

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792169

研究課題名(和文) 粉末による細菌の凝集システム構築とレーザー照射に起因した殺菌機序解明に関する研究

研究課題名(英文) Study on bactericidal effects by laser beam irradiation in the suspension with inorganic powder

研究代表者

古本 達明 (Furumoto, Tatsuaki)

金沢大学・機械工学系・准教授

研究者番号：60432134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、無機粉末の懸濁液内部でレーザー照射したときに発生する誘起衝撃応力を測定すると共に、水中でレーザー照射したときの様子を高速カメラで可視化した。また、歯質表面にレーザー照射したときの温度を赤外線放射温度計で測定し、細菌を含有した懸濁液内部にレーザー照射を行って細菌の形態学的変化を電子顕微鏡で観察した。その結果、懸濁液内部の細菌は、レーザーエネルギーが大きくなるにつれて次第に細胞壁輪郭が不明瞭になり、菌体表面が溶解して無定型物質に変化することが明らかとなり、無機粉末とレーザー照射の併用による殺菌効果は、レーザー照射に起因して生じる熱的作用と機械的作用によって発現することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the dynamic stress generated in the suspension with inorganic powder induced by laser beam irradiation was measured, and the phenomenon of the laser beam irradiation in the water environment was observed with a high speed video camera. In addition, the surface temperature on the enamel surface of the human tooth during cavity preparation by the irradiation of YAG laser beam was measured by the three-color pyrometer with an optical fiber. Moreover, the bactericidal effects by the YAG laser irradiation under the presence of inorganic powder were investigated morphologically, then the samples were observed by the SEM.

Regarding the bactericidal effects by laser beam irradiation, there was a significant reduction such as 90 - 99.9% of viable cells. SEM investigations revealed the morphological damage according to pulse energies and exposure times. The bactericidal action occurred by the dynamic stress and the temperature rise induced by the laser beam irradiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：レーザー レーザー誘起衝撃応力 一次元弾性応力波理論 温度測定 赤外線放射温度計 殺菌効果

1. 研究開始当初の背景

歯科の二大疾病の一つであるう蝕治療では、初期であれば切削による侵襲処置を行わず、罹患部位の再石灰化を促進するための治療法が有効であると考えられる。そこで、う蝕を細菌による感染症として捉え、罹患歯質表面にレーザー照射を行って原因菌を殺菌し、歯質の除去を可及的に抑制する最小侵襲処置が注目されている。レーザー治療は、回転切削器具と比較して不必要に健全歯質を除去することが無く、治療時の振動や音も殆ど発生しないため、患者に対して恐怖感を与えない。また、Nd:YAG レーザーは、吸収率が健全歯質と罹患歯質で異なるため、健全歯質に及ぼす影響を抑えながらレーザーを罹患歯質に選択的に吸収させて除去する治療が可能である。さらに、レーザーは疼痛抑制効果があるため無麻酔で処置が行え、また、非接触であるため感染症の予防にも効果的であるなど、数多くの利点を有する。

う蝕患部にレーザー照射するとき、口腔内の洗浄、歯質表面の冷却、反応剤などとしての目的で、酸化チタン粉末を含む懸濁液が用いられる。歯質表面にレーザー照射すると、罹患部位の原因菌が殺菌されて再石灰化が進み、レーザー照射とフッ素の併用によるエナメル質の耐酸性増強の効果、酸化チタン懸濁液との併用による殺菌作用の増強などが生じると報告されている。これまで、このような殺菌作用の発現因子として、歯質表面にレーザー光が吸収されることで生じる熱で細菌の細胞壁が破壊されるとする因子、併用する酸化チタン粉末にレーザー光が吸収され、粉末の加熱もしくは粉末周辺の溶媒の加熱によって細胞壁が破壊されるとする因子、レーザー光が酸化チタン粉末に吸収され、加熱・蒸散時に生じる衝撃応力によって細胞壁が破壊されるとする因子、酸化チタン粉末の触媒作用によって細胞壁が破壊されるとする因子など、レーザー照射部の病理学的な観察から諸説考察されている。しかし、レーザーと酸化チタン粉末を併用することで発現する殺菌作用のメカニズムや、レーザー照射時に生じる物理現象との関連は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、無機粉末とレーザー照射の併用で発現する殺菌メカニズム解明に向け、以下の検討を行う。

- (1) 無機粉末の懸濁液内部でレーザー照射を行い、そのとき生じる誘起衝撃応力を測定し、殺菌に寄与する物理的作用について実験的に調べる。
- (2) 水中で歯科治療器用ファイバーの先端からレーザー照射したときの様子を高速ビデオカメラで可視化し、レーザー光が水に吸収される事で生じる現象を実験的に調べる。
- (3) 細菌を含有した懸濁液内部でレーザー照射を行い、レーザー照射後の細菌を電子顕微鏡で観察して形態学的変化を調べる。

そして、これまでに行ってきた歯質表面や懸濁液内部でレーザー照射したときの温度測定結果と合わせ、より効果的な殺菌作用の発現因子を特定し、レーザー照射と無機粉末の併用による殺菌効果発現の機序について、レーザー照射時に生じる物理現象を捉えながら実験的に解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 懸濁液内部のレーザー誘起衝撃応力測定  
粉末を含有した懸濁液にレーザー照射すると、粉末にレーザー光が吸収・加熱され、粉末の蒸散あるいは粉末周辺の溶媒の加熱・蒸散で相変化が生じ衝撃応力が発生する。このレーザー誘起衝撃応力を一次元弾性応力波理論に基づく測定法で測定した。細い棒中に生じた応力波が形を変えずに一定速度で伝播する性質を利用し、棒側面に貼付した2点の歪みを測定・解析して任意位置の衝撃応力を算出した。

図1に、誘起衝撃応力測定装置概要を示す。ひずみゲージを貼付した試験棒の端面に、内部を懸濁液で満たした溶液容器を設置し、容器内部の懸濁液にレーザー照射して生じる誘起衝撃応力を測定した。実験にはパルスNd:YAGレーザーを用いた。試験棒には、長さが2000mm、直径が10mmのアルミ丸棒を使用

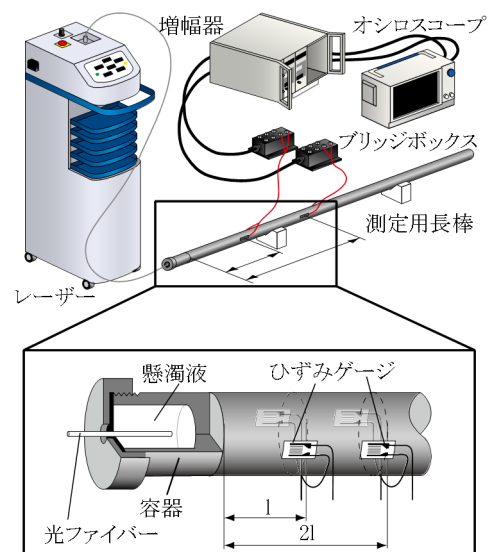


図1 レーザー誘起衝撃応力測定装置

表1 無機粉末の仕様

粉末	TiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub>
分子量	79.90	46.00	123.22
密度 kg/m <sup>3</sup>	4240	2651	5560
融点 K	2143	1883	3173
沸点 K	3200	3223	4573
比熱 J/(kg・K)	697	971	456
熱伝導率 W/(m・K)	6.53	1.55	1.95
平均粒径 μm	0.4	0.8	1.0
	0.02		

表 2 観察条件

高速度カメラ	
撮影速度 fps	100,000
サンプリング $\mu$ s	10
解像度	320 x 192
光源	
メタルハライド	
観察用セル	
材質	石英
大きさ mm	3 x 10 x 44
雰囲気	蒸留水
レーザー条件	
エネルギー mJ	102
パルス幅 $\mu$ s	200
照射回数 回	1

し、試験棒の応力測定端面から 200mm, 400mm の位置にひずみゲージを貼付した。

粉末の仕様を表 1 に示す。実験では、平均粒径が異なる 2 種類のルチル型酸化チタン粉末を用いた。また、比較対象として  $ZrO_2$  粉末および  $SiO_2$  粉末を用いた。いずれも酸化物系の粉末であり、常温で安定しているため取り扱いが容易である。懸濁液は、蒸留水中に粉末を加えミキサーで撹拌した。

#### (2) 水中レーザー照射時の可視化

水中で歯科治療器のコンタクトチップ先端から Er:YAG レーザーを出射したときの様子について、高速度ビデオカメラを用いて撮影した。実験条件を表 2 に示す。使用した高速度ビデオカメラのサンプリング間隔は 10  $\mu$ s である。光源にはメタルハライドランプを用いた。まず、内径が 3×10×44 mm の石英セルの中に蒸留水を満たし、その中にコンタクトチップを挿入した。そして、コンタクトチップの先端が石英セルの底面から 30 mm の位置となるように調整し、表 2 に示す条件でレーザー照射を行ってその時の様子を観察した。

#### (3) 懸濁液内部の細菌へのレーザー照射実験

実験に用いた供試菌は、*S.mutans* ATCC 25175(日大松戸歯学部微生物学講座よりの提供)であり、Brain Heart Infusion broth (以下、BHI broth)であらかじめ増菌培養した菌液について一定量を新たな BHI broth に接種し、37°Cで 48 時間嫌気培養した。実験で使用した酸化チタン粉末は、粒径が 0.05-0.5  $\mu$ m のルチル型であり、その表面は不活性なアルミナでコーティングされ、光触媒作用を含め化学反応性が抑えられている。この酸化チタン粉末の濃度が 1%(w/v)となるように蒸留水に懸濁させ、懸濁液 0.1ml に対して菌浮遊液 0.5ml を加え、全量 0.6ml の酸化チタン反応混合液を作製した。次に、作製した反応混合液に対して、波長が 1064nm である Nd:YAG レーザーを照射し、反応液内部の細菌の様子

を電子顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 懸濁液内部のレーザー誘起衝撃応力測定

懸濁液濃度が 30wt% のとき、照射されたレーザーのピークパワーと誘起衝撃応力との関係を図 2 に示す。図より、いずれの粉末においてもピークパワーの上昇に伴い、誘起衝撃応力が増加した。これは、ピークパワーの増加に伴い、レーザーを吸収して蒸散した粉末の量が増加したためと考えられる。また、粉末の違いによる誘起衝撃応力を比較すると、酸化チタン、ジルコニア、酸化ケイ素の順に誘起衝撃応力が大きくなった。各粉末のレーザー吸収率が異なるため、レーザーを吸収して蒸散した粉末の量に差が出たためと考えられる。

酸化チタン粉末の懸濁液濃度が 30wt% のとき、粉末粒径の違いによる誘起衝撃応力の変化を調べた結果を図 3 に示す。同一のピークパワーでは、粒径の小さい粉末の方が誘起衝撃応力は大きくなった。これは粉末の粒径の微細化によって粒子一粒の蒸散に必要なエネルギーが小さくなったためであると考えられる。本研究では、粒径が 0.02  $\mu$ m である酸化チタン懸濁液を使用したとき、パルス幅が 200  $\mu$ s、ピークパワーが 4 kW の条件で誘起衝撃応力値が最大値となり、その値は 1100 Pa であった。

##### (2) 水中レーザー照射時の可視化

レーザーエネルギーが 102 mJ/pulse のとき、蒸留水中でコンタクトチップ先端からレーザーを単発照射したときの先端付近の様子について、高速度ビデオカメラで撮影した結

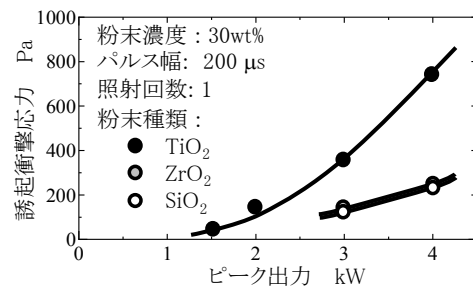


図 2 粉末種類による衝撃応力の変化

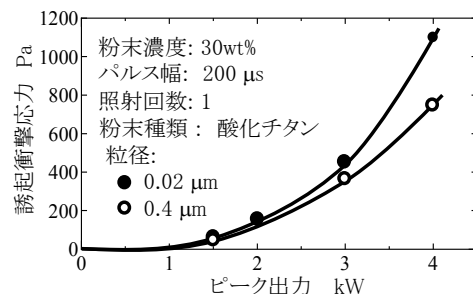
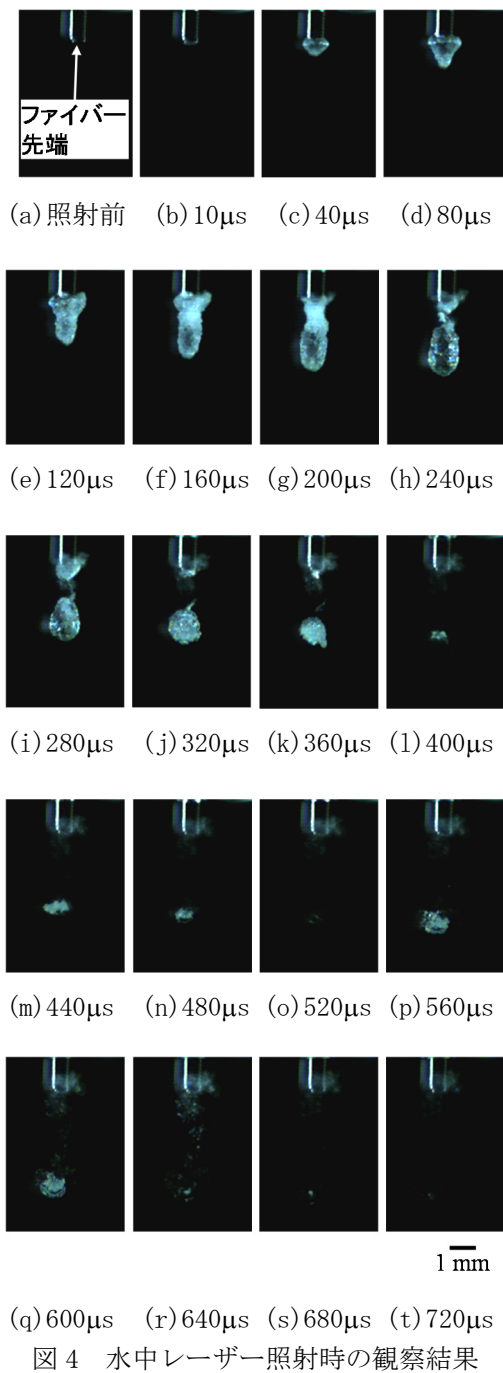


図 3 粉末粒径による衝撃応力の変化



果を図4に示す。Er:YAGレーザーは、水に対する吸収係数が $\beta=10^5 \text{ mm}^{-1}$ であるため、コンタクトチップ先端では図4(b)に示すようにレーザー照射直後から水の気化に伴って発生する蒸気泡が観察された。その後、蒸気泡は図4(d)に示すようにレーザープロファイルの形状に沿うように大きくなり、レーザーのパルス幅である200  $\mu$ sまでレーザー照射方向に対して円柱状に成長した。また、レーザーが照射されている間は、蒸気泡の位置が時間の経過と共にファイバー先端から離れていった。これらのことより、レーザー照射によって生じた蒸気泡の内部ではレーザーの吸収がほとんど行われていないことがわかる。レーザー照射によって蒸気泡が生じると、それに伴っ

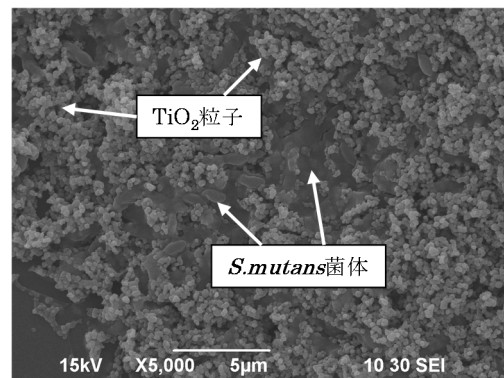


図5 300mJ, 100秒照射後の観察結果

てレーザーが吸収される位置がレーザー照射方向に対して前方に移動し、その位置でレーザーを吸収して蒸気泡が形成されることを繰り返すため、次第にファイバー先端から離れた位置で蒸気泡が生じたと考えられる。

レーザー照射が終了すると、図4(h)に示すようにコンタクトチップ先端付近から蒸気泡が消失して次第に球状となり、図6(o)に示す照射開始から520  $\mu$ sまでの間はその領域が小さくなっていった。これは、周辺に存在する水から受ける圧力との作用に起因していると考えられる。レーザー照射が終了してエネルギー供給がなくなると、蒸気泡は周辺の水からの圧力を受けて球状となり、気化領域の一部は周辺の水による冷却作用によって液化しながら次第に小さくなっていったと考えられる。その後、図4(p)に示すように照射開始から560  $\mu$ s経過した時に再び気化した領域が形成され、時間の経過と共にその領域が小さくなり、照射開始から720  $\mu$ s経過すると図6(t)に示すように気化した領域が完全に消失した。これらの変化は、蒸気泡の急激な収縮に伴ってキャビテーションが発生し消失した結果であると考えられる。医療の現場では、Ho:YAGレーザーなどを照射したときに生じるキャビテーションを臨床にも適用しており、Er:YAGレーザーを水中で照射したときにも同様のキャビテーションが生じたと考えられる。

### (3) 懸濁液内部の細菌へのレーザー照射実験

図5は、反応液に対してレーザーエネルギーが300mJの条件で、パルス状に10Hzで100秒間照射した後の細菌の様子である。反応液中の酸化チタン粉末と*S. mutans*は密集しており、*S. mutans*菌体はそれに埋入した状態でかつ菌体の周辺に酸化チタン粉末が凝集している。我々のこれまでの研究によると、混合した直後から凝集を生じ沈下するため、遠心分離にかけても両者の分離はできなかった。そして、細胞壁の輪郭が不明瞭な菌も見受けられる。

図6は、レーザーエネルギーが600mJの条件で、パルス状に10Hzで200秒間照射した後の細菌の様子である。視野内で菌数が減少し、菌体表面が融解し長軸方向に伸び、本来の1個ずつの独立した形態が失われ、融合し始めた

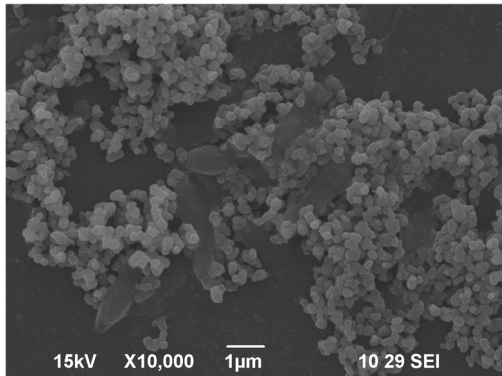


図6 600mJ, 200秒照射後の観察結果

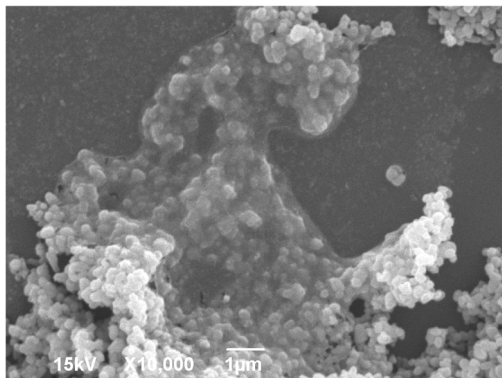


図7 900mJ, 300秒照射後の観察結果

像が見られる。

図7は、レーザーエネルギーが900mJの条件で、パルス状に10Hzで300秒間照射した後の細菌の様子である。通常細菌細胞の形態は認められず、形態が融解し更に崩壊し無定形物質に変化した像が認められた。

これらの結果より、レーザーエネルギーを大きくすることで、細菌の細胞壁輪郭が不明瞭になり菌体表面が融解し長軸方向に伸び、ないしは形態が崩壊し無定形物質に変化することがわかった。別途行ってきた実験結果から、レーザーエネルギーを大きくすることによって反応液中の生菌数が減少することもわかっている。これらは、反応液中の細菌が酸化チタン粉末に対して凝集しやすい性質があることが一因であると考えられる。反応液に対してレーザー照射すると、レーザーは反応液中の酸化チタン粉末に吸収され、急激に温度上昇することで反応液の温度も上昇する。気化蒸散に伴う瞬間的な体積膨張によって反応液内部に衝撃応力が発生することも明らかとしており、酸化チタン粉末とレーザー照射の併用による殺菌効果の発現は、これらの熱的、機械的作用に起因することを示唆する結果といえる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

(1) T. Furumoto (2nd), other 4 authors:

Study on Measurement of Laser Induced Dynamic Stress in the Suspension, The Influences of Powder Materials on Induced Dynamic Stress, *Procedia CIRP*, 査読有, Vol. 5, 2013, pp. 74-78.

DOI:10.1016/j.procir.2013.01.015

(2) 古本達明 (1番目), 他5名: Er:YAGレーザーによる歯質の除去特性, 注水による気泡の発現と効果, *日本機械学会論文集(C編)*, 査読有, 第78巻, 794号, 2012, pp. 3594-3604.

DOI:http://dx.doi.org/10.1299/kikaic.78.3594

(3) 古本達明 (2番目), 他3名: Nd:YAGレーザーとTiO<sub>2</sub>による *in vitro*での殺菌効果 (第2報), *日本レーザー歯学会誌*, 査読有, 第22巻, 第2-3号, 2011, pp. 77-84.

DOI:10.5984/jjpnsoclaserdent.22.77

(4) T. Furumoto (1st), other 3 authors: Surface Temperature during Cavity Preparation on Human Tooth by Er: YAG Laser Irradiation, *CIRP Annals, Manufacturing Technology*, 査読有, Vol. 60, No. 1, 2011, pp. 555-558.

DOI:10.1016/j.cirp.2011.03.065.

〔学会発表〕(計12件)

(1) 辺見慎吾, 古本達明, 細川晃, 小谷野智広, 上田隆司: レーザー照射による歯質除去時の温度測定と除去形態の関係, 第56回自動制御連合講演会, 2013年11月17日, 新潟大学

(2) 山内隆志, 古本達明, 上田隆司, 細川晃: レーザー照射に起因した殺菌効果発現のメカニズム解明に関する研究, Nd:YAGレーザー照射時の誘起衝撃応力測定, *日本機械学会2012年度年次大会*, 2012年9月12日, 金沢大学

(3) T. Furumoto, K. Nakatani, T. Ueda, A. Hosokawa and R. Tanaka: Study on Temperature Measurement during Er:YAG Laser Irradiation with Two-color Pyrometer, *World Federation of Laser Dentistry European Division 2011*, 2011年6月10日, Sapienza University of Roma.

(4) M. Waga, T. Furumoto and T. Ueda: Combined Effect of Nd:YAG Laser and TiO<sub>2</sub> on Bactericidal Action, *World Federation of Laser Dentistry European Division 2011*, 2011年6月10日, Sapienza University of Roma.

〔図書〕(計3件)

(1) 古本達明, 金沢大学先端科学・イノベーション推進機構, 金沢大学ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー年報2012, 2013, pp. 27-30

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

古本 達明 (FURUMOTO TATSUAKI)

金沢大学・機械工学系・准教授

研究者番号: 60432134