

低エネルギーレーザープロセスによる *in vivo* 骨組織再生

国立研究開発法人産業技術総合研究所 ナノ材料研究部門

主任研究員 大矢根 綾子

(平成 27 年度 一般研究開発助成 AF-2015215)

キーワード：レーザー，リン酸カルシウム，アパタイト，過飽和溶液

1. 研究の目的と背景

歯周病は、中高年の過半数に認められる国民病であり、細菌感染による歯周組織の炎症によって発症する。細菌増殖により歯周組織との付着（ペリオドンタルアタッチメント）が壊れ、歯周ポケットの拡大、歯槽骨の溶解へと症状が進行・重症化していくと、歯の喪失につながる。歯周病治療において感染部を除去した後の歯面は、本来の歯面に比べて歯周組織との親和性に劣るため、ペリオドンタルアタッチメントが再構築されにくい。このため、歯周ポケットが改善せず細菌の温床となり、歯周病再発の原因となる。

ヒトの硬組織である皮質骨や象牙質は、有機高分子のコラーゲン線維の上にバイオミネラルであるリン酸カルシウムが析出して合成される（バイオミネラリゼーション）。ヒトのバイオミネラルであるアパタイトとその前駆体（リン酸八カルシウム、非晶質リン酸カルシウムなど）は、優れた生体親和性を示すことが知られている。

バイオミネラリゼーション反応（リン酸カルシウム析出反応）は、体液と同様にリン酸カルシウムに対して過飽和な水溶液を用いることで、人工材料の表面でも人為的に起こすことができる。この反応は、常温・常圧でも進行することから、有機高分子などの低融点基材にも有効な、安全で温和な表面改質技術として利用されてきた。また、ある種の生理活性成分（タンパク質、生体微量元素など）を過飽和溶液中に添加することで、これらの生理活性成分をリン酸カルシウムと基材上でナノ複合化できることも報告されている [1-3]。これによって基材に、バイオミネラル単独では達成できない多様なバイオメディカル機能を付与することができる。

バイオミネラリゼーション反応を、歯周治療後の歯の表面で迅速・簡便に誘起することができれば、*in vivo* バイオミネラル再生の効果により、歯面に生体親和性を付与できると期待される。近年、報告者らは、過飽

和溶液中に設置された基材上に低エネルギーパルスレーザー光を照射することで、基材表面の目的領域に、迅速に（30 分以内に）リン酸カルシウムを析出できることを報告してきた [4-6]。本研究では、歯周治療における上述の課題解決を目的とし、この低エネルギーレーザープロセスを利用した *in vivo* バイオミネラル再生技術の構築を目指した。

まず、歯質のモデル物質として焼結水酸アパタイト（sHA）基材を用い、過飽和溶液中での低エネルギーレーザープロセス [4-6] により、同基材表面にリン酸カルシウムを析出させるための条件（レーザー光波長、照射時間）を検討した。次に、選定された条件のもと、過飽和溶液にフッ化物イオンを添加し、フッ素担持リン酸カルシウムの析出を試みた。フッ素は、歯質強化作用、抗菌性の他、骨形成促進・骨吸収抑制効果を有することが知られている。本研究では、基材上に析出したフッ素担持リン酸カルシウムの抗菌性を、う蝕原因菌である *Streptococcus mutans* 菌を用いて評価した。得られた結果を基に、*in vivo* バイオミネラル再生における、本低エネルギーレーザープロセスの有効性を検証した。

2. 研究方法

2. 1. 基材および過飽和溶液の準備

大きさ 10 mm × 10 mm、厚さ 2 mm の sHA 平板および直径 5 mm、厚さ 2 mm の sHA 円板（いずれも Hoya Technosurgical 製）を、エタノールで超音波洗浄後、風乾し、基材として用いた。表面構造解析（2. 3.）には平板状基材を用い、抗菌試験（2. 4.）には円板状基材を用いた。

フッ素無添加のリン酸カルシウム過飽和溶液は、NaCl（最終濃度 142 mM）、K₂HPO₄·3H₂O（1.5 mM）、1M-HCl（40 mM）、CaCl₂（3.75 mM）を超純水に順に溶解した後、トリスヒドロキシメチルアミノメタン（50 mM）および 1M-HCl（必要量）を添加し、溶液 pH を

7.40 (25 °C) に調整することにより調製した [1]。調製後の CP 液は冷蔵保管し、使用期限は調製後 1 カ月とした。フッ素添加過飽和溶液は、レーザープロセスの直前に、上記のフッ素無添加過飽和溶液に NaF (1 mM) を溶解することで調製した。

2. 2. レーザープロセス

sHA 基材を、5 mL のフッ素無添加あるいはフッ素添加過飽和溶液に浸漬した。溶液温度は恒温水槽を用いて 25 °C に調整した。sHA 基材の表面の中央領域 (直径 5 mm) に、Nd:YAG ナノ秒パルスレーザー (30 Hz, Quanta-Ray LAB-150-30, Spectra-Physics 製) を用い、基本波 (近赤外光 : 1064 nm)、第 2 次高調波 (可視光 : 532 nm) または第 3 次高調波 (紫外光 : 355 nm) の非集光ビーム (6 W/cm²) を 5 分間あるいは 30 分間照射した (図 1)。照射後の基材を過飽和溶液から取り出し、超純水で洗浄後、風乾した。

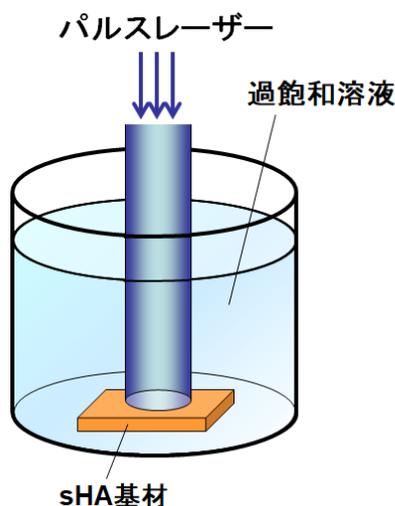


図 1 低エネルギーレーザープロセス (平板状基材使用時)

2. 3. 表面構造解析

レーザープロセス後の sHA 基材 (平板状) にカーボン蒸着を施し、レーザー光照射部位および非照射部位の表面形態および化学組成を、走査電子顕微鏡 (SEM) 観察およびエネルギー分散型 X 線分光 (SEM-EDX) 分析により調べた。

また、レーザー光照射部位に生じた析出物をカーボングリッド上にマウントし、その形態、結晶構造、および化学組成を、透過電子顕微鏡 (TEM) 観察、制限

視野電子線回折 (SAED) 分析、高角度環状暗視野 (HAADF) 走査 TEM (STEM) 観察、および STEM-EDX 分析により調べた。

2. 4. 抗菌試験

レーザープロセス後の sHA 基材 (円板状) を 48 ウェル内に設置し、*Streptococcus mutans* 菌 (ATCC35668) を生着させた (5.5×10⁶ CFU/0.5 mL/well)。8 時間嫌気培養した後、基材を別のウェルに移してさらに 24 時間培養した。培養後の培地の濁度 (波長 590 nm) を、濁度計を用いて測定することにより、基材の抗菌性を評価した。

各条件につき 3 枚の基材を用い、濁度の平均値および標準偏差を算出した。Student's t-test による検定を行い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

3. 研究成果

3. 1. レーザー光波長の検討 [7]

まずフッ素無添加の過飽和溶液を用い、各波長のレーザー光を、平板状 sHA 基材の表面中央領域 (直径 5 mm) に 30 分間照射した (図 1)。照射部位と非照射部位をそれぞれ SEM 観察および SEM-EDX 分析で評価した結果、紫外 (355 nm) レーザー照射では、照射部にのみ、リン酸カルシウムと考えられる薄板状の析出物が認められた (図 2、左列)。同析出物の STEM-EDX 分析および SAED 分析の結果から、同析出物はリン酸

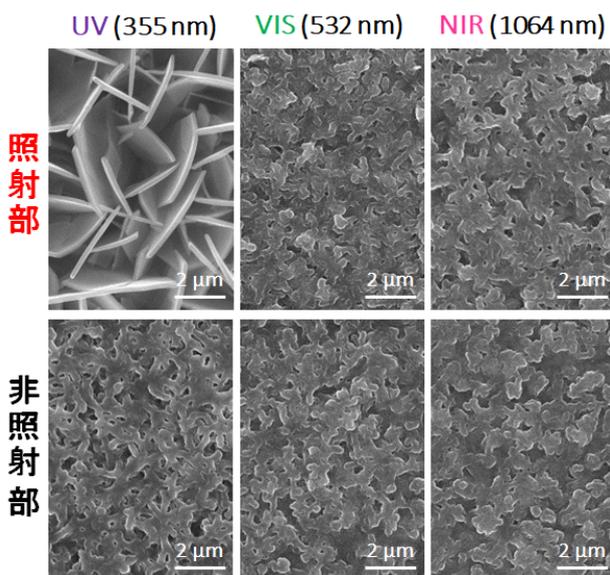


図 2 フッ素無添加の過飽和溶液中で、紫外 (左列)、可視 (中列)、および近赤外 (右列) レーザー光を照射した後の sHA 基材表面の、照射部 (上段) および非照射部 (下段) の SEM 像

八カルシウムと同定された。このことから、sHA 基材への紫外レーザー照射により、sHA 表面にリン酸八カルシウムが析出したことが分かった。

一方、可視光 (532 nm) および近赤外光 (1064 nm) レーザーの照射では、照射部位と非照射部位の表面構造ならびに化学組成に違いは認められなかった (図 2、中・右列)。これらのレーザー光には、リン酸カルシウムの析出反応を促進する効果はほとんどないと考えられた。これは、sHA 基材の光吸収性が、紫外領域で高く、可視光および近赤外光領域で低いためと考えられる。以上の結果から、sHA 基材表面にリン酸カルシウムを迅速析出させるためには、可視光および近赤外レーザー照射よりも、紫外レーザー照射の方が適していることが確認された。

3. 2. フッ素添加効果および照射時間の検討 [7]

3. 1. で得られた結果に基づき、レーザー光波長を 355 nm (紫外光) に固定し、過飽和溶液へのフッ素添加および照射時間がリン酸カルシウム析出反応に与える影響について検討した。前項と同じ平板状 sHA 基材を用い、フッ素無添加およびフッ素添加ありの過飽和溶液中で、5 分または 30 分間、紫外レーザー照射を

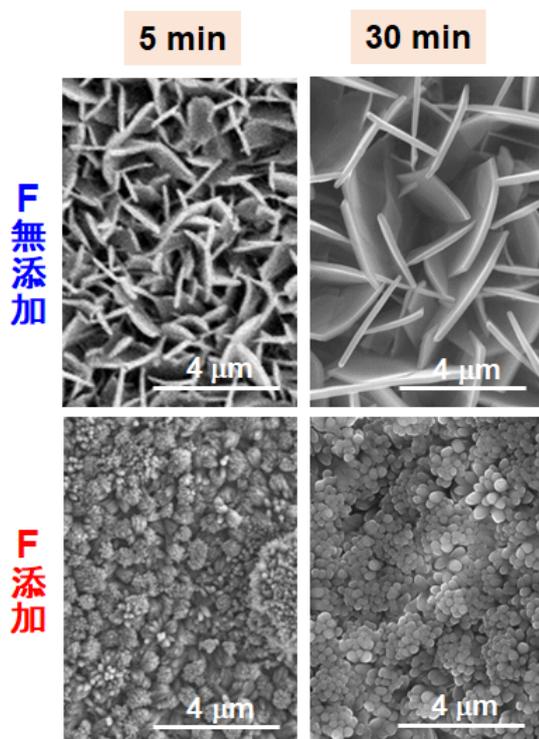


図 3 フッ素無添加 (上段) およびフッ素添加あり (下段) の過飽和溶液中で紫外レーザー光を 5 分間 (左列) または 30 分間 (右列) 照射した後の sHA 基材表面 (照射部) の SEM 像

行った。

SEM 観察の結果、フッ素無添加の過飽和溶液中では、レーザー照射 5 分後には基材上にミクロンサイズの薄板状析出物が認められ、これらの薄板が照射時間とともに成長することが分かった (図 3、上段)。同析出物には、SEM-EDX 分析において、炭素 (蒸着膜に由来)、カルシウム、リン、および酸素が検出されたが、フッ素は検出されなかった。

一方、フッ素添加ありの過飽和溶液中では、照射 5 分後には基材上にサブミクロンサイズの粒状析出物が生成し、30 分後にはそれらが成長し、基材表面に隙間なく高密度に集積することが分かった (図 3、下段)。同析出物の SEM-EDX スペクトルには、いずれの照射時間においても、カルシウム、リン、酸素に加えて、わずかにフッ素が検出された (図 4)。この結果から、照射 5 分後には既に、フッ素を含むリン酸カルシウムが sHA 基材表面に析出したことが確認された。

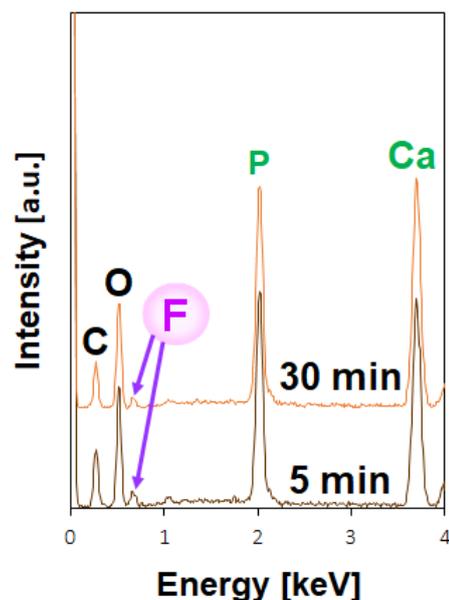


図 4 フッ素添加過飽和溶液中で紫外レーザー光を 5 分間または 30 分間照射した後の sHA 基材表面 (照射部) の SEM-EDX スペクトル (炭素: 蒸着カーボン)

フッ素添加過飽和溶液中で、紫外レーザー照射 30 分後に生成した析出物について、TEM による精密分析を行った。図 5 (左上) の TEM 像から、SEM 観察において粒状に見えた析出物 (図 3、右下) は、基材表面に対し垂直方向に密に配列した針状析出物であると考えられた。STEM-EDX による化学組成分析、および SAED

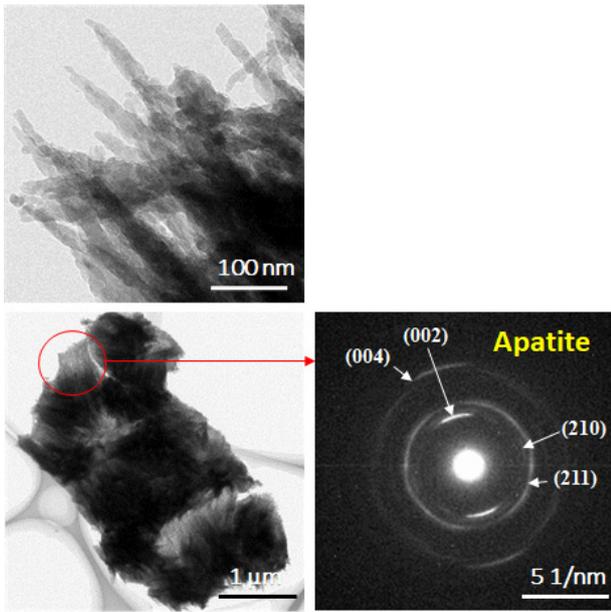


図 5 フッ素添加過飽和溶液中での紫外レーザー照射（30 分間）により sHA 基材表面（照射部）に生成した析出物の TEM 像（左上：強拡大、左下：弱拡大）および SAED パターン（右下）

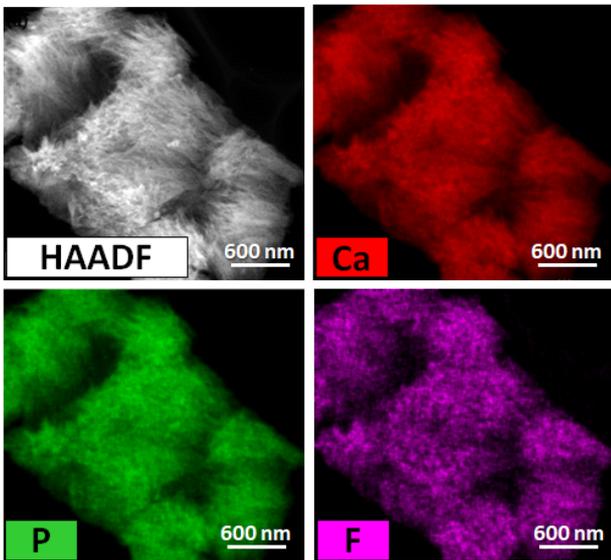


図 6 フッ素添加過飽和溶液中での紫外レーザー照射（30 分間）により sHA 基材表面（照射部）に生成した析出物の HAADF 像（左上）、ならびにフッ素（右上）、カルシウム（左下）、リン（右下）の STEM-EDX 元素マッピング像

分析による結晶構造解析（図 5、下段）の結果から、同析出物は、c 軸配向したフッ素担持水酸アパタイトであると考えられた。図 6 に、同析出物の HAADF 像（左上）ならびに STEM-EDX によるフッ素（右上）、カルシウム（左下）、リン（右下）の元素マッピング像を示す。フッ素は、カルシウムおよびリンと同様の分布を示したことから、水酸アパタイトからなるマトリックス中に均一に担持されていることが分かった。フッ素は水酸アパタイト結晶中の水酸基の一部を置換しているものと考えられる。

以上の結果から、過飽和溶液中にフッ素を添加することにより、紫外レーザー照射後に sHA 基材表面に析出するリン酸カルシウムが、板状のリン酸八カルシウム結晶から、針状のフッ素担持水酸アパタイト結晶へと変化することが分かった。フッ素担持水酸アパタイトは、フッ素を含まない水酸アパタイトやリン酸八カルシウムよりも耐酸性に優れることから、これを歯の表面に析出させることで、歯質保護膜として機能する可能性がある。

3. 3. 抗菌性評価

3. 2. で得られた結果に基づき、紫外レーザーの照射時間を 5 分間に固定し、フッ素無添加およびフッ素添加ありの過飽和溶液中で処理された基材の抗菌性を評価した。

嫌気培養後の細菌懸濁液の濁度（細菌濃度と正の相関を持つ）を比較した結果（図 7）、フッ素添加過飽和

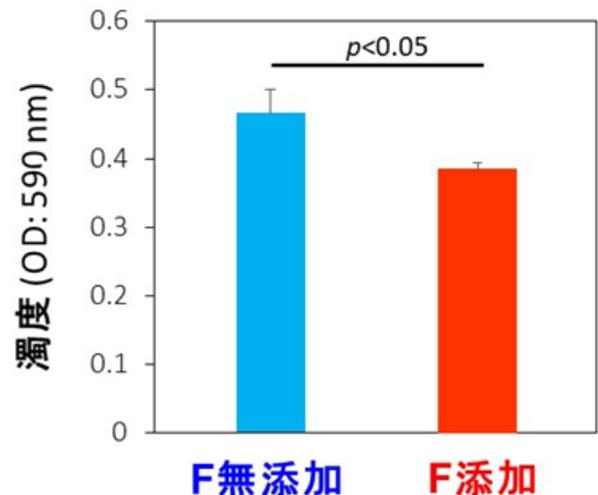


図 7 フッ素無添加およびフッ素添加ありの過飽和溶液中で紫外レーザー光を 5 分間照射した後の sHA 基材の抗菌性評価結果（培養後の *Streptococcus mutans* 菌懸濁液の濁度；平均値 + 標準偏差、n = 3）

溶液中で処理された基材は、フッ素無添加の過飽和溶液中で処理された基材に比べ、*Streptococcus mutans* 菌の増殖を有意に抑制することが分かった。これは、前者の基材表面に析出したフッ素担持水酸アパタイトから、抗菌作用を示すフッ化物イオンが溶出したことによると推定される。

4. まとめ

フッ素添加過飽和溶液中で sHA 基材表面に低エネルギー密度の紫外レーザー光を照射することにより、同表面に迅速に（5 分以内に）フッ素担持水酸アパタイトを析出できることが分かった。基材として用いた sHA は象牙質やエナメル質の主要無機成分であることから、本低エネルギーレーザープロセスが、歯の表面における *in vivo* バイオミネラル再生に有効である可能性が示唆された。さらに、本法により得られたフッ素担持アパタイトが *Streptococcus mutans* 菌に対し抗菌性を示したことから、本法によって歯の表面に、バイオミネラル由来の生体親和性だけでなく、フッ素由来の抗菌性を付与できる可能性が示された。さらなる検討が必要ではあるが、歯周治療後の歯面改質への応用が期待される。

謝辞

本研究は、国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究部門の ARPUTHARAJ Joseph Nathanael 博士、中村真紀博士、坂巻育子氏、ならびに北海道大学大学院歯学研究院の宮治裕史博士、葎佳奈子氏と共同で実施された。TEM 分析においては、産業技術総合研究所 TIA 推進センター電子顕微鏡施設の齋藤徳之氏および吉澤徳子博士にご協力を頂いた。また、本研究に多大なご支援を頂いた公益財団法人天田財団に感謝の意を表す。

参考文献

- [1] M. Uchida et al, *Adv Mater*, **16**, 1071 (2004)
- [2] X.P. Wang et al, *Biofabrication*, **3**, 122001 (2011).
- [3] A. Oyane et al, *Acta Biomaterialia*, **8**, 2034 (2012).
- [4] A. Oyane et al, *J Biomed Mater Res A*, **100A**, 2573 (2012).
- [5] A. Oyane et al, *RSC Adv*, **4**, 53645 (2014).
- [6] M. Nakamura et al, *J Mater Chem B*, **4**, 6289 (2016).
- [7] A.J. Nathanael et al, *Acta Biomaterialia*, **79**, 148 (2018).