

学 位 論 文 題 名

Non-Contact Surface Profile Analysis of Laser-Irradiated
Tooth using Scanning Electron Microscopy
and Confocal Laser Scanning Microscopy

(走査型電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いた
レーザー照射歯質の非接触表面プロファイル解析)

学位論文内容の要旨

【緒言】

1964年に、歯質にルビーレーザーを照射した研究が報告され、歯質除去の可能性が示唆された。その後、従来の切削バーからレーザーへの転換の可能性を調べるために、ルビーレーザーを用いて、色々な試みが為された。しかし、ルビーレーザーにより歯質は除去できたが、高エネルギー密度のレーザーが必要なため、レーザーの熱影響による歯髄への傷害が生じた。そしてNd:YAG (波長1.06 μ m)、Er:YAG (2.94 μ m)、CO₂ (10.6 μ m)のようなレーザーも、歯牙硬組織に対して適用された。これらのレーザーは、ルビーレーザーより歯髄への傷害が少ないと報告された。

これまでに走査型電子顕微鏡 (SEM)、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM)および原子間力顕微鏡 (AFM)を用い、種々の形状観察を行い、歯質へのレーザー照射の影響が調べられて来た。しかし、表面形状の定量的分析は乏しかった。レーザー照射した歯質の基本的な観察は、表面トポグラフィと粗さである。多くの研究では表面粗さ(Ra)を計測するため、従来型の接触式表面粗さ計を使用して来た。しかし、この方法では表面形状観察と深さプロファイル測定を同時に測定できない。接触式表面粗さ計によるRa測定は、SEM観察とは別に行うため、表面粗さ測定位置と観察像とは正確に一致しない。更に、探針による接触で計測を行うため、デリケートな歯質表面を損傷する可能性がある。新しく開発された非接触表面形状の定量解析が可能な三次元形状解析装置付属の走査型電子顕微鏡 (3D-SEM)とCLSMを用いることによって、任意の微小領域における試料表面の形状観察と深さプロファイル測定を、高分解能で同時に行えるようになった。

そこで、本研究では、非接触式である3D-SEMとCLSMの方法で、レーザー照射した歯質を観察した。研究は第1部と第2部に下のように分けている:

第1部

非接触表面形状の定量解析が可能な三次元形状解析3D-SEMとCLSMを使用し、表面形状観察と深さプロファイル測定を同時に行い、ヒトエナメル質および象牙質へのNd:YAGレーザー照射効果を比較、検討した。試料の同一視野を3D-SEMとCLSMを用い観察、測定し、その結果を従来型の接触式表面粗さ計で計測したデータと比較した。

第2部

第1部と同様に、3D-SEM、CLSMと接触式表面粗さ計を用い、ヒトエナメル質および象牙質へのCO₂レーザー照射効果を比較、検討した。更にラマン分光分析も行い、またエッチング処理した歯質表面に対するレーザー照射の影響を調べた。

【材料および方法】

第1部

カリエスのない、新鮮なヒト抜去歯を用いた。低速ダイヤモンド刃を用い、歯の軸面に平行に切断した。露出したエナメル質と象牙質の切断表面は、アルミナ研磨液で研磨し、脱イオン水中で超音波洗浄し、Nd:YAGレーザーをエナメル質と象牙質に垂直に照射した。SEM（反射電子像）観察とともにSEMに付属の三次元形状解析装置を用い、レーザー照射した歯質の表面形態と非接触の深さプロファイルを測定した。3D-SEMで観察した同一の歯質表面を用い、CLSM（反射像）では、同様に表面形態と非接触の深さプロファイルを測定した。また、従来型の接触式表面粗さ計による測定を行い、3D-SEMとCLSMの深さプロファイルデータと比較した。

第2部

カリエスのない、新鮮なヒト抜去歯を用い、第1部と同様な方法で歯を切断、研磨、洗浄した。この研究では各歯から二つの歯質切片を切り出し、一つはCO₂レーザー照射するまで4℃の脱イオン水中に保存し、一つは象牙質に含まれるコラーゲンへのレーザー照射効果を調べるため、切片を5分間35%リン酸に浸し、コラーゲンを露出した後、それぞれレーザー照射を行った。第1部と同様に3D-SEM、CLSMと従来型の接触式表面粗さ計を使用し、CO₂レーザー照射した歯質の表面プロファイルと粗さを測定した。更に、ラマン分光分析により、歯質のレーザー照射部のスペクトル解析を行った。

【結果および考察】

第1部

Nd:YAGレーザー照射したエナメル質では、フレーク状の表面が観察され、象牙質では溶融した小球部層が観察された。3D-SEM像とCLSM像では、異なったコントラストを示した。3D-SEM像では、エナメル質表面の溝が見られなかったが、CLSMの反射モードでは強いコントラストを示し、よく見る事が出来た。

象牙質の CLSM 像では、3D-SEM 像に比較して象牙細管の内側が良く見えた。3D-SEM の断面プロファイルから求められる中心線平均粗さ (Ra) は Nd:YAG 処理のエナメル質、象牙質で、それぞれ $0.9\mu\text{m}$ 、 $2.3\mu\text{m}$ であった。CLSM の Ra は 3D-SEM より高かったが、非接触で取った深さプロファイルは同様の輪郭を示した。3D-SEM と CLSM の Ra のオーダーは同様だった。エナメル質では CLSM は 3D-SEM の 1.3 倍、象牙質では 2.9 倍高い値を示した。これは各スキニング方法の違いによると考えられる。CLSM のイメージは、歯の表面に平行に光学的に分割された一連の断層から出来ており、その断層の間隔は $0.5\mu\text{m}$ であるため Ra が大きい値を示すと考えられる。

接触針式表面粗さ計で同一試料の Ra を測定すると、エナメル質と象牙質はそれぞれ $0.8\mu\text{m}$ と $2.2\mu\text{m}$ となり、3D-SEM から求めた値に近く、3D-SEM の断面プロファイルの信頼性が高いことが示唆された。

第 2 部

CO₂ レーザー照射後、エナメル質は乳白色を示し、象牙質の表面は、黒変した。レーザー照射したエナメル質ではクレター状の表面が見られ、象牙質では、スムーズな表面が観察された。レーザー照射した表面の 3D-SEM 観察では、エナメル歯質は、ハイドロキシアパタイト結晶が照射表面に平行になっているところで削除されたことが分かった。エッチング処理されていない象牙質表面では、レーザー照射後管周象牙質に多くの亀裂が見られ、それ以上の変化はほとんど認められなかった。一方、エッチング処理された象牙質では、コラーゲンが蒸発し、アパタイトが溶融した。ラマン分光分析では、CO₂ レーザー照射後、象牙質上のコラーゲンに起因するバンドは消失し、アモルファス炭素に由来するピークが観察された。

3D-SEM と CLSM 観察を比較すると、レーザー照射したエナメル質の 3D-SEM 像では溝のエッジ部分が明るいコントラストを示し、CLSM 像では低コントラストになった。象牙質の CLSM 像では、3D-SEM 像に比較して象牙細管の内側が良く見られ、亀裂と区別することができた。CO₂ レーザー照射した歯質では Nd:YAG の結果と同様に、3D-SEM の Ra は CLSM より低い値を示した。

接触式表面粗さ計は広い面積での計測に有効であり、任意の微小領域の計測は困難であるが、非接触式である 3D-SEM と CLSM を用いることで微小領域の計測も可能となった。

【結論】

- 1) 三次元形状解析 3D-SEM および CLSM の非接触表面粗さ測定は接触式表面粗さ計に類似した表面プロファイルを示した。Ra は同じオーダーの値を示したが、1-2 倍異なる位置を示した。従って、3D-SEM および CLSM は十分に信頼性があり、レーザー照射した歯質の深さプロファイルと表面粗さを定量的に検討できた。
- 2) 3D-SEM および CLSM 法では、従来型の接触式表面粗さ計と比べ、顕微鏡像

に対応した任意の微小領域における表面粗さ測定が可能であり、レーザー照射した歯質の構造変化を評価するのに有効であった。

- 3) 非接触プロファイルである 3D-SEM と CLSM の観察では、Nd:YAG 照射した象牙質の Ra は、それぞれ 2.28 μm と 3.09 μm となり浅い窩洞を示し、CO₂ レーザーの Ra は、それぞれ 0.12 μm と 0.78 μm となり、スムーズな表面を示した。
- 4) ラマンスペクトルにより、レーザー照射した象牙質中のコラーゲンの炭化が確認された。
- 5) CO₂ レーザー照射したエナメル質の Ra は、クレーター状の表面が生じた為、フレーク状の表面が生じた Nd:YAG レーザーより高かった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 亙 理 文 夫
副 査 教 授 佐 野 英 彦
副 査 教 授 大 畑 昇

学 位 論 文 題 名

Non-Contact Surface Profile Analysis of Laser-Irradiated Tooth using Scanning Electron Microscopy and Confocal Laser Scanning Microscopy

(走査型電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いた
レーザー照射歯質の非接触表面プロファイル解析)

審査は審査担当者が一同に会して約2時間かけて行った。まず申請者に本論文の概要の説明を求め、その後に口頭試問の形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。

申請者は論文の概要を以下のように説明した。

【目的】任意の微小領域における非接触表面形状の定量解析が可能な三次元形状解析走査型電子顕微鏡（3D-SEM）と共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）を応用し、表面形状観察と深さプロファイル測定を同時に行い、従来型の接触式表面粗さ計との比較を行うとともに、ヒトエナメル質および象牙質へのNd:YAG、およびCO₂レーザー照射効果を解析・検討した。

【材料および方法】

1. 試料：カリエスの無い、新鮮なヒト抜去歯を低速ダイヤモンド刃で歯の軸面に平行に切断し、アルミナ研磨液で研磨後、脱イオン水中で超音波洗浄し、試料とした。
2. レーザー照射条件：エナメル質と象牙質にNd:YAG（波長 1.06 μm ）およびCO₂（10.6 μm ）レーザーを各 1 パルス照射した。照射エネルギー量としてNd:YAG で 0.6 J、CO₂ レーザーではエナメル質に 4 J、象牙質に 3 J で設定した。
3. 解析：SEM、CLSM、触針式表面粗さ計を使用し、同一試料、同一視野の表面形態と深さプロファイルを測定・比較した。更にCO₂レーザー照射した歯質では、ラマン分光分析も行い、また 35%リン酸でエッチング処理後のレーザー照射効果についても調べた。

【結果および考察】Nd:YAG と CO₂ レーザー照射後、エナメル質は乳白色を示し、象牙質の表面は、黒変した。顕微鏡像を比較すると、3D-SEM 像では被写体形状の輪郭部が明るいコントラストを示すのに対し、CLSM 像では逆に暗くなり、象牙質では、試料内部の象牙細管の透視性が認められた。

3D-SEM の断面プロファイルから求められる中心線平均粗さ (Ra) は Nd:YAG 処理のエナメル質、象牙質でそれぞれ 0.9 μ m、2.3 μ m、CO₂ レーザーでは 3.2 μ m、0.1 μ m であった。CLSM も同様の深さプロファイルを示したが Ra は SEM より大きかった。これは CLSM 像が歯の表面に平行に光学的に分割された一連の光学断層像から構成され、その断層間隔は約 0.5 μ m と分解能に限度があるためと考えられる。触針式表面粗さ計では Nd:YAG 処理試料の Ra はそれぞれ 0.8 μ m、2.2 μ m と SEM から求めた値に近く、SEM の断面プロファイルの信頼性が示された。

CO₂ レーザー照射後、管周象牙質に多くの亀裂が見られた。象牙質をエッチング処理し、コラーゲンを露出された後にレーザー照射すると、コラーゲンの蒸発とアパタイトの熔融に、より顕著な変化を示した。ラマン分光分析では、CO₂ レーザー照射後、象牙質上のコラーゲンに起因するバンドは消失し、アモルファス炭素に由来するピークが観察された。

【結論】三次元形状解析 SEM および CLSM は従来型の接触式表面粗さ計と比べ、顕微鏡像に対応した任意の微小領域における非接触表面粗さ測定が可能であり、レーザー照射した歯質の構造変化を評価するのに有効であった。

各審査委員が行った主な質問は、以下の通りである。

- 1) 3D-SEM と CLSM の Ra が異なる理由
- 2) 3D-SEM における観察方法について
- 3) 3D-SEM 観察における試料乾燥方法
- 4) Nd:YAG レーザーと CO₂ レーザーの臨床への応用の可能性について
- 5) 3 種類の方法 (3D-SEM, CLSM, 従来型の接触式表面粗さ計) の優劣
- 6) エッチング処理した歯質表面に対するレーザー照射の効果について
- 7) エッチング後にレーザー照射した処理の順番の理由

これらの質問に対して、論文申請者から明快な回答ならびに説明が得られ、さらに今後の研究の発展性についても明確な方向性を持っていると判定した。審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が博士 (歯学) の学位を授与される資格を有するものと認めた。