

早期治癒を支援するレーザー生理活性コーティング技術開発

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 電子光基礎技術研究部門 先進レーザープロセスグループ
研究グループ長 奈良崎 愛子

(平成 29 年度 重点研究開発助成 B 課題研究 AF-2017202)

キーワード：レーザー転写、生理活性タンパク質、アパタイト

1. 研究の目的と背景

我々はこれまで、レーザー転写プロセスを駆使した物質デリバリー手法を考案、プロセス解明ならびに産業応用に向けた研究開発に取り組んできた[1-3]。レーザー転写は、一般にレーザー誘起前方転写法 (Laser-Induced Forward Transfer, LIFT) と呼称され、レーザーアブレーション等のレーザー誘起現象を推進力に利用して物質を移すデリバリー手法であり、微小ドットから膜形状まで多様な構造を転写堆積することができる (図 1)。古くは 1970-80 年代から金属等のレーザー転写に関する研究報告が始まっている[4,5]。レーザー転写法の特長として、固体・液体選ばず原料 (ドナー) とでき、金属[6,7]、半導体[1,3]、酸化物[2,3]、銀ナノインク[8,9]やバイオインク[10]、タンパク質や細胞など生体材料[11]、最近ではグラフェン[12]と新材料を含め適用範囲を拡大し続けている。近年では、金属、導電性酸化物や銀ナノインク等の配線描画によるエレクトロニクス応用や、他技術では難しい高粘性バイオインクや細胞の 2D・3D プリンティングによるバイオ・医療応用などが注目を集めている。一方で、レーザー転写技術の主な課題は、転写物の形状・堆積位置制御といった高精度化と、転写時のドナー物性保持や転写物と転写先基板 (レシーバー) の密着性などの高品位化にあり、欧米を含め研究開発が活発化している。

我々はその様な背景のもと、歯や骨の主な無機成分であり生体親和性に優れるハイドロキシアパタイト (Hydroxy apatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 以下アパタイト) のレーザー転写に取り組んでいる。アパタイトは、骨伝導性ならびにヒトの軟組織および硬組織との良好な生体適合性を

示すため、アパタイトコーティングは様々なインプラント材料 (例えば、歯根および人工骨) に適用されてきた。従来のアパタイトコーティング技術は、非位置選択的であり、高温や長時間処理を必要とする。その中で、過飽和リン酸カルシウム溶液中でアパタイトを基材表面に析出させるバイオミメティック法[13]は、非熱コーティング技術であり、タンパク質などの熱に弱い生理活性物質も高い生理活性を保持した状態で膜中に担持できる。しかしソフトプロセスであるがゆえ数百ナノメートルからミクロン厚のアパタイト膜を形成するのに数時間から数日かかる。

そこで本研究では、レーザー転写法を基盤技術に、生理活性アパタイトの高速・高密着コーティング手法を提案、歯周病再生医療の新しい歯科術式に資する「早期治癒を支援するレーザー生理活性コーティング」手法として、その基礎実証に挑戦する。我が国の成人の約 8 割が罹患しているといわれる歯周病治療では、歯周ポケット周囲の感染部を除去後、ペリオドンタルアタッチメントの再形成を試みる。しかし、歯周病に罹患した歯は、本来の歯に比べ、ペリオドンタルアタッチメントが再構築されにくく、再度の細菌感染・増殖により歯周病が再発し易い。そこで、歯面にヒトの歯や骨の主要無機成分であり優れた生体親和性と骨結合能を有するアパタイトをコーティングできれば、ペリオドンタルアタッチメント形成を促進できる。さらに、細胞接着性や骨形成促進能などを有する生理活性タンパク質をアパタイトに担持できれば、ペリオドンタルアタッチメント形成にかかる時間を短縮化、その結果術後の細菌感染リスクも低減できるため、患者の QOL に大きく貢献する。以下、本研究により得られた成果を報告する。

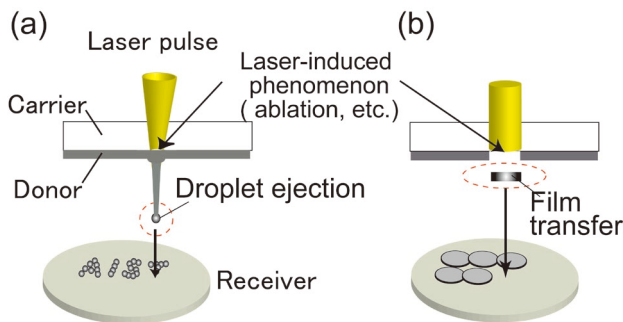


図 1 レーザー転写法の例。
(a) ナノマイクロドット描画と(b)膜転写。

2. 実験方法

2-1 バイオミメティック法による生理活性タンパク質担持アパタイト転写原料膜の調製

図 2 に、本研究のレーザー転写用原料膜 (ドナー) となる、細胞接着性因子としてフィブロネクチン (fibronectin, Fn) を担持あるいは非担持のアパタイト膜のバイオミメティック成膜手法を示す。Fn は、細胞接着性タンパク質の一種であり、細胞の接着・伸展を促進する機能を有する。アパタイトを成膜するため、透明キャリア (サポート) としてポリエチレンテレフタレート (PET) を使用、その上に犠牲層 (レーザー光を吸収しアブレーションを起こす層) としてカーボン膜を蒸着法により成膜した基材を用いた。この基材をカルシウム溶液とリン酸溶液に交互浸漬処

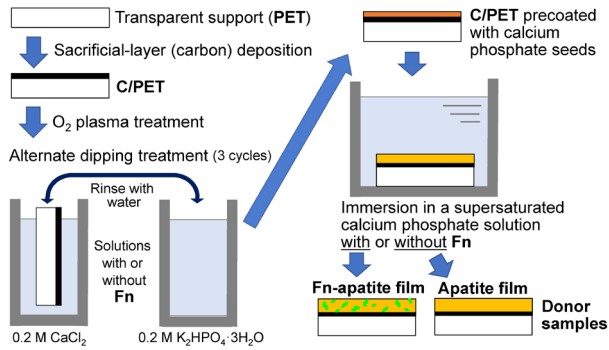


図2 バイオミメティック法を用いたFn担持/非担持アパタイト成膜によるレーザー転写用原料膜の調製。

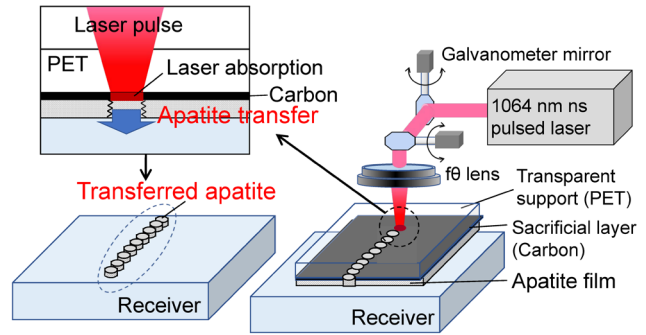


図3 レーザー転写システムの構成例。

理することで、カーボン犠牲層表面にアパタイトの前駆体であるアモルファスリン酸カルシウム (ACP) ナノ粒子をプリコートした。次に、アパタイトに対して過飽和なリン酸カルシウム水溶液(コーティング液)に5時間浸漬した。このコーティング液への浸漬により、基材表面のACPがアパタイトの核形成を誘起し、過飽和溶液中のイオンやリン酸カルシウムクラスターが膜成長するバイオミメティック手法を利用し、アパタイト原料膜を調製した。さらに前記の交互浸漬処理のためのカルシウム溶液とリン酸溶液ならびにリン酸カルシウム過飽和溶液にFnを添加することで、膜中にFnを担持させたアパタイト膜(Fn担持アパタイト, Fn-apatite)を調製した。成膜後、Fnの失活抑制のため凍結乾燥処理を行った。同条件での比較検討のため、Fn担持/非担持に関わらず凍結乾燥処理を実施した。

得られた原料膜については、薄膜X線回折測定より析出相を分析、共焦点レーザー顕微鏡およびSEM観察より表面モルフォロジーと膜厚を評価した。

2・2 細胞接着性フィブロネクチン(Fn)担持/非担持アパタイト膜のレーザー転写

図3に本実験で用いたアパタイトのレーザー転写装置例を示す。レーザー光源に波長1064nmのDPSSナノ秒パルスレーザー(fwhm 40 ns, 10 kHz)を用い、凍結乾燥処理したFn担持/非担持アパタイト膜を転写原料膜(ドナー)とし、透明サポートであるPET側からレーザーパルスを照射、アパタイト膜をレシーバー基材へ転写した。アパタイトが脆性材料であり、転写時に膜にかかる衝撃を低減するため、ドナー膜とレシーバー基材を接触配置させた状態でレーザーパルス照射を実施した。また、衝撃吸収性の異なるPET、ポリジメチルシロキサン(PDMS)の2種類のレシーバーについて検討した。レーザーパルスはガルバノミラー/fθレンズを用いて、各スポットに単一ショット照射となるようビーム集光(ガウシアンビーム)走査し、転写物の2次元パターンニングについても検討を行った。

2・3 細胞活性評価

レーザー転写プロセスがタンパク質の生理活性に与える影響を検討するため、以下の要領の細胞培養試験により、レーザー照射前のFn非担持/担持アパタイト原料膜ならびにそれらのレーザー転写構造物について、細胞接着性を評価した。24ウェル細胞培養プレートを用い、各サンプルにCHO-K1細胞を播種した(5×10⁴細胞/0.5 mL/ウェル)。3から24時間培養後、クリスタルバイオレットによりサンプル上の細胞を固定化・染色し、光学顕微鏡観察を実施した。

2・4 Fn担持アパタイト膜のヒト象牙質への転写

本手法の歯面への適用を基礎実証する目的で、Fn担持アパタイト膜のヒト象牙質基材(インフォームドコンセント後、提供された抜去歯牙より作製)への転写を実施した。象牙質は、硬組織の無機成分であるアパタイトが70%と残りはコラーゲンなどの軟組織で構成され、外部から歯の中心の歯髄まで無数の象牙細管が走っている。歯周病や加齢などにより歯茎が下がりセメント質が薄れるなどすると、この象牙細管が露出する。この象牙質への転写を検討するため、透明サポートをPETから衝撃吸収性の高いPDMSに変更、さらにカーボン犠牲層を蒸着後、Fnアパタイト膜を成膜した。

転写したFnアパタイト膜と象牙質の界面を観察するため、集束イオンビーム(Focused Ion Beam, FIB)加工により膜断面を形成、そのSEM観察を行った。

3. 研究成果

3・1 アパタイト転写原料膜へのFn添加効果：モルフォロジー変化と細胞接着性の向上

図4にバイオミメティック法で作製した(a)アパタイト転写原料膜と、成膜時のFn添加により調製した(b)Fn担持アパタイト膜の表面SEM写真を示す。両試料ともフレーク状の表面構造が共通して見られるが、Fn添加によりその構造サイズが微細化することが分かった。また過飽和溶液への浸漬時間は両試料ともに5時間であるが、得られた平均膜厚はFn非担持のアパタイト膜試料が約500nm、Fn

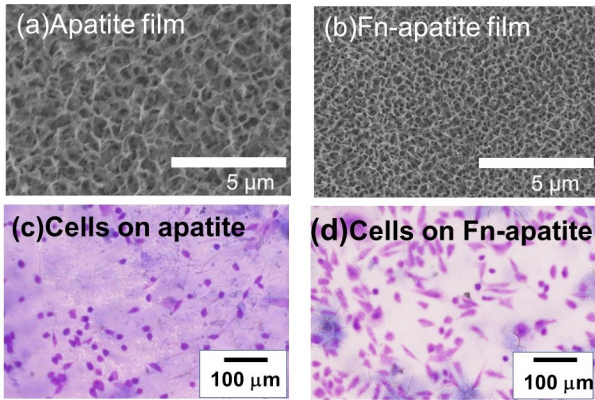


図4 (a)アパタイト, (b)Fn 担持アパタイト原料膜の SEM イメージ. CHO-K1 細胞培養後, クリスタルバイオレットで固定染色した(c) アパタイト, (d)Fn 担持アパタイト膜の光学顕微鏡イメージ (濃い紫色が細胞). Fn タンパク質担持膜上では伸展する細胞が多数みられる.

担持試料が約 200 nm であった. 以上の結果から, 細胞接着性タンパク質であるフィブロネクチン添加による膜の緻密化が示唆される.

次に, 原料膜の生理活性効果を調べるため, 原料膜表面への CHO-K1 細胞播種による細胞接着性評価を行った. 細胞播種後 3 時間を経てクリスタルバイオレットで細胞の固定化, 染色した光学顕微鏡イメージを図 4(c,d)に示す. 図 4(c)がアパタイト, (d)が Fn 担持アパタイト原料膜上の染色細胞のイメージである. 図 4(c)のイメージから, Fn 添加の無いアパタイト膜上では, ほとんどの細胞は球形状のままであり, 細胞伸展は見られない. 一方, 図 4(d)にあるように Fn 担持アパタイト膜上では, 多数の細胞伸展が見られ, 本原料膜の優れた細胞接着特性を示している. 以上より Fn 添加効果として, 原料膜の緻密化などモルフォロジー変化ならびに細胞接着性向上が確認された[14].

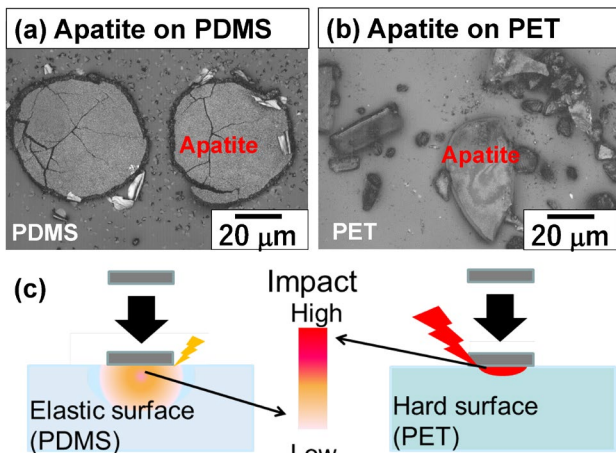


図5 膜転写におけるレーザー基材の効果.

3.2 レーザー転写コーティング: レシーバー物性の影響

レーザー転写では, 転写物とレーザーの衝突を伴うため, 脆性材料では破碎し易い. そこで, 衝撃を吸収・緩和する衝撃吸収材をレーザーとして使用すれば, 膜破碎を低減できると仮定, 以下の検討を行った.

一般に, ポリマー材料は変形時に弾性と粘度を示す. 正弦波応力により計測される複素弾性率は, 貯蔵弾性率 E' と損失弾性率 E'' に分解される[15]. 前者は弾性成分で変形中のエネルギー貯蔵に直接比例するのに対し, 後者は粘性成分であり外部拡散するエネルギー損失に相当する. 損失正接 ($\tan\delta = E''/E'$) は損失エネルギーと保存されたエネルギーの比であり, $\tan\delta$ の値が大きいほど, より多くのエネルギーが拡散 (衝撃吸収) する. 一般的な PET の $\tan\delta$ の値は約 10^{-2} (1 Hz の測定周波数, 室温) であるのに対し, PDMS の値は PET のそれより約 1 桁大きく, PDMS の方が衝撃吸収能が高いことを示している[16].

この仮説を検証するため, PDMS (ソフト表面) と PET (ハード表面) の 2 つの異なるレーザーを用い, アパタイト膜のレーザー転写を検討した. 図 5 は, (a)PDMS および(b)PET レシーバーに転写堆積したアパタイトマイクロチップの共焦点レーザー顕微鏡イメージを示す. PDMS レシーバー上のアパタイトマイクロチップは, レーザースポットに対応した円形の膜形状を維持しており, 比較的高品位な転写が得られている. 一方, PET レシーバーでは, 顕著な膜破碎が観察された. レーザー転写時に発生する衝撃力のモデルを図 5(c)に示す. 衝撃吸収性の高い PDMS の場合, 衝撃は効果的に吸収されるため, 転写膜の破碎を軽減できる. 対照的に, PET レシーバーの場合, 衝撃は表面近くに保存されるため, 膜破碎が容易に起こる. さらに, 柔軟性にも優れる PDMS は, ドナー膜とギャップなく接触しやすく, フライ距離を低減できるため, フライ時の応力付加を低減できる効果もある. 以上より, PDMS レシーバーの利用により, アパタイトのような脆性材料も転写可能であることを基礎実証できた[14,17-18].

図 6 に PDMS 上に形成したアパタイトの連続パターン転写によるコーティングの様子を示す. 基材表面約 80% の被覆率での連続転写堆積を実現している[19-21].

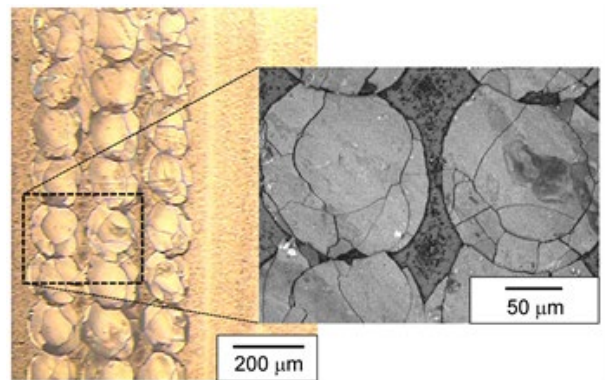


図6 アパタイトコーティングの共焦点レーザー顕微鏡像.

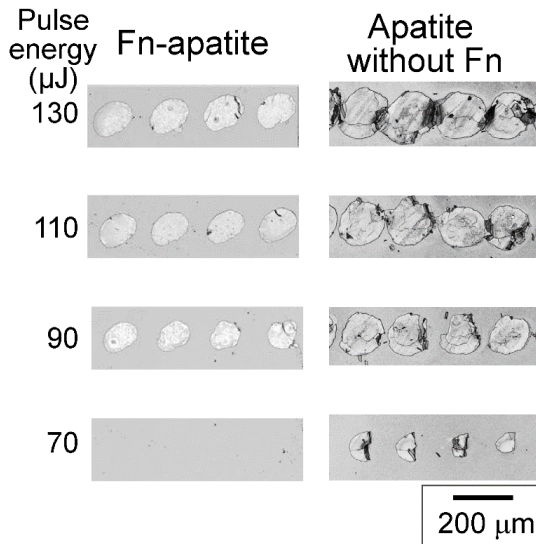


図7 転写構造の Fn 添加およびパルスエネルギー依存性.

3・3 レーザー転写：Fn 添加効果

次に、Fn 担持/非担持膜を原料に用いたレーザー転写を比較検討、Fn 添加が転写挙動に与える影響を考察した。

図7にPDMS レシーバー上に転写堆積したFn 担持/非担持アパタイトマイクロチップのパルスエネルギー依存性を示す[14]. Fn 担持試料では、転写閾値は約70-90 μJ/pulseにある。90-130 μJ/pulse のパルスエネルギー範囲では、膜破碎の無い緻密な状態を維持した転写が実現でき転写に好適な条件と言える。尚ここには示さないが、より高エネルギー領域では、クラック発生が頻発化し、膜破碎が生じ始めることを確認している。よって、高品位膜転写の最適エネルギー範囲は、転写閾値エネルギー近傍に存在する。一方、Fn 非担持のアパタイト原料膜の場合は、70 μJ/pulse において部分的ではあるが転写物が確認され、転写閾値がFn 担持膜に比べ低エネルギーにシフトした。一般的にレーザー膜転写では、膜を支持する透明サポート（本実験の場合は犠牲層）からの剥離エネルギー（密着性に依存）、ビームパターンを型抜きするための膜内結合切断エネルギー（膜の密度、結合エネルギーに依存）、レシーバーに移すエネルギー（放出部の重量、即ち膜厚に依存）が必要となる。本実験でのFn 添加の結果、転写閾値が高エネルギーにシフトしており、Fn 添加による膜の緻密化や下地層（犠牲層）への高密着化が起こっている可能性が示唆される。転写チップの表面観察から、Fn 非担持の場合は転写によるクラック発生が多数確認され、タンパク質の添加によりクラック発生が抑制されている。以上より、細胞接着性タンパク質添加が、クラックレスな高品位膜転写に対しても有効な手法であることが分かった。タンパク質は細胞接着性向上を含め様々な生理活性機能の付与を可能にするため、タンパク質担持材料の転写は、インプラントなど医用材料表面の高機能化や医療応用が期待される。

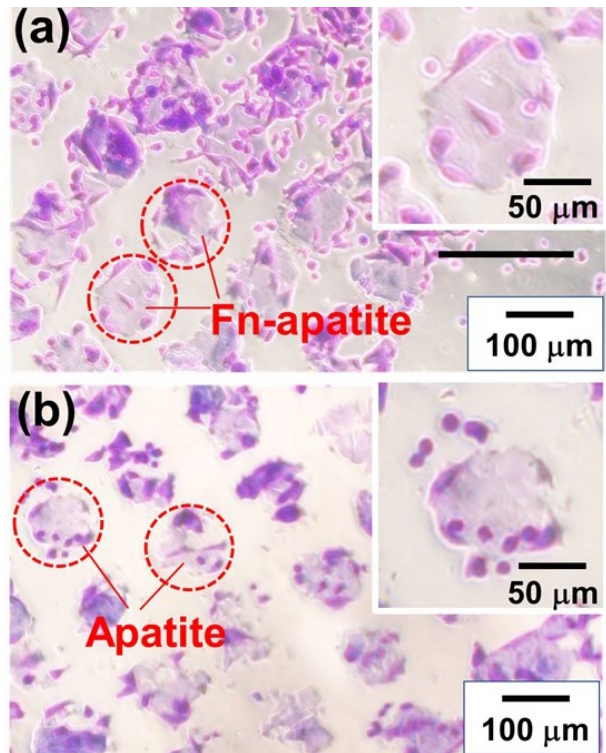


図8 (a)Fn 担持と(b)非担持アパタイトチップ（直径約100 μm）を2次元配列したPDMS上のCHO-K1細胞（濃い紫色、10～数十μm）の光学顕微鏡イメージ。

3・4 転写したFn 担持アパタイトの生理活性評価

図8に、(a)Fn 担持アパタイト(Fn-apatite)ならびに(b)非担持アパタイト(apatite)マイクロチップを転写形成したPDMS上で24時間培養されたCHO-K1細胞の光学顕微鏡イメージを示す。直径約100 μmの円形ディスクの淡い紫色のパターンは、転写により形成されたマイクロチップに相当する。これら両方のマイクロチップ上に細胞が選択的に密集する様子が確認された一方で、PDMS上の細胞はまばらであった。この結果は、本手法プロセスで形成されたアパタイトおよびFn 担持アパタイトマイクロチップが、PDMSに比べて、CHO-K1細胞に対して優れた細胞適合性を示す。さらに、Fn-apatite マイクロチップ上の細胞の多くが、Fn 担持アパタイト原料膜（図4 (d)）と同様に、進展している様子が確認できる（図8(a)）。このことから、Fnの細胞接着性が、レーザー転写後も保持されていると推察される。これらに加え、細胞の多くがアパタイトチップの周囲に沿って局在・整列する傾向がみられることから、本手法によるパターンニングが細胞操作能力を有する可能性が示唆される。即ち、本手法によると、細胞接着などに加え細胞の局在化や伸展方向など多様な制御が可能な生理活性コーティングを実現できる[18].

3・5 ヒト象牙質への転写

本研究では、レーザー転写をベースとした生理活性タンパク質材料のコーティング、即ち「レーザー生理活性コー

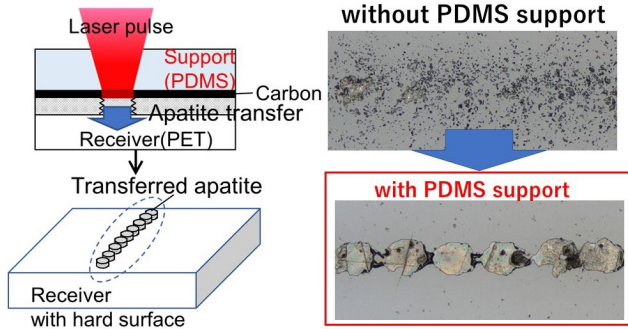


図9 PDMS サポートを利用した新たな転写手法。
固いPET レシーバー上へ高品位な転写堆積を実現。

「転写」技術の開発を目指している。そこでヒト象牙質基材へのFn担持アパタイト膜のレーザー転写を図9左に示す実験配置で実施した。図3実験との違いは、象牙質レシーバーに高品位転写堆積を実現するため、アパタイト原料膜を支持する透明サポート側に衝撃吸収性と柔軟性を有するPDMSを利用した点である。このFn-apatite/PDMSサポートからなるドナーを用い、PDMSに比べハードな表面をもつPETレシーバーへの転写堆積を検討した結果を、図9右下に示す。図9右上のFn-apatite/PETドナーを用いた場合は転写膜の破砕が顕著にみられたのに対し、今回のPDMSサポートを用いた場合は、破砕の伴わないレーザービーム形状を反映した転写が可能であることを実証できた。

そこで、上記のPDMSサポートを用い、ヒト象牙質へのFnタンパク質担持アパタイトのレーザー転写を検討した結果、Fn-apatite マイクロチップの高品位転写堆積に成功した(図10上段左)。さらに、転写したFn-apatiteと象牙質の界面を観察するため、FIB加工により試料を薄片化(図10上段中央・右)、断面SEM観察を実施した結果を図10下段に示す。Fn-apatite膜と象牙質界面に大きな隙間のない高品位界面の形成を初めて基礎実証できた。ただし

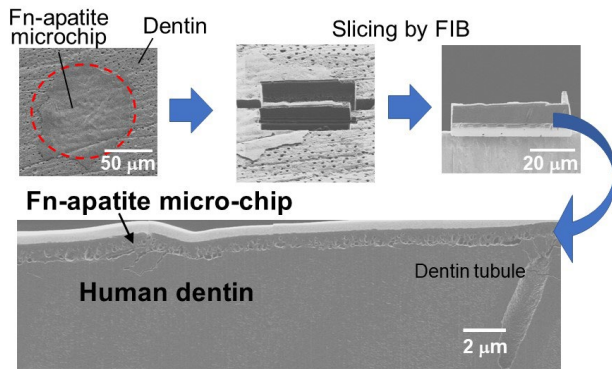


図10 象牙質に転写堆積したFn担持アパタイト(上段左)とFIBによる断面試料形成(上段中央・右)、Fn担持アパタイト/象牙質界面の断面SEM観察(下段)。

課題もあり、アパタイト膜の表面は図4(a,b)に示すようにフレック状のモルフォロジーを有し平滑でないため、界面には小さなギャップが存在している。そこで今後は、転写原料膜の表面モルフォロジー制御など界面にフォーカスした技術開発を進め、コーティングに重要な界面の評価と高次制御を実現したいと考えている。

4. 結言

本研究では、レーザー転写法を基盤技術に、生理活性タンパク質担持アパタイトの高速・高密度コーティング手法を提案、基礎実証に挑戦した。

細胞接着性タンパク質であるフィブロネクチン(Fn)を添加したアパタイト膜を原料ドナーとし、レーザー転写用犠牲層と衝撃吸収性レシーバー基材を用いることで、脆性材料であるアパタイト膜においても膜形状を維持した良好な膜転写を実現できた。Fn担持効果として、高細胞接着性、さらに膜のモルフォロジー変化とクラック発生を低減した高品位転写が確認できた。細胞接着性タンパク質の添加が、生理活性向上にとどまらずレーザー転写挙動にも影響し、レーザー転写用原料として優れた特性を有することがわかった。

ヒト象牙質への本技術の適用を目指し、衝撃吸収性サポートを開発した結果、象牙質へのFn担持アパタイトの転写堆積と高品位界面の形成に成功した。

今後、細胞接着などに加え細胞の局在化や伸展方向など自在な細胞制御が可能なレーザー生理活性コーティング技術を展開したい。

謝辞

本研究の実施にあたり公益財団法人天田財団より重点研究開発助成B(AF-2017202)を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) A. Narazaki, T. Sato, R. Kurosaki, Y. Kawaguchi, and H. Niino, *Appl. Phys. Express* **1**, 057001 (2008).
- 2) A. Narazaki, R. Kurosaki, T. Sato, and H. Niino, *Appl. Phys. Express* **6**, 092601 (2013).
- 3) 奈良崎愛子, *オプトロニクス* **433**, 127-131 (2018).
- 4) M. L. Levene, R. D. Scott, and B. W. Stryj, *Appl. Opt.* **9**, 2260-2265 (1970).
- 5) J. Bohandy, B. F. Kim, and F. J. Adrian, *J. Appl. Phys.* **60**, 1538-1539 (1986).
- 6) C. W. Visser, R. Pohl, C. Sun, G. R. B. E. Römer, B. Huis in't Veld, and D. Lohse, *Adv. Mater.* **27**, 4087-4092 (2015).
- 7) M. Zenou, A. Sa'ar, and Z. Kotler, *Appl. Phys. Lett.* **106**, 181905 (2015).
- 8) A. Piqué, R. C Y Auyeung, H. Kim, N. A. Charipar, and S. A. Mathews, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **49**, 223001 (2016).

- 9) R. C. Y. Auyeung, H. Kim, S. Mathews, and A. Piqué, *Optics Express* **23**, 422-430 (2015).
- 10) A. Sorkio, L. Koch, L. Koivusalo, A. Reiwick, S. Miettinen, B. Chichkov, and H. Skottman, *Biomaterials* **171**, 57-71 (2018).
- 11) I. Zergioti, A. Karaiskou, D. G. Papazglou, C. Fotakis, M. Kapsetaki, and D. Kafetzopoulos, *Appl. Phys. Lett.* **86**, 163902 (2005).
- 12) E. C. P. Smits, A. Walter, D. M. de Leeuw, and K. Asadi, *Appl. Phys. Lett.* **111**, 173101 (2017).
- 13) A. Oyane, X.P. Wang, Y. Sogo, A. Ito and H. Tsurushima, *Acta Biomater.* **8**, 2034-2046, (2012).
- 14) 奈良崎愛子, 大矢根綾子, 小室智稀, 黒崎諒三, 亀山智子, 坂巻育子, 荒木裕子, 海野昌喜, 宮治裕史, 電気学会研究会資料「レーザプロセッシングと先端技術」(2019).
- 15) H. Murata, "Rheology-Theory and application to biomaterials", *Polymerization*, IntechOpen, <http://dx.doi.org/10.5772/48393> (2012).
- 16) Y. Nishiyama, *Networkpolymer* **32**, 362-366 (2011).
- 17) 奈良崎愛子, 黒崎諒三, 亀山智子, 大矢根綾子, 宮治裕史, レーザー学会第 527 回研究会報告「新レーザー技術」, 1-5 (2018).
- 18) A. Narazaki, A. Oyane, S. Komuro, R. Kurosaki, T. Kameyama, I. Sakamaki, H. Araki, H. Miyaji, *Opt. Mater. Express* **9**, 2807-2816 (2019).
- 19) A. Narazaki, T. Sato, H. Niino, Y. Nakata, T. Shoji, Y. Tsuboi, A. Oyane, H. Miyaji, *Proc of the 2018 IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2018)*, 333-337 (2018).
- 20) 奈良崎愛子, 欠端雅之, 屋代英彦, *光アライアンス* **30-6**, 51-55 (2019).
- 21) A. Narazaki, A. Oyane, H. Miyaji, *ICALEO 2019 Proceedings, Nano301* (2019).