

ブタ冠動脈狭窄モデルを用いた7  
種のス TENT 植 え 込 み 後 の 再 狭 窄  
の 形 態 と 組 織 学 的 検 討

**Morphological and Histological  
Studies of In-Stent Restenosis in  
Seven Types of Stents Implanted in  
Porcine Coronary Arteries**

萬屋 穰  
嶽山 陽一\*  
磯 良 崇  
柴田 正行  
中谷 雅貴  
木庭 新治  
鈴木 洋  
村上 幹高  
片桐 敬

Minoru YOROZUYA, MD  
Yoichi TAKEYAMA, MD, FJCC\*  
Yoshitaka ISO, MD  
Masayuki SHIBATA, MD  
Masaki NAKATANI, MD  
Shinji KOBA, MD  
Hiroshi SUZUKI, MD  
Mikitaka MURAKAMI, MD  
Takashi KATAGIRI, MD, FJCC

**Abstract**

**Objectives.** Differences in the mechanism of restenosis after stenting between coil and tubular stents were examined in porcine coronary arteries using histological and immunohistochemical methods.

**Methods.** Twenty-four pigs underwent balloon-induced injury in the left anterior descending coronary artery. Two weeks later, seven different stents clinically available in Japan (Coil stents: GR, GR, Wiktor, Cordis; Tubular stents: gfx, Multilink, Palmaz-Schatz) were implanted in the injured site. Four weeks after the stent implantation, the pigs were sacrificed for histological examination and for morphometrical analysis of the lumen, neointima, media and adventitia. Immunohistochemical studies using anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA), anti- $\alpha$ -smooth muscle actin and anti-macrophage antibody were also performed.

**Results.** The coil stents formed eccentric, and the tubular stents formed concentric neointimal proliferation. Although there was no difference in the area of neointima between the stents, the area of lumen in the tubular stents was bigger than that in the coil stents ( $p < 0.01$ ) because the vascular area was bigger in the tubular stents ( $p < 0.05$ ). Immunohistochemical examination found many PCNA-positive cells in the proliferated neointima, especially in the area around the stent strut. Many of these cells around the stent strut were positively stained by anti-macrophage antibody. Other cells positively stained for PCNA were confirmed as smooth muscle cells.

**Conclusions.** Tubular stents maintained a wider lumen than coil stents, because negative remodeling after stenting was less in the tubular stents. Implantation of stents with less negative remodeling is very important to prevent restenosis after stenting.

J Cardiol 2001 Nov; 38(5): 273 - 280

**Key Words**

Stent Restenosis Coronary artery disease Angioplasty  
Experimental medicine

昭和大学医学部 第三内科: 〒142-8666 東京都品川区旗の台1-5-8; \*昭和大学藤が丘病院 循環器内科, 横浜  
The Third Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine, Tokyo; \*Division of Cardiology, Showa University,  
Fujigaoka Hospital, Yokohama

**Address for correspondence:** YOROZUYA M, MD, The Third Department of Internal Medicine, Showa University School of  
Medicine, Hatanodai 1-5-8, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666

Manuscript received August 30, 2000; revised April 25 and July 10, 2001; accepted July 11, 2001

## はじめに

ステントの開発により、単純旧式バルーン形成術 (plain old balloon angioplasty: POBA) のみが治療手段であった時代と比較して、再狭窄率は20-30%へと減少したことが、Benestent試験<sup>1)</sup>やSTRESS試験<sup>2)</sup>で証明され、再狭窄のメカニズムの違いが再狭窄率の改善をもたらしていることが報告されている<sup>3)</sup>。POBA後の再狭窄機序の一つは、POBAの物理的傷害により炎症や血栓形成が惹起され、血管平滑筋細胞が内膜へ遊走し新生内膜を形成することであり、他の機序として、血管壁構成細胞が治癒する過程で起こる収縮性リモデリングが考えられている。一方、ステント再狭窄の機序は、新生内膜増殖が主因で収縮性リモデリングの関与は少なく、両者間での再狭窄機序の違いが指摘されている。

しかし、最近の新しいステントのすべてがPOBAと比較して満足のいく成績ではなく、ステントの構造の違いにより再狭窄率がかなり異なることが明らかとなってきた<sup>4)</sup>。しかしながら、これまでステントの種類ごとに再狭窄形態を組織学的に詳細に検討した報告は少ない。そこで各種ステント間での再狭窄のメカニズムの違いを検討するため、ステント植え込み後の冠動脈壁における増殖性変化について、我が国で認可されている7種類のステントをブタ冠動脈内に植え込み、その構造や性状による増殖性変化の相違について組織学的および免疫組織化学的な比較検討を行った。

## 対象と方法

### 1. 実験プロトコル

生後12週の子雄ブタ(体重20kg)2頭に、ケタミン10mg、硫酸アトロピン1mgの筋注で麻酔の導入を行い、笑気2l/min、酸素2l/min、ハロセン1l/minの混合ガス麻酔を行った。Cut-down法により右内頸動脈を露出して8Fシースを挿入し、ヘパリン5,000Uを動注後、7Fガイディングカテーテルを用いて冠動脈造影を行った。続いて左冠動脈前下行枝の第1対角枝分岐部を中央にバルーン(直径3.0mm、長さ20mm、バルーン/血管比=1.2)で8気圧、1分間の拡張を3回繰り返し、過拡張による狭窄モデルを作成した<sup>3)</sup>。術前1週間前より屠殺するまでアスピリン100mg/dayを経口投与した。14日後に右内頸動脈から同様に冠動脈

造影を行い、傷害部の有意狭窄(造影上75%以上)を確認のうえ、同部位に直径3.0mmの各種ステントを推奨拡張圧で30秒間拡張し植え込んだ。植え込み直後の造影では、全例で十分な冠動脈の拡張が得られた。使用したステントは、我が国で使用可能な7種類である( Table 1)。ステント植え込み28日後、冠動脈造影を行った後に屠殺し、ステント部の冠動脈を摘出した。

### 2. 形態観察

摘出した冠動脈を脱水、脱脂後ヒストレジンプラス樹脂(ライカ・マイクロシステムズ製)で包埋し、おのおの2mm間隔のブロックを作成した。ブロックごとにそれぞれタングステンナイフ(ライカ・マイクロシステムズ製)で横断切片を作成し、hematoxylin-eosin染色、AZAN Mallory染色、elastic van Gieson染色を行った。

### 3. 形態計測

形態計測は、hematoxylin-eosin染色、elastic van Gieson染色標本をNIHイメージでコンピューター解析し、各種ステントのブロックごとに内腔、新生内膜、中膜、外膜面積、ステント面積(=内腔面積+新生内膜面積)の計測を行った。各ステントの狭窄率(%)は、狭窄率=各ブロックの内腔面積の和(各ブロック内腔面積の和+各ブロック新生内膜面積の和)×100として算出した。また、コイルとチューブステントタイプ別における平均値も算出した。

新生内膜増殖の偏心性は、eccentricity indexを用いて評価し、偏心性は、最大新生内膜幅(全ブロックの平均)最小新生内膜幅(全ブロックの平均)>5とし、同心性は、最大新生内膜幅(全ブロックの平均)最小新生内膜幅(全ブロックの平均)≤5とした<sup>5,6)</sup>。

### 4. 免疫組織学的観察

免疫組織学的検討には、摘出した冠動脈からステントを手動的に抜去後、パラフィン切片を作成した。切片を、抗proliferating cell nuclear antigen(PCNA)抗体(SIGMA製, Clone PC10, 1:2000)、抗マクロファージ抗体(LVC製, Clone MAC 387, 1:100)および抗平滑筋アクチン抗体(SIGMA製, Clone 1A4, 1:400)で染色後、顕微鏡観察を行った。

**Table 1 Characteristics of seven types of stents implanted into porcine coronary arteries**

Stent	Manufacturer	Metal	Design	Expanded metallic surface area(%)
Cordis( <i>n</i> = 3)	Cordis	Tantalum	Single helical coil	18
Wiktor( <i>n</i> = 3)	Medtronic	Tantalum	Single wire coil	8 - 9.5
GR ( <i>n</i> = 3)	COOK	Stainless steel	Incomplete coil clam shell loop	10
GR ( <i>n</i> = 3)	COOK	Stainless steel	Flexible coil longitudinal spine	15 - 20
Palmaz-Schatz( <i>n</i> = 6)	JJIS	Stainless steel	Slotted tube	< 20
gfx( <i>n</i> = 3)	AVE	Stainless steel	Connected zig-zag wire	20
Multilink( <i>n</i> = 3)	ACS	Stainless steel	Multiple rings	< 18
□	□	□	□	□

5. 統計学的検討

統計学的処理は、2群間の比較にはStudentの*t*検定を、3群以上の比較には分散分析法を用いて検討し、*p* < 0.05を有意差の判定とした。

結 果

1. 形態観察

各ステントの新生内膜の形態 (Fig. 1)を比較すると、コイルステントは偏心性に、チューブステントは同心性に増殖する特徴を認めた。また、ステントストラット周囲にマクロファージを中心とする著しい炎症細胞浸潤が認められ、その一部は好酸球であった。しかし、各ステントでの炎症細胞浸潤の程度や数に違いは認められなかった。一方、コイル、チューブいずれのステントも中膜、外膜の肥厚は認められなかった。

2. 形態計測

コイルタイプのステントのeccentricity indexはいずれも10以上であり (Fig. 2), 著明な偏心性増殖をきたしているのに対して、チューブタイプのステントでは、いずれもeccentricity indexは5以下で同心性増殖を呈し、両タイプのステントで明らかな違いが認められた (*p* < 0.001)。内腔面積は、平均ではチューブステントがコイルステントと比べて有意に内腔が大であった (*p* < 0.01; Fig. 3)。しかし、新生内膜面積では各ステント間や平均でも有意差は認められなかった (Fig. 4)。それに対してステント面積は、チューブステントの平均では6.2 ± 0.7 mm<sup>2</sup>に拡張されステント径が保持され

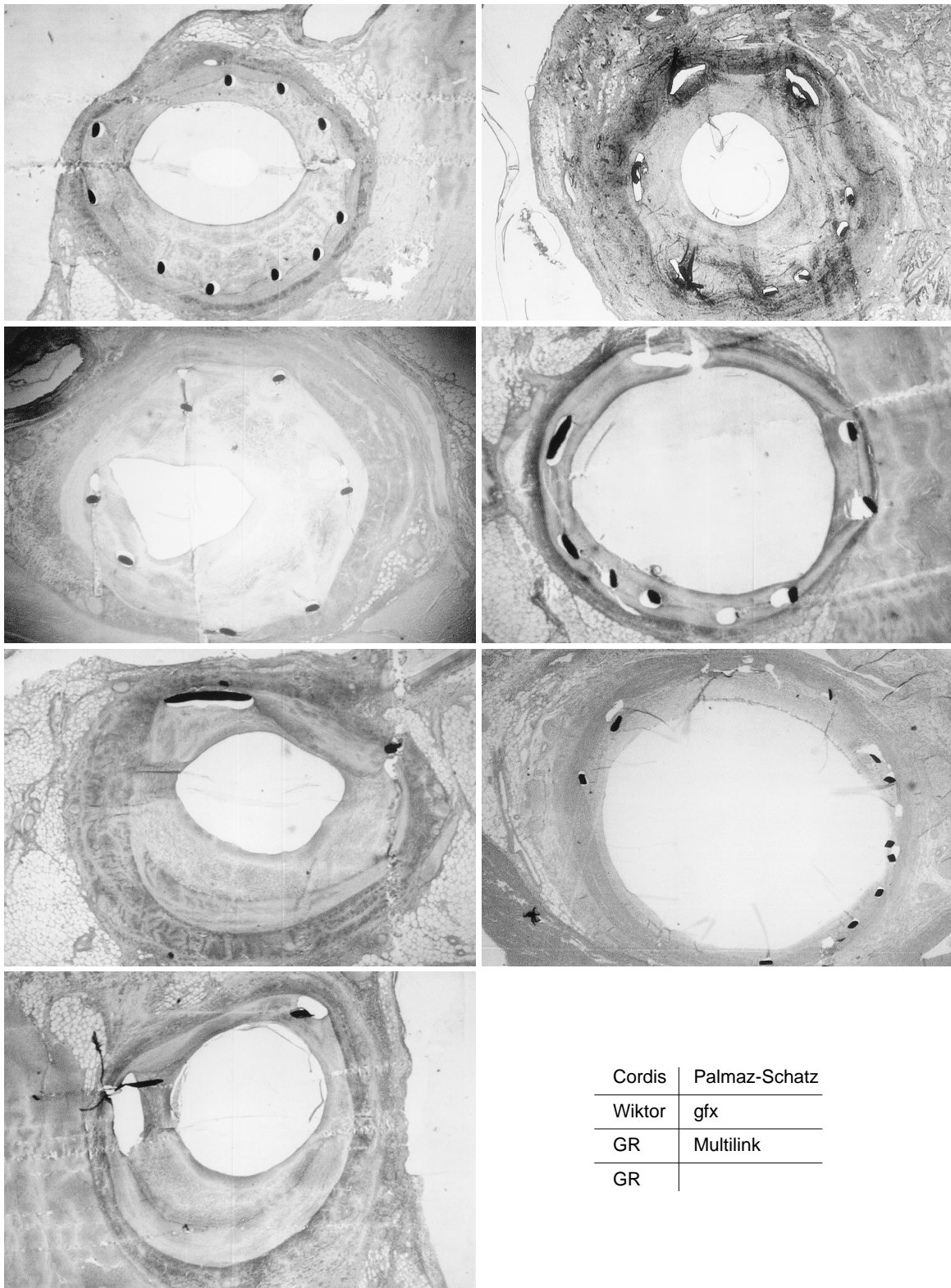
ていたのに比較して、コイルステントでは4.3 ± 0.7 mm<sup>2</sup>と有意に縮小し、収縮性リモデリングを示していた (*p* < 0.05; Fig. 5) (7 mm<sup>2</sup>は、直径3.0 mmのステントが拡張されたときの断面積を示す)。ステント別の各平均面積は、増殖内膜、中膜、外膜の各面積では、各ステント間で有意差は認められなかったが、全血管面積の平均はコイルステントで8.5 ± 0.4 mm<sup>2</sup>, チューブステントで10.1 ± 0.3 mm<sup>2</sup>とチューブステントで有意に大であった (*p* < 0.05; Fig. 6)。血管の内腔狭窄率は、コイルステントはチューブステントに比べて、有意に内腔狭窄率が高度であった (*p* < 0.05; Fig. 7)。

3. 免疫組織学的観察

細胞増殖性の指標である抗PCNA抗体陽性反応は、新生内膜、とくにステントストラット周囲に認められた。また、抗マクロファージ抗体陽性細胞は、主にステントストラット周囲に認められ、その大部分は、抗PCNA抗体陽性であった (Figs. 8, 9)。一方、抗平滑筋アクチン抗体陽性反応は、新生内膜の大部分で認められ、ステントストラット周囲の抗PCNA抗体陽性細胞の一部も抗平滑筋アクチン抗体で染色された (Fig. 10)。

考 案

バルーン傷害後の再狭窄機序は、新生内膜増殖に加え、収縮性リモデリングと急性期の血管の弾性反跳によると考えられている<sup>7)</sup>。一方、ステント植え込み後の再狭窄は初期に得られた過拡張が持続するため、内



**Fig. 1** Representative photomicrographs of the seven types of stents 1 month after stent implantation  
 Neointimal proliferation within coil type stents formed an eccentric pattern( *left column*,  $\times 20$  ). Neointimal proliferation within tube type stents formed a concentric pattern( *right column*,  $\times 20$  ).

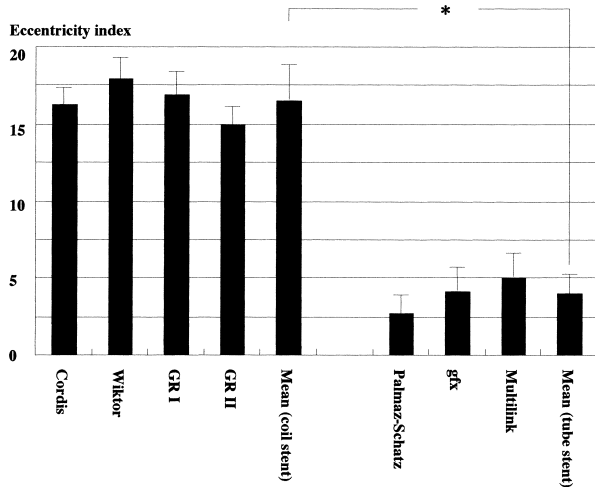


Fig. 2 Eccentricity index of the seven types of stents  
\*  $p < 0.001$ , Mean( coil stent )vs Mean( tube stent ).

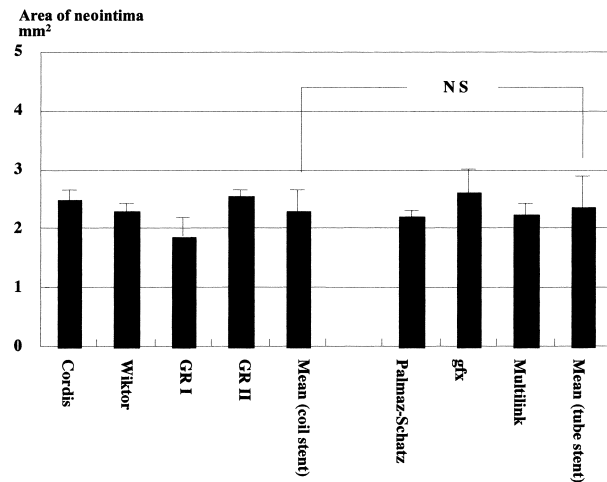


Fig. 4 Area of neointima within the seven types of stents 1 month after stent implantation

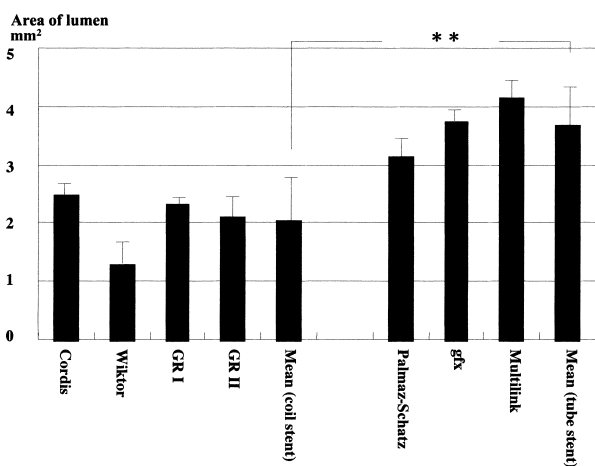


Fig. 3 Area of the lumen of the seven types of stents 1 month after stent implantation  
\*\*  $p < 0.01$ , Mean( coil stent )vs Mean( tube stent ).

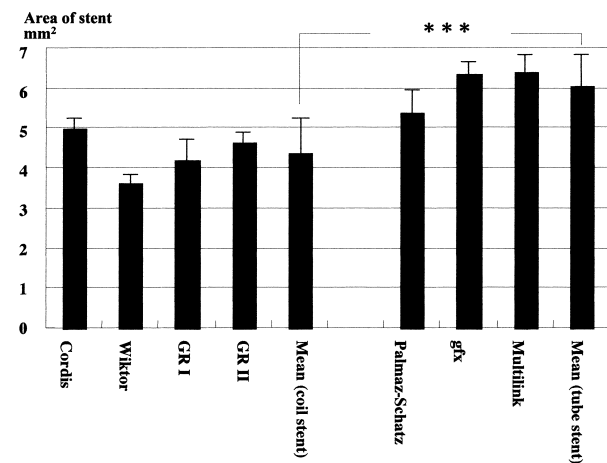


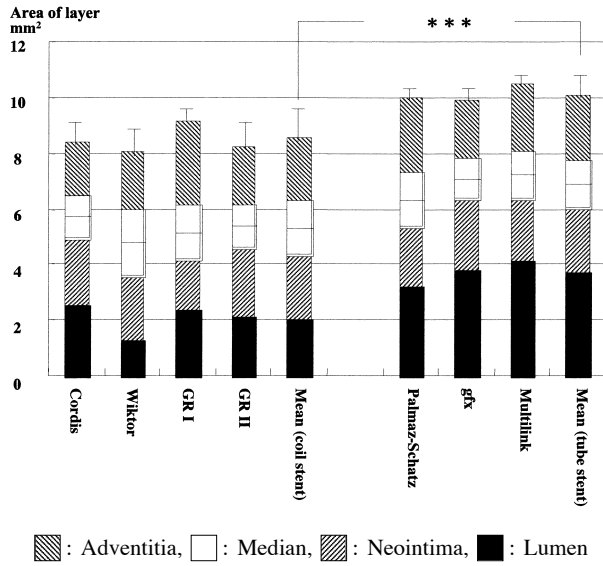
Fig. 5 Area of the seven types of stents 1 month after stent implantation  
\*\*\*  $p < 0.05$ , Mean( coil stent )vs Mean( tube stent ).

膜増殖によるもののみが原因であると報告されている<sup>8-11)</sup>。しかし、チューブステントの短所であるステントデリバリーの悪さや側枝閉塞といった点を改善するために考案されたコイルステントでは、急性期にステント自体のリコイルが起き、その後収縮性リモデリングを抑制できないことが、血管内超音波などの検討により明らかになった<sup>12,13)</sup>。

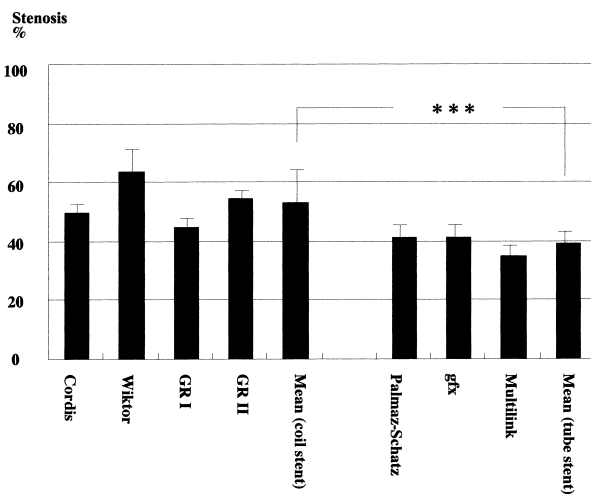
今回の我々の形態計測からも、コイルステントとチューブステントでは、新生内膜の増殖形態の違いが示された。Fig. 3に示すように、内腔面積はチューブ

ステントがコイルステントより有意に大きかったが、新生内膜面積、中膜面積および外膜面積では、両者間で有意差は認められなかった。しかし、ステント面積は、チューブステントで十分に保持されていたが、コイルステントでは有意に低値であった。

これらのことからコイルステントでは収縮性リモデリングが大きく再狭窄に影響しており、そのために、チューブステントと狭窄形態、内腔面積や狭窄率に大きな差が生じることが示唆された。その理由として、コイルステントは金属量が少ないため、ステントスト



**Fig. 6** Accumulated area of each layer in the seven stents  
 \*\*\*  $p < 0.05$ , Mean (coil stent) vs Mean (tube stent)



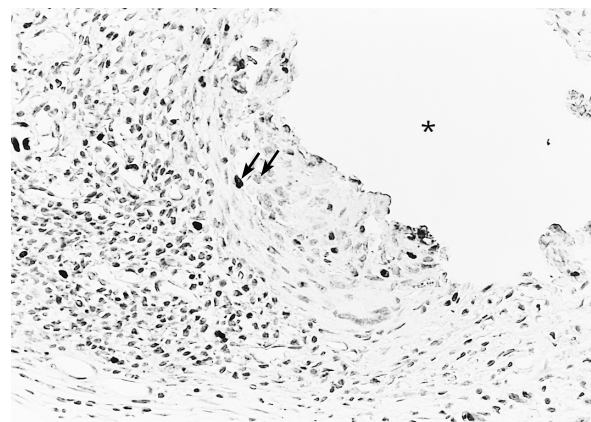
**Fig. 7** Stenosis of the seven types of stents 1 month after stent implantation  
 \*\*\*  $p < 0.05$ , Mean (coil stent) vs Mean (tube stent)

ラットが疎となり、ステントストラットの無い部分での保持力の弱さから、コイルステントは偏心性の内膜増殖となり、チューブステントは同心性となったと考えられる。

POBA後再狭窄とステント植え込み後再狭窄の機序の違いでもう一つ注目されていることは、ステントの金属による炎症反応の惹起が原因と考えられる持続的

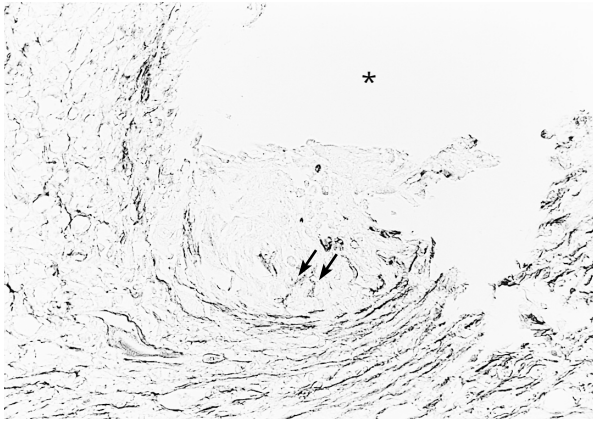


**Fig. 8** Photomicrograph of anti-proliferating cell nuclear antigen positive cells (arrows) around the stent strut  
 \* stent strut;  $\times 400$ .



**Fig. 9** Photomicrograph of anti-macrophage antibody positive cells (arrows) around the stent strut  
 \* stent strut;  $\times 400$ .

な細胞刺激による新生内膜増殖である<sup>14,15)</sup>。今回の検討でも細胞増殖性の指標であるPCNAは、新生内膜の血管平滑筋細胞に認められ、とくにステントストラット周囲へ浸潤しているマクロファージを主体とする炎症細胞やその周囲の平滑筋細胞にも認められたことより、ステント自体による炎症反応の関与が考えられた。また、ステントストラット周囲への好酸球の浸潤も認められたことから、アレルギー反応の関与も考慮に入れる必要があるであろう。しかし、ステントストラット周囲の炎症細胞浸潤の程度や平滑筋細胞の増殖の程度は、各種ステント間で大きな差はみられず、炎症自



**Fig. 10** Photomicrograph of anti-smooth muscle actin antibody positive cells (arrows) around the stent strut  
\* stent strut;  $\times 400$ .

体が、各ステント間での狭窄率の差に影響を及ぼしている可能性は低いと考えられた。

今回の我々の検討でステントの植え込みは、コイルタイプもチューブタイプも同じバルーン/血管比のステントを推奨拡張圧で30秒間行った。しかし、コイルステントではステントサイズを1/2あるいは1/4サイズアップしたり、高圧拡張をしたり、拡張時間を長

くするなどの工夫によって内腔面積や狭窄率も改善された可能性もある。臨床の場合では、すでに再狭窄率が高率であることからコイルステントは淘汰されているが、今後は保持力の強いステントを大きく植え込むことが、再狭窄予防に重要な要因であると考えられた。

今回我々は、ブタ正常冠動脈へPOBAを施行することにより、血管傷害モデルを作成しステントを植え込んだ。しかし実際の臨床では、粥状硬化や石灰化を中心とした動脈硬化病変に対してインターベンションは施行されており、動物モデルで同様の状態を再現するのは困難である。そのため、臨床の場合における再狭窄病変においては本研究の結果以外の要素も加わっていることを考慮する必要があると考えられる。

### 結 語

チューブステントは、コイルステントと比べて血管壁を均等に支持して収縮性リモデリングの関与が少なく、新生内膜増殖の程度はコイルステントと同程度であったが、内腔はより広く保たれていた。再狭窄を抑制するためには、より収縮性リモデリングの関与の少ないステントを植え込むことが非常に重要と考えられた。

### 要 約

**目的:** 冠動脈ステント植え込み後の再狭窄病変形成について、7種類のステントをブタ冠動脈に植え込み、コイルステントとチューブステントに分けて、その血管壁増殖様式について形態学的、組織学的検討を行った。

**方法:** 去勢雄ブタ24頭を用いて、左前下行枝に経皮的冠動脈形成術用バルーンを用いてバルーン傷害を加えた。14日後にバルーン傷害部に対して直径3mmの7種のステント(コイルステント: GR, GR, Wiktor, Cordis; チューブステント: gfx, Multilink, Palmaz-Schatz)を植え込んだ。植え込み28日後にステント部の左前下行枝を摘出し、光顕的に形態計測および免疫組織学的検討を行った。免疫組織学的検討には抗proliferating cell nuclear antigen(PCNA)抗体、抗マクロファージ抗体および抗平滑筋アクチン抗体を使用した。

**結果:** ステント植え込み後の内膜増殖は、コイルステントでは偏心性で、チューブステントでは同心性であった。両タイプのステントで新生内膜面積に差はみられなかったが、平均血管面積がチューブステントで大きく保たれていたため( $p < 0.05$ )、内腔面積はチューブステントで有意に大きかった( $p < 0.01$ )。免疫組織学的検討では、新生内膜、とくにストラット周囲に抗PCNA抗体陽性細胞がみられ、その多くは抗マクロファージ抗体陽性あるいは抗平滑筋アクチン抗体陽性細胞であった。

**結論:** チューブステントは、コイルステントと比べて収縮性リモデリングの関与が少なく、内膜増殖の程度はコイルステントと同程度にもかかわらず、内腔はより広く保たれていた。再狭窄を

抑制するためには、より収縮性リモデリングの関与の少ないステントを植え込むことが非常に重要と考えられた。

*J Cardiol* 2001 Nov; 38(5): 273 - 280

## 文 献

- 1) Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Margo J, Legrand V, Materne P, Belardi J, Sigwart U, Colombo A, Goy JJ, Heuvel P, Delgan J, Morel M, for the Benestent Study Group: A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994; **331**: 489 - 495
- 2) Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, Clemen M, Heuser R, Almond D, Teirstein PS, Fish D, Colombo A, Brinker J, Moses J, Shaknovich A, Hirshfeld J, Bailey S, Ellis S, Rake R, Goldberg S, for the Stent Restenosis Study Investigators: A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994; **331**: 496 - 501
- 3) 中谷雅貴, 嶽山陽一, 片桐 敬: 冠動脈インターベンション後の血管病変の形成と外膜・血管内皮 1999; **3**: 289 - 296
- 4) Jean-Francois T, Brian AA, Donald FF, Robert EF, Marino L, Michael HS Jr, James PZ, Harry RP, Richard SS: Assessment of coronary stent recoil by quantitative coronary angiography: Does design make a difference? *Circulation* 1994; **90**(Suppl ): -48(abstr)
- 5) Iwami T, Fujii T, Miura T, Otani N, Matsuzaki M: Limitations of intravascular ultrasound for the evaluation of coronary luminal area: Comparison with quantitative angiography. *Jpn Circ J* 1996; **60**: 575 - 584
- 6) Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Chuang YC, DeFalco RA, Leon MB: Limitations of angiography in the assessment of plaque distribution in coronary artery disease: A systematic study of target lesion eccentricity in 1446 lesions. *Circulation* 1996; **93**: 924 - 931
- 7) Minz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, Hong MK, Kovach JA, Leon MB: Arterial remodeling after coronary angioplasty: A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996; **94**: 35 - 43
- 8) 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* 1996; **94**: 1247 - 1254
- 9) Komatsu R, Ueda M, Kawasaki M, Morita N, Nakatsuchi Y, Fuji K, Nakao M, Toyama S, Becker AE: Pathological changes at site of coronary stenting in humans. *J Am Coll Cardiol* 1997; **29**: 312A
- 10) Ikari Y, Hara K, Tamura T, Saeki F, Yamaguchi T: Luminal loss and site of restenosis after Palmaz-Schatz coronary stent implantation. *Am J Cardiol* 1995; **76**: 117 - 120
- 11) Hoffmann R, Mintz GS, Popma JJ, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, Walsh C, Mackell P, Leon MB: Chronic arterial responses to stent implantation: A serial intravascular ultrasound analysis of Palmaz-Schatz stents in native coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1996; **28**: 1134 - 1139
- 12) Yoshito Y, David LB, Thomas AI, Armin A, William FP: Effect of stent design on reduction of elastic recoil: A comparison via quantitative intravascular ultrasound. *Cathet Cardiovasc Intervent* 1999; **47**: 251 - 257
- 13) Carrozza JP Jr, Hosley SE, Cohen DJ, Baim DS: In vivo assessment of stent expansion and recoil in normal porcine coronary arteries: Differential outcome by stent design. *Circulation* 1999; **100**: 756 - 760
- 14) Murphy JG, Schwartz RS, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR Jr: Percutaneous polymeric stents in porcine coronary arteries: Initial experience with polyethylene terephthalate stents. *Circulation* 1992; **86**: 1596 - 1604
- 15) Holmes DR, Camrud AR, Jorgenson MA, Edwards WD, Schwartz RS: Polymeric stenting in the porcine coronary artery model: Differential outcome of exogenous fibrin sleeves versus polyurethane-coated stents. *J Am Coll Cardiol* 1994; **24**: 525 - 531