

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 石川 治

### 【序文】

心筋梗塞や狭心症などの虚血性心疾患に対する治療は、外科的治療に比べた低侵襲性や高い利便性の点から、ステント治療が広く普及している。しかし、ステント留置後の合併症には未解決のものが多く、1990年代から使用されている金属ステント（BMS ; bare metal stent）は、留置後 3-6 ヶ月目に生じる新生内膜増殖を主体とする再狭窄が課題である。一方、2000年代になり登場した細胞増殖抑制作用をもつ薬剤を用いた薬剤溶出性ステント（DES ; drug-eluting stent）は、BMS と比べ著明な再狭窄抑制効果を示した。しかし、使用した薬剤の作用によりステントが内皮などの組織で被覆されないため、ステント内に血栓が形成されステント血栓症という致命的な合併症が生じることや、薬剤を包むポリマーにより局所的に高度な炎症が引き起こされ、慢性期に再狭窄を来すことなどが問題となっている。このような再狭窄およびステント血栓症という問題は、前臨床試験の検証では明らかにされず、臨床応用後に初めて判明したという経緯がある。

ステントの前臨床試験で用いられるモデルとしては、血管のサイズや走行、ステント留置後の反応などがヒトと類似しているためブタ冠動脈モデルが汎用されてきた。実験の方法は、冠動脈 3本のうち 1-3本にステントを留置し、再狭窄のピークと推定されている 4週目にステントの効果判定を行うものであり、長期的な評価を行う場合は留置後 3ヶ月目や 6ヶ月目などの時点での観察を追加するというものである。すなわち、ステント留置後の狭窄率は、各時点での血管撮影あるいは血管内超音波（IVUS ; intravascular ultrasound）を参考にはするが、あくまで各時点での病理標本による測定が中心であり、それによりステントの有効性を評価してきた。しかし、ブタ冠動脈は 3本それぞれの血流が異なり、またステント留置後の新生内膜増殖は経時的に変化し、しかもその過程は個体差が大きいことから、上記のブタ冠動脈モデルでステントの有効性を正確に評価することは困難といわれる。BMS 留置後の新生内膜は、急性期に増殖し慢性期に軽度の退縮を示し、DES 留置後は慢性期になり新生内膜が増殖し始める可能性があるため、各ステントの経過を経時的に追う必要があると考えられる。本研究では、ステント留置の条

件を可能な限り均一にしたいうえで、同一個体に繰り返し IVUS 測定を行うことにより、各ステントの狭窄率の経過を経時的に比較検討できる新たな動物モデルの作製を試みた。同時に、現在開発中のステントの有効性を評価することにより、本動物モデルの妥当性を検証した。

## 【方法と結果】

本研究では、体格が一定で長期的な観察に適したミニブタ（ゲッチング系ミニブタ、平均体重約 23kg、月齢 15 ヶ月）を用いた。実験のバイアスを最小限に抑えるため、抗血小板薬は内服させていない。2種類のステントを blind にしたいうえでミニブタの左右対称な外腸骨動脈および内腸骨動脈に留置することで、血管径や血流などの背景因子の均一化を図った。主に左総頸動脈からアプローチして、1頭あたり4本のステントを留置した。使用した頸動脈は結紮せず温存して繰り返し使用できるよう工夫して、留置後2週間毎に IVUS を用いてステント内狭窄の経時的変化および観察期間中の狭窄率のピーク値を評価した。

ミニブタ8頭に対して2週間間隔で12週目までの評価を行い、12週目の IVUS 終了後にミニブタを安楽死し、病理標本を採取した。また、急性期の病理評価を補足するために2週群（2頭）、4週群（2頭）を追加し、各々の病理標本作製した。本研究における主な評価項目および結果を示す。経時的変化の比較は 2-way repeated measure ANOVA により検討し、2群間の比較には Wilcoxon signed-rank test を適用した。

### 1) 繰り返しの IVUS がミニブタの健康状態に与える影響について

2週間間隔で全身麻酔や頸動脈処置、IVUS 検査を繰り返し施行するため、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。そのため実験期間中、ミニブタ健康スコア（Score 0–21）による評価や、2週毎の IVUS 測定時に血液検査を実施し、健康状態をモニターした。実験期間中のミニブタの活気や食欲、栄養状態、姿勢保持、四肢の運動などに関して観察したが、処置翌日を除いて全期間スコア 0 と良好であり、体重もほぼ一定であった。また、血算値や肝機能、腎機能、凝固系機能にも異常所見を認めなかった。

### 2) ステント内狭窄の経時的変化

繰り返しの IVUS 測定により、ステント留置後の狭窄の進行から、ピークを過ぎると退縮するまでの連続的な変化を、12週間の観察期間のなかで確認することができた。これにより各ステントの代表値である狭窄率のピーク値が同定され、比較検討することが可能となった。

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

BMS をコントロールとし、評価対象として現在開発中のフッ素添加 DLC（diamond-like carbon）コーティングステント（F-DLC coated stent）を用いた。両側の外腸骨動脈および内腸骨動脈に、左右それぞれ異なるステントを留置したが、F-DLC coated stent と BMS の間で、留置前の血管径や使用したステントのサイズ、ステント拡張圧、留置直後のステント血管径比（留

置後のステント径／留置前の血管径) は差を認めず、ステント留置の条件はステント間で同様であった。

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 : percent in-stent volume obstruction) 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 : percent area stenosis at minimal lumen area) 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 ( $p < 0.05$ )。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有意ではないが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が有意ではなかった ( $0.01 \pm 0.02$  vs.  $0.07 \pm 0.06$ ;  $p = 0.09$ )。また、全てのステントにおいて明らかな血栓付着を認めなかった。

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

急性期群の病理評価でも、全てのステントに血栓を認めなかった。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 の組織被覆化は BMS と同様に早期に認め (2 週間目で約 94%)、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。

#### 【考察】

ミニブタの腸骨動脈にステントを留置し、繰り返し IVUS を用いて測定したところ、各ステントの狭窄率の変化を経時的に評価することができた。その結果、従来の動物モデルでは同定困難であった狭窄率のピーク値を捉えることが可能となった。本動物モデルは、同一個体の両側に比較対象のステントを置いて経時的に評価することで、個体差や観察時期によるデータのバラツキを解消することができる。また、本研究では繰り返しの処置によりミニブタの健康状態は悪化せず、実験モデルとして安定した評価が可能であった。動物の健康状態に与える影響については今後さらなる検証が必要ではあるが、本動物モデルは各種ステント開発に応用可能と考えられる。

開発中のステントの有効性を評価する実験で、F-DLC coated stent は BMS と比して、ステント留置後の狭窄率が低く、また優れた抗血栓性や抗炎症性が示唆され、F-DLC coated stent のストラットは BMS と同様早期に組織被覆化が認められた。臨床使用においても F-DLC

coated stent は BMS より高い再狭窄抑制効果を持ち、DES と比較してステント血栓症のリスクが低くなることが期待される。ステントの製品化過程においてブタ冠動脈を使用した安全性評価試験は必須であるが、莫大な費用を投じて行われる。有効性が不明確のまま安全性評価が先行して行われることが多く、本研究のように動物内での有効性を予め評価しておくことは、研究開発費の節約にもつながると考えられる。この F-DLC coated stent は本研究により有効性が確認されたため、ステントの製品化へ向けたステップを促進することが決定し、今後ブタ冠動脈を用いた安全性試験を予定している。

#### **【結論】**

本研究のミニブタ腸骨動脈モデルは、ステントの有効性を経時的に評価する動物モデルとして有用と考えられる。本モデルが今後の各種ステント開発における有用な前臨床評価モデルになることが期待される。