

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02635

研究課題名（和文）レーザー誘起ナノジェットによる物質デリバリー手法開拓と高機能人工歯面の創製

研究課題名（英文）Development of material delivery method by laser-induced nanojet and creation of high-performance artificial tooth surface

研究代表者

奈良崎 愛子（Narazaki, Aiko）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・研究グループ長

研究者番号：40357687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病は罹患率の極めて高い生活習慣病であり、その治療法が高度化すれば多くの国民のQOL向上に資する。歯周病の再生治療においては、細菌増殖により破壊された歯表面（歯面）での歯周組織との付着（ペリオドンタルアタッチメント）を早期に再構築させることが重要である。本研究では、生理活性物質とリン酸カルシウムのナノ複合粒子を高濃度に分散させたバイオインクを開発、そのバイオインクを用いて歯面上に高機能人工歯面を形成するため、新たにレーザー誘起ジェットを利用したナノ複合粒子の3次元デリバリー技術構築を目指し、バイオインクを約50マイクロメートルのディスク形状で、位置精度よく基板上に堆積させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義としては、生理活性物質を担持させたリン酸カルシウムナノ微粒子を高濃度に含有するバイオインクについて、レーザー誘起ジェットによるデリバリーの可視化によるプロセス最適化手法を駆使、微量なバイオインクの高精度堆積が可能なことを基礎実証した。本手法が高度化できれば、我が国の生活習慣病である歯周治療につながり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Periodontal disease is a lifestyle-related disease with an extremely high prevalence, and if the treatment method becomes more sophisticated, it will contribute to improving the QOL. In the regenerative treatment of periodontal disease, it is important to reconstruct the attachment (periodontal attachment) to the periodontal tissue on the tooth surface destroyed by bacterial growth at an early stage. In this work, we have developed a bio-ink in which nano-composite particles of physiologically active substances and calcium phosphate are dispersed in high concentration, and a novel laser-induced jet is used to form a highly functional artificial tooth surface using the bio-ink. Aiming to build a three-dimensional delivery technology for nano-composite particles, we succeeded in depositing bio-ink on a substrate with a disk shape of about 50 micrometers with high positional accuracy.

研究分野：レーザープロセス

キーワード：レーザー転写 デリバリー バイオインク レーザー誘起ジェット リン酸カルシウム ナノ複合粒子  
アパタイト 生理活性物質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は罹患率の極めて高い生活習慣病であり、その治療法が高度化すれば多くの国民のQOL向上に資する。歯周病は、歯表面（歯面）と歯肉界面での細菌増殖・歯肉の炎症により発症し、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、歯周ポケットを形成する。歯周組織再生治療において、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り、ペリオドンタルアタッチメントの再構築が困難である。このため、術後に歯肉上皮の侵入を許し細菌の温床となり歯周病再発の原因となっている。この治療後の歯面に、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水酸アパタイト（以下、アパタイトと総称）などのリン酸カルシウムをデリバリーし高密着固定化できれば、新たな人工歯面を形成でき、歯周組織との親和性を速やかに回復できる可能性がある。さらに、骨形成促進能を有するタンパク質などの生理活性物質を人工歯面に担持できれば、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可能性がある。

研究代表者の奈良崎は、高温や真空プロセスを要しない物質デリバリー手法として、各種材料（金属・半導体・酸化物固体）のレーザー転写技術を開発してきた。本手法によれば、透明サポート上の固体膜に単一レーザーパルスを集光、過渡的熔融場を形成することで微小ジェットを形成、単一のマイクロ/ナノ液滴を放出でき、精密にサイズ・位置制御した状態で、対峙するレシーバー基材上に堆積できる。他方、研究分担者の大矢根は、体液に類似したリン酸カルシウム過飽和溶液を用い、歯の主要無機成分であるアパタイトと生理活性物質（タンパク質など）を各種基材上でナノ複合化・成膜する技術を開発してきた。さらに、研究分担者の中村は薬剤送達分野を専門とし、リン酸カルシウムナノ粒子の安全・簡便な one-pot 合成技術を開発してきた。これらの生理活性物質担持リン酸カルシウムの調製技術を、前記のレーザー誘起ジェットを利用した転写堆積技術と融合すれば、新たな物質デリバリー技術ならびそれを駆使した高機能人工歯面を創製できると考え、本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

本研究では、生理活性物質を担持させたリン酸カルシウム複合ナノ粒子を高濃度に分散させたバイオインクを開発、そのバイオインクを用いて歯面上に高機能人工歯面を形成するため、新たにレーザー誘起ジェットを利用した複合ナノ粒子のデリバリー技術構築を目指す。具体的には、要素技術として、(1)独自のリン酸カルシウムナノ粒子合成技術の高度化により、生理活性物質を担持させたリン酸カルシウム複合ナノ粒子を含有するバイオインク合成手法の確立、(2)レーザー転写法を基盤としたバイオインクなどの生理活性物質を担持させたリン酸カルシウム（インク・膜）のデリバリー技術開発を目指す。

## 3. 研究の方法

生理活性物質を担持させたリン酸カルシウム複合ナノ粒子を高濃度に分散させたバイオインクを開発、次にそのバイオインクを用いて歯面上に高機能人工歯面を形成するため、新たにレーザー誘起ナノジェットを利用した複合ナノ粒子のデリバリー技術（バイオインク転写技術）の構築を検討した。バイオインクのレーザー転写に加え、過飽和溶液を利用したバイオミメティック法であらかじめ膜形状に調製した生理活性タンパク質担持リン酸カルシウムについても、レーザー膜転写の検討を行った。2種類のレーザー転写技術（バイオインク転写、膜転写）のうち、バイオインク転写については原料に用いた医療用注射液中の水が極大吸収を有する波長 2940 nm の Er:AG マイクロ秒パルスレーザーを用いた。一方、膜転写については、膜内に担持させた生理活性タンパク質への熱影響低減のため、レーザーアブレーションを起こすドライヤー層としてカーボン薄膜を導入、カーボン膜が吸収を有する波長 1064 nm の Nd:YAG ナノ秒パルスレーザー（基本波 1064 nm）を採用した。

### (1) バイオインク合成技術

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、ヘパリンナトリウム溶液（分散剤）<sup>1)</sup>、生理食塩水の5種類の原料溶液を混合・攪拌して調製した反応液を 25℃で振

とうさせ、分散性リン酸カルシウムナノ粒子の合成を試みた。また、反応液に生理活性物質として線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) を添加し、FGF-2 担持リン酸カルシウム複合ナノ粒子の合成を試みた。各原料成分の濃度、反応液の振とう時間 (1 分~24 時間) などを変化させ、適切な粒子合成条件を検討した。

## (2) レーザー転写技術<sup>2-4)</sup>

### ① バイオインクのレーザー転写検討

新たに液体のレーザー転写に挑戦するため、バイオインク用のレーザー転写セル (インクホルダ) を設計・作製した。ノズルサイズにより射出体積の下限が制限されるインクジェット法と異なり、レーザー転写を基盤とする本技術では、ノズルサイズに影響されず、極微量のインク射出が実現できる可能性がある。このセルに光学窓を設け、水が極大吸収を有する波長 2940 nm の Er:AG パルスレーザーからのマイクロ秒パルスを集光照射することで、水のレーザーアブレーションを用いたバイオインクの射出を検討した。原理検証とプロセス最適化のため、ハイスピードカメラを利用した可視化システム構築に取り組んだ。

本手法により、基板上にバイオインクの 2 次元パターンニングを作製、デジタルマイクロスコープや高分解能 FE-SEM による表面観察等を実施した。

### ② リン酸カルシウム膜の転写検討

フィブロネクチンを添加したリン酸カルシウム過飽和溶液を用い、レーザー転写用ドナーとして、フィブロネクチン担持リン酸カルシウム原料膜 (転写原料膜) を光学的に透明かつ転写時に発生する衝撃を低減できる光スタンプ上に成膜した。本実験では、光スタンプとして、衝撃吸収材となるポリジメチルシロキサン (PDMS) を表面にコートしたポリエチレンテレフタレート (PET) 基材を用いた。この際、原料膜とは別にレーザー吸収層としてカーボン薄膜をリン酸カルシウム膜と光スタンプ界面に成膜することにより、タンパク質への高温負荷を低減した。

得られた原料膜について、原料膜とコンタクトさせる形で転写先基材 (レシーバー) を配置し、PET 基材側からナノ秒レーザーパルス (波長 1064 nm) を同一箇所シングルショット照射となるよう、大気中でビーム走査を実施した。

原料膜ならびに転写したフィブロネクチン担持アパタイト微細構造については、デジタルマイクロスコープや高分解能 FE-SEM による表面観察等を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) バイオインクの合成

5 種の原料溶液を混合・攪拌して調製した反応液を 1 分~24 時間振とうさせた結果、リン酸カルシウムナノ粒子を得ることができた。得られた粒子は医療用注射液中で分散し、動的光散乱法による平均粒子径は 100~200 nm 程度であった。また、ゼータ電位は -22~-15 mV 程度であり、比較的大きな負のゼータ電位を有した。負電荷を有するヘパリンが粒子に含まれることで、粒子間の静電反発により粒子の分散性向上に寄与したと考えられた。なお、振とう時間が長い条件で得られた粒子の方が、長期にわたり分散性を維持できた。

FGF-2 を添加した反応液からは、FGF-2 担持リン酸カルシウム複合ナノ粒子が得られた。得られた粒子は培地中で少なくとも 48 時間にわたって FGF-2 を徐放できることを確認した。

### (2) レーザー転写

#### ① バイオインクのレーザー転写結果

バイオインクのホルダについては、レーザー未照射の場合はインクの表面張力によりインクを保持しつつ、レーザーパルス照射による水のアブレーションを経て形成される気泡を利用してインクを押し出す機構を可能とするよう設計を行った。また、射出後に発生する気泡が次のレーザーパルス照射を遮ることのないよう改造することで、連続的なインク射出を可能とした。さらに、レーザー転写の際のインク射出挙動を捕捉するため、ハイスピードカメラを用いた可視化システムを構築、レーザーパラメータと射出速度・量の相関性を検討し、微小液滴を高い再現性で射出できるようレーザーパラメータの最適化に取り組んだ。その結果、バイオインクを対向配

置したレーザー基板上に連続射出することで、直径約 50 マイクロメートルのディスク形状で、位置精度よく基板上に連続堆積させることに成功、本手法によるバイオインクの 2 次元微細パターンングを実現できた。

#### ②リン酸カルシウム膜の転写結果

レーザー転写用ターゲットとして作製したフィブロネクチン担持リン酸カルシウム膜/カーボン薄膜/光スタンプ (PDMS コート PET) をレーザー転写用システムに設置、光スタンプ側から原料膜へナノ秒レーザーパルスを実行して照射し、対向配置したレーザー基板上への膜転写を検討した。光スタンプを用いた結果、レーザー基板として PDMS に加え、これまで難しかった硬い表面を有する PET や象牙質ブロック (ヒト天然歯) についても、膜破砕なくレーザービーム形状に対応した直径数十マイクロメートルのマイクロチップ転写堆積が得られ、本手法により被覆率約 80 %のコーティングを確認している。またレーザーパラメータの最適化により、フィブロネクチン担持アパタイトマイクロチップの象牙質表面への転写堆積において、FIB-SEM 断面観察により評価した結果、大きなギャップのない良好な界面形成を確認できた。

#### <引用文献>

- 1) M. Nakamura et al., Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2018, 162, 135-145.
- 2) A. Narazaki et al., Applied Sciences, 2020, 10, 7984.
- 3) 奈良崎愛子, スマートプロセス学会誌, 2021, 10, 65-71.
- 4) H. Miyaji et al., Journal of Oral Biosciences, 2022, 64, 217-221.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 A. Narazaki, A. Oyane, H. Miyaji	4. 巻 10
2. 論文標題 Laser-Induced Forward Transfer with Optical Stamp of a Protein-Immobilized Calcium Phosphate Film Prepared by Biomimetic Process to a Human Dentin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 7984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app10227984	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 奈良崎愛子	4. 巻 10
2. 論文標題 レーザー転写を利用した付加型微細パターン形成	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 スマートプロセス学会誌	6. 最初と最後の頁 76-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 奈良崎愛子	4. 巻 00D-21-017
2. 論文標題 レーザー転写が創り出す機能性表面・界面	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 電気学会研究会資料「スマートレーザプロセッシング研究開発の最新動向」	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Narazaki Aiko, Oyane Ayako, Komuro Saki, Kurosaki Ryozo, Kameyama Tomoko, Sakamaki Ikuko, Araki Hiroko, Miyaji Hirofumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Bioactive micropatterning of apatite immobilizing cell adhesion protein by laser-induced forward transfer with a shock absorber	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Optical Materials Express	6. 最初と最後の頁 2807 ~ 2816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/OME.9.002807	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Narazaki Aiko, Oyane Ayako, Hirofumi Miyaji	4. 巻 -
2. 論文標題 Laser additive micro-patterning for biomedical applications using laser-induced transfer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ICALEO 2019 Proceedings	6. 最初と最後の頁 Nano604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 奈良崎 愛子	4. 巻 37-3
2. 論文標題 レーザー転写による付加型パターンニング - 光が創り出す微小粒子と薄膜の微細パターン -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MICROOPTICS NEWS 第153回微小光学研究会「微細加工・操作の微小光学」	6. 最初と最後の頁 11~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirofumi Miyaji, Ayako Oyane, Aiko Narazaki	4. 巻 64
2. 論文標題 Biological Modification of Tooth Surface by Laser-Based Apatite Coating Techniques	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JOURNAL OF ORAL BIOSCIENCES	6. 最初と最後の頁 217~221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 奈良崎 愛子	4. 巻 -
2. 論文標題 光スタンプレーザー転写による膜転写技術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 第96回レーザー加工学会講演論文集	6. 最初と最後の頁 53~56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大矢根 綾子, 奈良崎 愛子, 宮治 裕史	4. 巻 -
2. 論文標題 レーザープラズマによる人工バイオミネラリゼーションと歯面改質	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JSPSプラズマ材料科学第153委員会第152回研究会資料	6. 最初と最後の頁 41~48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮治 裕史, 大矢根 綾子, 奈良崎 愛子	4. 巻 36
2. 論文標題 レーザーを用いたアパタイトコーティング技術による歯表面の生物学的改質	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NEW GLASS	6. 最初と最後の頁 15~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 奈良崎愛子
2. 発表標題 レーザー転写による物質デリバリー技術と界面形成の展望
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奈良崎愛子
2. 発表標題 レーザー転写を利用した付加型微細パターン形成
3. 学会等名 先進機能性表面・構造を創出するレーザー表層加工 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奈良崎愛子
2. 発表標題 レーザー転写が創り出す機能性表面・界面
3. 学会等名 電気学会研究会「スマートレーザプロセッシング研究開発の最新動向」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大矢根綾子
2. 発表標題 過飽和液中レーザープラズマ処理による高機能化歯面の構築
3. 学会等名 第38回プラズマプロセッシング研究会(SPP-38)/第33回プラズマ材料科学シンポジウム(SPSM33) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Narazaki Aiko, Oyane Ayako, Hirofumi Miyaji
2. 発表標題 Laser Additive Micro-patterning for Biomedical Applications using Laser-Induced Transfer
3. 学会等名 ICALEO 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oyane Ayako
2. 発表標題 Laser Plasma Processing for Biofunctional Surface Engineering
3. 学会等名 The 12th Asian-European International Conference on Plasma Engineering (AEPSE2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奈良崎 愛子、中田 芳樹、東海林竜也、坪井 泰之、佐藤 正健、新納 弘之、大矢根 綾子、宮治裕史
2. 発表標題 レーザー転写による物質デリバリーと界面形成
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奈良崎 愛子
2. 発表標題 レーザー転写による付加型パターンニング - 光が創り出す微小粒子と薄膜の微細パターン -
3. 学会等名 第153回微小光学研究会 「微細加工・操作の微小光学」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大矢根 綾子
2. 発表標題 飽和溶液法による表面機能化とバイオメディカル応用
3. 学会等名 2019年日本表面真空学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Narazaki Aiko、Oyane Ayako、Hirofumi Miyaji
2. 発表標題 Laser-induced forward transfer of bioactive materials with PDMS-based optical stamp
3. 学会等名 Photonics WEST 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Narazaki Aiko、Oyane Ayako、Kurosaki Ryoso、Kameyama Tomoko、Sakamaki Ikuko、Araki Hiroko、Hirofumi Miyaji
2. 発表標題 Additive Patterning of Fibronectin-Immobilized Apatite Micro-Chips by Laser-Induced Forward Transfer
3. 学会等名 PACRIM13 The 13th Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aiko Narazaki、Oyane Ayako、Hirofumi Miyaji
2. 発表標題 Bio-active patterning of fibronectin-containing apatite by laser-induced forward transfer
3. 学会等名 LAMP2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奈良崎 愛子
2. 発表標題 光スタンプレーザー転写による膜転写技術
3. 学会等名 第96回レーザー加工学会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako Oyane, Aiko Narazaki, Hirofumi Miyaji
2. 発表標題 Laser-assisted pseudo-biomineralization for tooth surface functionalization
3. 学会等名 The 2022 CLEO Conference and Exhibition (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aiko Narazaki, Ayako Oyane, Hirofumi Miyaji
2. 発表標題 Delivery of Protein-Immobilized Calcium Phosphate Microchips to a Human Dentin by Laser-Induced Forward Transfer with Optical Stamp
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials and The 8th Asian Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aiko Narazaki, Ayako Oyane, Hirofumi Miyaji
2. 発表標題 Laser-induced forward transfer of biomaterials prepared by biomimetic process
3. 学会等名 Optics-2021, 2nd International Summit on OPTICS, PHOTONICS AND LASER TECHNOLOGIES (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奈良崎 愛子
2. 発表標題 レーザー転写による物質デリバリー手法の開拓
3. 学会等名 溶接学会第133回マイクロ接合研究委員会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大矢根 綾子, 奈良崎 愛子, 宮治 裕史
2. 発表標題 レーザープラズマによる人工バイオミネラリゼーションと歯面改質
3. 学会等名 日本学術振興会プラズマ材料科学第153委員会第152回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

産業技術総合研究所 奈良崎愛子 研究紹介 主要な研究テーマ 1. レーザー転写による物質デリバリー  
<https://staff.aist.go.jp/narazaki-aiko/research.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 真紀  (Nakamura Maki)  (00568925)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員   (82626)	
研究分担者	大矢根 綾子  (Oyane Ayako)  (50356672)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・研究グループ長   (82626)	
研究分担者	宮治 裕史  (Miyaji Hirofumi)  (50372256)	北海道大学・大学病院・講師   (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------