

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560864

研究課題名(和文) フッ素含有率および結晶性の傾斜構造を有するシート状耐酸性アパタイトの開発

研究課題名(英文) Development of acid resistive apatite sheet with gradation of fluorine density and crystallinity

研究代表者

楠 正暢 (KUSUNOKI, Masanobu)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20282238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：厚さ数  $\mu\text{m}$  のシート状アパタイト(Ap)を歯質表面に貼り付けることにより、齲蝕の発生を劇的に抑えることができる、歯科用新素材を創出することを目的として、「表面が齲蝕しにくい高結晶性フッ化アパタイト(F-Ap)、裏面が歯質に結合しやすい低結晶性ヒドロキシアパタイト(H-Ap)」の構造を有する、「フッ素含有率・結晶性傾斜型F-Ap / H-Apシート」の作製法の検討を行った。パルスレーザーデポジション法の成膜条件を最適化した結果、得られた高結晶F-Ap膜はOH基を含まず、pHが5以下まで耐酸性を持つことが示された。これを、従来開発したH-Ap作製法と組み合わせ、傾斜構造を実現できることを示した。

研究成果の概要(英文)：We developed a fabrication method of new dental material of apatite sheet that prevents tooth decay. Using the pulsed laser deposition, top side of the sheet was made of crystallized fluoroapatite (F-Ap) to prevent from tooth decay, and the bottom side of the sheet was made of amorphous hydroxyapatite (H-Ap) to be able to bond itself with the tooth surface. Degree of crystallization and density of the F and OH was gradually varied from the top to the bottom through the film. X-ray diffraction showed that a single layer of the F-Ap film was crystallized with c-axis orientation perpendicular to the film surface. Fourier-transform infrared spectroscopy indicated that the single F-Ap film was pure  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  without OH group. The F-Ap film showed an acid resistance lower than pH of 5.

研究分野：デバイスプロセス

キーワード：フッ化アパタイト ヒドロキシアパタイト 膜

### 1. 研究開始当初の背景

アパタイト(Ap)をはじめとするリン酸カルシウム系素材の研究は、人工骨、人工歯根をはじめ、細胞培養足場、バイオセンサ、環境汚染物質除去剤などへの応用を目的として、国内外問わず多くの研究が行われてきた。歯科分野における Ap 膜の活用法に限定すれば、金属製人工歯根表面のコーティングとして H-Ap  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  を用いることにより、治療期間の短縮を促す効果が期待され、その作製法、特性評価が行われてきており、実用化に至っている成果もある。これらが、人工歯根と歯周組織の結合膜用素材として用いられてきたのに対し、近年、歯質そのものの「齲蝕治療、予防」に用いることが検討され、厚さ数ミクロンの H-Ap シートを歯質へ貼り付ける技術が報告されている。

一方、H-Ap に関する膨大な数の研究に対して、フッ化アパタイト (F-Ap  $[Ca_{10}(PO_4)_6F_2]$ ) はバルクや粉末に対する基礎的な研究に留まっており、薄膜化に関する研究や、その医科歯科用素材としての応用研究の報告は少ない。フッ素(F)そのものの効果については、口腔内の天然歯に F イオン含有溶液等を塗布し、徐々にフッ化させることによる齲蝕治療/予防法としての実績があり広く知られているが、あらかじめ F を結晶中に含んだ、固体の F-Ap をシート状素材として歯質表面に貼り付けるという本研究は、新たな提案として位置づけられる。

### 2. 研究の目的

これまでに我々は、レーザーのエネルギーを用いて材料を真空中で気化させ、膜状に堆積させる、パルスレーザー堆積法 (PLD) を基本技術として高品質 H-Ap の作製を行い、人工歯根、人工骨、バイオセンサ、細胞培養足場等への応用を行ってきた。特に、医科・歯科応用の研究では、生体に吸収され、新生骨に置換・再生することを材料特性の一つとして重要視し、いわば「溶けやすい Ap」として開発を進めてきた面もある。近年、この製法で得られる H-Ap 膜を、基板等の母材から単離させ、厚さ数  $\mu\text{m}$  のシートにする方法を開発し、その実用化を目指し、結晶化技術、大面積・量産技術を確立してきた。ここで用いてきた H-Ap シートは、歯と同一化、再石灰化の促進を期待したものであったが、歯質の主成分である以上、酸に弱く再齲蝕の可能性もある。そこで、治療のみならず予防もできる、「溶けにくい Ap」すなわち、耐酸性の F-Ap シート開発を着想するに至った。一方、H-Ap シートが歯質表面に接着し同一化するためには、アモルファス Ap が必要な役割を果たしていることが報告されている。そこで本研究では、歯質に貼り付ける裏面はアモルファス H-Ap 層、齲蝕から歯質を予防する表面は耐酸性の F-Ap からなる Ap シートを作製することを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

まず、本研究のキーマテリアルである、F-Ap 薄膜を単層で作製する方法について検討を行う。開発済みの、PLD 法による H-Ap 薄膜作製技術を発展させ、優れた化学組成と結晶性が得られる、F-Ap 成膜パラメータの最適な組み合わせを見出す。ターゲットには F-Ap 粉末をプレス、焼結したものをを用いる。作製した試料に対しては、耐酸性の評価も行う。

次に、「表面が齲蝕しにくい高結晶性 F-Ap、裏面が歯に結合しやすい低結晶性 H-Ap」の構造を実現するため、シートの厚さ方向に F の含有率勾配ならびに Ap 結晶性の勾配を有する、フッ素・結晶性傾斜 F-Ap /H-Ap シート作製法の検討を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) フッ化アパタイト薄膜作製法の検討

##### フッ化アパタイト膜の組成制御

PLD 法で高品質な F-Ap 膜を作製するため、まず組成制御に関する検討を行った。繰り返し周波数 10Hz、波長 248nm のパルスレーザー (COHERENT、COMPEX の Pro-205) を用いて、F-Ap の焼結体ペレットをターゲットとして真空チャンバ内でアブレーションを行った。ターゲット表面で集束されたレーザー光の密度は  $28 \text{ mJ/mm}^2$  であった。ターゲットの正面 16mm の距離にターゲット面と並行に  $10 \times 10 \text{ mm}^2$  の基板を設置した。H-Ap の成膜の際は、OH 基を導入するために  $\text{H}_2\text{O}$  バプリングを経た水蒸気混合  $\text{O}_2$  ガスを用いたが、F-Ap の場合は OH の混入を防がねばならないため、チャンバを  $8 \times 10^{-4} \text{ Pa}$  程度まで真空排気した後、純度 99.999% のドライ  $\text{O}_2$  を雰囲気ガスとして導入した。 $\text{O}_2$  圧が 2, 5, 10 Pa の異なる条件下でそれぞれ厚さ  $1 \mu\text{m}$  の F-Ap 膜を室温で堆積させた。各条件における堆積速度は、触針式表面プロファイラ (ULVAC Decktak 150) を使用して、事前に求めたものを適用した。使用したシステムの概略図を図 1 に示す。

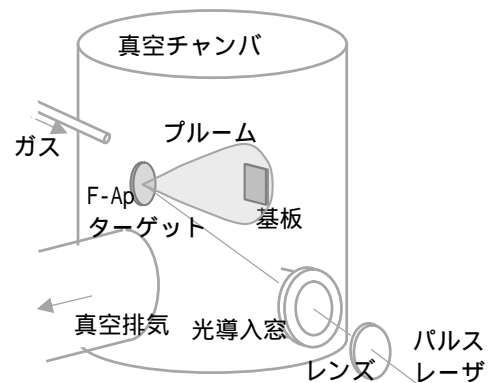


図 1. PLD 法による F-Ap 膜作製システムの概略

上記のようにして得られた各試料に対し、エネルギー分散型 X 線解析 (EDX; EDAX Genesis, ELIONIX ERA8800) を用いて組成を調べた。分析中、試料が電子ビームによりチャージアップすることを防止する目的で膜厚 50nm の Pd 膜を表面にコートした後行った。これにより得られた P/Ca 及び F/Ca 比の値は、図 2 (a) (b) 中に四角でプロットされている。今回試したすべての  $O_2$  圧下で、P/Ca 及び F/Ca 比の値は、化学量論的理想値 (P/Ca=0.6、F/Ca =0.2) を下回る結果となった。また、F/Ca 比の値は、 $O_2$  圧力の範囲にわたってほぼ一定であり、この  $O_2$  圧範囲外まで変化させても顕著に改善されることは困難であると判断し、大きな変化をもたらす方法として、ターゲット面に対し基板面を直交して配置する off-axis 法を試みた。基板中心とターゲット中心の距離を 43mm に設定し、上記と同様な  $O_2$  圧の範囲で実験を行った。その結果は図 2 (a) (b) 中に黒丸としてプロットされている。on-axis の場合と比較し、化学量論的理想値に近い値へシフトし、10 Pa 付近で最適値となり、off-axis 法が有効であることが明らかとなった。

#### フッ化アパタイト膜の OH 基の確認

次に、F-Ap 膜中の OH 基の有無を確認するために、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR; SHIMADZU IR Prestige-21) による分析を行った。このとき、F-Ap 膜を結晶化させることを目的として、 $800^\circ\text{C}$  の基板加熱を行いながら堆積した。FT-IR の結果を図 3(a) に示す。比較のために、従来法で最適化された H-Ap 膜の結果を図 3(b) に示す。H-Ap 膜の場合、OH 基に起因するピークが  $3560\text{cm}^{-1}$  付近に明確に現れているが、F-Ap には見られなかった。一方、 $580\text{cm}^{-1}$ 、 $1010\text{cm}^{-1}$  に現れる  $\text{PO}_4$  基に起因するピークは、H-Ap、F-Ap 双方に同様に表れている。このことから、OH 基のないほぼ純粋な  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  が PLD を用いて得られることが示された。

#### フッ化アパタイト膜の結晶性

F-Ap、H-Ap 膜の結晶性は、X 線回折 2 - 法 (XRD; RIGAKU, ULTIMA IV) により評価した。いずれの試料も、図 4 (a) 及び図 4 (b) に示すように、Si (100) 基板面に垂直に、c 軸配向していることが明らかになった。Si 基板表面が酸化層を有していることを考慮すると、これらの膜はエピタキシャル成長したわけではないことが言える。F-Ap においては、僅かに CaO のピークが表れた。これは、その組成がわずかに変化したことを示唆している。これが生じた原因は、その組成比を室温で最適化されたのに対し、今回結晶化を目的として  $800^\circ\text{C}$  で堆積したため、F と P が膜から再蒸発し、結果的に膜中の Ca の比率が高くなったためと考えられる。この問題は、今後堆積パラメータの微調整を行うことで解決できると期待される。

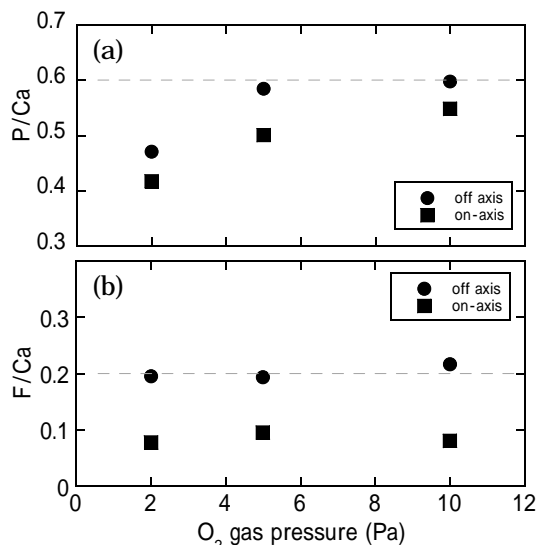


図 2. F-Ap 膜の構成元素と酸素圧の関係 (a) P/Ca, (b) F/Ca

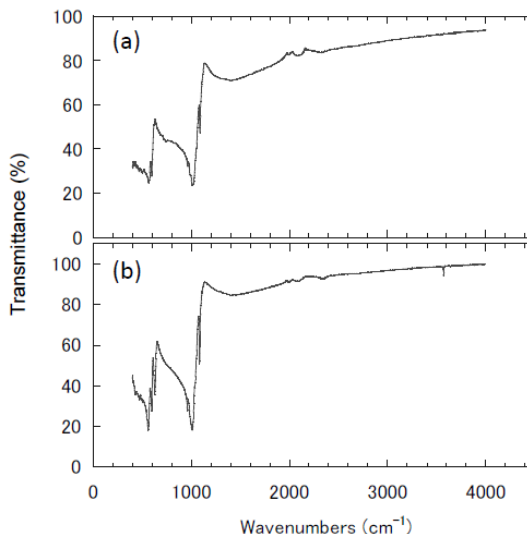


図 3. FT-IR による Ap 膜中の OH 基の確認 (a) F-Ap 膜、(b) H-Ap 膜

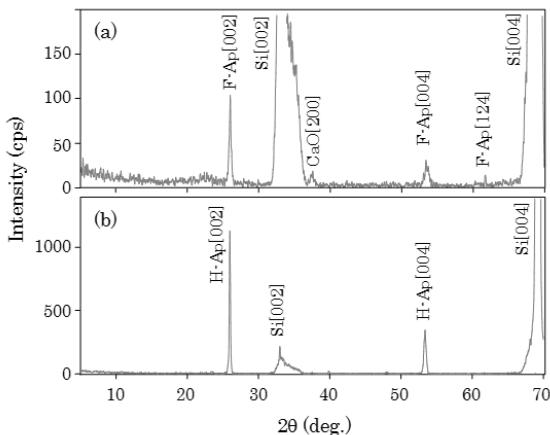


図 4. XRD による Ap 膜の結晶性 (a) F-Ap 膜、(b) H-Ap 膜

このようにして得られた FA 膜について耐酸性の評価を行うため、pH が 7, 6, 5, 4 のリン酸緩衝液を準備し、pH が大きい順に 10 分ずつ FA 膜を浸漬した。その結果、pH=5 までは膜の溶解が確認できず、pH=4 で部分的に溶解することが明らかとなった。さらに pH=3 のリン酸溶液に浸漬したところ、完全に溶解した。一般的に H-Ap の場合 pH=6 では溶解することを考慮すると、今回作製した FA は耐酸性に優れていることが示された。

#### 組成制御に関する考察

off-axis 法で、化学量論的な組成を得ることができた理由について、以下のように考察した。PLD 中にターゲットから放出された粒子は、クラスタ化された巨大粒子および原子またはイオンのような微小粒子の両方から構成されている。図 5 に示すように微小粒子は雰囲気ガスによってあらゆる方向に散乱されるが、巨大粒子は、ターゲット表面に対してほぼ垂直な直線経路をたどる。それらが基板に到達する前に、揮発性の P と F 原子が巨大クラスタから放出されると仮定した場合、on-axis 法では P と F が不足した膜として堆積することが予想される。逆に、off-axis 法では、クラスタを除く散乱された微小粒子が堆積するため、組成が合った膜が堆積するものと考えられる。以上の考察は試料の光学顕微鏡により確認することができる。on-axis 法で作製した試料では数  $\mu\text{m}$  から数  $100\mu\text{m}$  までの大きさのドロップレットが膜表面に多く観察されたのに対し、off-axis 法の場合はドロップレットのない極めて平滑な試料表面が得られた。また堆積速度が、off-axis 方より on-axis 法の方がはるかに速かったこともこの考察の裏付けとなっている。

#### (2) フッ素・結晶性傾斜 F-Ap /H-Ap 膜作製法の検討

高結晶性 F-Ap とアモルファス H-Ap は性質が大きく異なるため、両者の中間には高結晶性 H-Ap を一旦介し、その後アモルファス H-Ap へと徐々に移行する構造が好ましいと考えられる。さらに、各層の界面は明確な境界を持つ不連続構造よりも、図 6 のような結晶性や構成元素にグラデーションのある傾斜構造を形成する方が様々な点において有利であると考えられる。

それを実現する方法として、(1)で確立した技術を基本として、FA ターゲットを用いドライ  $\text{O}_2$  のみで FA を成膜し、一定の膜厚に達した後、パブリングを通したウエット  $\text{O}_2$  を導入することにより徐々に  $\text{H}_2\text{O}$  濃度を上げていくことで OH 基が取り込まれる確率を高めていく。その後 in-situ でターゲットを H-Ap にかえ、ドライ  $\text{O}_2$  を遮断し、ウエット  $\text{O}_2$  のみで H-Ap を成膜する。最後に、基板温度を下げアモルファス層へと移行するという工程をとる。

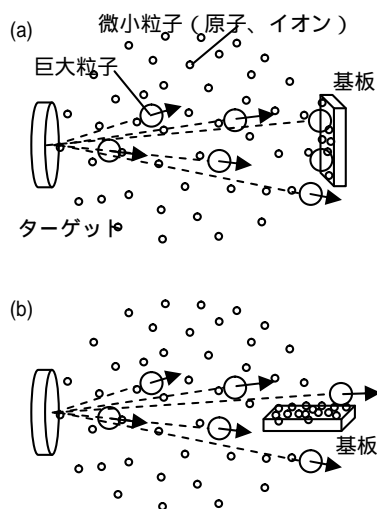


図 5. on-axis 法、off-axis 法の体積メカニズムの違いが組成への影響の概念図

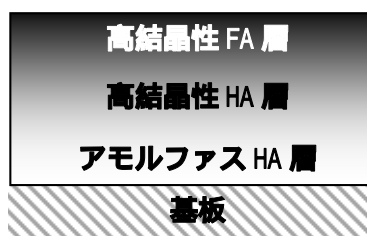


図 6. フッ素・結晶性傾斜 F-Ap /H-Ap 膜のイメージ

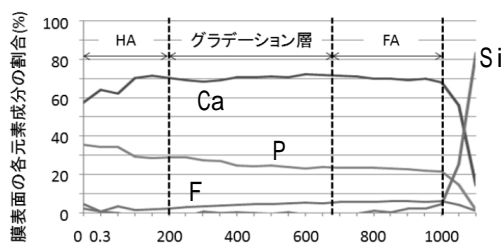


図 7. XPS による傾斜膜深さ方向への元素の密度分布

#### フッ素濃度傾斜構造作製法の検討

まず、F-Ap と H-Ap のグラデーション層を作製するために、膜の厚み方向に F と OH の濃度勾配を作製する方法について検討を行った。膜厚方向に対する F 濃度の勾配が作製可能であることを確認することを目的として、基板加熱は行わず上記の工程を室温で成膜を行った。これは、熱的な拡散による濃度勾配が形成される可能性も考慮して、この効果が発生しない条件下でガスとターゲット制御シーケンスで F 勾配を形成可能であることを明確にするための実験である。作製した試料は光電子分光 (XPS) 装置を用いて評価した。イオンエッチングと元素分析を交互に行うことで試料表面 5nm 以下の深さ精度で段階的に構成元素の比率を測定できる。

図 7 のグラフは、横軸がイオンエッチング

した膜厚を意味し、図 6 の H-Ap 側からの深さに対応している。縦軸は XPS で得られた構成元素の信号強度比がトータル 100%となるよう表されている。まず F-Ap 層の部分において、F, Ca, P が一定の比率で含まれていることが分かる。膜表面に近づくに従い、フッ素量が減り、グラデーション構造の形成に成功したことが読み取れる。600nm 付近から一定量含まれているはずの P が増加しているように見えるが、これは全元素の総和が 100% になるよう表示されているため、F の減少分だけ相対的に P が増加しているように見えているものと考えられる。この図から、膜の大半の部分で、想定していた結果が得られたと結論付けることができる。

#### 結晶構造傾斜構造作製法の検討

前述の で膜厚方向に対する F 濃度の勾配が作製可能であることが示された。また、(1) で結晶化した FA の作製条件も確立した。これを従来の H-Ap 結晶膜作製技術と組み合わせることにより、F 濃度と結晶構造に対する傾斜構造を得ることが可能となる。具体的には、のプロセスに、基板温度の制御を加えることで実現できると考えられるが、本研究期間内では時間的にそれを実験的に確認するまでに至れなかった。

#### (3) まとめ

PLD 法を用いて、高品質 F-Ap が作製でき、F の濃度勾配が制御可能であることを実験的に示した。従来技術の高品質 H-Ap 形成法と組み合わせることにより、フッ素・結晶性傾斜 F-Ap /H-Ap 膜の実現が可能であることを述べた。本実験で用いた基板は Si を用いて行っているため、あくまで基板上に形成したフッ素・結晶性傾斜 F-Ap /H-Ap 膜である。これを齶蝕防止用シートとして、基板から単離させるためには、当研究の開始前に確立した、水溶性基板を用いたアパタイトシート作製法に本技術を組み合わせることにより実現できると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Y. Sakoishi, R. Iguchi, H. Nishikawa, S. Hontsu, T. Hayami, M. Kusunoki, “C-axis-oriented hydroxyapatite film grown using ZnO buffer layer”, Applied Physics Express, Vol. 6, 115501 (2013) (査読あり).
2. M. Kusunoki, T. Matsuda, N. Fujita, Y. Sakoishi, R. Iguchi, S. Hontsu, H. Nishikawa, T. Hayami, “Control of Crystallinity of Hydroxyapatite Sheet”, Key Engineering Materials, Vol. 529-530, p. 615-619, (2013)

(査読あり).

3. E. Yamamoto, N. Kato, H. Nishikawa, M. Kusunoki, T. Hayami, K. Yoshikawa, S. Hontsu, “Adhesive Strength between Flexible Hydroxyapatite Sheet and Tooth Enamel”, Key Engineering Materials, Vol. 529-530, p. 522-525 (2012) (査読あり).

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 牧野隆之, 藤田尚希, 稲垣貴也, 碓石康裕, 浅野克弥, 楠正暢, “フッ素含有率の傾斜構造を有する耐酸性アパタイトシート”, 日本セラミックス協会, (2015.3.18, 岡山県岡山市, 岡山大学).
2. 牧野隆之, 藤田尚希, 楠正暢, “フッ化アパタイト薄膜の溶解性に対する検討”, 日本セラミックス協会第 27 回秋季シンポジウム, (2014.9.10, 鹿児島県鹿児島市, 鹿児島大学).
3. 藤田尚希, 牧野隆之, 楠正暢, “フルオロアパタイト薄膜の組成制御法に関する検討”, 日本セラミックス協会第 27 回秋季シンポジウム, (2014, 鹿児島県鹿児島市, 鹿児島大学).
4. 碓石康裕, 楠正暢, “c 面配向ハイドロキシアパタイト薄膜の結晶性制御の検討”, 電気関係学会関西連合大会, (2014.11.23, 奈良県奈良市, 奈良先端科学技術大学院大学).
5. 藤田尚希, 楠正暢, “PLD 法によるフルオロアパタイト薄膜作製時の最適成膜条件の検討”, 電気関係学会関西連合大会, (2014.11.23, 奈良県奈良市, 奈良先端科学技術大学院大学).
6. Masanobu Kusunoki, Yasuhiro Sakoishi, Katsuya Asano, Naoki Fujita, Takayuki Makino, Daisuke Okai, “Fabrication of hydroxyapatite thin film with entirely c-plane surface”, 26<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, (2014.9.1, the Liverpool Echo Arena and Convention Centre, Liverpool, GB).
7. 森田知樹, 藤田尚希, 楠正暢, “ハイドロキシアパタイト薄膜の結晶性に対する溶解性の評価”, 電気関係学会関西連合大会, (2013.11.16, 大阪府大阪市, 大阪電気通信大学).
8. 藤田尚希, 楠正暢, “PLD 法を用いたフルオロアパタイト薄膜の作製”, 電気関係学会関西連合大会, (2013.11.16, 大阪府大阪市, 大阪電気通信大学).
9. 碓石康裕, 井口亮, 西川博昭, 本津茂樹, 速水尚, 楠正暢, “水晶振動子マイクロパランスセンサ上への c 軸配向ハイドロキシアパタイト作製法の検討(H24 発表の奨励賞に対する特別シンポジウム)”, 電気関係学会関西連合大会,

- (2013.11.16, 大阪府大阪市, 大阪電気通信大学).
10. 藤田尚希, 本津茂樹, 西川博昭, 楠正暢, “レーザーデポジション法による歯科用アパタイトシート作製技術の検討”, 生体医工学シンポジウム 2013, (2013.9.20, 福岡県福岡市, 九州大学).
  11. 浅野克弥, 藤田尚希, 松田太陽, 本津茂樹, 西川博昭, 楠正暢, “液泡対策を目的とした歯科用スルーホールアパタイトシート作製法”, 生体医工学シンポジウム 2013, (2013.9.20, 福岡県福岡市, 九州大学).
  12. 碓石康裕, 藤田尚希, 楠正暢, “アパタイトコート水晶振動子マイクロバランスセンサの平滑表面作製技術の検討”, 生体医工学シンポジウム 2013, (2013.9.20, 福岡県福岡市, 九州大学).
  13. 藤田尚希, 西川博昭, 本津茂樹, 楠正暢, “歯科用アパタイトシートの高効率製造法に関する検討”, 日本セラミックス協会第 26 回秋季シンポジウム, (2013.9.4, 長野県長野市, 信州大学).
  14. 藤田尚希, 松田太陽, 森田知樹, 西川博昭, 本津茂樹, 楠正暢, “歯科用 HA シートへのスルーホール作製法の検討”, 日本セラミックス協会第 26 回秋季シンポジウム, (2013.9.4, 長野県長野市, 信州大学).
  15. 碓石康裕, 藤田尚希, 楠正暢, “エクリプス法を用いたアパタイトコート水晶振動子マイクロバランスセンサ作製法の検討”, 日本セラミックス協会第 26 回秋季シンポジウム, (2013.9.4, 長野県長野市, 信州大学).
  16. 碓石康裕, 井口亮, 楠正暢, 橋本典也, 西川博昭, 本津茂樹, 速水尚, “水晶振動子マイクロバランスセンサ上への c 軸配向ハイドロキシアパタイト作製法の検討”, 電気関係学会関西支部連合大会, (2012.12.9, 大阪府吹田市, 関西大学).
  17. 碓石康裕, 井口亮, 楠正暢, 橋本典也, 西川博昭, 本津茂樹, 速水尚, “バイオセンサ表面におけるハイドロキシアパタイトの配向制御法に関する検討”, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム, (2012.11.26, 宮城県仙台市, 仙台国際センター).
  18. M. Kusunoki T. Matsuda N. Fujita Y. Sakoishi, R. Iguchi S. Hontsu H. Nishikawa, T. Hayami, “Crystallization Control of Hydroxyapatite Sheet”, 5th International Conference “Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices”, (2012.8.30, University Ovidius, Constanta, Romania).

〔その他〕

奨励賞受賞:

碓石康裕, 井口亮, 楠正暢, 橋本典也,

西川博昭, 本津茂樹, 速水尚, “水晶振動子マイクロバランスセンサ上への c 軸配向ハイドロキシアパタイト作製法の検討”, 電気関係学会関西支部連合大会, (2012.12.9, 大阪府吹田市).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

楠 正暢 (KUSUNOKI, Masanobu)  
近畿大学・生物理工学部・教授  
研究者番号: 20282238

### (2) 研究分担者

岡井 大祐 (OKAI, Daisuke)  
兵庫県立大学大学院・工学研究科・助教  
研究者番号: 60336831

### (3) 連携研究者

なし