

平成 24 年度課題解決型医療機器等開発事業

「生体吸収性ポリマー技術を用いた生体吸収性ステントの改良及び製品化」

研究成果報告書(要約版)

平成 25 年 2 月

委託者 経済産業省

委託先 株式会社京都医療設計

目次

| | |
|---------------------------------------|----|
| 第1章 研究開発の概要 | 3 |
| 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標..... | 3 |
| 1-2 研究体制 | 5 |
| 1-3 成果概要 | 8 |
| 1-4 当該研究開発の連絡先..... | 8 |
| 第2章 本論 | 9 |
| 2-1 生体吸収性抹消血管用ステントの結晶化度の最適化(分解性)..... | 9 |
| 2-2 生体吸収性抹消血管用ステントの接合部の高強度化..... | 14 |
| 2-3 分解性試験..... | 17 |
| 2-4 生体吸収性末梢血管用ステントの臨床使用評価..... | 24 |
| 第3章 全体総括..... | 25 |

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1-1-1 研究開発の背景

経皮的血管形成術(PTA: Percutaneous transluminal angioplasty)においては、再狭窄や elastic recoil、内膜剥離による急性閉塞などの合併症を伴う。これら合併症の予防あるいは処置の目的で、ステントが用いられている。

ステントは、脈管内部から血管壁を支持し、その内腔を開存することを目的とする円筒構造体である。既に臨床におけるステントの有用性は認められており、現在、様々な血管領域でステントが使用されている。しかしながら、現在、使用可能なステントは全て金属製である。このような金属製のステントは、一旦血管内に留置されると、外科的手術を施さない限り、血管内から取り出すことができない。ステントは、経皮的血管形成術の合併症に対して良好な成果を得ているが、一方でステントを留置した部位でさらに狭窄を来たすステント内再狭窄(In-stent restenosis)が、临床上、問題として残っている。再狭窄及びステント内再狭窄は、経皮的血管形成術後の6～9ヶ月以内に、生じると言われている。この期間に再狭窄が生じない場合は、発生率が顕著に低下する。そのため、ステントは血管内において、6～9ヶ月の間、ステント機能を有してれば良く、その後は、血管内で残存し続ける必要がない。

生体吸収性ステントは生分解性素材によって構成され、ポリ L-乳酸製の生体吸収性ステントは血管内に留置された後、6～9ヶ月間、ステントとしての機能を有し、血管組織中にて大よそ2～3年で消失するよう、設計されている。生体吸収性ステントは、患者の体内に永久に留置されることなく、血管内に異物として残らないため、ステント内再狭窄を生じた際にも、再治療を容易に施すことができる。

弊社においては1990年頃から冠動脈用の生体吸収性ステント開発を開始した。開発当初のステントデザインは、ニット形状で作製し、動物実験を施行した。以降、生体吸収性ステントの改良と動物実験を重ね、生体への安全性及び意図した目的に使用し得ることが示され、1998年に臨床治験を施行して、冠動脈においてその安全性が立証された。

人冠動脈へのステント留置の安全性が示された後、生体吸収性末梢血管用ステントの開発を行った。既に、冠動脈用ステントにおいて、安全性は示されていたものの、設計された製品が意図したステント性能を発揮し得るかについて、生体吸収性末梢血管用ステントについても動物実験を施行した。その後、末梢血管に使用する臨床試験をヨーロッパにて施行し、2007年に欧州で生体吸収性ステントとしては世界初のCEマークを取得し、商品名を”REMEDY”とし、欧州11カ国で生体吸収性末梢血管用ステントの販売を行っている。

1-1-2 研究の目的

生体吸収性ステントを国内で実用化させるため、本事業全体の研究開発計画においては、生体吸収性末梢血管用ステントの改良、非臨床試験の実施、治験の実施を目標としている。24年度は、生体吸収性ステントの国内治験を実施し、臨床使用評価及びステント留置後のフォローアップを行う。加えて、ポリ乳酸の結晶化度を最適化し、分解性について評価する。また、ステント接合部の高強度化についても研究する。薬事承認申請に関する取り組みとしては、薬事承認申請に備え、医薬品医療機器総合機構(PMDA)の対面助言を通じ、承認申請書類を準備する。

1-1-3 研究の目標

- ① 生体吸収性末梢血管用ステントの臨床使用評価(慶応義塾大学病院、株式会社京都医療設計)

慶応義塾大学病院及び関連病院にて100例のステント留置術を施行し、臨床での使用評価を株式会社京都医療設計が収集する。

- ② 生体吸収性末梢血管用ステントの経過観察(慶応義塾大学病院、株式会社京都医療設計)

慶応義塾大学病院及び関連病院にてステント留置後の検査を実施し、9ヶ月間の有効性評価及び12ヶ月間の安全性評価を行い、生体吸収性末梢血管用ステントの妥当性確認を行う。データ集計、統計解析を株式会社京都医療設計が行う。

- ③ 生体吸収性末梢血管用ステントを構成するポリ乳酸の結晶化度の最適化(国立大学法人 京都工芸繊維大学)

ステントの安定性を確保するため、分解性に影響を及ぼすポリ乳酸の結晶化度を最適化し、実時間による分解性試験は株式会社京都医療設計にて実施し、分解性について評価する。結晶化度の最適化は京都工芸繊維大学にて実施する。

- ④ 生体吸収性末梢血管用ステントの接合部の高強度化(株式会社京都医療設計)

ステント留置後の負荷に対する耐久性を向上させるため、ステント構造を形成する接合部の接合強度を高める(実験に PLLA-LMP を 6Kg 使用)。ステントの接合部の高強度化は株式会社京都医療設計にて実施する。

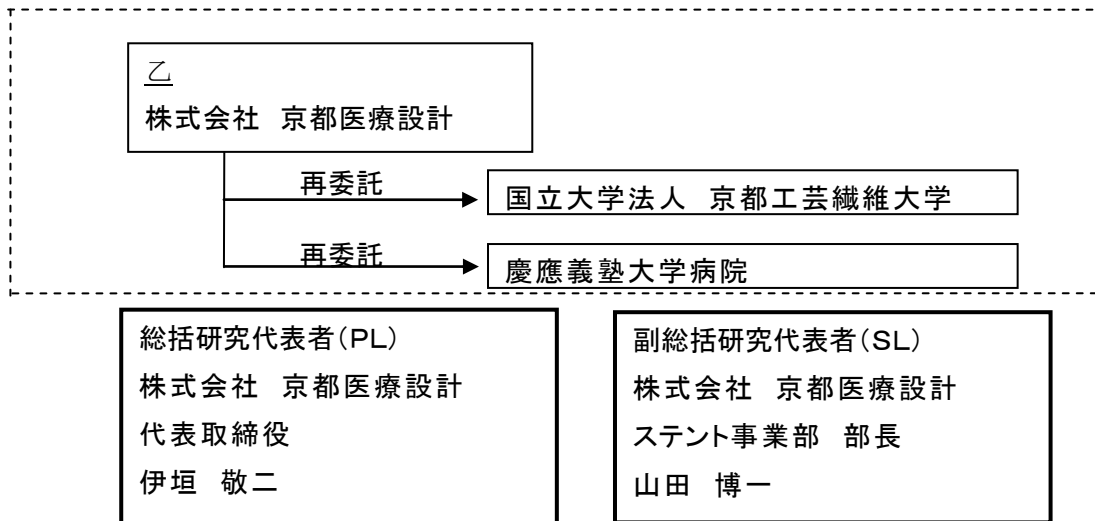
- ⑤ 承認申請の準備(株式会社京都医療設計)

株式会社京都医療設計が PMDA の対面助言(医療機器安全性確認相談、医療機器品質相談、医療機器申請前相談等)を受け、承認申請に必要な試験、データ、文書等を確認し、承認申請の準備を行う。

1-2 研究体制

1-2-1 研究組織及び管理体制

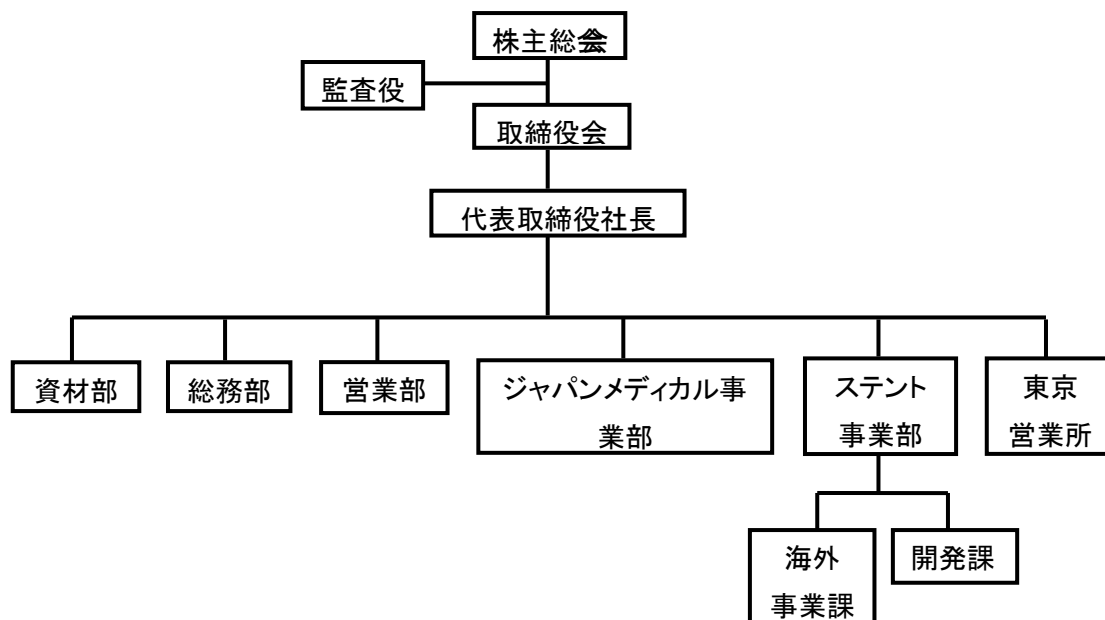
1) 研究組織(全体)



2) 管理体制

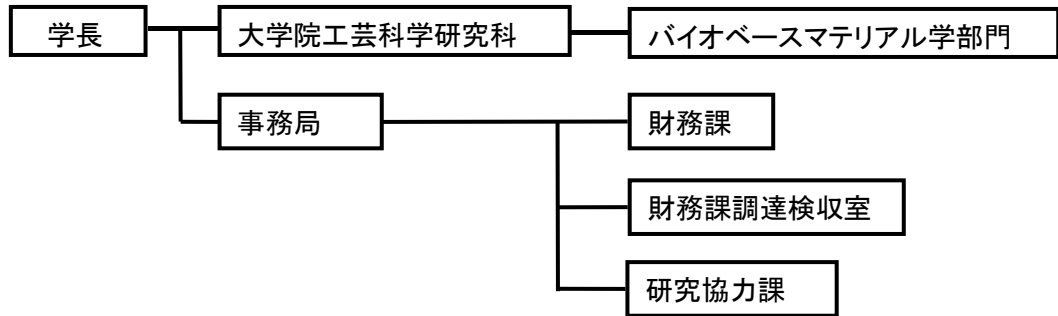
① 事業管理機関

[株式会社 京都医療設計]

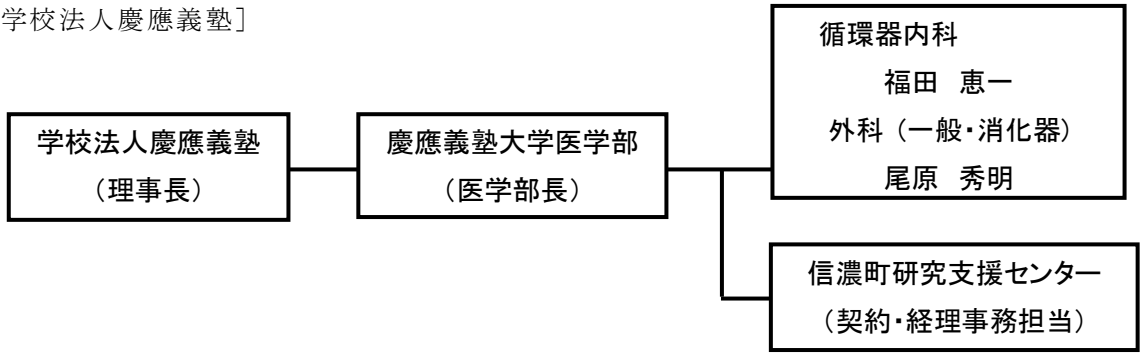


②再委託先

[国立大学法人 京都工芸繊維大学]



[学校法人慶應義塾]



1-2-2 管理員及び研究員

【事業管理機関】株式会社京都医療設計

① 管理員

| 氏名 | 所属・役職 | 実施内容(番号) |
|-------|------------|----------|
| 伊垣 敬二 | 代表取締役 | ①、②、④ |
| 山田 博一 | ステント事業部 部長 | ①、②、④、⑤ |
| 高見 細香 | ステント事業部 | ①、②、④、⑤ |

② 研究員

| 氏名 | 所属・役職 | 実施内容(番号) |
|----------|--------------|----------|
| 伊垣 敬二(再) | 代表取締役 | ①、②、④ |
| 山田 博一(再) | ステント事業部 部長 | ①、②、④、⑤ |
| 西田 喜昭 | 東京営業所 所長 次長 | ①、②、⑤ |
| 竹口 宏樹 | 総務部 課長 | ①、② |
| 谷 大和 | ステント事業部 課長代理 | ①、②、⑤ |
| 塚本 幸徳 | 総務部 係長 | ①、② |
| 木下 光彦 | ステント事業部 主任 | ①、②、④ |
| 松原 千紗 | ステント事業部 | ①、②、④、⑤ |
| 山本 泰裕 | ステント事業部 | ④ |
| 藤居 翔太 | ステント事業部 | ④ |

【再委託先】※研究員のみ

国立大学法人 京都工芸繊維大学

| 氏名 | 所属・役職 | 実施内容(番号) |
|-------|---------------------------------|----------|
| 山根 秀樹 | 大学院工芸科学研究科 バイオベースマテリアル学部門 教授 | ③ |

慶應義塾大学病院

| 氏名 | 所属・役職 | 実施内容(番号) |
|-------|------------------|----------|
| 福田 恵一 | 循環器内科 教授 | ①、② |
| 尾原 秀明 | 外科(一般・消化器) 助教 | ①、② |

1-3 成果概要

①生体吸収性末梢血管用ステントの臨床使用評価

PMDA からの指摘事項に対する対応、及び治験施設での倫理委員会の開催が遅れ、治験開始が遅れてしまったが、治験施設 7 施設にて治験が可能となった。現在までに治験 6 症例が施行された。

②生体吸収性末梢血管用ステントの経過観察

上記臨床使用に伴い、経過観察を開始することができた。

③生体吸収性末梢血管用ステントの結晶化度の最適化

80℃で延伸した糸は、結晶化度が高く、機械的特性が高く、熱処理温度が高いと、結晶化度が促進され、現在、結晶化度が高くなれば、分解性の耐性が増し、安定して分解することが判明した。

④生体吸収性末梢血管用ステントの接合部の高強度化

レーザー溶着を施すことで、従来の接合強度と比べ、強度が 2.8 倍向上した。

⑤承認申請の準備

平成 25 年 1 月 18 日に PMDA 対面助言(医療機器安全性確認相談、医療機器品質相談)を受け、PMDA 安全性相談にて、海外メーカーが実施したステントデリバリーシステムの生物学的安全性試験が GLP 適合施設で行われていないため、国内で再度試験が必要であるとの指摘を受けた。また、PMDA 品質相談より、製品の品質保証を厳格に行うため、保管試験や輸送試験等を再度実施すべきであることが判明した。

1-4 当該研究開発の連絡先

株式会社京都医療設計 ステント事業部 部長 山田 博一

〒607-8035 京都市山科区四ノ宮神田町4 古橋山科ビル

Tel:075-594-5595 Fax:075-594-6444 E-mail: stent@kyoto-mp.co.jp

第2章 本論

2-1 生体吸収性抹消血管用ステントの結晶化度の最適化(分解性)

(1) 実施内容

ポリ L-乳酸繊維の熔融紡糸法及び延伸加工を最適化し、生体吸収性末梢血管用ステントを構成するポリ L-乳酸繊維の強度を向上させる。さらにポリ L-乳酸繊維を熱処理することによる力学的性質、熱的性質、分解性の変化について調査し、生体分解吸収性ステント製造条件の指針とする。

(2) 実験

ポリ L-乳酸繊維の作製

試料として、(株)京都医療設計でステント用に使用されているポリ L-乳酸を用いた。分子量は約 21 万であり、熔融紡糸直前に真空乾燥機を用いて乾燥した。

熔融紡糸は、直径 15 mm のスクリーンを有する紡糸機に内径 1 mm のモノホールダイを取り付けて行った。シリンダー温度は 210℃、ノズル温度は 180℃とした。ポリ L-乳酸融体の吐出速度を一定にし、引き取り速度を変化させることにより、種々の直径を有するストランドを得た。ストランド直径は約 500 μm であった。これを昨年度の研究結果に従い、80℃の湯浴中で 6 倍に延伸した。さらに定長状態での熱処理を空气中、120℃～160℃の温度範囲で施した。

分析と観察

ポリ L-乳酸繊維の力学的性質は、引張試験機により測定した。一定速度 50 mm/min で繊維を伸長した際の応力とひずみの関係を求め、引張強度、引張弾性率、破壊伸びを算出した。

ポリ L-乳酸繊維の高次構造は、広角 X 線回折 (WAXD) と小角 X 線散乱法 (SAXS) により評価した。また、結晶化度は示差走査熱量分析 (DSC) により決定した。

ポリ L-乳酸繊維の加水分解は、加速試験により 70℃のリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) および NaOH 水溶液 (0.1 mol/L) 中に行い、力学的性質、分子量、結晶化度、表面状態の変化により評価した。分子量は GPC により、表面状態の観察は走査型電子顕微鏡 (SEM) により行った。

(3) 結果

熔融状態から押出したポリ L-乳酸繊維を延伸すると結晶化し、分子鎖が繊維軸方向に配向していることが認められた。配向の程度は延伸倍率とともに増大し、その結果、強度、弾性率は延伸倍率とともに上昇し、破壊伸びは低下した (図 2.1-1)。

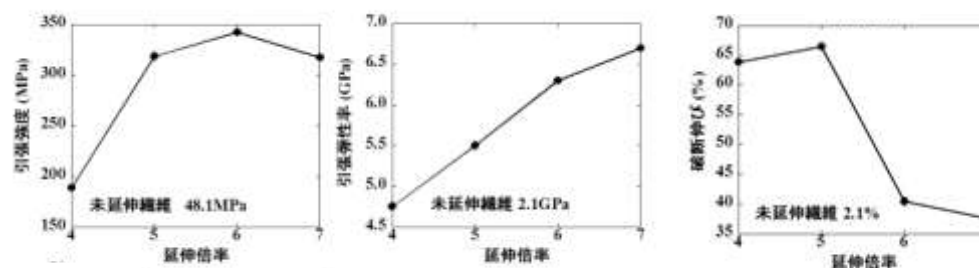


図 2.1-1 種々の温度で熱処理を行ったポリ L-乳酸繊維の結晶化度

熱処理に伴う高次構造と力学的性質の変化

昨年度の研究結果で最も優れた力学的性質を示した 80℃で 6 倍に延伸したポリ L-乳酸繊維に熱処理を施した。熱処理により、結晶化度は熱処理温度および時間とともに単調に増大した (図 2.1-2)。WAXD パターンを撮影したところ、定長熱処理により熱処理時間の増加に伴い延伸繊維の分子配向を

緩和させることなく結晶化度を増大させていることが確認された(図 2.1-3)。また、SAXS パターンより、延伸繊維および 120℃までの熱処理では、結晶ラメラとラメラをつなぐ非晶タイ分子からなる繰り返し構造を有していないが、それ以上の温度での熱処理では、繰り返し構造を反映する長周期を示す散乱スポットが表れており、スポットの強度は熱処理温度とともに増大した(図 2.1-4)。このような高次構造の変化は力学的性質に反映し、弾性率は熱処理温度と時間とともに増大したが、強度、破壊伸びは低下した(図 2.1-5)。

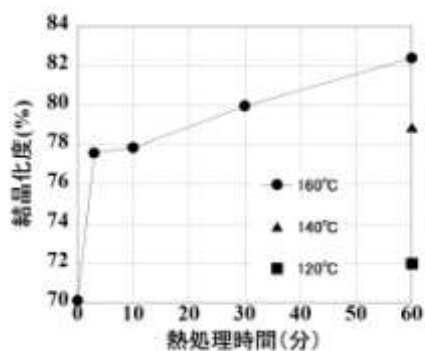


図 2.1-2 種々の温度で熱処理を行ったポリ L-乳酸繊維の結晶化度

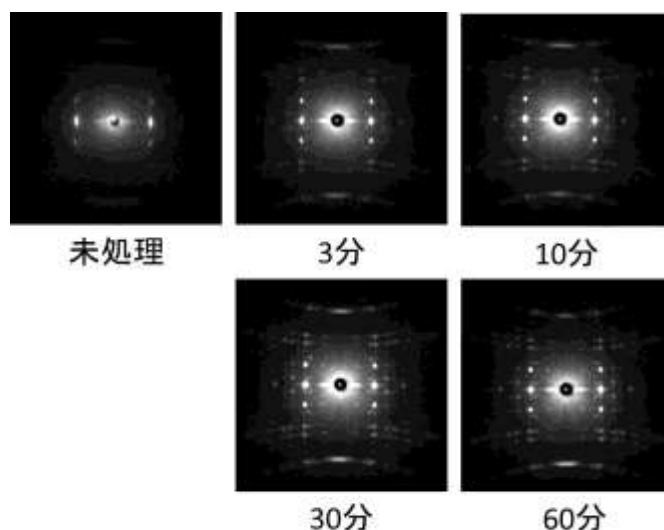


図 2.1-3 種々の時間で熱処理(160℃)を行ったポリ L-乳酸繊維の WAXD 写真

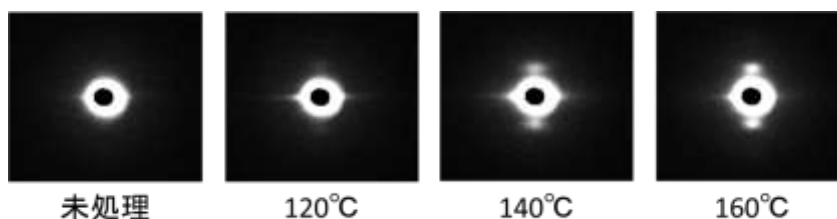


図 2.1-4 種々の温度で 60 分間熱処理を行ったポリ L-乳酸繊維の SAXS 写真

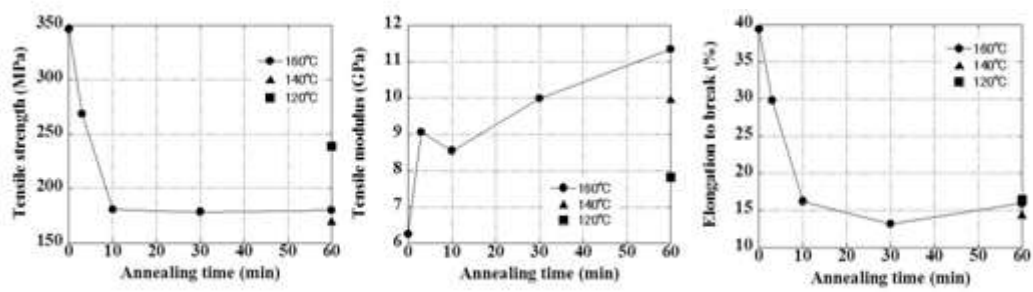


図 2.1-5 種々の温度、時間により熱処理を行ったポリ L-乳酸繊維の力学的性質

熱処理に伴う分解性の変化

本研究では、70℃に加熱したリン酸緩衝生理食塩水および NaOH 水溶液中で、160℃、60 分間熱処理したポリ L-乳酸繊維を用い分解の加速試験を行った。

リン酸緩衝生理食塩水中および NaOH 水溶液中に浸漬したポリ L-乳酸繊維の形態変化をそれぞれ図 2.1-6 および図 2.1-8 に示す。また、それぞれの高倍率 SEM 像を図 2.1-7 および図 2.1-9 に示す。

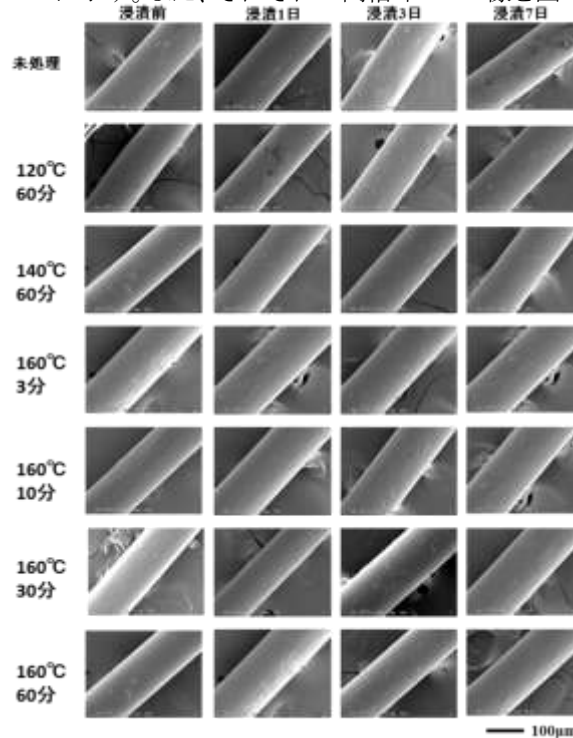


図 2.1-6 リン酸緩衝水溶液中に浸漬したポリ L-乳酸繊維の形態変化

リン酸緩衝生理食塩水中に浸漬したポリ L-乳酸繊維は、熱処理条件にかかわらず低倍率 SEM 像では表面の変化は観察されなかった。しかしながら、高倍率 SEM 像では、160℃で 3 分間および 10 分間熱処理したポリ L-乳酸繊維には 7 日目に軸に垂直な筋状穴が確認された。この筋状の穴は、熱処理時間と共に軽微になり、30 分以上の熱処理により消滅している。なお、未処理ポリ L-乳酸繊維は 7 日目でも滑らかな表面を有していたが、これは分解された成分が脱落したのではないかと考えている。NaOH 水溶液中に浸漬した未処理ポリ L-乳酸繊維は 1 日目から表面に変化が現れた。浸漬前は滑らかな表面を有していたが、1 日目には繊維軸と垂直方向に楕円状の穴が観察され、3 日後にはその穴が成長している。さらに、7 日目にはポリ L-乳酸繊維は大きく細化し、大きなくぼみが観察される。これは、分解に伴い、表面部分が崩壊し、浸漬液中に分散したものと思われる。熱処理ポリ L-乳酸繊維は 3 日目までは表面の変化はほとんど観察されなかったが、7 日目に変化が初めて見られた。120℃ ~ 160℃で 1 時間熱処理したポリ L-乳酸繊維では、どの繊維でも細化しているが、未処理ポリ L-乳酸繊維ほど大き

なくぼみは観察されない。これは、熱処理時間と共に表面部分の崩壊落下単位がより小さくなっていることによるものと思われる。熱処理時間依存性を見てみると、160°Cで3分間熱処理を施したポリL-乳酸繊維は、7日目に未処理ポリL-乳酸繊維の1,3日目と同様ではあるが、より大きな穴が観察された。さらに熱処理時間を増加させると、7日目には細化しているがほぼ平滑な表面が観察された。以上より、NaOH水溶液中での分解は、まず繊維の表面部分の非晶部で起こり、残存した結晶領域が崩壊脱離して進行していくと考えられる。

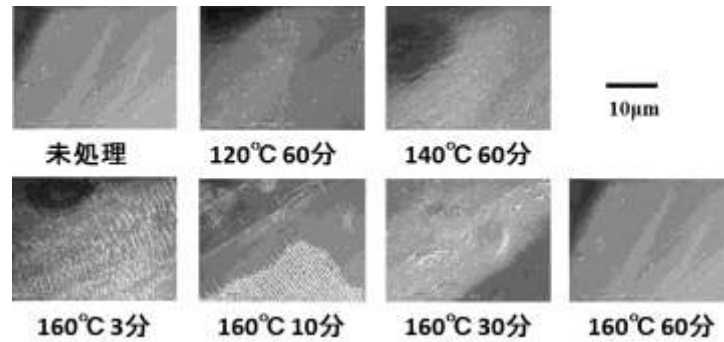


図 2.1-7 リン酸緩衝水溶液中に7日間浸漬したポリL-乳酸繊維の形態変化(拡大写真)

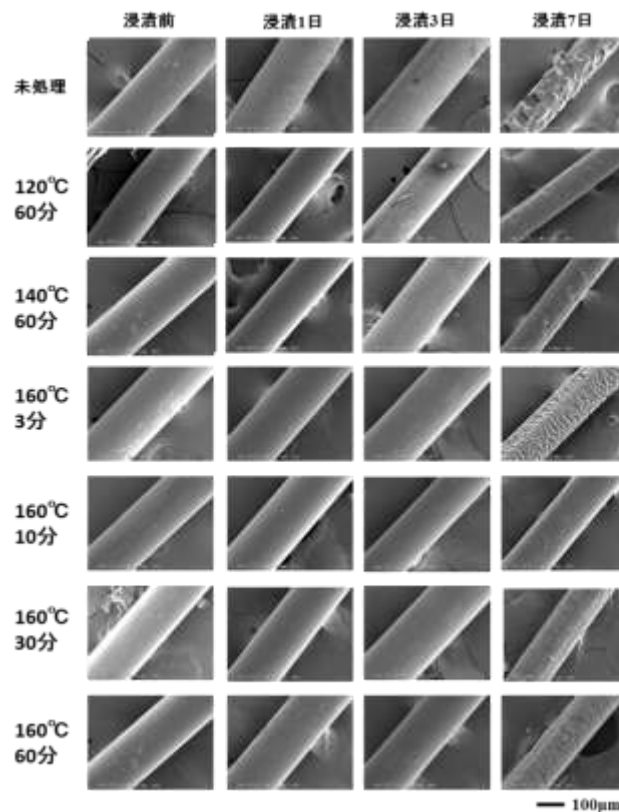


図 2.1-8 NaOH水溶液中に浸漬したポリL-乳酸繊維の形態変化

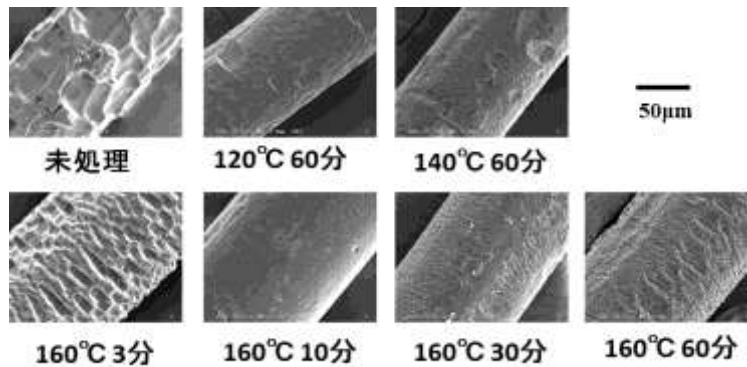


図 2.1-9 NaOH 水溶液中に 7 日間浸漬したポリ L-乳酸繊維の形態変化(拡大写真)

DSC による熱分析の結果より、リン酸緩衝生理食塩水中および NaOH 水溶液中の両者に浸漬したポリ L-乳酸繊維の結晶化度は、分解時間とともに増大することが分かった。これは、繊維の非晶部分が優先的に分解され、結晶部分が残存したことによるものと思われる(図 2.1-10)。

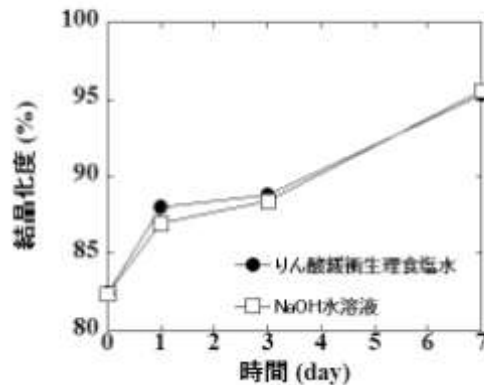


図 2.1-10 各水溶液に種々の期間浸漬した、ポリ L-乳酸繊維の結晶化度

ポリ L-乳酸繊維の分子量は、(図 2.1-11)に示すように分解時間とともに低下した。リン酸緩衝生理食塩水中より NaOH 水溶液中でより分解が加速されている。NaOH 水溶液中では加水分解がアルカリに触媒されるため、リン酸緩衝生理食塩中より分子量低下が起きていると考えられる。

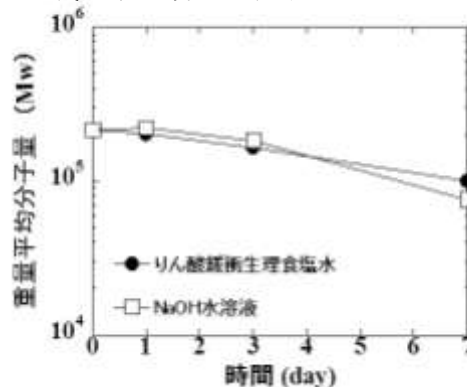


図 2.1-11 各水溶液に種々の期間浸漬した、ポリ L-乳酸繊維の重量平均分子量(Mw)

このような、分解に伴い力学的性質は変化している(図 2.1-12)。弾性率は分解の初期に低下するが、その後はほぼ同程度の値を保っている。一方、強度と破壊伸びは分解時間とともに単調に低下している。従って、分解に伴い、ポリ L-乳酸繊維は硬さをほぼ保持したまま、徐々にもろくなっていくものと思われる。

る。本実験では、分解を加速させているが、実際にステントを生体内に留置した場合には、このような変化が1～2年間でゆっくり起こるものと予想される。

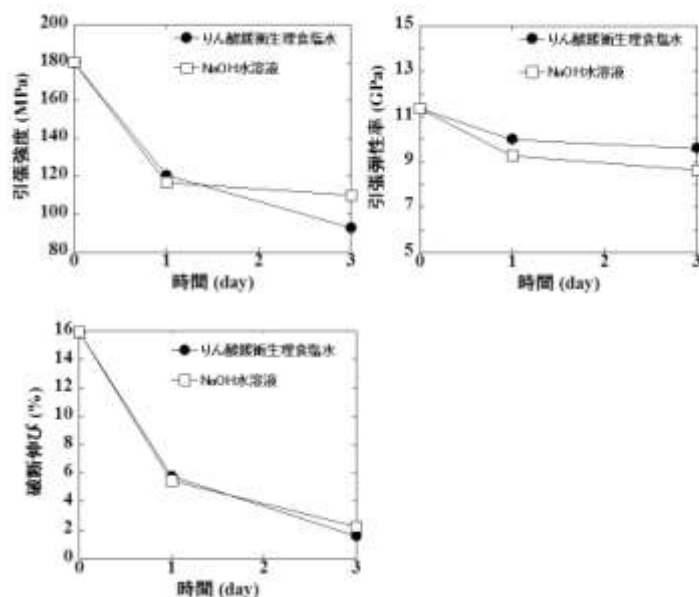


図 2.1-12 各水溶液に種々の期間浸漬した、ポリL-乳酸繊維の力学的性質

(4) まとめ

溶融紡糸したポリL-乳酸繊維の延伸および熱処理に伴う高次構造、力学的性質、および分解挙動の変化について検討した結果、以下の知見を得た。

1. 使用したポリL-乳酸繊維は80℃で6倍延伸することにより、最も優れた力学的性質が達成される。
2. 熱処理に伴い、弾性率は増大するが、強度と破壊伸びは低下する。
3. 熱処理に伴う結晶化により分解速度は低下、熱処理温度、熱処理時間とともに分解に対する耐性はより顕著となる。
4. 分解の進行とともに、弾性率をある程度保持したまま、強度、破壊伸びが低下する傾向がある。体内に留置されたステントには、引張りの大変形を受けることは少なく、血管の拍動や曲げに対する変形が多いものと予想され、このような変形に対しては長期間弾性的に追従および回復を示すものと期待できる。

結晶化度を制御することにより、分解速度を変化させることが可能であり、熱処理条件を適当に選ぶことにより、最適な初期の力学的性質と分解速度とを決定することが出来る。

2-2 生体吸収性抹消血管用ステントの接合部の高強度化

(1) 実施内容

23年度の研究成果により、ステント構造を再設計し、ステント強度は向上、改良したステントは従来品より大きな外力に耐えることが出来る。しかしながら、ステント構造を形成する接合部は改良されておらず、より大きな外力が加わっても、接合部が破損しないよう接合部の高強度化が必要である。本研究ではステント接合部に炭酸ガスレーザーを照射することで接合部の溶着を行い、接合部の高強度化を目指した。

(2) 実験

レーザー照射(ステント接合部)試料の作製

試料用ステントとして、ステント構造が再設計された改良型ステント(ポリL-乳酸繊維使用)を用いた。

ステント接合部のレーザー溶着は、CO₂レーザー装置により行った(図 2.2-1)。図 2.2-2 に示すように、ステント接合部にレーザーが照射するよう照準をあわせた。レーザーの出力に応じ数秒間程度レーザーの照射を行い、接合部の溶着を行った。本試験ではレーザー出力が接合部の溶着強度に与える影響について確認した。



図 2.2-1 CO₂レーザー装置

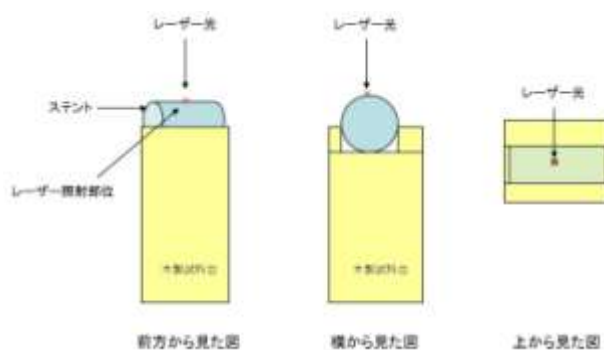


図 2.2-2 試料台上ステントのレーザー照射部位

分析と観察

レーザー照射(ステント接合部)試料の力学的性質は、引張試験機により測定した。一定速度 20mm/min で、剥離、せん断方向に負荷をかけ、接合部が破断に至る強度を求めた。ステント接合部溶着箇所の表面観察は光学顕微鏡を用い観察を行った。

(3) 結果

図 2.2-3 に剥離強度試験における各レーザー出力の剥離開始荷重(N)および最大荷重(N)を示す。レーザー出力が 10mA までは最大荷重が 1.4N 前後であったが、12mA 以上のレーザー出力で接合部を溶着した場合、最大荷重は上昇し 20mA で 1.9N を示した。レーザー出力が低い場合、接合部の溶着に時間を要するため、照射ムラが起きやすく、試料形状は不均一化し剥離強度が向上しなかったと考えられる。しかし、12mA 以上の高出力で処理した場合には短時間で溶着処理ができることから試料形状の不均一化は起きにくく、より短時間で処理できる高出力側でより高い剥離強度になったと考えられる。本試験では剥離強度が最大 1.9N となったが、これは従来ステントの剥離強度 0.65N と比較し 2.8 倍の剥離強度であった(図 2.2-4)。

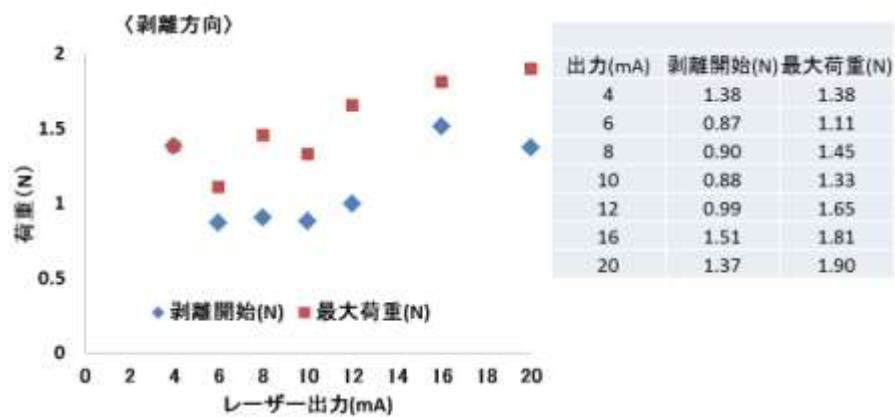


図 2.2-3 剥離強度試験における各レーザー出力の剥離開始荷重(N)および最大荷重(N)

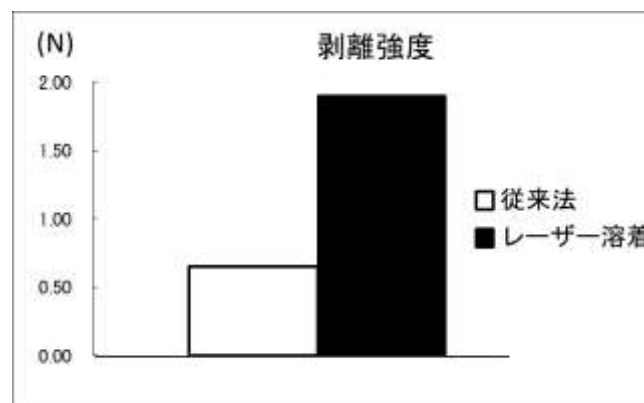


図 2.2-4 従来ステントとレーザー溶着ステントとの剥離強度比較

図 2.2-5 にせん断強度試験における各レーザー出力の剥離開始荷重(N)および最大荷重(N)を示す。せん断方向では剥離方向と異なりレーザー出力による強度向上は見られず、剥離強度試験のような傾向は得られなかった。各試料いずれも、せん断強度はレーザー溶着した接合部強度が繊維強度より高く、接合部の破断の前に繊維が破断してしまい、接合強度は測定できなかった。この結果よりレーザー

溶着した接合部のせん断強度は十分な強度を有していることがわかった。

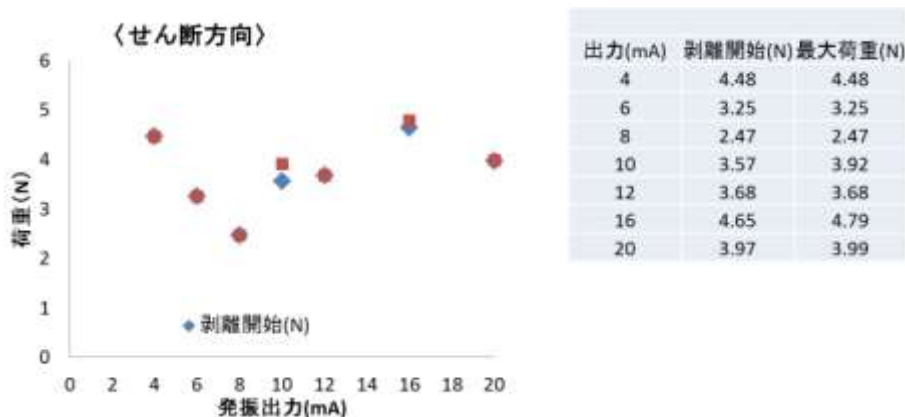


図 2.2-5 せん断強度試験における各レーザー出力の剥離開始荷重(N)および最大荷重(N)

まとめ

炭酸ガスレーザーによりステント接合部にレーザー溶着を行うことにより、接合部の高強度化を行うことが出来た。特に 20mA の出力でレーザー照射を行ったステント接合部の剥離強度は既存ステントと比べ 2.8 倍向上した。レーザー溶着した接合部の写真からポリ L-乳酸繊維同士が溶融融着していることが観察され、これによりステント接合部が高強度化したと考えられる。

CO₂ レーザー照射による接合部の高強度化は本法により達成することがわかった。しかし、溶着箇所の高分子鎖配向結晶化領域はレーザー照射による熱融解により非晶状態となっており、他の結晶部位と比較してより早く分解することが考えられる。分解挙動への影響を鑑みた場合、非晶部となった溶着箇所を再結晶化する等により耐分解性の向上を行う必要があると考えられる。

2-3 分解性試験

生分解性ポリマーであるポリ L-乳酸を原材料とした末梢血管用生体吸収性ステント『REMEDY™』は、原材料を紡糸・延伸して得られるポリ L-乳酸繊維にて作製されている。

平成 23 年度に行った「ポリ L-乳酸繊維の高強度化」及び「ステントデザインの再設計」を受け、高強度ポリ L-乳酸繊維を改良ステントへ適用する前に、同繊維の結晶化度変化による分解性への影響を検証することが平成 24 年度の課題として挙げられた。

平成 24 年度は、高強度化を達成した延伸条件及び、その繊維の結晶化度が生体吸収性ステントに適していることを評価するため、4 種類のポリ L-乳酸繊維とそれらを用いて成形した改良ステントに対して 37℃リン酸緩衝液中での実時間の生分解性試験を実施し、分解に伴う力学的及び物理化学的試験にてステントの性能評価を行った。評価は、「外科移植材用ポリ(Lラクチド)レジン及び加工体—体外分解試験」ISO13781:1997(E)を参考に、昨年度に依頼実績のあるエイキット株式会社にて実施した。

(1) 目的

高強度化を達成した延伸条件及び、その繊維の結晶化度が生体吸収性ステントに適していることを検証するため、4種類のポリ-L-乳酸繊維とそれらを用いて成形した改良ステントに対して in vitro での6ヶ月間にわたる実時間の分解性試験を行い、引張試験、GPC 試験、ラディアルフォース試験、表面観察(SEM)を実施して分解挙動の評価を行う。

(2) 試験サンプル

① 試験サンプル

4種類のポリ-L-乳酸繊維とそれらのポリ-L-乳酸繊維によって作製された4種類のステントをサンプルとして用意した。下表(表 2.3-1)の通り、サンプル作製条件及び結晶化度が異なる4種類のポリ-L-乳酸繊維を得た。4種類のサンプルは、A、B、C、Dとして区別し、4種類のポリ-L-乳酸繊維にて作製されたステントはそれぞれ、「ステントA」、「ステントB」、「ステントC」、「ステントD」として区別した。

表 2.3-1 サンプルの作製条件と結晶化度

| サンプル | サンプル作製条件 | 結晶化度 |
|------|-----------------------|-------|
| A | 70℃の温水中にて6倍に伸張 | 56.6% |
| B | 80℃の温水中にて6倍に伸張 | 62.7% |
| C | 90℃の温水中にて6倍に伸張 | 58.5% |
| D | 110℃に熱した金属ピンに接して6倍に伸張 | 66.7% |

② 各試験項目における試験サンプルの形状

ポリ-L-乳酸繊維は全長30cm、ステントは full-expandable の状態で各試験を行った。試験項目及び試験サンプルの形状は以下の通りである(表 2.3-2)。

表 2.3-2 試験サンプルの形状

| 試験項目 | 試験サンプル | 形状 |
|-------------|----------------------|-----------|
| 引張試験 | ポリ-L-乳酸繊維 | 全長 約 30cm |
| GPC 試験 | ステント full-expandable | 外径 約 10mm |
| ラディアルフォース試験 | ステント full-expandable | 外径 約 10mm |
| 表面観察 | ステント full-expandable | 外径 約 10mm |

(5) 試験の概要

ステント用線材である各ポリ-L-乳酸繊維に対して引張試験にて力学的強度を測定し、分解に伴う強度変化を評価した。成形品であるステントに対して、GPC 試験を行って分解に伴う分子量の変化を評価

し、ラディアルフォース試験を行って力学的特性の変化を評価した。また、分解に伴う形態の変化を確認するために、SEM を用いた表面観察を行った。

(6) 測定ポイントとサンプル数

当生分解性試験を開始する直前に全試験期間における初期数値の測定を行い、侵食溶液中での分解開始から 3 ヶ月後、6 ヶ月後に各測定を実施した。試験項目と、浸漬させるサンプル数は下表の通りである(表 2.3-3)。

表 2.3-3 測定ポイントとサンプル数

| 試験項目 | 試験サンプル | 浸漬サンプル数(本) | | |
|-------------|-----------|------------|------|------|
| | | 初期 | 3ヶ月後 | 6ヶ月後 |
| 引張試験 | ポリ-L-乳酸繊維 | 3 | 3 | 3 |
| GPC 試験 | ステント | 1 | 1 | 1 |
| ラディアルフォース試験 | ステント | 3 | 3 | 3 |
| 表面観察 | ステント | 1 | 1 | 1 |

(7) 試験サンプルの準備

試験サンプルのポリ-L-乳酸繊維は、容量 110ml の密閉可能な容器にて期間毎に種類毎のサンプルをまとめて浸漬させた。各容器のリン酸緩衝液の量は 100ml。全ての容器で、試験サンプルを完全に浸漬させた。試験サンプルのステントは、容量 50ml の密閉可能な容器を用い、サンプル瓶には 1 本ずつステントを入れた。各サンプル瓶のリン酸緩衝液の量は 40ml。全ての容器で、試験サンプルを完全に浸漬させた。

各サンプルを浸漬させた容器には各々番号を付し、管理することとした。

(8) 試験サンプルの環境

全ての試験サンプルはオイルバス / OB-200S AM(ASONE 製)にて、試験期間を通して $37 \pm 1^\circ\text{C}$ に保持し、侵食溶液が激しく動くことがないよう安定させた(写真 2.3-1)。

予め、オイルバスの装置設定温度が 37°C の時、各サンプル容器内のリン酸緩衝液の温度が 37°C で安定することを予備実験により確認した。

リン酸緩衝液の pH 値は 7.4 ± 0.2 とし、この値は試験期間を通して維持できるよう、試験期間毎に少なくとも 2 つの異なる容器の pH を pH 試験紙を用いて確認することとした。また、侵食溶液の混濁等の異常について、適宜目視確認を行うこととした。

初期サンプルは、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ の蒸留水中で 60 ± 15 分間保持した後に、試験サンプルが濡れた状態で力学的試験(引張試験、ラディアルフォース試験)を行うこととした。 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ の温度管理は、ウォーターバス(ASONE 製)(写真 2.3-2)にて行った。

3 ヶ月及び 6 ヶ月の分解期間を経た試験サンプルは、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ の蒸留水中に保持することなく、サンプル瓶から取り出して直ぐの試験サンプルが濡れた状態で力学的試験(引張試験、ラディアルフォース試験)を行うこととした。



写真 2.3-1 オイルバス及び、浸漬の様子



写真 2.3-2 37°C蒸留水浸漬の様子

(9) 試験方法

① 引張試験

引張試験では、試験サンプルであるポリ-L-乳酸繊維の外径をマイクロメータにて 3 ヶ所計測して平均値を算出後、ポリ-L-乳酸繊維の両端を 20mm の間隔で引張圧縮試験機オートグラフ / AG-X 100kN (島津製作所製) (写真 2.3-3)に取り付けて、20mm/min の速度で引っ張り、試験サンプルが破断に至るまでの最大荷重を測定した。引張試験の様子は写真 2.3-4 を参照。



写真 2.3-3 オートグラフ



写真 2.3-4 引張試験の様子

② GPC 試験

物理化学試験では、GPC 法を用いてステントの数平均分子量(Mn)と重量平均分子量(Mw)の測定を行い、分解期間の経過に伴う分子量の変化を求めた。溶媒にはクロロホルムを用いた。

③ ラディアルフォースの測定方法

ラディアルフォースの測定では、ステントの外周上から 20mm/min の速度で垂直に荷重をかけて圧縮し、0.2N の負荷を加えた時の垂直方向の変位を計測した(写真 2.3-5)。圧縮負荷をかける前に、工具顕微鏡 MM-60/L3T(ニコン製) (写真 2.3-6)にて試験サンプルの初期径測定を測定した。これにより、本ステントの外径の変形率を求め、圧縮に対する抵抗力を評価した。試験には引張圧縮試験機オートグラフ(写真 2.3-3)を使用した。この試験では、最大 10N のロードセルを用いることとした。また、圧縮には、直径 10mm の治具を用いた。

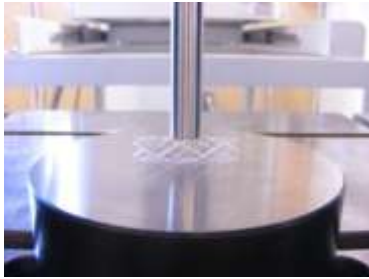


写真 2.3-5 ラディアルフォース試験の様子



写真 2.3-6 工具顕微鏡

④ 表面観察

表面観察はステントに対して行う。観察には走査電子顕微鏡 JSM-5900LV/JED-2200 (JEOL 製) (写真 2.3-7)を用い、試験サンプルには 50 Å の厚さの金蒸着を施した(写真 2.3-8)。



写真 2.3-7 SEM 走査電子顕微鏡



写真 2.3-8 金蒸着させたステント

(10) 試験結果

全試験期間を通して、温度及び pH 値に逸脱は見られず、すべての試験は適切に行われた。

① 引張試験

サンプル A、B 及び D で、分解時間の経過とともに、引張強度は低下した。サンプル A は初期段階の強度が最も大きかったが、分解期間中で最も大幅に強度が低下し、浸漬 6 ヶ月後には、初期段階より半減していた。サンプル B 及び D は強度の低下の傾向は同等であり、浸漬 6 ヶ月後には、初期段階より約 33%低下した。初期強度及び浸漬 3 ヶ月後の強度が最も低かったサンプル C は初期から浸漬 3 ヶ月後にかけて引張強度の低下は見られなかったものの、浸漬 6 ヶ月後には分解の進行によって繊維が断裂したため、引張試験器に取り付けることが出来ず、測定が不可能であった。試験結果を下記に示す(表 2.3-4、図 2.3-1)。

2.3-4 引張試験結果

| サンプル | 最大荷重(N) | | |
|------|---------|------------|------------|
| | 初期 | 3 ヶ月 浸漬 | 6 ヶ月 浸漬 |
| A | 11.05 | 6.79 | 5.81 |
| B | 6.61 | 5.06 | 4.38 |
| C | 3.02 | 3.22 | — |
| D | 9.42 | 6.80 | 6.08 |

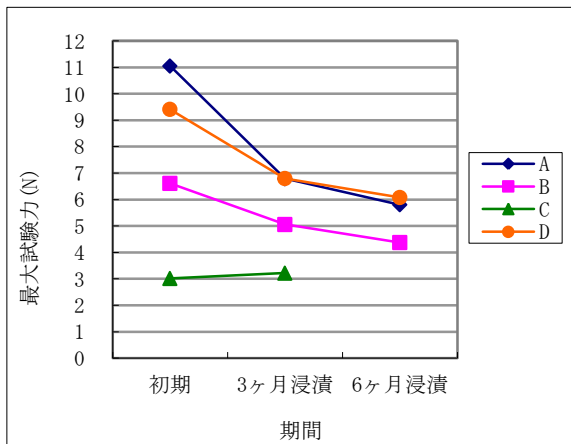


図 2.3-1 引張試験結果

② GPC 試験

初期段階の PLLA(ポリ L-乳酸)重量平均分子量(Mw)は、約 13 万の値でほぼ同等であったが、分解期間に伴い、サンプル間で差異が見られた。分解性に関する因子として、分子量低下の「時期」と「程度」に着目した時、ステント B は分解期間前半(浸漬期間前半の 3 ヶ月間)の分子量の低下が緩徐であり、ステント D は、浸漬期間後半(3 ヶ月～6 ヶ月)で分子量の低下が最も小さかった。試験結果を下記に示す(表 2.3-5、図 2.3-2)。

表 2.3-5 GPC 試験結果

| サンプル | 重量平均分子量(Mw) | | |
|--------|-------------|-----------|-----------|
| | 初期 | 3ヶ月 浸漬 | 6ヶ月 浸漬 |
| ステント A | 128000 | 105000 | 94000 |
| ステント B | 131000 | 124000 | 89000 |
| ステント C | 131000 | 115000 | 97000 |
| ステント D | 129000 | 112000 | 105000 |

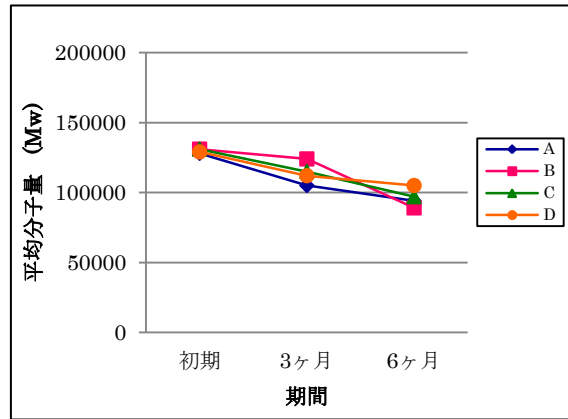


図 2.3-2 GPC 試験結果

③ ラディアルフォース試験

全サンプルにおいて、分解時間の経過に伴うラディアルフォースの変化はほとんどなかった。(表 2.3-6、図 2.3-3)。

表 2.3-6 ラディアルフォース試験結果

| サンプル | 変形率(%) | | |
|--------|--------|-----------|-----------|
| | 初期 | 3ヶ月 浸漬 | 6ヶ月 浸漬 |
| ステント A | 4.19 | 4.29 | 3.96 |
| ステント B | 4.58 | 4.22 | 4.12 |
| ステント C | 6.00 | 5.25 | 4.78 |
| ステント D | 4.29 | 3.90 | 3.69 |

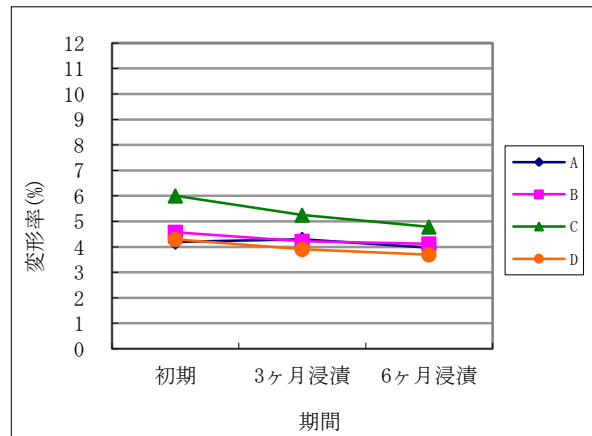


図 2.3-3 ラディアルフォース試験結果④ 表面観察

全サンプルにおいて経時変化によって表面状態が変化したサンプルは見られなかった。また、各期間において、サンプルによる表面状態の差異は確認されなかった(写真 2.3-9~2.3-12))。

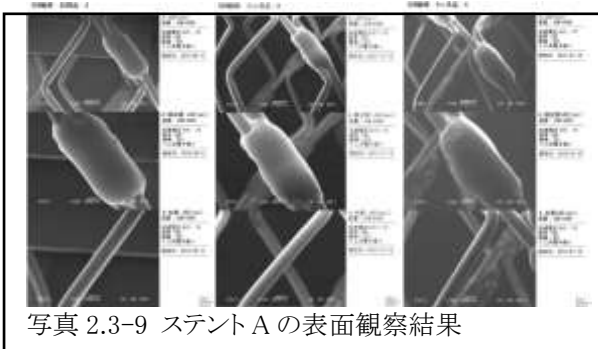


写真 2.3-9 ステント A の表面観察結果

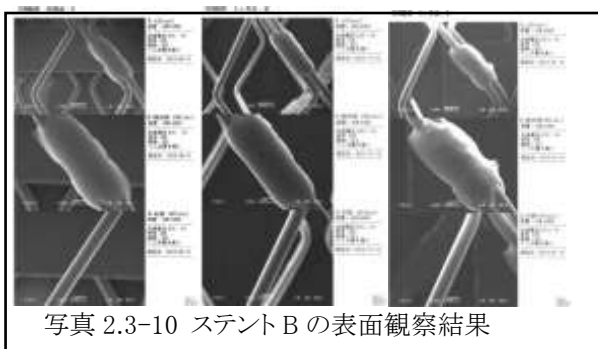


写真 2.3-10 ステント B の表面観察結果

(左:初期 中央:浸漬 3ヶ月 右:浸漬 6ヶ月)

(左:初期 中央:浸漬 3ヶ月 右:浸漬 6ヶ月)

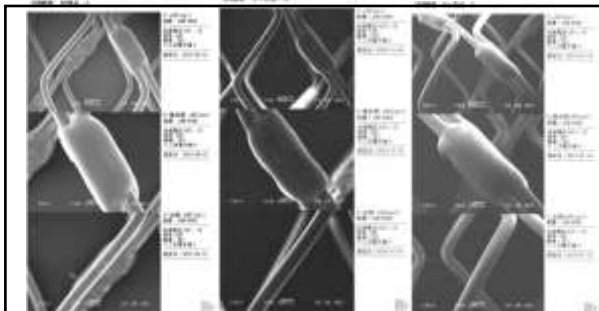


写真 2.3-11 スtent C の表面観察結果
(左:初期 中央:浸漬3ヶ月 右:浸漬6ヶ月)

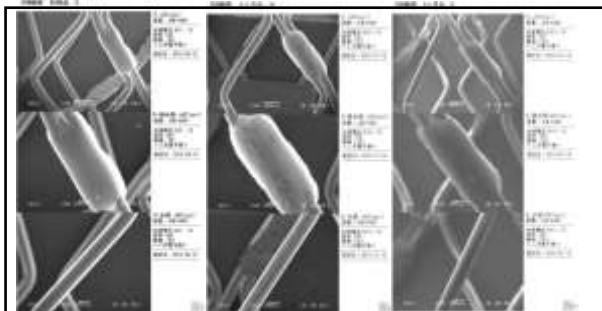


写真 2.3-12 スtent D の表面観察結果
(左:初期 中央:浸漬3ヶ月 右:浸漬6ヶ月)

(11) まとめ

4種類の延伸条件にて作製されたポリL-乳酸繊維及びそれらのポリL-乳酸繊維を用いて成形したステントを37°Cのリン酸緩衝液中に浸漬した後、引張試験、GPC試験、ラディアルフォース試験、表面観察(SEM)の各試験を行った。

引張試験では、全サンプルにおいて6ヶ月間の浸漬により強度は低下した。サンプルB及びDにおける引張強度の低下の傾向は同等であり、浸漬6ヶ月後の引張強度は、初期段階と比較して約33%低下した。サンプルAの初期段階の引張強度は最も高かったが、分解時間の経過に伴って強度は大幅に低下し、浸漬6ヶ月後の引張強度は初期段階より半減していた。サンプルCは初期段階及び浸漬3ヶ月後の引張強度が他のサンプルと比して最も低く、浸漬6ヶ月後には測定が不可能であった。

初期段階のPLLA(ポリL-乳酸)平均分子量は各サンプル共に約13万であり、サンプル間の差異はほとんどなかった。分解に伴う平均分子量の評価の結果、各サンプルの分解挙動に違いがあることが見出された。ステントA及びCにおいて、分解時間の経過による分子量の低下の傾向は類似していたが、他サンプルと比較して、ステントBは初期段階から浸漬3ヶ月後までの分子量の低下が最も緩徐であり、ステントDは、浸漬3ヶ月後から浸漬6ヶ月後にかけての分子量の低下が最も緩徐であった。

ラディアルフォース試験において、全サンプルで、分解時間の経過によるラディアルフォースの低下は少なかった。

SEM画像による表面観察からは、全サンプルで分解時間の経過による変化は確認されず、サンプル間の差異も見られなかった。

今回の試験では、最も高い結晶化度のポリL-乳酸繊維(サンプルD、結晶化度66.7%)にて作製されたステントDは初期段階と比して浸漬6ヶ月後の分子量低下が18.60%であったのに対し、他のステントサンプルは初期段階から浸漬6ヶ月後に25%以上分子量が低下していた。

以上より、結晶化度高値のもので分解性が安定することが分かった。

2-4 生体吸収性末梢血管用ステントの臨床使用評価

2-4-1. PMDA 対面助言

生体吸収性末梢血管用ステントの薬事承認を取得するために、臨床使用評価のデータと非臨床試験のデータを揃える必要がある。2012年1月に行ったPMDA(独立行政法人医薬品医療機器総合機構)の2回の対面助言(医療機器治験相談及び医療機器性能試験相談)を通じ、不十分であると助言を受けた非臨床試験のデータについて、さらにデータの収集を行い生体吸収性末梢血管用ステントの安全性、妥当性について確認を行った。

またこれらの追加された非臨床試験のデータは、生体吸収性末梢血管用ステントの安全性・妥当性を担保するデータとして収集され、治験実施計画書や治験機器概要書に随時反映された。臨床使用評価である「治験」の準備を行いつつ、非臨床試験のデータを収集し、事業計画を推し進めた。

2-4-2. 非臨床試験による生体吸収性末梢血管用ステントの安全性・妥当性について

2012年1月に行ったPMDAの2回の対面助言を受け、以下(1)～(2)の点についてデータが不十分であり、承認申請を行うためにデータの追加や検証が必要であるとの助言を受けた。加えて整理すべき点として(3)の

助言を頂いた。

- (1) PLLA ステントの性能についてのデータ(安全性、操作性、耐久度、有効性、金属ステントとの比較等)。
- (2) PLLA ステントが生体内で分解する際のデータ(ステントストラットの変化、分解物が生体に与える変化等)
- (3) 本品の臨床的意義について整理しておく必要がある。また、これまでの臨床成績を解析し、有効性を説明すること。

データの追加が必要であるとの助言を受け、以下に示す非臨床試験により必要なデータを収集し、以後3回のPMDAとの面談(事前面談)にて追加データ等を差し示した。

第3章 全体総括

生体吸収性抹消血管用ステントの結晶化度の最適化(分解性)は再委託先である、京都工芸繊維大学にて実施した。

熔融紡糸したポリ L-乳酸繊維の延伸および熱処理に伴う高次構造、力学的性質、および分解挙動の変化について検討した結果、①使用したポリ L-乳酸繊維は 80℃で 6 倍延伸することにより、最も優れた力学的性質が達成される。②熱処理に伴い、弾性率は増大するが、強度と破壊伸びは低下する。③熱処理に伴う結晶化により分解速度は低下、熱処理温度、熱処理時間とともに分解に対する耐性はより顕著となる。④分解の進行とともに、弾性率をある程度保持したまま、強度、破壊伸びが低下する傾向がある。体内に留置されたステントには、引張りの大変形を受けることは少なく、血管の拍動や曲げに対する変形が多いものと予想され、このような変形に対しては長期間弾性的に追従および回復を示すものと期待できる。

以上のことから、結晶化度を制御することにより、分解速度を変化させることが可能であり、熱処理条件を適当に選ぶことにより、最適な初期の力学的性質、結晶化度、及び分解速度を決定することが出来る。

高強度化を達成した延伸条件及び、その繊維の結晶化度が生体吸収性ステントに適していることを検証するため、外注先であるエイキット株式会社にて、4 種類のポリ L-乳酸繊維とそれらを用いて成形した改良ステントに対して in vitro での 6 ヶ月間にわたる実時間の分解性試験を行い、引張試験、GPC 試験、ラディアルフォース試験、表面観察(SEM)を実施して分解挙動の評価を行った。引張試験では、全サンプルにおいて6ヶ月間の浸漬により強度は低下した。ラディアルフォース試験において、全サンプルで、分解時間の経過によるラディアルフォースの低下は少なかった。SEM 画像による表面観察からは、全サンプルで分解時間の経過による変化は確認されず、サンプル間の差異も見られなかった。

今回の試験では、最も高い結晶化度のポリ-L-乳酸繊維(サンプルD、結晶化度66.7%)にて作製されたステントDは初期段階と比して浸漬6ヶ月後の分子量低下が18.60%であったのに対し、他のステントサンプルは初期段階から浸漬6ヶ月後に25%以上分子量が低下していた。以上より、結晶化度高値のもので分解性が安定することが判明した。

生体吸収性末梢血管用ステントの臨床使用評価については、PMDAからの指摘事項に対する対応、及び治験施設での倫理委員会の開催が遅れ、治験開始が遅れてしまったが、治験施設7施にて治験が可能となった。現在までに治験6症例が施行された。生体吸収性末梢血管用ステントの経過観察は、臨床使用に伴い、経過観察を開始することができた。