

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560234

研究課題名(和文)人間の歯の健全性評価に向けた3次元アトムプローブによるナノスケール元素分析解析

研究課題名(英文)Three-dimensional nanoscale elemental analysis in human teeth by atom probe tomography towards their soundness evaluation

研究代表者

清水 康雄 (SHIMIZU, Yasuo)

東北大学・金属材料研究所・助教

研究者番号：40581963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで金属や無機材料にしか適用できなかった3次元アトムプローブ法を人間の歯に応用し、ナノスケールで実空間上の元素分布を調べた。まず、人間の歯を構成する主な成分であるハイドロキシアパタイト(HAp)を用いて、集束イオンビーム加工技術を駆使して分析用の針状試料形状の最適化を図った。紫外光レーザー補助による3次元アトムプローブ測定条件を見出し、HApを用いて蓄積した技術ノウハウを人間の歯(エナメル質・象牙質)に適用し、元素分布を得られるようにした。より詳細な解析を実施することで、エナメル質領域においてマグネシウムの顕著な粒界偏析・析出が見られることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, three-dimensional (3D) elemental distribution in human teeth with nanoscale was investigated by utilizing 3D atom probe (3D-AP), which was conventionally applicable to metals and inorganic materials. First, the shape of needle specimen of hydroxyapatite (HAp) crystals for 3D-AP analysis was optimized by means of a focused ion beam technique. After determining a proper condition of 3D-AP equipped with an ultraviolet pulsed laser for HAp, we could apply it for a human tooth (enamel and dentin regions) in order to obtain the elemental distribution. By performing a detailed analysis in 3D, clear segregation and clustering of magnesium in the enamel region were found.

研究分野：工学

キーワード：歯学 生体材料 3次元アトムプローブ 元素分布 硬さ

1. 研究開始当初の背景

3次元アトムプローブ (以下、3D-AP) 法は、針状試料の先端から材料中の原子を1個ずつ剥ぎ取ることで、原子レベルの位置分解能で実空間上の元素分布を得る分析手法である。近年、パルスレーザーを用いることで、金属や無機材料を対象とした研究が盛んに実施されるようになってきた。

一方、生体材料に対しては、これまで3次元の元素分布評価は取り組まれてこなかった。その主な理由として、試料準備・加工の難しさ、3D-AP測定時の針状試料先端からの原子の剥ぎ取りの難しさが挙げられる。これまで試験的であるが、歯の材料中の微量元素の偏析・析出物を調べるべく3次元情報の取得に取り組んできたが、試料加工の適切な手順や3D-AP法の条件設定が困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、最新の3D-AP法を人間の歯に応用して、ナノスケールで実空間上の元素分布を調べることを目的とした。これまで人間の歯に取り組まれてこなかった主な理由は、

(I) 歯の微細加工の難しさ、(II) 3D-AP測定時の原子の剥離の難しさ、の2点であり、まずこれらを解決しなければならない。ここでは、人間の歯を構成する主成分のハイドロキシアパタイト (HAp) をテスト試料として用いて、3D-AP法を適用するための試料加工条件 (ガリウム (Ga) ビームの加速エネルギー・電流値・照射時間・切削領域など) を最適化し、さらに針状試料の先端から原子を1個ずつ剥ぎ取るための3D-AP測定条件 (電界蒸発を誘発するためのレーザー強度、パルスレーザー周波数、イオン蒸発速度、試料温度など) の最適化を図り、再現良く針状試料の量産・統計精度を高めるための多量な解析を行える状況を整えた。

3. 研究の方法

(1) ハイドロキシアパタイトを用いた実験

本研究を実施するには、図1(a)に示す通り、歯の断面より任意の箇所からエナメル質・象牙質領域から選定できるようにする。ここでは、歯の主成分であるHAp試料を用いて、3D-AP測定に適用するための針状試料加工条件を見出した。

図2に一連の試料加工手順を示す。ここでは高分解能走査電子顕微鏡 (SEM) を備えた集束イオンビーム (FIB) 加工装置 (東北大学設置) を用いて実施した。まず、FIB装置に備わっている白金 (Pt) で所望の領域に保護膜を形成した [図2(a)]。続いて、斜め方向から Ga イオンを照射して保護膜周辺部を削り、マニピュレータを用いて分析領域を含むように試料片を持ち上げた [図2(b)]。続いて、この試料片をマイクロチップ (トップ平坦部約 2 μm 径のシリコン (Si) マイクロポスト) 上に位置調整して接合して試料を乗せ、Ga イオンを上方から環状パターンで照射

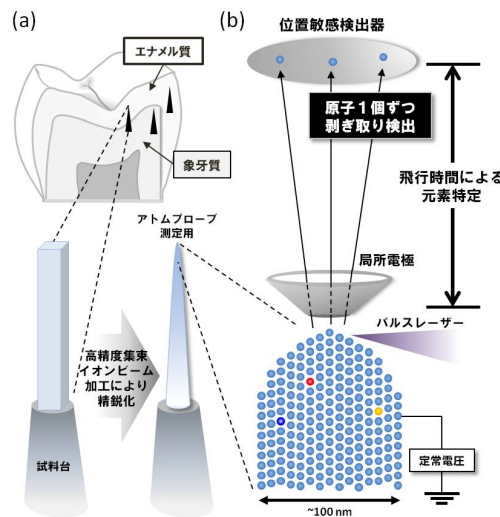


図1 : (a) 歯の断面の特定の領域から測定箇所を選定するイメージ図。(b) 3次元アトムプローブ測定の概念図。

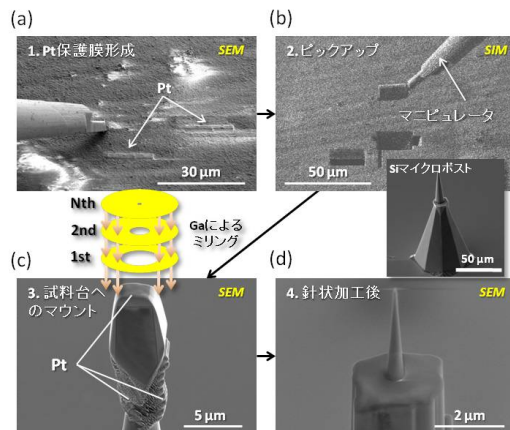


図2 : ハイドロキシアパタイト試料を用いた集束イオンビームによる加工手順。(a) 白金 (Pt) 保護膜形成、(b) 試料のピックアップ、(c) 試料台へのマウント、(d) 環状パターンを用いた加工 (最終形状)。

することで円錐状に加工した [図2(c)]。環状パターンの内径を徐々に狭めることで試料先端部を先鋭化した [図2(d)]。従来の金属や無機材料に比べ、HAp試料は硬く脆い材料であり、試料先端部の精鋭化は困難を極めた。今回の実験を通じて、精鋭化のためには環状パターンの内径と Ga ビーム照射時間の調整手順が最も重要なプロセスであることが分かった。

HAp試料に対して、再現良く針状試料を量産した後、3D-AP測定を実施した。HApに含まれるリン (P) と酸素 (O) の複合体 ( $P_xO_y$ ) として検出されることが分かった。これを不足無く検出するためには、パルスレーザー周波数を低くする必要があることが分かった。

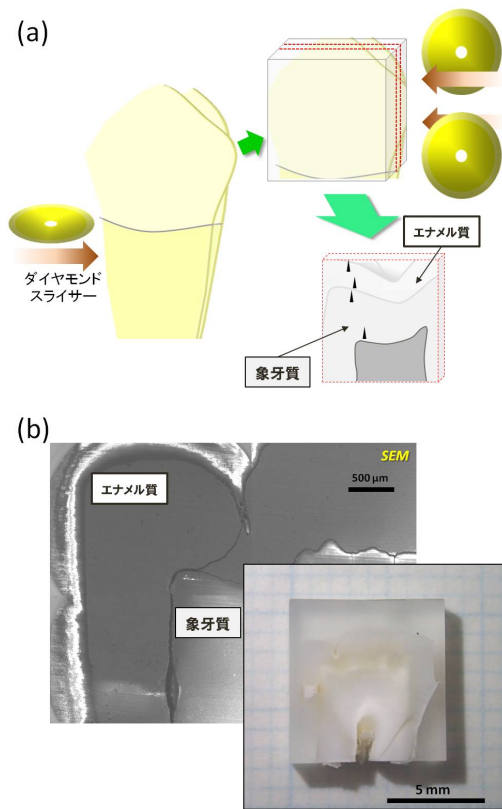


図3：(a) ダイヤモンドスライサーを用いた歯の試料準備手順。(b) 本研究で用いた試料断面のSEM像および全体像。

## (2) 歯の準備・加工

1本の歯から任意の領域(エナメル質・象牙質)を選定できるよう、ダイヤモンドスライサーを用いて平坦試料を抜き出した[図3(a)]。図3(b)に実際に用いた試料断面のSEM像および全体像を示す。ここでは、東京医科歯科大学より試料提供を受けて実施した。SEM像においてもエナメル質・象牙質領域の判断が容易であり、それぞれの領域において、(1)で最適化した加工・測定条件を適用した。

## 4. 研究成果

### (1) ハイドロキシアパタイトの測定結果

図4(a)にHAp試料の質量スペクトルを示す。HApの成分であるカルシウム(Ca)、リン(P)、酸素(O)およびこれらの複合体のピークが明瞭に見られた。質量スペクトルのピークとイオン種の対応を取ると、HApの主成分比とよく一致した。今回、3D-AP法を適用するには、図4(a)に示す針状試料形状が適することが分かり、これを効率良く再現良く加工できた。エナメル質・象牙質の領域においてもこの形状を目指した。

### (2) エナメル質の測定結果

HAp試料と同様、図4(b)にエナメル質領域における質量スペクトルと針状試料のSEM像を示す。まず、針状試料加工時のFIBによ

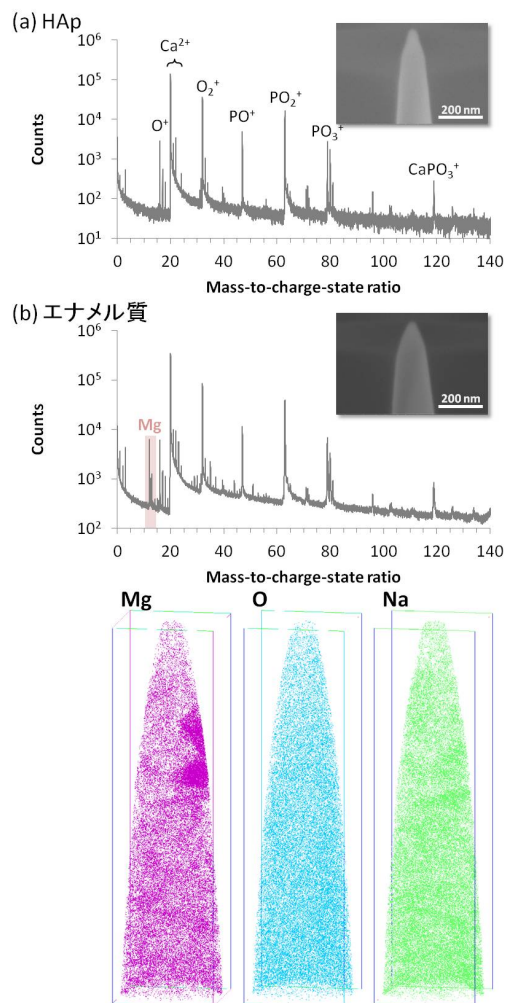


図4：(a) HAp試料の3D-AP法で得られた質量スペクトルおよび針状試料のSEM像。(b) エナメル質領域における質量スペクトルおよび針状試料のSEM像。マグネシウム(Mg)、酸素(O)、ナトリウム(Na)の3次元アトムマップ(体積：87×86×322 nm<sup>3</sup>)。

るGaビーム加工による形状調整では、HApとエナメル質で大きな差がないことが分かった。エナメル質の主成分はHApであり、質量スペクトルのピーク位置やカウント比は、図4(a)に示すHAp試料と同等であることを確認した。注目すべき点は、エナメル質領域に微量に含まれるマグネシウム(Mg)やナトリウム(Na)のピークが見られた点である。その3次元アトムマップを同図内に示すが、特にMgの顕著な粒界偏析・析出が見られた。また、Naもやや不均一な分布していることが明らかとなった。一方で、酸素(O)関連(リンとの複合体P<sub>x</sub>O<sub>y</sub>など)は、ほぼ均一に分布していることが分かった。

### (3) 象牙質の測定結果

(2)のエナメル質の測定と同様のプロセスを象牙質に適用した。図5(a)に示す針状試

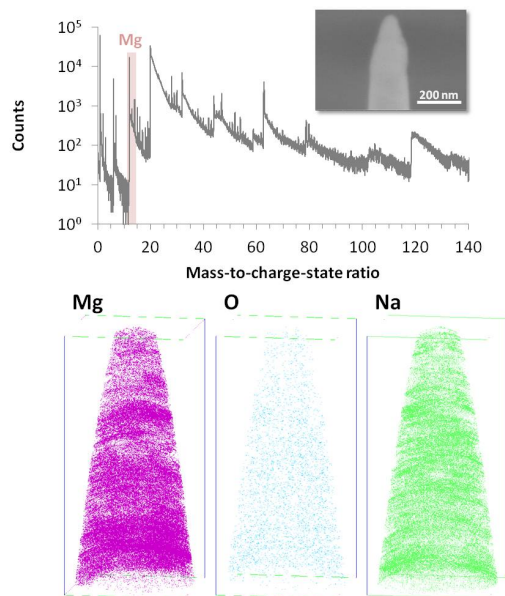


図5：(a) 象牙質領域における質量スペクトルおよび試料の針状試料のSEM像。(b) マグネシウム (Mg)、酸素 (O)、ナトリウム (Na) の3次元アトムマップ (体積：83×82×177 nm<sup>3</sup>)。

料のSEM像の通り、針先の形状に限ればHApとエナメル質と大きな差がなく加工できた。しかし、エナメル質に比べて3D-AP測定中の電界応力による試料破壊が起こりやすく、十分な体積を得るための測定は困難を極めた。針先に着目すると、SEMにて微小なボイドやクラックが見られ、これが大体積の3D-AP測定を阻害していることが分かった。

図5(a)に示す質量スペクトルのピーク位置に着目するとエナメル質領域の結果と近いが、ピークの右側に裾引きが見られている。これは3D-AP測定において酸化物を対象としたときに見られる特有な現象であり、エナメル質-象牙質間で、パルスレーザーによる熱の影響において差があることを示している。図5(b)には測定成功例のMg、O、Naの3次元アトムマップを示す。エナメル質と同様に、Mgの粒界偏析や析出が見られることが分かった。

本研究を通じて、実際の人間の歯に対し、初めてエナメル質領域において、3D-AP測定中の電界応力による試料破壊をほとんど起こすことなく、従来にない大体積且つ再現性の高い実空間上の元素分布を得ることができた。これまでマイクロスケールの組織観察で健全性を評価してきたが、実際の歯に対して、ナノスケールにおける元素の不均一分布を得たという新しい知見に繋がった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計3件)

- ① Y. Shimizu, T. A. Bakhsh, A. Sadr, J. Espigares, J. Tagami, B. Han, Y. Tu, K. Yoshida, K. Inoue, and Y. Nagai, Atom probe tomographic study of human tooth materials, International Conference on Atom Probe Tomography & Microscopy, June 12-17, 2016, Gyeongju, South Korea
- ② Y. Shimizu, B. Han, H. Takamizawa, T. A. Bakhsh, A. Sadr, J. Tagami, K. Inoue, and Y. Nagai, Three-dimensional elemental analysis of human enamel and dentin by laser-assisted atom probe tomography, 第75回応用物理学会秋季学術講演会、2014年9月18日、北海道大学札幌キャンパス
- ③ 清水康雄、3次元アトムプローブを用いた材料解析例、2014年夏の電子顕微鏡解析技術フォーラム、日本顕微鏡学会・電子顕微鏡解析技術分科会主催、2014年8月23日、時之栖、静岡 [招待講演]

[その他]

ホームページ等

<http://wani.imr.tohoku.ac.jp/yshimizu.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 康雄 (SHIMIZU, Yasuo)  
 東北大学・金属材料研究所・助教  
 研究者番号：40581963

### (2) 研究分担者

サダル アリレザ (SADR, Alireza)  
 東京医科歯科大学・国際交流センター・非常勤講師  
 研究者番号：20567755

永井 康介 (NAGAI, Yasuyoshi)  
 東北大学・金属材料研究所・教授  
 研究者番号：10302209

井上 耕治 (INOUE, Koji)  
 東北大学・金属材料研究所・准教授  
 研究者番号：50344718