



A. Oyane

過飽和液中レーザー照射による リン酸カルシウム成膜技術と歯面改質応用

大矢根 綾子*

1. まえがき

ヒトの硬組織（歯や骨）を構成する主な無機鉱物（バイオミネラル）はリン酸カルシウム（CaP）結晶の一種、アパタイトであり、アパタイトに対して過飽和な体液中で合成される。このような、生物によるバイオミネラルの合成反応はバイオミネラリゼーションと呼ばれる。アパタイトをはじめ、 β 型リン酸三カルシウム、リン酸八カルシウムなどのある種の CaP 結晶は、優れた生体親和性と骨伝導性を示すことから、人工骨や骨再生用材料の素材、金属製インプラントの表面改質剤などとして臨床応用されてきた。

金属製インプラントへの CaP 成膜技術としては溶射法などの高温プロセスが主流であるが、体液に類似の CaP 過飽和溶液中で基材表面に CaP を析出させる成膜法「過飽和溶液法」が、生体バイオミネラリゼーションに倣った温和な CaP 成膜法として注目されている。過飽和溶液法によれば、有機高分子などの低融点基材にも CaP を成膜できるほか、天然バイオミネラルに類似した構造・組成を有するアパタイトを合成することもできる。ただし、従来の過飽和溶液法は一般に、複雑かつ長時間の工程を必要とし、実用性に劣っていた。

筆者らは近年、過飽和溶液法にレーザー照射プロセスを導入することで、迅速・簡便、かつ部位選択的な CaP 成膜技術「過飽和液中レーザー照射法」¹⁾を開発した。以下に、この技術の概要と、歯面改質応用に関する最近の研究成果を紹介する。

2. 過飽和液中レーザー照射法

過飽和液中レーザー照射法は、過飽和溶液中での CaP 析出・成長反応（人工バイオミネラリゼーション）を、レーザー光によって誘起・加速する技術である¹⁾。例えば、金属材料に替わる次世代インプラント材料として注目されているポリエーテルエーテルケトン（PEEK）基材に対しては、CaP 過飽和溶液（pH = 7.40, 25°C）中で Nd:YAG レーザーの非集光ビーム（355 nm, 30 Hz, 2 W/cm²）を 30 分照射するだけで（図 1）、照射域にアパタイトを成膜することができる（図 2 左）²⁾。従来の過飽和溶液法で必要とされる複雑な前処理も、過飽和溶液への長時間の浸漬工程（通常 1 日～数日）も必要としない。また、同基材のレ

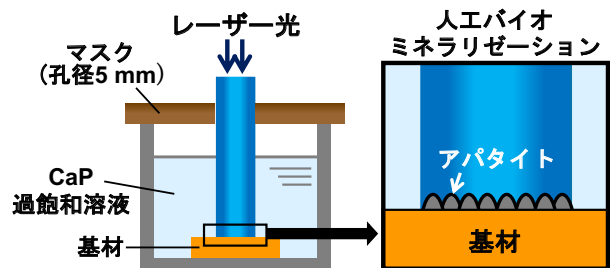


図 1 過飽和液中レーザー照射法の模式図

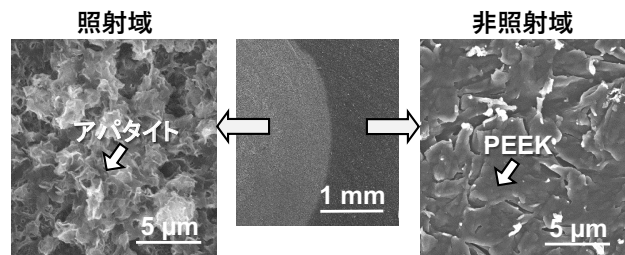


図 2 過飽和液中レーザー照射法によりアパタイトを成膜した PEEK 基材表面（照射域（左）、境界域（中）、非照射域（右））の走査電子顕微鏡（SEM）²⁾

ザー光非照射域に影響を与えることなく（図 2 右）、照射域のみ選択的に成膜を行うことができる。

過飽和液中レーザー照射法によって得られるアパタイト膜の細胞親和性を調べるため、アパタイト未成膜および成膜後の PEEK 表面に骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）を播種し、7 日間まで培養を行った。水溶性テトラゾリウム塩による比色定量の結果、PEEK 基材へのアパタイト成膜によって細胞の増殖が有意に促進されることを確認した（図 3 左）²⁾。この結果は、培養 7 日後の各基材表面の細胞核染色像（図 3 右）からも裏付けられる。以上より、本法で形成されるアパタイト膜も、良好な細胞親和性を示すことが確認された。

過飽和液中レーザー照射法における人工バイオミネラリゼーションの反応過程は次のように説明される^{1, 2)}。まず、基材がレーザー光を吸収し、表面粗さの増大、表面官能基の導入、水濡れ性の増加（図 4 左）といった表面構造変化を起こすことで、CaP 析出に有利な表面環境を形成す

* 産業技術総合研究所 ナノ材料研究部門 研究グループ長

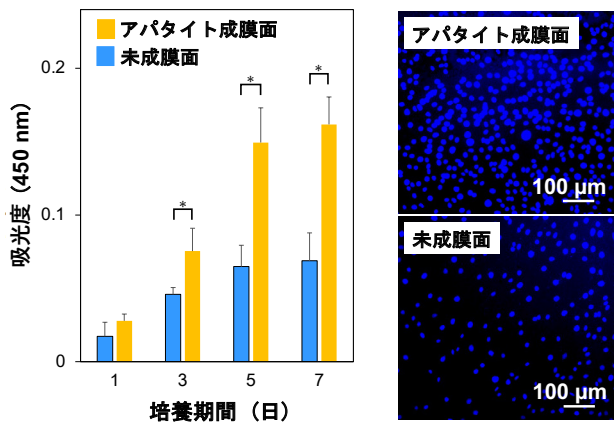


図3 過飽和液中レーザー照射法によりアパタイトを成膜した PEEK 基材および未成膜基材表面での細胞増殖性：(左) 培養7日後までの細胞数変化 (n=4, * $p < 0.05$)、(右) 培養7日後の細胞核染色像²⁾

る。これに並行して、基材に吸収されたレーザー光エネルギーの一部が熱に変換され、レーザー光照射域および照射域近傍の溶液を加温する (図4右)。アパタイトの溶解度は、25°C付近では液温上昇により低下する。従って、照射域近傍における液温上昇は、物質移動速度の増加だけでなく過飽和度のさらなる増大を通じて³⁾、CaPの核形成・結晶成長を加速する効果を持つ。これらの、レーザー光照射による基材の表面修飾と溶液加熱の複合的な効果によって、照射域において選択的にCaPが迅速析出すると考えられる。

上述の通り、過飽和液中レーザー照射法によるCaP成膜技術においては、基材のレーザー光吸収が重要な役割を持つ^{4,5)}。基材の光吸収特性に応じて適切なレーザー光波長を選択し、照射条件(パワー密度、照射時間など)を調整することで、様々な材料基材に本成膜技術を適用することができる。これまでに、過飽和液中レーザー照射法によるCaP成膜を確認した人工材料としては、PEEKに加えて、ポリエチレンテレフタレート⁴⁾、エチレンビニルア

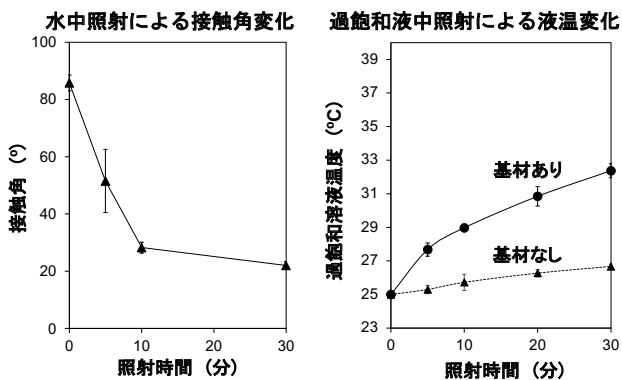


図4 (左) 水中レーザー照射によるPEEK基材表面の接触角変化、および(右) PEEK基材への過飽和液中レーザー照射によるCaP過飽和溶液の温度変化²⁾

ルコール共重合体⁶⁾、焼結水酸アパタイト⁵⁾、チタン金属^{7,8)}、コバルトクロム合金⁹⁾、歯科用コンポジットレジン(無機フィラー含有アクリル系高分子)¹⁰⁾が挙げられる(いずれも30 HzのNd:YAGレーザー使用)。

3. 歯面改質応用研究

筆者らは、過飽和液中レーザー照射法の強み(迅速・簡便性、部位選択性)を活かした応用先として歯面改質を着想し、北海道大学大学院歯学研究院と共同で、歯質のモデル物質(焼結水酸アパタイト基材)を用いた基礎検討を行った。歯面を改質・高機能化するため、抗菌作用と歯質強化作用(耐酸性向上効果)の期待されるフッ素をCaP過飽和溶液に添加することで、フッ素含有アパタイトの成膜を試みた。条件検討の結果、フッ素(NaF)を1~3 mM添加した過飽和溶液中、Nd:YAGレーザーの非集光ビーム(355 nm, 30 Hz, 6 W/cm²)を30分照射することで、基材表面のレーザー光照射域にフッ素含有アパタイトを成膜できることを明らかにした⁵⁾。得られたフッ素含有アパタイト膜は、う蝕原因菌(*Streptococcus mutans*)に対し抗菌性を示したほか、焼結水酸アパタイト基材を上回る耐酸性(pH=5.4のクエン酸緩衝液中での溶解性試験による)を示した⁵⁾。生成膜の優れた耐酸性は、フッ化物イオンが水酸アパタイト結晶の水酸基の一部を置換し、結晶の溶解度を低下させた効果によると考えられる。これらの結果から、本法で得られるフッ素含有アパタイト膜が、抗菌性と耐酸性を併せ示す歯面改質材として機能する可能性を確認した。

以上の基礎検討結果に基づき、北海道大学病院と産業技術総合研究所の倫理委員会での審査と機関承認を受け、ヒト抜去歯牙由来の基材を用いた自主臨床研究を進めた。まず、インフォームドコンセントを得た患者より抜去歯牙(通常の治療目的で抜去された歯牙)の提供を受け、ヒト象牙質基材を作製した。同基材をフッ素(1 mM)添加過飽和溶液中に設置し、モデル物質と同条件でレーザー光を30分照射した。その結果、モデル物質と同様、照射域のみにフッ素含有アパタイトを成膜できることを確認した(図5)¹¹⁾。透過電子顕微鏡(TEM)およびエネルギー分散型X線分光器(EDX)による分析の結果、生成膜は、フッ素を一様に含む柱状ナノ結晶からなる厚さ数ミクロンの膜

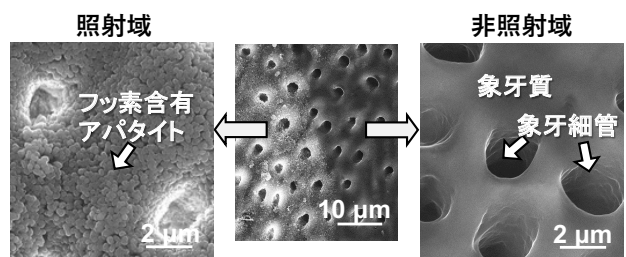


図5 過飽和液中レーザー照射法によりフッ素含有アパタイトを成膜した象牙質基材表面(左:照射域、中:境界域、右:非照射域)のSEM像¹¹⁾

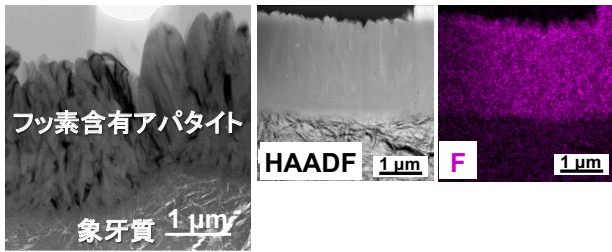


図6 過飽和液中レーザー照射によりフッ素含有アパタイトを成膜した象牙質基材の表層断面の(左)TEM像、走査型TEMによる(中)高角散乱環状暗視野(HAADF)像および(右)EDXフッ素マッピング像¹¹⁾

であり、象牙質基材と隙間なく接合・一体化していた(図6)。電子線回折法による分析の結果、柱状ナノ結晶は、基材表面に対し概ね垂直方向にc軸配向したアパタイト結晶であった。この配向構造は、結晶成長過程における幾何学的選別作用によると考えられる。以上の分析において、象牙質基材の内部には、レーザー光照射による顕著な構造・組成変化は認められなかった。また、抗菌試験の結果、象牙質基材の表面に生成したフッ素含有アパタイト膜も、*Streptococcus mutans* に対し抗菌性(増殖抑制効果)を示すことを明らかにし(図7)、本成膜法による歯面の抗菌化を基礎的に実証した。

筆者らは近年、Nd:YAGレーザーに替えて、歯科臨床で使用されている半導体レーザー(808±10nm、連続波)を用いた検討も進めてきた。このレーザー光波長では、歯質によるレーザー光吸収性が人工バイオフィジレーションの誘導に不十分であったことから、800nm付近に最大吸収を持つ医薬品(造影剤)インドシアニンググリーン(ICG)を、光吸収剤として象牙質基材の表面に塗布した。ICGを塗布した基材の表面に、フッ素(1mM)添加過飽和溶液中で歯科用半導体レーザーを3分間照射したところ、照射域におけるフッ素含有アパタイト膜の生成を確認した(図8左)¹²⁾。生成したフッ素含有アパタイト膜は1μm強の厚みを持ち、Nd:YAGレーザー照射による生成膜(図6)と同様、基材表面に対し概ね垂直方向にc軸配向した柱状ナノ結晶からなり、下地の象牙質と隙間なく接合・一体化していた(図8左)。走査型TEM-EDX分析において、生成膜の内部および象牙質との界面にICGの成分元素(S)は検出されなかったことから、基材に塗布されたICG層はアブレーションによってほぼ消失したと考えられた。なお、基材へのICG塗布工程を除くと、膜生成は認められなくなった。

以上の結果から推定される、ICG併用過飽和液中レーザー照射法における人工バイオフィジレーションの反応過程を図9に示す。照射前の基材表面には、予め塗布されたICG層が存在する(図9左)。過飽和液中レーザー照射下、このICG層がレーザー光を吸収し、照射域および照

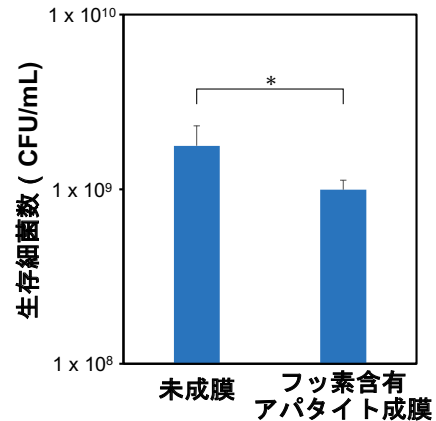


図7 過飽和液中レーザー照射によりフッ素含有アパタイトを成膜した象牙質基材および未成膜基材の共存下で12時間培養後の生存細菌数(n=4, *p<0.05)¹¹⁾

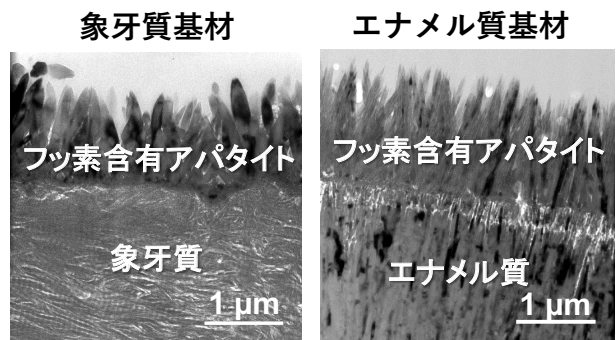


図8 ICG併用過飽和液中レーザー照射によりフッ素含有アパタイトを成膜した(左)象牙質基材および(右)エナメル質基材の表層断面のTEM像^{3,12)}

射域近傍の溶液を加温しつつアブレーションされる。アブレーションにより露出した象牙質アパタイトを足場としてフッ素含有アパタイト結晶が析出し、照射3分後には、長さ1μmを超える柱状結晶へと成長する(図9右)。この成長過程における結晶の幾何学的選別作用によって、基材表面に対し概ね垂直方向にc軸配向した柱状結晶の集合体からなる生成膜となる。

ICG併用過飽和液中レーザー照射法によれば、わずか3分という極めて短時間のレーザー光照射によって、象牙質基材の表面にフッ素含有アパタイトを成膜できることが分かった。本成膜技術は、ヒト象牙質基材だけでなく、ヒトエナメル質基材に対しても有効であった(図8右)³⁾。現在、ヒトセメント質への成膜についても確認中である。

歯面改質のためのCaP成膜技術には、歯科医が通常の診療時間・設備で実施可能な迅速・簡便性に加え、歯面の標的領域のみに成膜可能な部位選択性が求められる。本稿で紹介した過飽和液中レーザー照射法はこれらの要件を満たすことから、歯面を保護・高機能化するための新たなツールとしての応用が期待される。

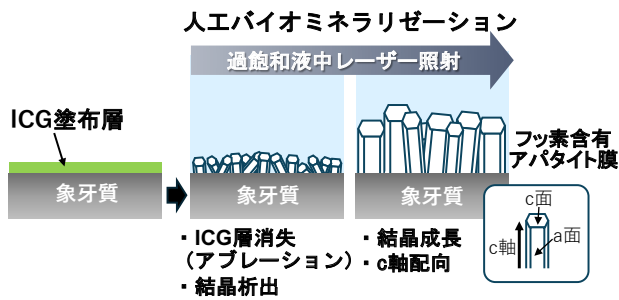


図9 ICG併用過飽和液中レーザー照射法における象牙質基材表面での人工バイオミネラリゼーション過程の模式図

4. まとめ

過飽和液中レーザー照射法は、レーザー光により人工バイオミネラリゼーションを誘起・加速する技術であり、従来の過飽和溶液法よりも迅速・簡便に、ヒト象牙質基材を含む様々な基材の標的領域に、部位選択的にCaP（アパタイトなど）を成膜することができる。また、フッ素などの薬物を反応液（CaP過飽和溶液）に添加することで、生成膜の機能（耐酸性、抗菌性など）の制御・向上も可能である。ただし本技術には、今後検討すべき課題（安全性評価、生成膜の力学的性質・耐久性評価など）も多い。生体材料や歯面の改質・高機能化技術としての応用に向けて、さらなる研究開発が求められる。

謝辞

本研究は、公益財団法人天田財団一般研究助成およびJSPS 科研費（15H00906, 15F15331, 17H02093, 19K22991, 19K10103, 20H04541, 22K09976, 22K19927, 22H05148, 23K11821）などの支援を受けて実施されました。

研究実施にあたっては、産業技術総合研究所の中村真紀博士、小沼一雄博士、A.J. Nathanael博士、坂巻育子氏、牧野雅氏、齋藤徳之氏、北海道大学の宮治裕史博士、田中佐織博士、薮佳奈子博士（現北海道医療大学）、その他関係

各位よりご支援・ご協力をいただきました。また、本研究の一部で、昭和薬品化工株式会社（現株式会社ジーシー昭和薬品）より貸与を受けた歯科用半導体レーザーを使用しました。

参考文献

- [1] M. Nakamura and A. Oyane : J. Mater. Chem. B, 4, 6289 (2016).
- [2] A. Oyane, M. Nakamura, I. Sakamaki, Y. Shimizu, S. Miyata and H. Miyaji : PLoS One, 13, e0206524 (2018).
- [3] K. Onuma, A. Pal, M. Makino, I. Sakamaki, M. Nakamura, S. Tanaka, H. Miyaji, A. Oyane, Mater. Today Commun., 38, 108030 (2024).
- [4] A. Oyane, I. Sakamaki, A. Pyatenko, M. Nakamura, Y. Ishikawa, Y. Shimizu, K. Kawaguchi and N. Koshizaki : RSC Adv., 4, 53645 (2014).
- [5] A.J. Nathanael, A. Oyane, M. Nakamura, M. Mahanti, K. Koga, K. Shitomi and H. Miyaji : Acta Biomater., 79, 148 (2018).
- [6] A. Oyane, I. Sakamaki, Y. Shimizu, K. Kawaguchi and N. Koshizaki : J. Biomed. Mater. Res. A, 100A, 2573 (2012).
- [7] A. Oyane, N. Matsuoka, K. Koga, Y. Shimizu, M. Nakamura, K. Kawaguchi, N. Koshizaki, Y. Sogo, A. Ito and H. Unuma : Coll. Interf. Sci. Commun., 4, 5 (2015).
- [8] M. Mahanti, M. Nakamura, A. Pyatenko, I. Sakamaki, K. Koga and A. Oyane : J. Phys. D: Appl. Phys., 49, 304003 (2016).
- [9] A. Oyane, I. Sakamaki, K. Koga and M. Nakamura : Appl. Sci., 10, 5584 (2020).
- [10] A.J. Nathanael, A. Oyane, M. Nakamura, K. Koga, E. Nishida, S. Tanaka and H. Miyaji : Heliyon, 4, e00734 (2018).
- [11] A. Oyane, I. Sakamaki, K. Koga, M. Nakamura, K. Shitomi and H. Miyaji, Mater. Sci. Eng. C, 116, 111170 (2020).
- [12] A. Oyane, I. Sakamaki, M. Nakamura, K. Koga, K. Shitomi, S. Tanaka and H. Miyaji, Int. J. Mol. Sci., 23, 15981 (2022).