Er:YAG レーザーアブレーション法を用いた歯質上への アパタイト膜の直接形成

本 津 茂 樹¹⁾ 山 本 衛¹⁾ 加 藤 暢 宏¹⁾
吉 川 一 志²⁾ 保 尾 謙 三²⁾ 山 本 一 世²⁾

¹⁾ 近畿大学生物理工学部医工学科

²⁾ 大阪歯科大学歯科保存学講座

(受付 : 2015 年 2 月 13 日, 受理 : 2015 年 3 月 28 日)

Direct Deposition of an Apatite Film on Dentin Using the Er:YAG Laser-Ablation Method

Shigeki HONTSU¹⁾, Ei YAMAMOTO¹⁾, Nobuhiro KATO¹⁾,

Kazushi YOSHIKAWA²⁾, Kenzo YASUO²⁾ and Kazuyo YAMAMOTO²⁾

¹⁾ Department of Biomedical Engineering, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University

²⁾ Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University

(Received: February 13, 2015, Accepted for Publication: March 28, 2015)

Abstract: Ideal restoration of tooth substances requires hydroxyapatite (HAp), of which the tooth is composed. However, restoration treatment with HAp is not yet possible, as adherence to ceramics is very difficult. In the present study, we examined a tooth restoration technique using the intraoral laser ablation method. A thin layer of α -tricalcium phosphate (α -TCP) was deposited on the dentin surface by the ablation phenomenon using an Er:YAG laser, which has already been introduced into dental treatment, to irradiate the target α -TCP. The deposited layer was then hydrolyzed by dripping pure water on its surface in order to create a hydroxyapatite (HAp) coating. In this study, we developed a compact pulsed laser deposition (PLD) system using the Er:YAG laser. The interface structure between the HAp coating and the dentin surface was observed by scanning electron microscope (SEM). Electron micrographs showed that the HAp layer was formed on the dentin surface. Moreover, dentinal tubules were sealed with HAp particles. We evaluated the blockade effect of dentinal tubules using Pashle's method. The measured average value for the sealing rate of the dentinal tubules was $85.6 \pm 8.6\%$, which was greater than the value with resin coating treatment. The adhesive strength of HAp films deposited on dentin was evaluated by quasi-static tensile tests. On mechanical evaluation, the adhesive strength was greater than 3.8 MPa. The present results suggest that this technique will be useful for the repair of dentin and the treatment of hyperaesthesia.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 26 : 10 ~ 16, 2015 Reprint requests to Dr. HONTSU)

Key words = Er:YAG Laser, Hydroxyapatite Film, Dentin Permeability Inhibition Ratio

キーワード = Er:YAG レーザー, ハイドロキシアパタイト膜, 象牙質透過抑制率

緒 言

エナメル質がう蝕や酸蝕, 咬耗や摩耗等で欠損した場合, 欠損部の修復にはこれまでコンポジットレジン (以下レジンとする) が主に使用されてきた。しかしながら, レ

ジンには含有する高分子化合物などによるアレルギー反応の問題や^{1,2)}, レジンの収縮により歯質との間に起こる亀裂や剥離の問題が指摘されている³⁾。本来, 歯質の修復・保存は歯質の主素材であるハイドロキシアパタイト (以下, HAp と記す) を用いて行うことが理想であるが, 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ため、HAp を用いた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。HAp を用いた先進的な治療法として、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 (powder jet deposition ; PJD) 法⁴⁾や、厚さ 1 ~ 10 μm の柔軟性を持つ HAp シートを歯の表面に貼付して歯質と一体化させる極薄アパタイトシート貼付法などが提案されているが⁵⁾、未だ実用化には至っていない。

我々は、紫外線 (エキシマレーザー) を用いたパルスレーザーデポジション (pulsed laser deposition ; PLD) 法を用い、HAp バルクターゲットに紫外線レーザーを照射し、ターゲットを構成する原子同士の結合を光のエネルギーを用いて切断して解離・分解反応 (アブレーション) を起こさせ、ターゲット表面から飛散した HAp の構成原子をチタンインプラント等の基材上に膜厚 1 μm 以下の HAp 薄膜としてコーティングすることに成功した⁶⁾。この薄膜成膜法は、レーザー加工技術を膜形成技術に転用したものである。一方、歯科分野では Er:YAG レーザーが歯質の切削や歯石除去に用いられており、この切削や除去は一種の加工と見なすことができる。前述したように加工と膜作製とは表裏一体の関係にあることから、Er:YAG レーザー光を歯質の主成分である HAp のバルクターゲットに照射し、ターゲットから飛散した粒子を歯質上に堆積すれば、HAp 膜を形成できるのではないかと考え、研究を開始した。その結果、アブレーション効率および HAp への加水分解反応の速さから α -リン酸三カルシウム (α -tricalcium phosphate ; α -TCP) ターゲットがアブレーション用ターゲットとして最も適していること、また α -TCP 堆積膜は約 3 時間で HAp 膜となることが分かった⁷⁾。

本研究では、この技術の実用化に向けての第一歩として、小型の Er:YAG-PLD 装置 (PLD ユニット) を作製し、エナメル質や象牙質上に直接 HAp 膜を形成し、その堆積膜の評価を行った。評価としては、走査型電子顕微鏡 (SEM) で歯質表面および歯質と堆積膜との界面を観察するとともに、象牙質上の堆積膜については象牙質透過抑制率の測定を行った。さらに、象牙質上の堆積膜の固着強度を引っ張り試験法により評価した。

材料と方法

1. 小型 Er:YAG-PLD ユニット

本研究に用いた Er:YAG レーザーを照射する膜原料のバルク体 (ターゲット) として、図 1 (a) に示すような 250 MPa で加圧成形された直径 7mm、長さ約 10mm の HAp の前駆体である α -リン酸三カルシウム (α -TCP) を用いた。このターゲットを図 1 (b) に示すような小型 Er:

YAG-PLD ユニットに取り付けた。ユニット先端部のコンタクトチップは C400F (モリタ製作所製 : 改造型) を用いた。

2. 基板

膜堆積用のエナメル質基板として、図 2 (a) に示すヒト抜去歯の一部をレジンで包埋した後、歯根歯冠境界部で切断してエナメル質を露出させ、その表面を #2000 メッシュの耐水ペーパーで研磨したヒト抜去歯エナメル質および、図 2 (b) に示す小窩裂溝をもつヒト抜去歯を用いた。また、象牙質基板として図 2 (c) に示すヒト抜去歯をレジンで包埋した後、歯根歯冠境界部で切断して象牙質を露出させ、その表面を #2000 の耐水研磨紙で研磨したものおよび、図 2 (d) に示すヒト抜去歯から象牙質ディスク (厚さ 1mm) を切り出し、スミヤー層を除去する目的で、その表面へ蒸留水にて 10% に調整した次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (キシダ化学) を 30 秒間作用させて、その後流水下で 5 秒間水洗させ、さらに蒸留水で 1 分間超音波洗浄することで象牙細管を開口させたものを用いた。

3. 小型 Er:YAG-PLD ユニットによる HAp 膜の形成

本研究で使用した Er:YAG レーザーは Erwin AdvErl (モリタ製作所) である。成膜に用いたレーザーエネルギーは 250mJ、繰り返し速度は 10pps、堆積時間は 2 ~ 10min である。ターゲットの角度は基板面に対して 30 ~ 45 度とした。また、チップ先端からターゲット表面までの距離は約 1mm、レーザー照射面と基板 (歯質) までの距離は 1 ~ 2mm で、膜厚がほぼ均一になるようにユニットを水平方向にゆっくりと移動させながら成膜を行った。図 3 に象牙質上とヒト抜去歯上の成膜の様子を示す。また、成膜効率を高めるために α -TCP ターゲットに純水を浸透させ、さらに以前の報告に示したように⁷⁾、堆積膜と歯質との固着性を高める目的で歯質上に pH4.0 の第一リン酸カルシウム水溶液 (monocalcium phosphate monohydrate ; MCPM) の塗布を繰り返しながら、Er:YAG-PLD 法で歯質上に膜を堆積させた。成膜後に α -TCP 膜を HAp 化するために、37℃ の恒温槽中で堆積膜上に純水を滴下するとともに、常に歯質の周りに水を供給することで歯質を乾燥させない状態を保って静置した。なお、ヒト抜去歯の使用については大阪歯科大学倫理委員会の承認を得た。

4. SEM による堆積膜 - 歯質界面の評価

成膜 4 日後に試料をレジン包埋し、5 日目にエナメル質表面に対して垂直方向に切断して低真空走査型電子顕微鏡 (Miniscope TM-1000, 日立ハイテクノロジー) により堆積膜 - 歯質界面の断面 SEM 像を観察した。

5. 象牙質透過抑制率の評価

象牙質透過抑制率の測定には図 4 に示す Pashley らの象牙質透過性測定装置を使用した⁸⁾。象牙細管内溶液 (Dental fluid ; 以下、DF) には親ウシ血清 (インビトロジェ

図1 アブレーション用ターゲット (a) と小型 Er:YAG-PLD ユニット (b)

(a) ヒト抜去歯エナメル質

(b) ヒト抜去歯

(c) ヒト抜去歯象牙質

(d) ヒト抜去歯象牙質ディスク

図2 膜堆積用歯質基板

図3 Er:YAG-PLD 法による膜の堆積
(a) 象牙質上 (b) ヒト抜去歯上

ン社) を蒸留水にて4倍希釈した液を使用した。象牙質ディスク試料の歯髄側に直径7mmのゴムリングを置き、この象牙質ディスクをステンレス製ホルダーにて上下で挟み込む様にして試料ステージに装着した。象牙質面における歯髄側から歯冠側への歯髄内圧は、HAp膜堆積前後ともに25mmHgになるように調整して臨床での歯髄内圧を再現した。まず、HAp堆積前のディスクの露出象牙質面にエアブローを60秒間行い、さらに30秒間放置後、ガラス毛細管内のDFの移動量を測定した。なお、エア圧は3.0 kgf/cm²に規定した。同様にHAp膜堆積後の象牙質試料に堆積前と同様にエアブローを60秒間行い、さらに30秒間放置後、DFの移動量を測定した。HAp膜堆積前と堆積後の移動量からHAp膜の堆積による透過抑制率を算出した ($n = 4$)。

6. HAp膜の機械的固着特性の評価

HAp膜の象牙質に対する機械的固着特性は、図5に示す引っ張り試験機(EZ-test, 島津製作所)を用いて評価

図4 象牙質透過抑制率測定装置

した。ステンレス鋼ロッド(ジグ直径3mm)をHAp堆積膜上にエポキシ樹脂接着剤で接着した。図に示すようにジグを引っ張り速度0.5 mm/minで引き上げ、得られた応力-変位曲線の最大の引っ張り応力から固着強度を求めた。

7. 高速度カメラによるアブレーション現象の観察

Er:YAG PLD法による膜作製過程について検討するために、象牙質上の膜堆積過程のアブレーション現象を高速度カメラ(Phantom V711, Vision Research)を用いて観察した。

結 果

1. 小型 Er:YAG-PLD 法によって成膜された堆積膜

図 6 に各種歯質上に堆積された HAp 膜の表面写真を示す。図 6 (a) はヒト抜去歯エナメル質, (b) はヒト抜去歯, (c) はヒト抜去歯象牙質, (d) はヒト抜去歯象牙質ディスクである。それぞれ左が堆積前, 右が堆積後である。いずれの場合も堆積後の歯質表面は乳濁色になっていることが分る。特に (b) のヒト抜去歯においては小窩裂溝部分にも HAp 膜が堆積していることが確認できる。

2. SEM による堆積膜 - 歯質界面の観察結果

図 7 にレジン包埋後にエナメル質表面に対して垂直に切断して観察した, HAp 膜 - エナメル質界面の断面 SEM 像

を示す。10 分間でエナメル質上に厚さ約 100 ~ 150 μ m の HAp 膜が形成されていることより, 成膜速度は 10 ~ 15 μ m/min と考えられる。また, 緻密な HAp 膜がエナメル質表面に形成されていることが分る。エナメル質に存在するクラック内にもアブレーションされた微小粒子が侵入し, クラックを封鎖している。

図 8 にレジン包埋後象牙質表面に対して垂直に切断した, HAp 膜 - 象牙質界面の断面 SEM 像を示す。一部空洞の部分が見られるが, 緻密な HAp 膜が象牙質表面を覆っている。拡大写真から HAp の微粒子は象牙細管内まで入り込み細管を封鎖していることが分る。

図 9 は象牙質表面の SEM 像を示している。この図の右側半分には, HAp 膜が堆積し, 象牙細管が封鎖されている。図 8 の SEM 像との対応していることが分る。

3. 象牙質透過抑制率の測定結果

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を表 1 に示す。透過抑制率の平均ならびに標準偏差は $85.6 \pm 8.62\%$ ($n = 4$) であった。

4. HAp 膜の機械的固着特性の測定結果

引っ張り試験機で測定した応力 - 変位曲線を図 10 に示す。図の最大の引っ張り応力から求めた固着強度は $3.8 \pm 2.6\text{MPa}$ ($n = 5$) であった。

引っ張り試験後の象牙質表面の光学写真と SEM 像を図 11 (a), (b) に示す。図 11 (a) より, 引っ張りジグ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る。図 11 (b) は図 11 (a) に四角で示したロッド跡辺縁部の拡大 SEM 像である。この図において黒色の部分は接

図 5 引っ張り試験機 (a) とその概略図 (b)

(a) ヒト抜去歯エナメル質

(b) ヒト抜去歯

(c) ヒト抜去歯象牙質

(d) ヒト抜去歯象牙質ディスク

図 6 各種歯質基板上への HAp 堆積膜
左: 堆積前 右: 堆積後

図 7 ヒト抜去歯エナメル質上に堆積された HAp 膜の断面 SEM 像 (a) とその拡大図 (b)

図 8 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 9 象牙質上に堆積した HAp 膜の SEM 像

着の際にロッドよりはみ出した接着剤で、この部分より上、すなわち引っ張りジグロッド外側の部分では象牙質が HAp 膜で覆われていることが確認できる。一方、引っ張りジグロッド跡にも堆積膜が残存しており、堆積膜の層内で凝集破壊が生じたと考えられる。

5. 高速度カメラによるアブレーション現象の観察結果

高速度カメラによる膜堆積時のアブレーション現象の観察結果を図 12 に示す。観察結果は動画であるが、図にはレーザーがターゲットに照射された瞬間の画像である。図にはターゲットと象牙質表面との楔形状の空間を示されており、コンタクトチップの先端が右方向から伸びている。

表 1 象牙質透過抑制率の測定結果

サンプル No.	透過抑制率
01	82.46
02	96.67
03	76.19
04	87.10
平均	85.6
標準偏差	8.62

図 10 象牙質上の HAp 膜の応力 - 変位曲線 ($n = 5$)

図 11 引っ張り試験後の象牙質表面の光学像 (a) と SEM 像 (b)

図 12 高速度カメラによる観察結果

象牙質表面の左側が光っていることより、レーザー光はターゲットをアブレーションした後、反射してターゲットから飛散した微粒子とともに象牙質にも達して光励起されていることが分かる。また、この狭い空間には霧状のものが見られており、これは歯質上に塗布した MCPM 水溶液が反射レーザー光を吸収して蒸発することで発生した蒸気ガスで、このガスの圧力が飛散粒子の歯質への固着効率を高めている可能性がある。

考 察

ArF や KrF エキシマレーザーのような紫外線レーザーを用いた PLD 法では、波長は短く 1 光子あたりのエネルギーは数 eV と高くなるため、レーザー光のエネルギーにより、直接原子間の結合を切断することでアブレーション(解離・分解反応)が生じ、原子、分子、イオン、クラスターなどが飛散粒子となり緻密な膜が形成される¹⁰⁾。一方、本研究の Er:YAG レーザーを用いた PLD 法では、Er:YAG レーザーの波長は $2.94\mu\text{m}$ と長いので光子のエネ

ルギーは低く 0.42eV 程度であり、光子のエネルギーでは原子間の結合を直接切ることができないので、アブレーションはレーザー光により励起された水分子の熱振動により生じた、水蒸気爆発反応(蒸散)によると言われている¹¹⁾。この場合、飛散粒子はターゲット構成材料の微粒子と考えられ、その質量の大きさから大気中でも膜形成は可能であるが、緻密な膜が得られるかどうかという問題が残る。本手法で Ti 板上にアブレーションした粒子の粒径を測定したところ $0.5\sim 2\mu\text{m}$ であり、エナメル質や象牙質上に得られた膜を構成している粒子径は約 $0.1\sim 2\mu\text{m}$ であったこと、堆積粒子はエナメル質のマイクロクラックや象牙質の象牙細管も封鎖していることから、堆積膜は緻密な膜であると結論付けられる。

今回の成膜は臨床応用を考え手動によりアブレーションユニットを移動させたので、均一な膜厚で歯質をコーティングすることは困難であるが、エナメル質の修復と象牙細管の封鎖が目的であるため、膜厚の不均一は気にする必要はないと考える。

象牙質の象牙細管の封鎖効果の評価指数である象牙質透過抑制率は成膜後 3 日目では $85.6\pm 8.62\%$ ($n=4$) であった。我々は同様の実験方法でレジン系知覚過敏抑制材とレーザーによる象牙質透過抑制率を測定しており、レジン系知覚過敏抑制材については $70\sim 80\%$ であり⁹⁾、レーザーについて $25\sim 74\%$ であることを報告している¹²⁾。本手法での透過抑制率はこの値より大きな値であることが分った。

ただし、本測定は成膜後 3 日目に行ったもので、今後コーティング直後や 1 週間後についても行う必要がある。また、純水以外にも人工唾液中に保管したものについても行うべきと考えている。さらに、実際の臨床応用を念頭に置き、ヒト抜去歯の歯根部への成膜も実施し、象牙細管の封鎖効果や固着強度についても評価する必要がある。

引っ張り試験による堆積膜の固着強度の測定結果は、生体材料分野で必要とされる固着強度、 10MPa より低い値であったが、引っ張り試験後の破断面の観察結果より、HAp 膜内での凝集破壊が生じたと考えられた。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考えられる。口腔内では唾液中に含まれるリンとカルシウムイオンにより再石灰化が生じるため、堆積膜は口腔内で結晶化を進めるとともに固着強度も増加していくものと考えられる。今後はブラッシング試験による固着強さや膜の残存状況の評価が必要と考えている。

本研究における Er:YAG-PLD 法による成膜現象は非常に複雑であり、特にターゲットと歯質表面とが形成するくさび状の狭い空間で起こる現象を理解することはかなり困難である。成膜時のアブレーション現象を高速度カメラで観測した結果から、以下の現象が考えられる。

まず、アブレーション現象によりターゲット表面から飛び出した高い運動エネルギーをもつ励起種（粒子）の歯質への衝突現象が考えられる。次に、アブレーション時にターゲットから反射したレーザー光による光の熱化（photothermal）で、歯質上に塗布した MCPM 水溶液が気化することで発生した蒸気ガス圧による衝撃波（圧力波）の発生、さらにレーザー光のターゲット面からの反射による光励起および熱励起が生じる。これらの効果により α -TCP 膜は短時間で HAp 膜に変化するとともに、歯質に対して高い固着強度を持つようになると考えられる。

結 論

Er:YAG レーザーを用いた小型の大気中レーザーアブレーションユニットを作製し、歯質上に直接 HAp 膜の作製を試みた。ターゲットとして α -TCP を使い、歯質上に pH4.0 の第一リン酸カルシウム水溶液を塗布して堆積した膜について、堆積膜と歯質の界面を走査型電子顕微鏡（SEM）により観察した。その結果、エナメル質上や象牙質上に HAp 膜を成膜できることが分かった。また、エナメル質上に堆積された HAp 膜は、小窩裂溝を填塞できることがわかった。さらに、象牙質上に堆積された HAp 膜は人工エナメルとして働き、象牙細管を封鎖できることもわかった。引っ張り試験法により測定した象牙質上の HAp 膜の固着強度は 3.8MPa 以上であることが明らかとなった。以上の結果より、この Er:YAG-PLD 法は HAp 膜を用いた歯質の修復技術や知覚過敏の治療に非常に有用であると考えられる。

謝 辞

本研究において、膜堆積メカニズムにつき有益なるご助言を頂いた近畿大学生理工学部の西川博昭准教授に感謝申し上げます。また、高速度カメラによるアブレーション現象の観察にご協力頂いた株式会社モリタ製作所に感謝申し上げます。本研究の一部は平成 25～29 年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（S1311045）の研究費によって支援された。

文 献

- 1) Kanerva L, Estlander T, Jolanki R: Occupational skin allergy in the dental profession. *Dermatol Clinics*, 12: 517-532, 1994.
- 2) 生野麻美子, 安藤一郎: 歯科患者に生じたメタクリルレジニアレルギー. *J Environ Dermatol Cutan Allergol*, 6: 285-288, 2012.
- 3) 水野 衛, 赤羽健太郎, 高橋 健: 歯科修復材コンポジットレジンの圧縮強度特性（光硬化時間と水中浸漬期間の影響）. *日本機械学会論文集（A 編）*, 78: 9-29, 2012.
- 4) Shibuya T, Sepasy MS, Mizutani K, et al: Design of double nozzle type powder jet device optimized for PJD. *Key Engineering Materials*, 389-390: 398-403, 2008.
- 5) Hontsu S, Yoshikawa K, Kato N, et al: Restoration and conservation of dental enamel using a flexible apatite sheet. *Journal of the Australian Ceramic Society*, 47: 11-13, 2011.
- 6) 本津茂樹, 速水 尚, 樋口裕一, 他: 2 層アパタイト被覆インプラントの開発—合成アパタイトおよび生体アパタイト 2 層薄膜被覆の骨伝導に関する組織学的検討—. *日本口腔インプラント学会誌*, 23: 697-708, 2010.
- 7) 本津茂樹, 加藤暢宏, 山本 衛, 他: Er:YAG レーザーを用いたハイドロキシアパタイト膜の形成. *バイオインテグレーション学会誌*, 4: 65-69, 2014.
- 8) Pashley DH, Galloway SE: The effects of oxalate treatment on the smear layer of ground surfaces of human dentine. *Arch Oral Biol*, 30: 731-737, 1985.
- 9) 野村雄司, 保尾謙三, 岩田有弘, 他: Effect of various materials on dentin permeability for the treatment of dentin hypersensitivity. *日本歯科保存学会誌*, 56: 516-525, 2013.
- 10) 田畑 仁, 本津茂樹, 川合知二: エキシマレーザーアブレーションによる生体材料の加工および薄膜形成. *生体材料*, 16: 343-349, 1998.
- 11) 熊崎 護: Er:YAG レーザーおよび分子振動レーザーによる歯牙硬組織切削について. *日本レーザー医学会誌*, 20: 55-61, 1999.
- 12) 善入寛仁, 吉川一志, 砂田和久, 他: レーザー照射が歯質透過性に与える影響について. *日本歯科保存学会誌*, 48: 427-433, 2005.