** において有意に低値であった。
- 狭窄率の性別解析の結果、オスでは **F-DLC coated stent** の有効性を認める傾向であったが、メスでは有意差を認めなかった。また、オスとメスの狭窄率の値に有意差を認めなかった。
- 12 週目の病理評価の結果、ステント内血栓や血管内腔面の粗大な損傷を認めなかった。**F-DLC coated stent** の炎症スコアは内腸骨動脈において **BMS** に

比して低値となる傾向を認めた。狭窄率（Histological %AS）に関しては、F-DLC coated stent が内腸骨動脈において有意に低値となり、外腸骨動脈でも低値となる傾向を認めた。両ステント群とも全てのストラットが内皮様組織や新生内膜によって被覆されていた。

- 病理解析による狭窄率計測値を、標本を採取する直前に施行した 12 週目の IVUS 測定による %VO との相関を検討した結果、有意な相関関係を認めた。IVUS 測定値の検者内および検者間信頼性の検討では、級内相関係数 0.99 以上の高い一致性を認めた。
- ステント間比較の妥当性を示す損傷スコアはステント間で同様であった。さらに損傷スコアは狭窄率と相関関係を認めず、ステント留置時の血管損傷が狭窄率に与えた影響は少ないことが示唆された。

#### D. ステント間の比較：短期フォローアップ群（2 週群、4 週群）

##### 1. ステント留置の条件

ミニブタ 4 頭の両側外腸骨動脈及び内腸骨動脈に、F-DLC coated stent と BMS をそれぞれ左右に 1 本ずつ、合計 16 本のステントを留置した。2 週群においては 2 週目に IVUS と病理評価、4 週群では 2 週目と 4 週目に IVUS 評価を行い、その後病理評価とした。評価対象ステント 16 本の内訳を表 20 に示す。

表 20. 2 週、4 週フォローアップ群のステント数（ミニブタ 4 頭）

	F-DLC coated stent	BMS
2 週群（2 頭）	4 本	4 本
4 週群（2 頭）	4 本	4 本

これを外腸骨動脈と内腸骨動脈の群に細分化すると各群のサンプル数減少により統計処理が困難となるため、急性期病理評価群における統計処理は、あくまでも参考として、血管群をまとめて比較検討した。全てのステント留置条件をペアごとに表示した図と、血管をまとめてステント間の比較検討を行った表を以下に示す（2 週群；図 49, 表 21；4 週群；図 50, 表 22）。

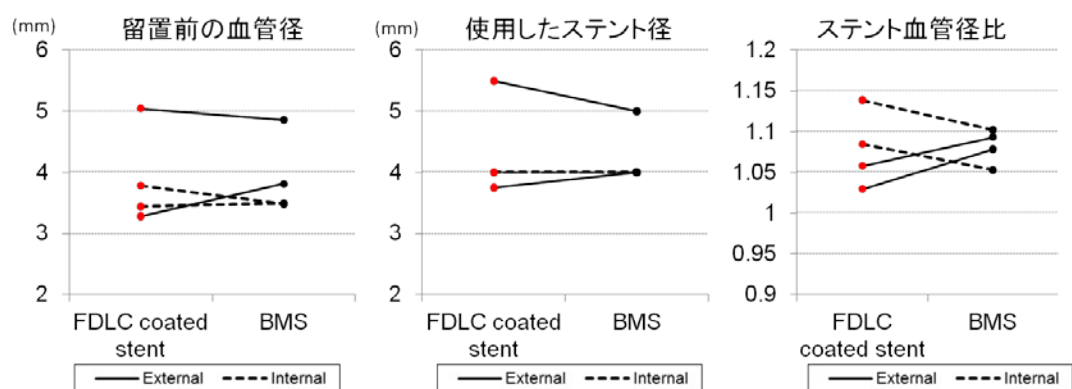


図 49. 2 週群のステント留置時の条件  
External = 外腸骨動脈、Internal = 内腸骨動脈

表 21. ステント留置時の条件 (2 週群)

Stent type	F-DLC coated stent	BMS	p 値
留置前の血管径 (mm)	3.9 ± 0.8	3.9 ± 0.7	0.90
使用したステント径 (mm)	4.3 ± 0.8	4.3 ± 0.5	0.72
ステント血管径比 (Stent/artery ratio)	1.08 ± 0.05	1.08 ± 0.02	0.87

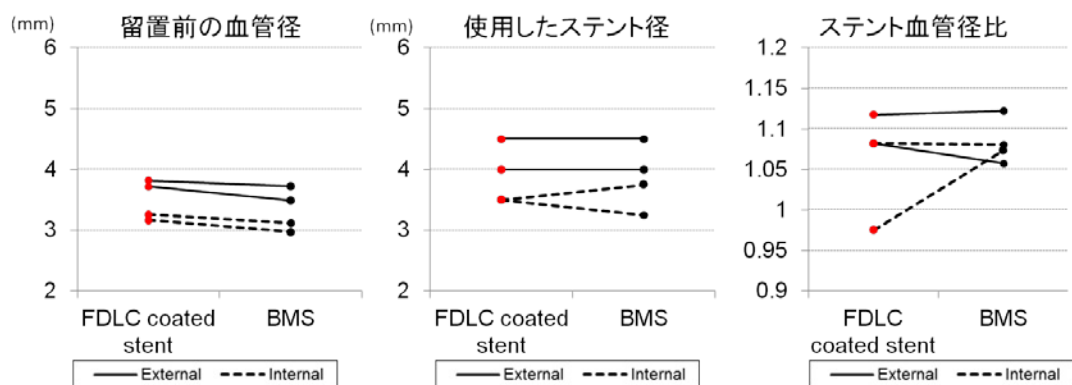


図 50. 4 週群のステント留置時の条件  
External = 外腸骨動脈、Internal = 内腸骨動脈

表 22. ステント留置時の条件 (4 週群)

Stent type	F-DLC coated stent	BMS	p 値
留置前の血管径 (mm)	3.5 ± 0.3	3.3 ± 0.3	0.13
使用したステント径 (mm)	3.9 ± 0.5	3.9 ± 0.5	1.0
ステント血管径比 (Stent/artery ratio)	1.06 ± 0.06	1.08 ± 0.03	0.53

2 週群と 4 週群の双方において、F-DLC coated stent と BMS の術前血管径や使用したステントのサイズ、ステント留置後のステント血管径比に著しい差を認めなかった。ステント血管径比に軽度のバラツキを認めるが、1.0–1.1 の目標値から大きく外れることはなかった。

## 2. IVUS による解析

短期フォローアップ群で IVUS を行った目的は、1) ステント内血栓の有無を確認すること、2) 病理標本で IVUS による血管内腔面損傷の有無を確認すること、である。55 頁の ACC consensus document に従い、IVUS により 2 週群と 4 週群におけるステント内血栓の評価を行ったが、全てのステントにおいて明らかな血栓は同定されなかった。

## 3. 病理学的評価

全てのステント評価の結果をペアごとに表示した図と、血管をまとめてステント間の比較検討を行った表を以下に示す（2 週群；図 51, 表 23：4 週群；図 52, 表 24）。

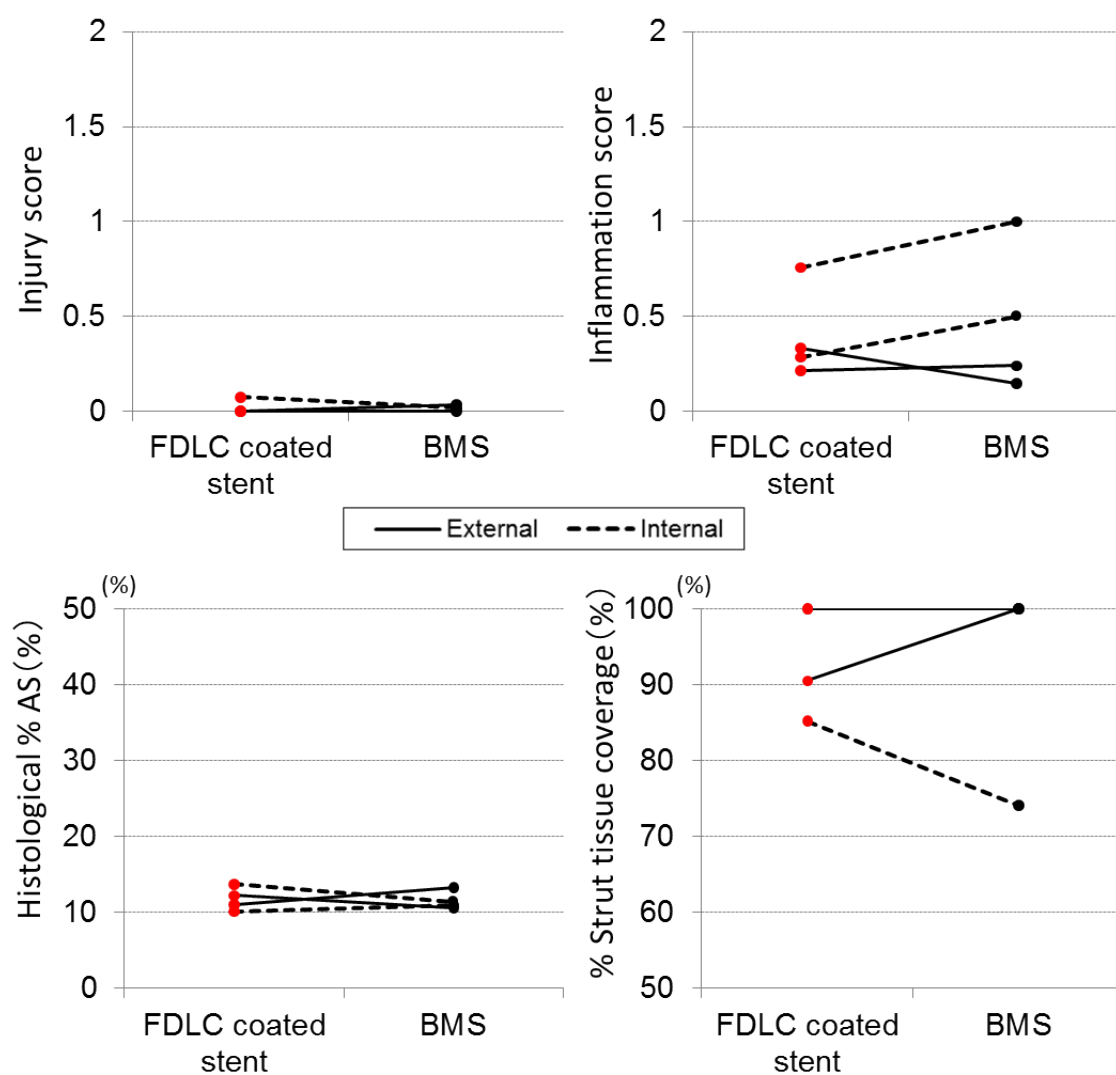


図 51. 2 週群の病理結果

External = 外腸骨動脈、Internal = 内腸骨動脈

表 23. 2 週群の病理学的解析

	F-DLC coated stent	BMS	p 値
血栓の有無	(-)	(-)	
血管内腔面の損傷	(-)	(-)	
損傷スコア	0.019 ± 0.04	0.014 ± 0.018	0.83
炎症スコア	0.40 ± 0.25	0.47 ± 0.38	0.51
面積狭窄率 (%)	11.7 ± 1.6	11.5 ± 1.2	0.86
組織被覆率 (%)	93.9 ± 7.4	93.5 ± 13.0	0.93

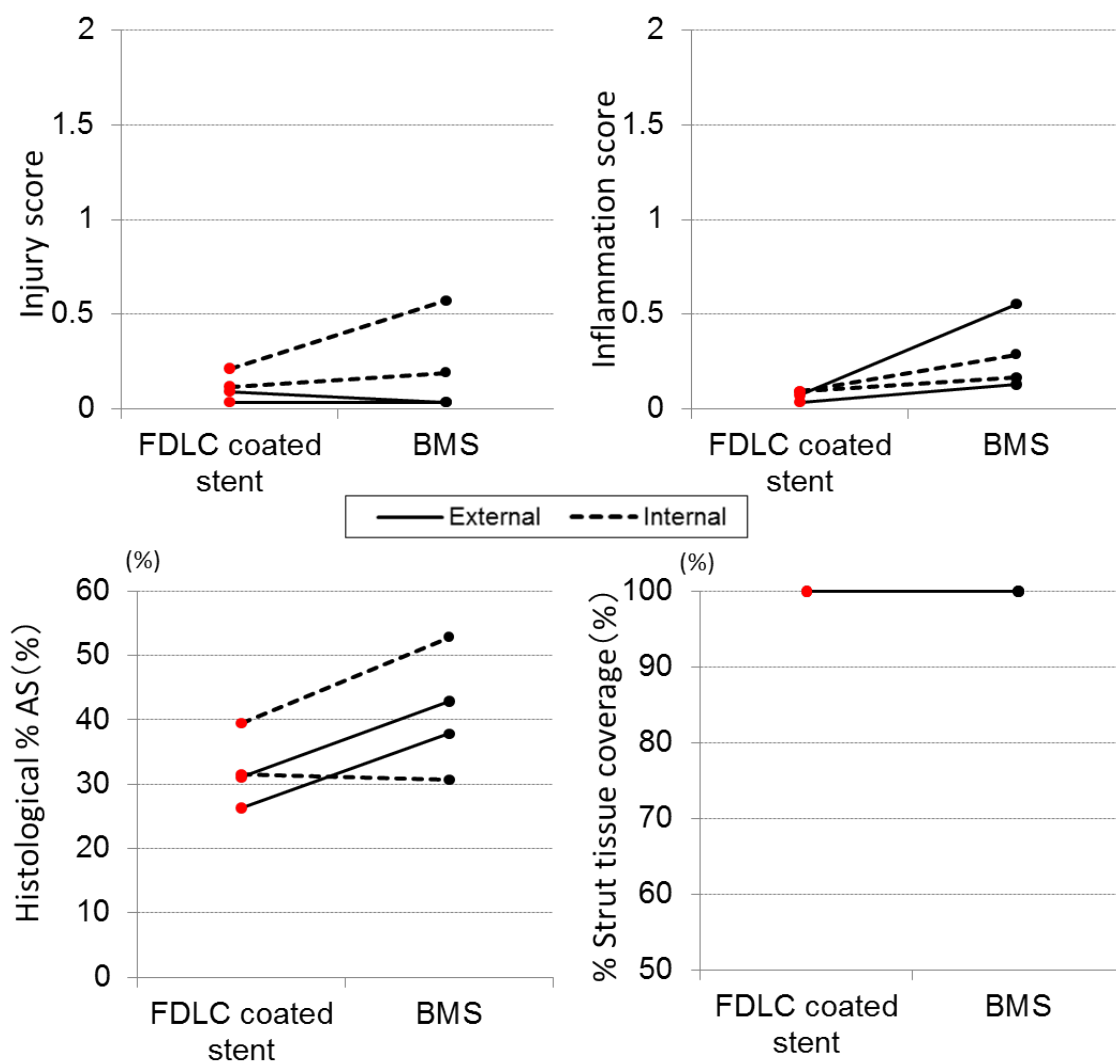


図 52. 4 週群の病理結果

External = 外腸骨動脈、Internal = 内腸骨動脈

表 24. 4 週群の病理学的解析

	F-DLC coated stent	BMS	p 値
血栓の有無	(-)	(-)	
血管内腔面の損傷	(-)	(-)	
損傷スコア	0.12 ± 0.07	0.21 ± 0.25	0.83
炎症スコア	0.08 ± 0.03	0.28 ± 0.19	0.11
面積狭窄率 (%)	32.1 ± 5.5	41.1 ± 9.3	0.07
組織被覆率 (%)	100	100	

2 週群および 4 週群の全ての病理標本において血栓の付着を認めなかった。また明らかな血管内腔面の損傷を認めなかった。損傷スコアは 2 週群、4 週群ともにステント間で差を認めなかった。炎症スコアは 2 週群、4 週群ともに差を認めず、両ステントともに低値（1 以下）であった。ストラットの組織被覆に関しては、両ステントとも 2 週目で 94%程度のストラットが内皮様細胞や新生内膜組織に覆われ、4 週目では完全に被覆されていた。面積狭窄率は 2 週群ではステント間で同様であり、4 週群は有意ではないが F-DLC coated stent において低値となる傾向にあった（F-DLC coated stent vs. BMS =  $32.1 \pm 5.5\%$  vs.  $41.1 \pm 9.3\%$  ;  $p=0.07$ ）。

2 週間と 4 週間の短期フォローアップ群における結果を以下にまとめた。ステントのサンプル数が小さいため、比較の検討はあくまでも参考として行った。

- 2 週目と 4 週目の急性期において、ステント内に明らかな血栓付着を認めなかった。
- IVUS 操作による粗大な血管内腔面の損傷を認めなかった。
- 病理評価における狭窄率の比較では、2 週目ではステント間で同様であるが、4 週目で F-DLC coated stent において低値となる傾向があった。
- 炎症スコアは急性期においても両ステントともに低値であり、ステント間に



差を認めなかった。

- ステントストラットの組織被覆の程度はステント間で同等であり、F-DLC コーティングによる組織被覆障害を認めなかった。

## VII. 考察

### A. 研究結果のまとめ

- ミニブタに対する繰り返しの処置：

ミニブタに対して2週間間隔に3ヶ月まで、健康状態を悪化させることなく、繰り返しの頸動脈からのカテーテル挿入処置や IVUS 測定が可能であった。

- 繰り返しの IVUS 測定結果：

ミニブタの左右対称な腸骨動脈にステントを留置して、2週間間隔で3ヵ月後まで繰り返し IVUS 測定した結果、新生内膜増殖によるステント内狭窄の進行から軽度退縮までの、各ステントにおける経時的な変化を確認し、狭窄率のピーク値を同定し得た。

- F-DLC coated stent vs. BMS の結果（12週フォローアップ群）

IVUS による狭窄率は、ステント全体の3次元的な狭窄率である新生内膜体積狭窄率（%VO）と、最も狭小化している横断面における面積狭窄率（%AS at MLA）の2項目を評価した。外腸骨動脈および内腸骨動脈の双方において、狭窄率2項目の経過パターンは F-DLC coated stent が BMS に比べて有意に低かった。狭窄率ピーク値の比較では、外腸骨動脈（%VO; F-DLC coated

stent vs. BMS =  $22.8 \pm 14.7$  % vs.  $40.4 \pm 24.2$  %;  $p=0.031$ : %AS at MLA;  $31.5 \pm 20.3$  % vs.  $48.8 \pm 24.4$  %;  $p=0.016$ )、内腸骨動脈 (%VO;  $24.3 \pm 15.9$  % vs.  $32.9 \pm 13.6$  %;  $p=0.039$ : %AS at MLA;  $32.0 \pm 17.7$  % vs.  $43.1 \pm 15.5$  %;  $p=0.016$ ) において F-DLC coated stent が BMS に比べて有意に低値であった。12 週後の病理標本による狭窄率の比較では、F-DLC coated stent の狭窄率が外腸骨動脈では低値となる傾向を認め ( $34.2 \pm 20.1$  vs.  $44.3 \pm 28.7$ ;  $p=0.09$ )、内腸骨動脈では有意に低値であった ( $34.7 \pm 17.3$  vs.  $40.9 \pm 15.5$ ;  $p=0.039$ )。炎症スコアは内腸骨動脈において F-DLC coated stent が低値となる傾向を認めた ( $0.01 \pm 0.02$  vs.  $0.07 \pm 0.06$ ;  $p=0.09$ )。全てのステントにおいて明らかな血栓付着および血管内腔面の粗大な損傷を認めなかった。

- F-DLC coated stent vs. BMS の結果 (2 週、4 週フォローアップ群)

全てのステントにおいて、ステント内の血栓や血管内腔面の損傷は同定されなかった。F-DLC coated stent の炎症スコアは急性期においても低値であり、BMS と同様であった。F-DLC coated stent の組織被覆率は BMS と同様であり、F-DLC コーティングによる組織被覆化の障害を認めなかった。

## B. 動物モデルの検証

### 1. ミニブタによる経時的評価の有用性と妥当性

本研究で使用したミニブタは元々実験動物用として開発された動物であり、臓器の特徴がブタと同様ヒトに類似しているといわれる。ブタとの大きな違いは、体格が小さく、生後 6-7 ヶ月で成熟した後の体格変動も小さい点であり、成長に伴う血管サイズの変化も小さいため、長期実験に適しているといわれている<sup>51, 55</sup>。本研究では平均 15 ヶ月齢で体重 23 kg 程度のミニブタを使用し、12 週群の前半に使用したミニブタは体重の減少を認めたが、食餌量を増加することで後半のミニブタは体重が一定となった。食餌量の調節が必要ではあったが、ミニブタは体重を一定に保つことが可能な実験動物と考えられる。なお、期間中に正常血管のサイズに変化があったか否かは本研究では検証されておらず、今後の課題である。

また、本研究では繰り返しの処置により、動物の健康状態悪化をもたらすリスクもあったが、血管内への進入ルートであるシースを毎回抜去し、体内に異物を残さない方針とした結果、動物の健康状態を損なうことなく実験を継続することが可能となり、ミニブタ健康スコアによる評価でも健康状態や神経学的所見の悪化を認めなかった。血液検査では 12 週群、4 週群においては経過中に

有意な悪化を認めなかったが、2 週群の個体 No.11 で白血球数変化 (3,310 →17,810/ $\mu$ l) を認めた。このミニブタはステント留置後 1 週目より腹部膨満を認め、食餌の速度もやや低下したが、残食もなく発熱や活気の低下も認めなかった。2 週目の血液検査のその他の項目は、Hb 8.7, Plt 31.9, ALT 29, AMY 1011, TB 0.3, Cre 0.5, Na 141, K4.1, ALB 3.9, BS70 であり白血球数の増多以外の異常所見は認めなかった。剖検時の検索でも肉眼的に肺炎や腹膜炎はなかったが、胃腸管に多量の残留物があり、手術操作とは関係のない、他の消化器系の感染症を合併した可能性が高い。No.11 以外のミニブタについては全経過中に血液検査の悪化は認めず、ミニブタは繰り返しの手術操作に耐えうる動物であることが示唆された。

## 2. 繰り返しの測定

従来の前臨床試験は、表 3 に示したように、コーティングステントの研究開発の場合はブタ冠動脈モデルが使用され、DES の開発の場合はブタ冠動脈モデルとウサギ腸骨動脈モデルが使用されている。ステント内狭窄を比較している報告例を提示すると、DLC coated stent の実験では、20 頭のブタの冠動脈にランダムに DLC coated stent と BMS を留置し、6 週目の病理標本により狭窄率を評価している (DLC coated stent vs. BMS =  $41 \pm 17$  % vs.  $54 \pm 15$  %;  $p=0.06$ )<sup>42</sup>。ま

た、DES の実験でシロリムス溶出ステント (SES; sirolimus-eluting stent) の BMS に対する有効性を示した報告では、16 頭のブタの冠動脈に留置したステントを 4 週目の病理標本により新生内膜面積を評価したもの (SES vs. BMS =  $2.47 \pm 1.04 \text{ mm}^2$  vs.  $5.06 \pm 1.88 \text{ mm}^2$ ;  $p < 0.0001$ )<sup>19</sup> や、19 頭のウサギの腸骨動脈に合計 37 本の 4 種類のステントをランダムに留置し 4 週目の病理標本により面積狭窄率を比較した報告 (SES vs. BMS = 8.6 % vs. 16.1 %;  $p < 0.05$ )<sup>21</sup> などがある。しかし、これらの報告は全て、特定の観察時期のみにおける横断的な比較となっているため、結果として得られた狭窄率がそれぞれのピーク値を示しているかは定かではない。また、複数の観察時期を設定している報告例<sup>56</sup>においても、図 5 で示した通り、別個体間の時期を変えた比較では、狭窄率の経過にバラツキを認め、結果の把握が困難となる。新生内膜の量や狭窄率は、ステントの有効性を評価する代表的な項目であるため、繰り返しの測定により各ステントにおける狭窄率の経過を解析し、増殖のピークを同定することが重要と考えられる。

本研究で、各ステントにおける新生内膜増殖を繰り返し測定した結果、同種の血管に留置した同じタイプのステント同士においても、増殖のピークを示すタイミングが個体により異なることが示唆された。図 30 に示した個々の %VO の経過グラフをみると、観察時期の違いによって狭窄率の上下が逆転する例が存在し、ある特定の観察時期のみの評価では、狭窄率が誤って評価される可能

性があるといえる。したがって、特定の観察時期における横断的な比較よりも、それぞれ時期は異なっても、繰り返しの測定により狭窄率のピーク値を正確に同定することがステントの有効性評価にとって重要と考えられる。また、動物実験の原則である“3Rs (replacement, reduction and refinement)”が近年特に重要視されており<sup>86</sup>、繰り返しの測定は使用動物数の減少に貢献するという側面も有する。

但し、繰り返しの IVUS 測定を行うためには、繰り返し使用可能なアプローチルートが必要であり、本研究では総頸動脈を結紮せずに温存し、これを繰り返し使用した。総頸動脈は片側で平均 5-6 回ルートとして再利用できるが、time point の設定としては 10-12 ヶ所くらいが限度と思われる。仮に両側の総頸動脈が期間中に使用困難となった場合は、ほかの候補として両側の深頸動脈、両側の上腕動脈からもアプローチが可能である。

本動物モデルでは繰り返しの測定に加え、ステント留置時の条件を均一化することを重視し、左右対称な腸骨動脈を使用した。ウサギ腸骨動脈はブタ冠動脈に比べ、血流の因子の均一化の点では有利であるが、ウサギは新生内膜の増殖反応が軽いため、狭窄率の比較モデルとしてではなく、ステントストラットの内皮化を判定するためのモデルとして使用されることが多い<sup>20, 55, 56</sup>。上記の 19 頭のウサギを使用した報告例では、ステント血管径比を 1.3 と高く設定した

過拡張モデルであったにも関わらず、BMS 留置後 4 週目の狭窄率が 16.1 % と低値であった。この場合、ステント留置時の血管壁損傷が大きく狭窄率に影響を及ぼすことが推測され、ステント自体の効果が結果に反映されにくいと考えられる。

### 3. ステント比較条件の妥当性

ステント留置後の狭窄率やストラット周囲の炎症反応、ストラットの組織被覆化の速度に強く影響する要因として、血管径やステント血管径比、損傷スコアが挙げられる<sup>4, 87-90</sup>。本研究ではこれらの要因が可能な限り均一となるように努めた結果、上記の項目に関してステント間で有意な差を認めなかった。ステント血管径比は両ステント群で目標としていた推奨値 1.0–1.1 の範囲内であり<sup>55</sup>、血管に過度の損傷は与えなかった。また損傷スコアもかなり低値（0.5 未満）であり、ステントストラットによる血管壁の損傷が狭窄率に与えるバイアス<sup>84</sup>を除くことができた。事実、12 週群において損傷スコアと histological %AS との相関係数を検討したが明らかな相関を認めず（図 48）、本研究では血管壁の損傷が狭窄率に影響しなかったといえる。そのため、ステント自体の性質を正確に反映した比較評価ができたといえる。

今回、外腸骨動脈に留置した F-DLC coated stent 1 本で、2 週間後のフォローア



ップ時に高度の変形が確認されたため、ペアとなる対側の BMS とともに評価対象から除外した。この変形したステントはステントの原形を保っておらず、ストラットは一部血管内腔に浮いている状態であった。初回のステント留置時のデータは、留置前血管径 4.9 mm、使用したステント 5.0 mm、ステント血管径比 1.07 と、外腸骨動脈に留置した F-DLC coated stent の平均値（血管径 4.8 mm、ステント 5.2 mm、ステント血管径比 1.09）からとくに逸脱していることはなく問題のない状態であった。今回使用したステントは元々冠動脈に使用する 2.5－4.0 mm のステントを腸骨動脈に使用するために 3.5－6.0 mm にサイズアップしたものであり、ヒトの腸骨動脈ステントとしての耐久性や半径方向力を完全には満たしていないため、ミニブタの後肢の動作、あるいは周囲の筋肉の圧迫により変形したものと考えられた。

#### 4. 抗血小板剤の使用に関して

ステントの動物実験では一般的に抗血小板剤が使用されるが、ステントの抗血栓性を確認するために抗血小板剤を使用しないブタやミニブタの研究もこれまで報告されている<sup>91-93</sup>。本研究では、実験のバイアスの減少、および新生内膜増生を引き起こしてステント間で比較することを目的としたため、抗血小板剤を使用しなかった。抗血小板剤を内服させたユカタン系ミニブタやゲッチング

ン系ミニブタの BMS 留置後の狭窄率は 20–30%程度と報告されているが<sup>94-96</sup>、本研究での結果、BMS 留置後の狭窄率は 40%程度とやや高値であり、抗血小板剤を内服しなかったため新生内膜の増殖が増加したものと考えられる。また、ブタ腸骨動脈は新生内膜増殖が軽いという報告もある<sup>97, 98</sup>が、本研究のミニブタにおいては良好な新生内膜増殖を認め、2 種類の異なるステントの狭窄率を正確に比較することができた。しかし、今回の狭窄率の比較結果はあくまでも抗血小板剤を内服していないという臨床使用とは異なる状況下での結果ということとを考慮する必要があり、抗血小板剤を使用した場合に、F-DLC coated stent と BMS の新生内膜増殖に差を認めなくなる可能性もあり得る。本研究に引き続き、ミニブタ冠動脈と腸骨動脈を用いた DES との比較実験が進行中であるが、その試験は抗血小板剤を内服した状態で行っているため、結果の違いに関しても比較検討する予定である。

## 5. 腸骨動脈と冠動脈の違い

本研究ではステントを留置する血管の走行や血管径、血流の均一化を重視したため腸骨動脈を使用した。しかし、腸骨動脈は冠動脈に比べて血管の弾性が大きく、血流は腸骨動脈では収縮期に灌流されるが冠動脈では拡張期の灌流であるため、冠動脈にステントを留置した場合、今回とは異なる結果を示す可能

性もある。実際、ブタの冠動脈と腸骨動脈の反応性の違いを検証している報告もあり、バルーン拡張術後に冠動脈は腸骨動脈に比べて血管が収縮するリモデリング反応は軽度であるが、新生内膜の増殖は腸骨動脈に比べて厚くなることが示されている<sup>97</sup>。また、**BMS** 留置後の比較においても、冠動脈は内腸骨動脈に比べて狭窄率が高くなることが報告されている<sup>98</sup>。今回の研究では、**F-DLC coated stent** の冠動脈ステントとしての評価ではなく、*in vitro* で抗血栓性が示されている **F-DLC coated stent** が、生体内で **BMS** に対して再狭窄抑制効果を示すか否かを評価することが目的であったため腸骨動脈を使用した。その結果はあくまでも腸骨動脈という条件下での結果である。**F-DLC coated stent** の有効性が冠動脈の使用によって変化するか否か、さらに冠動脈と腸骨動脈の反応性の違いに関しては、現在進行中の冠動脈と腸骨動脈を使用した実験にて検討を行う予定である。

## 6. ミニブタの性差

今回使用したミニブタはオス 6 頭、メス 6 頭と雌雄同数であり、各フォローアップ群でも雌雄同数になるように均等に振り分けた。これまでのブタやミニブタを用いた報告例では、雌雄が記載されていないものが多いが<sup>19, 54, 79, 99</sup>、雌雄ともに使われている報告<sup>67, 91</sup>や、メスのみ<sup>100</sup>を使用した報告例も散見される。

ただ、いずれも性別にわけた解析はされていない。本研究の計画を立てた時点では雌雄で新生内膜の反応が異なるという情報がなく、また入手可能なミニブタ頭数に限りがあったため雌雄同数となったが、性別ごとにわけて狭窄率の解析を行った結果、オスにおいてはステント間の有意差を認める傾向にあり、メスだけに限ると統計学的な有意差を認めなかった。これは、図 41, 42 の通り、オスに比べてメスでは個体による狭窄率のバラツキが大きいことが一因かもしれない。一方、オスとメスの狭窄率の違いを追加解析した結果、図 43, 44 に示す通り、狭窄率の程度に有意な差を認めなかった。本研究の結果のみから性別による傾向を判断することは困難であるが、今後はオスに統一するか、あるいはメスを使用する場合は性周期に同期させるよう統一することが必要と考えられる。本研究ではミニブタ頭数に困難がありやむを得ない状況であったが、今後は性別の選択も重要な検討課題である。

## 7. IVUS 測定の信頼性

本研究で主要な測定手段として使用した IVUS は、血管撮影や病理評価と異なり、生体下において新生内膜やプラークの状態を評価することが可能という利点を有するため、現在ステント留置後の評価手段として臨床および研究の現場で汎用されている<sup>81, 101-103</sup>。しかし IVUS の基本原理として、1) 血管が正円で、

2) カテーテルが血管の中心に位置し、3) トランスデューサが血管の長軸面に対して並行にある、という仮定のもとに画像が構築されていることに留意しなければならない。IVUS 測定の際に、生体内でこの条件を満たすことは稀であり、血管の蛇行による影響を除くことは本質的には不可能であるといわれている<sup>80</sup>。さらに冠動脈の場合は心拍動に伴い血管とカテーテル全体が動くことによる motion artifact の影響も測定の妨げとなる<sup>104</sup>。

IVUS 測定における第一の問題点は、測定値の正確性に関する問題である。von Birgelen らの報告によると、剖検後や心臓移植後の recipient から得られた 13 本のヒト冠動脈を用いて、in vitro で IVUS と病理標本によりプラークの断面積や体積、および狭窄率を測定した結果、IVUS と病理標本からの測定値の間に高い相関関係を認めている（相関係数  $r = 0.80-0.98$ ）<sup>76</sup>。また、Mehran らはブタ冠動脈に BMS を留置して、1 か月後の IVUS と病理標本により新生内膜の体積を測定した結果、両者の間に高い相関関係を認めたことを報告している（相関係数  $r = 0.965$ ,  $p < 0.0001$ ）<sup>77</sup>。今回の研究においても IVUS と病理標本から測定される狭窄率の相関を検討した結果、図 47 に示した通り、有意な相関関係を認めることができた（自由度調整  $R^2 = 0.90-0.92$ ,  $p < 0.0001$ ）。

また、今回の研究で腸骨動脈を使用した最大の理由は、左右対称な血管が二組存在する、という点であるが、さらに腸骨動脈は冠動脈と比べて、1) 血管

が直線的である、2) 頸動脈からアプローチすることでカテーテルが直線化する、3) 拍動が少ない、といった特徴を有する点も挙げられる。これらの特徴は IVUS 測定の正確性を上げるものと推測される。また左右対称な血管のため、左右で同様のカテーテル操作を行うことにより、測定方法が同様になるように心がけた。

IVUS における第二の問題点は、解析の正確性および再現性の問題である。この点に関しては、今回の研究において IVUS 測定値の検者内および検者間信頼性を検討した結果、図 31 に示した通り、有意な一致性が確認された（級内相関係数  $r > 0.995$ ）。

IVUS の第三の問題点として、とくに細い血管において測定の際に IVUS カテーテルが血管内腔面を損傷し、急性閉塞や血管解離を来す可能性があることである<sup>105</sup>。この点に関しては、近年はカテーテルの細径化により IVUS 測定による合併症は皆無であるとも報告されている<sup>106</sup>。本研究ではこれらのリスクに対し、1) 血管径が比較的大きく直線的な腸骨動脈を使用すること、および2) 測定の際に無駄な操作を避け、1 往復のみの操作とすること、により対処した。実際に血管内腔面の損傷が存在したか否かは、病理標本の血管内腔面を詳細に観察し、粗大な損傷がないことを確認したが、今回の研究では2週目と4週目、12週目の限られた標本における観察でしかない。今後十分な検証を行うために

は、各観察時期の病理標本を増やすか、IVUS 測定を繰り返す群と IVUS を行わないコントロール群の狭窄率経過を比較検討することなどが必要と考えられる。

## 8. 本動物モデルの限界

本研究はステント内狭窄の経時的評価を重視したものであるため、経過途中の病理標本による評価が大幅に省略されている。病理評価はステントストラットの内皮化や組織被覆化、ストラット周囲の炎症などを観察できる点で優れており、ステントの評価には必須な項目である。そのため、本動物モデルの IVUS による繰り返しの評価に加え、今回の研究で 2 週目と 4 週目の短期群を置いたように、必要な **time point** における病理評価用の群を追加しておく必要がある。今回の研究における病理評価群は、F-DLC coated stent が BMS と比べて急性期に過度の炎症を惹起しないかどうか、および F-DLC coating によるストラットの組織被覆化の障害が起こらないかどうかを確認するためのプレリミナリーな意味合いが大きかったため、少ないサンプル数の実験となったが、結果の差を確認するためには動物数を増やして検証する必要がある。

今回の観察期間は予備実験の結果を受けて 3 ヶ月間と設定したが、全てのステントにおける狭窄率のピーク値を同定することはできなかった。DES 留置後の動物実験は、晩期再狭窄を評価するために 6 ヶ月間の観察期間が推奨されて

いるが、BMS やコーティングステントの評価期間の定義は存在しない。ほとんどが1ヶ月後に評価されている中、今回は3ヶ月間に延長して実験を行ったが、慢性期における変化を確認するためには観察期間の延長が必要と考えられる。



## C. 今後の展望

### 1. 動物モデル

本研究はミニブタ腸骨動脈を使用し、ステント留置後 2 週間間隔で 12 週目までの観察を行った。しかし、実験の目的に応じて測定間隔や観察期間は変更可能である。例えば DES の評価を目的とする場合は慢性期における評価が重要となるため、測定間隔及び観察期間を延長することも可能である。あるいは比較するステントの特徴に応じて数頭による予備実験を行うことにより time point を策定できる。

本研究の繰り返しの測定自体は、腸骨動脈以外の血管、例えば冠動脈にステントを留置する実験にも応用可能である。この場合、各血管の血流が異なるため、同一個体内での正確な狭窄率の比較は困難であるが、各ステントの狭窄率がピークとなる time point を同定できるため、病理標本を採取する time point を決定することが可能となる。その際に腸骨動脈にもステントを留置しておけば、同一血流条件下での比較も同時に行える。また、疾患モデルのある動物を用いた経時的な観察も可能である。例えば、動脈硬化モデルのプラーク変化、あるいは動脈瘤モデルにおける瘤の形態や閉塞状態の観察などにも応用できる。このように、本モデルを応用して様々な研究が可能と考えられる。

## 2. フッ素添加 DLC コーティングステント (F-DLC coated stent)

今回のミニブタ腸骨動脈を使用した実験により、F-DLC coated stent の in vivo における有効性が初めて示された。すなわち、F-DLC coated stent が BMS に比して有意に新生内膜増殖を抑制することが確認され、BMS に比べて炎症反応を抑制する傾向、およびコーティングにより内皮様細胞や新生内膜による被覆を阻害しないことが確認された。F-DLC coated stent は臨床においてもステント留置後の再狭窄を抑制し、かつステント血栓症のリスクも低減する有効なステントとなる可能性を有するものと推測される。今回の結果を受けて、F-DLC coated stent の製品化へ向けての工程が本格的に開始され、バルーンを含めたステントシステムの改良や生産システムのインフラ整備、ステントの耐久性試験、ブタ冠動脈モデルや各種毒性試験などの安全性試験の手配が行われている。また、現在ミニブタの冠動脈と腸骨動脈に F-DLC coated stent と DES を留置する比較試験を進行中であり、F-DLC coated stent が冠動脈においてどのような狭窄率の経過を示すかの確認や、DES に対する有効性の調査を行っているところである。

ここでは DES による長期の合併症を確認する必要があるため、1 ヶ月間隔で 6 ヶ月後までの繰り返しの測定を継続しており、途中段階であるが DES の狭窄率が慢性期にも上昇する一方、F-DLC coated stent の狭窄率が徐々に低下していく経過を確認している。

現在、各地において新規ステントの研究開発へ莫大な研究開発費が投入されているが、動物実験での有効性が確立されないまま、現行の主流であるブタ冠動脈モデルによる安全性試験が行われている。高額な経費を必要とする安全性試験の前に、本動物モデルにより新規開発中ステントの有効性を正確に評価できれば、研究開発費の節約につながるものと思われる。

## VII. 結論

本研究は、血管内ステントの有効性を経時的に評価する動物モデルの作製を目標とした。左右対称のミニブタ腸骨動脈（外腸骨動脈と内腸骨動脈）に異なるステントを留置し、血管内超音波（IVUS）を用いて繰り返しステント留置後の変化を観察した。その結果、ステント内に増殖する新生内膜の形態変化を経時的に評価することが可能となり、個々のステントにおける狭窄率のピーク値を同定することができた。また、ステント内狭窄に影響する各種の因子を均一にすることにより、フッ素添加 DLC コーティングステントの金属ステントに対する優越性を正確に評価することができた。繰り返しの麻酔や頸動脈の処置、IVUS 測定によってもミニブタの健康状態は悪化しなかった。本動物モデルは各種ステントの有効性を検討するうえで有用なモデルと考えられる。

## VIII. 引用文献

1. Vineberg A, Munro DD, Cohen H, Buller W. Four years' clinical experience with internal mammary artery implantation in the treatment of human coronary artery insufficiency including additional experimental studies. *J Thorac Surg* 29:1-32; discussion, 32-36. 1955
2. Gruntzig A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet* 1:263. 1978
3. Sharma SK, Israel DH, Kamean JL, Bodian CA, Ambrose JA. Clinical, angiographic, and procedural determinants of major and minor coronary dissection during angioplasty. *Am Heart J* 126:39-47. 1993
4. Schwartz RS, Holmes DR, Jr., Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: An alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 20:1284-1293. 1992
5. Strauss BH, Serruys PW, Bertrand ME, Puel J, Meier B, Goy JJ, Kappenberger L, Rickards AF, Sigwart U. Quantitative angiographic follow-up of the coronary wallstent in native vessels and bypass grafts (european experience--march 1986 to march 1990). *Am J Cardiol* 69:475-481. 1992
6. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent restenosis study investigators. *N Engl J Med* 331:496-501. 1994
7. Pache J, Kastrati A, Mehilli J, Schuhlen H, Dotzer F, Hausleiter J, Fleckenstein M, Neumann FJ, Sattelberger U, Schmitt C, Muller M, Dirschinger J, Schomig A. Intracoronary stenting and angiographic results: Strut thickness effect on restenosis outcome (isar-stereo-2) trial. *J Am Coll Cardiol* 41:1283-1288. 2003
8. Sketch MH, Jr., Ball M, Rutherford B, Popma JJ, Russell C, Kereiakes DJ. Evaluation of the medtronic (driver) cobalt-chromium alloy coronary stent system. *Am J Cardiol* 95:8-12. 2005
9. Unverdorben M, Sattler K, Degenhardt R, Fries R, Abt B, Wagner E, Koehler H, Scholz M, Ibrahim H, Tews KH, Hennen B, Daemgen G, Berthold HK, Vallbracht C. Comparison of a silicon carbide coated

- stent versus a noncoated stent in humans: The tenax- versus nir-stent study (teniss). *J Interv Cardiol* 16:325-333. 2003
10. Sick PB, Gelbrich G, Kalnins U, Erglis A, Bonan R, Aengevaeren W, Elsner D, Lauer B, Woinke M, Brosteanu O, Schuler G. Comparison of early and late results of a carbofilm-coated stent versus a pure high-grade stainless steel stent (the carbostent-trial). *Am J Cardiol* 93:1351-1356, A1355. 2004
  11. Haase J, Storger H, Hofmann M, Schwarz CE, Reinemer H, Schwarz F. Comparison of stainless steel stents coated with turbostratic carbon and uncoated stents for percutaneous coronary interventions. *J Invasive Cardiol* 15:562-565. 2003
  12. Airoldi F, Colombo A, Tavano D, Stankovic G, Klugmann S, Paolillo V, Bonizzoni E, Briguori C, Carlino M, Montorfano M, Liistro F, Castelli A, Ferrari A, Sgura F, Di Mario C. Comparison of diamond-like carbon-coated stents versus uncoated stainless steel stents in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 93:474-477. 2004
  13. Meireles GC, de Abreu LM, Forte AA, Sumita MK, Sumita JH, Aliaga Jdel C. Randomized comparative study of diamond-like carbon coated stainless steel stent versus uncoated stent implantation in patients with coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol* 88:390-395. 2007
  14. Kastrati A, Schomig A, Dirschinger J, Mehilli J, von Welser N, Pache J, Schuhlen H, Schilling T, Schmitt C, Neumann FJ. Increased risk of restenosis after placement of gold-coated stents: Results of a randomized trial comparing gold-coated with uncoated steel stents in patients with coronary artery disease. *Circulation* 101:2478-2483. 2000
  15. Buller CE, Dzavik V, Carere RG, Mancini GB, Barbeau G, Lazzam C, Anderson TJ, Knudtson ML, Marquis JF, Suzuki T, Cohen EA, Fox RS, Teo KK. Primary stenting versus balloon angioplasty in occluded coronary arteries: The total occlusion study of canada (tosca). *Circulation* 100:236-242. 1999
  16. Schampaert E, Cohen EA, Schluter M, Reeves F, Traboulsi M, Title LM, Kuntz RE, Popma JJ. The canadian study of the sirolimus-eluting stent in the treatment of patients with long de novo lesions in small native coronary arteries (c-sirius). *J Am Coll Cardiol* 43:1110-1115. 2004
  17. Schofer J, Schluter M, Gershlick AH, Wijns W, Garcia E, Schampaert

- E, Breithardt G. Sirolimus-eluting stents for treatment of patients with long atherosclerotic lesions in small coronary arteries: Double-blind, randomised controlled trial (e-sirius). *Lancet* 362:1093-1099. 2003
18. Colombo A, Drzewiecki J, Banning A, Grube E, Hauptmann K, Silber S, Dudek D, Fort S, Schiele F, Zmudka K, Guagliumi G, Russell ME. Randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions. *Circulation* 108:788-794. 2003
  19. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, Klugherz BD, Papandreou G, Narayan P, Leon MB, Yeung AC, Tio F, Tsao PS, Falotico R, Carter AJ. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 104:1188-1193. 2001
  20. Farb A, Heller PF, Shroff S, Cheng L, Kolodgie FD, Carter AJ, Scott DS, Froehlich J, Virmani R. Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation* 104:473-479. 2001
  21. Klugherz BD, Llanos G, Lieuallen W, Kopia GA, Papandreou G, Narayan P, Sasseen B, Adelman SJ, Falotico R, Wilensky RL. Twenty-eight-day efficacy and pharmacokinetics of the sirolimus-eluting stent. *Coron Artery Dis* 13:183-188. 2002
  22. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 349:1315-1323. 2003
  23. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IM, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: A quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation* 103:192-195. 2001
  24. Stone GW, Moses JW, Ellis SG, Schofer J, Dawkins KD, Morice MC, Colombo A, Schampaert E, Grube E, Kirtane AJ, Cutlip DE, Fahy M, Pocock SJ, Mehran R, Leon MB. Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med* 356:998-1008. 2007
  25. Brodie B, Pokharel Y, Fleishman N, Bensimhon A, Kissling G, Hansen

- C, Milks S, Cooper M, McAlhany C, Stuckey T. Very late stent thrombosis after primary percutaneous coronary intervention with bare-metal and drug-eluting stents for st-segment elevation myocardial infarction a 15-year single-center experience. *Jacc-Cardiovasc Inte* 4:30-38. 2011
26. Nakazawa G, Finn AV, Joner M, Ladich E, Kutys R, Mont EK, Gold HK, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R. Delayed arterial healing and increased late stent thrombosis at culprit sites after drug-eluting stent placement for acute myocardial infarction patients: An autopsy study. *Circulation* 118:1138-1145. 2008
  27. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1769-1776. 2002
  28. Anderson HV, McNatt J, Clubb FJ, Herman M, Maffrand JP, DeClerck F, Ahn C, Buja LM, Willerson JT. Platelet inhibition reduces cyclic flow variations and neointimal proliferation in normal and hypercholesterolemic-atherosclerotic canine coronary arteries. *Circulation* 104:2331-2337. 2001
  29. Rosanio S, Tocchi M, Patterson C, Runge MS. Prevention of restenosis after percutaneous coronary interventions: The medical approach. *Thromb Haemost* 82 Suppl 1:164-170. 1999
  30. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: Cardiac events. *Circulation* 111:363-368. 2005
  31. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, Kutys R, Skoriya K, Gold HK, Virmani R. Pathology of drug-eluting stents in humans: Delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol* 48:193-202. 2006
  32. Daemen J, Wenaweser P, Tsuchida K, Abrecht L, Vaina S, Morger C, Kukreja N, Juni P, Sianos G, Hellige G, van Domburg RT, Hess OM, Boersma E, Meier B, Windecker S, Serruys PW. Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: Data from a large two-institutional cohort study. *Lancet* 369:667-678. 2007
  33. Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK, Virmani R. Vascular responses to drug eluting stents: Importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1500-1510. 2007
  34. Ako J, Morino Y, Honda Y, Hassan A, Sonoda S, Yock PG, Leon MB, Moses JW, Bonneau HN, Fitzgerald PJ. Late incomplete stent



- apposition after sirolimus-eluting stent implantation: A serial intravascular ultrasound analysis. *J Am Coll Cardiol* 46:1002-1005. 2005
35. Cook S, Wenaweser P, Togni M, Billinger M, Morger C, Seiler C, Vogel R, Hess O, Meier B, Windecker S. Incomplete stent apposition and very late stent thrombosis after drug-eluting stent implantation. *Circulation* 115:2426-2434. 2007
  36. Virmani R, Liistro F, Stankovic G, Di Mario C, Montorfano M, Farb A, Kolodgie FD, Colombo A. Mechanism of late in-stent restenosis after implantation of a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system in humans. *Circulation* 106:2649-2651. 2002
  37. Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, Mihalcsik L, Tespili M, Valsecchi O, Kolodgie FD. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: Should we be cautious? *Circulation* 109:701-705. 2004
  38. Thomson LA, Law FC, Rushton N, Franks J. Biocompatibility of diamond-like carbon coating. *Biomaterials* 12:37-40. 1991
  39. Yang P, Huang N, Leng YX, Chen JY, Fu RK, Kwok SC, Leng Y, Chu PK. Activation of platelets adhered on amorphous hydrogenated carbon (a-c:H) films synthesized by plasma immersion ion implantation-deposition (piiii-d). *Biomaterials* 24:2821-2829. 2003
  40. Jones MI, McColl IR, Grant DM, Parker KG, Parker TL. Protein adsorption and platelet attachment and activation, on tin, tic, and dlc coatings on titanium for cardiovascular applications. *J Biomed Mater Res* 52:413-421. 2000
  41. Gutensohn K, Beythien C, Bau J, Fenner T, Grewe P, Koester R, Padmanaban K, Kuehnl P. In vitro analyses of diamond-like carbon coated stents. Reduction of metal ion release, platelet activation, and thrombogenicity. *Thromb Res* 99:577-585. 2000
  42. De Scheerder I, Szilard M, Yanming H, Ping XB, Verbeken E, Neerinck D, Demeyere E, Coppens W, Van de Werf F. Evaluation of the biocompatibility of two new diamond-like stent coatings (dylyn) in a porcine coronary stent model. *J Invasive Cardiol* 12:389-394. 2000
  43. Riezebos R, Ronner E, Kiemeneij F, Laarman GJ. A prospective multicentre registry of the procedural and long-term clinical and angiographic results of stent implantation using a dylyn coated

- coronary stent system. *Int J Cardiovasc Intervent* 6:137-141. 2004
44. Ho JY, Matsuura T, Santerre JP. The effect of fluorinated surface modifying macromolecules on the surface morphology of polyethersulfone membranes. *J Biomater Sci Polym Ed* 11:1085-1104. 2000
  45. Lamperti A, Bottani CE, Ossi PM. Elemental distribution in fluorinated amorphous carbon thin films. *J Am Soc Mass Spectrom* 16:126-131. 2005
  46. Hasebe T, Shimada A, Suzuki T, Matsuoka Y, Saito T, Yohena S, Kamijo A, Shiraga N, Higuchi M, Kimura K, Yoshimura H, Kuribayashi S. Fluorinated diamond-like carbon as antithrombogenic coating for blood-contacting devices. *J Biomed Mater Res A* 76:86-94. 2006
  47. Hasebe T, Yohena S, Kamijo A, Okazaki Y, Hotta A, Takahashi K, Suzuki T. Fluorine doping into diamond-like carbon coatings inhibits protein adsorption and platelet activation. *J Biomed Mater Res A* 83:1192-1199. 2007
  48. Roy RK, Lee KR. Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 83:72-84. 2007
  49. Hasebe T, Murakami K, Nagashima S, Takahashi K, Suzuki T. Design for improved adhesion of fluorine-incorporated hydrogenated amorphous carbon on metallic stent: Three-layered structure with controlled surface free energy. *Diamond & Related Materials* 20:902-906. 2011
  50. Muller DW, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 19:418-432. 1992
  51. Perkins LE. Preclinical models of restenosis and their application in the evaluation of drug-eluting stent systems. *Vet Pathol* 47:58-76. 2010
  52. Gross DR. Thromboembolic phenomena and the use of the pig as an appropriate animal model for research on cardiovascular devices. *Int J Artif Organs* 20:195-203. 1997
  53. Lowe HC, Schwartz RS, Mac Neill BD, Jang IK, Hayase M, Rogers C, Oesterle SN. The porcine coronary model of in-stent restenosis: Current status in the era of drug-eluting stents. *Catheter Cardiovasc Interv* 60:515-523. 2003

54. Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR. Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation* 82:2190-2200. 1990
55. Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, Carter A, Granada JF, Kaluza GL, Chronos NA, Robinson KA, Waksman R, Weinberger J, Wilson GJ, Wilensky RL. Drug-eluting stents in preclinical studies: Updated consensus recommendations for preclinical evaluation. *Circ Cardiovasc Interv* 1:143-153. 2008
56. Nakazawa G, Finn AV, John MC, Kolodgie FD, Virmani R. The significance of preclinical evaluation of sirolimus-, paclitaxel-, and zotarolimus-eluting stents. *Am J Cardiol* 100:36M-44M. 2007
57. Daley SJ, Herderick EE, Cornhill JF, Rogers KA. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis. Part 1: Differing lesion area and volume despite equal plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb* 14:95-104. 1994
58. Kalinowski M, Alfke H, Bergen S, Klose KJ, Barry JJ, Wagner HJ. Comparative trial of local pharmacotherapy with l-arginine, r-hirudin, and molsidomine to reduce restenosis after balloon angioplasty of stenotic rabbit iliac arteries. *Radiology* 219:716-723. 2001
59. Suzuki Y, Yeung AC, Ikeno F. The pre-clinical animal model in the translational research of interventional cardiology. *JACC Cardiovasc Interv* 2:373-383. 2009
60. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: Are human and animal studies comparable? *Heart* 89:133-138. 2003
61. Kastrati A, Schomig A, Dietz R, Neumann FJ, Richardt G. Time course of restenosis during the first year after emergency coronary stenting. *Circulation* 87:1498-1505. 1993
62. Kimura T, Yokoi H, Nakagawa Y, Tamura T, Kaburagi S, Sawada Y, Sato Y, Yokoi H, Hamasaki N, Nosaka H, et al. Three-year follow-up after implantation of metallic coronary-artery stents. *N Engl J Med* 334:561-566. 1996
63. Kuroda N, Kobayashi Y, Nameki M, Kuriyama N, Kinoshita T, Okuno T, Yamamoto Y, Komiyama N, Masuda Y. Intimal hyperplasia regression from 6 to 12 months after stenting. *Am J Cardiol* 89:869-872. 2002
64. Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, Chronos N, Rogers C, Robinson

- KA, Waksman R, Weinberger J, Wilensky RL, Jensen DN, Zuckerman BD, Virmani R. Drug-eluting stents in preclinical studies: Recommended evaluation from a consensus group. *Circulation* 106:1867-1873. 2002
65. Hardhammar PA, van Beusekom HM, Emanuelsson HU, Hofma SH, Albertsson PA, Verdouw PD, Boersma E, Serruys PW, van der Giessen WJ. Reduction in thrombotic events with heparin-coated palmaz-schatz stents in normal porcine coronary arteries. *Circulation* 93:423-430. 1996
  66. Edelman ER, Seifert P, Groothuis A, Morss A, Bornstein D, Rogers C. Gold-coated nir stents in porcine coronary arteries. *Circulation* 103:429-434. 2001
  67. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware M, Jr., Nater C, Hruban RH, Rezai B, Abella BS, Bunge KE, Kinsella JL, Sollott SJ, Lakatta EG, Brinker JA, Hunter WL, Froehlich JP. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation* 103:2289-2295. 2001
  68. Kassab GS, Berkley J, Fung YC. Analysis of pig's coronary arterial blood flow with detailed anatomical data. *Ann Biomed Eng* 25:204-217. 1997
  69. VanBavel E, Spaan JA. Branching patterns in the porcine coronary arterial tree. Estimation of flow heterogeneity. *Circ Res* 71:1200-1212. 1992
  70. Gal D, Rongione AJ, Slovenkai GA, DeJesus ST, Lucas A, Fields CD, Isner JM. Atherosclerotic yucatan microswine: An animal model with high-grade, fibrocalcific, nonfatty lesions suitable for testing catheter-based interventions. *Am Heart J* 119:291-300. 1990
  71. Barth KH, Virmani R, Froelich J, Takeda T, Lossef SV, Newsome J, Jones R, Lindisch D. Paired comparison of vascular wall reactions to palmaz stents, strecker tantalum stents, and wallstents in canine iliac and femoral arteries. *Circulation* 93:2161-2169. 1996
  72. Schurmann K, Vorwerk D, Kulisch A, Stroehmer-Kulisch E, Biesterfeld S, Stopinski T, Gunther RW. Experimental arterial stent placement. Comparison of a new nitinol stent and wallstent. *Invest Radiol* 30:412-420. 1995
  73. Doucette JW, Corl PD, Payne HM, Flynn AE, Goto M, Nassi M, Segal

- J. Validation of a doppler guide wire for intravascular measurement of coronary artery flow velocity. *Circulation* 85:1899-1911. 1992
74. Tanaka M, Tsuno NH, Mitsudo K, Kadota K, Tatami R, Kato M, Kato K, Nogami A, Ishikawa O, Takahashi K. First human trial of kw39 slotted-tube stents. *Tex Heart Inst J* 38:502-507. 2011
75. Mintz GS, Griffin J, Chuang YC, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Popma JJ, Leon MB. Reproducibility of the intravascular ultrasound assessment of stent implantation in saphenous vein grafts. *Am J Cardiol*. 1995;75:1267-1270
76. von Birgelen C, van der Lugt A, Nicosia A, Mintz GS, Gussenhoven EJ, de Vrey E, Mallus MT, Roelandt JR, Serruys PW, de Feyter PJ. Computerized assessment of coronary lumen and atherosclerotic plaque dimensions in three-dimensional intravascular ultrasound correlated with histomorphometry. *Am J Cardiol* 78:1202-1209. 1996
77. Mehran R, Mintz GS, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Brahim A, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Popma JJ, Leon MB. Validation of the in vivo intravascular ultrasound measurement of in-stent neointimal hyperplasia volumes. *J Am Coll Cardiol* 32:794-799. 1998
78. Strehblow C, Gyongyosi M, Sperker W, Shirazi M, Windberger U, Pugatsch T, Ben-Sasson S, Lotan C, Glogar D. Usefulness of intravascular ultrasound-guided histological measurements after stenting in porcine coronary artery. *Coron Artery Dis* 13:291-294. 2002
79. Carter AJ, Laird JR, Kufs WM, Bailey L, Hoopes TG, Reeves T, Farb A, Virmani R. Coronary stenting with a novel stainless steel balloon-expandable stent: Determinants of neointimal formation and changes in arterial geometry after placement in an atherosclerotic model. *J Am Coll Cardiol* 27:1270-1277. 1996
80. Mintz GS, Nissen SE, Anderson WD, Bailey SR, Erbel R, Fitzgerald PJ, Pinto FJ, Rosenfield K, Siegel RJ, Tuzcu EM, Yock PG. American college of cardiology clinical expert consensus document on standards for acquisition, measurement and reporting of intravascular ultrasound studies (ivus). A report of the american college of cardiology task force on clinical expert consensus documents. *J Am Coll Cardiol* 37:1478-1492. 2001
81. Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J, Leon MB. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study.

- Circulation* 94:1247-1254. 1996
82. Yamaguchi M, Zhou C, Heistad DD, Watanabe Y, Zhang JH. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase failed to prevent cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 35:2512-2517. 2004
  83. Tanaka Y, Imai H, Konno K, Miyagishima T, Kubota C, Puentes S, Aoki T, Hata H, Takata K, Yoshimoto Y, Saito N. Experimental model of lacunar infarction in the gyrencephalic brain of the miniature pig: Neurological assessment and histological, immunohistochemical, and physiological evaluation of dynamic corticospinal tract deformation. *Stroke* 39:205-212. 2008
  84. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: Results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 19:267-274. 1992
  85. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: Contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 31:224-230. 1998
  86. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX* 19:73-78. 2002
  87. Briguori C, Sarais C, Pagnotta P, Liistro F, Montorfano M, Chieffo A, Sgura F, Corvaja N, Albiero R, Stankovic G, Toutoutzas C, Bonizzoni E, Di Mario C, Colombo A. In-stent restenosis in small coronary arteries: Impact of strut thickness. *J Am Coll Cardiol* 40:403-409. 2002
  88. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Pache J, Ulm K, Schuhlen H, Seyfarth M, Schmitt C, Blasini R, Neumann FJ, Schomig A. Restenosis after coronary placement of various stent types. *Am J Cardiol* 87:34-39. 2001
  89. Roubin GS, King SB, 3rd, Douglas JS, Jr. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: The emory university hospital experience. *Am J Cardiol* 60:39B-43B. 1987
  90. Uretsky BF, Rosanio S, Lerakis S, Wang FW, Smiley M, Stouffer GA, Tocchi M, Estella P. A prospective evaluation of angiography-guided coronary stent implantation with high versus very high balloon inflation pressure. *Am Heart J* 140:804-812. 2000
  91. Henn C, Satz S, Christoph P, Kurz P, Radeleff B, Stampfl U, Stampfl

- S, Berger I, Richter GM. Efficacy of a polyphosphazene nanocoat in reducing thrombogenicity, in-stent stenosis, and inflammatory response in porcine renal and iliac artery stents. *J Vasc Interv Radiol* 19:427-437. 2008
92. van der Giessen WJ, Slager CJ, van Beusekom HM, van Ingen Schenau DS, Huijts RA, Schuurbiers JC, de Klein WJ, Serruys PW, Verdouw PD. Development of a polymer endovascular prosthesis and its implantation in porcine arteries. *J Interv Cardiol* 5:175-185. 1992
  93. Bar FW, van Oppen J, de Swart H, van Ommen V, Havenith M, Daemen M, Leenders P, van der Veen FH, van Lankveld M, Verduin M, et al. Percutaneous implantation of a new intracoronary stent in pigs. *Am Heart J* 122:1532-1541. 1991
  94. Buchwald AB, Unterberg C, Nebendahl K, Grone HJ, Wiegand V. Low-molecular-weight heparin reduces neointimal proliferation after coronary stent implantation in hypercholesterolemic minipigs. *Circulation* 86:531-537. 1992
  95. Unterberg C, Sandrock D, Nebendahl K, Buchwald AB. Reduced acute thrombus formation results in decreased neointimal proliferation after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 26:1747-1754. 1995
  96. de Smet BJ, Pasterkamp G, van der Helm YJ, Borst C, Post MJ. The relation between de novo atherosclerosis remodeling and angioplasty-induced remodeling in an atherosclerotic yucatan micropig model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:702-707. 1998
  97. Ward MR, Kanellakis P, Ramsey D, Jennings GL, Bobik A. Response to balloon injury is vascular bed specific: A consequence of de novo vessel structure? *Atherosclerosis* 151:407-414. 2000
  98. Krueger KD, Mitra AK, DelCore MG, Hunter WJ, 3rd, Agrawal DK. A comparison of stent-induced stenosis in coronary and peripheral arteries. *J Clin Pathol* 59:575-579. 2006
  99. Waksman R, Leitch IM, Roessler J, Yazdi H, Seabron R, Tio F, Scott RW, Grove RI, Rychnovsky S, Robinson B, Pakala R, Cheneau E. Intracoronary photodynamic therapy reduces neointimal growth without suppressing re-endothelialisation in a porcine model. *Heart* 92:1138-1144. 2006
  100. Frohlich G, Strehblow C, Sperker W, Yahya N, Shirazi M, Hevesi A, Garamvolgyi R, Hadjiev J, Scherzer T, Glogar D, Gyongyosi M. Serial intravascular ultrasonographic measurements after implantation of

- biodegradable polymer-coated stents in porcine coronary arteries. *Coron Artery Dis* 14:409-412. 2003
101. Weissman NJ, Koglin J, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Kutcher M, Wong SC, Strickland W, Mooney M, Russell ME, Ellis SG, Stone GW. Polymer-based paclitaxel-eluting stents reduce in-stent neointimal tissue proliferation: A serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the taxus-iv trial. *J Am Coll Cardiol* 45:1201-1205. 2005
  102. Sousa JE, Costa MA, Sousa AG, Abizaid AC, Seixas AC, Abizaid AS, Feres F, Mattos LA, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries. *Circulation* 107:381-383. 2003
  103. Hong MK, Park SW, Moon DH, Oh SJ, Lee CW, Rhee KS, Sun F, Song JM, Kang DH, Song JK, Kim JJ, Park SJ. Intravascular ultrasound analysis of beta radiation therapy for diffuse in-stent restenosis to inhibit intimal hyperplasia. *Catheter Cardiovasc Interv* 54:169-173. 2001
  104. Nadkarni SK, Boughner D, Fenster A. Image-based cardiac gating for three-dimensional intravascular ultrasound imaging. *Ultrasound Med Biol* 31:53-63. 2005
  105. Hausmann D, Erbel R, Alibelli-Chemarin MJ, Boks W, Caracciolo E, Cohn JM, Culp SC, Daniel WG, De Scheerder I, DiMario C, et al. The safety of intracoronary ultrasound. A multicenter survey of 2207 examinations. *Circulation* 91:623-630. 1995
  106. Batkoff BW, Linker DT. Safety of intracoronary ultrasound: Data from a multicenter european registry. *Cathet Cardiovasc Diagn* 38:238-241. 1996



## IX. 謝辞

本研究の機会を与えてくださり、ご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経外科学教授・齊藤延人先生に深く感謝いたします。また研究のテーマや実験計画、実験内容につき具体的なご指導を賜りました東京大学医学部附属病院輸血部教授・高橋孝喜先生に深く感謝いたします。日々の研究現場や統計解析、論文作成において厚くご指導を賜りました東京大学医学部附属病院輸血部助教・田中実先生に深謝いたします。動物実験の遂行にあたり周術期管理や動物の特徴など様々にご指導やご助言を賜りました前東京大学医学部脳神経外科助教（現京都産業大学総合生命科学部動物生命医科学科助教）・今野兼次郎先生に深謝いたします。動物実験の遂行にあたり厚くご協力をいただきました東邦大学医療センター佐倉病院放射線科准教授・長谷部光泉先生、同病院放射線科・北村範子先生、川澄化学工業株式会社・堀川あゆみ様、寺西麻依様、高橋優子様、東京大学医学部附属病院輸血部・清水珠代様に心より感謝いたします。

本研究に使用しましたコーティングステントの開発にご尽力されました慶応大学理工学部教授・鈴木哲也先生、川澄化学工業株式会社・村上和範様に深く御礼申し上げます。

動物の健康管理や実験施設の運営に関して大変お世話になりました東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター動物資源研究領域・岩淵成紘先生、後藤元樹先生・渡辺澄子様へ深謝いたします。日々の動物管理において厚くご協力をいただきました株式会社ジェー・エー・シー・山岡史明様、伊東邦敏様、中尾紀彦様、高橋優花様に心より感謝いたします。

実験の技術的なご指導を賜りました前東京大学医学部脳神経外科特任講師（現東京厚生年金病院脳神経血管内治療科部長）・飯島明先生、同医学部脳神経外科助教・庄島正明先生、同医学部循環器内科特任助教・藤生克仁先生に深く感謝いたします。また、日々の実験にご協力いただきました川澄化学工業株式会社・井原晃様、吉田紳一郎様、野見山弘章様、吉川吉治様、ボストン・サイエンティフィック ジャパン株式会社・梅田基夫様、株式会社セントラル科学貿易・萩野憲司様、そして研究に関する様々な助言をいただきました大学院の同僚に心より感謝いたします。

最後に、4年間の激しく長い研究生活を支えてくれた妻佐知子、長男温貴、長女奈和に、心から感謝したいと思います。