

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04541

研究課題名（和文）歯周病治療革新のための歯界面反応の光制御と歯面高機能化

研究課題名（英文）Tooth surface functionalization via optical control of interfacial reactions for advanced periodontal treatments

研究代表者

大矢根 綾子（OYANE, Ayako）

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

研究者番号：50356672

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）：リン酸カルシウム過飽和溶液中でのレーザー照射プロセス（過飽和液中レーザー照射法）に基づき、ヒト象牙質基材にフッ素含有アパタイトを迅速成膜する技術を開発した。Nd:YAGパルスレーザーによる予備検討の結果、照射30分後の基材表面に、厚さ数ミクロンのフッ素含有アパタイトが生成することを確認した。同膜は象牙質基材と隙間なく接合・一体化しており、う蝕原因菌に対し抗菌性を示した。さらに、本成膜法を歯科用半導体レーザーに展開した。同レーザー光波長（808 nm）に有効な光吸収剤としてシアニン色素系診断薬であるインドシアニングリーンを基材表面に塗布しておくことで、照射時間の短縮（3分）に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯面のモデル材料としてヒト象牙質基材を用い、同基材の表面にフッ素含有アパタイトを迅速成膜する技術（過飽和液中レーザー照射法）を開発した。本成膜技術の特長として、医療現場での応用に適した簡便性・迅速性（照射時間：3～30分）に加えて、標的部位のみに選択的に成膜できる部位選択性が挙げられる。本研究では、成膜後のヒト象牙質基材がう蝕原因菌に対し抗菌性（フッ素による効果）を示すことを確認し、本成膜技術による歯面の高機能化を基礎実証した。さらなる技術改良・検証が必要ではあるものの、歯面を改質・高機能化する技術として、歯周病等の口腔感染症の予防や治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：A technique for fluoridated apatite (FAP) coating on teeth would be useful in dental applications. In this study, we achieved rapid (in 30 min) FAP coating on a human dentin substrate by a laser-assisted biomimetic (LAB) process; pulsed Nd:YAG laser irradiation in a supersaturated calcium phosphate solution supplemented with NaF. The LAB-processed, FAP-coated dentin substrate exhibited antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. We refined the LAB process with a combination of a dental diode laser and a clinically approved light-absorbing agent, indocyanine green, and achieved even faster (in 3 min) FAP coating on the human dentin substrate. Cross-sectional analysis by transmission electron microscopy revealed gapless interface states between the FAP coating layer and the dentin substrate. The LAB process enables rapid FAP coating on a target region of the dentin surface, and hence, has potential as a tool for tooth surface functionalization.

研究分野：無機生体材料

キーワード：レーザー アパタイト リン酸カルシウム 過飽和溶液 成膜 歯 コーティング 抗菌

1. 研究開始当初の背景

歯周病は罹患率・再発率の極めて高い細菌感染症であり、重症化すると歯の喪失を招くことから、より確実な治療法が望まれている。歯周外科処置後の歯面に、生体親和性と抗菌性、耐酸性（歯質保護効果）を併せ示すフッ素含有アパタイトを成膜することができれば、歯面の改質・高機能化により、歯周病の再発を抑制できる可能性がある。このような歯面改質応用には、簡便かつ迅速に、歯面の標的部位にアパタイトを成膜するための技術が必要である。

様々なアパタイト成膜技術の中でも、体液に類似したリン酸カルシウム過飽和溶液を反応場とする過飽和溶液法は、低融点基材にも適用可能な温和な液相成膜法として知られている。近年、研究代表者らは、過飽和溶液法とレーザープロセスを融合した独自のアパタイト成膜技術として、過飽和液中レーザー照射法[1,2]を開発し、従来の過飽和溶液法における課題（工程が複雑・長時間）の解決を図った。過飽和液中レーザー照射法では、リン酸カルシウムに対して過飽和な水溶液中に設置された基材の表面にレーザー光を照射することで、照射面にアパタイトを迅速析出させ、成膜を行う。研究代表者らはこれまで、Nd:YAG パルスレーザーを用いた基礎的検討において、本成膜法で得られたアパタイト膜の良好な細胞親和性を *in vitro* 細胞実験で実証したほか[3]、本成膜法によって歯質のモデル物質（焼結水酸アパタイト基材）の表面にフッ素含有アパタイトを迅速成膜できること、同生成膜が焼結水酸アパタイトを上回る耐酸性と抗菌性を示すことを明らかにした[4]。さらに、本成膜法をヒト象牙質基材に適用したところ、過飽和溶液中での 30 分の Nd:YAG パルスレーザー光の照射によって、照射面にアパタイトを成膜できることを示した[5]。

以上の背景から、本成膜法（過飽和液中レーザー照射法）が、歯周外科処置後の歯面を改質・高機能化するための技術として有用と考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らの過飽和液中レーザー照射法[1,2]に基づき、歯面（ヒト象牙質基材の表面）の標的部位（直径数ミリメートル）に、簡便かつ迅速にフッ素含有アパタイトを成膜するための技術を確立し、その効果を検証することを目的とする。歯面の改質・高機能化技術としての応用に向けて、これまでの研究で用いてきた Nd:YAG パルスレーザーに加えて、医療機器として臨床応用されている歯科用半導体レーザーを用い、技術の改良・高度化を進めていくこととした。

3. 研究の方法

ヒト由来試料を用いる本研究計画については、国立研究開発法人産業技術総合研究所および北海道大学病院の倫理委員会による審査と機関承認を得た上で、以下の方法により実施した。歯科用半導体レーザーは、昭和薬品化工株式会社（現株式会社ジーシー昭和薬品）より無償貸与を受けた。

(1) ヒト象牙質基材の作製

インフォームドコンセントを取得後、通常の治療目的で採取された歯牙の提供を受け、ヒト象牙質基材（厚さ 1 mm, 3~5 mm 角）を作製した。基材の表面に象牙細管が開孔するようカッティングした後、表面を研磨し、超音波洗浄に付した。

(2) 過飽和液中レーザー照射

フッ化ナトリウム（1 mM）を添加したリン酸カルシウム過飽和溶液（25 ）中に、(1)で作製されたヒト象牙質基材を設置し、同基材の表面に Nd:YAG パルスレーザー（Spectra-Physics 製 Quanta-Ray LAB-150-30, 30 Hz, 355 nm, 6 W/cm²）あるいは歯科用半導体レーザー（株式会社ジーシー昭和薬品製 S レーザー, 808 nm, 17 W/cm²）を 30 分までの種々の時間照射した（過飽和液中レーザー照射）。照射後の基材は速やかに超純水で洗浄した後、風乾した。なお、歯科用半導体レーザー光は象牙質にほとんど吸収されない（反応性に乏しい）ため、同レーザーによる過飽和液中レーザー照射に先立ち、光吸収剤としてシアニン色素系診断薬であるインドシアニングリーン（ICG）の溶解液を基材の表面に塗布した。

(3) 基材表面の組成・構造分析

過飽和液中レーザー照射によるヒト象牙質基材の表面組成および構造の変化を、走査電子顕微鏡（SEM）、エネルギー分散型 X 線分析装置（EDX）、薄膜 X 線回折装置（XRD）、およびフーリエ変換赤外全反射分光分析装置（FT-IR ATR）により調べた。また、集束イオンビーム加工観察装置を用いたマイクロサンプリング法により基材表層の断面組織を採取、薄膜化し、透過電子顕微鏡（TEM）による分析を行った。

(4) 抗菌試験

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ヒト象牙質基材、ならびに

対照試料として非成膜基材（各4枚）を、う蝕原因菌 *Streptococcus mutans* の懸濁液中に浸漬し、12時間嫌気培養を行った。コロニー計数法により、基材の抗菌性を評価した。

4. 研究成果

(1) Nd:YAG レーザーによる過飽和液中レーザー照射法の効果 [6]

図1に、ヒト象牙質基材表面の一部の領域（直径5mm）に、Nd:YAG レーザーを用いて過飽和液中レーザー照射（30分）を行った後の基材表面（左下：照射域、右下：非照射域、上：境界領域）のSEM像を示す。EDX、XRD、FT-IR ATR、TEMによる分析の結果、象牙質基材のレーザー光照射面（図1左下）にのみ、膜厚数ミクロンのフッ素含有アパタイトが成膜されたことが分かった。このフッ素含有アパタイト膜は、基材表面に対し垂直方向にc軸配向した柱状ナノ結晶からなり、下地の象牙質基材と隙間なく接合・一体化していた（図2左）。フッ素は膜全体に一樣に分布しており（図2右）、アパタイト結晶の水酸基の一部を置換していると考えられた。なお、断面TEM-EDX分析において、レーザー光照射による基材内部の構造・組成への影響は認められなかった。

本成膜法の歯面改質効果を検証するため、フッ素含有アパタイトを成膜した象牙質基材の抗菌性を評価した。その結果、ヒト象牙質基材表面に成膜されたフッ素含有アパタイト膜が *Streptococcus mutans* の増殖抑制効果を示すことを確認した。すなわち、本成膜法が、抗菌性歯面の構築に有効であることを基礎的に実証した。

(2) 歯科用半導体レーザーによる過飽和液中レーザー照射法の効果 [7]

図3上に、歯科用半導体レーザーを用いて過飽和液中レーザー照射（3分）を行ったヒト象牙質基材（左：ICG前処理なし、右：あり）の表面のSEM像を示す。ICG前処理を施した基材の表面には粒子状の析出物が観察され（図3右上）、これがフッ素含有アパタイトであることを、EDX、XRD、FT-IR ATR、TEM分析により確認した。断面TEM分析の結果によると、生成したフッ素含有アパタイト膜は1~1.5 μmの厚みを持ち、Nd:YAG レーザーによる結果（図2）と同様に、基材表面に対し垂直方向に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3右下）。基材への前処理において塗布された ICG の成分は検出されなかったことから、レーザーアブレーションにより消失したと考えられた。

一方、ICG前処理を施さなかった基材には、過飽和液中レーザー照射による構造変化は認められなかった（図3左上）。基材表面に塗布された ICG がレーザー光を吸収することで、フッ素含有アパタイトの析出を促したと考えられた。

ICG前処理を施したヒト象牙質基材の表面に、フッ素添加リン酸カルシウム過飽和溶液中で歯科用半導体レーザーを照射すると、わずか3分以内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。

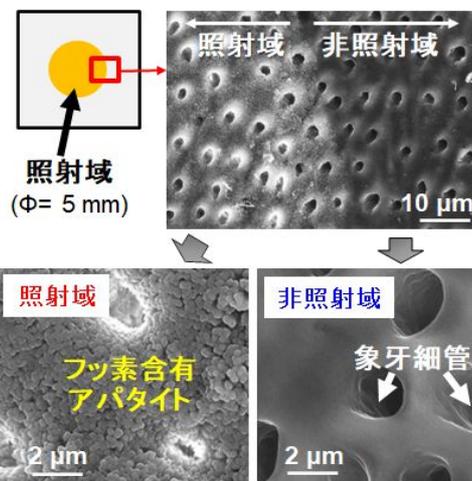


図1 Nd:YAG レーザーによる過飽和液中レーザー照射（30分）後の象牙質基材表面（左下：照射域、右下：非照射域、上：境界領域）のSEM像

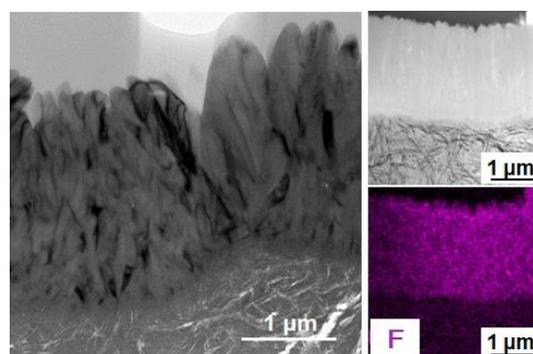


図2 Nd:YAG レーザーによる過飽和液中レーザー照射（30分）後の象牙質基材表層断面のTEM像（左）、HAADF像（右上）、および走査TEM-EDXによるフッ素マップ（右下）

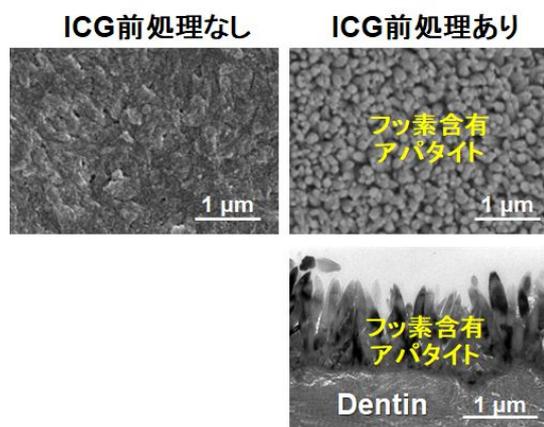


図3 歯科用半導体レーザーによる過飽和液中レーザー照射（3分）後の象牙質基材表面のSEM像（左上：ICG前処理なし、右上：あり）および基材表層断面のTEM像（右下）

(3) まとめ

過飽和液中レーザー照射法によれば、ヒト象牙質基材表面の標的部位（直径数ミリメートル）に、簡便かつ迅速にフッ素含有アパタイトを成膜でき、これによって歯面を改質・高機能化できることを実証した。さらなる技術改良が必要ではあるが、歯と歯周組織の健康維持・向上に資する歯面の改質・高機能化技術としての応用が期待される。

引用文献

- [1] A. Oyane et al., *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2012, **100A**, 2573.
- [2] Nakamura et al., *J. Mater. Chem. B*, 2016, **4**, 6289.
- [3] A. Oyane et al., *PLoS One*, 2018, **13**, e0206524.
- [4] A.J. Nathanael et al., *Acta Biomaterialia*, 2018, **79**, 148.
- [5] A. Oyane et al., *Mater. Sci. Eng. C*, 2019, **105**, 110061.
- [6] A. Oyane et al., *Mater. Sci. Eng. C*, 2020, **116**, 111170.
- [7] A. Oyane et al., *Inter. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**, 15981.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 中村 真紀、大矢根 綾子	4. 巻 41
2. 論文標題 薬物送達のためのリン酸カルシウムナノ粒子・薄膜の液相合成	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FC レポート	6. 最初と最後の頁 22-26
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 A. Oyane, I. Sakamaki, M. Nakamura, K. Koga, K. Shitomi, S. Tanaka, H. Miyaji	4. 巻 23
2. 論文標題 Fluoridated apatite coating on human dentin via laser-assisted pseudo-biomineralization with the aid of a light-absorbing molecule	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 15981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232415981	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 H. Miyaj, A. Oyane, A. 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 J. Oral Biosci.	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 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 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 152
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 大矢根 綾子、中村 真紀、宮治 裕史	4. 巻 28
2. 論文標題 歯科応用のための抗菌性リン酸カルシウム薄膜・ナノ粒子の迅速合成技術の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Soc. Inorg. Mater., Japan	6. 最初と最後の頁 164-169
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 A. Oyane, I. Sakamaki, K. Koga, M. Nakamura	4. 巻 10
2. 論文標題 Formation of a calcium phosphate layer immobilizing cobalt chromite nanoparticles on cobalt-chromium alloy by a laser-assisted biomimetic process	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Appl. Sci.	6. 最初と最後の頁 5584-5596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app10165584	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 A. Oyane, I. Sakamaki, K. Koga, M. Nakamura, K. Shitomi, H. Miyaji	4. 巻 116
2. 論文標題 Antibacterial tooth surface created by laser-assisted pseudo-biomineralization in a supersaturated solution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mater. Sci. Eng. C	6. 最初と最後の頁 111170-111180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2020.111170	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17件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 大矢根綾子、奈良崎愛子、中村真紀、宮治裕史
2. 発表標題 バイオメティック法と光技術の融合による高機能化歯面の構築
3. 学会等名 第21回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大矢根 綾子
2. 発表標題 生体に倣ったモノづくりとバイオメディカル応用
3. 学会等名 一般社団法人日本歯科理工学会令和5（2023）年度第81回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大矢根 綾子
2. 発表標題 バイオセラミックスの基礎～異分野融合研究の最前線
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大矢根 綾子
2. 発表標題 液相レーザープロセスを利用したアパタイト成膜技術
3. 学会等名 第20 回 五セラミックス研究機関(東工大-名工大-JFCC-AIST-NIMS)合同講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大矢根 綾子
2. 発表標題 バイオミネラリゼーションの光制御による高機能化歯面の構築
3. 学会等名 2022年度東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ / 日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 A. Oyane, A. Narazaki, H. 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 大矢根 綾子、牧野 雅、坂巻 育子、中村 真紀、田中 佐織、宮治 裕史
2. 発表標題 過飽和溶液中での歯科用半導体レーザー照射による歯面へのフッ素含有アパタイト成膜
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 A. Oyane, I. Sakamaki, S. Santakumar, H. Miyaji
2. 発表標題 Tooth surface functionalization via laser-assisted pseudo-biomineralization
3. 学会等名 日米バイオマテリアル学会ジョイントシンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 A. Oyane
2. 発表標題 Laser-assisted biomineralization for biofunctional surface engineering
3. 学会等名 11th India-Japan Science and Technology Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大矢根 綾子、坂巻 育子、中村 真紀、田中 佐織、田中 享、宮治 裕史
2. 発表標題 過飽和液中レーザー照射法による セメント質・エナメル質へのフッ素含有アパタイト成膜
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大矢根 綾子
2. 発表標題 歯工連携によるバイオミネラリゼーションの光制御と歯面改質
3. 学会等名 第30回日本コンピュータ外科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大矢根 綾子、坂巻 育子、中村 真紀、部 佳奈子、田中 佐織、宮治 裕史
2. 発表標題 歯科用半導体レーザーによるヒト象牙質基材への迅速アパタイト成膜
3. 学会等名 公益社団法人日本セラミックス協会第34回秋季シンポジウム
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 (独)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「死滅と再生を制御するプラズマ技術」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大矢根 綾子
2. 発表標題 リン酸カルシウム薄膜・ナノ粒子合成とバイオメディカル応用
3. 学会等名 日本材料学会ナノ材料部門委員会2021年度研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大矢根 綾子、坂巻 育子、中村 真紀、奈良崎 愛子、部 佳奈子、田中 佐織、宮治 裕史
2. 発表標題 レーザーを利用した迅速・部位選択的なアパタイト成膜技術と歯面高機能化
3. 学会等名 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
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 部佳奈子、宮治裕史、菅谷勉、古賀健司、中村真紀、大矢根綾子
2. 発表標題 過飽和液中レーザー照射法による象牙質表面へのフッ素担持アバタイト成膜と抗菌特性
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会（第152回）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究代表者のホームページ https://staff.aist.go.jp/a-oyane/ 研究代表者のグループ（産総研 ナノ材料研究部門 ナノバイオ材料応用グループ）のホームページ https://unit.aist.go.jp/nmri/nb-md/

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	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
---------	---------