非熱的レーザー射出を利用した
抗菌性バイオミネラルナノ粒子による歯根面の三次元修復

産業技術総合研究所　材料基盤研究部門
研究グループ長　中村　真紀
（2022 年度 一般研究開発助成 AF-2022222-B3）

キーワード：レーザー転写，抗菌性粒子，リン酸カルシウム

１．研究の目的と背景

超高齢社会を迎えた我が国において，口腔健康の維持は健康寿命の延伸や QOL（生活の質）の向上を実現するための最重要課題の一つである．歯科医療の進展により高齢者の残存歯数は増加傾向にある一方で，近年は根面う蝕（歯の根元のむし歯）の増加が新たな問題として注目されている．加齢などの影響により歯肉（歯ぐき）が退縮すると，歯根面（歯の根元の歯面）にセメント質が露出する．セメント質はミネラル成分の割合の少ない，う蝕に対する耐性が低い組織である．露出したセメント質にう蝕原因菌が繁殖し，根面う蝕が進行すると，根元から歯が折れて抜歯に至る場合も多く，口腔機能の低下を通じて全身の健康状態や QOL に悪影響を及ぼす．そのため，根面う蝕に対する予防や早期治療の重要性が高まっている．

筆者らは，歯のミネラル成分であるリン酸カルシウムのナノ粒子が，様々な薬物をデリバリーできる担体として有用であることに着目し，薬物担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成技術を開発してきた [1,2]．その中で，抗菌剤として銀微粒子を担持したリン酸カルシウムナノ粒子を合成し，う蝕原因菌に対する抗菌作用を確認している [3]．本ナノ粒子では，う蝕原因菌の産生する酸によりリン酸カルシウムが溶解し，銀微粒子を放出したことで，抗菌作用を発揮したと考えられた．しかし，ナノ粒子の塗布だけでは歯根面での長時間の保持は困難である．また，銀微粒子は着色を生じやすく，歯科での利用においては審美性の面で課題があるため，非着色性を示す抗菌剤（有機系抗菌剤の一部など）の使用が望ましい．

また，筆者らは，歯面にバイオミネラルナノ粒子を堆積させる手法として，レーザー転写技術に着目して検討を進めてきた．具体的には，レーザー光照射に伴う水のアブレーションを推進力として利用することで，ナノ粒子への熱影響を限りなく低減し，ナノ粒子に担持された薬物の失活を防ぎつつ歯面にデリバリーできる技術の構築を目指してきた．このような技術の構築のため，まず，ナノ粒子の水懸濁液を充填できるレーザー転写セル（以下，ホルダ）を設計・作製した．これにリン酸カルシウムナノ粒子の水懸濁液を充填し，Er:YAG レーザー光を照射（水の極大吸収を有する波長 2.94 μm，研究用レーザー装置を使用）することで，粒子懸濁液の液滴を射出し，対向配置した基板上に粒子を堆積させることが可能であることを確認した

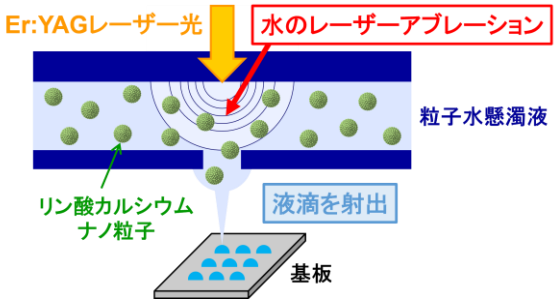


図 1　本研究で検討するレーザー転写技術の模式図

（図 1）．前述のとおり，本技術では粒子懸濁液の液滴を水のレーザーアブレーションにより射出するため，熱に弱い有機系抗菌剤がナノ粒子に担持されていても，レーザー光照射による失活を防ぎつつ，抗菌性を維持したまま歯面にデリバリーできると期待される．

そこで本研究では，根面う蝕の予防や早期治療に向けて歯根面を抗菌化できる技術を構築するため，以下に示す三つの目的を掲げて検討を行った．

①有機系抗菌剤担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成
②得られたナノ粒子のモデル歯面へのレーザー転写
　（歯科臨床で使用されているレーザー装置での検討）
③転写されたナノ粒子の抗菌性評価

なお，リン酸カルシウムナノ粒子に担持させる有機系抗菌剤としては，牛乳に含まれる抗菌性タンパク質であるラクトフェリン，および，洗口液の抗菌性成分である塩化セチルピリジニウムを使用した．

２．研究方法

2･1　ラクトフェリン担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成 [4]

筆者らのタンパク質担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成技術 [5]を参考に，ラクトフェリンとヘパリンをリン酸カルシウムと共沈させる手法で目的のナノ粒子を合成した．塩化カルシウム溶液，リン酸水素二カリウム溶液，炭酸ナトリウム溶液，ラクトフェリン溶液，ヘパリンナトリウム溶液の 5 種類の溶液を混合し，反応液(4 mL)を調製した．その際，反応液中のラクトフェリン溶液の濃度を，1.25，2.5，5.0，7.5 mg/mL と変化させた．この反応液を 25℃で

24 時間振とう後，析出物を洗浄・回収して試料を得た．得られた試料は反応液中のラクトフェリン溶液濃度に応じて，**LF1.25**，**LF2.5**，**LF5.0**，**LF7.5** とした．

2･2　塩化セチルピリジニウム担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成

まず始めに，カルボキシメチルセルロースを担持したリン酸カルシウムナノ粒子を合成し，それに塩化セチルピリジニウムを吸着させる手法で目的のナノ粒子を合成した．塩化カルシウム溶液，リン酸水素二カリウム溶液，炭酸ナトリウム溶液，カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液の 4 種類の溶液を混合し，反応液(4 mL)を調製した．反応液の調製後すぐに析出物を洗浄・回収し，水に再懸濁した．この懸濁液(1 mL)に塩化セチルピリジニウム溶液(0.1，0.2，0.5，1.0 mg/mL，1 mL)を添加し，1 分間撹拌後，生成物を洗浄・回収して試料を得た．得られた試料は添加した塩化セチルピリジニウム溶液の濃度に応じて，**CPC0.1**，**CPC0.2**，**CPC0.5**，**CPC1.0** とした．得られた試料(**CPC0.5**)を超純水(1 mL)に再懸濁し，レーザー転写（2･4 節）の検討に用いた．

2・3　構造・組成評価

得られた試料の構造・組成・分散性を，走査電子顕微鏡(SEM)観察，エネルギー分散型 X 線分光法(EDX)，紫外可視分光法(UV)，動的光散乱法(DLS)，電気泳動光散乱法(ELS)などにより調べた．また，ラクトフェリンの担持効率（試料に担持されたラクトフェリン量／反応液に添加したラクトフェリン量×100(%)）を算出した．

2・4　ナノ粒子のレーザー転写

モデル歯面として焼結水酸アパタイト基板（直径 5 mm の円形基板）を用い，塩化セチルピリジニウム担持リン酸カルシウムナノ粒子の水懸濁液の液滴を射出した．まず，歯科用 Er:YAG レーザー装置（アドベール SH，モリタ製作所）に装着できるホルダを設計・作製した．これに塩化セチルピリジニウム担持リン酸カルシウムナノ粒子の水懸濁液を充填し，レーザー光を 30 mJ，1 Hz で 1 秒照射した．

2・5　抗菌性評価

塩化セチルピリジニウム担持リン酸カルシウムナノ粒子を転写した焼結水酸アパタイト基板（CPC-CaP 基板）を用いて評価を行った．基板上に口腔内細菌の一種である *Actinomyces naeslundii*（An 菌）の懸濁液（2.0×10^7 CFU/mL，CFU：コロニー形成単位）を 10 μL 滴下し，フィルム密着法（ポリプロピレンシート，5×5 mm^2）で 24 時間培養した．培養後，基板表面に付着している細菌を培地 1 mL 中に回収，寒天培地に塗抹し，48 時間培養後に CFU を測定した．比較対象として，ナノ粒子を転写していない基板（未処理基板），ならびに，塩化セチルピリジニウムを担持していないナノ粒子（カルボキシメチルセルロースを担持したリン酸カルシウムナノ粒子）を転写した基板（CaP 基板）についても検討を行った．

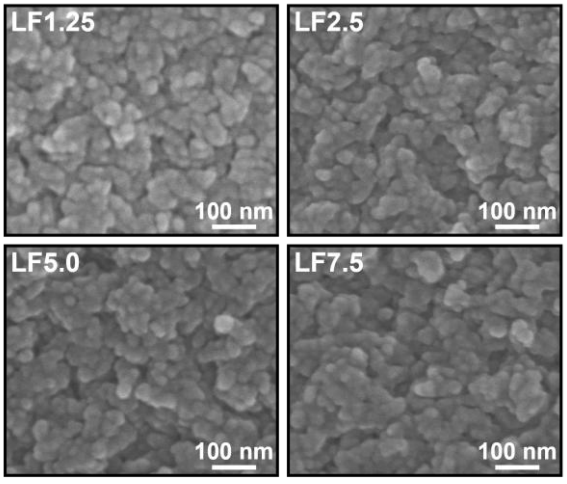


図 2　得られた試料(**LF1.25**，**LF2.5**，**LF5.0**，**LF7.5**)の SEM 像 [4)]

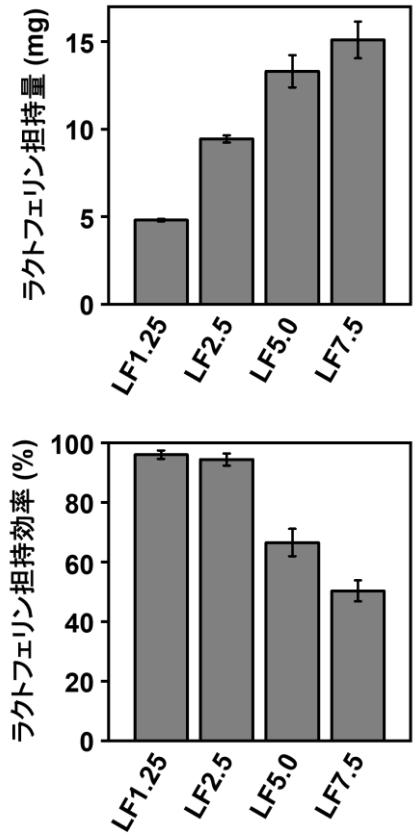


図 3　反応液 4 mL から得られた試料(**LF1.25**，**LF2.5**，**LF5.0**，**LF7.5**)におけるラクトフェリンの担持量（上）と担持効率（下）（n = 3）[4)]

３．研究成果

3・1　抗菌剤担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成

3・1・1　ラクトフェリン担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成[4)]

SEM 観察の結果, 得られた試料(**LF1.25**, **LF2.5**, **LF5.0**, **LF7.5**)はいずれも不定形のナノ粒子であった（図 2）. EDX 分析の結果, すべての試料でリン酸カルシウムに由来するカルシウムとリンの大きなピークに加えて, 硫黄のピークが検出された. この硫黄はヘパリンならびにラクトフェリンに由来するものと考えられた．続いて，UV 測定により試料中のラクトフェリン担持量を算出したところ, 反応液中のラクトフェリン濃度の増加に伴い, 得られたナノ粒子のラクトフェリン担持量は増加した（図 3 上）．一方で，担持量から算出されたラクトフェリン担持効率は低下した（図 3 下）．反応液中のラクトフェリン濃度 2.5 mg/mL 以下の場合，ラクトフェリン担持効率は 90%以上と非常に高い値となり, ラクトフェリンをほとんどロスすることなく担持できることが明らかとなった．先行研究[5)]と同様, ラクトフェリンとヘパリンとの静電的な相互作用により，良好な担持効率を示したと考えられる．以上より，得られた試料は, ラクトフェリンとヘパリンを共担持したリン酸カルシウムナノ粒子であることが確認された.

また, 得られたナノ粒子はいずれも水に良好な分散性を示し，DLS 測定によると平均粒子径は 100～200 nm であった（図 4）．また，いずれのナノ粒子も比較的大きな負のゼータ電位（−19～−14 mV，図 5）を示した．負の電荷を有するヘパリンによる効果と考えられる．なお, 反応液中のラクトフェリン濃度の増加に伴い, ゼータ電位の絶対値は減少した．ラクトフェリン担持量の増加により，一部の電荷が相殺されたためと推測される.

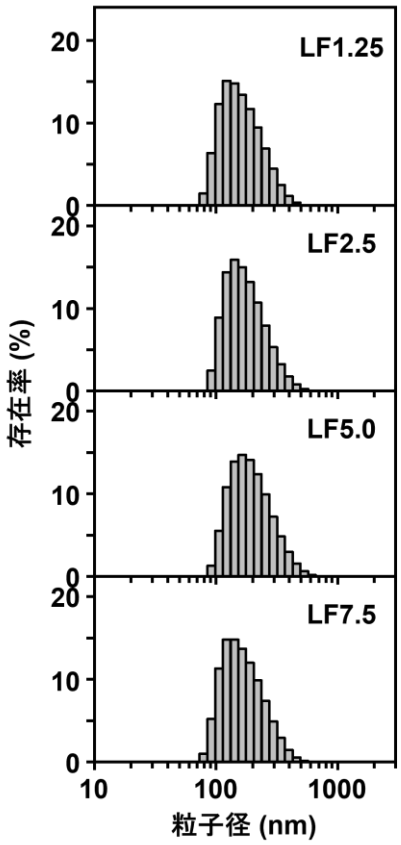


図 4　得られた試料(**LF1.25**，**LF2.5**，**LF5.0**，**LF7.5**)の粒子径分布[4)]

3・1・2　塩化セチルピリジニウム担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成

SEM 観察，EDX 分析，UV 測定などによる解析の結果，得られた試料(**CPC0.1**，**CPC0.2**，**CPC0.5**，**CPC1.0**)は，塩化セチルピリジニウムとカルボキシメチルセルロースを共担持したリン酸カルシウムナノ粒子であることが確認された．ナノ粒子中の塩化セチルピリジニウム担持量は，合成時に添加した塩化セチルピリジニウム濃度の増加に伴って増加した．得られた塩化セチルピリジニウム担持リン酸カルシウムナノ粒子(**CPC0.5**)の水懸濁液 1 mL 中に含まれる塩化セチルピリジニウムは，約 0.3 mg と算出された.

以上, ラクトフェリンあるいは塩化セチルピリジニウムを有機系抗菌剤として担持した 2 種類のリン酸カルシウムナノ粒子の合成に成功した. 次節以降のレーザー転写の検討には, 塩化セチルピリジニウム担持リン酸カルシウムナノ粒子(**CPC0.5**)を用いた.

3・2　ナノ粒子のレーザー転写

本研究では，これまでの研究用レーザー装置に代わり，歯科臨床で使用されているレーザー装置での検討を行った．歯科用レーザー装置は，治療現場で歯質や軟組織に照射することを目的として設計された医療機器であり, 中空ファイバーを介してハンドピース先端にレーザー光を伝送する. ハンドピースには先端の細いコンタクトチップを装着して使用する.

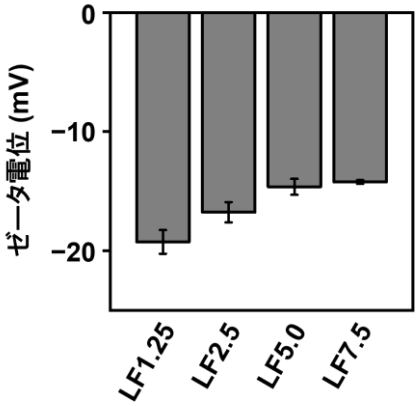


図 5　得られた試料(**LF1.25**，**LF2.5**，**LF5.0**，**LF7.5**)のゼータ電位(n = 3)[4)]

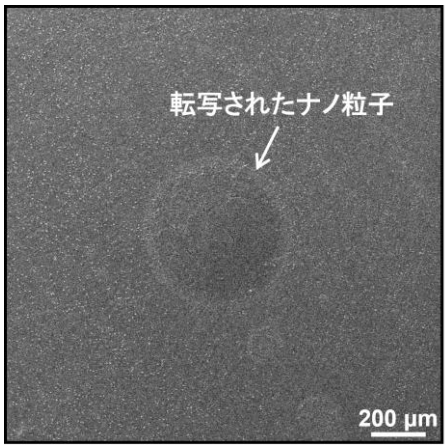


図 6　塩化セチルピリジニウム担持リン酸カルシウムナノ粒子を転写した基板の SEM 像

本装置に装着でき，図 1 に示すような機構でナノ粒子水懸濁液の液滴をレーザー光照射により射出できるようなホルダを設計・作製した．3·1·2 節で合成した塩化セチルピリジニウム担持リン酸カルシウムナノ粒子(**CPC0.5**)の水懸濁液をホルダに充填し，対向に焼結水酸アパタイト基板（モデル歯面）を配置，レーザー光を 30 mJ，1 Hz で 1 秒照射すると，液滴が 1 滴射出された．液滴を乾燥後，SEM 観察を行うと，直径約 0.5 mm の円形スポット（粒子堆積物）が確認された（図 6）.

3・3　抗菌性評価

CPC-CaP 基板の抗菌性評価においては，まずはじめに Live/Dead 染色による評価を試みたが，基板上のナノ粒子堆積箇所が色素により染色されてしまい，有効な評価ができなかった．そこで，フィルム密着法による培養後，基板表面から回収した細菌の数を CFU として定量する方法で評価を行った. 基板表面におけるナノ粒子の被覆率を向上させるため，基板上に約 1 mm 間隔で格子状にナノ粒子水懸濁液の液滴を射出し，評価に用いた.

歯垢の初期付着菌であり，根面う蝕との関連が示唆されている An 菌を用いた評価の結果，未処理基板や CaP 基板と比較して，CPC-CaP 基板では明らかに CFU が減少した（図 7）．すなわち，CPC-CaP 基板において抗菌効果が認められた. 本結果により，レーザー光照射による転写後も，ナノ粒子に担持された塩化セチルピリジニウムが抗菌剤として機能することが示された.

４．結論

本研究では，筆者らのリン酸カルシウムナノ粒子合成技術をもとに，有機系抗菌剤としてラクトフェリンあるいは塩化セチルピリジニウムを担持したリン酸カルシウムナノ粒子を合成した. また，歯科臨床現場での利用を想定し，歯科用 Er:YAG レーザー装置を使用して，得られたナノ粒

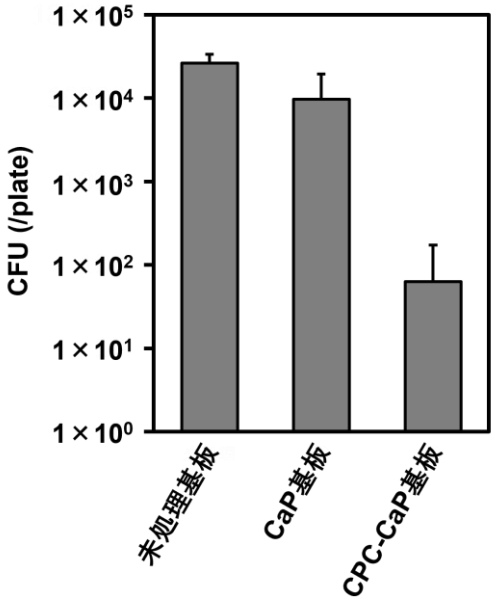


図 7　An 菌による基板の抗菌性評価(n = 3)，未処理基板：ナノ粒子を転写していない基板，CaP 基板：塩化セチルピリジニウムを担持していないリン酸カルシウムナノ粒子を転写した基板，CPC-CaP 基板：塩化セチルピリジニウム担持リン酸カルシウムナノ粒子を転写した基板

子をモデル歯面に転写した．さらに，転写されたナノ粒子が口腔内細菌に対して抗菌効果を有することを示した. 今後，本研究の進展により，有機系抗菌剤担持リン酸カルシウムナノ粒子を歯根面に堆積させるレーザー転写技術が構築されれば，根面う蝕の予防や早期治療につながると期待される.

謝　辞

本研究は，産業技術総合研究所の大矢根綾子博士，大沼恵里香博士，黒崎諒三博士，奈良崎愛子博士，北海道大学の宮治裕史博士，金本佑生実博士，西田絵利香博士，蔀佳奈子博士と共同で実施されました．また，本研究の実施にあたり多大なご支援を頂いた公益財団法人天田財団に深く感謝いたします.

参考文献

1) 中村真紀・大矢根綾子：セラミックス, 55 (2020), 189.
2) 大矢根綾子・中村真紀・猪瀬智也：BIOINDUSTRY, 43 (2026), 19.
3) Maki Nakamura, Ayako Oyane, Yoshiki Shimizu, Saori Miyata, Ayumi Saeki, Hirofumi Miyaji, *Acta Biomater.*, 46 (2016), 299.
4) Maki Nakamura, Ayako Oyane, Tomoya Inose, Yukimi Kanemoto, Hirofumi Miyaji, *Int. J. Mol. Sci.*, 26 (2025), 852.
5) Maki Nakamura, Wakako Bunryo, Aiko Narazaki, Ayako

Oyane, *Int. J. Mol. Sci.*, 23 (2022), 11530.