

遺伝性高脂血症ウサギを用いた LASTAC システム (アルゴンレーザー) による実験的血管形成術の基礎研究 —— 病理組織学的, 電子顕微鏡的検討 ——

河 野 純

信州大学医学部第 1 内科学教室

(主任: 関口 守衛教授)

A Histopathological and Ultrastructural Study of Laser Angioplasty Using LASTAC System (Argon Laser) in Hereditary Hyperlipidemic Rabbits

Jun KONO

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Morie SEKIGUCHI)

To perform safe and effective laser coronary angioplasty, we performed an experimental study employing a balloon catheter argon laser instrument (LASTAC system, G-V Medical Co.) in 23 WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) rabbits and 11 Japanese white rabbits.

Lasing was applied at the atheromatous lesion of the brachiocephalic artery of the WHHL rabbits, and at normal carotid arteries in a parallel or oblique fashion (Experiment 1). With the fiber tip located vertically 1-2mm from the tissue surface, the aortic specimen in saline was lased under various conditions (Experiment 2).

In Experiment 1, when the lasings were presumed to hit the atheromatous plaque, craters without coagulated elements were observed. After the lasings were performed parallel to the normal arterial wall, the intima and media remained intact, and after they irradiated in an oblique fashion, the arterial wall developed perforation or subintimal dissection. In Experiment 2, subintimal dissection occurred more frequently in normal arteries than in atheromatous lesions. Among various conditions of lasing, 5W for 2sec produced the lowest degree of injury to the surrounding tissue. These results suggest that laser coronary angioplasty using a LASTAC system is applicable to the treatment of coronary artery disease clinically. *Shinshu Med J* 43: 335-345, 1995

(Received for publication March 2, 1995)

Key words: LASTAC system, laser angioplasty, argon laser, Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit
LASTAC システム, レーザー血管形成術, アルゴンレーザー, 渡辺遺伝性高脂血症ウサギ

I はじめに

別刷請求先: 河野 純

〒399-82 南安曇郡豊科町豊科5685

豊科赤十字病院循環器科

Grüntzig ら¹⁾が1970年代後半よりはじめた経皮経管的冠動脈形成術 (PTCA) は全世界に普及し, わが国

においても、現在では確立された治療法として日常的に行われている。しかし、症例を重ねるにつれ本法のすぐれた点とともに、再狭窄が生じやすいこと、および完全閉塞例の成功率が低いことなどその限界や欠点も明らかになってきた。

これらの問題を解決する方法の1つとして、冠動脈の動脈硬化病変をレーザーにより蒸散させるレーザー冠動脈形成術が注目され、現在各方面の研究が行われている。レーザーは、1960年に Maiman²⁾によって開発されて以来、各分野で利用され、医学の分野においてもさまざまな領域で応用されるようになった。レーザー血管形成術は、1981年 Lee ら³⁾、1982年 Abela ら⁴⁾、Choy ら⁵⁾などにより相次いで基礎研究が、1984年には Geschwind ら⁶⁾、Ginsburg ら⁷⁾、Choy ら⁸⁾によって臨床成功例が報告された。以後各種のレーザー装置の開発が進み、さまざまな基礎および臨床報告がなされてきた。現在レーザー血管形成術に応用されているレーザーにはCO、CO₂、Argon、Nd-YAG、Excimer などがあり、照射法は直射法と接触法とに大別される。直射法はbare-endのファイバーよりレーザーエネルギーを直接照射することにより硬化性病変を焼灼する方法で、これに対し接触法はファイバー先端に金属、sapphire、ceramic によるキャップをつけ、レーザーエネルギーを熱エネルギーに変換し病変を焼灼する方法である。このように、血管形成術へのレーザーの応用についてはレーザーの種類による血管壁、動脈硬化病変への効果の相違、レーザーの導光システム、レーザーの照射方法など、幾多の問題を有し、いまだ確立した方法は見当たらない。

著者らは、Nordstrom ら⁹⁾により開発されたLASTACシステムと呼ばれるアルゴンレーザー治療機を使用する機会を得たので、小口径で屈曲部にしばしば偏在性の狭窄病変が存在する冠動脈の血管形成術を行う前に、安全性と確実性を期すために、基礎実験を重ねてきた¹⁰⁾¹¹⁾。今回はわが国で開発された遺伝性高脂血症ウサギ¹²⁾を用いて、アルゴンレーザー照射が動脈硬化病変部および健常血管に対して与える影響について、病理組織学的、電子顕微鏡的研究を行ったので報告する。

II 方 法

レーザー発生装置は、米国GVメディカル社のLASTACシステムを用いた。これは、bare-endのアルゴンレーザー照射システムで、カテーテルはレーザ

ー照射部先端の近位部にPTCAバルーンを装備し、開存した後を修復することができるようになっている。そしてバルーンでその方向性を固定することにより、血管内の中心部にレーザー発生部を一致させることができる。しかもレーザーファイバー先端に光学処理を施し、常に中心角40度の一定角度でレーザーが照射されるため、血管の穿孔が少ないという特徴をもっている。

実験動物として、23羽の渡辺遺伝性高脂血症ウサギ(WHHLウサギ)と、11羽の日本白色ウサギを使用した。WHHLウサギは、神戸大学において開発された遺伝性高脂血症ウサギで、血清コレステロール値は700mg/dlにおよび、動脈硬化性病変はヒトのそれに類似し、病変は弓部大動脈およびその分枝部に強いと報告されている¹²⁾。

実験 1

体重2～3 kgのWHHLウサギ23羽と日本白色ウサギ11羽をsodium pentobarbitalで静脈麻酔した後、気管内挿管し、人工呼吸器で調節呼吸を行い下記のごとく操作を行った。両側頸動脈を露出し、動脈切開により逆行性にカテーテルを挿入し、WHHLウサギに対しては、腕頭動脈ないし頸動脈分枝部の粥状硬化部に5W 2秒のレーザー照射を行い、日本白色ウサギに対しては、頸動脈に平行あるいは角度をつけて、10W 2秒または10W 5秒のレーザー照射を行った後に、10～30分間同部に血流を再開させてから屠殺した。

実験 2

WHHLウサギおよび日本白色ウサギ屠殺時に大動脈を摘出し、切開を加え内臓面を上にして虫ピンで平板に固定した後、生理食塩水中にて距離1～2 mmから垂直に5W 2秒、10W 1秒、10W 2秒、5W 5秒、のレーザー照射を行った。

実験1、実験2についてレーザー照射血管を、以下の方法にて、透過型電子顕微鏡(日本電子製、JEM1200EX)、走査型電子顕微鏡(日立製、HHS2R; 加速電圧20kV)、光学顕微鏡を用いて観察した。

A 透過型電子顕微鏡

組織標本を、3%グルタルアルデヒドで90分間前固定、1%四酸化オスミウムで90分間後固定した後、上昇アルコール系列を通して脱水。プロピレンオキシド置換後エポキシ樹脂で包埋し、60°Cで48時間重合させた。60nmに薄切した後、銅のメッシュに載物し、酢酸ウラニールとクエン酸鉛で電子染色して観察した。

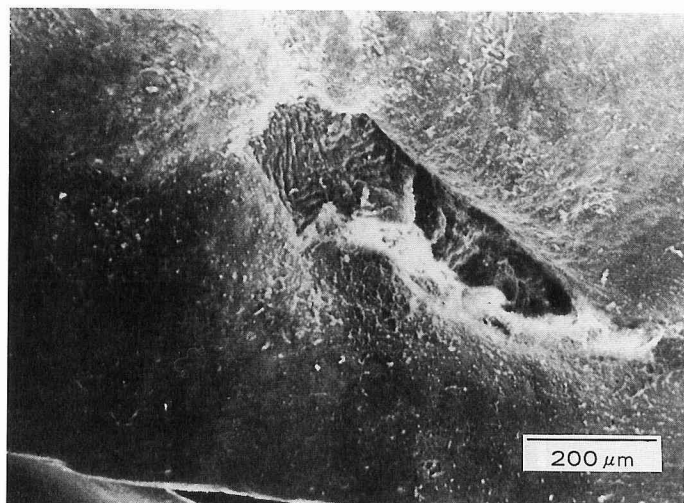


図1 5 W 2 秒のレーザー照射を行い、約30分間血流を再開させた後に摘出した WHHL ウサギ腕頭動脈内膜表面の走査電顕像

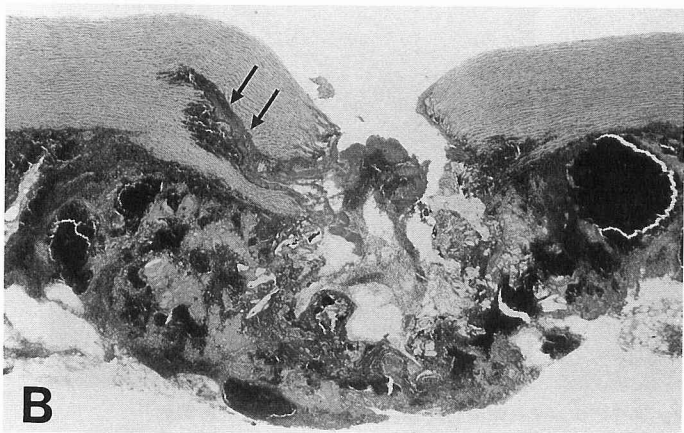
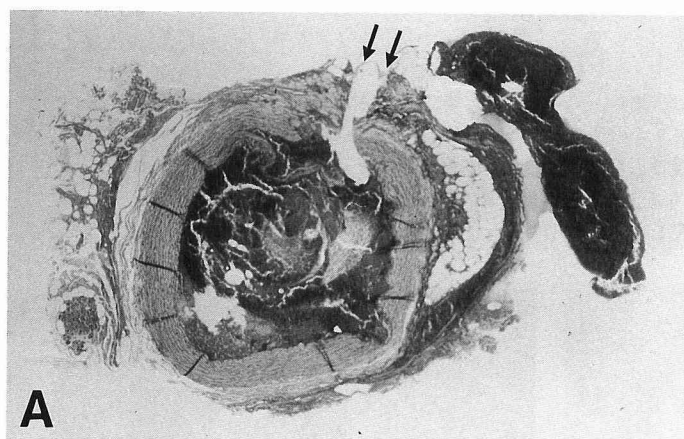


図2 健康ウサギの頸動脈壁に直接レーザー照射した場合の組織像 (10W 2 秒照射)

(H-E 染色 $\times 10$)

A : 横断面。血管壁穿孔 (矢印) をみる。

B : 長軸面。内膜、中膜の断裂と中膜の解離 (矢印) をみる。

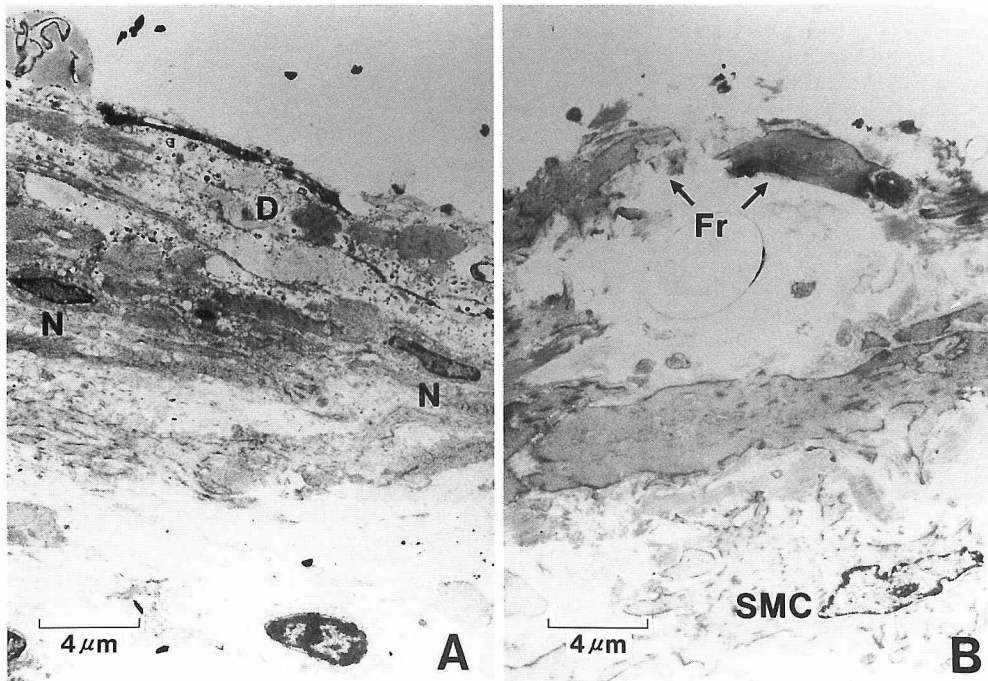


図3 健常ウサギの頸動脈壁に直接レーザー照射した場合の透過電顕像(10W 2秒照射)

- A: 中膜平滑筋細胞は核(N)を残すのみでdebris(D)になっている。
 B: 中膜固有組織が比較的残存した部分。図の下半分はdense ovoid areaが温存された平滑筋細胞(SMC)を, 上半分は破壊された部分(Fr)をしめす。
 なお破壊部は無構造を呈している。

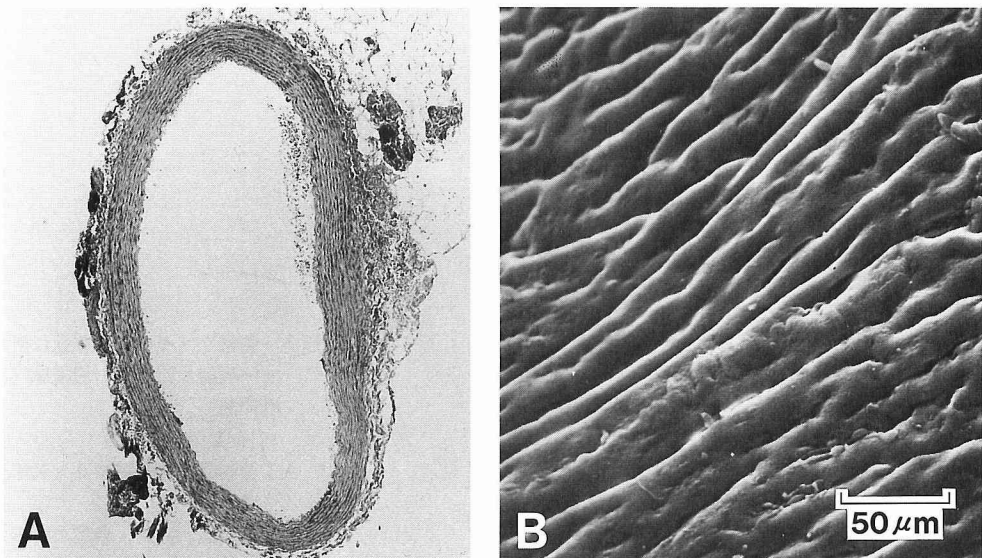


図4 健常ウサギの頸動脈壁に平行にレーザー照射した場合の組織像(10W 5秒照射)

- A: 横断面は正常である。(H-E染色 ×10)
 B: 内膜走査電顕像も正常を示す。

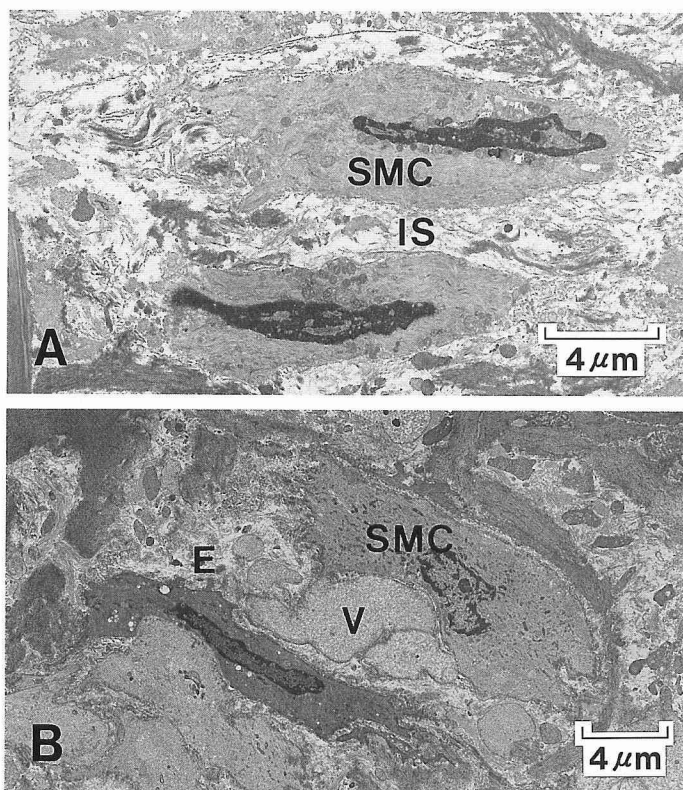


図5 健常ウサギの頸動脈中膜の透過電顕像

- A：レーザー非照射部（コントロール）。平滑筋細胞（SMC）には、軽度の固有構造の乱れをみ、間質（IS）は軽度の浮腫を示すが、これらは手術操作に基づく artifact と思われる。
- B：レーザー平行照射部近傍（10W 5 秒）。平滑筋細胞の周囲に空胞（V）形成がみられる。間質の浮腫（E）も軽度に見られる。

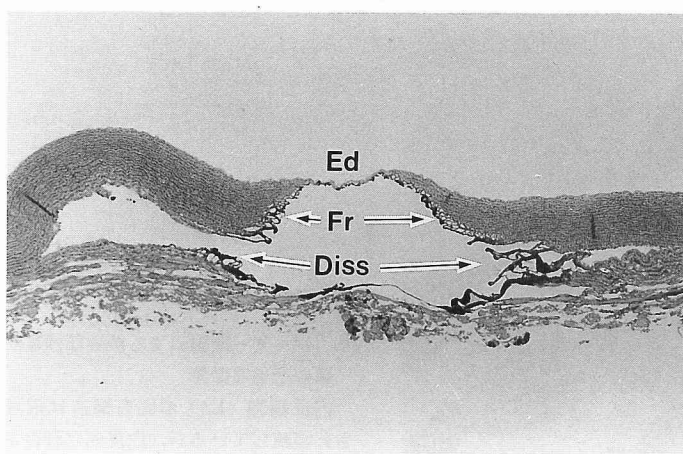


図6 生食中で距離1 mmから垂直にレーザー照射した健常ウサギ摘出大動脈切片の組織像（H-E染色 $\times 13.2$ ）
内膜（Ed）は残存し、中膜の断裂（Fr）と解離（Diss）を認める。

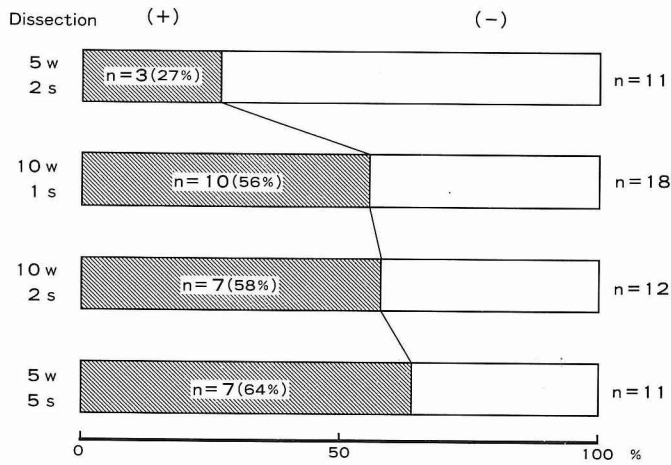


図7 健常大動脈切片における各照射条件別の中膜解離の発生頻度

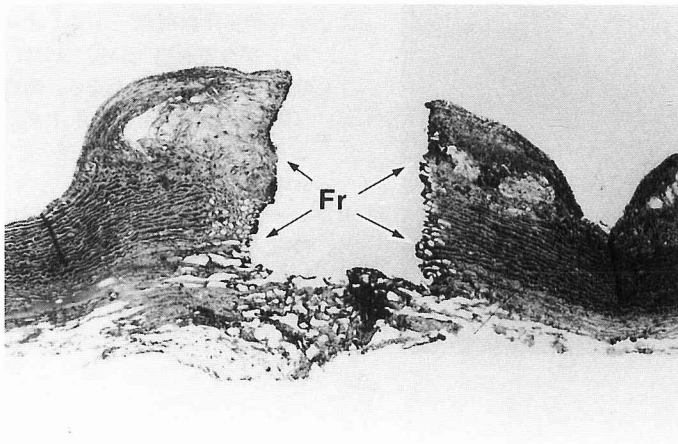


図8 生食中で距離1 mmから垂直にレーザー照射した WHHL ウサギ摘出大動脈切片の組織像 (H-E染色 $\times 13.2$)
内膜粥腫部位と中膜の断裂 (Fr) をみるが解離はみられない。

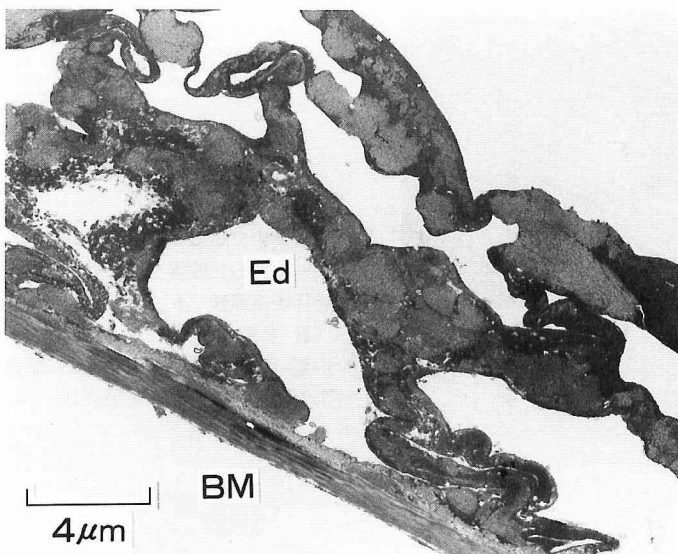


図9 レーザー照射による蒸散部残存内膜の透過電顕像
内皮細胞 (Ed) の固有構造は破壊され消滅しているが、内皮列は温存されている。基底膜 (BM) はその構造を保っている。

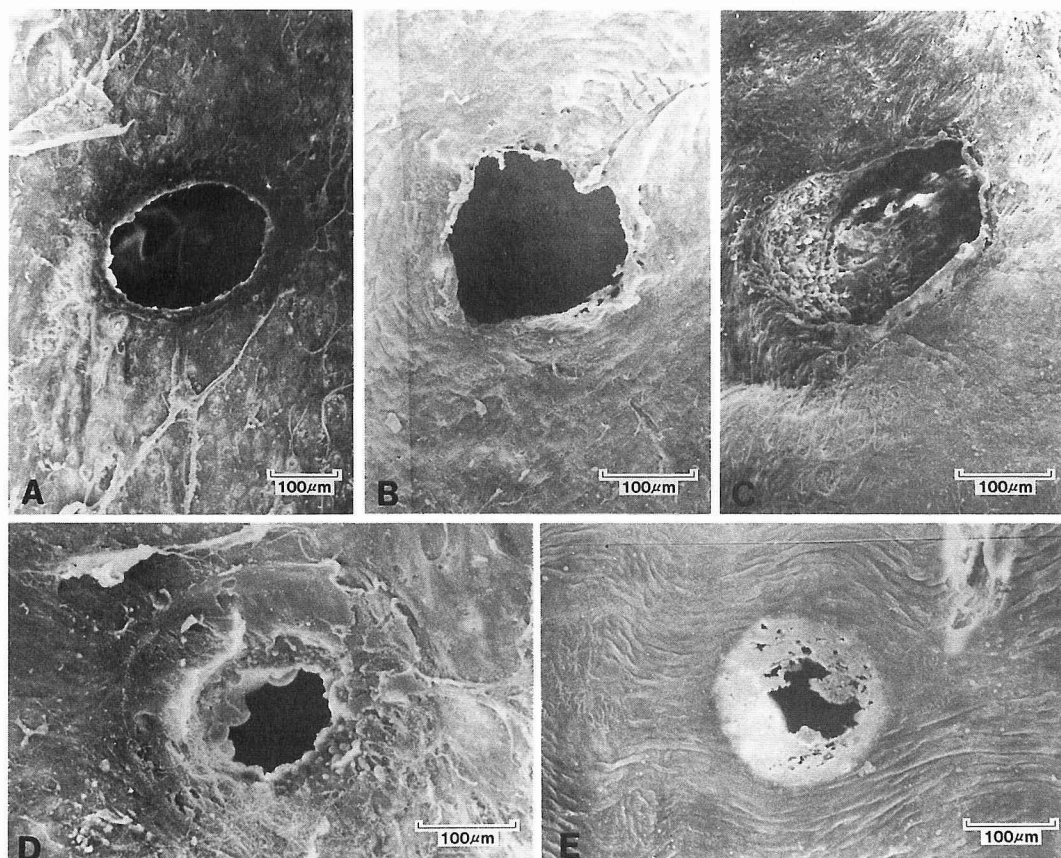


図10 生食中で距離 2 mm から垂直にレーザー照射した WHHL ウサギ摘出大動脈切片内膜表面の走査電顕像

- A : 5 W 2 秒照射。蒸散部周囲の組織の変化は認められない (Grade I)。
- B : 5 W 2 秒照射。蒸散部周囲に翻転物が少量認められる (Grade II)。
- C : 10 W 2 秒照射。蒸散部の周囲に一部空胞化した組織傷害が認められるが、蒸散部より狭い範囲にとどまっている (Grade III)。
- D : 5 W 2 秒照射。蒸散部より広い範囲に空胞化した組織傷害が認められる (Grade IV)。
- E : 10 W 2 秒照射。蒸散部の周囲に空胞化および炭化したと思われる熱性傷害の強い部分が認められる (Grade V)。

B 走査型電子顕微鏡

組織標本を、1%グルタルアルデヒドで5時間前固定、1%四酸化オスミウムで4時間後固定した後、上昇アルコール系列を通して脱水。臨界点乾燥装置にて乾燥させた後、試料台に固定し、金を蒸着させ観察した。

C 光学顕微鏡

組織標本を、10%リン酸緩衝ホルマリン (pH7.4)

で固定後、上昇アルコール系列を通して脱水。ベンゼン置換後、パラフィンで包埋し、4 μm の連続切片を作製した後、ヘマトキシリン-エオジン染色して観察した。

III 結 果

実験 1

粥状動脈硬化病変部に直接レーザーが照射された場

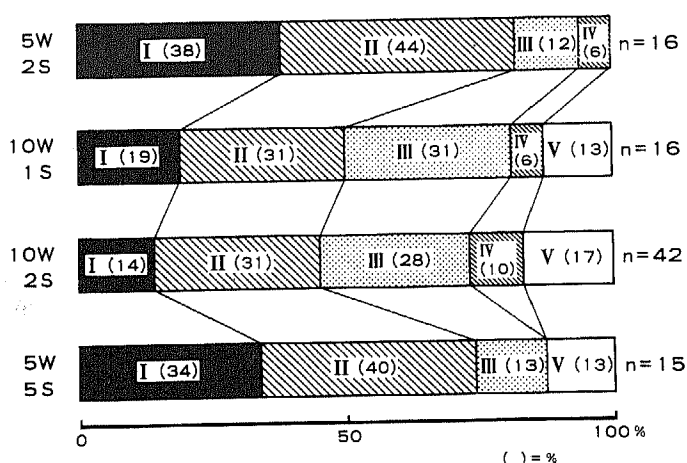


図11 各照射条件別の周辺組織の傷害度分類の割合

合には、図1のごとく長径500 μ m、短径220 μ mの蒸散部が見られたが周辺の熱性傷害、血栓の付着は認められなかった。

健常動脈壁に直接レーザーが照射された場合には、血管穿孔または中膜の解離（図2）が認められた。また照射部周辺の中膜組織を透過型電顕で観察すると、種々の程度の中膜組織破壊像を認めた。組織傷害高度の部位は平滑筋細胞の固有構造を認めないほど破壊されたdebrisを形成していたが、傷害の弱いところでは平滑筋細胞の半分が破壊されながらも他の半分にはdense ovoid areaが温存された所見も多く見られた（図3）。

一方、健常動脈壁に平行にレーザーが照射された場合には、光顕にて中膜の変化は見られず、走査型電顕にて血管内表面の変化は認められなかった（図4）。ただし、透過型電顕で中膜を観察すると、中膜間質の浮腫と空胞形成が散在し、平滑筋細胞固有構造も軽度に乱れていたが、これらの変化はレーザー非照射部の変化と大差はなかった（図5）。

実験2

健常血管壁にレーザーを垂直照射した場合52例中41例（79%）に、図6に示すように蒸散部内膜が残存しており、蒸散部周辺の中膜の解離が52例中27例（52%）に認められた。各照射条件別に中膜解離の発生率をみると、照射エネルギー、照射時間が増加するほど中膜解離を起こす頻度も高くなった（図7）。

一方、粥状動脈硬化病変部にレーザーを垂直照射した場合には、蒸散部内膜の残存は11例中4例（36%）

にのみ認められたにすぎず、蒸散部周辺の中膜の解離も11例中3例（27%）に認められたのみであった（図8）。

また、蒸散部残存内膜を透過型電顕で観察すると、内皮細胞は固有構造が認められないほど破壊されていたが、蒸散消失は免れて内皮列としては残存しており、基底膜はその構造を保っていた（図9）。

次に、粥状動脈硬化病変部にレーザーを垂直照射した場合のレーザー照射部周辺組織の傷害度を、走査電顕像より以下の5段階に分類した。I：蒸散部のみで周囲の組織傷害の認められないもの（図10A）。II：蒸散部周辺に翻転物が少量認められるもの（図10B）。III：周辺部に組織傷害が認められるが、その範囲が蒸散部より小さいもの（図10C）。IV：周辺部の組織傷害の範囲が蒸散部より大きいもの（図10D）。V：周辺部に熱性傷害が高度に認められるもの（図10E）。各照射条件別に、周辺組織の傷害度分類の割合をまとめると、図11のようになった。5W 2秒の場合にはIが38%、IIが44%、IIIが12%、IVが6%でVは認められなかった。10W 1秒の場合にはIが19%、IIが31%、IIIが31%、IVが6%、Vが13%であった。10W 2秒の場合にはIが14%、IIが31%、IIIが28%、IVが10%、Vが17%で、5W 5秒ではIが34%、IIが40%、IIIが13%、IVがなくVが13%であった。傷害度分類III以上を有意な組織傷害としてカイ2乗検定を行うと、5W 2秒と10W 2秒の間でのみ有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた。

IV 考 察

LASTAC システムは、Nordstrom ら⁹⁾、Foschi ら¹³⁾により開発されたバルーン付きのアルゴンレーザーカテーテルで、バルーンを拡張させることにより、オプティカルファイバーが冠動脈と同軸性を保つように工夫されたものである。しかも、レーザービームの照射角度は約40度であるため、レーザーの照射距離は短くなり、健常血管への損傷の危険が少なく、重篤な合併症である冠動脈の穿孔を予防しうる方法とされている。Foschi ら¹⁴⁾の行った米国の多施設共同研究の成績では、冠動脈病変53例（完全閉塞48例）、bypass grafts 病変14例（完全閉塞7例）に対して、LASTAC システムを使用し、初期成功率は76%であり、合併症は急性冠動脈閉塞2例、不整脈2例、機械的穿孔1例で、死亡は消化管出血の1例のみであった。また、オランダのMast ら¹⁵⁾は、冠動脈完全閉塞病変30例に対して、LASTAC システムを使用し、初期成功率は60%であり、合併症は非貫壁性心筋梗塞1例、無症状の冠動脈解離7例、心室細動1例であった。以上のように欧米ではすでに臨床応用が開始されており、その臨床効果と安全性が確認されている。わが国には、臨床用に2台、実験用に1台導入されており、そのうちの臨床用1台が信州大学に設置されている。これを冠動脈に臨床応用する前段階として本研究を行った。

本研究の結果、LASTAC システムにおいては、健常血管に対して血管とカテーテルの同軸性を保ち、血管壁に平行照射すれば内膜および中膜にほとんど変化は認められないが、同軸性が保てず、健常血管壁に直接照射された場合には血管穿孔や中膜の解離を起こす危険性があることがわかった。また健常血管壁に直接照射した場合、蒸散部内膜は熱変性をきたすが残存する傾向が強く、蒸散部周辺の中膜に熱損傷、解離などの変化が強く認められた。これは、アルゴンレーザーにおいては、蒸散の間、照射表面よりも表面下温度のほうが高くなり、表面下に組織の破壊や蒸気の発生が生じ、急激な圧の上昇が中膜の解離を引き起こすためと思われる¹⁶⁾¹⁷⁾。一方、粥状動脈硬化病変部にレーザー照射した場合には、肥厚した内膜の粥腫部に組織の破壊や蒸気の発生が起こり、その下の中膜層に及ぼす影響は軽減されるため、中膜の解離の見られる頻度は減少したと思われる。また、走査電顕による検討より、粥状動脈硬化病変部に同じ条件でレーザー照射をしても、周辺組織に与える組織傷害の程度は一定でなく、

様々な程度の組織傷害がみられることがわかった。これは、照射される側の動脈硬化病変の性状は石灰化、アテローム、水分等の含有量によって異なるために、レーザーに対する反応も違ったものになるためと思われた。また、照射条件を変えた場合には、5W 2秒のレーザー照射のほうが10W 2秒よりも周辺への組織傷害および熱性傷害の程度は有意に低くなるという結果が得られた。これは著者らが以前報告した光顕での検討と一致した¹¹⁾。

以上より、アルゴンレーザーを用いた冠動脈形成術を実際に臨床で行う場合には、血管とカテーテルの同軸性を高め、動脈硬化部に正確に、適切な出力と適切な時間のレーザー照射を行うことが必要である。この点 LASTAC システムは、血管とカテーテルの同軸性にすぐれており、臨床応用は可能と思われた。また、至適照射条件は5W 2秒であったが、実際に臨床で用いる場合は、動脈硬化病変のレーザーに対する反応が石灰化、アテローム、血栓、水分等の含有量によって異なるため、10W 2秒照射も必要と思われた。さらに、臨床での確実性を増すためには、血管内視鏡や血管内超音波法を併用して動脈硬化病変の性状を把握し、適切なレーザー照射を行い、血管の反応を確認しながら照射条件を変化させていくことが望ましい。

V 結 語

LASTAC システムを用いた冠動脈形成術の安全性と確実性を期すために、WHHL ウサギと健常ウサギを用いてレーザー血管形成術の基礎実験を行い、以下の結論を得た。

- 1 WHHL ウサギの生体頸動脈の動脈硬化病変部にレーザー照射した場合、同部の蒸散性病変がみられたが、周辺の熱性傷害、血栓の付着は認められなかった。
- 2 至適照射条件は、5W 2秒であった。
- 3 血管とカテーテルの同軸性が保たれていれば、レーザー照射をしても健常血管部の傷害は認められなかった。
- 4 健常血管壁に直接レーザーが照射された場合には、血管穿孔または中膜の解離が認められた。
- 5 以上より、LASTAC システムを用いた冠動脈形成術の臨床応用は可能であるが、血管屈曲部または分岐部におけるレーザー照射には細心の注意を払う必要があると思われた。

この研究は財団法人日本心臓血圧研究振興会の平成元年度、2年度公募研究として同施設で行った。なお、本論文の一部は、第31回日本脈管学会総会（1990年10月、札幌）、第10回アジア・太平洋心臓学会議（1991年10月、ソウル）において発表した。

VI 謝 辞

稿を終わるにあたり、終始懇篤なるご指導、ご校閲

を賜りました信州大学第1内科学教室関口守衛教授に深く感謝の意を表します。さらに、本研究をご援助くださった山田博美博士、矢崎善一先生、神戸大学医学部動物実験施設渡辺嘉雄教授、塩見雅志教授、財団法人日本心臓血圧研究振興会の方々に心より厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Grüntzig AR, Senning Å, Siegenthaler WE: Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 301: 61-68, 1979
- 2) Maiman TH: Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 187: 493-494, 1960
- 3) Lee G, Ikeda RM, Kozina J, Mason DT: Laser-dissolution of coronary atherosclerotic obstruction. *Am Heart J* 102: 1074-1075, 1981
- 4) Abela GS, Normann S, Cohen D, Feldman RL, Geiser EA, Conti CR: Effects of carbon dioxide, Nd-YAG, and argon laser radiation on coronary atheromatous plaques. *Am J Cardiol* 50: 1199-1205, 1982
- 5) Choy DSJ, Stertzer SH, Rotterdam HZ, Bruno MS: Laser coronary angioplasty: experience with 9 cadaver hearts. *Am J Cardiol* 50: 1209-1211, 1982
- 6) Geschwind HJ, Boussignac G, Teisseire B, Benhaïem N, Bittoun R, Laurent D: Conditions for effective Nd-YAG laser angioplasty. *Br Heart J* 52: 484-489, 1984
- 7) Ginsburg R, Kim DS, Guthaner D, Toth J, Mitchell RS: Salvage of an ischemic limb by laser angioplasty: description of a new technique. *Clin Cardiol* 7: 54-58, 1984
- 8) Choy DSJ, Stertzer SH, Myler RK, Marco J, Fournial G: Human coronary laser recanalization. *Clin Cardiol* 7: 377-381, 1984
- 9) Nordstrom LA, Castaneda-zuniga WR, Lindeke C C, Rasmussen TM, Burnside DK: Laser angioplasty: controlled delivery of argon laser energy. *Radiology* 167: 463-465, 1988
- 10) 関口守衛, 広田 潤, 西田 博, 中野秀昭, 渡辺 直, 豊崎哲也, 遠藤真弘, 小柳 仁, 広沢弘七郎, 渡辺嘉雄: LASTAC システムを用いたアルゴンレーザーによる血管形成術. 日本心臓血圧研究振興会昭和62年度研究業績集, pp 31-33, 1989
- 11) 広田 潤, 関口守衛, 河野 純, 山田博美, 豊崎哲也, 細田瑳一, 渡辺 直, 遠藤真弘, 小柳 仁, 渡辺嘉雄: LASTAC (アルゴンレーザー) による冠動脈形成術の基礎的研究. 日本心臓血圧研究振興会昭和63年度研究業績集, pp 52-55, 1990
- 12) Watanabe Y: Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis* 36: 261-268, 1980
- 13) Foschi A, Myers G, Crick WF, Friedberg HD, Synder D, Nordstrom LA: Laser angioplasty of totally occluded coronary arteries and vein grafts: Preliminary report on a current trial. *Am J Cardiol* 63: 9F-14F, 1989
- 14) Foschi AE, Myers GE, Flamm MD: Laser-enhanced coronary angioplasty: combined early results of direct argon laser exposures in atherosclerotic native arteries and bypass grafts. *J Am Coll Cardiol* 15: 56A, 1990
- 15) Mast EG, Plokker HWM, Ernst JMPG, Bal ET, Tjon Joe Gin RM, Ascoop CAPL: Percutaneous recanalization of chronic total coronary occlusions: experience with the direct Argon laser assisted angioplasty system (LASTAC). *Herz* 15: 241-244, 1990

- 16) Van Gemert MJC, Welch AJ, Bonnier JJM, Valvano JW, Yoon G, Rastegar S: Some physical concepts in laser angioplasty. *Semin Intervent Radiol* 3:27-38, 1986
- 17) Welch AJ, Bradley AB, Torres JH, Motamedi M, Ghidoni JJ, Pearce JA, Hussein H, O'Rourke RA: Laser probe ablation of normal and atherosclerotic human aorta in vitro: a first thermographic and histologic analysis. *Circulation* 76: 1353-1363, 1987

(7. 3. 2 受稿)
