

学 位 論 文 要 旨

氏名 伊藤 育子

題 目 : Effects of chitin nanofibrils on skin
(キチンナノファイバーの皮膚への効果)

論文要旨 :

Chitins are highly crystalline structures that are predominantly found in crustacean shells. Alpha-chitin is composed of microfibrils, which are made up of nanofibrils (NFs) that are 2–5 nm in diameter and 30 nm in length and embedded in a protein matrix. Isolated chitin NFs show a potential for use in drug delivery systems, the tissue engineering of scaffolds, and wound dressing. Acid hydrolysis is one of the main methods used to prepare chitin NFs. Moreover, ultrasonication of squid pen beta-chitin under acidic conditions yields 3–4-nm-wide chitin NFs with relatively low crystallinity. Chitin nanofibers are easily prepared using either fine grinding or wet-type atomization methods. Recently, Chitin and chitosan could be used as NFs. However, it is unclear whether chitin NFs could maintain original function or not.

Because many people exhibit skin hypersensitivity in response to cosmetics and textiles, the development of materials exempt from inflammatory activity is essential. As the risk of the UV exposure has risen due to depletion of the ozone layer, the demand for new, more functional sun protection materials has increased. We were specialized in skin and investigated an effect to skin of NFs.

In the chapter I, we verified the effect of chitin NFs and nanocrystals (NCs) on skin using a three-dimensional skin culture model and Franz cells. The three-dimensional human skin culture models were removed from the assay plate at 4, 12, and 24 h post-application, and the cultured skin (from the keratin to basal layers) were harvested. The harvested skin culture was immersed and fixed in 10% formalin. Cross-sectional slices were soaked in hematoxylin and eosin (H&E) and histological evaluations were conducted. Franz cells were used to evaluate the test model. Skin samples removed from mice sacrificed by cervical dislocation were applied to 1X phosphate buffered saline-soaked Franz cells. The cells were incubated in a thermostat chamber for 1 h. Each test material was then applied and the cells were re-incubated. At 1, 3, and 6 h post-application, PBS was aspirated from the cells. The aspirated PBS was concentrated, and we measured the concentration of IL-1 α and TGF- β .

The application of NFs and NCs to skin improved the epithelial granular layer and increased granular density. Furthermore, NFs and NCs application to the skin resulted in a lower production of IL-1 α and TGF- β compared to that of the control group. NFs and NCs are mildly irritating to the skin, and can protect skin cells. Therefore, their potential use as components of skin-protective

formulations merits consideration.

In the chapter II, we prepared urocanic acid (UCA) chitin NFs (UNFs) by UCA hydrolysis. UCA is an intermediate metabolite of histidine and is present mainly in the stratum corneum. UCA is a major UV-absorbing chromophore in the skin. We hypothesized that we could generate valuable new NFs with UV-blocking function by preparing NFs with UCA, and we examined the protective effect of the UNFs against UV radiation.

Hos:HR-1 mice were divided into nine groups and treated with the following substances: (1) Acetic acid (Ac) cream groups, (2) hydrophilic ointment (HO) groups, (3) Polyethylene glycol (PG) groups, (4) Acetic acid chitin nanofibrils (ANFs) cream groups, (5) UCA cream groups, (6) UNFs cream groups, (7) Squid ink (SI) cream groups, (8) Control (+) (no sample was applied to the mice, but they were irradiated) groups, and (9) Control (-) (no sample was applied and the mice were not irradiated) groups. Each sample was applied to the left side of the back of the test mice. eight groups were irradiated (302 nm, 150 mJ/cm²). In accordance with the criteria established by the OECD, erythema of the skin was assessed at 2, 4, 6, 12, and 24 h after irradiation. 24 h after UV irradiation, the animals were euthanized by cervical dislocation, Histological observations were performed after H&E and TUNEL staining. The presence of sunburn cells in the epidermis was evaluated using specimens prepared by TUNEL staining. Basal cells inside the epidermis were counted, and the number of TUNEL-positive sunburn cells present between granular cells was counted. These measurements were conducted at four random times, and the mean number of sunburn cells per 100 cells was recorded.

Hos:HR-1 mice coated with UNF showed markedly lower UVB radiation-induced cutaneous erythema than the control. Additionally, sunburn cells were rarely detected in the epidermis of UNFs-coated mice after UVB irradiation. The combination of NFs with other substances that possess UV-protective effects, such as UCA, may provide an enhanced protective effect against UVB radiation.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	伊藤 育子
審査委員	主査：鳥取大学 准教授 大崎 智弘
	副査：鳥取大学 教授 岡本 芳晴
	副査：鹿児島大学 教授 三角 一浩
	副査：鳥取大学 教授 竹内 崇
	副査：鳥取大学 教授 今川 智敬
題目	Effects of chitin nanofibrils on skin (キチンナノファイバーの皮膚への効果)

審査結果の要旨：

キチンは主に甲殻類の外骨格に存在する生体高分子である。 α キチンは直径2-5nm、長さ30nmのナノファイバー(NFs)からなり、タンパク質マトリックスに包埋された極細繊維から構成されている。単離した NFs はドラックデリバリーシステム、組織工学の骨組み、創傷治癒に利用できる可能性がある。酸性加水分解はキチン NFs の作製に使用される主要な手段の一つである。さらに、酸性の条件下でイカ β キチンを超音波処理する事で、幅3-4nmの低結晶化度キチン NFs を作製することができる。キチン NFs は石臼式摩砕機や湿式微粒化装置によって容易に作製することができる。このように近年、キチン、キトサンをナノファイバー化し、利用できるようになったが、キチン NFs がキチン、キトサンの元来有する機能が維持できているかどうかに関しては明確には明らかになっていない。

現在、化粧品や繊維製品に対して、皮膚過敏症を呈する人が増えており、炎症を誘起しない製品の開発は重要事項である。また、オゾン層の破壊により、紫外線暴露のリスクは増大しており、新しい効果的な紫外線(UV)保護剤への要求も増えてきている。今回、我々はキチン NFs の皮膚への作用に着目し、研究を行った。

チャプター1において、我々は3次元ヒト皮膚モデル、フランツセルを使用し、キチン NFs、キチンナノクリスタル(NC)の皮膚への作用を検討した。3次元ヒト皮膚モデルにおいては、各供試物質をモデルに塗布後、4, 12, 24時間後に培養皮膚(基底層から角質層を有する)を採材した。その後、10%ホルマリンで固定した後に、ヘマトキシリンエオジン(H.E)染色を行い、組織学的検索を実施した。フランツセルにおいては、頸椎脱臼により安楽殺したHos:HR-1から剥離した皮膚を使用した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)でセル内を満たしたフランツセルに剥離皮膚を設置後、1時間恒温槽でインキュベートを行った。その後、皮膚に

(別紙様式第 10 号)

各供試物質を塗布し、さらにインキュベートを行った。塗布後、1, 3, 6 時間後に PBS をフラインツセルから吸引し、濃縮後に IL-1 α , TGF- β の測定を実施した。

キチン NFs、キチン NC を皮膚に塗布することで、上皮顆粒層数、顆粒密度の増加が認められ、さらに、対照群と比較して、IL-1 α , TGF- β の産生量が有意に低いことが認められた。キチン NFs、キチン NC の皮膚への塗布は皮膚への刺激を抑制し、皮膚細胞を保護する作用があり、皮膚保護剤としての可能性が示唆された。

チャプター 2 において、我々は、ウロカニン酸 (UCA) でキチンを加水分解することにより、UCA 開繊キチン NFs (UNFs) を作製し、その作用を検討した。UCA は主に角質層に存在する、ヒスチジンの中間代謝物質である。UCA は皮膚における主要な UV 吸収物質である。我々は、UCA を使用してキチン NFs を作製することで、新たな UV 保護剤を作り出せるのではないかと仮定し、UNFs の紫外線照射による効果を検討した。

以下の 9 群に分け、各供試物質を塗布した。(1) 酢酸 (Ac) クリーム群、(2) 親水軟膏 (HO) 群、(3) ポリエチレングリコール (PG) 群、(4) 酢酸開繊キチンナノファイバー (ANFs) クリーム群、(5) UCA クリーム群、(6) UNFs クリーム群、(7) イカスミ (SI) クリーム群、(8) Control (+) (供試物質を塗布せず、UV 照射実施) 群、(9) Control (-) (供試物質を塗布せず、UV 照射未実施) 群。各供試物質を Hos:HR-1 左背部に塗布し、8 群に対して UV (302 nm, 150 mJ/cm²) 照射を実施した。照射から 2, 4, 6, 12, 24 時間後の皮膚紅斑の評価を OECD 基準に従って実施した。供試マウスを頸椎脱臼にて安楽殺した後に、表皮を剥離し、10% ホルマリンで固定した後に、ヘマトキシリンエオジン (H.E) 染色、TUNEL 染色を行い、組織学的検索を実施した。TUNEL 染色標本を使用して表皮のサンバーンセル数の検討を行った。各標本から 4 回ランダムで基底細胞 100 個中のサンバーンセル数を測定し、平均値を測定した。

UNFs クリーム群は対照群と比較して UV 照射により引き起こされる皮膚紅斑を有意に抑制した。また、UV 照射後に認められるサンバーンセルはほとんど認められなかった。

キチン NFs と UCA のような紫外線防御物質を組み合わせる事によって、更なる紫外線保護剤の作製が可能になる可能性が示唆された。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文に相応しい価値があると認める。