

カニ殻より単離されるキチンナノファイバーの生体に及ぼす効果・効用の探索

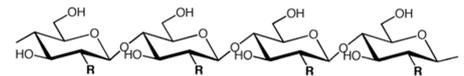
¹伊福伸介、²谷啓輔、¹斎本博之、³森本稔、¹南三郎、
¹鳥取大学大学院工学研究科、²鳥取大学農学部獣医学科、
³鳥取大学生命機能支援研究センター

1. 緒言.

ナノテクノロジー分野の研究においてナノファイバーがその中核を担う材料として注目されている。ナノファイバーはそのサイズ効果により、マイクロサイズの繊維では発現し得なかった機能や特性が期待できるため、ナノファイバーの製造および利用開発が精力的に進められている。

近年では地球上で最も豊富に存在するバイオマスであるセルロースおよびキチンがナノファイバーの原料として注目されている。セルロースやキチンはナノサイズの繊維が集合し、緻密な階層構造を経て複雑な組織体へと展開していく。このことはマクロな構造を解きほぐすことにより、微細な繊維に分解できることを示唆している。本稿ではカニやエビの殻の緻密な造形に着目し、このコンセプトに基づいて、キチン質のナノファイバーの単離技術を見出している。

キチンとは *N*-アセチルグルコサミンが直鎖状に連なった多糖類であり、セルロースと類似した化学構造を有する (図1)。キチンは地球上に広く存在し、例えばカニやエビの殻、昆虫類の外皮、あるいは、カビ、キノコ、藻類の細胞壁を形成する構造材料としての役割を果たす。年間合成量は地球上で最も豊富なバイオマスであるセルロースに匹敵する 1×10^{11} トンとも推定されている。カニやエビの殻には種類や部位により異なるが、20~30%程度のキチンが含まれており、それ以外の成分は主にタンパク質と炭酸カルシウムが占めている。カニやエビの外骨格の構造はナノファイバーが階層的に組織化された極めて緻密な高次構造で構成されている (図2)。よって、適切な処理によってカニやエビ殻を構成するキチンをナノレベルにまでダウンサイジングできることを示唆している。



セルロース: $R = OH$
キチン: $R = NHAc$

図1. 代表的な多糖: セルロース, キチンの化学構造.

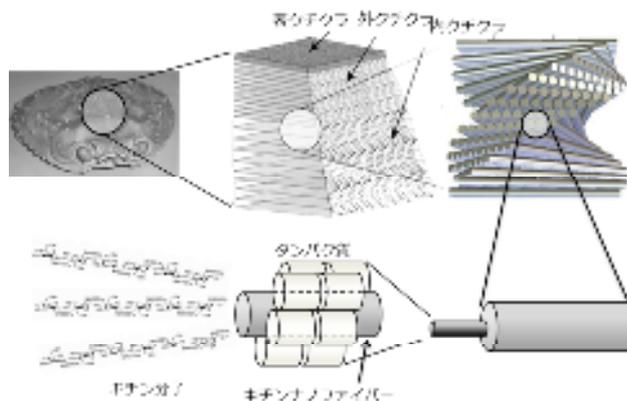


図2. カニの外骨格の精緻な高次構造.

キチンナノファイバーは伸びきり鎖結晶性の繊維であるため、高強度、低熱膨張、高熱伝導など、物性に優れる。また、キチンは抗菌・抗カビといった衛生面の効果のほか、抗炎症作用、創傷治癒効果、免疫力強化、止血作用、保湿性、コレステロール値の降下など健康面における多彩な効果が既に知られている。たとえば鳥取大学の南らはキチン質の生体への機能を評価し、キチン質の創傷治癒促進効果は、動物に対する臨床実験の中から明らかにされ、その効果は認知されるに到っている。また、獣医学領域においてもキチン質の創傷治癒促進効果を利用した生体材料が開発され、その臨床効果を確認するとともに、炎症性細胞の局所への集簇、新生血管に富む良性肉芽組織形成など、創傷治癒における各ステージへの影響についても報告してきた。しかしながら、ナノファイバーとしてのキチンの効果・効用については全くの未知であり興味もたれる。我々は髪の毛の1万倍に及ぶキチンナノファイバーの莫大な表面積は上述の生体機能を増幅すると期待している。そこで、本研究ではキチンナノファイバーの生体に対する機能性の評価を行った。

生体に対する効果・効用が続々と見出されることにより、物性、形状、機能が複合的に備わった新素材として、繊維のほか、医療用材料、製紙、化成品、複合新素材など多彩な分野での用途展開が想定される。キチンナノファイバーの優れた物性と形状、そして見出される機能を複合的に組み合わせ、高機能化を図ることで廃カニ殻の有効利用に繋がると考えている。

2. 実験方法

2. 1 キチンナノファイバーの調製

カニ殻に含まれる炭酸カルシウム、タンパク質、脂質、色素を順次取り除きキチンを得た。精製したキチンに酢酸を添加した後、グラインダーを用いて繊維の微細化を行った。

2. 2 皮膚に対する影響の検討

試料として、キチンナノファイバー分散液（キチンナノファイバー 0.5%、酢酸 1%）を使用した。試験群として Hos : HR - 1 マウスを用いた。試料塗布部位は、頸部背側から上腹部背側まで長さ 30 mm で、正中から左側および右側に 5 mm 離れた部位で幅 3 mm である。試料塗布 4 時間後および 8 時間後に皮膚を採材した。採材した皮膚は、10%ホルマリンにて浸漬固定し、皮膚表面に対して垂直な断面が観察できるよう切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色およびエラスチカ・ワンギーソン染色を施し、光学顕微鏡を用いて組織学的観察を行った。

1) 上皮厚の算出

各実験群の H.E. 染色標本において、それぞれ上皮（基底層から有棘層まで）の面積および表面長を測定した。測定した面積および表面長から、平均上皮厚を算出した。

2) 膠原線維面積率の算出

膠原線維を色抽出し、測定範囲全体の面積および抽出領域の面積を計測した。さらに、測定範囲内の毛根部および脂腺部の面積を測定して測定範囲全体の面積から除外することで補正総面積とし、膠原線維の面積率を算出した。

3) 弾性線維面積率の測定

染色標本において、光学顕微鏡を用いて基底層から深部に向かい 100 μm の範囲を測定部位として設定し、弾性線維を色抽出し、測定範囲全体の面積および抽出領域の面積を計測した。さらに、測定範囲内の毛根部および脂腺部の面積を測定して測定範囲全体の面積から除外することで補正総面積とし、弾性線維の面積率を算出した。

3. 結果と考察

3. 1 キチンナノファイバーの調製

解繊したキチンは幅がわずか10~20 nmと極めて細く、均質であり、非常にアスペクト比の高いナノファイバーであった(図3)¹⁾。このナノファイバーはカニ由来のキチンに特徴的な α 型結晶構造を有していた。キチンナノファイバーの調製において、酢酸の添加が重要な鍵となることを見いだした。すなわち、キチンはN-アセチルグルコサミンが直鎖状に配列した化学構造をしているが、わずかにグルコサミン単位が含まれている。グルコサミンのアミノ基は酸性条件下でカチオン化され、繊維間で電荷による反発力を生じるため、グラインダーで解繊処理をする際に解繊効率が向上した²⁾。なお、解繊の効率化には酢酸以外の有機酸も利用可能であった。

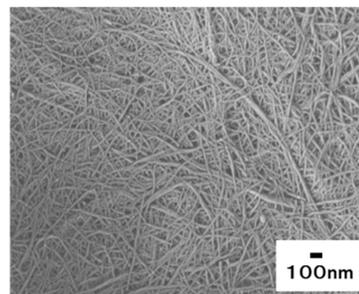


図3. カニ殻から単離した幅10-20 nmのキチンナノファイバー。

この「アミノ基のカチオン化に伴う反発力」を利用して、精製済みの市販されている乾燥キチンから手軽にキチンナノファイバーに変換することも可能であった³⁾。一般にセルロースナノファイバーの調製においては、水素結合に伴うナノファイバー間の強固な凝集を避けるため、一連の製造工程を未乾燥で進めることが必須とされる。しかしながら、この制約は工程が煩雑になり、コスト高に繋がるため事業化において不利である。一方、キチンの場合は電荷による反発力を利用して市販の乾燥キチンから速やかにナノファイバーを製造可能であった。

なお、カニ以外の様々な生物の外皮、例えばブラックタイガー、甘エビ、クルマエビなど一般的に食されるエビの殻からも同様の形状のナノファイバーが単離できることが確かめられた⁴⁾。また、最近では菌類に分類される多彩なキノコの細胞壁からもキチンナノファイバーが得られることが見出され始めている。

3. 2 皮膚に対する影響の検討

1) 上皮厚の算出

- pH 3 の試料を塗布し 4 時間後に採材した実験群において、上皮厚は対照群が $14.08 \pm 1.83 \mu\text{m}$ 、キチン NF 群が $16.50 \pm 0.84 \mu\text{m}$ 、AcOH 群が $14.34 \pm 0.79 \mu\text{m}$ であった。対照群と比較して、キチン NF 群で上皮厚が増加する傾向がみられた(図4~図6)。
- pH 3 の試料を塗布し 8 時間後に採材した実験群において、上皮厚は対照群が $17.73 \pm 1.20 \mu\text{m}$ 、キチン NF 群が $19.53 \pm 1.16 \mu\text{m}$ 、AcOH 群が $15.94 \pm 1.68 \mu\text{m}$ であった。対照群と比較して、キチン NF 群およびキトサン NF 群で上皮厚が増加する傾向がみられた(図4~図6)。
- pH 6 の試料を塗布し 4 時間後に採材した実験群において、上皮厚は対照群が $13.34 \pm 1.11 \mu\text{m}$ 、キチン NF 群が $14.42 \pm 0.81 \mu\text{m}$ 、AcOH 群が $14.00 \pm 0.96 \mu\text{m}$ であった。対照群と比較して、キチン NF 群で上皮厚が増加する傾向がみられた(図4~図6)。
- pH 6 の試料を塗布し 8 時間後に採材した実験群において、上皮厚は対照群が $13.85 \pm 0.27 \mu\text{m}$ 、キチン NF 群が $14.35 \pm 0.74 \mu\text{m}$ 、AcOH 群が $13.02 \pm 0.49 \mu\text{m}$ であった。対照群と比較して、キチン NF 群で上皮厚が増加する傾向がみられた(図4~図6)。

以上の結果より上皮の厚みは pH 3 および pH 6 実験群の両方で、4 時間後の結果において対照群と比較してキチン NF 群で増加傾向にあった。このことから、キチン質 NF 塗布により上皮の厚みを増加させる効果が得られた。しかし、8 時間後の結果では、対照群と比較して増加傾向にあるものの有意差はみられなかったことから、この効果が時間経過とともに軽減される可能性があることも考慮する必要がある。

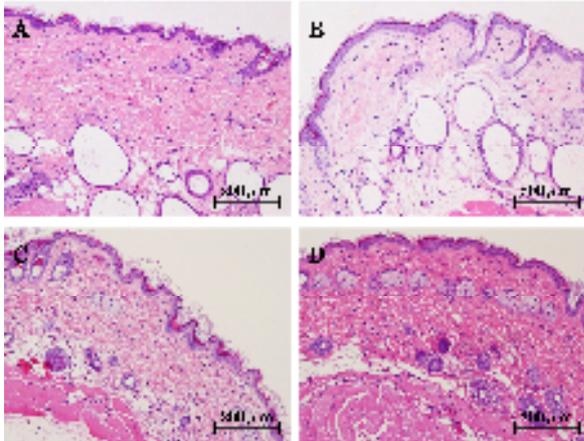


図 4 対照群、A : pH 3、4 時間後、B : pH 3、8 時間後、C : pH 6、4 時間後、D : pH 6、8 時間後

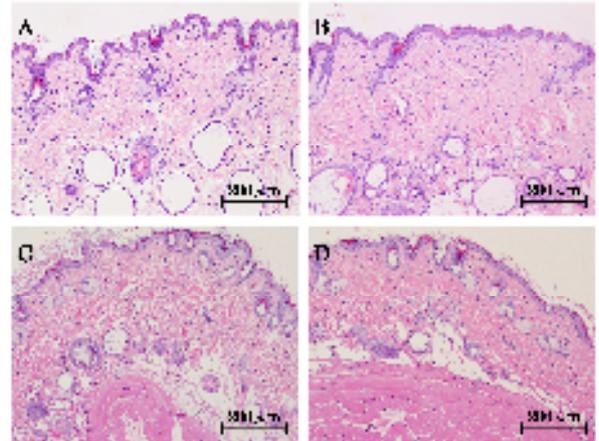


図 5 キチン NF 群、A : pH 3、4 時間後、B : pH 3、8 時間後、C : pH 6、4 時間後、D : pH 6、8 時間後

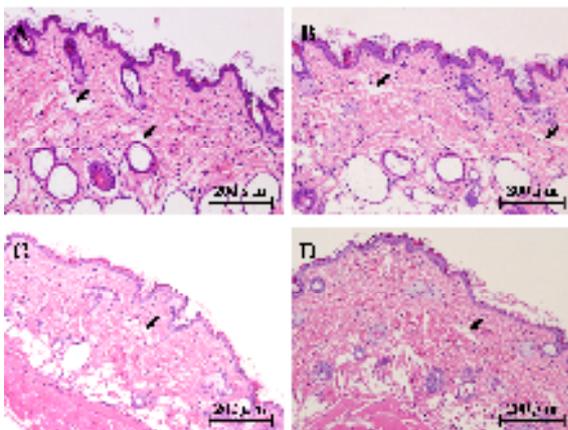


図 6 AcOH 群、A : pH 3、4 時間後、B : pH 3、8 時間後、C : pH 6、4 時間後、D : pH 6、8 時間後

2) 膠原線維面積率の算出

- pH 3 の試料を塗布し 4 時間後に採材した実験群において、面積率は対照群が $76.70 \pm 1.20\%$ 、キチン NF 群が $71.01 \pm 5.12\%$ 、AcOH 群が $56.45 \pm 1.50\%$ であった。対照群と比較して、キチン NF 群で面積率が減少する傾向がみられた。また、キチン NF 群、ならびに対照群と比較して、AcOH 群では、面積率は有意に減少した (図 7 ~ 図 9)。
- pH 3 の試料を塗布し 8 時間後に採材した実験群において、面積率は対照群が $64.57 \pm 6.47\%$ 、キ

チン NF 群が $76.19 \pm 3.35\%$ 、AcOH 群が $73.11 \pm 3.06\%$ であった。対照群と比較して、キチン NF 群、キトサン NF 群ならびに AcOH 群で面積率が増加する傾向がみられた (図 7～図 9)。

- pH 6 の試料を塗布し 4 時間後に採材した実験群において、面積率は対照群が $75.64 \pm 0.94\%$ 、キチン NF 群が $78.74 \pm 1.66\%$ 、AcOH 群が $72.88 \pm 0.43\%$ であった。対照群、ならびに AcOH 群と比較して、キチン NF 群で面積率が有意に増加した (図 7～図 9)。
- pH 6 の試料を塗布し 8 時間後に採材した実験群において、面積率は対照群が $72.94 \pm 1.32\%$ 、キチン NF 群が $76.80 \pm 2.18\%$ 、AcOH 群が $75.02 \pm 1.25\%$ であった。対照群と比較して、キチン NF 群ならびに AcOH 群で面積率が増加する傾向がみられた (図 7～図 9)。

3) 弾性線維面積率の測定

- pH 3 の試料を塗布し 4 時間後に採材した実験群において、面積率は対照群が $3.11 \pm 0.30\%$ 、キチン NF 群が $3.28 \pm 0.53\%$ 、AcOH 群が $2.69 \pm 1.80\%$ であった (図 7～図 9)。
- pH 3 の試料を塗布し 8 時間後に採材した実験群において、面積率は対照群が $2.80 \pm 0.42\%$ 、キチン NF 群が $3.49 \pm 1.66\%$ 、キトサン NF 群が $3.91 \pm 1.58\%$ 、AcOH 群が $3.94 \pm 1.27\%$ であった。対照群と比較して、キチン NF 群、ならびに AcOH 群で弾性線維面積率が増加する傾向にあった (図 7～図 9)。
- pH 6 の試料を塗布し 4 時間後に採材した実験群において、面積率は対照群が $4.45 \pm 0.87\%$ 、キチン NF 群が $3.57 \pm 0.50\%$ 、AcOH 群が $3.38 \pm 0.34\%$ であった (図 7～図 9)。
- pH 6 の試料を塗布し 8 時間後に採材した実験群において、面積率は対照群が $2.19 \pm 0.23\%$ 、キチン NF 群が $3.22 \pm 0.78\%$ 、AcOH 群が $2.59 \pm 0.35\%$ であった)。対照群と比較してキチン NF 群、ならびに AcOH 群で弾性線維面積率が増加する傾向にあった (図 7～図 9)。

以上の結果より弾性線維面積率に関しては、8 時間後には対照群と比較して面積率の上昇傾向がみられた。この結果は、エラスチン材料の蓄積は周囲のコラーゲン構造の変性に関連があるという報告があることから、酸性物質の塗布による膠原線維の損傷に対する生体反応の影響を受けていることが示唆された。一方で、pH 6 実験群においても 8 時間後にキチン NF 群で AcOH 群と比較して増加傾向がみられること、キチン NF 群では基底層付近に細い弾性線維がより多くみられたことを考慮すると、キチン質 NF には弾性線維の増生促進効果がある可能性が考えられる。

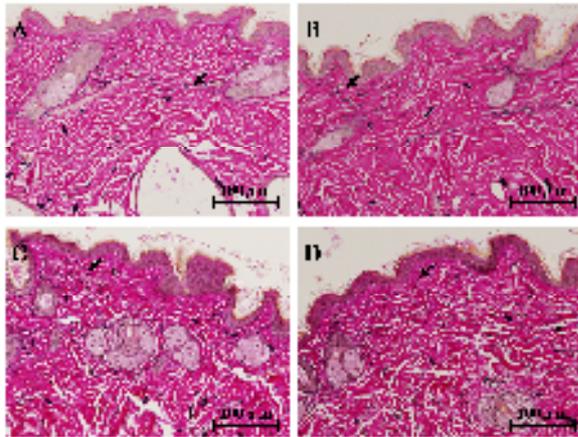


図7 対照群、A：pH 3、4 時間後、B：pH 3、8 時間後、C：pH 6、4 時間後、D：pH 6、8 時間後

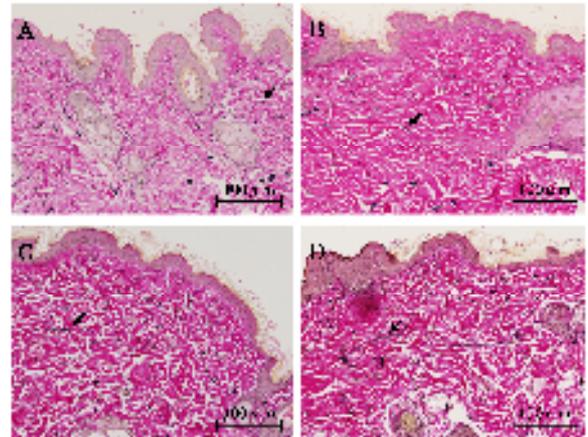


図8 キチンNF群、A：pH 3、4 時間後、B：pH 3、8 時間後、C：pH 6、4 時間後、D：pH 6、8 時間後

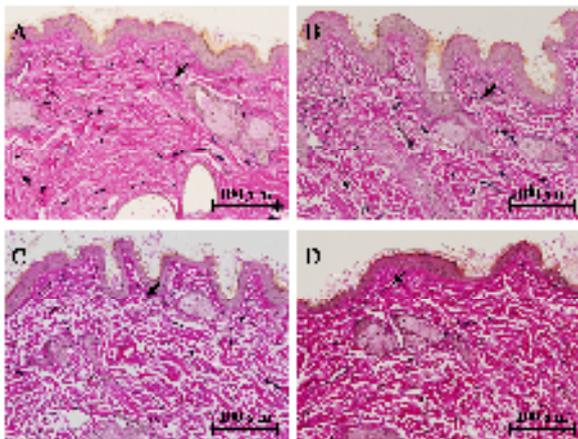


図9 AcOH群、A：pH 3、4 時間後、B：pH 3、8 時間後、C：pH 6、4 時間後、D：pH 6、8 時間後

4. 結論

キチン質NFを皮膚に塗布することにより、炎症を惹起することなく、上皮厚を増大させる効果および膠原線維面積率を増大させる効果が得られた。さらに、これらの効果によりキチン質NFの皮膚への塗布は、皮膚全体におけるアンチエイジングおよび皮膚損傷予防に有効な手段になり得ると考える。近年、キチンはようやくバイオマスとしての重要性が認識される機運が高まっており、地球上で大量に利用可能な最後のバイオマスと言われている。しかしながら、研究の歴史はまだ浅いため、莫大な年間合成量にも関わらず、その量に見合った有効な利用法は未だ見出されていない。その大きな要因の一つとして、キチンが水に対して不溶であり、加工性に乏しいことが挙げられる。キチンナノファイバーはキチンがナノレベルで均質に分散しており、溶解に近い状態であると言える。よって、キチンナノファイバーは、フィルムや不織布、スポンジな

ど用途に応じて様々な形状に加工することができる。本研究の推進に伴い、キチンナノファイバーの生体への機能が見出され、加工性、形状、物性において優れるキチンナノファイバーの利用が急速に拡大すると期待される。想定される用途範囲は繊維、製紙、高機能性プラスチック、化粧品、医療、医薬、食品など幅広い。貴財団の助成金制度によって得られた成果を活用し、速やかにキチンナノファイバーの効果・効用を活かし、廃カニ殻を人々の健康面を支える高機能性新素材へと変換し、実用化へと繋げていきたい。

参考文献

- 1) S. Ifuku, M. Nogi, K. Abe, M. Yoshioka, M. Morimoto, H. Saiomoto, H. Yano, *Biomacromol.*, 10, 1584 (2009).
- 2) Y. Fan, T. Saito, A. Isogai, *Biomacromol.*, 9, 1919 (2008).
- 3) S. Ifuku, M. Nogi, K. M. Yoshioka, M. Morimoto, H. Yano, H. Saimoto, *Carbohydr. Polym.*, 81, 134 (2010).
- 4) S. Ifuku, M. Nogi, K. Abe, M. Yoshioka, M. Morimoto, H. Saimoto, H. Yano, *Carbohydr. Polym.*, 84, 727 (2011).
- 5) 谷 啓輔, 鳥取大学農学部獣医学科, 平成22年度卒業論文.