

平成27年度ものづくり中小企業・小規模事業者等連携事業創造促進事業  
(戦略的基盤技術高度化支援事業)

「感染を防止し、骨再生を促進する革新的インプラントの開発」

## 成 果 報 告 書

平成28年3月

委託者 中国経済産業局  
委託先 公益財団法人岡山県産業振興財団

## 目 次

### 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
1－2 研究体制·····	5
1－3 成果概要·····	8
1－4 当該研究開発の連絡窓口·····	9

### 第2章 本論

2－1 インプラント周囲の骨の再生促進への対応·····	10
2－1－1 アパタイトコート技術の開発·····	10
2－1－2 アパタイトコートによる骨再生機能の実現·····	16
2－1－3 アパタイトコートの安全性検討·····	16
2－1－4 品質安定性検討·····	39
2－2 インプラントの感染防止への対応·····	39
2－2－1 C P C コート技術の開発·····	39
2－2－2 C P C コートによる感染防止機能の実現·····	40
2－2－3 C P C コートの安全性確保·····	43
2－2－4 品質安定性検討·····	43
最終章 全体総括·····	47

## 第1章 研究開発の概要

①インプラント周囲の骨造成の遅延・不全と②術後に起こる感染は、インプラント喪失の最大の原因である。そこで本事業では、岡山大学が開発した多糖誘導体リン酸化プルランを基材として、①骨の成分である炭酸アパタイトをコートすることにより骨再生を促進する人工歯根・人工関節と②抗菌物質 CPC をコートすることにより感染防御機能を付与した人工歯根を製品化するための塗装技術の開発を行うものである。

### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

#### 【研究背景】

人工歯根や人工関節などインプラントを喪失する最大の原因是術後に起こる感染であるが、感染防御機能を有した製品はない。また、インプラント周囲の骨再生遅延・不全も治療の成否に大きく影響するが、製品に使用されてきたプラズマ溶射法やフレーム溶射法によるアパタイトコートは骨再生を促進するものの、吸収されないため、剥離すれば感染の原因にもなる。特に高温で処理するプラズマ溶射では、アパタイト層が人工歯根から剥離し、感染の原因となって撤去に至った症例が多く、そのため現在ではアパタイトコートのない製品が主流となったという歴史的経緯もある。

#### 【研究目的】

人工歯根や人工関節等のインプラントを喪失する最大の原因是感染であり、また、骨再生の遅延も機能不全に大きく影響する要因である。本事業では川下企業である株式会社ジーシー・ナカシマメディカル(株)からのインプラント高機能化の要望に応えるため、①骨の再生促進と②感染防止を目指し、リン酸化プルランを基材として骨の成分である炭酸アパタイトや抗菌物質 CPC (塩化セチルピリジニウム) をコートする塗装技術を確立する。

#### ①アパタイトコート人工歯根・人工関節

骨密度が低い上顎や骨粗鬆症の患者に対する人工歯根（口腔インプラント）の機能向上のため、骨接触部位にプラズマ溶射法やフレーム溶射法でアパタイトをコートした製品が臨床で用いられてきた。しかし、これら溶射により形成されたアパタイト層は生体内で吸収されないため、剥離、それに続く感染というリスクが付きまとう。本事業で開発する技術は、リン酸化プルランを結合材として生体吸収性の炭酸アパタイトの微粒子をインプラントに塗装するもので、生体内で吸収され速やかに骨に置換するため治癒期間の短縮にもつながる画期的な方法である。将来的には、人工股関節の大軸骨埋入部位へと事業展開を実現するものである。

#### ②CPC コート人工歯根

人工歯根の感染で起こるインプラント周囲炎は人工歯根を喪失する最大の原因であり、歯科医学会でも、その率の高さが問題視されているが、現在の治療法では骨の回復は極めて困難である。しかし、市販の人工歯根には原因となる口腔細菌の付着を抑える機能はない。本研究開発では、国内最大の総合歯科メーカーである株式会社ジーシーの要望を受けて、同社の人工歯根の歯肉接触部位に CPC を塗装することにより、インプラント周囲炎を予防する革新的な人工歯根開発を実現するものである。

【研究目標】

<目標値>本研究開発期間で得られる最終目標は次のとおりとする。

開発テーマ	目標値
【1】インプラント周囲の骨の再生促進への対応	<p>研究計画の最終目標は炭酸アパタイトをインプラント周囲に塗装する技術を開発することであり、手術中に剥がれず、かつ、生体内で早期に吸収・置換される最適な塗膜の接着強さと硬度を見出すことを目標とする。本事業では膜厚、アパタイトの混合率と接着性、硬度の関係を明らかにし、最適なコート層の条件を決定する。</p> <p>実施事項は以下の2項目とした。</p> <p>①浸漬塗装、エアスプレー、エアレススプレーの中で、どの塗装法を用いるかを決定する。</p> <p>平成25年度は、上記の塗装方法を試行した結果、エアスプレー方式に決定した。塗装条件については塗装面のチタン表面の清浄度が大きく影響することがわかった。</p> <p>平成26年度は、プラズマ処理装置で清浄したチタン表面でコーティングを実施し、条件決定を行った。</p> <p><u>平成27年度目標</u></p> <p>昨年度の条件で試作した製品の、動物実験による評価およびプロセスにおける非発熱性の担保等を基に改善を図り、最終的な製品向けの規格を策定する。</p> <p>②手術中に剥がれず、かつ、生体内で早期に吸収・置換される最適な塗装条件を見出すため、膜厚、アパタイトの混合率と接着性、硬度の関係を明らかにし、塗装条件を決定する。</p> <p>平成25年度は、塗装条件の決定をするためのデータ収集を行った。</p> <p>平成26年度は、動物実験を行う予定であったが、出来ておらず、次年度に繰り越すことになった。その代わり、試作品の作製を実施した。</p> <p><u>平成27年度目標</u></p> <p>試作したインプラントについて、動物実験を通して最適なコーティング規格を決定する。また、新しい規格のリン酸化フルランに対応したコーティングを進めること。</p>
【1-1】アパタイトコート技術の開発	<p>細胞実験、動物実験等の非臨床試験を通して、インプラント表面に作製したアパタイト層によるインプラント周囲骨の再生促進効果を評価し、骨再生機能を持つインプラントを開発することを最終目標とする。</p> <p>平成25年度は、細胞実験や動物実験の予備検討を行い、有効性をどのように評価するかの評価法を決定した。</p> <p>平成26年度は、決定した評価法に基づき、最適なコーティング組成条件を決定した。</p> <p><u>平成27年度目標</u></p> <p>決定した評価法に基づき、試作したインプラントについて犬の口腔内において動物実験を実施し、骨再生を確認する。</p>
【1-2】アパタイトコートによる骨再生機能の実現	

【1-3】アパタイトコートの安全性検討	<p>細胞実験、動物実験等を通して、アパタイトコート・インプラント生体安全性を評価する。さらに医療機器として工業的に製造する上で重要なリスクファクター、「無菌性」および「非発熱性」をどのように担保するのかを検討する。具体的な目標は1-3-1および1-3-2のとおりである。</p> <p>平成25年度は、予備検討として、同位体標識リン酸化プルランを合成した。</p> <p>平成26年度は、同位体標識したリン酸化プルランによる体内動態検討を行い、判断指標、とし安全性を検証した。</p> <p><u>平成27年度目標</u></p> <p>体内での使用を目的として、安全性の検討を進め、商品化のための薬事相談を行い、製品化への準備を行った。</p>
【1-3-1】無菌性	<p>最終目標は無菌性保証水準 (Sterility Assurance level : SAL) 10の-6乗以下を担保することである。</p> <p>平成26年度までは、滅菌方法の検討を行い、滅菌方法をガンマ線滅菌として決定した。</p> <p><u>平成27年度目標</u></p> <p>ガンマ線滅菌製品の保管の安定性等を検証し、問題ないことを確認する。</p>
【1-3-2】非発熱性	<p>最終目標はエンドトキシン規格値として、コート層内の総量が300EU（エンドトキシンユニット）以下となるように除去法を検討することである。</p> <p>平成26年度までは、製造したコーティングするリン酸化プルランとアパタイトのエンドトキシン総量が300EU以下となることを確認した。</p> <p><u>平成27年度目標</u></p> <p>非発熱性を製造プロセスとの関連から検証し、体内埋め込み機器としての製造プロセスを決定する。</p>
【1-4】品質安定性検討	<p>体内埋め込み用医療機器として具備すべき2年間の保証期間を担保することである。</p> <p>平成26年度までは、促進試験を行い安定性の評価を行った。</p> <p><u>平成27年度目標</u></p> <p>試作品を作製し室温保管および冷蔵保管を進める。</p>
【2】インプラントの感染防止への対応	
【2-1】CPCコート技術の開発	<p>最終目標としてはCPCをインプラントの歯肉接触部位（口腔内に露出した部位で、骨には接合しない部位）に塗装する技術を開発する。歯ブラシによる摩耗があるため剪断接着強さ1MPa以上を目標とする。</p> <p>実施事項は以下の3項目とする。</p> <p>①浸漬塗装、エアスプレー、エアレススプレーの中で、どの塗装法を用いるかを決定する。</p> <p>平成25年度は、エアスプレー法による塗布に決した。</p> <p>平成26年度は、エアスプレー法を用いて試作モデル品の製作を行った。</p>

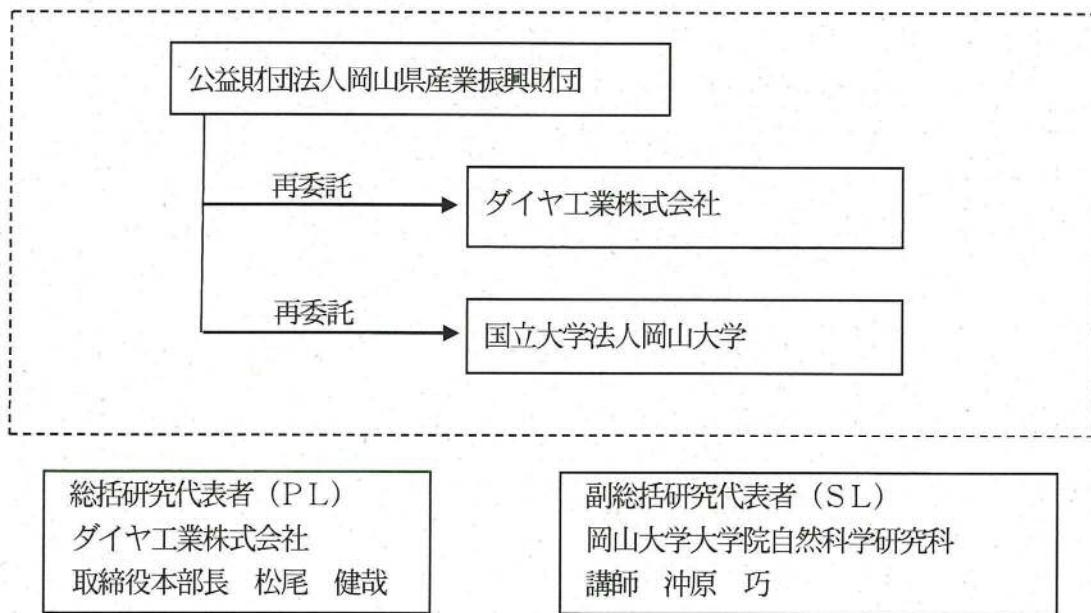
	<p><u>平成27年度目標</u> 試作品を作製し、動物実験を実施する。また、浸漬塗装でコーティングできる手法を確立する。 ②CPCをインプラントの歯肉接触部位（口腔内に露出した部位で、骨には接合しない部位）に塗装する技術を開発する。</p> <p>平成26年度までは、マスキングが可能な塗装用治具を製作した。</p> <p><u>平成27年度目標</u> 試作品の成果を基に改良する。製造プロセスの規格化を進めていく。</p> <p>③歯ブラシによる摩耗を考慮して、塗膜の剪断接着強さ1MPa以上を目指す。</p> <p>平成25年度は、付着強さの評価を行った。</p> <p>平成26年度は、試作モデルについて接着強さを確認した。</p> <p><u>平成27年度目標</u> 試作したインプラントを動物実験に使用しその結果をフィードバックしながら製品規格の最適化を行う。</p>
【2-2】 CPCコートによる感染防止機能の実現	<p>細菌実験、動物実験等の非臨床試験を通して、インプラント表面に作製したCPCコート層によるインプラント周囲炎防止機能を保持させることを最終目標とする。</p> <p>平成25年度は、細菌実験の予備検討を行い、コーティング方法の検討とその評価方法の検討を行った。</p> <p>平成26年度は、試作モデル品について、その効果を評価した。</p> <p><u>平成27年度目標</u> 試作モデル品について、培養実験および動物実験を行い、その効果を評価する。</p>
【2-3】 CPCコートの安全性確保	<p>抗菌物質CPCは安全性の観点から使用できる濃度が定められているため、CPCの徐放速度を分析し、基準値以下に抑えた上で抗菌効果を発現するように塗装法を工夫する。さらに、細胞実験、動物実験等を通して、CPCコート・インプラントの生体安全性が確保されていることを確認することを目標とする。</p> <p>平成26年度までは、抗菌効果の動物実験、細胞実験での評価を行いながら、安全性の検討を行った。</p> <p><u>平成27年度目標</u> 試作したインプラントについて、動物実験を通して安全性を検証する。</p>
【2-3-1】 無菌性	<p>CPCコート・インプラントの生体安全性が確保されていることを確認することを最終目標とする。</p> <p>平成26年度までは、製品の滅菌方法の検討を行いガンマ線滅菌を採用した。</p> <p><u>平成27年度目標</u> 試作した製品について、ガンマ線滅菌を行ったものを保管し、無菌性について追跡調査する。</p>

<p><b>【2-3-2】非発熱性</b></p>	<p>「非発熱性」については、CPCコートは口腔内に露出した歯肉接触部位にのみ行い、骨と接合する部位には行わないため特に基準値を設ける必要はない。 平成26年度までは、試作した製品の持つエンドトキシン量について評価を行った。</p> <p><u>平成27年度目標</u> 引き続き試作品に関して、エンドトキシン量の測定を行い、非発熱性を確認する。</p>
<p><b>【2-4】品質安定性検討</b></p>	<p>医療機器として具備すべき<u>2年間</u>の保証期間を担保することを最終目標とする。 平成26年度までは、促進試験により、その安定性を検証した。</p> <p><u>平成27年度目標</u> 試作品を作製し、保存条件を検討した後に保存を開始する。</p>

## 1-2 研究体制

### (1) 研究組織及び管理体制

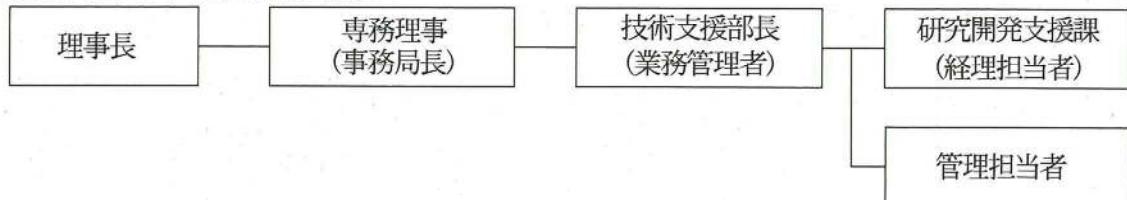
#### 1) 研究組織（全体）



#### 2) 管理体制

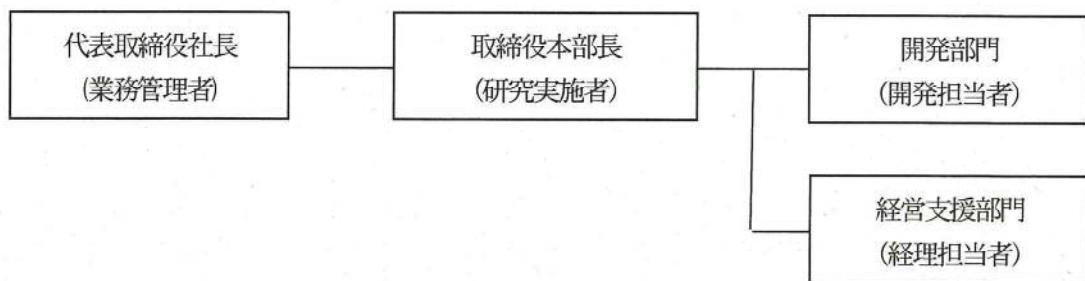
##### ①事業管理機関

公益財団法人岡山県産業振興財団

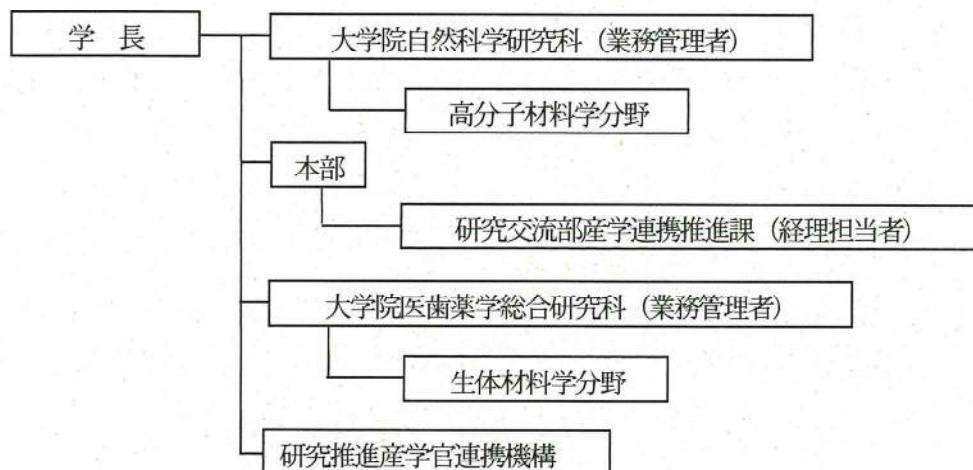


②(再委託先)

ダイヤ工業株式会社



国立大学法人岡山大学



(2) 管理員及び研究員

【事業管理機関】 管理員

公益財団法人岡山県産業振興財団

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
本位田 和昭	技術支援部 部長	【3】
横田 尚之	技術支援部 次長	【3】
小川 洋子	技術支援部 研究開発支援課 主幹	【3】
田渕 雅子	技術支援部 研究開発支援課 主事	【3】
末森 靖治	技術支援部 研究開発支援課 主事	【3】

【再委託先】※研究員のみ

ダイヤ工業株式会社

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
松尾 健哉	取締役本部長	【1】 【2】
丸山 由恵	研究員	【1】 【2】
石井 正雄	研究員	【1】 【2】
千代 淳美	研究員	【1】 【2】

国立大学法人岡山大学

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
沖原 巧	大学院自然科学研究科 講師	【1】 【2】
田中 雅人	大学院医歯薬学総合研究科 准教授	【1】 【2】

(3) 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

(事業管理機関)

公益財団法人岡山県産業振興財団

(経理担当者)	技術支援部 研究開発支援課 主幹 小川 洋子
(業務管理者)	技術支援部 部長 本位田 和昭

(再委託先)

ダイヤ工業株式会社

(経理担当者)	経営支援部門 北口 政浩
(業務管理者)	代表取締役 松尾 正男

国立大学法人岡山大学

大学院自然科学研究科

(経理担当者)	研究交流部産学連携推進課
	共同(受託)研究推進グループ 主査 柴田 裕巳
(業務管理者)	大学院自然科学研究科 教授 後藤 邦彰

大学院医歯薬学総合研究科

(業務管理者)	大学院医歯薬学総合研究科 教授 尾崎 敏文
---------	--------------------------

#### (4) 他からの指導・協力者

氏名	所属・役職	備考
坂井 裕大	株式会社ジーシー 研究所 研究員	推進委員会アドバイザー
重光 勇介	株式会社ジーシー 研究所 研究員	推進委員会アドバイザー
西村 直之	帝人ナカシマメディカル株式会社 製造部 生産技術品証グループ 課長	推進委員会アドバイザー
吉田 靖弘	国立大学法人北海道大学 大学院歯学研究科 教授	推進委員会アドバイザー

### 1-3 成果概要

#### 【1-1】アパタイトコート技術の開発

コーティング法について、吐出量、吐出ピッチ、基板温度等変化させて、最適な塗装条件を検討した。ホモジナイザーで処理したリン酸化プルランや、溶液型のリン酸化プルランについて、浸漬法の塗装方法を含めて、条件検討を行った。また、リン酸化プルランの新しい規格に対する塗装方法も検討した。

#### 【1-2】アパタイトコートによる骨再生機能の実現

骨再生能に関しては、インプラント製品へのコーティング試作品を製作し、製品の非臨床試験を想定し、動物（イヌ）に対しての実験で骨再生を検証した。

#### 【1-3】アパタイトコートの安全性検討

リン酸化プルランの安全性について、放射性同位元素である炭素14で標識したリン酸化プルランの動態検討のために、標識した炭素の取り込み具合を検討するために、同位体取り込み比等の検討を行った。

#### 【1-3-1】無菌性

滅菌方法としては、乾熱滅菌、ガンマ線滅菌、EOGガス滅菌の候補の中から、ガンマ線滅菌を選択した。ガンマ線滅菌の影響を分子量測定等により行い、実用上、問題ないことがわかった。

#### 【1-3-2】非発熱性

1製品あたりのリン酸化プルランによるエンドトキシン量は0.771EUとなり、目標値以下となったが今後、塗装プロセス全般からの汚染の可能性の検討を必要とする。

#### 【1-4】品質安定性検討

チタン板上にコーティングした試料について、保存検討を開始するとともに、その塗装溶液についても、その安定性を検討した。

#### 【2-1】CPCコート技術の開発

CPCコーティング法について、吐出量、吐出ピッチ、基板温度等変化させて、最適な塗装条件を検討した。

## 【2-2】CPCコートによる感染防止機能の実現

CPCコーティングしたチタン板について、シャーレ内に置いて、阻止円を作製する試験を行った。その結果、阻止円の発生を確認しCPCコーティングが有効に機能していることがわかった。

## 【2-3】CPCコートの安全性確保

【1-3】と同様に安全性試験を行い、その体内における安全性を検証した。

## 【2-4】

チタン板上にコーティングした試料について、保存検討を開始するとともに、その塗装溶液についても、その安定性を検討した。

## 1-4 当該研究開発の連絡窓口

管理法人：公益財団法人岡山県産業振興財団

〒701-1221 岡山県岡山市北区芳賀5301 テクノサポート岡山3F

連絡担当者名：技術支援部 次長 横田尚之

TEL：086-286-9651 FAX：086-286-9676

E-mail：nyokota@optic.or.jp

## 第2章 本論

### 2-1 インプラント周囲の骨の再生促進への対応

#### 【2-1-1】アパタイトコート技術の開発

##### (1) コーティング方法の選択

粘性が高いリン酸化ブルランーアパタイト混合物を体内埋め込み用医療機器に塗装するには、汚染のリスクなどから使用できる塗装法が限られる。本事業では、アパタイトコートに適応可能と思われる以下の3つの方法を中心に検討を進める。

##### ・浸漬塗装（最も簡便であるが、塗膜厚さの均一化が難しい）

浸漬法による塗装を行ったが膜が均一とならなかった。また、皮膜が基本的にやや厚くなる傾向があり、 $100\mu\text{m}$ くらいの厚さになってしまった。リン酸化ブルランは乾燥すると硬くなる。このように厚くなると、塗装した金属との間での膨張係数の違いから、乾燥した状態では、1日足らずで剥げてしまうことがわかった。そのため、リン酸化ブルランの塗布方法としては不適であることがわかった。

##### ・エアスプレー（均一な塗膜が得られるが、粘性の高い材料には不向きである）

後述するようにコーティング装置を用いた塗装において、リン酸化ブルラン溶液の粘性は特に問題とならなかった。しかし、アパタイト分散液によるコーティングではアパタイトがすぐに沈殿してしまうために、分散を維持する塗装条件の決定が必要である。来年度の計画としては

- ① 粉碎によるアパタイト粒子の微細化 遊星ボールミルによる粉碎時間を延長させることにより、微細化を図る。もしくは、ある程度微細化させた後、ホモジナイザーを用いてさらなる微細化を図る。

- ② 混合条件の検討 溶液状態の混合比率および、リン酸化ブルラン溶液の粘性の調節により最適な分散状態を実現する。

##### ・エアレススプレー（粘性の高い材料にも使用可能であるが、表面粗さが大きくなる）

本方法は、粘性の高い溶液に適用できる方法であるが、溶液の消費量が非常に多く、今回の使用には適していないことがわかった。また、溶液の濃度を上げることは均一な塗膜の形成に必ずしも有利でないことから、本開発においては、この方法を使用しないこととした。

以上のように、検討により、本開発においては、コーティング方法をエアスプレー方式とすることとした。

塗装に用いた装置は旭サナック製の rCoater である。

平板部への塗装は  $37^\circ\text{C}$  に保持した基盤上にスライドグラス上に固定したチタン円板もしくはチタン板に対して行った。

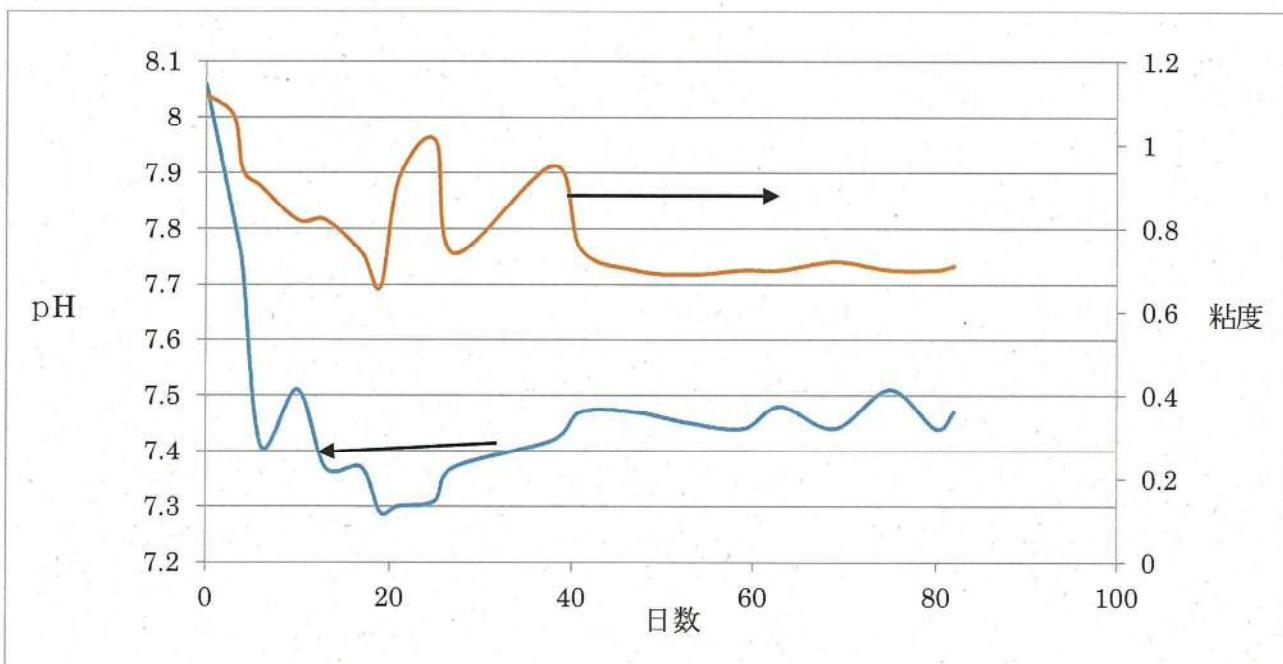
## (2) アパタイトコート技術の確立

本年度は、リン酸化プルランの新規格の溶液製品に対応すると共に、これまでより、より厚い塗膜の製造のために、溶液浸漬法も検討を加えた。

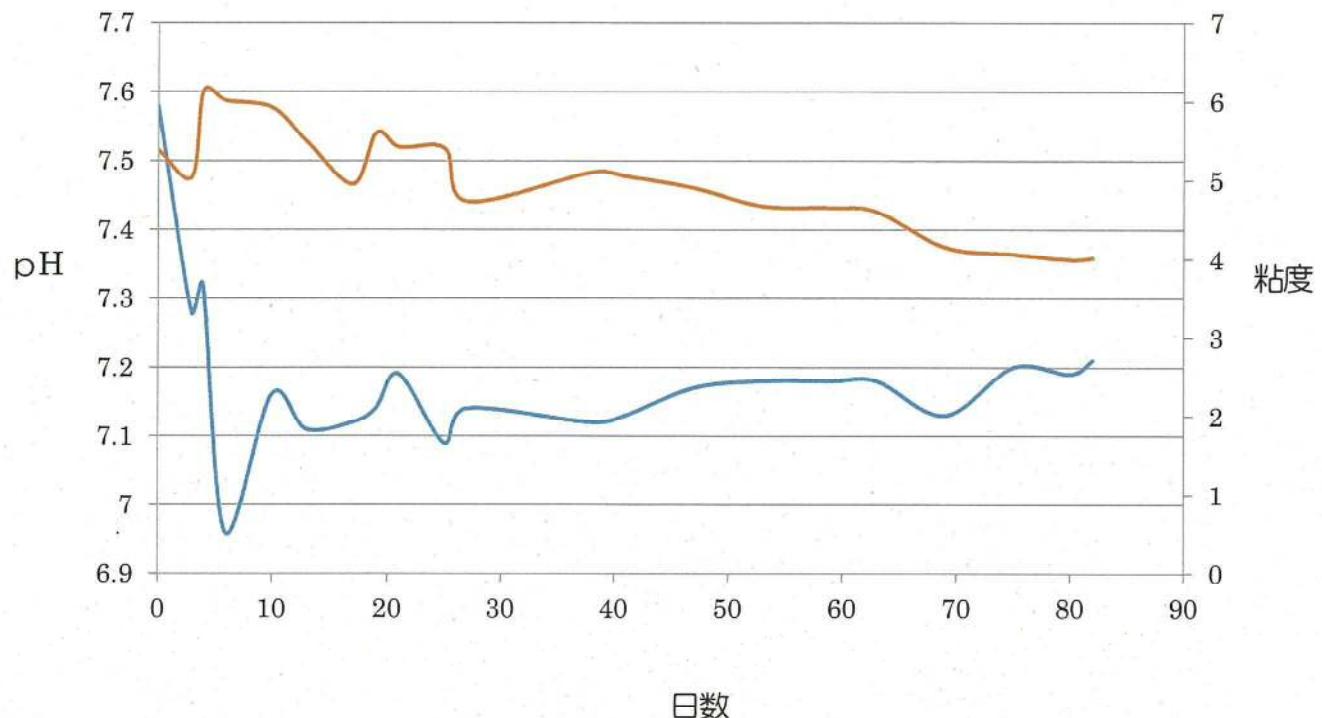
浸漬のために溶液の保存性の検証を行った。特に pH の変化は、リン酸化プルランの低分子量化につながるため、溶液の保存性を検証した。

### リン酸化プルラン溶液の pH の経過日数による変化

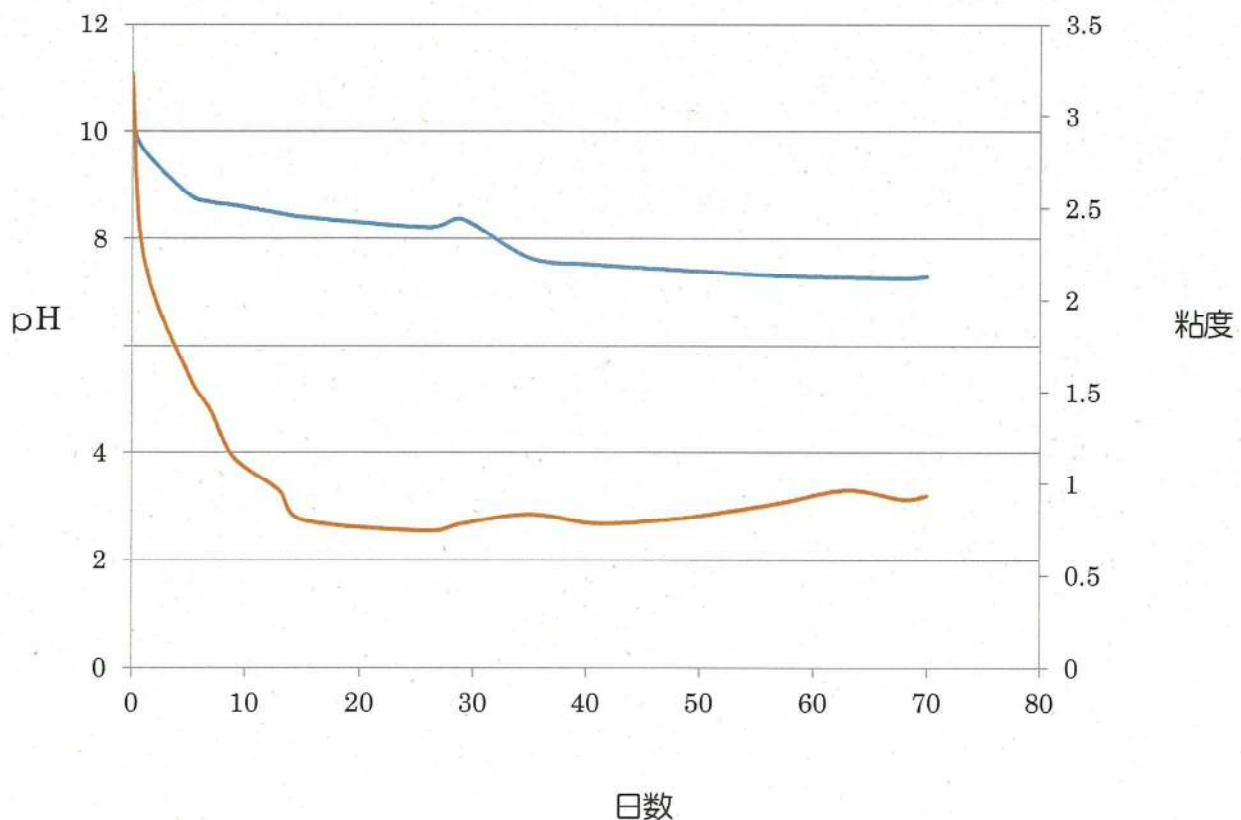
ロット番号 CJ0859011AA



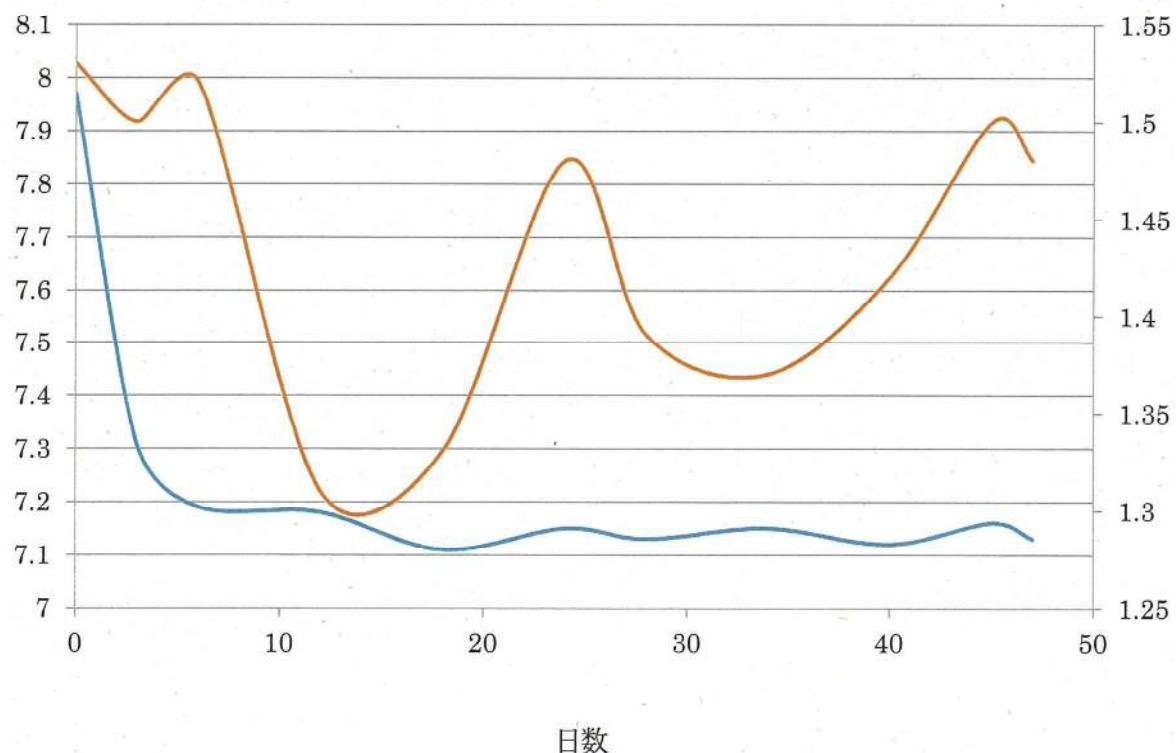
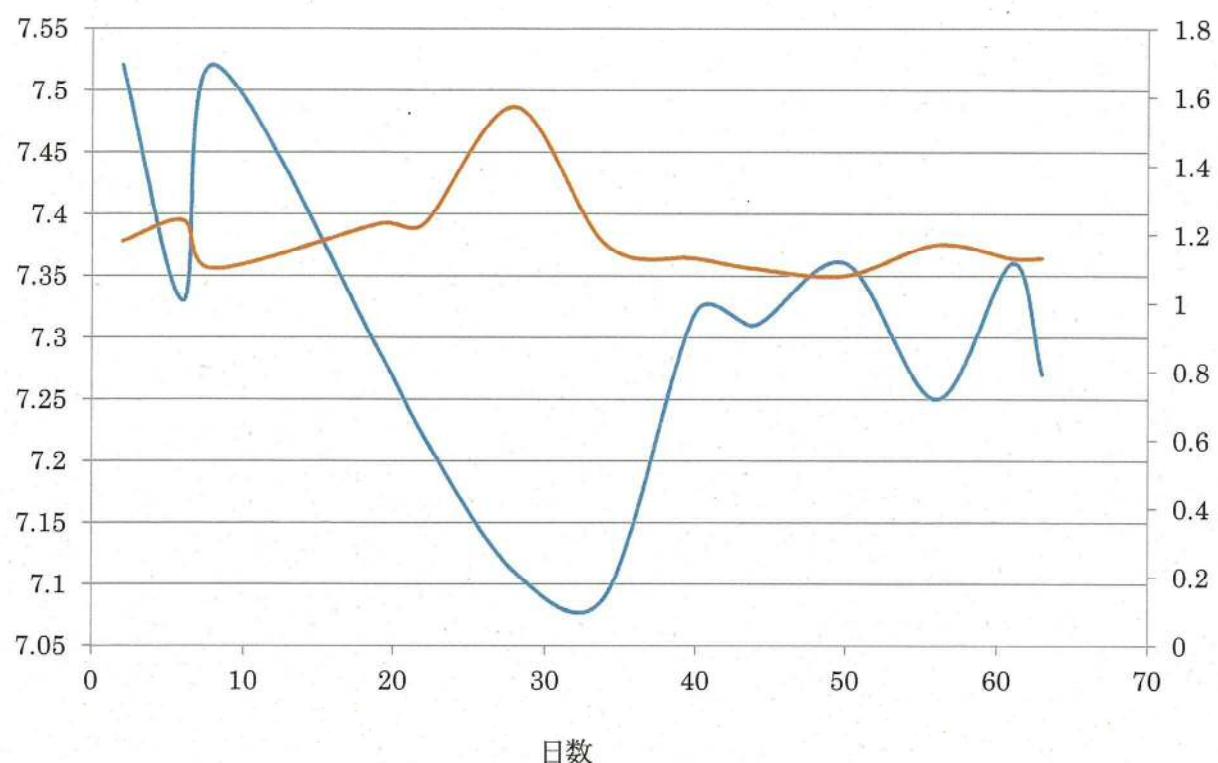
ロット番号 DA0859014AA



日数



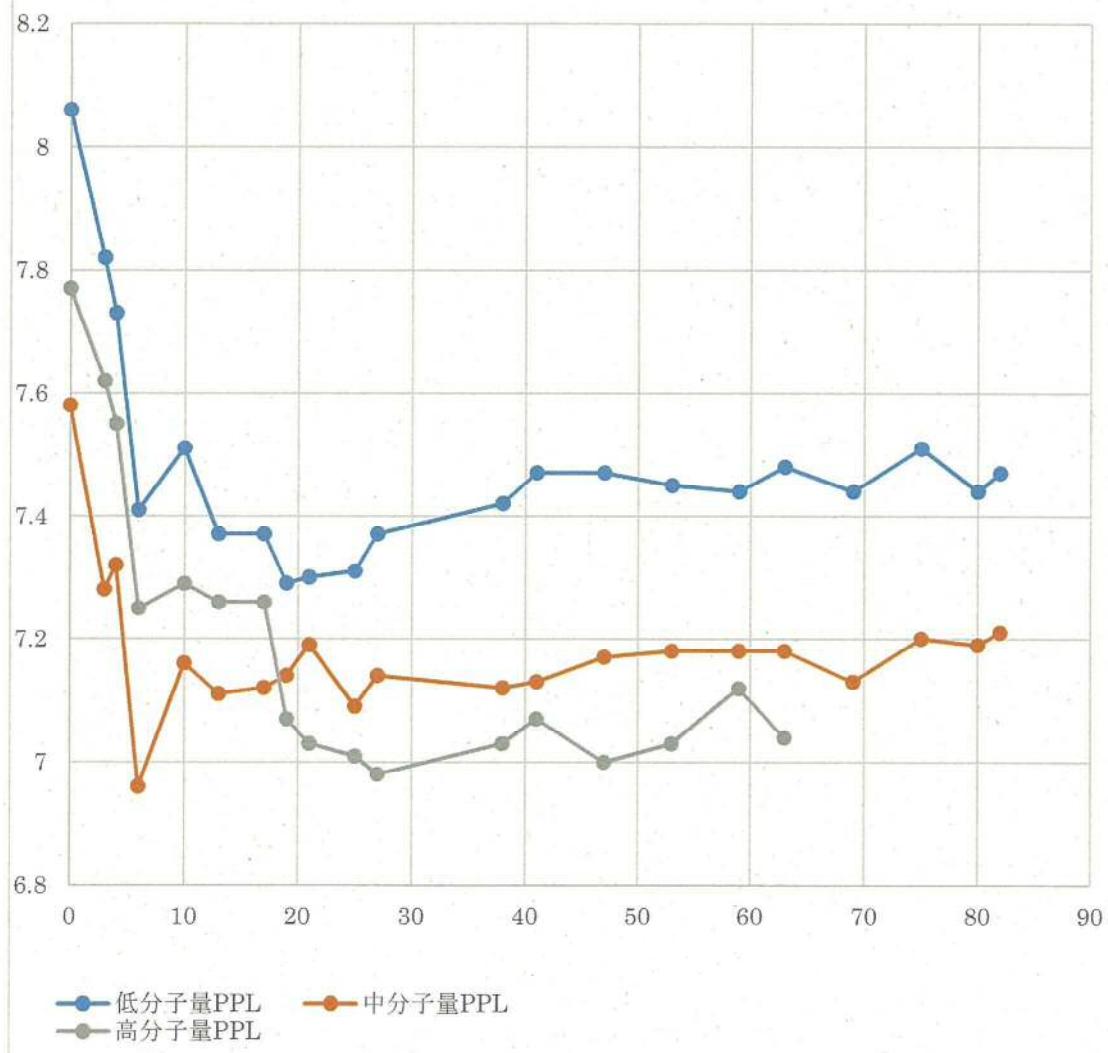
ロット番号 DK0723002AA (CPC 0.1%)



2つは同一ロットの試料であるが、その挙動に若干の違いが見られた。基本的には安定であり、長期の保管等に耐えられると考えられる。

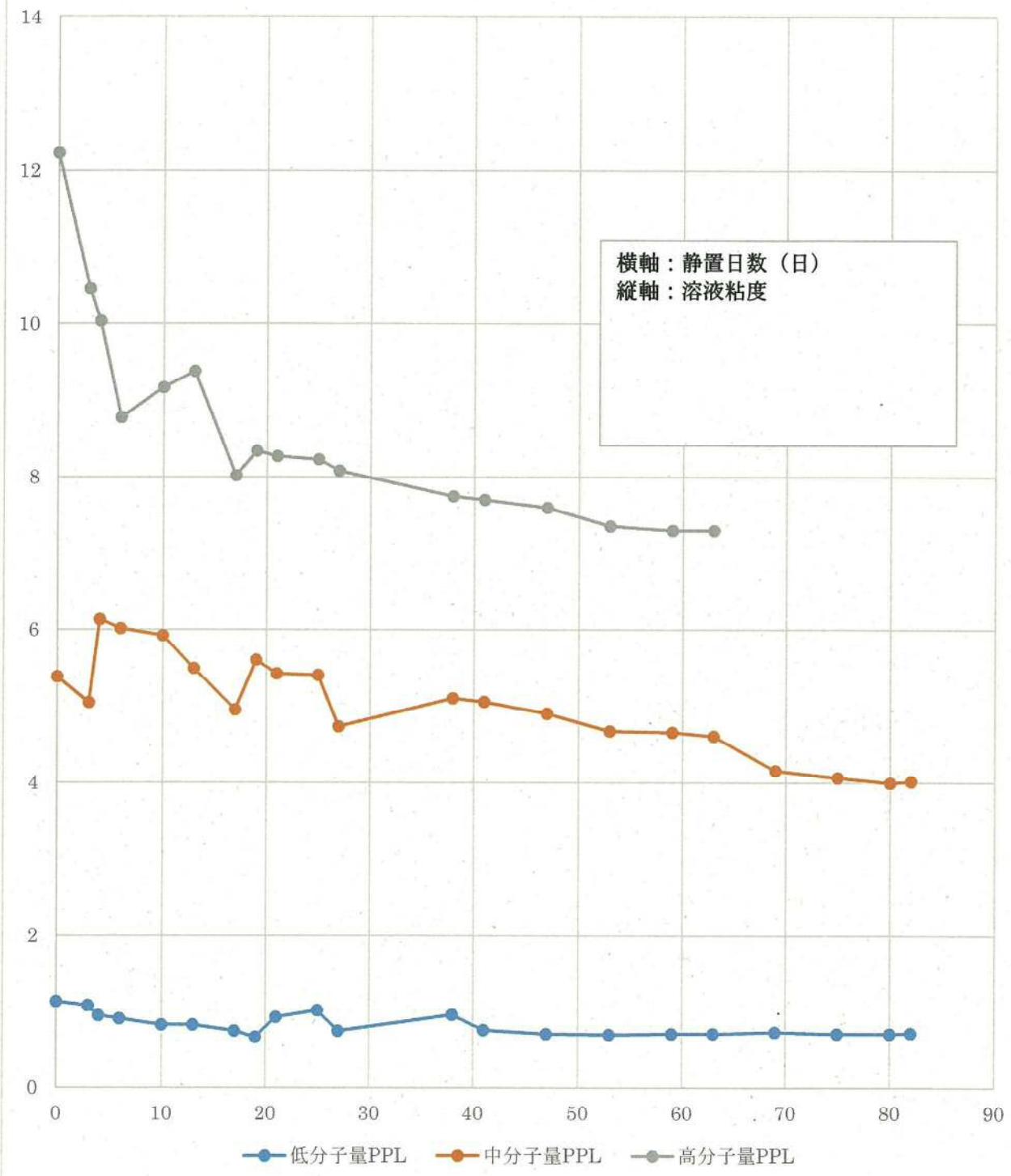
いずれの試料においても、リン酸化プルランの粘度は初期に少し減少するが、その後、安定するため、かなり長期にわたり保存可能であると考えられ、浸漬法にも対応可能であると考えられる。

分子量の異なるPPL水溶液pHの経時変化



溶液状態での新規格のリン酸化プルランにおいても安定性を評価した。いずれも10日間くらいはpHの低下を示すが、その後は安定に推移することがわかった。

### 分子量の異なるPPL水溶液粘度の経時変化



溶液の粘度の変化も評価を行った。低分子量の場合には、ほとんど安定であるが、高分子量のリン酸化プルラン溶液では初期の低下が見られるが、その後は安定に推移するようになる。

## 【2-1-2】アパタイトコートによる骨再生機能の実現 金属チタンへのコーティングの検討

アパタイトコーティングについて、試作品の検討を始めた。チタンインプラントの頭部近傍においては塗装せず、こちらには後述する抗菌剤を含んだリン酸化プルランをコーティングする。そのためのジグを作製して、インプラント頭部を隠すようにし、塗装を昨年度行った。結果は報告したとおりである。これを、骨再生に対して検討するが、現在のインプラントは表面に凹凸構造を導入しており、骨再生を促進する構造となっている。そのため、処理していないチタンねじに対してコーティングを行い、イヌの口腔内で動物実験を行った。結果は、CPC コーティングの部分で記述する。

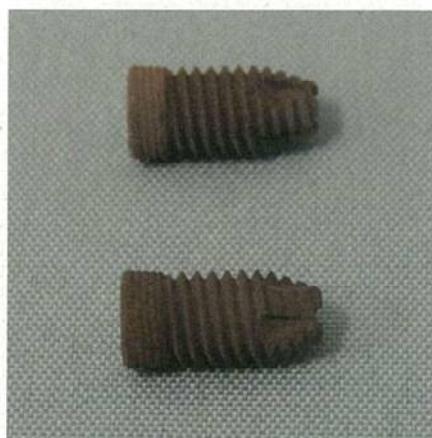


図 マスキングした塗装インプラント(上) 通常のインプラント(下)

## 【2-1-3】アパタイトコートの安全性検討

同位体による、分解性生物の追跡等の体内挙動の評価技術として、放射性同位体である、炭素 14 でできた、リン酸化プルランの合成を行い、体内挙動の評価を行う。

### プルランの炭素同位体標識

*Aureobasidium pullulans* を富同位体環境下に置くことによる生育・生産挙動および生成物への影響を検討した。

### 富炭素同位体液体培地による培養

炭素源に  $^{13}\text{C}$  標識でフルラベルを施したグルコース ( $^{13}\text{C}$  ratio < 99%, Sigma-Aldrich) を用いて、2.2 と同様の条件で培養および精製を行った。ただし、菌体は 2.2.2 との培養液と同組成の 20 ml 培地で継代培養したものを用いた。

得られた多糖について IR スペクトル測定を行い、標準品であるプルランとの比較を行った。また、安定同位体比質量分析 (ANCA-GSL、大陽日酸) にて、試料の  $^{13}\text{C}$  割合を測定し、同位体の導入を確認した。

### 同位体取り込み割合の評価

炭素源のグルコースについて、同位体標識化物および未標識物を所定の割合で混合し、同位体比を調整したものを用いて培養を行った。CTA-OH による分画、透析による脱塩後、凍結乾燥により目的物を精製した。

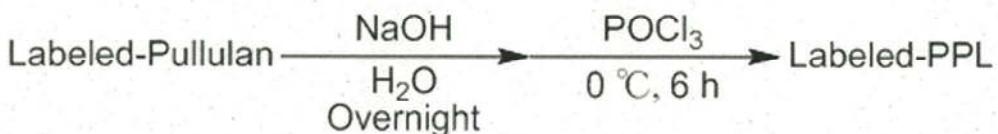
得られた多糖について安定同位体比質量分析により同位体導入割合を求めた。

### リン酸化プルランの合成

培養により得られたプルランに対してリン酸化を施した。いくつかの合成法を試みることでより利便性の高い合成法を見出した。それぞれの合成で得られたリン酸化物のリン含有量を ICP 発光分光分析装置 (VISTA-PRO、SII 製) もしくは、モリブデンブルー法により定量した。

### 塩化ホスホリルによる水系溶媒での合成

**Scheme 2** Phosphorylation of pullulan by organic solvent.



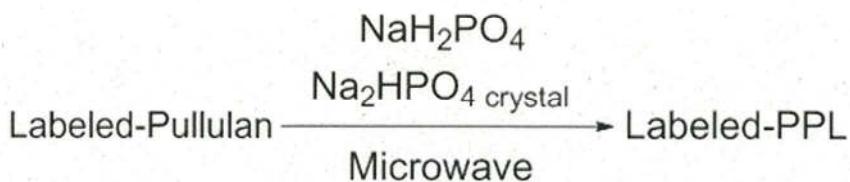
プルラン 1.0 g を超純水 50 ml に溶解させ、水酸化ナトリウム水溶液 (水酸化ナトリウム 0.82 g、後に添加する塩化ホスホリルを中和するのに必要な濃度) 25 ml を加え一夜攪拌しアルカリ処理を行った。

プルランが完全溶解後、塩化ホスホリル (Wako) 0.38 ml を添加し、6 h 反応させた。反応後にリン酸 (Wako) を用いて pH 7 になる様に中和した。この時、これらの操作は多糖の低分子化を防ぐため氷浴中で行った。中和後の溶液について透析、凍結乾燥によって生成物を得た。

精製後の試料を超純水に溶解させて 1000 ppm の溶液を作製し、ICP 発光分光分析装置により、含有リンの定量を行った。

## マイクロ波合成反応装置による水系溶媒での合成

Scheme 3 Phosphorylation of pullulan by microwave heating.



プルラン 0.15 g と、リン酸二水素ナトリウム（無水物、Wako）9.4 g、リン酸水素二ナトリウム（含水結晶物、Wako）17.3 g を二つ口フラスコに入れ、溶媒を蒸発させながらマイクロ波合成反応装置（StartSYNTH、Milestone General 社製）を用いて出力 200 W で 18 min. マイクロ波を照射した。得られた反応物について、透析、凍結乾燥にて精製した。

得られたリン酸化物を超純水に溶解させて 1000 ppm の溶液を作製し、ICP 発光分光分析によりリン含有量を定量した。また、固有粘度測定および<sup>31</sup>P-NMR により多糖にリン酸基の導入を確認した。粘度測定については、溶媒は水を使用し、Ubbelohde 粘度計を用いて、30°C の恒温槽中で行った。一定距離の流下時間を測定し、比粘度  $\eta_{sp}$  を算出した。比粘度を濃度で割り（還元粘度）、それを試料濃度に対してプロットした。

### 多糖の分析

得られた多糖について、分子量測定および粘度測定による分解挙動について分析を行った。

### 分子量測定

東ソー分析センターのもと、分子量測定を行った。装置にはビルドアップ GPC システム（東ソー）を、カラムは TSKgel α-M (7.8 mmI.D.×30 cm) を用いた。試料を測定して、溶離液である 0.2 M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液/0.2 M-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液=1/1 (v/v) を加えて終濃度 1 mg/ml とした。その後、緩やかに振り混ぜて 0.5 μm のセルロースアセテートカートリッジフィルターで濾過した。カラムを 40 °C に保ち、200 μl を 1.0 ml/min で流した。測定は 2 度行って平均を算出した。

## 酸加水分解挙動

標準品のプルランおよび同位体標識プルランを超純水に溶解させて、pH を中性および、1 N 塩酸を用いて酸性に調整した後 1 日攪拌した試料を調製した。粘度測定は、Ubbelohde 粘度計を用いて、30°C の恒温槽中で行った。一定距離の流下時間を測定し、比粘度  $\eta_{sp}$  を算出した。比粘度を濃度で割り（還元粘度）、それを試料濃度に対してプロットし、酸に対する分解性について評価した。

## 同位体標識物化物の NMR スペクトル

同位体の導入による NMR スペクトルの変化を確認した。試料溶液は遠心分離、フィルター濾過により不溶物を除去した後、超音波により脱気処理を施したもの用いた。上記処理を施した試料 0.8 ml をサンプルチューブ（ $\phi 5 \times 7$  inch、関東化学製）に挿入し、測定試料とした。NMR 測定は、400-MR (400 MHz、Varian 社製) および、JMN-ECS400 (400 MHz、JEOL RESONANCE 社製) を使用し、PFG オートスイッチャブルプローブを用いて実施した。プローブの温度は 25°C とした。

## リン酸置換部位の解明

様々なリン酸化単糖、リン酸化多糖の NMR を測定、比較することで、リン酸化プルランのリン酸置換部位の検討を行った。試料溶液の調製および測定には、同様の手法を用いた。

## 富炭素同位体液体培地による培養

炭素源に  $^{13}\text{C}$  グルコースを用いて培養を行ったところ、3.2.2 と同様の様子が観察された。培養終了後の培地にエタノールを加えることによって、同様に多糖が生成した。

グルコースの標識化物と未標識物の IR スペクトル比較 (Fig. 25)、取り出した多糖と標準品であるプルランの IR スペクトル比較 (Fig. 26) および、その拡大図 (Fig. 27) をそれぞれ示す。

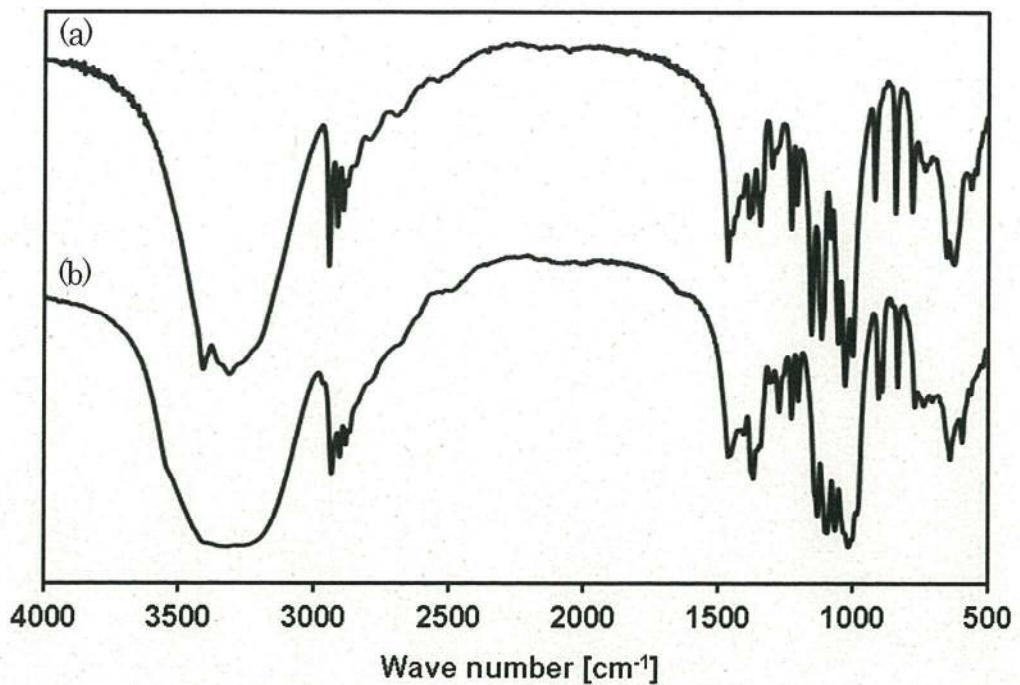


Fig. IR spectra of (a) <sup>12</sup>C-glucose and (b) <sup>13</sup>C-glucose.

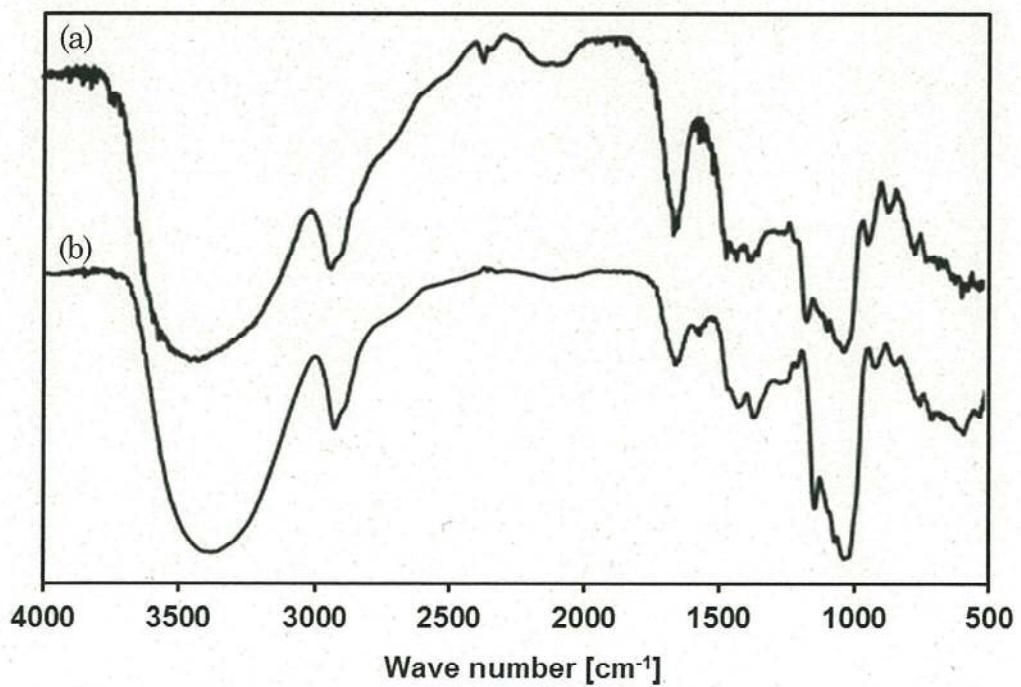


Fig. IR spectra of (a) <sup>12</sup>C pullulan and (b) culture product with <sup>13</sup>C glucose.

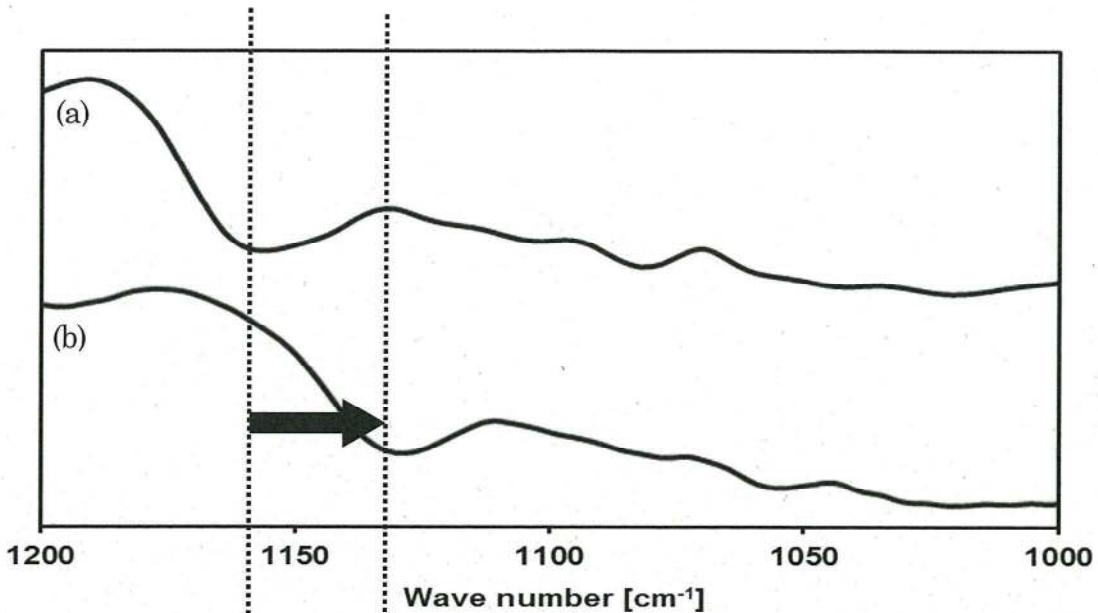


Fig. Enlarged picture of a 1000 ppm to 1200 ppm : (a)  $^{12}\text{C}$  pullulan and (b). culture product with  $^{13}\text{C}$  glucose.

F 同位体標識グルコースの IR スペクトルのピークの内いくつかが未標識物のものと比較して、低波数側にシフトしていることが分かった。IR スペクトルは重い元素に置換すると、調和振動子の振動数 (Scheme ) が変化し、それに対応する分子振動のピークが低波数側（低振動数）にシフトすることが分かっている。

**Scheme.** Formula of Harmonic oscillator;  $v$ , frequency  $k$ , Spring constant  $\mu$ , Reduced mass ( $= m_1m_2 / m_1+m_2$ ).

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

グルコース中の炭素原子が重い同位体に置き換わったことで、このようなピークのシフトが観測された。このことから、プルランにおいても同位体導入により、ピークのシフトが観測されると思われる。

Fig.より、標準品のプルランと富炭素同位体培養における生成物との IR スペクトルはほぼ同一のものが得られたことから、同位体標識グルコースを使用してもプルランが生成していることが分かった。また、ピークの位置は完全には一致しておらず、 $^{13}\text{C}$  グルコースを用いた培養生成物のピークのいくつかがわずかに低波数側にシフトしていることが分かった。特に、1000~1200  $\text{cm}^{-1}$  付近のピークを拡大してみると、両者のピークの間にずれが生じていることがよくわかる。このピークのシフトが観測されたことにより、プルランへの同位体の導入を確認することができた。

## 同位体取り込み割合の評価

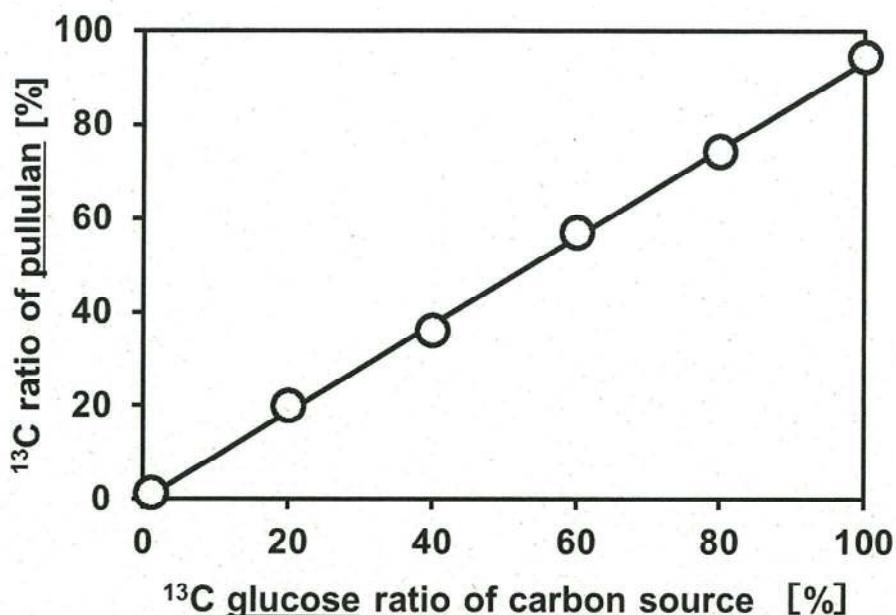


Fig. Relationship <sup>13</sup>C ratio between the carbon source and

炭素源の同位体比を調整して行った培養における生成物の安定同位体比質量分析の結果を示す (Fig. 28)。<sup>13</sup>C 標識物を炭素源に 100% 用いることによって、プルランを構成する炭素原子のうち約 95% が同位体で置換されていることが分かった。残りの 5% については以下の理由が考えられる。一つは、グルコースのみではなく、酵母エキスまたは生体内に存在していた炭素源を利用してプルランを生産したことである。もう一つは微生物の体細胞由来の <sup>12</sup>C が精製の段階で混入したことである。

また、炭素源と生成物の同位体存在比の間に比例の相関関係が見られ、炭素源の同位体存在比を調整することで導入量を制御できることが分かった。これらのことから、本培養で用いる *A. pullulans* は同位体を区別することなく取り込んでプルランを生産しており、安定同位体を多く含む培地で本菌を培養することによって、プルランへの同位体標識を行う方法を確立した

リン酸化プルランの合成

塩化ホスホリルによる水系溶媒での合成

Phosphorus content of phosphorylated pullulan synthesized by phosphoryl chloride.

Entry	Labeling	P (%) <sup>a</sup>	D.S. <sup>b</sup>
1	○	2.2	0.12
2	×	1.8	0.15

<sup>a</sup> Determined by ICP.

<sup>b</sup> Degree of substitution.

ICP 発光分光分析により定量した塩化ホスホリルを用いた合成反応物のリン含有量を示す。同位体標識後の試料 (Entry 1) も、未標識のものと同等のリン酸化を行うことができた。

マイクロ波合成反応装置による水系溶媒での合成

Table Phosphorus content of phosphorylated pullulan synthesized by microwave heating.

Entry	<sup>13</sup> C ratio [%]	P (%) <sup>a</sup>	D.S. <sup>b</sup>
1	1.10	2.6	0.049
2	18.7	2.7	0.052
3	19.7	4.2	0.034
4	35.1	2.0	0.038
5	35.8	1.5	0.027
6	51.7	1.2	0.021
7	61.6	5.3	0.13
8	68.9	1.8	0.034
9	74.1	2.3	0.046
10	94.2	3.9	0.078

<sup>a</sup> Determined by ICP.

<sup>b</sup> Degree of substitution.

ICP 発光分光分析により定量したマイクロ波加熱を用いた合成反応物のリン含有量を示す。Entry 1 は標準品のプルランである。塩化ホスホリルを用いる合成法と同様に、同位体の有無、存在比にかかわらず、リン酸化が可能であることが分かった。

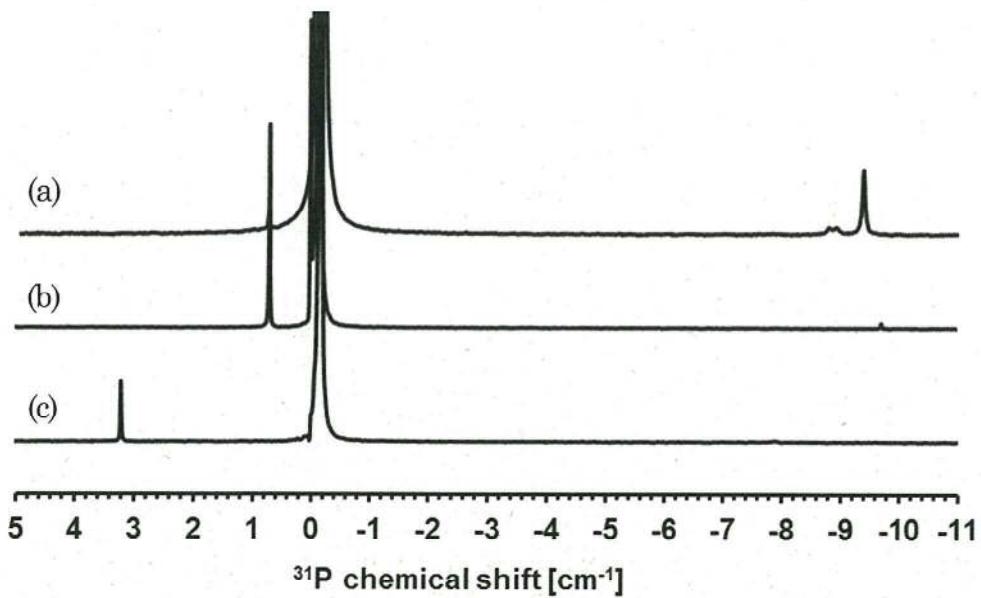


Fig.NMR spectra of (a) labeled-PPL, (b)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and (c)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  reference at 0.00 ppm recorded at 298 K.

マイクロ波照射による合成生成物および反応に使用した2種のリン酸塩の $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトルを示す。生成物のスペクトルにはそれぞれのリン酸塩のスペクトル中には見られないピークが出現していることから、リン酸エステルが生成していることが分かった。また、リン酸塩と同じ化学シフトにピークが存在しなかったことから、十分に反応後の脱塩を行うことが出来た。

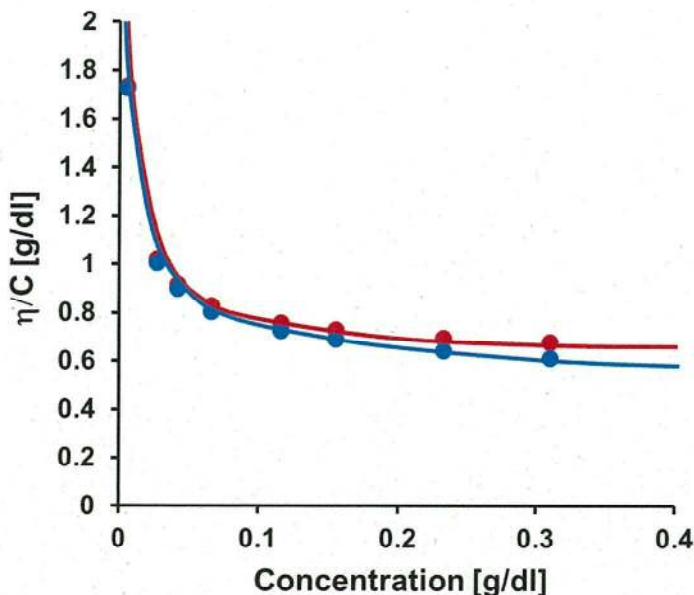


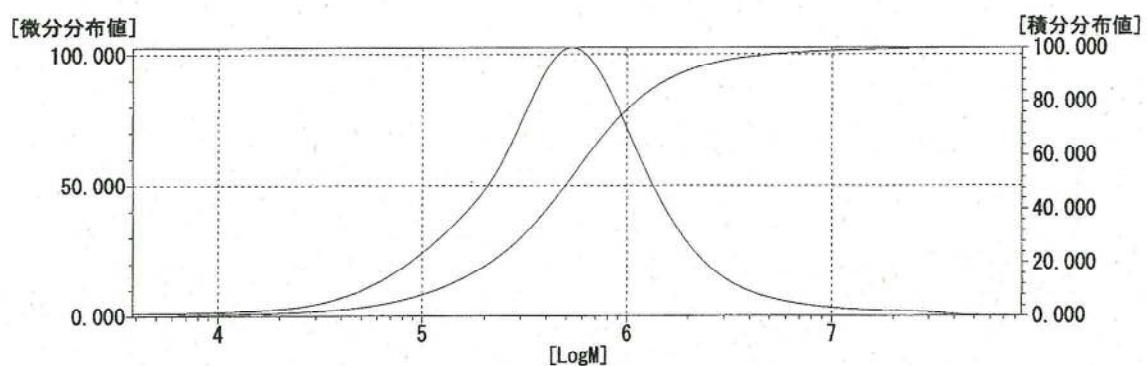
Fig. Measurement of the intrinsic viscosity of PPL at 30°C by using Ubbelohde viscometers ; (Red)  $\eta_{sp}/C$  and (Blue)  $\ln(\eta_{sp})/C$ .

マイクロ波による合成生成物の固有粘度測定結果を示す。低濃度域において還元粘度が急激に上昇した。高分子電解質は自身の電荷の反発によって分子鎖が拡がり、層流にまたがるため、低濃度域において粘度が上昇する。よって、本合成による生成物は、リン酸基がエステルの状態で多糖に結合していることが分かった。

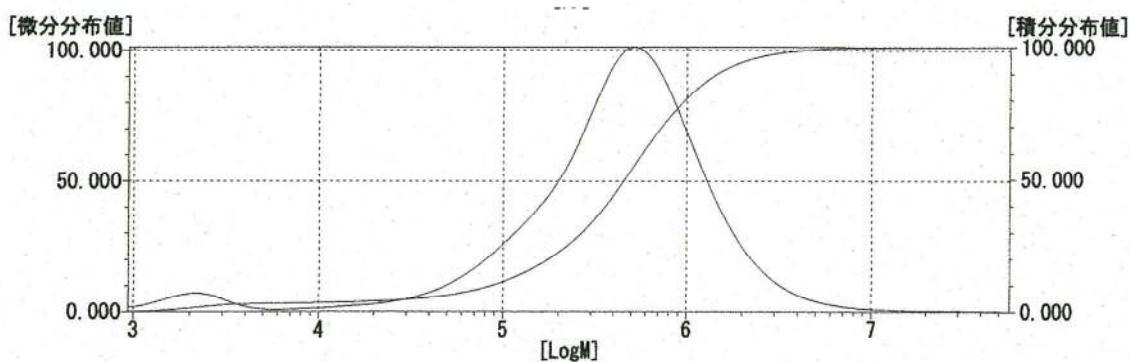
マイクロ波照射による合成法は、有機溶媒と比較して溶媒除去の手間がなく、塩化ホスホリルと比較して短時間で合成できるといった優位性がある。よって本研究では、以降のリン酸化フルランの合成として、マイクロ波加熱による合成を選択した。

## 多糖の分析

### 分子量測定



(a)



(b)

Fig. Molecular weight distribution of (a)  $^{12}\text{C}$  pullulan and (b)  $^{13}\text{C}$  pullulan.

Table The result of molecular weight measurement.

	Entry	$Mn^a$ $(\sim 10^4)$	$Mw^b$ $(\sim 10^4)$	$Mz^c$ $(\sim 10^4)$	$Mw/Mn^d$
$^{12}\text{C}$ pullulan	1	19	100	730	5.3
	2	21	100	740	4.9
	Ave.	20	100	730	5.1
$^{13}\text{C}$ pullulan	1	6.4	33	68	5.2
	2	6.4	33	69	5.2
	Ave.	6.4	33	69	5.2

<sup>a</sup> Number-average molecular weight  
<sup>c</sup> z-average molecular weight

<sup>b</sup> Weight-average molecular weight  
<sup>d</sup> Dispersion

本研究で得られた多糖の分子量分布図および分子量測定結果をそれぞれ、示す。ただし、検量線は Shodex 製のプルランを用いた3次近似曲線であるため、得られる値はプルラン換算分子量となる。  
 $^{12}\text{C}$  グルコースを用いた培養で得られたプルランの分子量は 200,000 であった。これは市販のプルランとほぼ同等のものであり、本実験で良質のものが得られていると言える。一方、 $^{13}\text{C}$  グルコースを用いた培養で得られたプルランは、分子量が 1 枝小さくなつた。 $^{13}\text{C}$  は  $^{12}\text{C}$  と比べて 1% しか天然に存在していない。本研究ではそれと比較して高い濃度で  $^{13}\text{C}$  を使用しているため、*A. pullulans* が糖をつなぎ合わせる働きが低下したのではないかと考えられる。また、 $^{13}\text{C}$  標識を行つたプルランは通常のものと比べて難溶である事が確認された。このことから、試料中の低分子量のものだけが溶解し検出された可能性も考えられる。

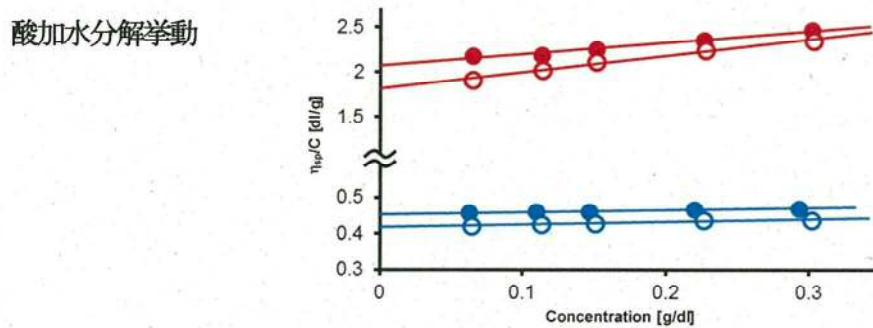


Fig Results of viscosity measurement after the hydrolysis by acid. (Red) unlabeled-pullulan of ● pH 7 and ○ pH 3, (Blue) labeled-pullulan of ● pH 7 and ○ pH 3.

同位体導入前後のプルランの粘度測定結果を示す。図には還元粘度のみ示した。両サンプルとも酸に曝すことでの低分子化され、極限粘度が低下した。また、その割合はほぼ同じであったことから、同位体の存在による分解性に変化はないことが分かった。

炭素同位体標識物化物の NMR スペクトル

グルコースの  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル測定

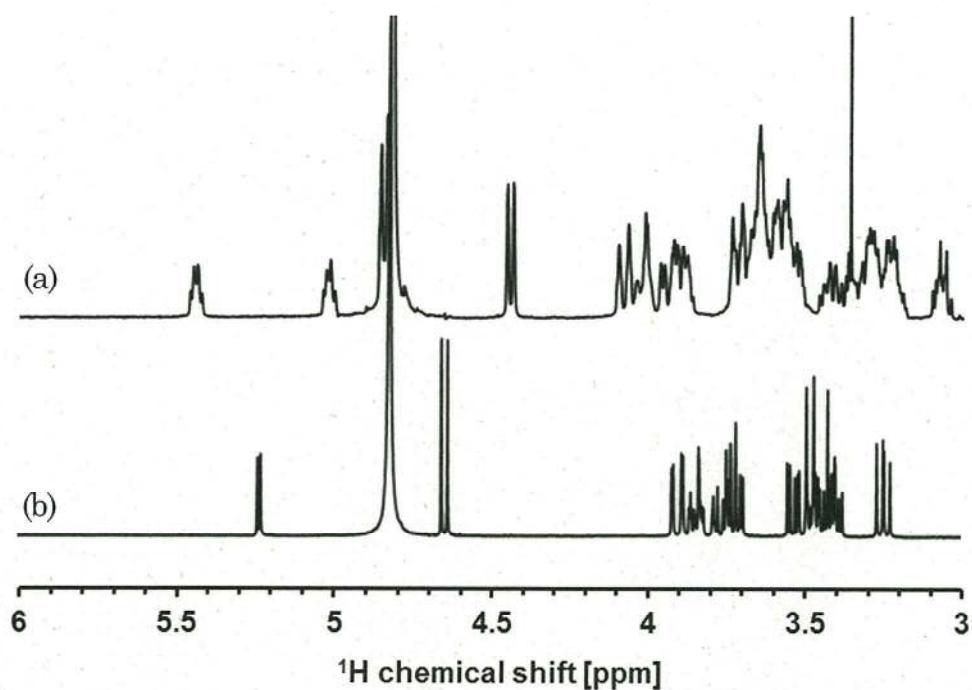


Fig.  $^1\text{H-NMR}$  spectra of (a) labeled-glucose and (b) unlabeled-glucose in  $\text{D}_2\text{O}$ , TMS reference at 0.00 ppm, recorded at 298 K.

グルコースの炭素同位体標識物および未標識物の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを示す。同一の化合物であるにもかかわらず、大きく異なるスペクトルが得られた。標識化物はほぼすべての炭素が  $^{13}\text{C}$  であるため、通常では観測されない、 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  カップリングが観測された。

### プルランの<sup>1</sup>H-NMR スペクトル測定

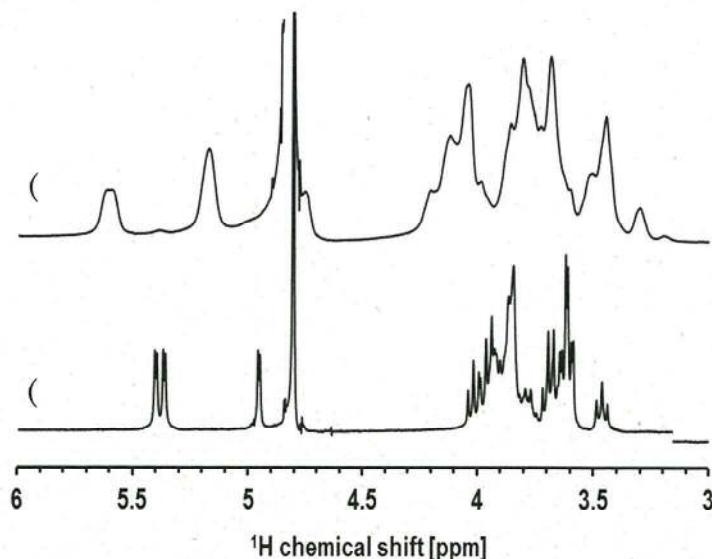


Fig. <sup>1</sup>H-NMR spectra of (a) labeled-pullulan and (b) unlabeled-pullulan in D<sub>2</sub>O, TMSP reference at 0.00

プルランの炭素同位体標識物および未標識物の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを示す。多糖は多数の水素を有するため、それぞれの共鳴線が重複し、スペクトルが複雑化する傾向がある(3.5-4 ppm 付近)。同位体標識化物のスペクトルに、シグナルのブロードニングが見られた。これは、モノマーであるグルコースと同様に、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C カップリングにより通常より多数の分裂が起きたことに加えて、未標識物より低濃度であること、高分子量体のために分子運動性が低いといった理由が考えられる。

### プルランの<sup>13</sup>C-NMR スペクトル測定

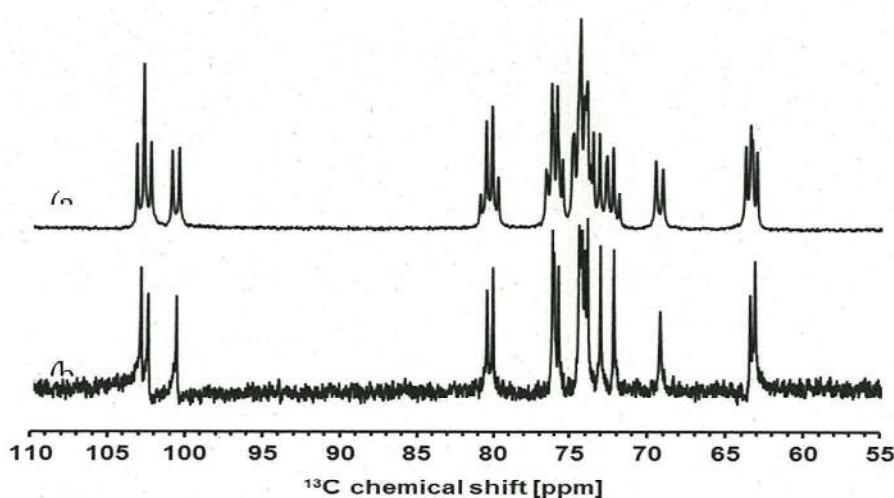


Fig. <sup>13</sup>C-NMR spectra of (a) labeled-pullulan and (b) unlabeled-

プルランの炭素同位体標識物および未標識物の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示す。プロトンと同様に、炭素同位体の存在により  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  カップリングが観測された。グルコースのものと同様にスペクトルの化学シフトは同じ場所に出現しており、また、プロトンと比較してシャープなスペクトルが得られたことから各ピークの帰属が容易であることが分かった。

#### 同位体存在比の $^1\text{H-NMR}$ への影響

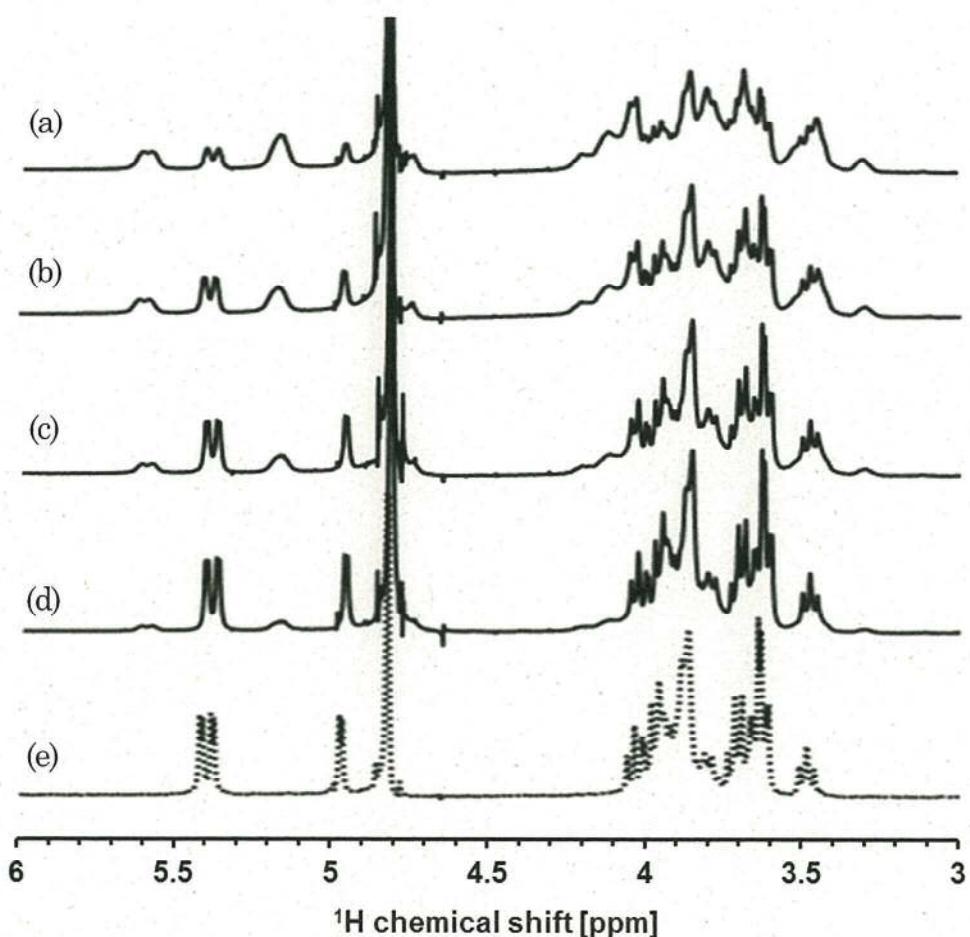
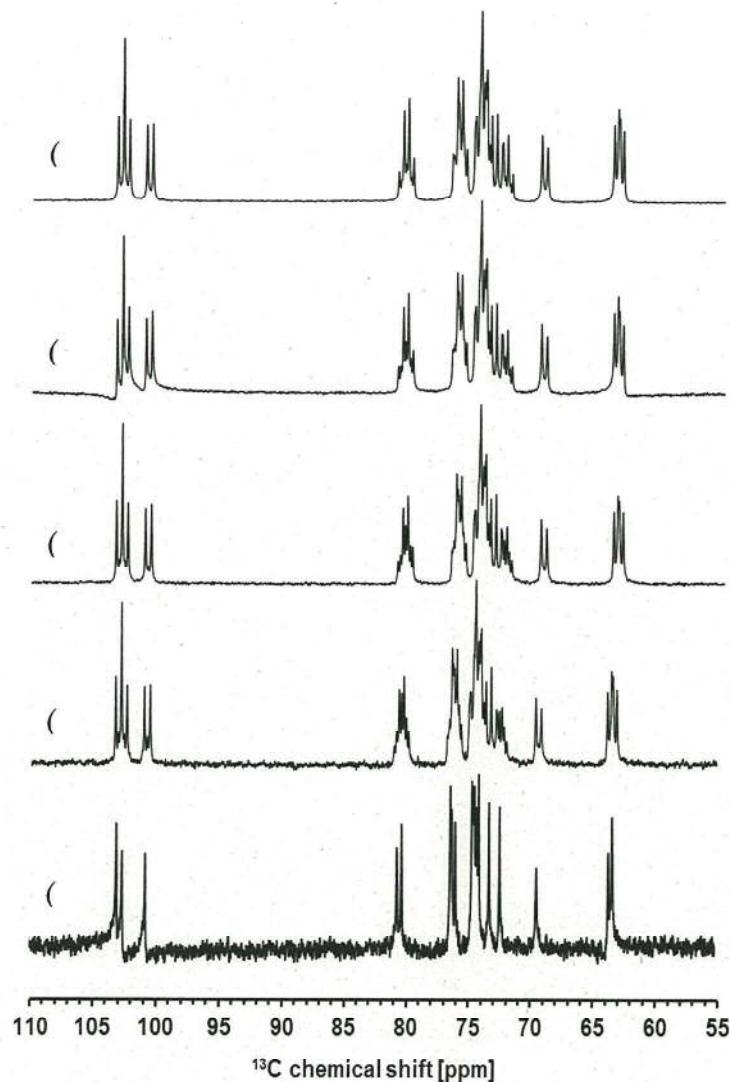


Fig.  $^1\text{H-NMR}$  spectra of pullulan which have different  $^{13}\text{C}$  ratio in  $\text{D}_2\text{O}$ , TMS reference at 0.00 ppm, recorded at 298 K. The  $^{13}\text{C}$  ratio of (a) 71%, (b) 49%, (c) 33%, (d) 17% and (e) 1.1% (unlabeled-pullulan).

同位体比の異なるプルランの  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを示す。同位体比が増加することによって  $^{13}\text{C}$  に隣り合うプロトンの数が増加する。そのため、 $^{13}\text{C}$  に隣接しないプロトンのピーク強度、積分値 (5.39 ppm など) が減少し、 $^{13}\text{C}$  に隣接してカップリングにより分裂したプロトンのピーク強度、積分値 (5.61 ppm, 5.18 ppm など) が増大する様子が確認された。

## 同位体存在比の<sup>13</sup>C-NMRへの影響



**Fig.** <sup>13</sup>C-NMR spectra of pullulan which have different <sup>13</sup>C ratio in D<sub>2</sub>O, TMSP reference at 0.00 ppm, recorded at 298 K. The <sup>13</sup>C ratio of (a) 71%, (b) 49%,

同位体比の異なるプルランの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す。同位体比が増加することによって<sup>13</sup>Cに隣り合うカーボンの数が増加する。そのためプロトンと同様に、<sup>13</sup>Cに隣接しないカーボンのピーク強度、積分値が減少し、<sup>13</sup>Cに隣接してカップリングにより分裂したカーボンのピーク強度、積分値が増大する様子が確認された。特に81 ppm付近のピーク群にその様子が見て取れる。

3.1.6の結果とともに、両者は、繰り返し単位内の同じ位置に存在する原子でありながら、周辺環境が異なる（ここでは<sup>13</sup>Cに隣接するか否か）ものを区別して観測することが出来た。各原子の環境の異なる2種のピーク強度、積分値の比から分子鎖中の<sup>13</sup>Cの配置を考察できると考えられる。

## リン酸置換部位の解明

### リン酸化プルランの $^{13}\text{C}$ -NMR 測定

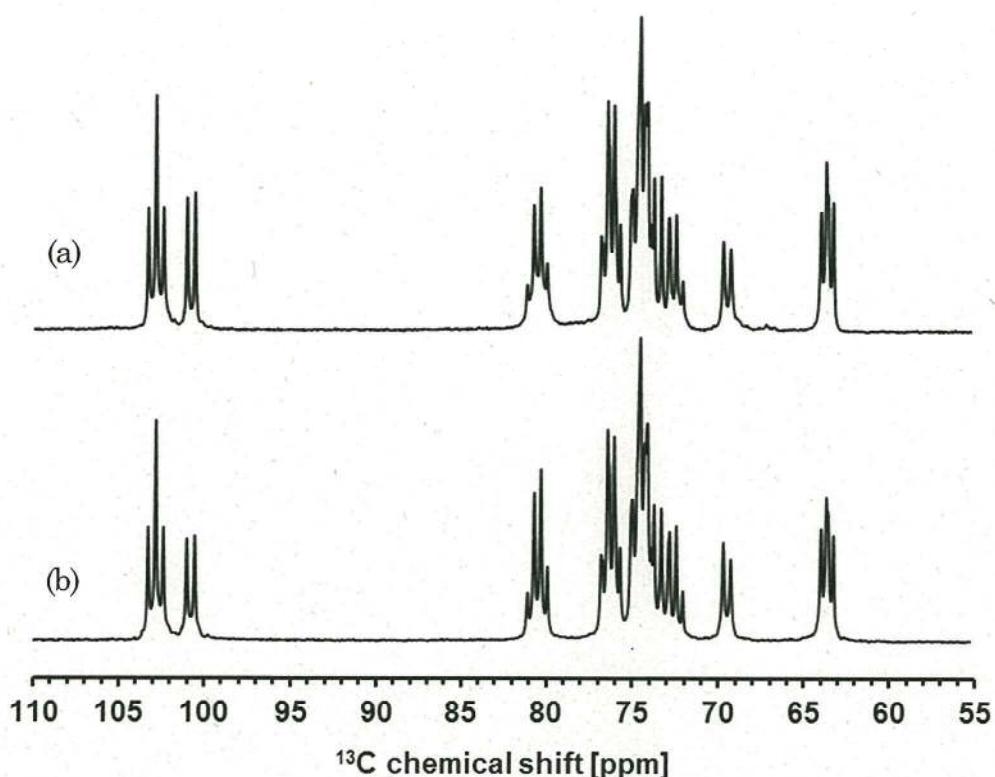


Fig.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of (a) labeled-PPL and (b) labeled-pullulan in  $\text{D}_2\text{O}$ , TMSP reference at 0.00 ppm, recorded at 298 K.

同位体導入を施したリン酸化プルランおよびプルランの  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示す。グルコースとグルコースリン酸化物のスペクトルとは異なり、おおよそ同一のスペクトルが得られた。

リン酸化プルランのスペクトル (Fig. 46 a) 中の 67.22 ppm に、プルランのスペクトル中には見られなかったピークが観測された。拡大してみたところ、明らかに新たなピークが出現していることが分かった。このピークについて、モノマーであるグルコースとの比較を行った。

同位体標識リン酸化プルラン、未標識グルコースおよびグルコース6リン酸の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す。リン酸化プルランの骨格であるプルランの6位炭素のうち、 $\alpha(1\rightarrow6)$ 結合に関与しない2つの炭素に対応するピークは、43.45 ppmに出現する。このピークと、新たに出現したピークのシフト幅を測定したところ、グルコースのリン酸（グルコース→グルコース6リン酸）に伴う6位炭素のピークのシフト幅とほぼ一致することが分かった。これより、プルランの6位炭素にリン酸基が置換することでそのピークが本来の値からシフトして出現したと考えられ、少なくとも6位炭素がリン酸置換部位の一つであることが分かった。

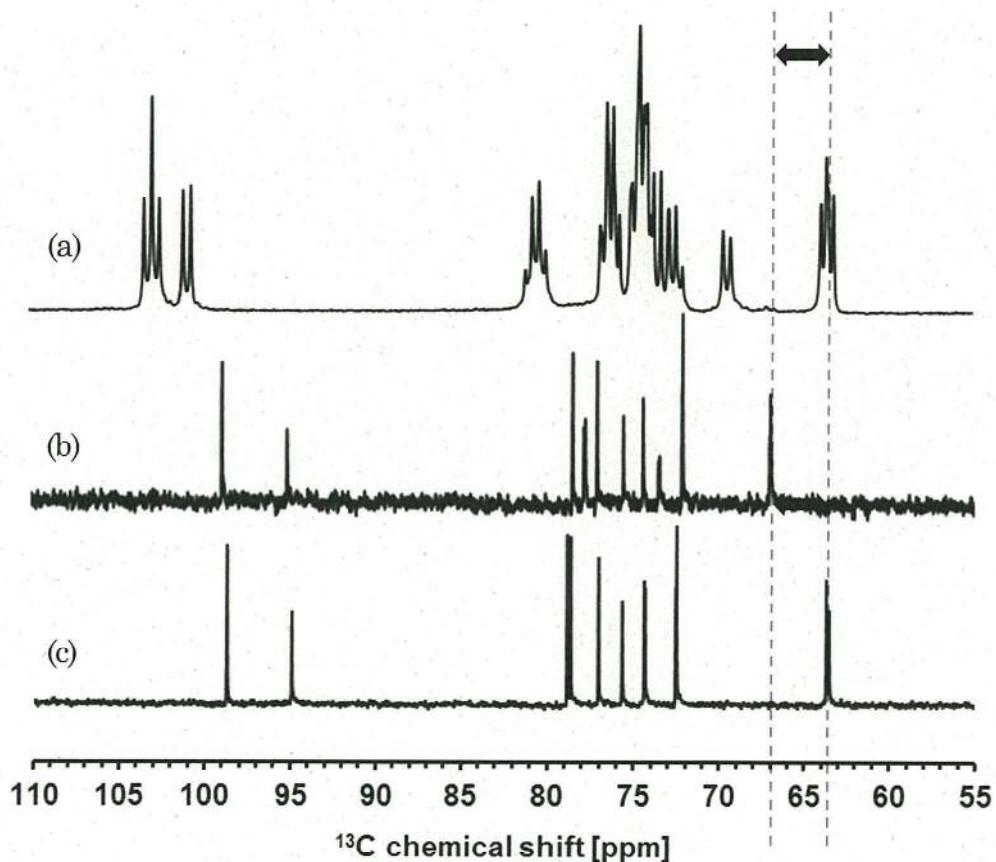


Fig. <sup>13</sup>C-NMR spectra of (a) labeled-PPL, (b) glucose-6-phosphate and (c) glucose in D<sub>2</sub>O, TMSP reference at 0.00 ppm,

## H-C 隣接相関 NMR 測定

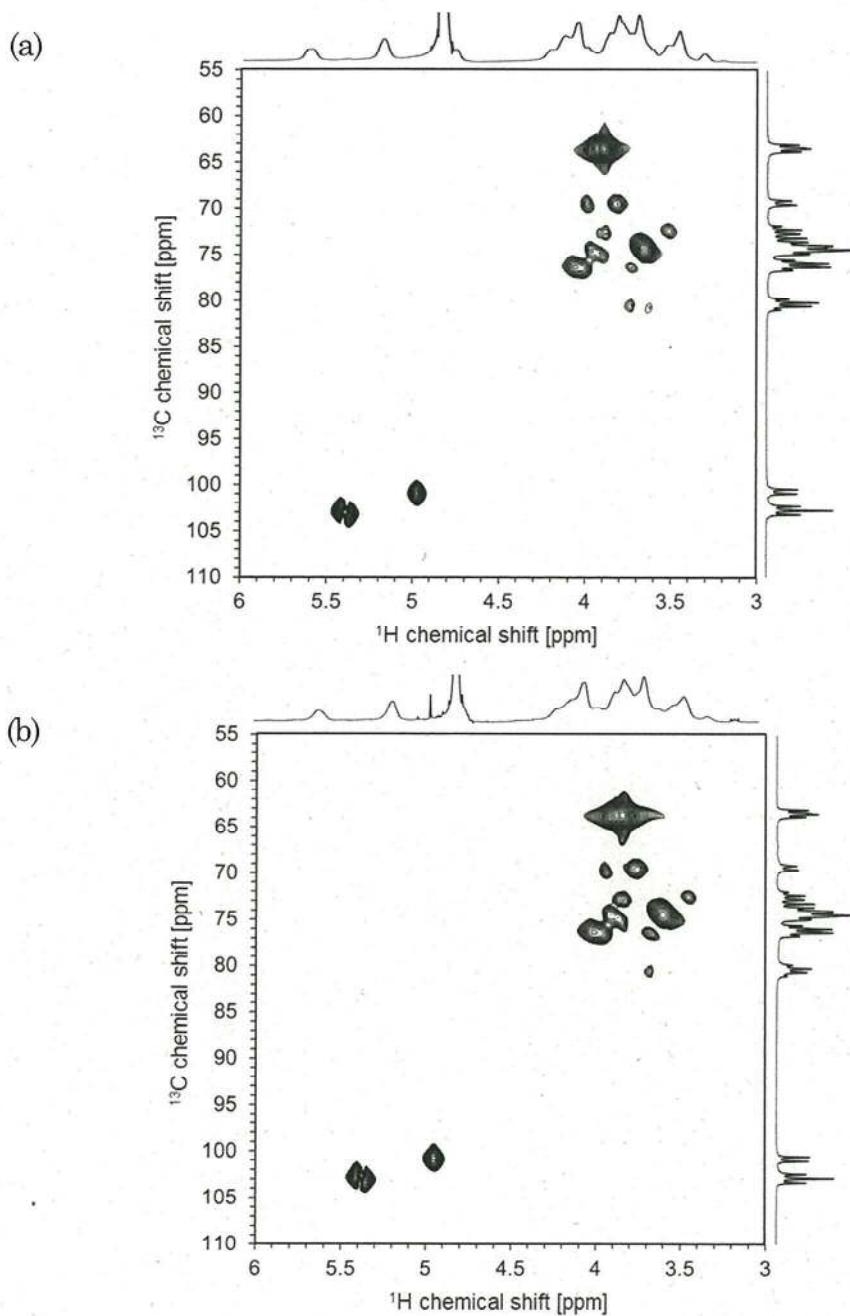
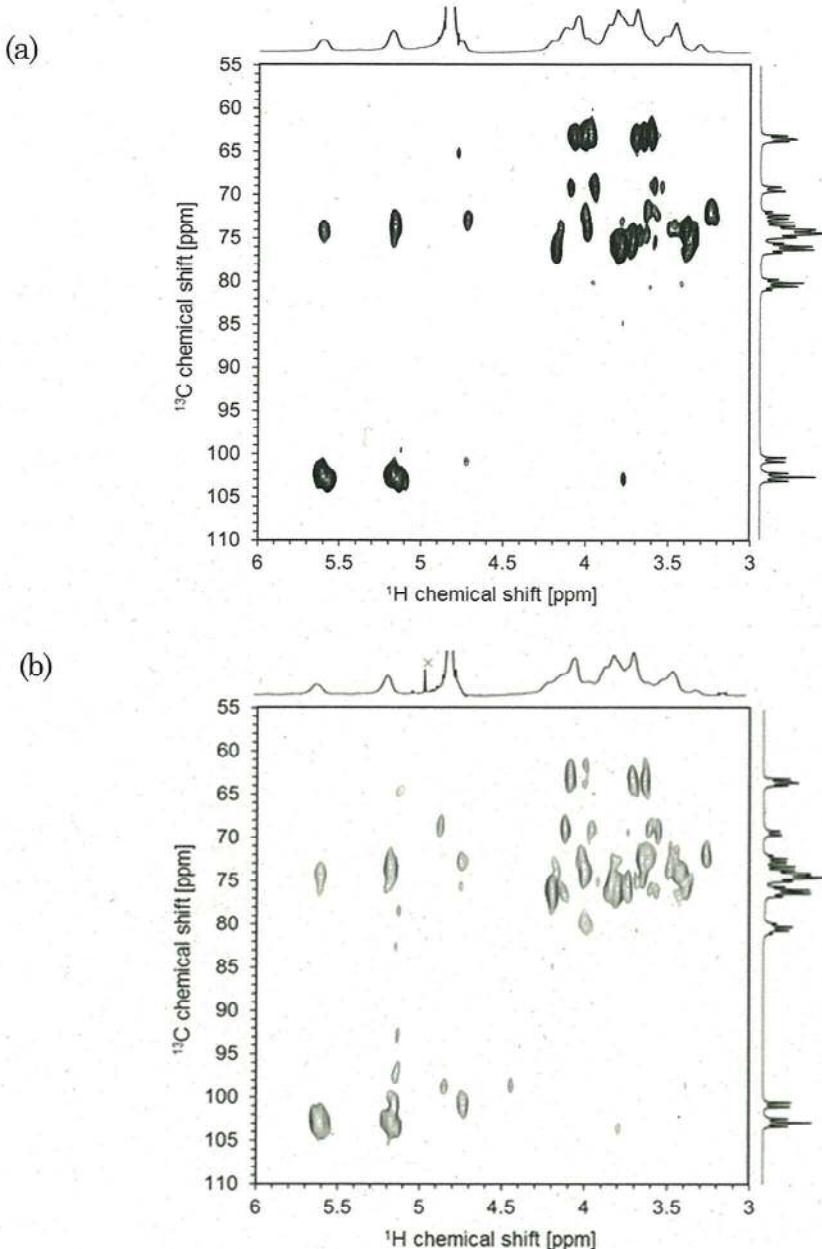


Fig. HMQC spectra of (a) labeled-pullulan and (b) labeled-PPL in D<sub>2</sub>O, TMS reference at 0.00 ppm, recorded at 298 K.

同位体標識を施したプルランとリン酸化プルランの H-C HMQC スペクトルを示す。両者を比較すると、ほとんど同一のスペクトルが得られた。また、リファレンスと比較すると、クロスピーカーの化学シフトが同一であることが分かった。よって、同位体によるカップリングは相関 NMR には関与しないことが分かった。

## H-C 遠隔相関 NMR 測定



**Fig.** HMBC spectra of (a) labeled-pullulan and (b) labeled-PPL in  $\text{D}_2\text{O}$ , TMSP reference at 0.00 ppm, recorded at 298 K.

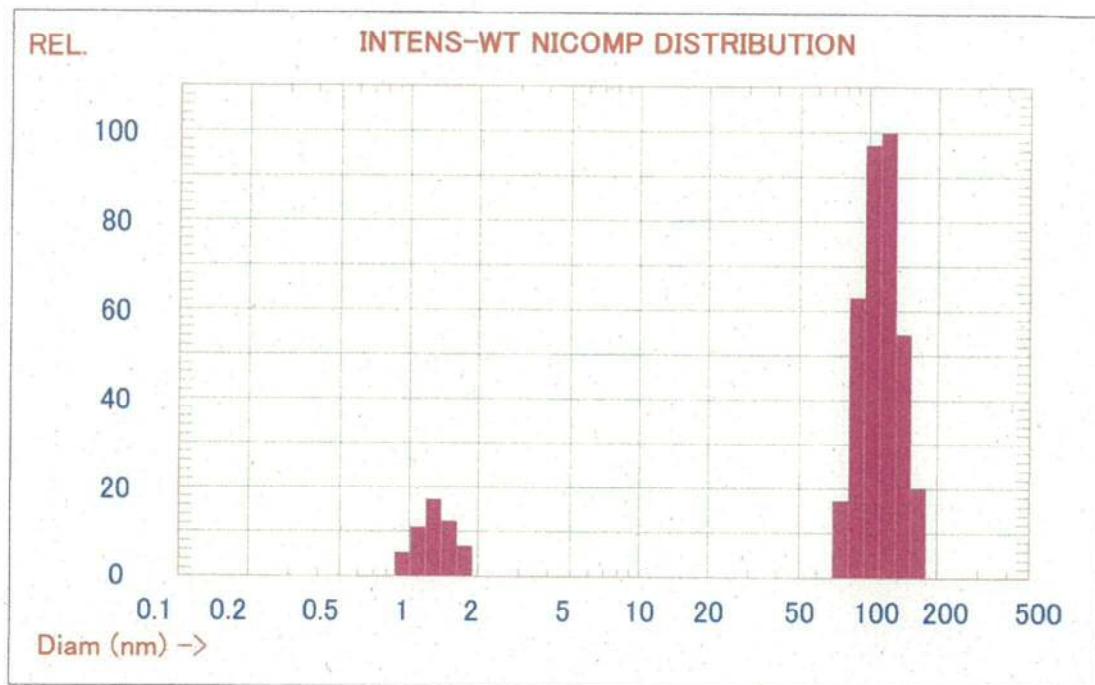
同位体標識を施したプルランとリン酸化プルランの H-C HMBC スペクトルを示す。両者を比較すると、HMQC 程ではないが、似たようなスペクトルが得られた。

今回の2次元NMRでは、リン酸化プルランの  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルに見られた小さなピークの相関を見出しが出来なかった。リン酸置換度が非常に小さいことが要因として挙げられる。

## 粒径評価

リン酸化プルランとCPCを混合した場合の、溶出挙動の評価のために、ゼータ電位測定および粒子径の評価を行った。

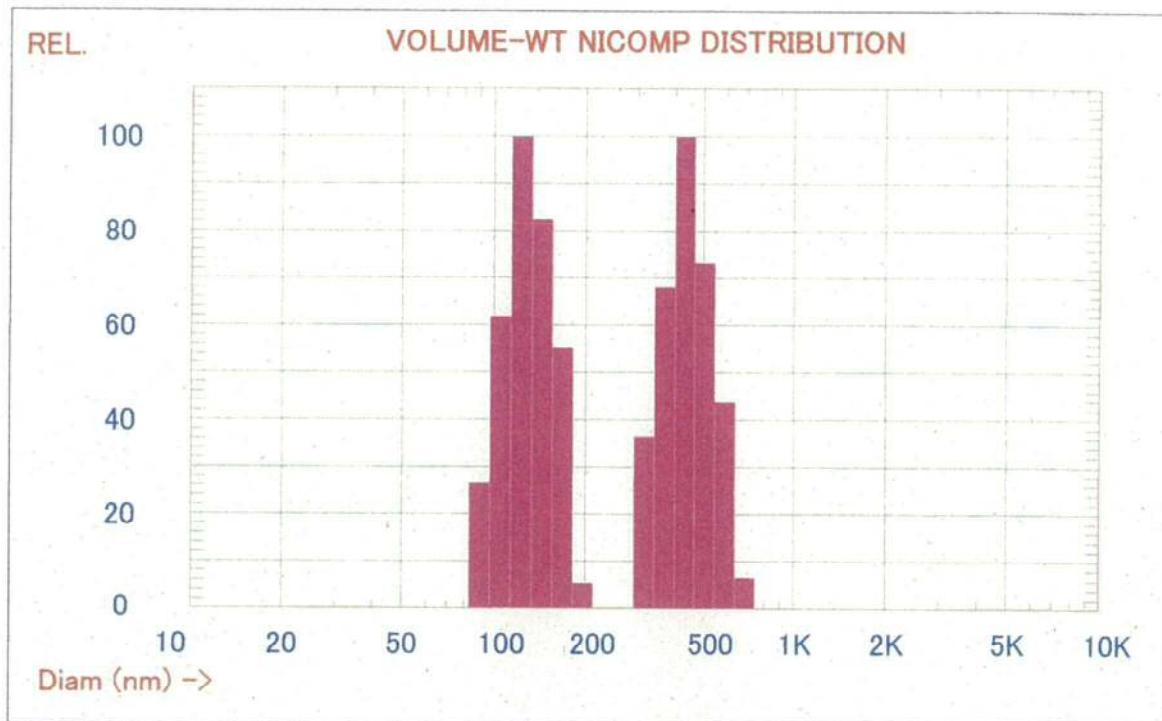
リン酸化プルラン単独の場合の粒子径は次のようになった。



100 ppm. 110

粒子径は 116nm および 1.3nm となった。

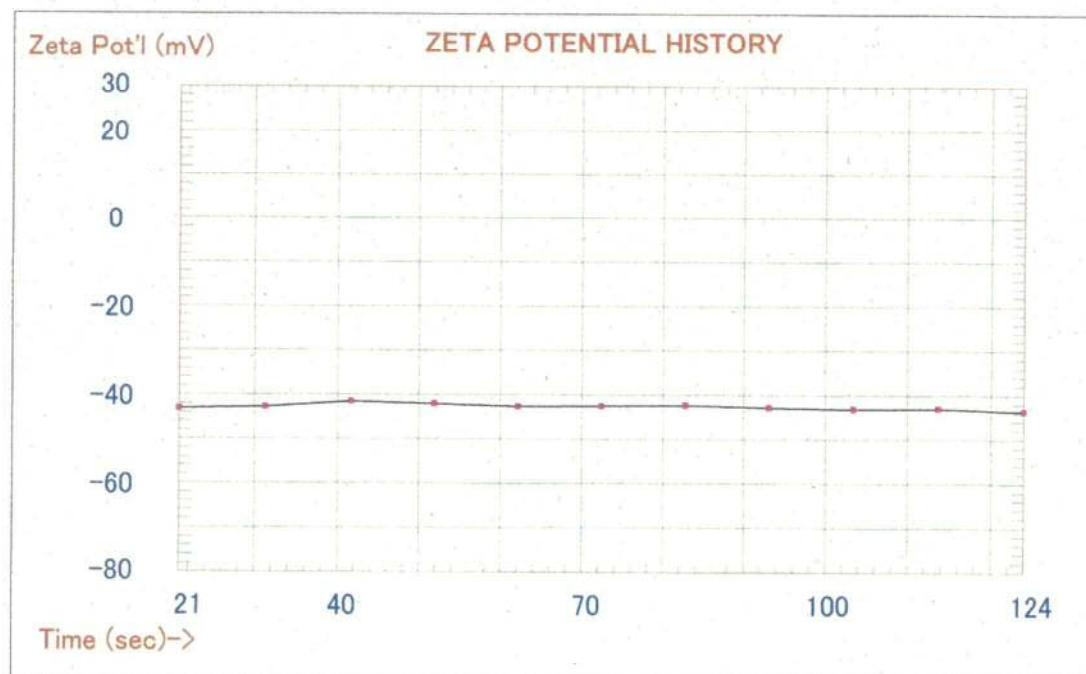
つぎにCPC混合溶液の場合の測定結果を示す。

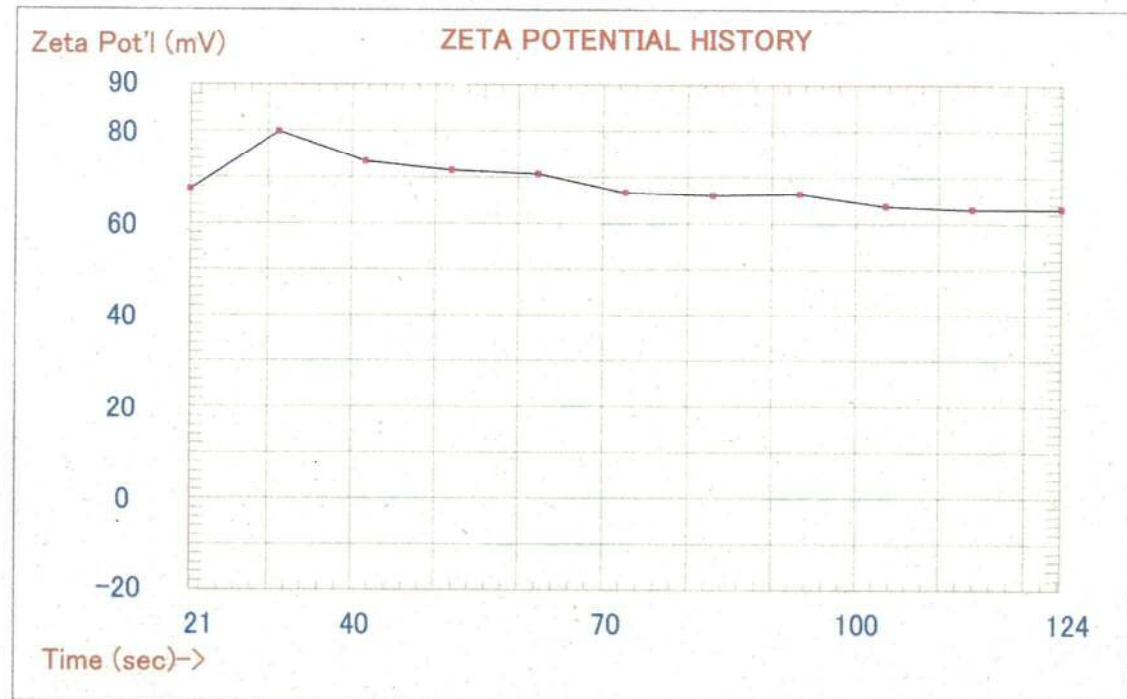


C+C.I. 102

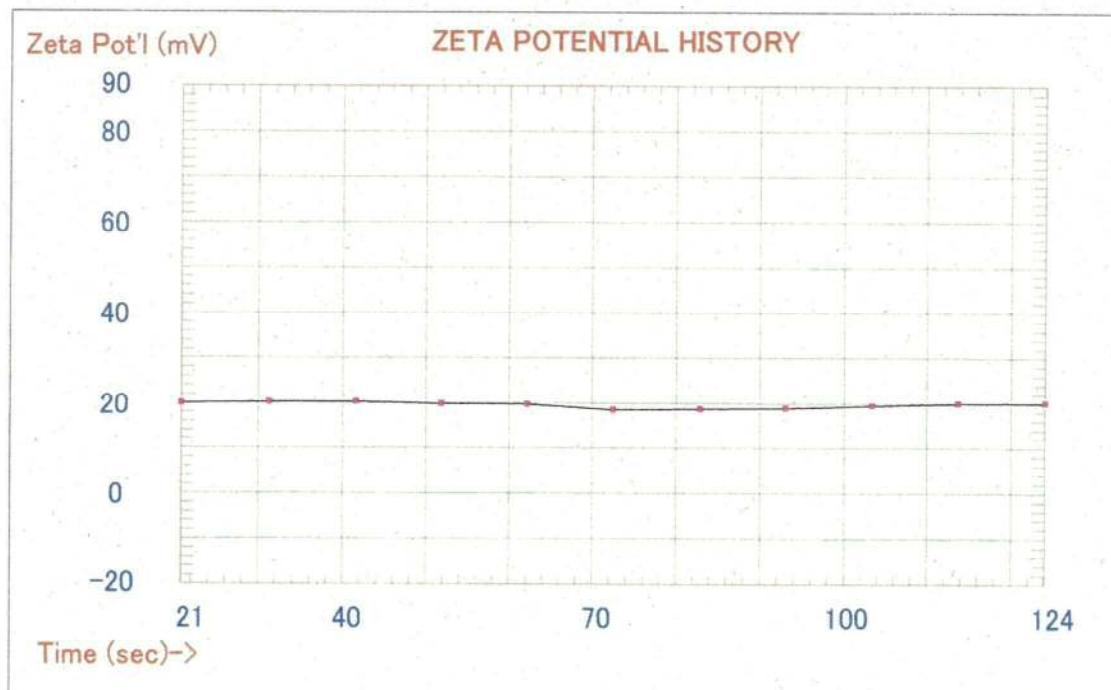
この場合、平均粒子径は100nmと450nm付近にあり、小さいほうはリン酸化プルラン単独であり、大きいほうが複合体と考えられる。結果、粒子径を追跡することにより、450nm付近の粒子は消失すれば、複合体が消えたと考えられ、分離溶出挙動の評価につながる結果である。

つぎにゼータ電位の結果を示す。これはリン酸化プルラン単独の場合である。





CPCはカチオンであるので、正に帯電していることがわかる。



複合体においては、CPCのほうが多いため、正に帯電しており、水中での安定性がやや劣るため、徐々に崩壊して徐放していることがわかった。

### 無菌性

リン酸化プルランを滅菌する方法としては、乾熱滅菌(250度1時間)、EOGガス滅菌、ガンマ線滅菌(照射量25kGy)等が考えられる。しかしながら、乾熱滅菌では、極端に分子量が低下してしまい、GPCでは測定不能となった。EOGガス滅菌では、リン酸基とエチレンオキサイドガスが反応してしまうため、リン酸化プルランが変性してしまうことがわかった。さらに、反応によりエチレンオキサイドガスが残留しなくなるため、滅菌状態を保証できなくなってしまう。ガンマ線滅菌では、リン酸化プルランの水溶液では、分子量が測定できないほど低下してしまうため、溶液状態での滅菌は適していない。乾燥状態では、重量平均が少し低下する程度で、数平均分子量はほとんど変化しない。

	数平均分子量	重量平均分子量
ガンマ線照射前	$3.4 \times 10^4$	$33.0 \times 10^4$
ガンマ線照射後	$3.3 \times 10^4$	$12.0 \times 10^4$

この結果から、滅菌方法としては、乾燥状態でのガンマ線滅菌を採用することとした。

### 非発熱性

リン酸化プルランの現在の値は1%濃度の溶液で2.57EU/mLとなり、1g辺り257EUとなる。製品辺りのエンドトキシンは300EU以下であり、コーティング製品1個当たり、3平方センチ、厚さ1.0μmとすると1製品辺り3mgのリン酸化プルランを使用する。その場合、エンドトキシンは0.771EUとなり、当初の目標をクリアする。しかし、塗装プロセスにおけるコンタミネーション(汚染)を検討する必要があり、来年度以降に検討を行う。

## 【2-1-4】品質安定性検討

### 安定性試験

リン酸化プルランコーティングの安定性については、現在、チタン表面にコーティングした試作品を作製しており、室温にて実時間保存を実施した。製品であるインプラントの場合、表面にサンドブラストを施してあるため、塗膜そのものの評価は難しい。そのため、チタン板上に塗布する方法に決定した。本年度、試作品を作製し、2年間の実時間保存を開始した。安定性について補完研究で実施する予定である。

## 2-2 インプラントの感染防止への対応

### 【2-2-1】CPCコート技術の開発

CPCの溶液の場合、リン酸化プルランと混合すると白濁する。この複合体溶液について、塗装を行うが、複合体の濃度が高いと、分離してしまうため、希薄の溶液を調製する必要があることがわかった。さらに、5mL/minや3mL/minの条件では、図のようなまだらな試料となることがわかった。この場合の対策として、チタン板の清浄性を維持する必要がある。そのために、来年度、プラズマ処理による清浄な表面を作製する。さらに、その清浄性の維持が可能な時間を表面張力計を用いて評価する予定である。当面の対策として少量ずつ塗布しながら、重ね塗りを行うこととした。

その塗布状況を図として示した。この写真からもわかるように、ある程度、液滴が小さくなっていることがわかつているが、根本的な対策としては表面の清浄性が重要であることがわかつた。

## 【2-2-2】 CPCコートによる感染防止機能の実現

阻止円の直径は、塗り重ね回数が増加するにしたがってわずかずつであるが、増加することがわかった。斑を生じない最小量の塗り重ねである5回の塗り重ねで十分であることがわかった。ただし、これは、菌による培養試験であり、実際の口腔内とは状況が異なっているため、そのまま、この条件が最適であるとは限らない。基本的にはCPCはスペクトラムの広い抗菌剤であり、さまざまな菌に適用可能であると思われるが、実際の口腔内の菌に適用できるかどうかを確認する必要がある。

さらに詳細に検討するために、抗菌試験品について、ATP活性とSEM観察を行った。

### <材料>

1. プラズマのみ、他のコーティング処理なしの円板
2. 5%PP 溶液に1回浸漬塗布処理した円板
3. 5%PP 溶液に1回浸漬塗布→乾燥→1%CPC に浸漬塗布→乾燥→5%PP 溶液に1回浸漬塗布した円板
4. プラズマ処理もなしの円板（未処置）

### <方法>

- ・菌液は *S. mutans* ATCC25175 を BHI で培養後、BHI で希釈したもの。菌濃度は  $1 \times 10^5$  乘 cfu/ml
- ・12well プレートに菌液を 4ml ずつ播種
- ・円板を、上面がコーティング面となるように浸漬し、37°Cでインキュベート
- ・12, 36 時間後に濁度の評価と ATP 活性および SEM撮影
- ・SEM 試料とする円板は 0.25%グルタルアルデヒドで固定後、エタノール上昇系で脱水し、オスミウムコーティングした（12時間のみ）。

### 12時間後

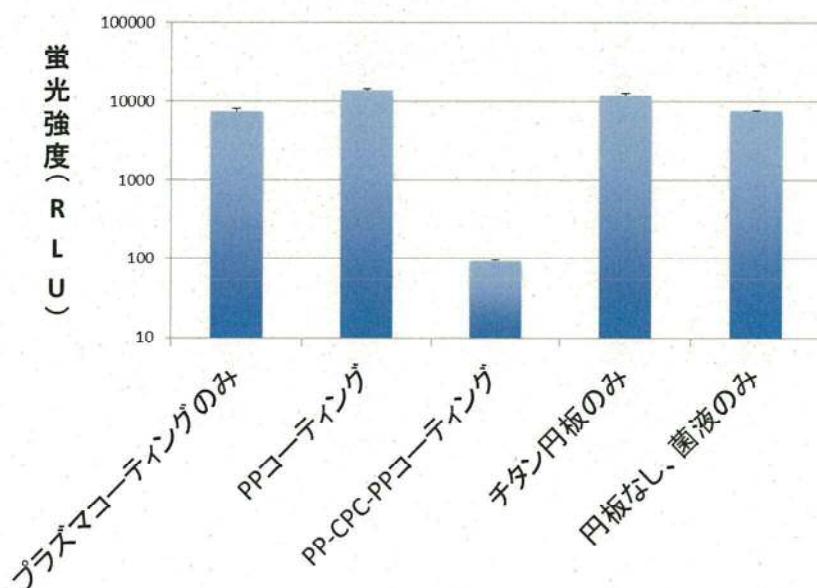


図 12時間後試料のATP活性

## 36時間後

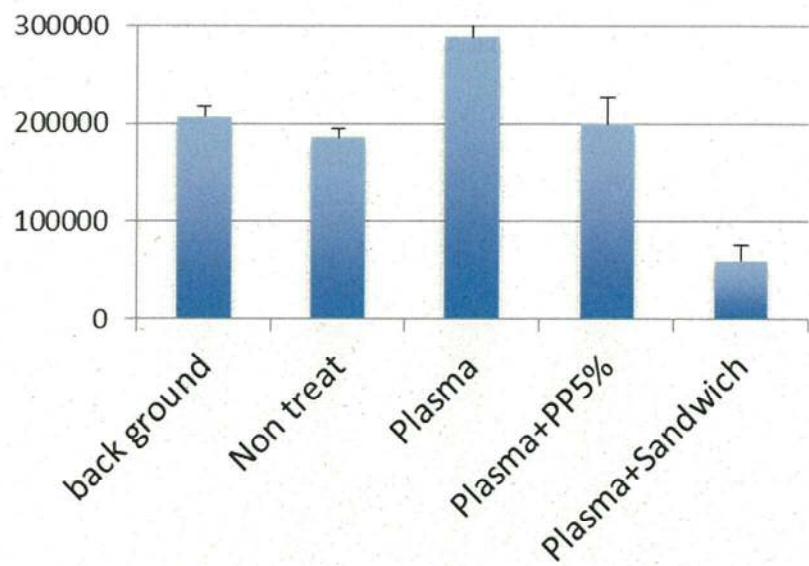


図 36 時間後試料の ATP 活性

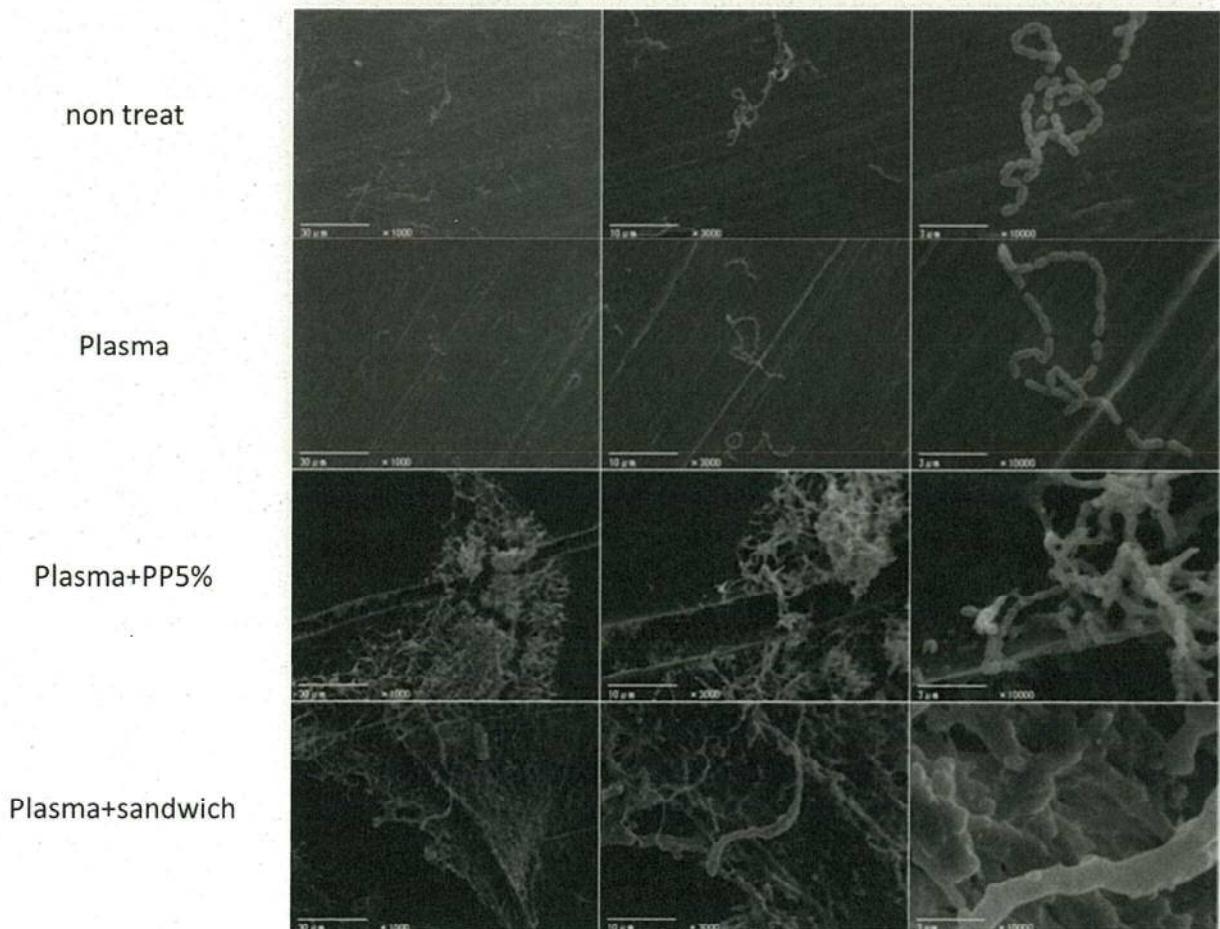


図 抗菌試験後のチタン表面

塗装品のATP活性検査から、リン酸化プルランーCPCーリン酸化プルラン塗装では、溶解しにくい構造をつくることができ、36時間後においても、抗菌性（低ATP活性）を示した。そのため、抗菌コーティングとして有効であることがわかった。

SEM観察から、プラズマ処理後にリン酸化プルランーCPCーリン酸化プルランのサンドイッチ塗装を施したものには、有機物が残留しており、徐々に溶解しながら抗菌性を示すことがわかった。

#### イヌを用いた抗菌性試験

CPCコーティングしたチタンねじをイヌの口腔内に埋込み、その状況を観察した。試験状況から、CPCコーティングを施していないチタンねじの脱落が見られた。このことは、CPCコーティングしていないねじでは感染を起こしてしまい、脱落してしまったことを示している。このことは、この感染防御用のCPCコーティングの有効性を示している。

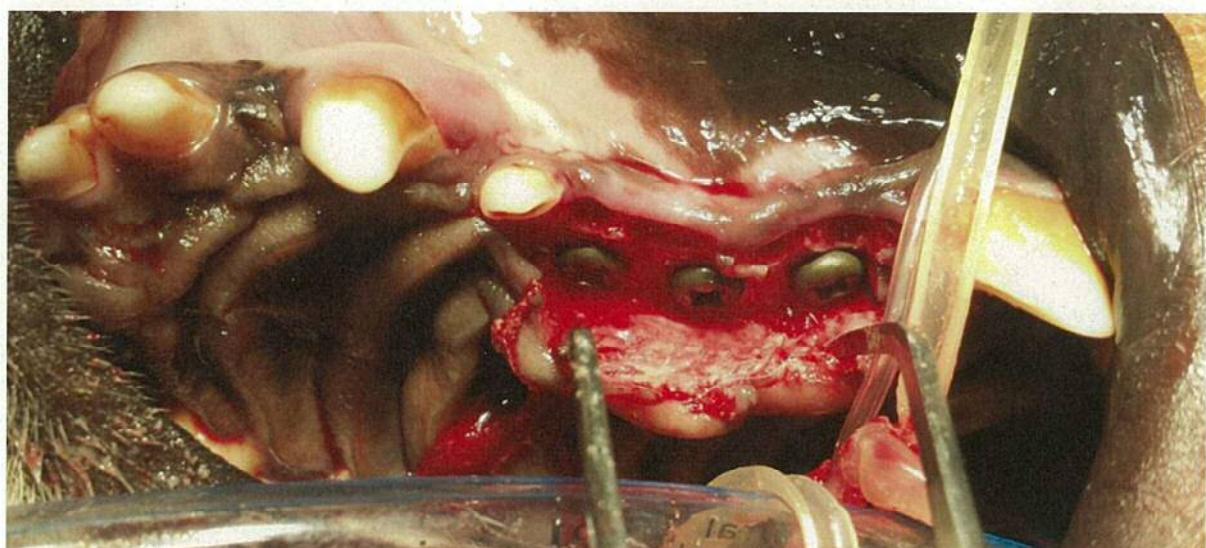


図 イヌへの埋込試験

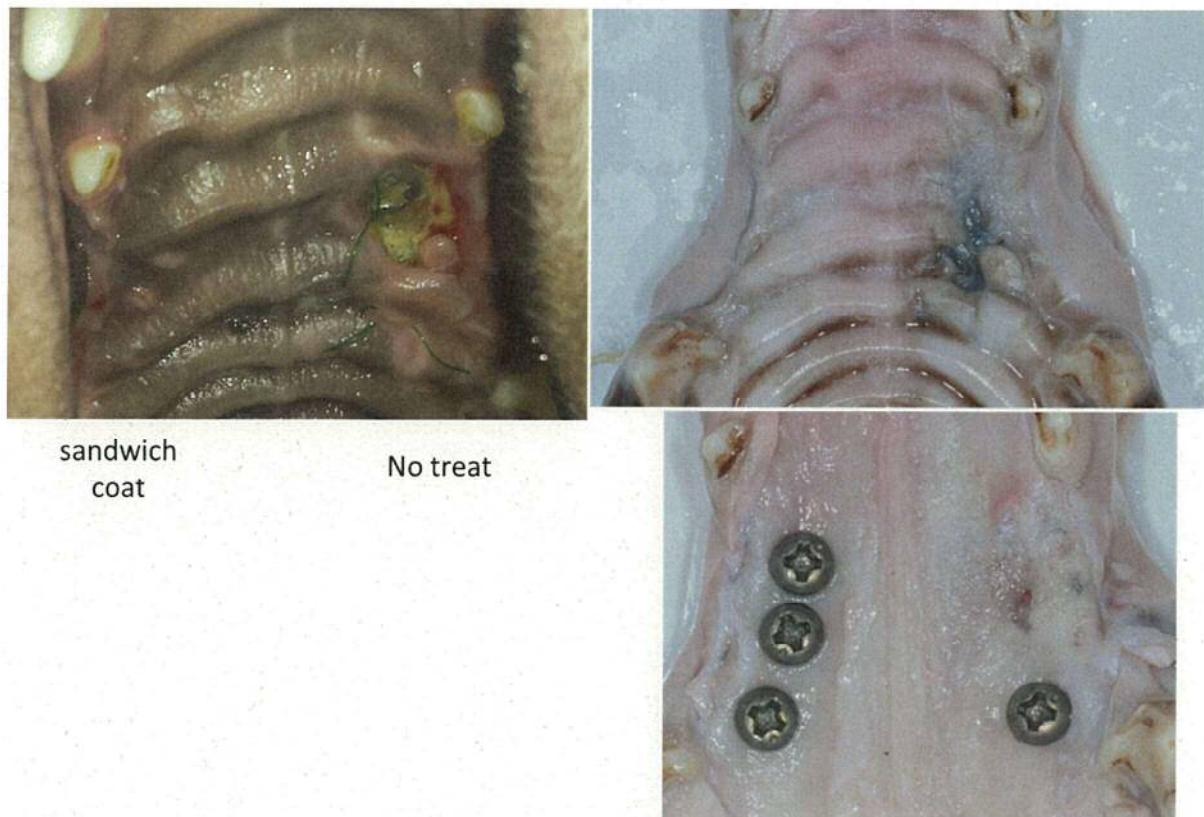


図 イヌへの埋め込み試験状況

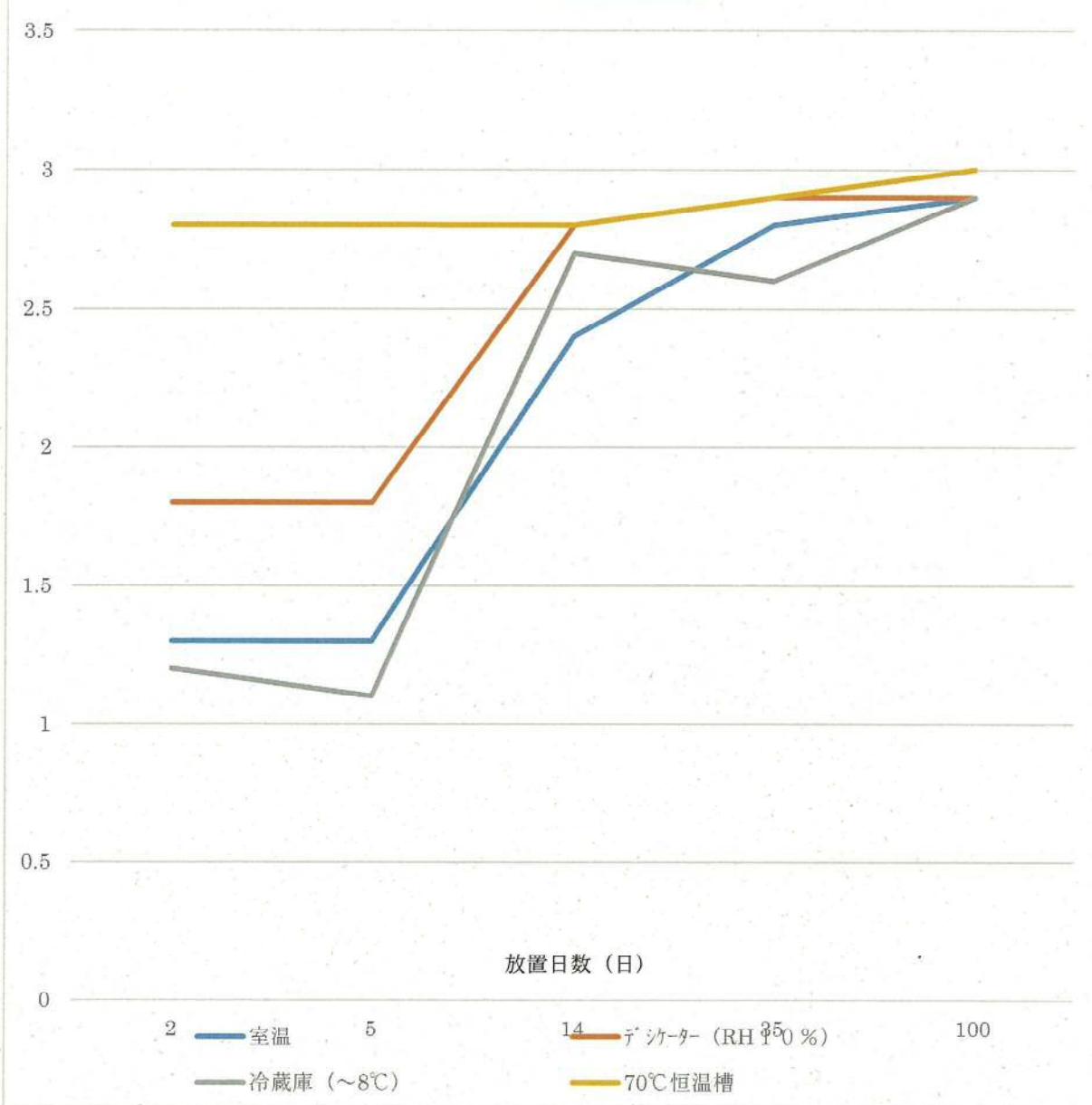
### 【2-2-3】CPCコートの安全性確保

安全性試験については、【1-3】の項と同様である。CPCについては、すでに医薬部外品等で認可されている薬品である。前項での阻止円の結果からもわかるようにリン酸化プルラン単独の場合には抗菌性を示さない。すなわち、毒性等も有していないといえる。このことからも、本項での安全性は【1-3】で述べられているものと同様である。

### 【2-2-4】品質安定性検討

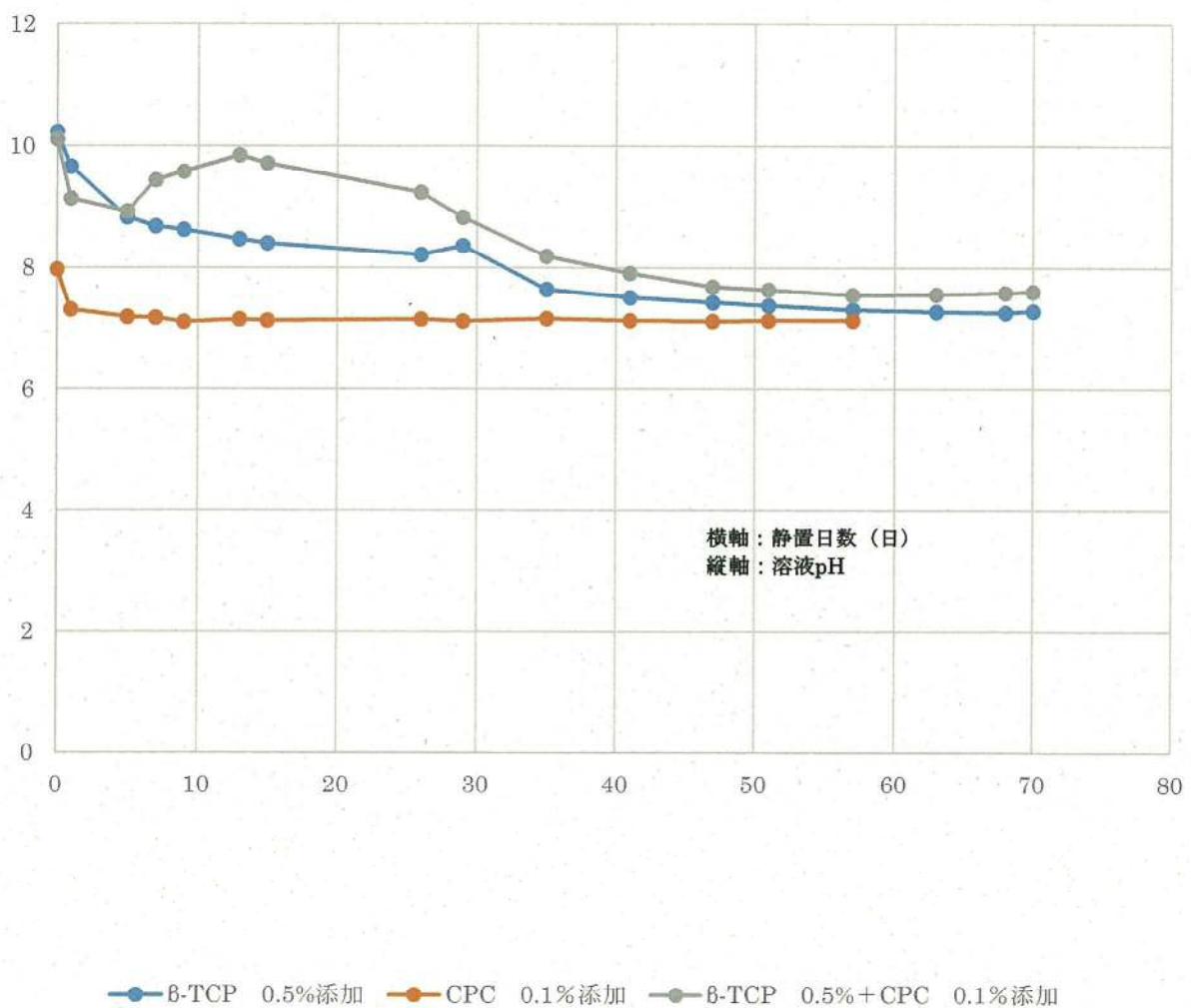
CPC-リン酸化プルランコーティングの安定性については、【2-1】で作製したチタン板での試作片を保管中であり、来年度早々に、付着性や硬度について評価を行い、抗菌性試験を行って有効性を保持しているかどうかについて判定する予定である。

## リン酸化プルラン塗膜引掻き硬度の経時変化



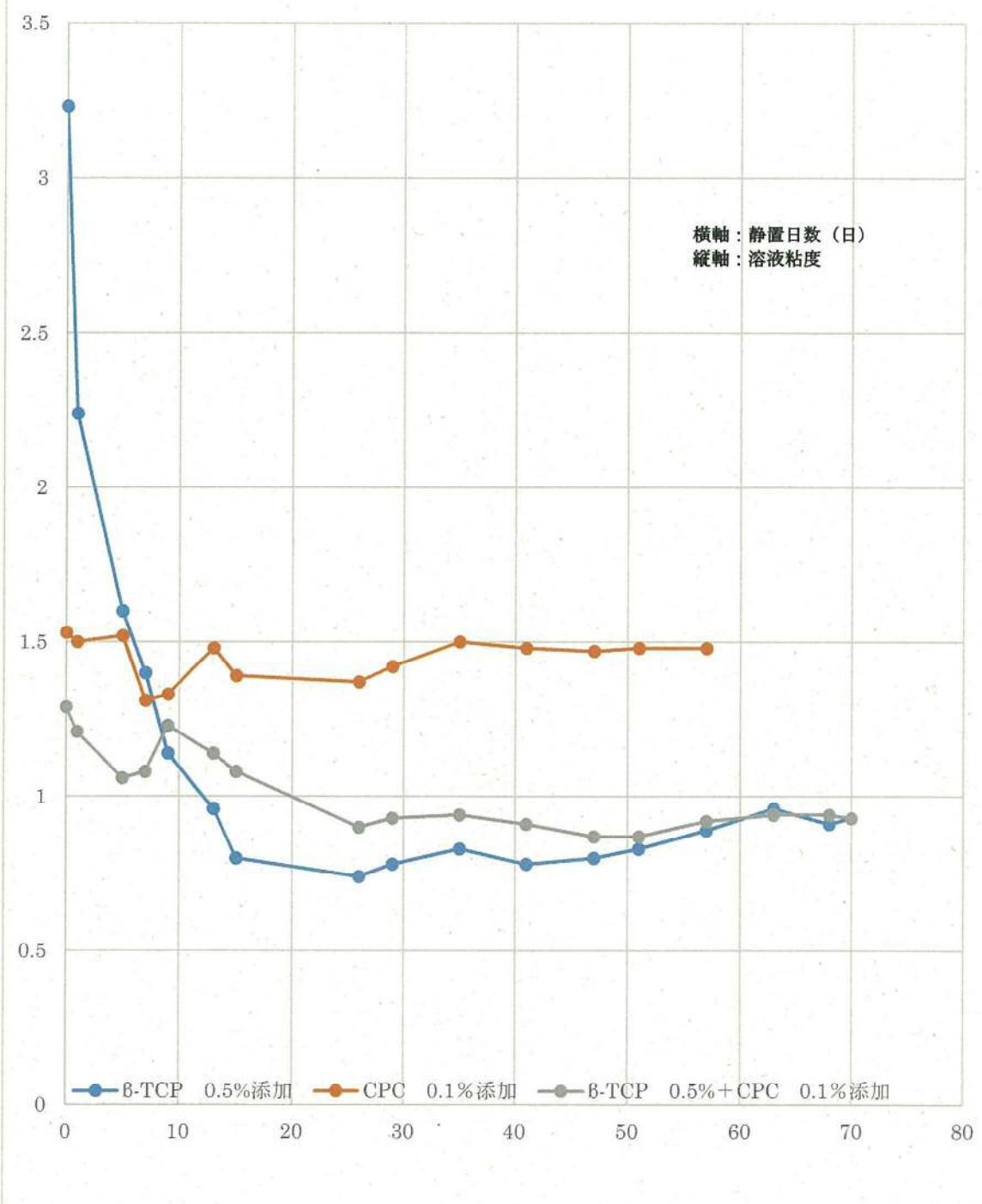
引っかき物性を評価することにより、塗膜の安定性を検討した。保存条件により、図のような結果となつた。2週間程度までは少しずつ固くなる結果が得られたが、これは水分が徐々に蒸発していくことを表していると考えられる。それは、70度で保管した場合、水分がすぐに蒸発するためにすぐ硬化して、その後、安定に推移していることがわかつた。

## 高分子量PPL水溶液に $\beta$ -TCP或いはCPC添加した溶液pHの経時変化



高分子量のリン酸化プルランに対して、今回の塗装に使う添加物である CPC や  $\beta$ TCP などを添加した場合の pH の経過時間による変化を示している。溶液では 1-2 で述べたような所期の変化がより小さくなり、安定に推移することがわかった。

高分子量PPL水溶液に $\beta$ -TCP或いはCPC添加した溶液粘度の経時変化



粘度の変化を同じ、高分子量リン酸化プルランを用いて、添加物を変えて測定したものである。 $\beta$ -TCPを加えた場合に急速に粘度低下を示したが、これは溶液中のリン酸化プルランが $\beta$ -TCPへ吸着していくことによるものであると考えられる。

## 最終章 全体総括

これまでの検討により、インプラントに対して、骨再生および感染防御の2つの機能を同時に持たせることが可能となるコーティング方法を開発した。

塗装方法は、スプレー法を基本とするが浸漬法でも可能であるように、溶液調製をすることができるよう混合方法、溶液の前処理法等を開発した。

骨再生能力に関しては、ウサギへの埋め込み試験により骨再生能を確認し、今年度イヌへの埋入試験を行い、評価を行っている。

感染防御機能の実現のために、CPC のコーティング方法の検討を行い、CPC の溶出速度の制御を行える塗装方法の開発を行った。

感染防御機能の検証に関してはイヌの口腔内で実施し、十分に有効であることがわかった。

体内での安全性については、同位体標識リン酸化プルランの分解挙動を証明することができ、製品化に向けて重要なエビデンスを確保できた。

以上の評価により、CPCによる感染防御と、リン酸カルシウムによる骨再生の促進を同時に実現する塗装をリン酸化プルランにより実施するための技術と、生体安全性のエビデンスを確保することができた。

これにより、製品化が可能な技術およびエビデンスとして活用し、製品化を目指す。

今後は動物実験と試作品へのフィードバックを繰り返しながら最終製品の完成を目指し、その間に薬事申請、製造販売のためのエビデンスを蓄積し、臨床試験（治験）を経て上市を目指す。