

令和元年6月19日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11576

研究課題名(和文) Er:YAGレーザーデポジション法による歯質上へのアパタイト膜形成条件の確立

研究課題名(英文) Establishment of hydroxyapatite film formation condition on dentin by Er:YAG laser deposition method

研究代表者

本津 茂樹 (Hontsu, Shigeki)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：40157102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：レーザー加工とレーザー成膜とが表裏一体の関係にあることに着目し、Er:YAGレーザーによる歯質の切削や歯石の除去を加工と見なし、このレーザーを歯質上でハイドロキシアパタイト(HAp)のバルク体(ターゲット)に照射すれば、歯質上にHAp膜が成膜できると考え、Er:YAGパルスレーザーデポジション(Er:YAG-PLD)法を提案した。本研究ではミスト供給式小型Er:YAG-PLDユニットを試作し、レーザーのコンタクトチップやターゲットの種類、レーザーパワーや繰り返し速度、ターゲットや歯質への水の供給量など、歯質上に接着性に優れ、知覚過敏治療にも適応できるHAp膜の最適形成条件を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床用に使用できる小型Er:YAG-PLDユニットを完成し、その成膜条件を確立したので、歯質と同素材によるエナメル質の大きな欠損の修復や、人工エナメル質を用いた知覚過敏症の治療が可能になるばかりでなく、これまで治療法がなかったTooth wearやエナメルクラックの治療も行える可能性がでてきた。よって、歯科治療分野においてこれまでレジニアレルギーで歯科治療の受けられなかった人達の治療を可能にするばかりでなく、口腔内の再石灰化能を利用した生体への侵襲のない新規なエナメル質修復治療を提供することができるようになる。

研究成果の概要(英文)：We focused on the fact that laser processing and film formation method with laser were inside and outside unification. That is, the cutting of the dentin and the removal of tartar with the Er:YAG laser were laser processing, and conversely, the laser irradiation of the bulk material (target) of hydroxyapatite (HAp) on the dentin in the oral cavity was laser deposition of HAp film. From this idea, we proposed the Er:YAG pulsed laser deposition (Er:YAG-PLD) method. In this study, first, a mist-supplying compact Er:YAG-PLD unit was fabricated. Subsequently, optimal forming conditions such as the type of laser contact tip and target, laser power and repetition rate, and the rate of water supply to the target for producing an HAp film that has excellent adhesion and can be applied to the treatment of dental hypersensitivity was established.

研究分野：機能材料工学

キーワード：Er:YAGレーザー ハイドロキシアパタイト膜

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯のエナメル質を作るエナメル芽細胞は、歯の萌出時にはすでに存在しないため、一度失ったエナメル質は二度と再生されることはない。現在、エナメル質がう蝕や酸蝕、咬耗や摩耗等で欠損した場合、欠損部の修復にはコンポジットレジン(以下レジンとする)が主に使用されている。しかしながら、レジンには含有する高分子化合物によるアレルギー反応の問題や、レジンの収縮により歯質との間に生じる亀裂や剥離の問題が指摘されている。欠損したエナメル質をエナメル質と同素材であるハイドロキシアパタイト(以下 HAp と記す)で修復しようとしても、粗面度の相違によりセラミックス同士の固着は非常に困難であることより、HAp を用いた歯質の修復は実現されていない。特に象牙質上に HAp の人工エナメル質を作ることは非常に困難とされている。これまで HAp を用いた先進的な治療技術として、室温・大気圧環境下で HAp 微粒子を歯の表面に高速で衝突させることにより、HAp 厚膜を形成するパウダージェットデポジション(power jet deposition; PJD)法や、厚さ 1~10  $\mu\text{m}$  のフレキシブルな HAp シートを歯質の表面に貼付して一体化させる極薄 HAp シート貼付法などが提案されているが、未だ実用化には至っていない。

このような現状の中で、申請者は Er:YAG パルスレーザーデポジション(pulsed laser deposition; PLD)法を提案し、この手法によりエナメル質の修復や知覚過敏症の治療が HAp を用いて行えることを示した。しかしながら、この Er:YAG-PLD 法を歯科治療の臨床現場に適用するためには、さらなる基礎データの蓄積と、PLD 装置の改良が必要不可欠となる。すなわち、コンタクトチップやターゲットの種類、レーザーパワーや繰り返し速度等の最適成膜条件の確立と、ターゲットと歯質上に安定した水分の供給システムを持つ小型 Er:YAG-PLD ユニットの実現が必要になると考えた。

### 2. 研究の目的

レーザー加工とレーザー成膜とが表裏一体の関係にあることに着目し、Er:YAG レーザーによる歯質の切削や歯石の除去を加工と見なし、このレーザーを歯質上でハイドロキシアパタイト(HAp)のバルク体(ターゲット)に照射すれば、歯質上に HAp 膜が成膜できると考え、図 1 に示すような Er:YAG パルスレーザーデポジション(Er:YAG-PLD)法を提案した。そしてこの手法を用いて、エナメル質や象牙質上に HAp 膜を形成できることを確認した。しかしながら、レーザーのコンタクトチップやターゲットの種類、レーザーパワーや繰り返し速度、ターゲットや歯質への水の供給法などの最適成膜条件は未だ確立されていない。本研究では、ミスト供給式小型 Er:YAG-PLD ユニットの試作し、それを用いて歯質上に固着性に優れ、知覚過敏治療にも適応できる HAp 膜の最適作製条件の確立を目指す。



図 1 開発した Er:YAG-PLD ユニット

### 3. 研究の方法

本研究では以下に示す二つの項目(a)、(b)に絞って研究を実施した。ヒト抜去歯の使用については大阪歯科大学の倫理委員会の承認を得た。

(a) 臨床用小型 Er:YAG-PLD ユニットの試作と成膜条件の検討；(b)の堆積膜の評価の一部の結果をフィードバックして実施

#### アブレーションアシストミスト量の決定

Er:YAG レーザーの分散・剥離反応(アブレーション機構)は、レーザー光により励起された水分子熱振動により生じた水蒸気爆発反応による蒸散、すなわち水和殻(Hydration Shell)の熱作用による水蒸気爆発であるため、外部から水分子をターゲットや歯質上に常時供給する必要がある。本研究ではこれまでの純水塗布法に対し、図 2 に示すようなミストアシスト法を用いることで、安定した成膜を実現する。試作機では市販のネブライザーをミスト供給源とし、最適ミスト量を決定する。



図 2. ミストアシスト Er:YAG-PLD 法

#### コンタクトチップおよびターゲットの決定

粒子径が小さく(1 $\mu\text{m}$ 以下)、密度が高く、短時間で HAp 膜に転移する堆積膜を得るために、Er:YAG-PLD ユニット先端のコンタクトチップとして、図 3 に示すような 2 つのファイバー径のチップについて検討する。また、上記の目標の膜が得られるターゲット素材の種類として、 $\alpha$ -TCP や非晶質リン酸カルシウム(ACP)等について、粒径や成型プレス圧を変えて作製したターゲットについて、最も適したものを選定する。



図 3. コンタクトチップ

#### レーザーパワーおよび繰り返し速度の決定

前述の粒子径と密度、HAp 転移の速い膜を得るための、レーザーパワー(150~300 mJ)と繰

り返し速度(5 ~ 20 pps)のレーザー成膜条件を決定する。

#### 照射角度・距離・時間の確立

レーザー成膜を行う場合、コンタクトチップとターゲット、ターゲットと歯質面の角度と距離は重要なパラメーターとなる。ここでは、X-Y-Z ステージ上に PLD ユニットのセットすることにより、臨床現場に合った最適な距離と角度を決定する。

また、歯の神経(歯髄)は 5 の温度差で死滅するので、図 4 に示す歯髄温度計測により、4 の変動範囲のレーザー照射時間を決定する。



図 4. 歯髄の温度計測

#### (b) 堆積膜の評価

##### XRD 回折による結晶構造測定

堆積膜の HAp 化への時間経過観察するために、堆積膜に純水を滴下するとともに試料の周りを純水で満たし、温槽にて 37 で静置し、1、12、24、48 時間後の結晶構造を X 線回折(XRD)装置で評価する。

##### SEM による堆積膜の粒子サイズの評価

研究項目(a)の、 を決定するための評価として、堆積膜表面と歯質-堆積膜断面を低真空 SEM で観察する。

##### 堆積膜の固着特性の評価；

膜の固着特性の評価を、引っ張り試験、160g 重さの 150 rpm、20 stroke のブラッシング試験を行い、剥離しないことを確認する。

#### (b) 堆積膜の評価

これまでの成果を踏まえて、Er-YAG-PLD の実用機をモリタ製作所第二研究開発部の協力のもとに作製する。新しく作製した小型 Er:YAG-PLD ユニットの図 5 に示す。ターゲット直径は試作機の 7 から 5 に変更するとともに、取り外しに便利なカセット方式とした。

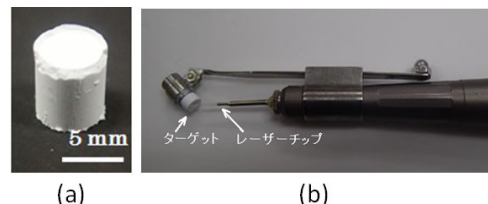


図 5 小型 Er:YAG-PLD ユニットの实用機

##### 象牙細管の封鎖性評価

実用機でヒト抜去歯から切り出した象牙質ディスク上に HAp 膜を堆積し、象牙細管の封鎖性を評価することで知覚過敏治療への可能性を検討する。象牙細管透過抑制率の測定は、Pashley らが報告していた象牙質透過抑制率測定装置を用いた。Dentinal fluid には親ウシ血清を用い、試料ステージに HAp 膜の成膜前後の試料を固定し、それぞれの Dentinal fluid の移動量を測定することで透過抑制率を算出した。また、堆積膜をもつ象牙質試料をレジンで包埋し、その後基板面に垂直に切断して、堆積膜 - 象牙質界面を露出させ、低真空 SEM により象牙細管の封鎖状況を観察した。

#### 4. 研究成果

XRD 回折による堆積膜の HAp 化への時間経過観察、SEM による堆積膜の粒子サイズの評価より、アブレーションアシストミスト量、コンタクトチップおよびターゲット、レーザーパワー、繰り返し速度、照射角度、照射距離、照射時間等の成膜条件の確立を行った。

##### アブレーションアシストミスト量の決定

図 6 に、ミストアシスト量を変えて成膜した Ti 基板上的堆積膜の状況を示す。成膜効率はミスト量とともに増加した。しかし、0.41 ml/min を超えると基板に水滴が付着し、成膜効率は著しく低下した。よって最適ミスト噴出量は 0.41 ml/min とした。

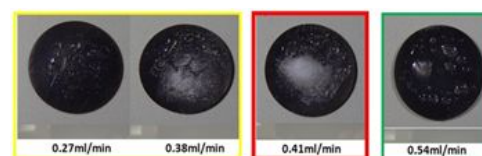


図 6 アシストミスト量と堆積膜の状況

##### コンタクトチップおよびターゲットの決定

コンタクトチップとしてファイバー径の異なる

2 つの改良型スーレートチップ C-400F と C-800F について検討した。

堆積膜の粒子サイズを SEM により観察した結果、ファイバー径が小さなチップほど堆積膜の粒子径は小さくなるのが分かり、堆積膜の密度が高いほど良質な膜であることから、C-400F を用いることにした。

Er:YAG レーザーを照射する膜原料のバルク体(ターゲット)の材料として、HAp および HAp の前駆体であるリン酸水素カルシウム二水和物;  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (DCPD)、 $\alpha$ -リン酸三カルシウム;  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ( $\alpha$ -TCP)、 $\beta$ -リン酸三カルシウム;  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ( $\beta$ -TCP)、ピロリン酸  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  (CPP)等を検討した。いずれのターゲットも純水を浸透させてから成膜を開始した。アブレーションの強さ、堆積膜の粒子径や堆積膜が HAp 膜に転化するまでの時間等から、ターゲットとして  $\alpha$ -TCP を用いることにした。



### レーザーパワーおよび繰り返し速度の決定

Er:YAG レーザーの出力および繰り返し周波数を変化させ、堆積膜の平均粒子径を SEM により観察した。レーザー出力を上げるほど粒子径は小さくなったが、300mJ を超えると、ターゲットからの反射レーザー光により、堆積膜に再アブレーションが生じ、成膜効率が低下したため、最適レーザー出力は 300mJ とした。また、繰り返し周波数の相違による粒子径の差はほとんどなかった。さらに、成膜速度は繰り返し周波数にほぼ比例したが、成膜速度が速いほど膜堆積体の温度上昇が速くなるため、臨床で取り扱いやすい 10Hz を最適速度とした。

### 照射角度、照射距離、照射時間の確立

レーザー光のターゲット照射面に対する照射角度はアブレーション粒子の飛散方向から 30° から 45°以内が最適であった。また、レーザー先端とターゲット距離は 0.5mm 程度、ミスト噴出口とターゲットの距離は約 10mm が最適であることがわかった。

照射時間は歯の神経(歯髄)の 4 の温度差の変動範囲から決定した。図 7 に示すように、4 の温度範囲でのレーザー照射時間は約 50 秒であることが分かった。

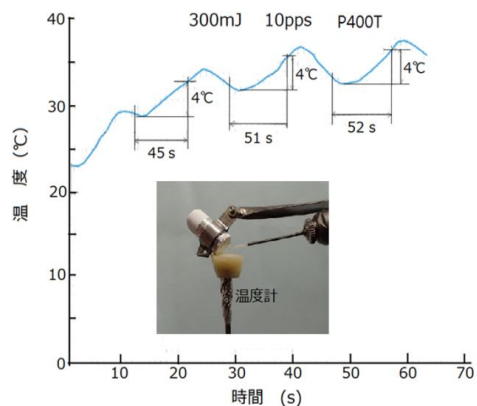


図 7 アブレーション時間と歯髄部温度の関係

### XRD 回折による結晶構造測定

Ti 基板に  $\alpha$ -TCP を堆積後、純水および人工唾液を塗布し、37 の恒温槽で 1~48 時間静置して  $\alpha$ -TCP 堆積膜の結晶構造の変化を調べた。その結果、 $\alpha$ -TCP 堆積膜は約 48 時間でほぼ HAp 膜に転化することがわかった。

### SEM による堆積膜の粒子サイズの評価

この堆積膜の粒子サイズの評価は、前述のと の評価を行う時に必要なものであり、すでに前項で説明している。

### 堆積膜の固着特性の評価；

HAp 膜の象牙質に対する機械的固着特性は、図 8 に示す引っ張り試験機 (EZ-test、島津製作所) を用いて評価した。ステンレス鋼ロッド(治具直径 3mm)を HAp 堆積膜上にエポキシ樹脂接着剤で接着した。図に示すように治具を引っ張り速度 0.5mm/min で引き上げ変位 - 応力特性の最大の引っ張り応力から固着強度を求めた。

引っ張り試験機で測定した変位 - 応力特性を図 9 に示す。図の最大の引っ張り応力から求めた固着強度は  $3.82 \pm 2.58$  MPa (n=5) であった。

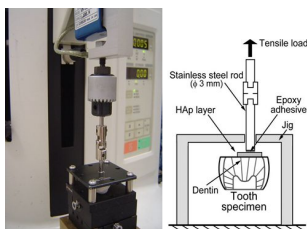


図 8 象牙質上に堆積した HAp 膜の SEM 像

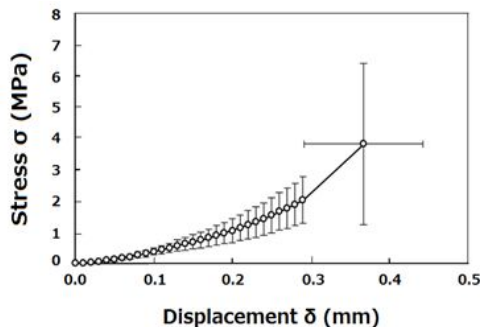


図 9 象牙質上の HAp 膜の変位 - 応力特性 (n=5)

引っ張り試験後の象牙質表面の光学写真を図 10(a)に示す。図より、引っ張り治具であるステンレス鋼ロッドの円形の跡が象牙質表面に見られ、この部分が引っ張り試験により何かのダメージを受けたことが分かる。引っ張り治具の辺縁部の SEM 写真を図 10(b)に示す。この図において黒色の部分は接着の際に治具ロッドよりはみ出した接着剤で、この部分より上の部分、すなわち引っ張り治具ロッド外の部分は象牙質が HAp 膜で覆われていることが確認できる。一方、引っ張り治具ロッドがあった部分には引っ張り試験後も堆積膜が残存しており、堆積膜の層面内で凝集破壊が生じたと思われる。よって、象牙質と接している HAp 膜の固着強度は測定値より大きいと

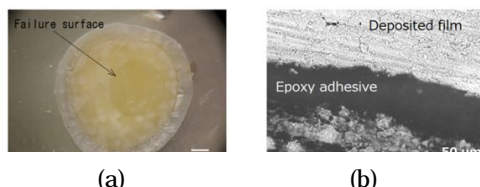


図 10 引っ張り試験後の象牙質表面の光学像 (a)と SEM 像(b)

考えられる。

#### 象牙細管の封鎖性の評価

図11にレジン包埋後に象牙質表面に対して垂直に切断して観察した、HAp膜-象牙質界面の断面SEM像を示す。一部空洞の部分がみられるが緻密なHAp膜が象牙質表面を覆っており、また拡大写真からHApの微粒子が象牙細管内まで入り込み細管を封鎖していることがわかる。

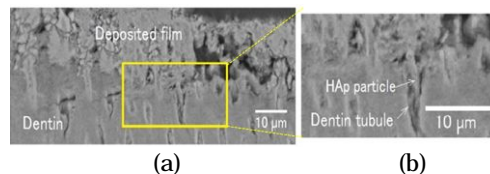


図 11 ヒト抜去歯象牙質上に堆積された HAp 膜の断面 SEM 像(a)とその拡大図(b)

図 12 は象牙質表面の SEM 像を示しているが、この図の右側の HAp 膜が存在する部分の象牙細管は堆積膜により封鎖されていることがわかり、上記の断面 SEM 像とよく対応していることが分かる。

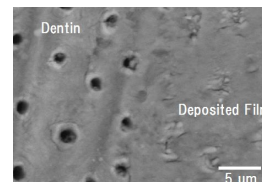


図 12 象牙質上に堆積した HAp 膜の SEM 像

成膜後 3 日目に象牙質透過抑制率測定装置を用いて測定した透過抑制率は  $85.60 \pm 8.62\%$  (n=4)であった。一般にレジン治療による象牙質透過抑制率は 70~80%であることから、本手法はこの値より大きな値であることが分かった。

#### 5 . 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 4 件)

Ei Yamamoto, Masahiro Nakazawa, Mizuki Hirai, Yoshiya Hashimoto, Shunsuke Baba and Shigeki Hontsu, Cell adhesion ability of  $\alpha$ -tricalcium phosphate films formed on titanium substrates by an Er:YAG laser deposition method: Imprecations for management of peri-implant inflammation, Key Engineering Materials, 査読有, in press,

Ei. YAMAMOTO, Nobuhir. KATO, Shigeki HONTSU, Adhesive Evaluation by Brushing Tests for Hydroxyapatite Films Fabricated on Dentins Using a Water Mist Assisted Er:YAG Laser Deposition Method, Key Engineering Materials, 査読有, 758 巻, 2017, 97-104, 10.4028/www.scientific.net/KEM.758.97

Ei. YAMAMOTO, Nobuhir. KATO, Kazushi. YOSHIKAWA, Kenzo. YASUO, Kazuyo. YAMAMOTO, HONTSU. Shigeki, Adhesion Properties of an Apatite Film Deposited on Dentine Using Er:YAG Laser Ablation Method, Key Engineering Materials, 査読有, 696 巻, 2016, 69-73, 10.4028/www.scientific.net/KEM.696.69

Ei. YAMAMOTO, Nobuhiro. KATO, Yuka. HATOKO, Shigeki. HONTSU, Optimization of Humid Conditions Using an Ultrasonic Nebulizer for the abrication of Hydroxyapatite Film with the Er:YAG Laser Deposition Method, Key Engineering Materials, 査読有, 720 巻, 2016, 269-274, 10.4028/www.scientific.net/KEM.720.269

##### [学会発表](計 13 件)

南野智紀, 平井瑞樹, 吉川一志, 本津茂樹, Er:YAG レーザーデポジション法を用いたエナメル質小窩の修復, 第 24 回 日本アパタイト研究会, 2018 年 11 月 22 日, 沖縄県那覇市(沖縄県立博物館・美術館)

平井瑞樹 本津茂樹 南野智記 橋本典也 馬場俊輔, Er:YAG レーザーデポジション法による SLA-Ti インプラント上への $\alpha$ -リン酸三カルシウム膜の形成, 日本歯科理工学会第 72 回秋季学術講演会, 2018 年 10 月 6~7 日, 北海道札幌市(北海道大学学術交流会館)

E. Yamamoto, M. Nakazawa, M. Hirai, Y. Hashimoto, S. Hontsu, Cell adhesion ability of  $\alpha$ -tricalcium phosphate layers fabricated on titanium substrates by an Er:YAG laser deposition method: Implications for management of peri-implant inflammation, The 18th Asian Bioceramics Symposium; ABC 2018 (国際学会), 2018 年 9 月 19 日~9 月 20 日, インドネシア・バンドン

中澤正博, 本津茂樹, 橋本典也, 馬場俊輔, チタンインプラントの Er:YAG レーザーによるデブライドメントとハイドロキシアパタイト被覆膜形成, 第 48 回日本口腔インプラント学会学術大会, 2018 年 9 月 14 日~9 月 16 日, 大阪府大阪市(大阪国際会議場)

本津茂樹, 中澤正博, 平井瑞樹, 山本衛, 橋本典也, Er:YAG レーザーデポジション法によって Ti 基板上に形成された  $\alpha$ -TCP 膜の特性評価, 歯科理工学会第 71 回春期学術講演会, 2018 年 4 月 14 日~15 日, 大阪府枚方市(大阪歯科大学 楠葉学舎)

Ei. YAMAMOTO, Nobuhir. KATO, Shigeki HONTSU, Adhesive Evaluation by Brushing Tests for Hydroxyapatite Films Fabricated on Dentins Using a Water Mist Assisted Er:YAG Laser Deposition Method, 29th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine; BIOCERAMICS 29 (国際学会), 2017 年 10 月 25 日~

27日、フランス(ツールーズ)

本津茂樹, 山本衛, 吉川一志, 山本一世, ミストコンタクトチップを用いたEr:YAGレーザーアブレーション法により作製したアパタイト膜の結晶性と固着強度, 第29回日本レーザー歯学会 総会・学術大会, 2017年9月23日~24日, 新潟県新潟市(日本歯科大学新潟生命歯学部 講堂・アイヴィホール)

本津茂樹, 口腔内レーザーデポジション法の歯科応用, 日本歯科医学会 第33回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」(招待講演), 2017年8月31日, 東京都千代田区(歯科医師会館 1階大会議室)

本津茂樹, 波床侑果, 山本衛, 加藤暢宏, 吉川一志, 山本一世, ミストアシストEr:YAGレーザーデポジション法によるアパタイト膜の形成, 第67回日本歯科理工学会学術講演会, 2016年04月16日~04月17日, 福岡県福岡市(九州大学医学部百年講堂)

本津茂樹, 山本衛, 加藤暢宏, 保尾謙三, 吉川一志, 山本一世, Er:YAGレーザーデポジション法を用いたアパタイト膜形成におけるミストアシストの効果, 第28回日本レーザー歯学会総会・学術大会, 2016年07月16日, 愛知県名古屋市(ウインクあいち)

K. Yoshikawa, K. Yasuo, C. Hirai, K. Yokota, Y. Hirota, N. Iwata, N. Kato, E. Yamamoto, S. Hontsu, K. Yamamoto, Direct Deposition of Apatite Film on Dentin Using Er:YAG Laser-ablation Method, The 15th Congress of the World Federation for Laser Dentistry (国際学会), 2016年07月16日, 愛知県名古屋市(WINC AICHI)

Ei. YAMAMOTO, Nobuhiro. KATO, Yuka. HATOKO, Shigeki. HONTSU, Optimization of Humid Conditions Using an Ultrasonic Nebulizer for the Fabrication of Hydroxyapatite Film with the Er:YAG Laser Deposition Method, 28th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine; BIOCERAMICS 28 (国際学会), 2016年10月18日~10月21日, アメリカ・シャーロット

本津茂樹, レーザーを用いたアパタイト膜形成による新規歯科治療法 ~極薄アパタイトシート貼付法と口腔内Er:YAGレーザーアブレーション法~, 平成28年度日本人間工学会 関西支部大会(招待講演), 2016年12月10日, 和歌山県紀の川市(近畿大学和歌山キャンパス)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 山本 衛

ローマ字氏名: YAMAMOTO, Ei

研究協力者氏名: 吉川 一志

ローマ字氏名: YOSHIKAWA Kazushi

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、研究者個人に帰属されます。