

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21669

研究課題名（和文）セルロースナノファイバー100%バルク体の生成と生体材料適合性に関する研究

研究課題名（英文）Study for biocompatibility of 100% cellulose nanofiber bulk

研究代表者

佐々木 啓一（Sasaki, Keiichi）

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30178644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、セルロースナノファイバー（CNF）の歯科材料への応用に関する基礎的検討を行った。CNFの疎水化、加圧条件およびCNFそのものの生体安全性に関する検討を行った。

加圧の増加により機械的強度の向上が認められた。化学的に疎水化処理したCNFは、表面のぬれ性は改善したものの、アクリルレジンと比べ高い吸水膨張を示した。赤外吸収スペクトル表より表面の親水性の官能基が疎水性のものへ置換されたことが示唆された。細胞毒性試験より、CNFの細胞生存率はISO基準値の70%を満たさなかった。感作性試験より、CNFは炎症反応を認めず遅延型アレルギー反応の一つである感作性がないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科臨床においてレジン系材料は様々な用途で用いられているが、その原料は石油であるため、未反応成分や添加成分等の残留・溶解によるアレルギー反応など材料そのものに由来する生体為害性が指摘されてきた。また、医療現場ではディスプレイの医療用プラスチック用品等の石油由来材料も日常的に用いられており、環境問題や資源枯渇問題などへの対応は重要な課題である。一方、近年注目されているセルロースナノファイバー（CNF）は軽量、高強度、化学的に親水性にも疎水性にもなりえる多様な性質を持ち、セルロースの原料で、環境負荷の少ない資源である。また、高い生体安全性を有し、医療材料・生体材料としての応用が期待されている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed basic research on the use of cellulose nanofibers (CNFs) as dental materials. Hydrophobization, pressurization conditions and biocompatibility of CNF have been investigated.

1. The mechanical strength was enhanced by increasing the pressure during fabrication process. 2. Although the chemically hydrophobized CNFs could improve surface wettability, they showed higher water-absorption than acrylic resins. 3. Using the infrared spectroscopy correlation table, it suggests that hydrophilic functional groups on the CNF surface have been replaced with hydrophobic ones. 4. The cytotoxicity test showed that the cell viability of CNF did not meet the ISO standard of 70% which indicates non-cytotoxicity. 5. According to the sensitization test, CNF samples showed no any inflammatory reaction and no sensitization reactions which is represented the delayed allergic reactions.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：セルロースナノファイバー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は長年、レジン系材料に関する種々の課題に着目していた。例えば、口腔内で長期間使用した義歯床レジンが脆くなり、ひどい臭気がすること、あるいは患者、歯科医師等のレジンアレルギーなど、これら機序解明に関する研究を行ってきた。現在、ボーンセメント、各種ステント、義歯床や人工歯等に用いる生体材料として、ポリメタクリル酸メチル(PMMA)系アクリルレジンに代表される合成樹脂が、その操作性、加工性、強度等の材料学的特性から半世紀以上に渡り広く使用されている。しかし長期間使用による吸水、また乾燥や繰り返し荷重、あるいはバイオデグラデーションによる機械的性質の低下等、材料学的に改善すべき課題が存在する。また、これらレジン系材料はほぼ全て石油由来の化学物質であるため、未反応成分や添加成分の残留や溶解によるアレルギー反応を含めた生体為害性の問題等、これら課題はレジン系材料そのものに起因するものである。また石油由来の材料は、その生成や分解、廃棄に関しての環境負荷も大きな社会的問題であり、その解決には全く異なる材料の導入が必要であろうと考えていた。

一方、軽量で高強度なバイオマス材料セルロース・ナノ・ファイバー(CNF)の情報を次第に得るようになり、近年、中越パルプ工業(株)と共同研究契約を締結、CNFに関する研究を行ってきた。解繊度等の条件を検討し、現在まで純粋な CNF バルク材では、現行の歯義歯床用アクリックレジンよりも高い曲げ強度を達成することが可能となった。しかし脱水生成には長時間を要し、また疎水基を付着した CNF ではバルク体での強度低下が見られ、バルク体の疎水化でも CNF の疎水化は達成されるものの CNF 間には水の侵入が見られる等、解決すべき課題が山積している。今回は、化学的な疎水化、生成法の効率化について、それぞれの領域のエキスパートと協議し、化学修飾による疎水化のバルク体生成に新たな方向性を見出し本発想に至った。

本課題は、高強度、軽量で、生体安全性・親和性も高く、環境負荷の少ない次世代のバイオマス素材として注目を集めている CNF に着目し、その特徴を最大限に発揮する CNF100%素材を開発し、その生体応用を目指すものである。

2. 研究の目的

本研究では、CNF の疎水化とその加圧脱水成形による生体安全性の高い CNF バルク製作を目指す。具体的には、1. 加圧脱水法によるバルク体成形の検討、2. バルク体への化学的な疎水基修飾、3. バルク体の材料学的評価、4. 親水性 CNF の生体安全性に関する検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 試料の作製

本研究では、水と竹由来パルプを使用して ACC (Aqueous Counter Collision) 法で作製した親水性 CNF 成形体 (nanoforest, 中越パルプ工業株式会社) を用いた。30×10mm に加工した CNF 成形体とステアリン酸塩化物、N-N ジメチル-4-アミノピリジンおよびテトラヒドロフルランをフラスコに入れ混和した処理液に浸漬し、90 で 4 時間還流させた後 8 時間常温で静置したものをテトラヒドロフルランおよびメタノールにて 2 回ずつ洗浄し乾燥させ、化学的に疎水化処理を行った CNF 成形体、コントロールとしてアクリルレジンおよび表面未処理の親水性 CNF を用いた。

また、生体安全性での検討として、細胞毒性試験には、10×10×1mm に加工した高解繊度親水性 CNF 成形体 (CNF・H)、低解繊度親水性 CNF 成形体 (CNF・L) の 2 種類およびコントロールとして同サイズの CpTi を使用し、感作性試験では、低解繊度水分散 CNF、高解繊度水分散 CNF およびコントロールとして生理食塩水を用いた。

(2) 物性の評価

表面ぬれの測定

試料の表面ぬれは、接触角の測定により評価した。接触角は全自動接触角計 (PCA-1, 協和界面科学株式会社) を用い、滴液法により蒸留水滴下 10 秒後に計測した。1 試料につき、10 点を測定、最大値および最小値を除く 8 点の平均値を求めた。

赤外吸収スペクトルの測定

赤外吸収分後法測定装置としてフーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR) 装置を用いて表面未処理の親水性 CNF および化学的に疎水化処理した親水性 CNF の表面の化学結合の種類を算出した。

吸水量の測定および算出

試料の吸水量は、37 度の水中に浸漬し、浸漬 24 時間後の重量増加を $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ の精度で求めた。重量測定の際には試験片を 1 個ずつ水中より取り出し、ろ紙で、表面付着水をふきとり、60 秒後に秤量および算出を行った。

(3) 細胞毒性試験

加工した CNF・H、CNF・L およびコントロールである CpTi を各 5 個ずつ 24well プレートに入れ、48 時間 -MEM 培地に浸漬し培地を吸収させた状態にした。浸漬終了後、培地を除去し細胞密度 5×10^4 個/ml にて 48 時間培養したものに MTT 試験を用いて細胞毒性試験を行った。

(4) 感作性試験

それぞれ原液, 50%希釈, 80%希釈した低解繊度水分散 CNF および高解繊度水分散 CNF を 6 種類とコントロールの生理食塩水をラットに皮内注射し惹起を促し感作性の有無を皮膚反応評価点付けにて評価した。

(5) 統計処理

得られたデータは一元配置分散分析 (one-way ANOVA) および Turkey-HSD test にて多重比較を用い, 危険率 5% で統計処理を行った。

4. 研究成果

CNF バルク体製作時に用いていた加圧脱水プレス機が圧力 10 トンから 80 トンまで向上し, CNF 成形体製作時の加圧脱水量が増加したことでバルク体の機械的強度の向上が認められた。

化学的に疎水化処理した親水性 CNF 成形体のおよびこれまで作製した疎水化 CNF のぬれ試験の経時変化 (図 1) およびグラフ (図 2) を示す。

接触角の大きさより, アクリルレジンの表面の接触角 98° であるのに対し, 化学的に疎水化処理した CNF の表面の接触角は, 119° と有意に高い値を示し, ぬれ性が大きく低下したことが確認された。

しかし, 吸水試験の結果に関しては化学的に疎水化処理した親水性 CNF は, 表面未処理の親水性 CNF に比べわずかに吸水量は低くなるもののアクリルレジンと比較すると高い吸水膨張反応を示した。また, 赤外吸収スペクトルの結果 (図 3) より未処理の親水性 CNF の表面の水酸基が化学的に疎水化処理したことで, CH₂, CH₃ および C=O で置換されていることが示唆された。

上の段: これまで作製した疎水化 CNF 成形体
下の段: 化学的に疎水化処理した親水性 CNF 成形体

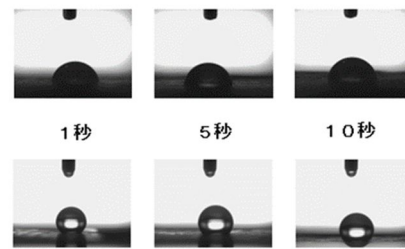


図 1: ぬれ試験の経時変化



図 2: 表面ぬれの測定結果

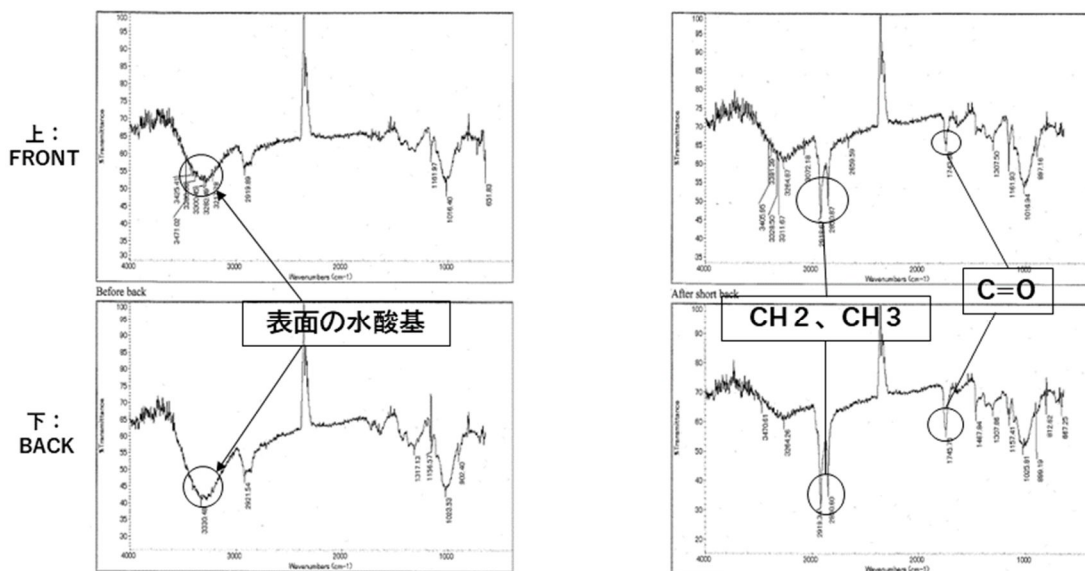


図 3: 赤外吸収スペクトル表

細胞毒性試験の結果である 48 時間 CNF・H, CNF・L および CpTi 上で培養した細胞生存率の結果を図 4 に示す。生存率はそれぞれ CNF・H が 58.78, CNF・L が 58.28, CpTi が 76.86 であった。CpTi と比べ CNF・H および CNF・L は有意に低い値を示した。(p<0.01)。CNF・H と CNF・L の間に有意差は認められなかった。

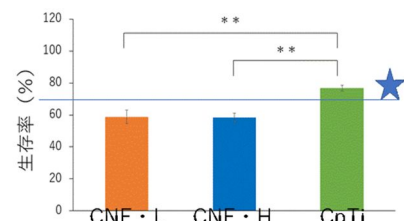


図 4: 48時間試験物質上で培養した際の細胞生存率

感作性試験では、高解繊度水分散 CNF（図 5）および低解繊度水分散 CNF（図 6）の感作濃度 100%、50%、20%皮内注射のいずれに対しても感作性を認めず、全ての惹起濃度に対して腹部皮膚に紅斑、浮腫等の視認できる変化を示さなかった。

感作濃度	惹起濃度 %	観察時間 (hr)*1	評価	
			陽性率*2	平均評価点*3
100%*	100%	24	0	0
		48	0	0
	50%	24	0	0
		48	0	0
	20%	24	0	0
		48	0	0
	0%	24	0	0
		48	0	0

図5：高解繊度水分散CNFに対する感作性試験結果

感作濃度	惹起濃度 %	観察時間 (hr)*1	評価	
			陽性率*2	平均評価点*3
100%*	100%	24	0	0
		48	0	0
	50%	24	0	0
		48	0	0
	20%	24	0	0
		48	0	0
	0%	24	0	0
		48	0	0

図6：低解繊度水分散CNFに対する感作性試験結果

結論

本研究では、生体親和性、環境低負荷、そして資源持続性の観点から、現在、歯科医療現場で頻用される石油由来のアクリルレジン系材料に代わり得る「脱石油歯科用材料」の開発を最終目標とし、CNFの疎水化とその加圧脱水成形による生体安全性の高いCNFバルク製作を目指すために必要な加圧脱水にて作製したバルク体の基礎的検討およびCNFそのものの生体安全性に関する検討を行い得られた結果から以下の結論を得た。

- バルク体作製時の加圧量を増加させることにより、従来と比べてさらに機械的強度の高いバルク体の作製が可能となった。
- 化学的に疎水化処理したCNFは、表面のぬれ性の改善が認められた。しかし表面未処理の親水性CNFに比べわずかに吸水量は低くなるもののアクリルレジンと比較すると高い吸水膨張反応を示した。
- 赤外吸収スペクトル表より表面の親水性の官能基が疎水性のものへ置換されたことが示唆された。
- 細胞毒性試験より、CNFの細胞生存率はISO基準値の70%を満たさなかった。
- 感作性試験より、CNFは高濃度で炎症反応を認めず遅延型アレルギー反応のひとつである感作性がないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamazaki Y, Ito T, Ogawa T, Hong G, Yamada Y, Hamada T, Sasaki K.	4. 巻 63
2. 論文標題 Potential of pure cellulose nanofibers as a denture base material	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Oral Sci	6. 最初と最後の頁 111-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.20-0245.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田有紀江, 小川 徹, 洪 光, 小出理絵, 天雲 太一, 橋場 洋美, 稲用 亨 謝 子琪, 濱田 泰三, 佐々木 啓一
2. 発表標題 セルロースナノファイバーの生物学的安全性および吸水性に関する検討
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第132回学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小川 徹 (Ogawa Toru) (50372321)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	洪 光 (Hong Guang) (70363083)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------