

毛髪の酵素的手法を利用した新規損傷評価法
および構造変化に関する研究

山内 力

目次

第1章 緒論	3
第1節 研究の目的と背景	3
第2節 毛髪の構造	4
第3節 毛髪の化学処理	8
第4節 毛髪の損傷	10
第2章 モデルケラチンのプロテアーゼ分解性	13
第1節 序	13
第2節 実験方法	13
第3節 実験結果と考察	17
3-1. モデルケラチンの調整とキャラクタリゼーション	17
3-2. プロテアーゼ分解条件の検討	22
3-3. プロテアーゼ分解の要因	25
3-4. プロテアーゼ分解部の解析	28
第4節 まとめ	31
第3章 毛髪のプロテアーゼ分解の特徴とその要因	32
第1節 序	32
第2節 実験方法	33
第3節 実験結果と考察	36
3-1. プロテアーゼ分解条件の検討	36
3-2. 毛髪の損傷とプロテアーゼ分解性	39
3-3. プロテアーゼ分解部の解析	44
3-4. 毛髪の構造解析	46
第4節 まとめ	49

第4章	還元剤処理毛のプロテアーゼ分解性	50
第1節	序	50
第2節	実験方法	50
第3節	実験結果と考察	53
3-1.	還元時間の影響	53
3-2.	シスチン還元率および水分保持率の影響	55
3-3.	パーマ毛の分解性と構造解析	57
第4節	まとめ	59
第5章	異なる化学処理毛のプロテアーゼ分解性	60
第1節	序	60
第2節	実験方法	61
第3節	実験結果と考察	63
3-1.	short-term の化学処理毛のプロテアーゼ分解性	63
3-2.	long-term の化学処理毛のプロテアーゼ分解性	67
第4節	まとめ	70
第6章	頭髮化粧品開発への利用	71
第1節	序	71
第2節	実験方法	71
第3節	実験結果と考察	74
第4節	まとめ	78
第7章	総括	79
	引用文献	82
	研究業績	92
	謝辞	95

第1章 緒論

第1節 研究の目的と背景

パーマメントウェーブ（パーマ）やヘアダイに代表される化学処理は毛髪に損傷を与えるため、これを防止することが化粧品業界においては重要な課題となっている。毛髪の損傷は官能の変化として実感され、摩擦抵抗の上昇によるパサつき、きしみ感、指通り・クシ通りの悪さに加えて毛髪が絡まりやすくなる。また、枝毛や切れ毛の発生、ハリコシの低下、つやの低下、毛髪の広がり（まとまりのなさ）なども観察される(1)。実際にパーマやヘアダイの経験がなくても、毛髪同様に獣毛の束である書道の筆を長期間使用した時の状態を思い出せば官能的な変化をイメージしやすい。このような官能の変化は洗髪時だけでなく乾燥時にも実感でき、毛髪が扱いにくくなることから消費者にとっては非常に不快と感じられる。

このため、毛髪の損傷を科学的に評価することは、毛髪自体の性質を知ることに加えて、損傷の進行を抑制する頭髪化粧品の開発においても重要な位置を占めている。通常、毛髪の損傷を評価する場合、電子顕微鏡観察と引っ張り特性の測定が汎用される(1~3)。前者は毛髪表面の特性、後者は繊維全体の特性を示している。しかし、これらの手法は高価な装置が必要であり、操作が煩雑であるためルーチン分析の妨げになっている(4~6)。そこで、本研究では特別な装置を必要とせず、操作が簡便である毛髪のプロテアーゼ処理に着目した。

化学処理された羊毛や毛髪のプロテアーゼ分解性が高いことは以前から知られていた(7)。しかし、これらの研究は分解性の比較をしているのみで、毛髪の損傷と分解性が関係しているというデータに基づいていないことから、この方法が広く普及するには至っていない。そこで、本研究では先ず基本的な知見を得る目的で、毛髪の主要タンパク質のプロテアーゼ分解性を調べた。次いで、毛髪の損傷とプロテアーゼによる分解挙動を調べ、毛髪の損傷部位の解

析を行った。さらにプロテアーゼによる手法を応用して種々の化学処理毛の構造解析を試みた。最後に、化粧品製剤の毛髪に対する損傷を比較して本方法の実用性を検証した。

本論文は緒論（第1章）に始まり、モデルケラチンのプロテアーゼ分解性（第2章）、毛髪のプロテアーゼ分解性（第3章）、還元剤処理毛のプロテアーゼ分解性（第4章）、異なる化学処理毛のプロテアーゼ分解性（第5章）、頭髪化粧品開発への利用（第6章）、総括（第7章）の順で構成されている。

第2節 毛髪の構造

毛髪を構成成分から見た場合、タンパク質が毛髪全体の80~90%を占めており、残りは水分（約10%）、脂質（数%）、メラニン色素（約1.5%）、微量元素（0.55%~0.94%）から構成されている（1, 8, 9）。毛髪は他の獣毛、爪、角、蹄、羽毛と同様に発生学的には表皮から生じた器官であり、イオウ原子を含むタンパク質である。これらのタンパク質中でイオウは主としてシスチンの形で分子間や分子内で架橋を形成しており、ケラチンと呼ばれる特殊な硬構造体を形成している。

ケラチンはX線回折のパターンに基づき α -ケラチンと β -ケラチンに分類できる（10）。毛髪や羊毛のような哺乳動物由来は α -ケラチン、爬虫類や鳥類由来は β -ケラチンが多いことが知られている（11）。表1-1に毛髪および他のタンパク質のアミノ酸組成を示した（12~14）。 α -ケラチンである毛髪や羊毛はシスチン*および α -ヘリックス形成能の高いグルタミン酸、ロイシンが多く、非ヘリックス性のグリシン、プロリンが少ないのが特徴である。特に毛髪は他のタンパク質に比べてシスチンが16.6~18%と高いことが特徴である（15）。

*慣用的にハーフシスチン（システイン）として表される。

表 1-1 種々のケラチンおよびタンパク質のアミノ酸組成^{a)}

	毛髪 ケラチン (12)	羊毛 ケラチン (12)	ヒトの爪 (13)	羽毛 (14)	コラーゲン (12)	絹フィブロイン (12)
Aspartic acid	4.9	5.9	7.1	6.0	4.6	1.3
Threonine	6.0	6.5	6.1	5.1	1.8	0.9
Serine	11.7	10.8	10.3	15.1	3.5	12.1
Glutamic acid	11.4	11.1	13.3	8.3	7.2	1.0
Proline	8.4	6.6	5.9	11.2	13.2	0.3
Glycine	6.4	8.6	8.0	11.0	33.0	44.5
Alanine	4.6	5.2	5.5	5.4	11.2	29.3
Half-cystine	17.8	13.1	10.7	8.4	0.0	0.2
Valine	5.8	5.7	5.5	7.4	2.6	2.2
Methionine	0.6	0.5	—	0.3	0.4	0.1
Isoleucine	3.6	3.0	2.7	4.1	1.0	0.7
Leucine	5.8	7.2	8.4	7.1	2.4	0.5
Tyrosine	2.0	3.8	3.2	1.5	0.3	5.2
Phenylalanine	2.2	2.5	2.5	3.5	1.4	0.6
Lysine	2.7	2.7	3.1	0.8	2.7	0.3
Histidine	0.9	0.8	1.0	0.3	0.4	0.2
Arginine	5.8	6.2	6.5	4.5	4.9	0.5

a) 100残基あたりの残基であらわした。

毛髪の階層構造を図 1-1 に示した (12)。毛髪の表面には鱗片状のキューティクル細胞が6~10層、その内部には紡錘状のコルテックス細胞が多数存在し、これらの細胞間には細胞膜複合体が存在している。また、毛髪の中央部分には高い頻度でメデュラが認められる。

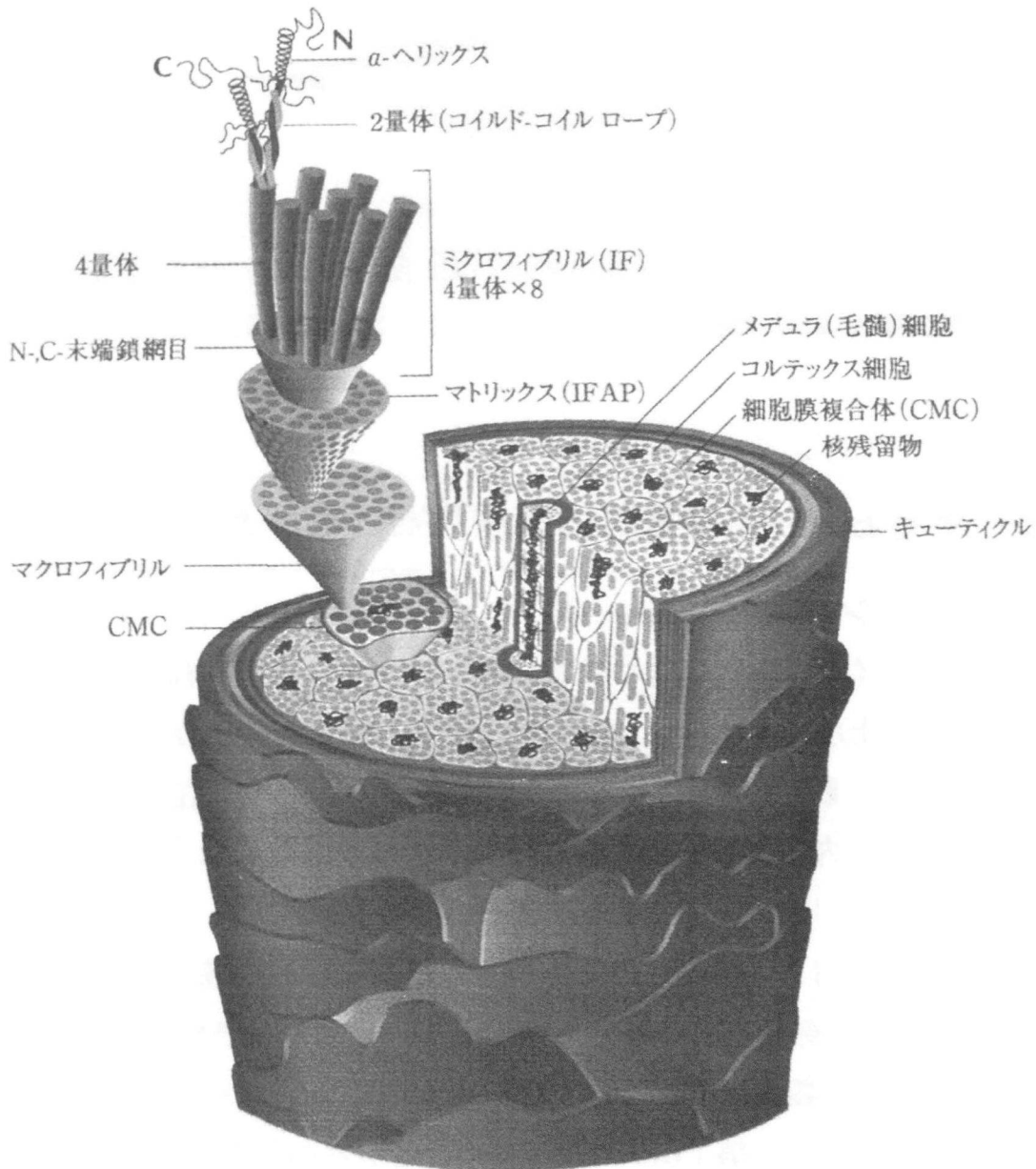


図 1-1 毛髪繊維の階層構造の模式図

キューティクルは毛髪重量の 10~15%を占めており、化学的に抵抗力のある領域である。図 1-2 に示したように、1 枚のキューティクルは外側よりエピキューティクル、A 層、エキソキューティクルおよびエンドキューティクルが主要な構成組織で、シスチン含量はそれぞれ 12%、30%、15%および 3%と報告されている (9)。

キューティクルの内側のコルテックスは毛髪全体の 85~90%を占める(1)。コルテックスは少量のメラニン色素などを除くと、約 60%のマイクロフィブリル (Mf) と約 40%のマトリックス (Ma) と呼ばれるタンパク質から構成され、Mf が Ma に埋め込まれる形で繊維の基本構造であるマクロフィブリルを形成している (12, 16)。Mf は分子量 45~55 k D a であり、結晶性の α -ヘリックスタンパク質から構成され、シスチンが約 7%と少ない。Ma は分子量 10~30 k D a で、非結晶性の球状タンパク質であり、シスチンが約 21%と多いのが特徴である (14, 17)。近年、Mf は中間径フィラメントタンパク質 (IF タンパク質)、Ma は中間径フィラメント結合タンパク質 (IFAP タンパク質) とも呼ばれているが、本論文では慣用名である Mf と Ma に統一した。

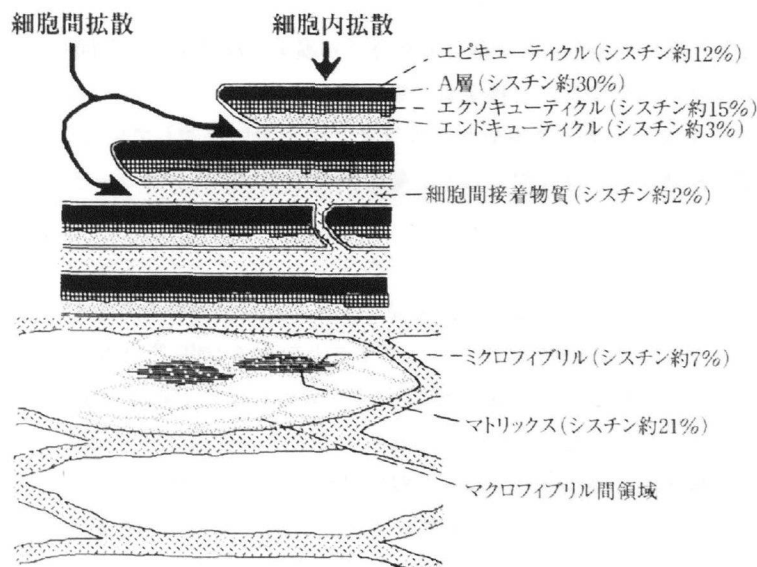


図 1-2 キューティクルとその周辺組織の構造

細胞膜複合体 (CMC) は細胞間接着物質という呼び方をされる場合もあり、キューティクル細胞間とコルテックス細胞間に存在している。構成成分はβ層 (脂質2分子膜) とδ層 (タンパク質) から成っており、水や化学物質の細胞間拡散ルートとなっている (図1-2) (9)。

メデュラは、蜂の巣状の細胞が並んだ構造であり、完全につながっているものや飛び石状に存在するもの、全く存在しないものがある。ヒト以外の動物の体毛では、メデュラの繊維全体に占める割合が大きいために、断熱の役割をしていると考えられている (18)。

第3節 毛髪の化学処理

毛髪の化学処理は美容処理として行われており、パーマントウェーブおよびヘアダイ (あるいはブリーチ) の2種類の化学反応に大別できる。

図1-3に示したようにタンパク質間には4種類の代表的な結合が存在する。パーマントウェーブはこの中のジスルフィド結合 (シスチン) と最も密接に関係する (11)。パーマントウェーブは毛髪を筒状のカーラーなどで望む

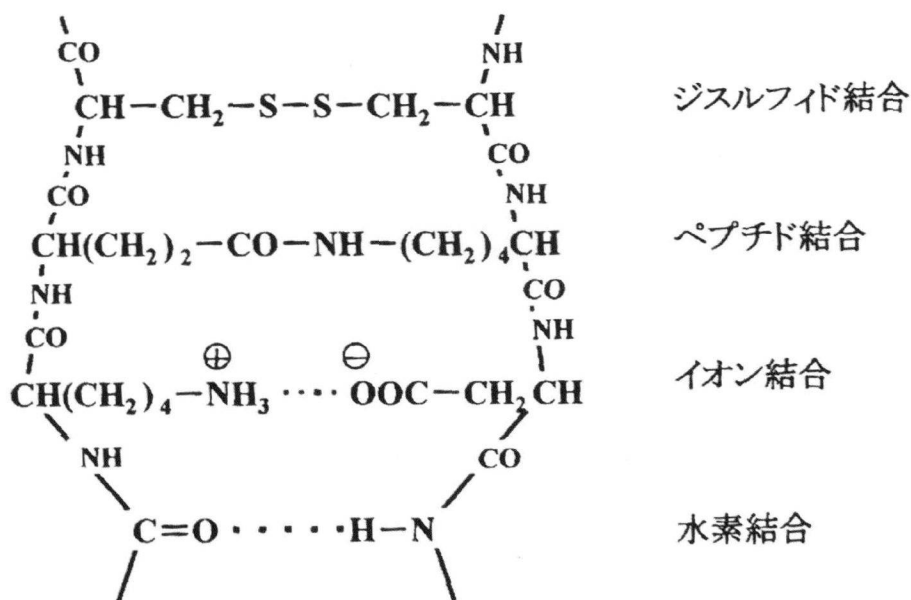


図1-3 タンパク質間の結合の種類

ヘアスタイルに変形した状態で、還元剤溶液（第1剤）を塗布して15分程度放置する（図1-4）。これによりシスチン（-SS-）がシステイン（-SH HS-）に還元される。続いて酸化剤溶液（第2剤）を塗布して15分程度放置することで、タンパク質間距離の近いシステイン間で酸化反応が起こる。この結果、シスチンが再形成されてウェーブを形成する。シスチンは強固な共有結合であり、日常の処理ではほとんど切れないうえにパーマ処理によって作ったウェーブを維持することができる。

一方、ヘアダイは色素前駆体（アニリン誘導体）を含有するアルカリ性の第1剤と過酸化水素を含有する酸性の第2剤を混合後、速やかに毛髪に塗布し、15～30分程度放置する。これにより毛髪のメラニン色素を分解するとともに色素前駆体が重合して色調が加わる美容処理である（図1-5）（19）。

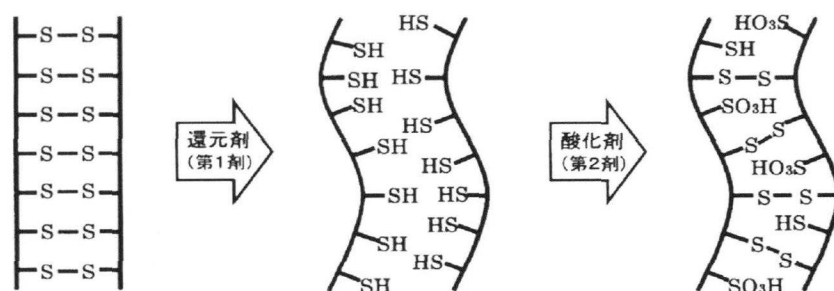


図1-4 パーマ処理によるジスルフィド結合（シスチン）の変化

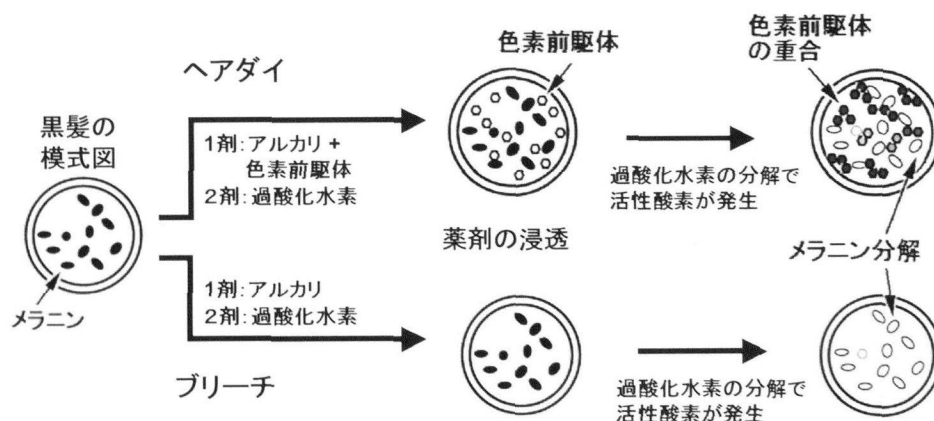


図1-5 ヘアダイおよびブリーチのメカニズム

ブリーチ処理はヘアダイの第1剤から色素前駆体を除いたことだけが異なっており、毛髪メラニン色素を分解することで毛髪の色調を明るくする美容処理である。ヘアダイとブリーチはアルカリ性の過酸化水素を含む剤を毛髪に塗布する。この時、過酸化水素の分解で生成した活性酸素により酸化反応が起こる。このため、シスチンの酸化切断によりシステイン酸が生成することがよく知られている。パーマで用いられる酸化剤の臭素酸ナトリウムに比較すると、ヘアダイとブリーチで用いられる過酸化水素のほうがより酸化力が強いために、システイン酸の生成も多い。

第4節 毛髪の損傷

毛髪は死んだ細胞の集合体であるために一度損傷を受けると元には戻らない。毛髪の損傷の原因としては物理的要因（日常の処理）、環境的要因、化学的要因の3種類に大別できる（1, 20）。

第1に、物理的要因による損傷としては、洗髪、タオルドライ、ブラッシング時の摩擦により、キューティクル表面のめくれや剥離が起こる（21）。さらにこの損傷が進行すると、コルテックス細胞間の接着性が低下して枝毛が発生することが知られている（22）。ドライヤーも100℃前後の熱風が出るため、濡れた毛髪を熱風で乾かす操作を繰り返すと、急激な収縮によりキューティクル表面に縦方向の小さな亀裂が生じる（23）。また、この熱の影響でメデュラの空洞化現象も観察される（24）。さらに、洗髪時に脂質やタンパク質の溶出が起こることが知られており、特に化学処理後の毛髪で顕著である（25）。

第2に、環境的要因としては日光暴露の影響が大きく、紫外線が毛髪の損傷に関与している。紫外線による化学変化としてはペプチド骨格の酸化的切断によるカルボニル基とアミド基の生成、シスチンの酸化分解に伴うシステイン酸の生成（26）、特定アミノ酸の分解などが報告されている（27, 28）。形態的な変化としてはメラニン色素、顆粒状物質、CMCの消失による多孔質化などが観察されている（29, 30）。また、メラニンの酸化分解による毛髪の赤色化も起

こる (31)。さらに、毛髪がごわごわになるなどの官能的な変化も起こる (28)。

第3に、化学的要因による毛髪の損傷は、本研究で焦点を当てたテーマであり、2つの化学反応に関係する。1つはパーマネントウェーブ (パーマ)、もう1つはヘアダイあるいはブリーチである。前述したように、パーマは通常アルカリ下の還元反応に続く酸化反応に基づいている。ヘアダイやブリーチではアルカリ性の酸化反応に基づいている。パーマとヘアダイ (ブリーチ) はアルカリ性媒体および酸化反応などの類似点があるため、毛髪の損傷に関しては共通して観察される現象や知見が多い。表 1-2 に化学処理で起こる主な毛髪の損傷とその検出方法をまとめた。毛髪中のミクロな変化はマクロな変化として現われる。すなわち、毛髪内の化学変化や構造変化は毛髪の形態や性状に影響を与え、さらに官能の変化として知覚される。このように、毛髪の損傷は研究者の視点によって異なる現象と捉えられるが、それぞれが因果関係になっている場合が多い。

以上、毛髪の損傷を3種類に大別して述べたが、実生活者の毛髪では特定の要因のみが影響するというよりは、各要因が複合的に影響していると考えられている。

表 1-2 化学処理による毛髪の損傷およびその検出方法

視点	対象とする損傷	損傷の検出方法
化学変化 など	・システイン酸の生成 (32)、アミノ酸の変化 (33, 34)、キューティクル表面の結合脂肪酸やペプチド結合の切断 (17, 35)、脂質の溶出 (36)	IR、アミノ酸分析、GC、HPLC、TLC
構造変化 など	・ランチオニン架橋などの生成 (37)	アミノ酸分析
	・ α -ヘリックスタンパク質の減少、ランダムコイル化、 β シート化 (38~40)、タンパク質の不安定化や溶出 (41)	X線回折、NMR、IR、ラマン、示差走査熱量測定、偏光顕微鏡観察、ローリー法、電気泳動法
	・マトリックスの溶出 (42) ・異なる SS 結合の切断 (43)	電気泳動法、アミノ酸分析 粘弾性測定
形態変化 など	・繊維の膨潤 (44)、過収縮 (45)、キューティクルのめくれや剥離 (46, 47)	光学顕微鏡、水分保持率、目視、電子顕微鏡
	・メラニン・CMC・顆粒状物質の分解・消失による繊維の多孔質化 (29, 30)	電子顕微鏡
	・コルテックス細胞の形態変化 (48)	偏光顕微鏡
	・アイロンパーマの熱による変形 (2)	電子顕微鏡
性状変化 など	・親水化 (49, 50)、色素吸着量変化 (51)	水分吸収、接触角度や表面張力、UV スペクトル
	・破断強度の低下 (46, 50)、引張特性の変化 (52)、摩擦抵抗の低下 (23)、ねじり応力の変化 (53)、柔軟性低下 (54)	直径計測、引張試験機、曲げ試験機、ねじり測定装置
官能変化 など	・パサツキ感・きしみ感・ハリコシの低下 (28) ・つややまとまりの低下 (1)、絡まり (20)	官能評価 (55)

第2章 モデルケラチンのプロテアーゼ分解性

第1節 序

プロテアーゼは毛髪組織を分離する方法として古くから利用されてきた(56, 57)。近年では産業的利用を目的として獣毛や羽毛を効率よく分解する微生物の検索と産生されるプロテアーゼに関する研究が多数報告されている(58, 59)。また、羊毛や毛髪のプロテアーゼ分解性を向上させる目的で還元剤処理等の前処理の検討も行われている(60, 61)。しかし、これらの研究はプロテアーゼの特性やタンパク質の分解性に志向しており、その分解挙動やメカニズムについてはほとんど知られていない。

そこで、本章では毛髪の主要構成成分である2種類のタンパク質、マトリックス(Ma)およびマイクロフィブリル(Mf)のプロテアーゼ分解性を調べることを目的とした。まず、毛髪からMaあるいはMfを還元剤で部分抽出し4種類のモデルケラチン: Maフィルム, Mfフィルム, Maリッチ繊維およびMfリッチ繊維を調整した。そして、これら4種類のモデルケラチンの特性を調べるとともにプロテアーゼによる分解挙動を調査した。

第2節 実験方法

2-1. 試薬

プロテアーゼとして Proteinase K(ナカライテスク, *TritIRachiuMalbum* 由来, 36.3U/mg), Pronase E (SIGMA, *Streptomyces griseus* 由来, 12.4U/mg), Subtilisin Carlsberg (SIGMA, *Bacillus licheniformis* 由来, 7.0U/mg), Trypsin (SIGMA, *Bovine pancreas* 由来, 10600U/mg), Pepsin (SIGMA, *Porcine stoMach* 由来, 3800U/mg) を用い、表 2-1 に性質を示した。半透膜は Spectra/Pro[®] CE Membrane (Spectrum Laboratories, 分子量分画 2,000) を 30 分間水洗して用いた。2-メルカプトエタノール(2-ME)は特級、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)は生化学用を用いた。他のすべての試薬は特級を用いた。

表 2-1 用いたプロテアーゼの性質

	Proteinase K	Pronase E	Subtilisin Carlsberg	Trypsin	Pepsin
安定pH	7.5~12.0	5.0~9.0	5.0~10.5	7~9	3.0~4.0
MW	18.5 kDa	34 kDa	28 kDa	23 kDa	35 kDa
熱安定性	60℃まで	70℃まで	65℃まで	60℃まで	約70℃で失活
分解の型	endo	endo + exo	endo	endo	endo

*安定性は 2-4 を参照

2-2. 試料毛髪およびモデルケラチンの調製

化学処理の履歴がない 20 代日本人女性の毛髪(平均直径 0.073mm)を 1.0% SDS 水溶液で 25℃、10 分間洗浄、30 分間水洗した後に自然乾燥させて用いた。

脂質の除去を目的に、毛髪をクロロホルム/メタノール(2 : 1)に 50 倍量の浴比(毛髪に対する液の重量比)で室温下、16 時間抽出した後、自然乾燥させて脱脂毛を得た(17)。毛髪の主要構成成分である Ma タンパク質と Mf タンパク質は、還元剤濃度の違いあるいは異なる還元剤溶液により選択的に抽出することができる(17, 62)。Ma の抽出には約 1.0 g の脱脂毛を 25mM の Tris-HCl 緩衝液(SDS を 1.0%、2-ME を 15.0%含有, pH=8.3)に 50 倍量の浴比で 50℃、3 日間浸漬させた。Mf の抽出には約 1.0 g の脱脂毛を 25mM の Tris-HCl 緩衝液(SDS を 1.0%、2-ME を 3.0%含有, pH=8.3)に 50 倍量の浴比で 50℃、3 日間浸漬させた。

タンパク質を抽出した各溶液は蒸留水に対して 3 日間の透析を行った。なお、蒸留水は約 12 時間ごとに交換した。透析部はエバポレーターにより 45℃で水を除去後にケラチンフィルムを得た。他方、タンパク質抽出後の残渣繊維は、流水により 24 時間水洗した後に蒸留水でよく洗浄し、7 日間自然乾燥させてケラチン繊維を得た。ケラチン繊維はタンパク質抽出前後の重量を測定し、重量の減量率からタンパク質抽出率を求めた。このように、毛髪から Ma あるいは Mf を部分抽出して 4 種類のケラチン: Ma フィルム、Mf フィルム、Ma リッチ繊維および Mf リッチ繊維を調製した。

2-3. アミノ酸分析

試料をガラス封入管に入れ、6 Mの HCl を添加、窒素置換を行った後にガスバーナーで封入し、105℃、24 時間加水分解を行った。この反応終了後の液はエバポレーターで塩酸を除去し、Bennett らの方法 (63) によりフェニルチオカルバモイル (PTC) 誘導体化した。分析には UV 検出器を装備した日本分光製 HPLC システムを用いた (64)。このシステムに GLサイエンス社製 Inertsil ODS-2 カラム(オクタデシルシリカゲル, 100 mm × 4.6 mm i.d.) および同充填剤を用いたガードカラムを接続させ、PTC 誘導体を注入後に単一溶離モードに続くグラジエントモードで 37℃、流速 1 ml/min、UV 波長 254 nm で分析した (64)。

シスチン量は過ギ酸によりシステイン酸への転化を行った後に定量し (65)、慣用的にハーフシスチン (1/2 シスチン) として表した。システインは酸化されてシスチンになりやすいために、S-カルボキシメチル化誘導体にした後に定量した (66)。また、上述した酸加水分解では、アスパラギン (Asn) とグルタミン (Gln) はそれぞれの酸タイプに転換する。従って、本実験のアスパラギン酸 (Asp) 量は Asp および Asn を示し、グルタミン酸 (Glu) 量は Glu および Gln を示している。トリプトファン (Trp) はかなり不安定なために分解される。アミノ酸量は、100 アミノ酸残基中の残基として表した。

2-4. 毛髪のプロテアーゼ処理

2.0 cm に切断したケラチン繊維またはケラチンフィルムの約 100 mg をエッペンドルフチューブに入れた。ここに 25 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH = 8.0) または 150 mM の酢酸-NaOH 緩衝液 (pH = 4.0) で 0.05 wt % に調整したプロテアーゼ溶液あるいはプロテアーゼを含有しない緩衝液 (コントロール) 2 ml を入れた。この後、速やかに 37℃ で 96 時間、振とうなしでインキュベートした。Pepsin を用いる場合は酢酸-NaOH 緩衝液を使用し、他のプロテアーゼを用いる場合は Tris-HCl 緩衝液を使用した。

プロテアーゼ処理後の反応液は、9,000×gで5分間の遠心分離後に上澄み液を捨てた。残渣は水洗し、9,000×gで5分間の遠心分離後に上澄み液を捨てた。この操作をさらに3回繰り返した。残渣は乾燥させた後に重量を測定し、次式により分解率を求めた。

$$Wp (\%) = [(A - B) / A] \times 100$$

ここで、 Wp はプロテアーゼ分解率、 A と B はそれぞれプロテアーゼ処理前およびプロテアーゼ処理後の毛髪重量。なお、測定は3回の実験結果の平均値を示した。

最後に、用いた5種類の酵素の熱安定性を調べた。酵素反応終了後の溶液中のプロテアーゼは毛髪に吸着しているために、この溶液中の酵素活性を測定すると低い値が出る。そこで、プロテアーゼ溶液を37℃で96時間放置後、パーマ処理6回毛を入れて、さらに37℃で96時間インキュベートし、上述と同様の方法で分解率を求めた。プロテアーゼ溶液を37℃で96時間放置した場合と、しない場合の毛髪の分解率を比較すると、37℃で96時間放置した場合の分解率は若干低いものの、プロテアーゼ溶液を37℃で96時間放置しない場合の分解率の90%以上を示した。

2-5. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

ケラチン繊維は長さをそろえるために、鋭利なはさみで端を切って捨てた。残った主要繊維部分をProteinase Kで処理した。このProteinase K処理前および処理後の繊維をステンレス台にのせ、10mAで5分間金蒸着させた後、日本電子(株)製JSM-5200を用いて加速電圧15kV、倍率750倍あるいは1,000倍で観察した。

2-6. 水分保持率

水分保持率はKoharaらと類似の方法(67)で測定した。モデルケラチンを25℃でイオン交換水に4時間浸漬させた。次いで3,000×gで5分間の遠心分

離後に重量を測定した。次いで、このモデルケラチンを 105℃で 3 時間乾燥後に、重量を測定し、次式により水分保持率を求めた。

$$Wr (\%) = [(W_1 - W_0) / W_0] \times 100$$

ここで Wr は水分保持率、 W_1 と W_0 はそれぞれ遠心分離後に重量および 105℃で 3 時間乾燥後の重量。なお、測定は 3 回の実験結果の平均値を示した。

第3節 実験結果と考察

3-1. モデルケラチンの調製とキャラクタリゼーション

毛髪の主要構成成分である Ma タンパク質と Mf タンパク質は、還元剤濃度の違いにより選択的に抽出することができる (17, 図 2-1)。そこで、毛髪から Ma タンパク質あるいは Mf タンパク質の抽出率が等しいケラチン繊維の調製を試みた。この目的で、2-メルカプトエタノール (2-ME) 溶液と毛髪の浴比による検討を行った。

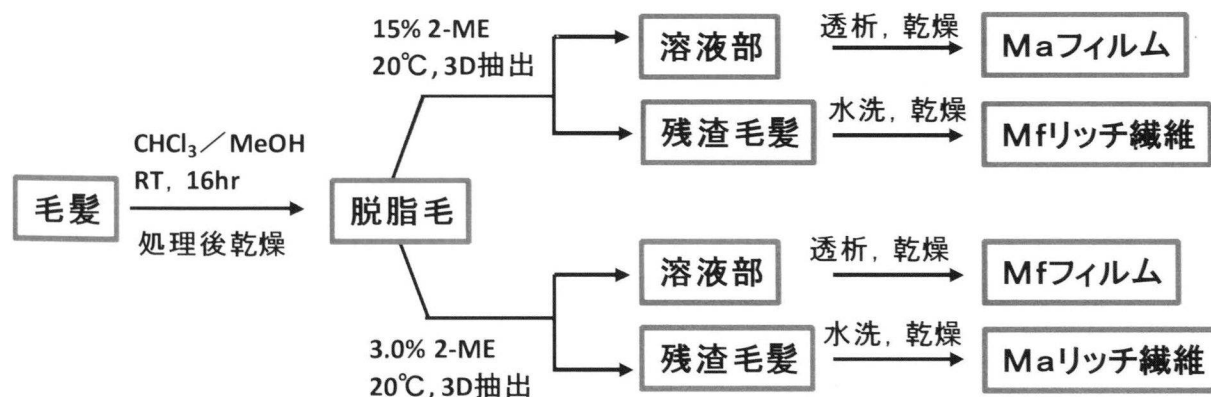


図 2-1 モデルケラチンの調製方法

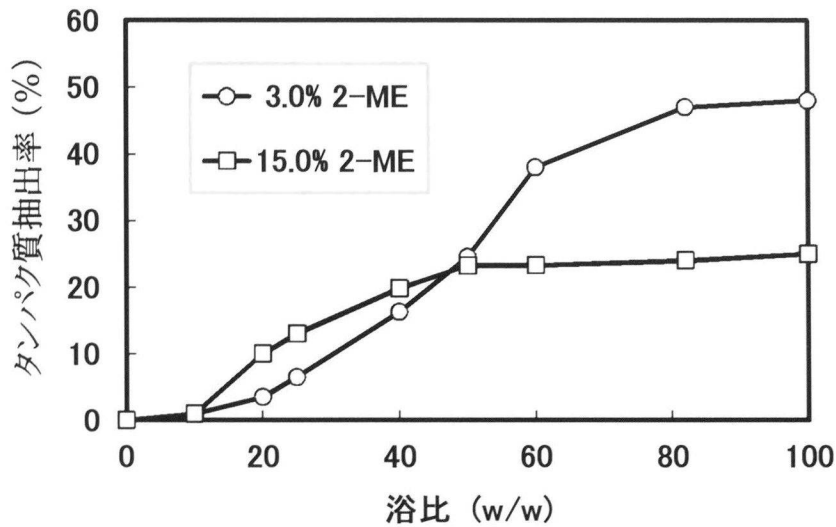


図 2-2 毛髪からのタンパク質抽出率と浴比の関係

図 2-2 に示したように、3.0%の 2-ME で Mf タンパク質を抽出した場合と 15.0% の 2-ME で Ma タンパク質を抽出した場合は抽出挙動が異なっていた。浴比 10 倍においてはいずれの 2-ME 濃度でもタンパク質の抽出量が約 1%と低かった。浴比 50 倍ではいずれの 2-ME 濃度でもタンパク質の抽出率は約 25%でほぼ等しくなることから、この浴比をケラチン繊維およびケラチンフィルムの調製に用いた。また、浴比 100 倍では 3.0%の 2-ME よりも 15.0%の 2-ME でタンパク質抽出量が少なかった。これは、低濃度の 2-ME ではコルテックスの約 60%を占める Mf タンパク質が主に抽出されるのに対して、高濃度の 2-ME ではコルテックスの約 40%を占める Ma タンパク質のみが抽出されることが原因と考えられる (17)。

図 2-3 にケラチンフィルムおよび水洗直後のケラチン繊維の外観を示した。また、ケラチン繊維の性状の比較を表 2-2 にまとめた。先ず、図 2-3 より Mf フィルム (a) と Ma フィルム (b) はともに滑らかな表面で、茶色の外観を呈しており、Yamauchi らが報告しているように硬い性状であった (68)。ケラチン繊維の外観を比較すると、Ma リッチ繊維 (c) は収縮していたが、Mf リッチ繊維 (d) は膨潤していた。

また、表 2-2 より、湿潤状態での Ma リッチ繊維は若干伸びてすぐ切断するのに対して、Mf リッチ繊維はよく伸びて切断した。乾燥状態での Ma リッチ繊維は十分に負荷をかけないと切断しないのに対し、Mf リッチ繊維は小さい負荷で切断した。以上のように、Ma リッチ繊維と Mf リッチ繊維は性状が異なることから、構成タンパク質が異なると考えられた。

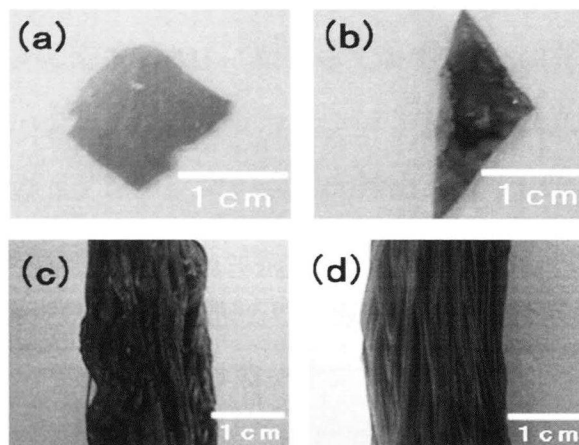


図 2-3 ケラチンフィルムおよびケラチン繊維
 (a) Mf フィルム (b) Ma フィルム
 (c) Ma リッチ繊維 (d) Mf リッチ繊維

表 2-2 ケラチン繊維の性状の比較

	Ma リッチ 繊維	Mf リッチ 繊維
外観	収縮	膨潤
湿潤状態	若干伸びて すぐ切断	よく伸びて 切断
乾燥状態	十分な負荷 で切断	小さい負荷 で切断

得られたモデルケラチンのキャラクタリゼーションをアミノ酸分析で行なった。本実験のアミノ酸組成は文献との比較で行なった。表 2-3 に示したように、4 種類のケラチン中のシスチン（ハーフシスチン）はシステインに比べて非常に豊富であった。これは、還元処理で生成したシステインが空気酸化 (69) によりシスチンに再結合したためと考えられる。毛髪成分の文献値 (70) と比較すると、Mf フィルムはシスチン量が少ないことから Mf に類似しており、Ma フィルムはシスチン量が多いことから Ma に類似していた。その他のアミノ酸組成からも Mf フィルムは Mf に類似しており、Ma フィルムは Ma に類似していることが分かった。これらのケラチンフィルムの高次構造は維持されていないと考えられるが、タンパク質の選択的抽出により一次構造は維持されていることが分かった。

他方、ケラチン繊維も還元剤処理により高次構造は失っていると考えられた。Ma リッチ繊維は非ヘリックス性のスレオニンおよびプロリン、さらにハーフシスチンが Mf リッチ繊維より多く、Ma に近い組成であった。一方、Mf リッチ繊維はヘリックス形成能の高いグルタミン酸およびロイシンが豊富で、Mf に近い組成であった。その他のアミノ酸組成からも Ma リッチ繊維には Ma が多量に残存しており、Mf リッチ繊維には Mf が多量に残存していると考えられた。これらの繊維は部分抽出によって調製されたことからアミノ酸組成は異なっていたが、Mf リッチ繊維と Ma リッチ繊維の収率はそれぞれ 76.8%と 75.8%でありほぼ等しかった。

表 2-3 毛髪成分の文献値およびモデルケラチンのアミノ酸組成^{a)}

	毛髪成分 (70)		ケラチンフィルム		ケラチン繊維	
	Mf	Ma	Mf-フィルム	Ma-フィルム	Mfリッチ 繊維	Maリッチ 繊維
Aspartic acid	9.3	2.5	9.3	4.8	8.2	6.9
Threonine	5.4	10.3	7.2	9.0	6.6	8.2
Serine	8.9	11.9	10.6	11.1	10.4	12.6
Glutamic acid	16.5	8.4	11.1	8.4	12.7	9.3
Proline	3.8	12.7	5.0	8.0	6.2	7.0
Glycine	5.1	6.1	7.6	5.7	5.3	6.5
Alanine	6.9	2.3	5.8	2.4	4.9	4.8
Half-cystine^{b)}	7.6	27.2	12.1	28.5	12.9	15.4
Cysteine	—	—	0.3	0.1	0.0	0.0
Valine	6.1	5.2	5.1	5.3	5.7	5.9
Methionine	0.4	0.0	1.0	0.1	1.0	0.2
Isoleucine	3.6	1.8	4.4	2.0	3.5	2.8
Leucine	10.2	2.2	5.5	3.7	8.0	3.5
Tyrosine	2.5	1.5	0.6	1.2	1.8	4.0
Phenylalanine	1.9	1.1	3.1	1.9	1.9	2.0
Lysine	3.5	0.6	3.2	1.0	3.5	3.6
Histidine	0.7	0.9	1.1	1.2	1.2	1.1
Arginine	7.1	5.4	7.0	5.7	6.2	6.2

a) 100残基あたりの残基であらわした。

b) ハーフシスチン量はハーフシスチンとシステインの総量をあらわしている。

3-2. プロテアーゼ分解条件の検討

先ず、ケラチン繊維に5種類のプロテアーゼを作用させて分解率の最大値を比較した。図2-4に示したように、いずれのプロテアーゼ処理でもMaリッチ繊維よりもMfリッチ繊維の分解性が高かった。Mfリッチ繊維に対して最大の分解率を示したのはProteinase Kで、Pronase E、Subtilisinも高い分解性を示した。Proteinase Kはネイティブな毛髪を分解し、基質特異性も広いために最大の分解率を示したものと考えられる(70, 71)。

毛髪の等電点pH=3.67(72)に近い酸性条件で用いたPepsinは他のアルカリ性条件で用いたプロテアーゼに比べて分解率が低かった。酸性条件下の毛髪はアルカリ条件下に比べて膨潤しにくいためか、毛髪あるいはPepsinがプラスチャージを持ったことにより分解が阻害されたものと推測される。以降の実験ではケラチン繊維に対して最大の分解率を示したProteinase Kを用いた。

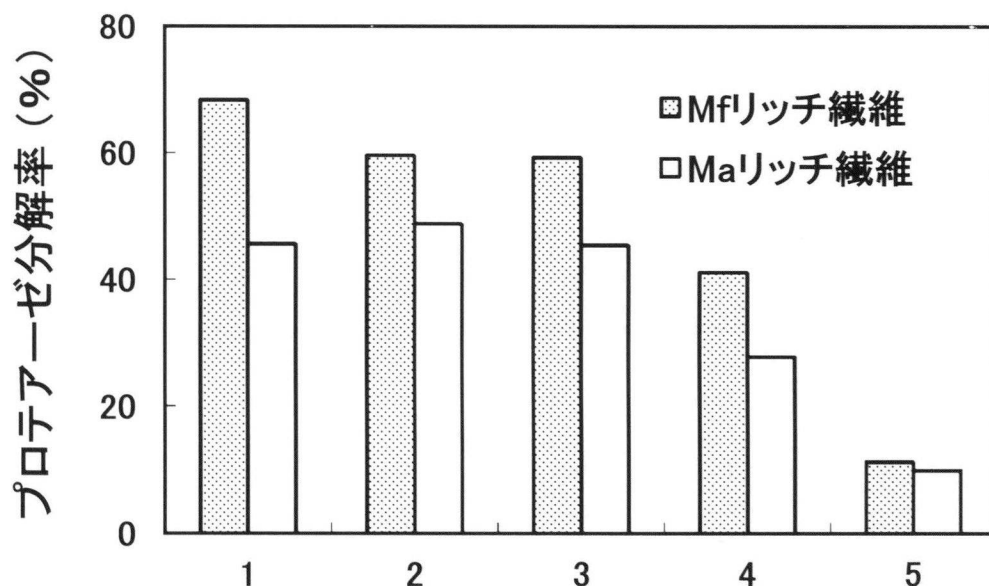


図2-4 ケラチン繊維のプロテアーゼ分解率(37℃, 100hr)

1 : Proteinase K, 2 : Pronase E, 3 : Subtilisin,
4 : Trypsin, 5 : Pepsin

プロテアーゼ処理時間を決定するために処理時間と分解率の関係を調べた。ケラチンフィルムの代表的な分解プロファイルを図 2-5 に示した。ケラチンフィルムの分解は、最初の 10 時間が著しく速く、40 時間以降はわずかな分解しか起きなかった。ここで、本研究の Mf フィルムの最大分解率は約 57%であったが、井出らのケラチンフィルムの分解率に比べると低い値であった (74)。これは、フィルムの調製法あるいはタンパク質の抽出部位の違いが原因と推測される。一方、プロテアーゼを含有しないコントロールでの分解率はほぼゼロに近かった。従って、分解率の上昇はほとんどがプロテアーゼによる分解と考えられ、ケラチンフィルムの可溶化の影響は無視できることが分かった。

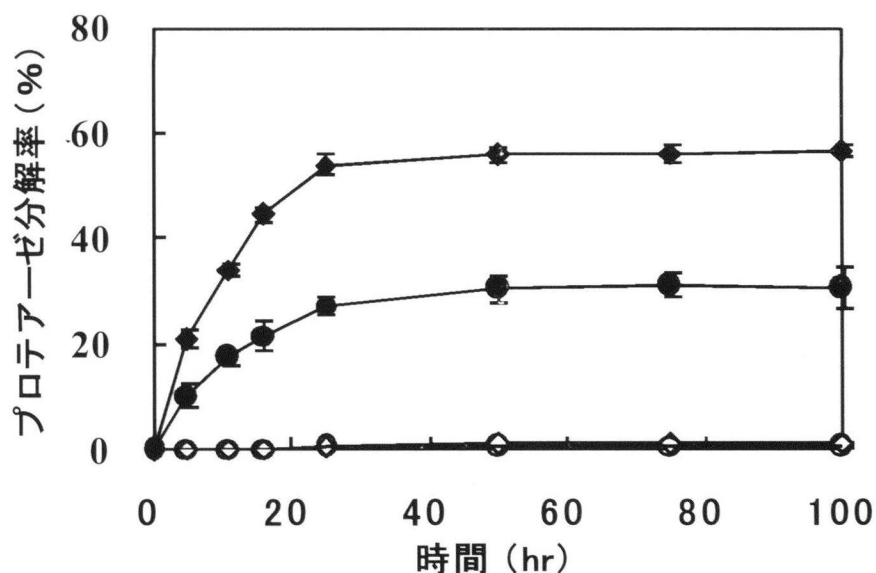


図 2-5 ケラチンフィルムの分解プロファイル

Mf フィルム(◆), Ma フィルム(●), Mf フィルムの
コントロール(◇), Ma フィルムのコントロール(○).
n = 3, 平均値 ± 標準偏差

ケラチン繊維の代表的な分解プロファイルを図 2-6 に示した。対象として用いた未処理毛は最初の 5 時間までの分解速度が速く、この時点での分解率は約 4.5%を示したものの、20 時間以降ではわずかな分解しか観察されなかった。他方、ケラチン繊維の分解率は未処理毛よりも非常に大きな値を示した。最初の 10 時間の分解が著しく急速で、その後緩やかになり、50 時間以降はわずかな分解しか観察されなかった。また、未処理毛の最大分解に要する 20 時間と比較すると、ケラチン繊維の最大分解に要する時間は 50 時間と延長していることが分かった。さらに、コントロールでの分解率はケラチンフィルムと同様にほぼゼロに近かった。プロテアーゼ処理時間は、分解が完全に停止していることと、操作上区切りがよいことから 96 時間に決定した。

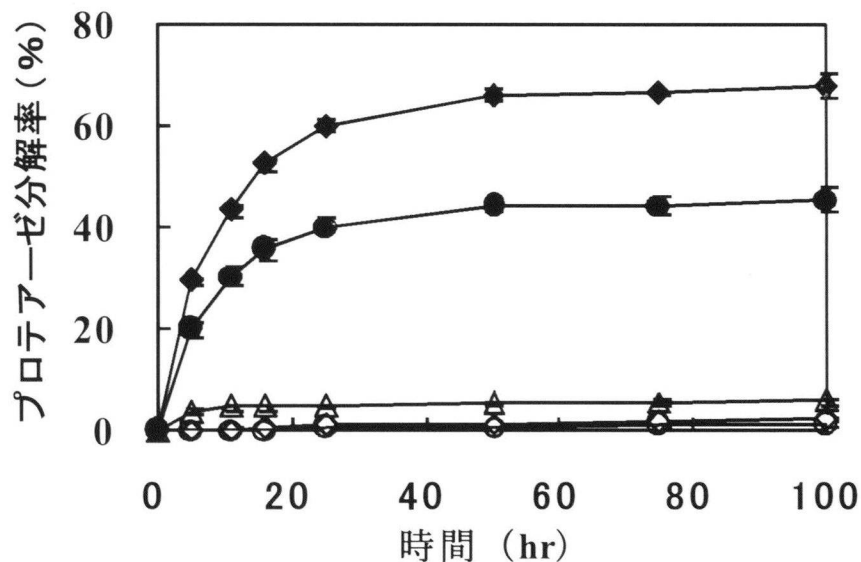


図2-6 ケラチン繊維の分解プロファイル

Mfリッチ繊維 (◆), Maリッチ繊維 (●), Mfリッチ繊維のコントロール (◇), Maフィルムのコントロール (○), n = 3, 平均値 ± 標準偏差

3-3. プロテアーゼ分解の要因

モデルケラチンの特性を表 2-4 に示した。類似した組成を持つケラチン同士を比較したところ、Mf フィルムは Mf リッチ繊維よりも分解性が低く、Ma フィルムも Ma リッチ繊維より分解性が低かった。これはケラチンフィルムがケラチン繊維より分解性が低いことを示している。ケラチンフィルムは、ケラチンモノマーが密に詰まっているポリマーと考えられる。従ってケラチン繊維よりも膨潤しにくくなり、プロテアーゼの作用が抑制されたと思われる。

他方、同じケラチンの形状で比較したところ、Mf リッチ繊維は Ma リッチ繊維よりも分解率が高く、Mf フィルムも Ma フィルムより分解率が高かった。これは Mf タンパク質が Ma タンパク質よりも分解性が高いことを示している。

表 2-4 モデルケラチンの特性

	分解率 (%)	シスチン量 (%)	水分保持率 (%)
M f リッチ繊維	67.8 ± 2.8	12.9 ± 0.8	71.6 ± 2.6
M f フィルム	56.7 ± 1.4	12.1 ± 0.4	58.8 ± 2.2
M a リッチ繊維	45.9 ± 2.6	15.4 ± 0.8	56.3 ± 2.8
M a フィルム	30.6 ± 4.3	28.5 ± 1.4	38.3 ± 1.5
未処理毛	5.9 ± 0.5	15.6 ± 0.7	16.8 ± 1.2

Kohara らの還元ケラチンの特性を調べた研究によると、ケラチン中のシスチン量や膨潤特性がプロテアーゼ分解に対して重要な要因になっていると考えられる (67)。そこで先ず、モデルケラチンのシスチン量と分解率との関係を調べた。図 2-7 に示したように、4 種のケラチンのシスチン量と分解率との間には直線の相関関係が認められたが、未処理毛のみはこの相関関係からは外れて分解率が著しく低かった。しかし、変性した毛髪（本章 3-1 のタンパク質抽出量 1.0% の Mf リッチ繊維）ではこの相関関係に一致した。従って、未処理毛のプロテアーゼ分解率が低かった原因は、タンパク質が変性していなかったためと考えられる。

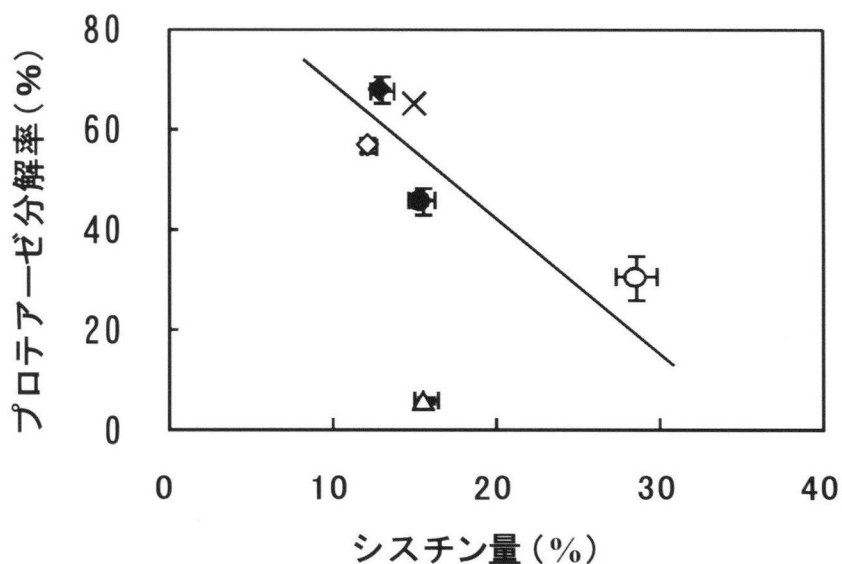


図 2-7 プロテアーゼ分解率とシスチン量の関係
 変性毛以外は $n = 3$ ， 平均値 \pm 標準偏差
 ◆：Mf リッチ繊維， ◇：Mf フィルム
 ●：Ma リッチ繊維， ○：Ma フィルム
 △：未処理毛， ×：変性毛

図2-8にモデルケラチンの水分保持率と分解率との関係を示した。モデルケラチンの水分保持率と分解率との間には高い相関関係があることが分かった。変性したタンパク質は水溶液中ではときほぐれた状態で存在することはよく知られている(75)。この事実から類推すると、ケラチンの膨潤性が増すことでケラチン内のプロテアーゼ量も増し、分解が促進すると考えられる。本研究でも、Mfタンパク質はMaタンパク質に比べて水分保持率が高いことから、プロテアーゼ分解性も高かったと推測される。

これらの知見より、プロテアーゼ分解率はケラチンが変性している場合はシスチン量に相関することが分かった。また、ケラチンの変性とは関係なく、プロテアーゼ分解率は水分保持率に相関することが分かった。

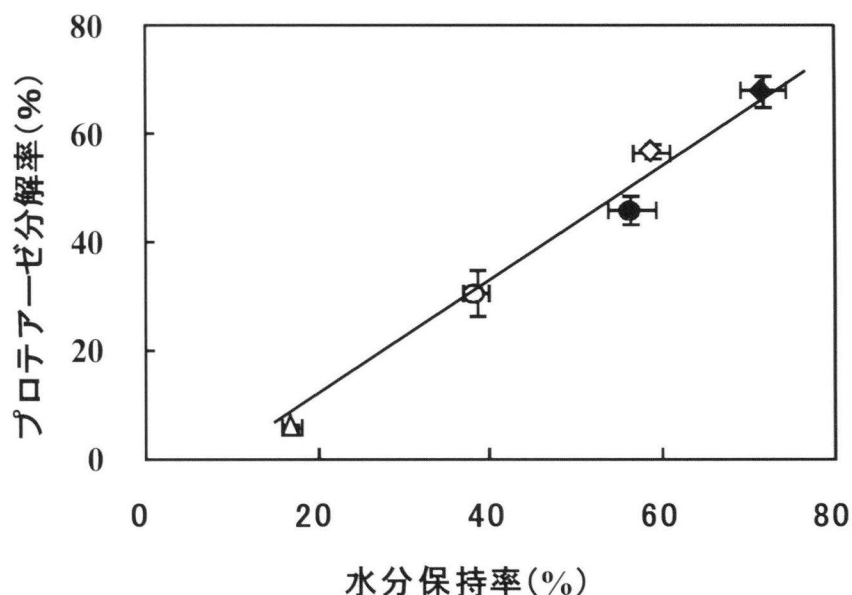


図2-8 プロテアーゼ分解率と水分保持率の関係

n = 3, 平均値 ± 標準偏差

- ◆ : Mfリッチ繊維, ◇ : Mfフィルム
- : Maリッチ繊維, ○ : Maフィルム
- △ : 未処理毛

3-4. プロテアーゼ分解部の解析

プロテアーゼにより分解されたケラチン繊維中のタンパク質を調べる目的で、プロテアーゼ処理後の可溶部を加水分解後にアミノ酸分析で調べた。本実験のアミノ酸組成は文献との比較で行った。表 2-5 に示したように、Ma リッチ繊維および Mf リッチ繊維のプロテアーゼ可溶部はいずれも α -ヘリックス形成能の高いグルタミン酸、アラニン、ロイシンが Ma タンパク質に比べて多かった。また、いずれもハーフシスチンが少ないことから Mf タンパク質に類似していることが分かった。

双方の繊維でアミノ酸組成に若干の違いがあったことは、これら 2 つの繊維が部分抽出されたために組成が単純ではないことが原因と考えられた。しかし、いずれの繊維の分解部も Mf タンパク質のアミノ酸組成に類似していることから、プロテアーゼは毛髪 of Mf タンパク質を主に分解していると考えられた。

表 2-5 ケラチン繊維の分解部および毛髪成分のアミノ酸組成^{a)}

	プロテアーゼ処理後の可溶部 ^{b)}		毛髪の成分 (70)	
	Ma リッチ繊維	Mf リッチ繊維	Mf	Ma
Asx	6.8	8.2	9.3	2.5
Thr	8.0	7.2	5.4	10.3
Ser	10.4	10.5	8.9	11.9
Glx	11.7	13.1	16.5	8.4
Pro	7.3	6.7	3.8	12.7
Gly	6.6	6.6	5.1	6.1
Ala	6.4	5.5	6.9	2.3
Cys	12.4	10.9	7.6	27.2
Val	6.2	6.4	6.1	5.2
Met	1.1	0.7	0.4	0.0
Ile	2.0	3.3	3.6	1.8
Leu	6.5	6.4	10.2	2.2
Tyr	2.5	1.9	2.5	1.5
Phe	1.9	2.1	1.9	1.1
Lys	3.2	3.1	3.5	0.6
His	1.2	1.2	0.7	0.9
<u>Arg</u>	5.8	6.2	7.1	5.4

a) 100残基あたりの残基であらわした。

b) プロテアーゼ処理後の溶液部分を加水分解した。

次いで、プロテアーゼが分解しているタンパク質をSEMによる観察で調べた。ケラチン繊維のプロテアーゼ処理前および処理後の代表的な表面形態を図2-8に示した。

プロテアーゼ処理前の Ma リッチ繊維 (a) および Mf リッチ繊維 (b) は双方ともタンパク質の抽出により収縮して毛髪表面に溝が観察された。一方、プロテアーゼ処理後の Ma リッチ繊維 (c) および Mf リッチ繊維 (d) は双方とも非常に収縮しており Mf が分解されたと考えられる外観を呈していた。

繊維 (c) は著しく収縮して縦方向の規則的なシワが多数観察されたが、毛髪繊維の形状は維持していた。これは繊維 (a) に残存していた Mf タンパク質が分解したために、繊維 (c) になったと考えられる。従って、繊維 (c) は Ma タンパク質が多量に残存している状態と考えられる。

他方、繊維 (d) は不定形な外観であり、毛髪繊維の形状は維持していなかった。これは繊維 (b) の主成分である Mf タンパク質が分解されたため繊維 (d) の外観になったと考えられる。換言すれば、繊維 (d) は毛髪の主要な 2 成分 (Ma および Mf) がなくなった状態と考えられる。

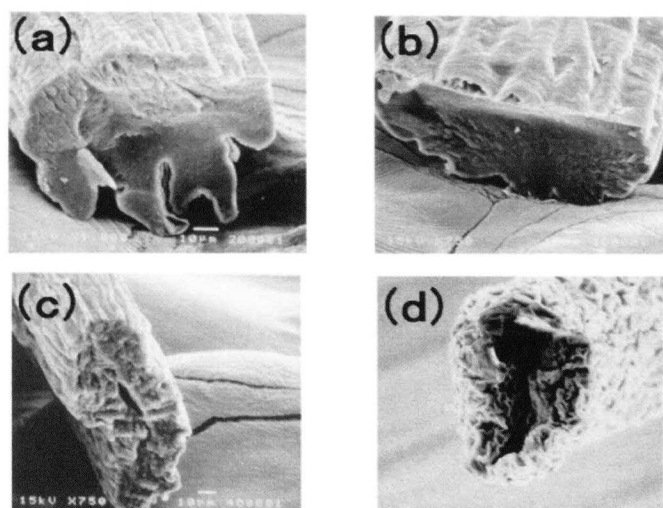


図 2-8 Proteinase K 処理前後のケラチン繊維の表面形態

- (a) Ma リッチ繊維の処理前, (b) Mf リッチ繊維の処理前
(c) Ma リッチ繊維の処理後, (d) Mf リッチ繊維の処理後

第4節 まとめ

高シスチン含有量の Ma あるいは低シスチン含有量の Mf を毛髪より抽出した。溶液部より 2 種類のケラチンフィルム：Ma フィルムおよび Mf フィルム、抽出残渣より 2 種類のケラチン繊維：Ma リッチ繊維および Mf リッチ繊維の合計 4 種類のモデルケラチンを調製した。4 種類のモデルケラチンはタンパク質の変性により高次構造は維持していないと考えられたが、シスチンの大部分が再形成されていることが分かった。また、Ma フィルムおよび Mf フィルムのアミノ酸組成は以前報告されている Ma と Mf に良く一致していた。さらに、Ma リッチ繊維および Mf リッチ繊維もそれぞれ Ma と Mf が豊富であることが分かった。従って、4 種のモデルケラチンの一次構造は維持されていると考えられた。

2 種類のケラチン繊維を用いてプロテアーゼ類による分解性を比較したところ、Proteinase K が最も高い分解性を示し、Pronase E および Subtilisin の分解性も高かった。ここで、Proteinase K を用いて 4 種類のモデルケラチンのプロテアーゼ分解性をシスチン含有量との関係で調べたところ、シスチン含有量が低いと分解率が高く相関関係が認められた。未処理毛ではこの相関関係から外れて分解率が著しく低かったものの、還元剤で変性した毛髪の分解率はこの相関関係に一致した。この結果、プロテアーゼ分解率は、ケラチンが変性している場合はシスチン含有量に相関していることがわかった。

Proteinase K を用いて 4 種類のモデルケラチンのプロテアーゼ分解率を水分保持率との関係で調べたところ、ケラチンの変性に関係なく高い相関関係があることが分かった。従って、水分保持率はプロテアーゼ分解性に密接に関係する要因と考えられた。

さらに、SEM による観察からはマイクロフィブリルが主に分解されていることが示された。これらの知見から、マイクロフィブリルの変性した部分がプロテアーゼにより分解されていることが明らかとなった。

第3章 毛髪のプロテアーゼ分解性の特徴とその要因

第1節 序

現在、毛髪の損傷評価には主に2つの手法が汎用されている。第一に、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いた毛髪表面の形態観察が定性分析として用いられている（2, 76）。第二に、引っ張り試験機による破断強度の測定が定量分析として用いられている（3, 77）。しかし、前者は優位差が出にくいこと、後者は操作が煩雑で測定誤差が大きいことが欠点である。

これらの課題を解決するために、本章では毛髪の損傷評価にプロテアーゼを用いた。以前から化学処理された羊毛や毛髪のプロテアーゼ分解性が高いことは知られていた（7, 78）。しかし、毛髪の損傷と分解性が関係しているというデータに基づいていないことから、この方法が広く普及するには至っていない。そこで本章では先ず毛髪の損傷とプロテアーゼ分解性の関係を定性および定量的な観点から調べた。定量分析としてはプロテアーゼ処理前後の重量変化率により、定性分析としてはプロテアーゼ処理後の毛髪のSEM観察による検討を行った。また、毛髪の損傷部位の解析を直接的および間接的な手法を用いて行った。直接法としてはプロテアーゼ処理前後の機器分析による構造解析を行い、間接法としてはプロテアーゼ分解部のアミノ酸組成の解析を行った。なお、プロテアーゼは前章で高い分解性を示した Proteinase K および Pronase E を用いた。

第2節 実験方法

2-1. 試薬

還元剤として 50%チオグリコール酸アンモニウム液 (TG)、DL-システイン (CYS)、酸化剤として臭素酸ナトリウム、35%過酸化水素、色素前駆体として p-フェニレンジアミン (PPD) およびその他の亜硫酸ナトリウム、28%アンモニア水は市販の化粧品グレードを用いた。重水 (D_2O) は試薬特級を精製せずにそのまま用いた。その他の試薬等は第2章と同様のものを用いた。

2-2. 試料毛髪および化学処理毛の調製

化学処理の履歴がない 20 代日本人女性の毛髪 (平均直径 0.073mm) を 1.0% SDS 水溶液中、25°C で 10 分間洗浄、30 分間水洗した後に自然乾燥させて用いた。前章で用いた脱脂毛は、毛髪重量の数%の脂質を抽出しているが、ここで用いた SDS 洗浄毛は、毛髪表面の脂質のみを除去しており、日常行うシャンプー洗浄後の毛髪に近い状態である。

パーマ処理は 0.50M の TG 水溶液あるいは CYS 水溶液 (いずれもアンモニアで pH=8.6 に調整) に毛髪約 1.0 g を 10 倍量の浴比 (毛髪に対する液の重量比) で 15 分浸漬し、速やかに 0.40M の臭素酸ナトリウム水溶液に 10 倍量の浴比で 15 分間浸漬し、30 分間水洗した後に自然乾燥させた。損傷毛のサンプルを調製する場合は同じ操作を繰り返した。パーマの処理は Proteinase K 処理に使用する毛髪は 25°C、Pronase E 処理に使用する毛髪は、実際の頭毛の温度を想定して 30°C で処理を行った。

ヘアダイ処理は 2.5% アンモニア水溶液 (PPD を 0.15%、亜硫酸ナトリウムを 0.3% 含有) および 6.0% 過酸化水素水溶液の 1 : 2 混合溶液 (v/v) を用いた。この混合溶液を調製した後、速やかに毛髪約 1.0 g を 10 倍量の浴比で 37°C、30 分間浸漬し、30 分間水洗した後に自然乾燥させた。ヘアダイ処理を繰り返す場合は同じ操作を繰り返した。

ブリーチ処理は 3.0% 過酸化水素水溶液 (アンモニア 1.0% 含有) に毛髪約

1.0 g を 10 倍量の浴比で 37℃、30 分間浸漬し、30 分間水洗した後に自然乾燥させた。ブリーチ処理を繰り返す場合は同じ操作を繰り返した。

2-3. 毛髪のプロテアーゼ処理

毛髪試料は 0.1~10.0 cm の長さに切り、2.0 cm の長さを主に用いた。また、0.1 cm の毛髪は一部を乳鉢ですりつぶして粉末にして用いた。代表的プロテアーゼ処理は、毛髪試料の約 100mg をエッペンドルフチューブあるいはスクリューキャップ付きガラス容器に入れ、ここに 20mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH=8.0) で 0.05wt% に調整した Proteinase K 溶液あるいは Pronase E 溶液を 2ml 入れた後、37℃ で 96 時間振とうなしでインキュベートした。処理終了後、12,000×g で 5 分間の遠心分離後に上澄み液を回収してアミノ酸分析試料とした。残渣は水洗し、12,000×g で 5 分間の遠心分離後に上澄み液を捨てた。この操作をさらに 3 回繰り返した。残渣は乾燥させた後に重量を測定し、次式により分解率を求めた。

$$Wp (\%) = [(A - B) / A] \times 100$$

ここで、 Wp は分解率、 A と B はそれぞれプロテアーゼ処理前およびプロテアーゼ処理後の毛髪重量。なお、測定は 3 回行い平均値を示した。

2-4. 破断強度の測定

毛髪はあらかじめマイクロメーターにより長径と短径を測定して断面積を算出した。この毛髪を用いて、島津製作所製 AGS-5A 型オートグラフにより破断重量を測定した。得られた破断重量から単位面積あたりの破断強度を算出した。なお、測定は 10 回行った。

2-5. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

第 2 章と同様に行った。

2-6. アミノ酸分析

加水分解は第2章と同様に行った。加水分解後の反応液はメンブレンフィルターでろ過後、エバポレーターにより45℃で塩酸と水を除去し乾燥試料を得た。この乾燥試料を0.02 MのHClに溶解後、日立製L-8500 AminoAcidAnalyzerを用いニンヒドリン法による測定を行った。なお、シスチン量は、過ギ酸によるシステイン酸への転化を行った後に定量した(56)。

2-7. 赤外吸収(IR)スペクトルの測定

密閉容器に乾燥毛髪とD₂Oを接触させないように入れ、35℃で100分放置して飽和D₂O蒸気で吸湿させた(79)。この毛髪を日本分光製FT/IR-410を用いて赤外吸収スペクトルの測定を行った。測定はKRS-5プリズムを用いたATR法により積算回数300回で行った。

2-8. 示差走査熱量測定(DSC)

毛髪を電気ヒゲそりで細かく切断し、その切断毛の約100mgを試料とした。この試料をSII製DSC6200型示差走査熱量計によりT_D(吸熱ピーク温度)を測定した。試料はステンレスパンに入れ、毛髪に対して10倍量の水で湿潤させた後、密閉状態で昇温速度10℃/min、温度範囲は室温～200℃で測定を行った。

第3節 実験結果と考察

3-1. プロテアーゼ分解条件の検討

プロテアーゼ分解率に及ぼす毛髪の長さの影響を Proteinase K を用いて調べた。図 3-1 に毛髪の長さを変化させた時のプロテアーゼ分解率の最大値 (37℃、96 時間) を示した。未処理毛に比べてパーマ毛では分解率が約 3 倍程度高かったが、双方の毛髪とも長さ (0.1~10 cm) および粉末化に関係なく分解率は一定であった。

ここで、毛髪の長さが 10 cm のときには毛髪の直径 : 長さの比が 1 : 1370 (断面積 : 側面積比では約 1 : 550) となり無限長の円筒に近似できる。このため毛髪の長さが 10 cm 以上のときには毛髪切断面からのプロテアーゼの浸透を無視できる。従って、図 3-1 の結果はプロテアーゼが毛髪側面から浸透するために、毛髪の長さに関係なく分解率が一定であったと推定される。この知見は羊毛の側面からプロテアーゼが浸透することを確認している Nolte らの研究 (80) からも支持される。

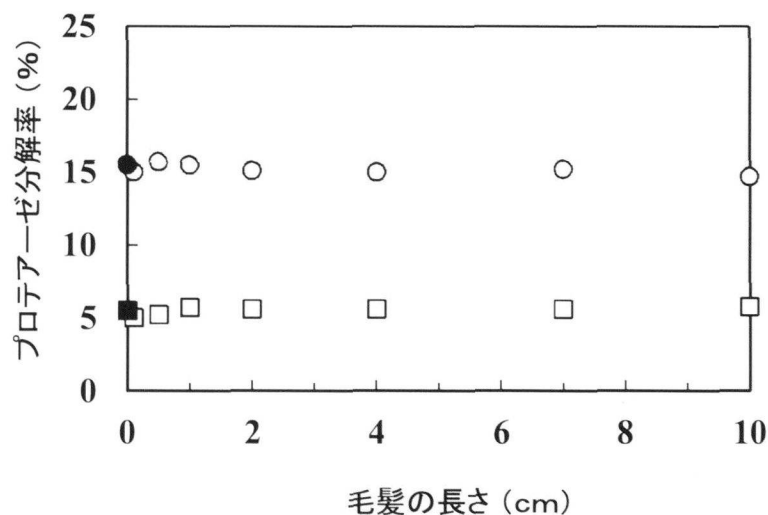


図 3-1 毛髪の長さとおプロテアーゼ分解率との関係

Proteinase K を使用

○ : パーマ毛 (6 回処理), ● : 粉末化パーマ毛
□ : 未処理毛, ■ : 粉末化未処理毛

次いで、プロテアーゼ処理時間を決定するために、プロテアーゼ処理時間と分解率との関係を調べた。毛髪の長さは、操作的に扱いやすい2 cmに固定した。Proteinase Kを用いた場合の代表的な分解プロファイルを図3-2に示した。未処理毛は処理5時間で分解率が約4.5%に達するが、その後は分解率の上昇はわずかで、処理20時間以降では分解が進行しなかった。未処理毛のプロテアーゼ処理ではキューティクル成分や細胞膜複合体（CMC）が分解されることが知られている(81~83)。従って、本研究でも毛髪表面の特定の組織やCMC成分が分解されていると推測された。

一方、パーマ6回処理毛は処理5時間までは未処理毛と同様に分解が速やかであったが、処理5時間以降は分解が緩やかになり、処理70時間以降は分解率がほぼ一定になった。プロテアーゼはCMCを通りキューティクルから毛髪内部のコルテックスに浸透するが、分子量が大きいため50時間程度かかることが知られている(80)。従って、図3-2の分解プロファイルは速やかに分解される毛髪の表面組織とより緩やかに分解される毛髪の内側組織があることを示唆している。

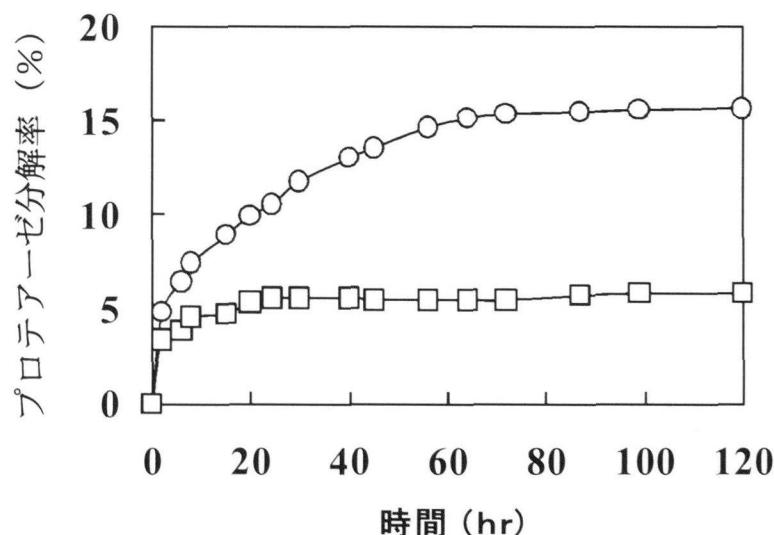


図3-2 Pronteinase Kによる毛髪の分解プロファイル
○：パーマ毛（6回）、 □：未処理毛

次いで、Pronase E を用いた場合の代表的な分解プロファイルを図 3-3 に示した。前述の Proteinase K の分解と同様に、未処理毛は処理 5 時間までの分解が速く、処理 20 時間以降では分解率の上昇はわずかであった。パーマ 5 回処理毛およびヘアダイ 5 回処理毛は処理 5 時間までは分解が速やかで、処理 5 時間以降は分解が緩やかになり、処理 80 時間以降は分解率がほぼ一定になった。パーマ毛とヘアダイ毛を比較した場合、処理 5 時間前後の挙動が異なっていた。パーマ毛では処理 5 時間の分解率は約 10% で、それ以後の最大分解率は 22% であった。他方、ヘアダイ毛では処理 5 時間の分解率は約 12% で、その後の最大分解率は 15% であった。このことから、パーマ毛では毛髪内部の分解部分が多く、ヘアダイ毛では毛髪内部の分解部分が少ないと推測される。

また、図 3-2 における Proteinase K 処理のパーマ毛と図 3-3 における Pronase E 処理のパーマ毛を比較したところ、前者では分解率の最大値は約 15% であるのに対し、後者では約 22% であった。これは、Proteinase K 処理に用いたパーマ毛の処理温度が 25℃ であるのに対して、Pronase E 処理に用いたパーマ毛の処理温度が 35℃ であったためと考えられる。プロテアーゼ処理時間は分解が完全に停止しており、操作上区切りがよいことから 96 時間に決定した。

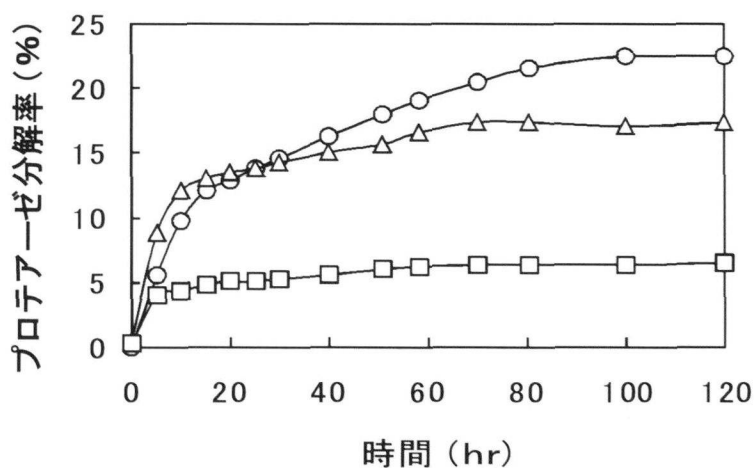


図 3-3 Pronase E による毛髪の分解プロファイル

○：パーマ毛 (5 回)，△：ヘアダイ毛 (5 回)，□：未処理毛

3-2. 毛髪の損傷とプロテアーゼ分解性

まず、毛髪の損傷評価に汎用される破断強度とプロテアーゼ分解率（Pronase Eを使用）との関係を比較した。破断強度は毛髪全体の性質と考えられ、プロテアーゼ分解率は毛髪タンパク質の変性に関係すると考えられる。異なる損傷度のヘアダイ毛を用いた場合、破断強度とプロテアーゼ分解率の間には高い相関関係が認められた（図 3-4）。破断強度の測定はばらつきが大きいために、測定は通常 25 回以上行うことが多いが、本実験の破断強度測定は 10 回で行った。一方、プロテアーゼ分解率の測定回数は 3 回で行った。図 3-4 から明らかなように、破断強度では標準偏差が大きかったが、プロテアーゼ分解率では標準偏差は非常に小さいことが分かった。

また、破断強度は 1 本ごとの繊維を測定するために 50 検体分の測定を毎回行う必要がある。また、操作も煩雑であるためにルーチン分析の妨げになっている。一方、プロテアーゼ分解率測定は特別な装置も必要とせず、15 検体分の測定が同時にできる利点がある。従って、プロテアーゼ分解率は、破断強度の代替法として非常に有効であると考えられる。

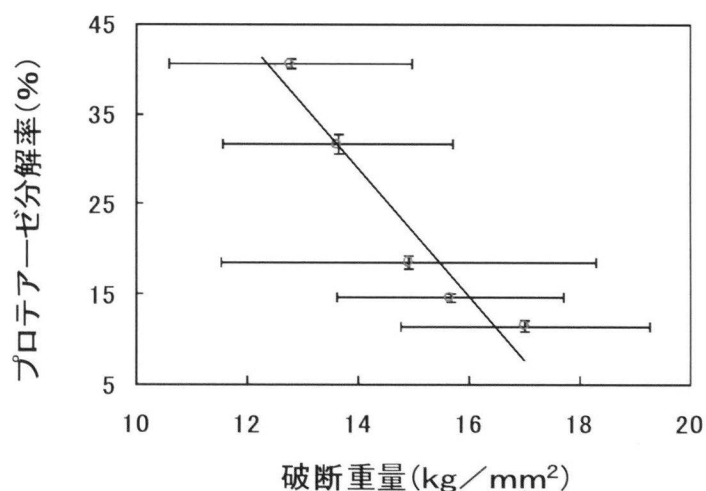


図 3-4 異なるヘアダイ毛における分解率と破断重量

Pronase E を使用，プロテアーゼ分解率（ $n = 3$, 平均値 ± 標準偏差），破断重量（ $n = 10$, 平均値 ± 標準偏差）

パーマやヘアダイ処理では毛髪の脂質が溶出することが知られている。この脂質のプロテアーゼ分解に及ぼす影響を調べた。まず、脱脂毛および未脱脂毛を用いて損傷度の異なるパーマ毛を調製した。定量分析としてこれら毛髪のプロteinase K によるプロテアーゼ分解率を比較した。図 3-5 に示したように、パーマ処理をしない毛髪の場合、プロテアーゼ分解率は脱脂毛よりも未脱脂毛が低かった。しかし、パーマ処理回数の増加に伴って脱脂毛と未脱脂毛のプロテアーゼ分解率はほぼ同じになることが分かった。これは、未脱脂毛では脂質の影響でプロテアーゼの浸透あるいはプロテアーゼの作用が抑制され、分解率が低くなったためと推定される。しかし、パーマ処理回数の増加に伴って脂質が溶出するために、脱脂による影響がなくなり、双方の毛髪のプロテアーゼ分解率がほぼ等しくなったと考えられる。

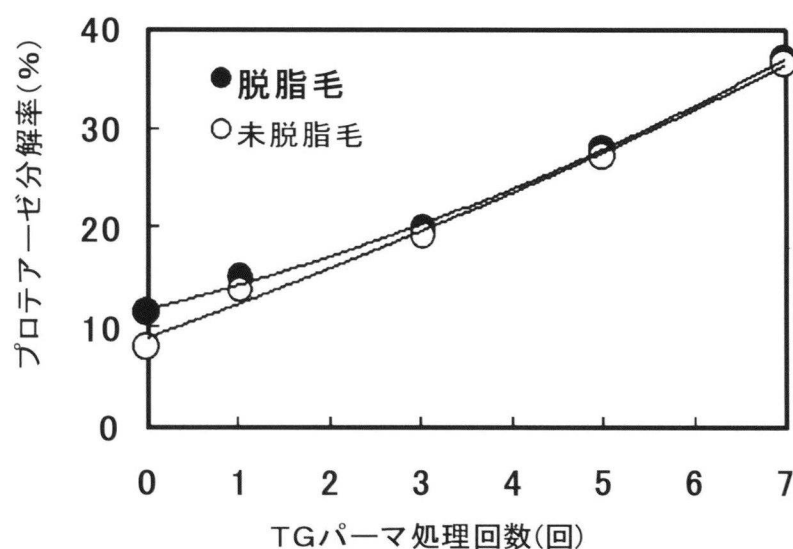


図 3-5 毛髪の脱脂の有無とプロテアーゼ分解率
Proteinase K を使用, n = 3, 平均値

次いで、定量分析として種々の化学処理毛の Pronase E によるプロテアーゼ分解率を比較した。図 3-6 に示したように、いずれの化学処理でも処理回数の増加とともにプロテアーゼ分解率は一次関数的に促進した。従って、毛髪の損傷とプロテアーゼ分解率の間には高い相関関係があることが分かった。吉村らはプロテアーゼ分解率の上昇が毛髪のタンパク質が変性を受けることが要因であると報告している (84)。化学処理でも毛髪のタンパク質が変性することから、本実験のプロテアーゼ分解率の上昇もタンパク質の変性が関わっているものと推測される。

さらに注目すべき点は、TG 処理パーマ毛が CYS 処理パーマ毛に比べて分解率の上昇が顕著であった点である。柄沢らは、 α -ヘリックス構造の減少 (変性) が CYS パーマにおいては低く、TG パーマにおいては高くなることを示している (85)。この知見から類推すると、TG パーマ毛ではタンパク質の変性が高いためプロテアーゼ分解率も高かったと推測される。

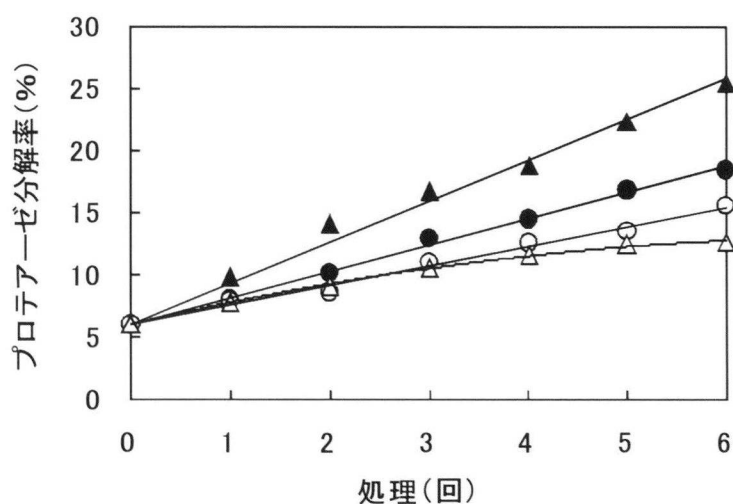


図 3-6 化学処理の回数とプロテアーゼ分解率との関係
Pronase E を使用
▲ : TG パーマ処理, ● : ヘアダイ処理,
○ : ブリーチ処理, △ : CYS パーマ処理

次いで、定性分析として Proteinase K 処理前後の代表的な毛髪表面形態を 図 3-7 に示した。未処理毛 (VB) および、パーマ 2 回処理毛 (P2B) ではキューティクルの表面は滑らかであった。一方、パーマ 6 回処理毛 (P6B) では、キューティクルの先端部分が若干浮き上がる傾向が観察されたが、未処理毛 (VB) と比較するとわずかな表面形態の差であった。

Proteinase K 処理後の未処理毛 (VA) の側面はキューティクルの浮き上がりが観察され、断面は若干分解された外観を呈していた。これはキューティクル同士の接着性に関与するタンパク質あるいは CMC が分解されたためと考えられる。パーマ 2 回処理毛 (P2A) ではキューティクルが顕著に剥離しており、断面はヒダ様のものが観察された。未処理毛 (VA) に比べると、分解の促進は毛髪表面だけではなく毛髪内部にまで進行していると考えられる。パーマ 6 回処理毛 (P6A) ではキューティクルの完全分解により、コルテックス細胞の露出が観察された。また、コルテックス成分が溶出したようなポーラスな断面、毛髪中心部分のメデュラの空洞化が観察されたことから、プロテアーゼによる分解が毛髪全体に進行していることが分かった。

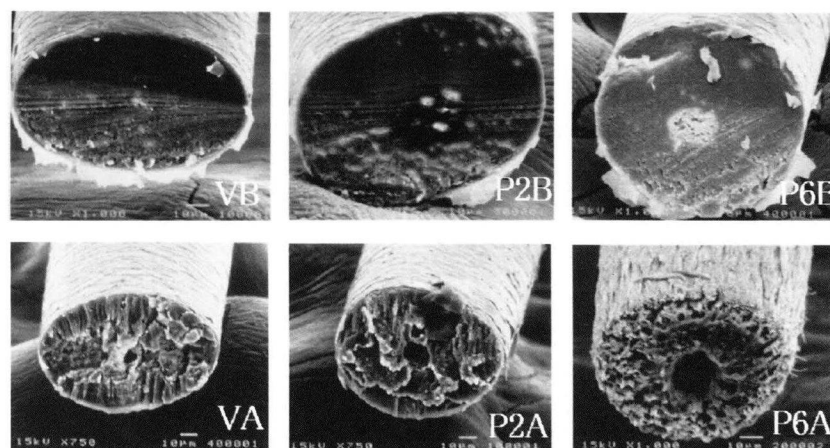


図 3-7 Proteinase K 処理前後の毛髪表面形態

VB：未処理毛の処理前 VA：未処理毛の処理後
P2B：パーマ 2 回毛の処理前 P2A：パーマ 2 回毛の処理後
P6B：パーマ 6 回毛の処理前 P6A：パーマ 6 回毛の処理後

次いで、定性分析として Pronase E 処理前後の代表的な毛髪表面形態を図 3-8 に示した。未処理毛 (VB) はキューティクルの先端部分が明瞭で、下層のキューティクルに接着しており、表面は滑らかであった。一方、パーマ 5 回処理毛 (P5B) では全体的にキューティクルの先端部分が白っぽく見えることから、わずかに浮き上がる傾向にあったが、未処理毛 (VB) と比較すると表面形態の差はわずかであった。

Pronase E 処理後の未処理毛 (VA) はキューティクルの浮き上がりが観察されたことから、キューティクルの接着性に関与する部分の分解が示唆された。Pronase E 処理後のパーマ 5 回処理毛 (P5A) はキューティクルの部分分解により、コルテックス細胞の縦方向のシワが観察され、明らかに未処理毛 (VA) よりも分解が促進していた。ここで、キューティクル層は毛髪全体の 10~15% を占めているといわれているが (86)、パーマ 5 回処理毛 (P5A) の分解率は約 22% であることから、キューティクルの内側に存在するコルテックス領域も分解されていると考えられる。

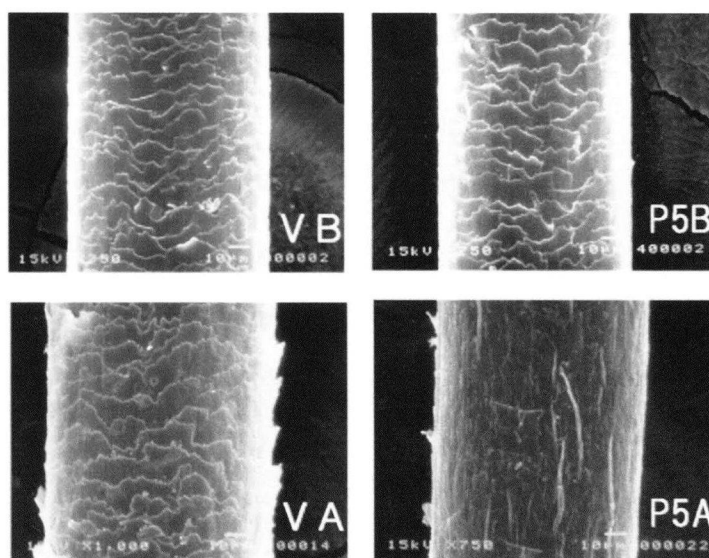


図 3-8 Pronase E 処理前後の毛髪表面形態

VB：未処理毛の酵素処理前

VA：未処理毛の酵素処理後

P5B：パーマ 2 回毛の酵素処理前

P5A：パーマ 2 回毛の酵素処理後

このように、未処理毛と実験的に調製したパーマ毛の表面形態は若干の差が認められる程度であったが、プロテアーゼ処理をすることにより、化学処理毛の分解が著しく促進した。以上の知見から、毛髪 of 化学処理により引き起こされる損傷は、プロテアーゼ処理を併用することで明瞭に識別できることが分かった。また、毛髪 of 損傷の増加に伴ってプロテアーゼによる分解が毛髪表面から毛髪内部に徐々に進行することが分かった。

3-3. プロテアーゼ分解部の解析

Proteinase K 処理後の可溶部と毛髪成分のアミノ酸組成を比較した。表 3-1 に示したように、未処理毛のプロテアーゼ処理後の可溶部の特徴は、シスチンとシステイン酸の合計が 4.7% とメチオニン以外の含硫アミノ酸量が非常に低くかった。また、毛髪 of 成分のアミノ酸組成と比較するとエンドキューティクル A に類似していた (81)。エンドキューティクル A はキューティクル of 構成成分で、他のプロテアーゼを用いた研究でも分解されやすいことが知られており (82)、SS 結合 of 架橋密度が低いためにプロテアーゼ of 作用を受けやすくなり分解したと推測される。

パーマ 2 回処理毛 of プロテアーゼ処理後の可溶部はセリン、グリシン、アラニンなど of 中性アミノ酸とシスチン of 量 of 比較から、エンドキューティクル A とマイクロフィブリル (Mf) of 中間的な組成であった。

パーマ 6 回処理毛 of プロテアーゼ処理後の可溶部もハーフシスチンとシステイン酸 of 合計が 11.7% とメチオニン以外の含硫アミノ酸量が低くかった。また、 α -ヘリックス形成能 of 高いグルタミン酸やロイシンが多く、非ヘリックス性 of スレオニン、プロリンが少ないことから、Mf に類似していた。

以上の結果は、毛髪 of 損傷度に関係なく、プロテアーゼが SS 結合 of 少ない組織を分解していることを示している。また、毛髪 of 損傷度が増すに従って、プロテアーゼが毛髪 of 表面組織から毛髪 of 内部組織を分解していることを示しており、前述 of 分解プロファイルや SEM による表面形態 of 観察とも一致す

る。さらに、ヘアダイ5回処理毛の Pronase E 処理後の可溶部も Mf に一致していることが明らかになった (81)。

表 3-1 毛髪のプロテアーゼ可溶部および毛髪成分のアミノ酸組成^{a)}

	プロテアーゼ処理後の可溶部				毛髪の成分		
	未処理 毛	パーマ毛 (2回)	パーマ毛 (6回)	ヘアダイ 毛 (5回)	インドキョーテ イクル A(81)	Mf (88)	Ma (88)
Asx	9.1	8.8	6.3	9.2	9.5	8.0	4.8
Thr	7.0	7.6	7.8	8.1	5.5	7.8	9.0
Ser	8.8	10.8	12.1	10.3	8.4	10.3	11.1
Glx	11.8	10.6	11.4	12.1	13.4	13.4	8.4
Pro	5.5	5.8	7.4	5.8	6.0	6.8	8.0
Gly	8.8	8.4	6.6	8.5	8.0	5.3	5.7
Ala	8.4	7.5	5.6	2.4	8.1	4.9	2.4
Cys + CA^{b)}	4.7	4.7	11.7	7.8	1.8	11.6	28.6
Val	7.2	6.8	6.0	7.9	7.0	6.0	5.3
Met	1.5	1.4	1.0	0.3	2.3	1.2	0.9
Ile	3.7	4.0	2.9	3.9	4.2	3.7	2.0
Leu	8.7	8.2	7.1	7.8	9.1	6.8	3.7
Tyr	3.3	3.8	2.5	3.3	3.3	1.1	0.3
Phe	2.7	2.6	2.1	2.9	3.1	2.3	1.9
Lys	3.0	2.9	2.6	3.8	4.3	3.0	1.0
His	1.2	0.3	1.0	1.1	1.1	1.2	1.2
Arg	4.6	5.8	5.9	4.8	4.9	6.6	5.7

a) 100 残基あたりの残基であらわした。 b) システイン酸

Proteinase K はエンドペプチターゼ、Pronase E はエキソペプチターゼおよびエンドペプチターゼを含む。しかし、分解部のアミノ酸組成、前述の分解プロファイルおよび SEM 観察を比較する限りにおいては毛髪に対する作用は同じと考えられた。

3-4. 毛髪の構造解析

前述のプロテアーゼによる分解が毛髪表面から毛髪内部に徐々に進行した要因を IR スペクトルにより調べた。この目的で、損傷度の異なるパーマ毛の IR スペクトルを測定した。本実験に用いた ATR 法は毛髪の表面分析であるが、毛髪の表面に近いコルテックス部の情報も反映される (89)。従って、図 3-9 に示した 1519 cm^{-1} と 1538 cm^{-1} の吸収はそれぞれ α -ヘリックスとランダムコイルに帰属される (76, 90)。この 2 つのピークに着目すると、パーマ処理回数が増すに従って α -ヘリックスに起因する 1519 cm^{-1} のピーク強度が弱くなり、 α -ヘリックス構造の崩壊したランダムコイルに起因する 1538 cm^{-1} のピーク強度が強くなっていることが確認された。

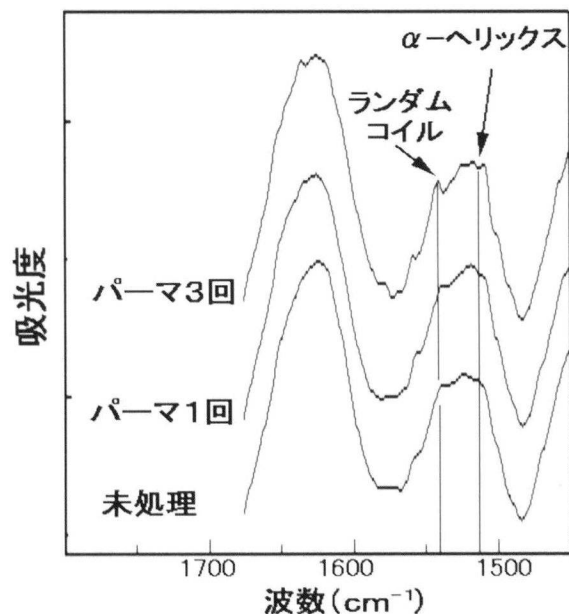


図 3-9 パーマ処理回数と IR スペクトルの変化

Nishikawa からもパーマ処理において Mf 中の α -ヘリックスがランダムコイルにわずかに変化することを報告している (46)。従って、図 3-9 の結果は、パーマ処理回数の増加とともに、毛髪表面に近い α -ヘリックス構造がランダムコイル構造に徐々に変化していくことを示している。換言すれば、毛髪の損傷度が増すに従って、タンパク質の変性は毛髪表面から毛髪内部に徐々に進行すると考えられる。

次いで、Pronase E 処理前後の毛髪の示差走査熱量分析 (DSC) を行った。図 3-10 に示した DSC 曲線で、温度上昇に伴い下降を開始する温度は T_D (吸熱ピーク温度、矢印部分) と呼ばれ、 α -ヘリックスの変性温度を表している (38, 91, 92)。図よりパーマ処理回数の増加とともに T_D は低下している。この現象は α -ヘリックスの減少、変性、Defolding などと解釈される。また、 T_D は Mf が埋め込まれているリックスマト (Ma) の架橋密度に強く影響されるとも言われている (12)。従って、図 3-10 においてプロテアーゼ処理前の毛髪 (左) はパーマ処理回数の増加に伴って α -ヘリックスが変性することを示している。また、プロテアーゼ処理後の毛髪 (右) は分解しているにもかかわらず、プロテアーゼ処理前の毛髪 (左) とほぼ同じ T_D を示している。このことから、プロテアーゼ処理前後では α -ヘリックス構造は維持されていると考えられる。

プロテアーゼにより分解されている部位は DSC 曲線に影響を与えない部分である Ma あるいはランダムコイルの可能性が考えられる。3-4 の IR スペクトルの結果を考慮に入れると、プロテアーゼにより分解されている部位は、ランダムコイルと考えられる。

以上の結果から、化学処理をした毛髪のプロテアーゼ分解促進のメカニズムは、 α -ヘリックス部のタンパク質の変性が深く関わっていると考えられた。このことは前述の分解プロファイル、表面形態の観察およびアミノ酸分析の結果とも一致する。

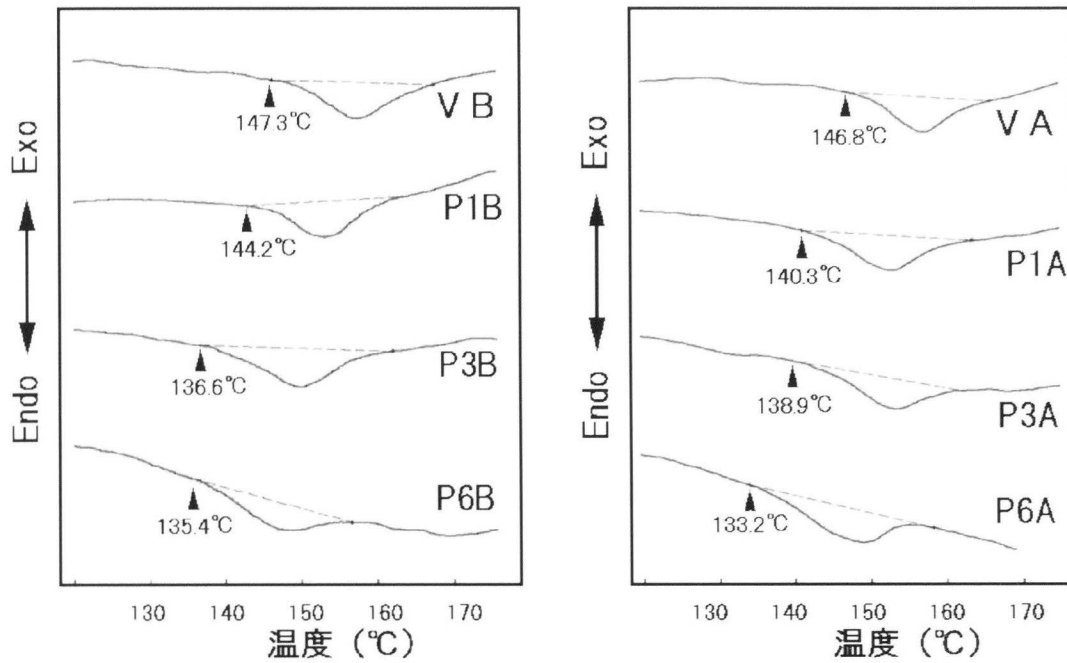


図3-10 パーマ処理回数と毛髪のDSC曲線

プロテアーゼ処理前 (左)

プロテアーゼ処理後 (右)

VB (未処理)

VA (未処理), 分解率3.7%

P1B (パーマ 1回)

P1A (パーマ 1回), 分解率15.8%

P3B (パーマ 3回)

P3A (パーマ 3回毛), 分解率20.8%

P6B (パーマ 6回)

P6A (パーマ 6回), 分解率27.5%

第4節 まとめ

異なる毛髪長（0.1～10 cm）および毛髪の粉末化に関係なく、プロテアーゼ分解率は一定であることがわかった。このことから毛髪断面からのプロテアーゼの浸透は分解率に影響しないことが分かった。毛髪長を2 cmに固定して毛髪の分解プロファイルを調べたところ、未処理毛では毛髪表面の特定の組織が分解されていると推測された。パーマ毛では速やかに分解される毛髪の表面組織とより緩やかに分解される毛髪の内側組織があると考えられた。

定量分析としてプロテアーゼ分解率を調べたところ、毛髪の損傷度（処理回数）が増すに従って、プロテアーゼ分解率も上昇して相関関係が認められた。また、毛髪の損傷が増すに従って、Mf を構成する α -ヘリックスが変性することをFT-IR と DSC より示した。さらに、毛髪の損傷の増加に付随して、プロテアーゼにより分解される組織が毛髪表面から内部に進行していることがアミノ酸分析により示された。以上の知見より、毛髪は化学的な損傷が増すに従って、毛髪内部の Mf の変性が進行し、この変性した部分がプロテアーゼにより分解されていると考えられる。汎用される破断強度測定とプロテアーゼ分解率との関係を調べたところ、相関関係があることが分かった。プロテアーゼ分解率は破断強度に比べると測定誤差が極めて小さく、3 回測定の平均値を比較することで実用的であることが分かった。

また、定性分析として毛髪を直接 SEM 観察したところ、未処理毛と化学処理毛での差はわずかであった。しかし、プロテアーゼ処理後に SEM 観察をすると化学処理毛の分解が促進し、未処理毛と化学処理毛の差が有意に識別できることが分かった。

第4章 還元剤処理毛のプロテアーゼ分解性

第1節 序

パーマで使用される還元剤はその構造の違いで機能が異なることから (85)、より機能的な還元剤の研究開発やこれらを配合した製剤が開発されてきた (93~95)。さらに、パーマ処理では使用する還元剤の違いにより毛髪の損傷の程度が異なることが知られている (68)。そこで、本章ではこの要因を調べる目的で、異なる還元剤処理毛のプロテアーゼ分解性を比較した。次いで、これら処理毛の特性を調べるとともにプロテアーゼ分解率との関係を調べて構造解析を試みた。さらに、これら処理毛のX線回折による構造解析を行い、異なる損傷の要因について考察した。

処理毛としては、シスチンを切断後に不安定なシステインを化学修飾した還元毛、シスチンを切断後に再形成させたパーマ毛を対象とした。還元剤はチオグリコール酸 (TG)、システアミン (CA)、システイン (CYS) を用いた。これら3種類の還元剤は、日本のパーマ市場で主要なシェアを占めており、TGはアニオン性、CAはカチオン性、CYSは両性に分類できる。

第2節 実験方法

2-1. 試薬

還元剤である50%チオグリコール酸アンモニウム液 (TG)、50%システアミン塩酸塩 (CA)、L-システイン (CYS) は化粧品グレードを用いた。リン酸および水酸化ナトリウムは試薬特級を用いた。その他の試薬等は第2章と同様のものを用いた。

2-3. 還元毛およびパーマ毛の調製

化学処理の履歴がない20代の中国人女性の毛髪 (平均直径0.071mm) を未処理毛として用いた。この毛髪を1.0% SDS水溶液中、25℃で10分間洗浄、

30 分間水洗した後に自然乾燥させて用いた。

還元毛：未処理毛を用いて、毛髪中のシスチンを切断後、次のように化学修飾させた(57)。表 4-1 に示した還元剤水溶液に約 1.0 g の未処理毛を 25℃、10 倍量の浴比で異なる時間で浸漬させた。この毛髪を速やかに取り出し、氷冷させた 1.0%ヨード酢酸水溶液（pH未調整）に 100 倍量の浴比で 5分浸漬した。次いで、この毛髪を 1.0%ヨード酢酸水溶液（水酸化ナトリウムで pH8.4 に調整）に 100 倍量の浴比で浸漬させ、80℃で 45 分間処理した後、30 分間水洗して自然乾燥させた。この操作により、シスチンの切断で生じたシステインをS-カルボキシメチル基で化学修飾させた。

パーマ毛：未処理毛を用いて、還元続く酸化処理により、シスチンを切断後に再形成させた(86)。表 4-1 に示した還元剤水溶液（第 1 剤）に約 1.0 g の未処理毛を 25℃、10 倍量の浴比で異なる時間で浸漬させた。この毛髪を速やかに酸化剤水溶液（第 2 剤）に 25℃、10 倍量の浴比で 15 分浸漬させた。毛髪は 30 分間水洗した後に自然乾燥させた。パーマの繰り返しは、還元時間を 15 分に固定して本操作を繰り返した。

表 4-1 パーマネントウェーブ溶液

	還元剤水溶液			酸化剤水溶液
	TG	CA	CYS	
チオグリコール酸アンモニウム	0.50M	—	—	—
システアミン塩酸塩	—	0.50M	—	—
L-システイン	—	—	0.50M	—
28%アンモニア水	pH8.6	pH8.6	pH8.6	—
臭素酸ナトリウム	—	—	—	0.4M
リン酸	—	—	—	pH4.0
イオン交換水	to 1000ml	to 1000ml	to 1000ml	to 1000ml

なお、X線回折に用いたパーマ毛は還元剤水溶液のpHを9.25に調整したものをを用いた。

2-4. アミノ酸分析

毛髪の水分解に続く誘導体化と分析は第2章と同様に行った。また、毛髪のシスチン切断率と定義したシスチン還元率を次式により求めた。

$$R(\%) = [(R_1 - R_0) / R_1] \times 100$$

ここで、 R はシスチン還元率、 R_1 は未処理毛のシスチン量を示し、 R_0 は還元毛あるいはパーマ毛のシスチン量を示している。測定値は3回の実験結果の平均値で表した。

2-5. 毛髪のプロテアーゼ処理

Pronase E を用いて第3章と同様に行った。

2-6. 水分保持率

第2章と同様に行った。

2-7. 走査型電子顕微鏡 (SEM) および水分保持率

第2章と同様に行った。

2-8. X線回折測定

X線回折装置RINT2000 (株)リガク製) を用い、Cu-K α 線を線源とし加速電圧40kV、40mAの条件でX線を照射した。走査角は5° ~ 25° の範囲で測定した。

第3節 実験結果と考察

3-1. 還元時間の影響

先ず、異なる還元剤処理毛のシスチン切断量を比較した。シスチン切断量と定義したシスチン還元率を測定した結果を図 4-1 に示した。いずれの還元剤でも処理時間の増加とともにシスチン還元率は上昇したが、30 分以上の処理では変化しないことが分かった。この知見は、還元剤の浸透が終了すると考えられる 30 分前後で還元反応が終了することを示している (96, 97)。さらに、還元時間に関係なくシスチン還元率はシステイン (CYS) 処理毛で最も小さく、システアミン (CA) 処理毛はより高い値を示し、チオグリコール酸 (TG) 処理毛は最も高い値を示した。特に、TG 処理毛の場合は処理 30 分前後で全シスチンの約 90% が切断していた。

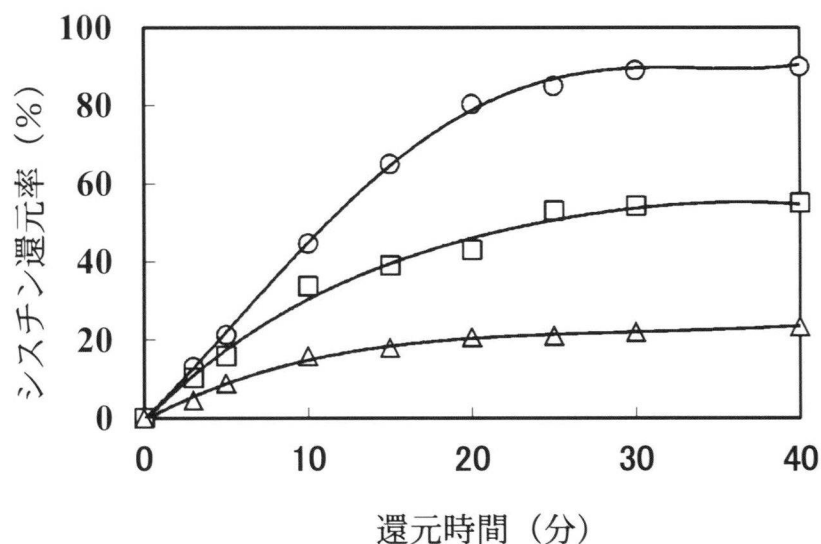


図 4-1 還元時間の変化とシスチン還元率

○ : TG, □ : CA, △ : CYS

次いで、還元毛およびパーマ毛のプロテアーゼ分解率を比較した。図 4-2 に示したように、還元毛は 3 種類とも還元時間の増加に伴って分解率が増加した。これは毛髪中のジスルフィド結合（シスチン）の開裂によりプロテアーゼの作用が促進したためと思われる。3 種類の還元毛の分解率の違いは、前述の図 4-1 に示したように、毛髪中のシスチンの開裂量が違うためと考えられる。

他方、3 種類のパーマ毛を比較した場合も還元時間の増加に伴って分解率が増加したが、処理 10 分以降は分解率の上昇が緩やかになった。これは、パーマの還元剤処理に伴って構造変化が起きているが、この構造変化が酸化処理では元に戻らないことを示唆している。さらに、パーマ毛同士での分解率の差は、還元毛同士での分解率の差に比べると小さかった。このことは、パーマ毛の酸化処理がプロテアーゼ分解率に影響しているものと考えられる。パーマ毛と還元毛はいずれも還元剤によりシスチンが切断される。しかし、パーマ毛ではその後の酸化処理でシスチンが再形成されるために、還元毛に比べてタンパク質の構造がより密になると考えられる。この理由により、プロテアーゼの作用が抑制され、パーマ毛同士で分解率の差が小さくなったと思われる。

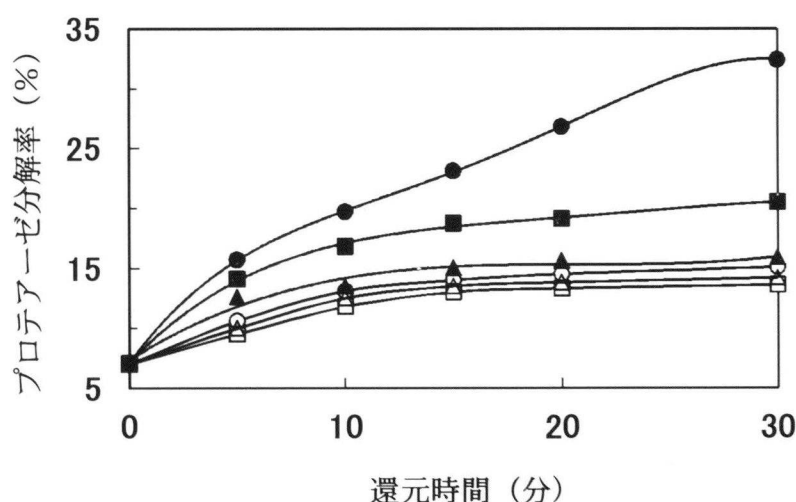


図 4-2 還元時間の変化とプロテアーゼ分解率（パーマ 2 剤処理は 15 分）

- : TG 還元毛, ■ : CA 還元毛, ▲ : CYS 還元毛
- : TG パーマ毛, □ : CA パーマ毛, △ : CYS パーマ毛

図 4-1 と図 4-2 の結果から、プロテアーゼ分解率は使用した還元剤の還元力と関係していることが分かった。プロテアーゼ分解率は還元毛およびパーマ毛いずれも CYS 処理 < CA 処理 < TG 処理の順で高くなった。

3-2. シスチン還元率および水分保持率の影響

先ず、シスチン還元率とプロテアーゼ分解率の関係を調べた。還元毛は前述した還元時間の異なる試料を用いた。パーマ毛は処理 1 回ではプロテアーゼ分解率が低いために、繰り返し処理毛 (5 回) も用いた。図 4-3 に示したように、還元毛とパーマ毛では異なる相関関係を示した。還元毛のシスチン還元率は広範囲に変化することから、シスチン還元率が分解率に影響していることが分かった。シスチン還元率が高い場合は分解率も高いことから、プロテアーゼの作用が促進することを示している。

一方、パーマ毛ではシスチン還元率とプロテアーゼ分解率は一次関数的な相関関係を示した。TG パーマ 1 回毛でのシスチン還元率は約 5% であることから、1 回のパーマ処理ではシスチン量の 90% 以上が再形成することが分かった。

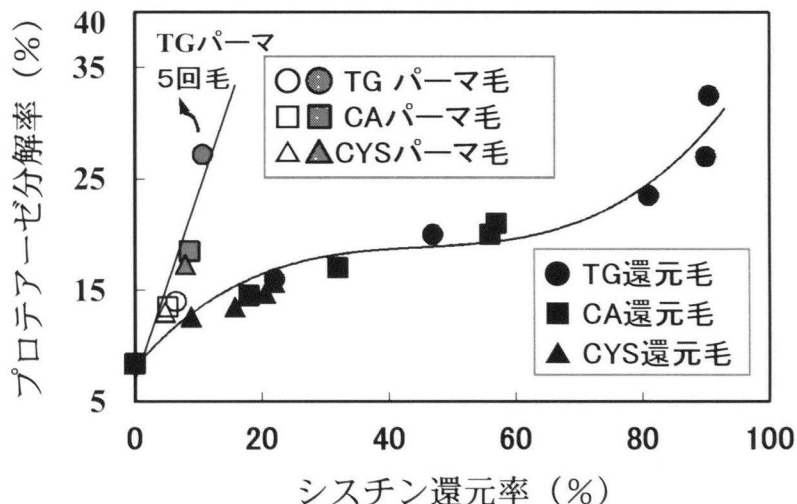


図 4-3 シスチン還元率とプロテアーゼ分解率との関係
還元毛の還元時間は 5, 10, 15, 20, 30 分
パーマ毛は処理 1 回 (白抜き), 処理 5 回 (淡色)

還元毛と比較すると、パーマ毛ではシスチン還元率は著しく低いですが、パーマの繰り返し処理によりプロテアーゼ分解率は高くなり、特に TG パーマ5回毛での分解率は約 27%と高かった。このことから、パーマ毛ではシスチン還元率以外の要因が分解率に大きく影響していると考えられた。

酵素反応は水溶液媒体中で起きることから、毛髪的水分保持率がプロテアーゼ分解率に影響すると考えられる (64)。そこで、水分保持率とプロテアーゼ分解率の関係を調べて図 4-4 に示した。

還元毛の場合、CA 還元毛と CYS 還元毛は同一直線上にプロットされ、TG 還元毛は異なる曲線上にプロットされた。同じ程度の分解率で比較した場合、TG 還元毛は CA 還元毛や CYS 還元毛よりも著しく水分保持率が高いことが分かった。この知見は、TG 還元毛が他の還元剤処理毛よりも非常に膨潤しやすいことを示している。前述の図 4-1 より、TG 還元毛では CA 還元毛や CYS 還元毛に比べてシスチン切断量が多いため、よりタンパク質間距離が広くなり、プロテアーゼの作用が促進したと推測される。あるいは、異なる還元剤では異なる環境のシスチン結合が切断されるとの報告があり、この要因による可能性も考えられる (98)。

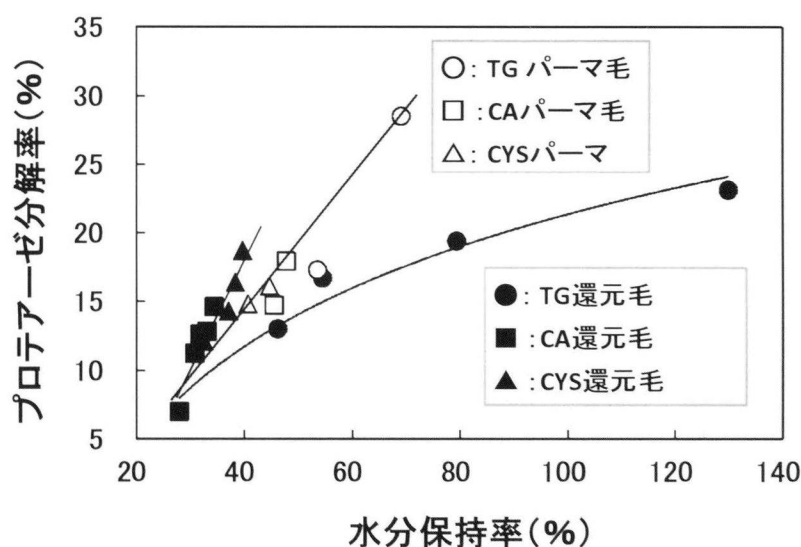


図 4-4 プロテアーゼ分解率と水分保持率の関係

一方、パーマ毛では還元剤の種類に関係なく、プロテアーゼ分解率と水分保持率は一次関数的な相関関係を示した。繰り返し処理により水分保持とプロテアーゼ分解率は増加し、パーマ処理1回、3回、5回の毛髪はいずれも水分吸収率と分解率が CYSパーマ毛 < CAパーマ毛 < TGパーマ毛の順で高くなっていた。従って、パーマ毛では水分保持率が分解率に密接に関係していることが分かった。以上のように、プロテアーゼ分解率と他の物性値との関係を調べることで、還元剤処理毛の構造解析に利用できることが分かった。

3-3. パーマ毛の分解性と構造解析

前述のように、還元剤が違くと毛髪の性状も異なることから、異なる還元剤で処理したパーマ毛のプロテアーゼ分解性を調べた。図4-5にプロテアーゼ処理後のパーマ毛のSEM観察を示した。これらのパーマ毛の分解率は同程度であったが、SEMからは優位な差が観察された。TGパーマ毛(a)の側面はキューティクルの大部分が分解されていた。切断面は他の毛髪に比べて不規則で凹凸が著しいことから、毛髪内部の分解も進行していると考えられた。

CAパーマ毛(b)およびCYSパーマ毛(c)の側面は、キューティクルの先端部が比較的明瞭であることから、キューティクル部の分解はあまり進行していないと考えられる。この2つの毛髪を比較すると、CAパーマ毛(b)はCYSパーマ毛(c)に比べて若干分解の程度が高いことが分かった。



図4-5 プロテアーゼ処理後のパーマ毛（3回処理）の表面形態

(a) TGパーマ毛 (b) CAパーマ毛 (c) CYSパーマ毛

CAパーマ毛 (b) およびCYSパーマ毛 (c) の切断面はTGパーマ毛 (a) に比べて比較的平面的なことから毛髪内部の分解はあまり進行していないと考えられる。また、それぞれのパーマ毛の分解率はTGパーマ毛 (19.2%)、CAパーマ毛 (16.9%)、CYSパーマ毛 (16.2%) であることから、SEMの外観がプロテアーゼ分解率を反映することが分かった (99)。

図4-6に異なる還元剤で処理したパーマ毛のX線回折強度曲線を示した。一般的に、羊毛や毛髪のX線回折強度曲線では、 $2\theta = 12^\circ$ および $2\theta = 20^\circ$ 付近に極大となるピークが観測される。 $2\theta = 12^\circ$ 付近のピークは α -構造由来の回折、 $2\theta = 20^\circ$ 付近のピークは β -構造由来の非晶性散乱であると考えられる (11, 100, 101)。図4-6より、TGパーマ毛では $2\theta = 12^\circ$ 付近の α -構造由来のピーク強度が著しく減少しているが、CAパーマ毛、CYSパーマ毛は未処理毛とほとんど変わらないことが確認された。このことは、CAパーマ、CYSパーマでは毛髪の α -ヘリックス部が変性しにくいことを示している。

従って、本章の3-2において、TGパーマ毛が他のパーマ毛に比べて分解率と水分保持率が高かった原因も α -ヘリックス部の変性が関係していると考えられる。

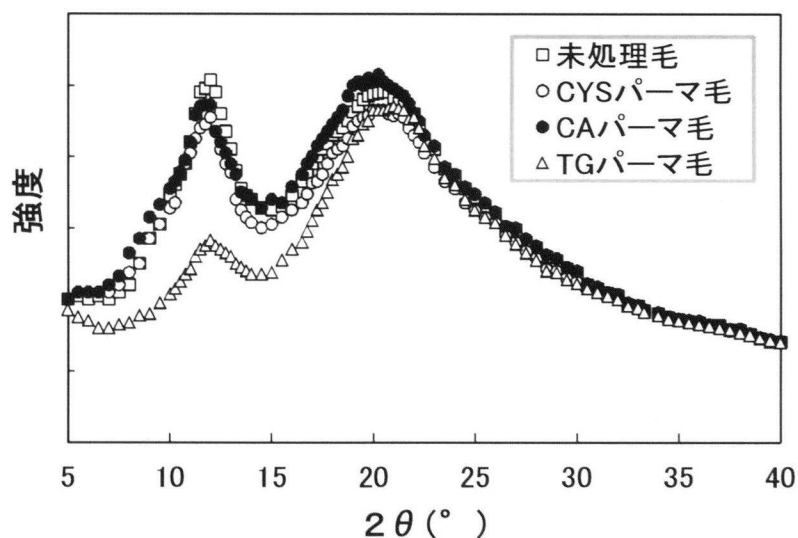


図4-6 異なる還元剤で処理したパーマ毛のX線回折強度曲線

第4節 まとめ

3種類の還元剤で処理した還元毛およびパーマ毛を調製した。還元毛およびパーマ毛のプロテアーゼ分解率を比較したところ、パーマ毛のプロテアーゼ分解率が低いことがわかった。また、3種類のパーマ毛の分解率はあまり差がなかったが、3種類の還元毛の分解率は非常に差が大きいことが分かった。

還元毛ではシスチンが切断状態にあるため、タンパク質間距離が広いと考えられる。このため、水分保持率が高くなりプロテアーゼの作用が促進したものと思われる。パーマ毛では1回の処理で、全シスチンの90%以上が再形成するために構造が密になると考えられる。従って、シスチン還元率が還元毛に比べて低く、プロテアーゼの作用が抑制され、分解率も低かったと考えられる。パーマ毛では、繰り返し処理を行ってもシスチン還元率は著しく小さいものの、水分保持率は高くなった。このことはタンパク質間距離が広がることを示唆しており、このためにパーマの繰り返し処理でプロテアーゼ分解率も高くなったと考えられる。

SEMによる観察からはTGパーマ毛での分解がCAパーマ毛やCYSパーマ毛よりも著しく促進しており、SEMの外観がプロテアーゼ分解率を反映すること分かった。また、プロテアーゼ分解率は用いた還元剤の還元力と関連していた。還元毛およびパーマ毛のプロテアーゼ分解率は CYS処理 < CA処理 < TG処理の順で高くなった。さらに、X線回折からは、TGパーマ毛ではCAパーマ毛やCYSパーマ毛よりも著しく α -ヘリックスが減少することが示された。

以上の結果から、還元剤の還元力はタンパク質の変性や水分保持率の程度に密接に関係し、さらにこの要因がプロテアーゼ分解性に影響すると考察した。

第5章 異なる化学処理毛のプロテアーゼ分解性

第1節 序

本章では化学処理毛を2つの視点から調べた。short-term および long-term での化学処理毛のプロテアーゼ分解性を調べた。short-term での化学処理は、短い毛髪に1回～数回の化学処理を短時間で行う。一方、long-term での化学処理は、美容院で1か月～数か月に1回の化学処理を行っている長い毛髪を使用した。従って、化学的損傷以外に、物理的要因、環境的要因による損傷も加味されている。short-term での化学処理毛は製品の毛髪に対する損傷評価を目的とし、long-term での化学処理毛は毛髪の損傷調査を目的としている。

先ず、short-term の化学処理毛に関しては、パーマ毛とヘアダイ毛の損傷を相対的に比較検討した。過去に、パーマ毛とヘアダイ毛の比較研究は示差走査熱量測定 (DSC)、アミノ酸分析や弾性率変化によるわずかな報告例があるだけで (34, 38, 102)、これら2つの処理による本質的な損傷の違いについてはほとんど知られていない。そこで、基礎的な知見を得る目的でパーマ毛およびヘアダイ毛のプロテアーゼ分解率や特性を調べた。さらに、プロテアーゼ分解率とこれらの特性との関係からパーマ毛とヘアダイ毛の構造的な違いや損傷の要因を考察した。

次いで、long-term の化学処理毛に関しては、パーマ施術者、ヘアダイ毛施術者、化学施術をしていない被験者の毛髪をプロテアーゼ分解性により比較検討した。過去に、化学処理の履歴の識別に関してはわずかな報告例がある。しかし、化学施術をしていない毛髪でも、その毛先方向では物理的要因や環境的要因による損傷が蓄積しており、常に損傷が検出される (53, 103)。加えて、現在のところ損傷度の絶対スケールが存在しないため、従来の損傷評価法では未処理毛とパーマ毛あるいはヘアダイ毛の識別が困難である。そこで、実際にパーマ、ヘアダイ施術をしている被験者、化学処理をしていない被験者の毛髪のプロテアーゼ分解性を調べて、識別が可能かどうかを検討した。

第2節 実験方法

2-1. 試薬

第3章と同様のものを用いた。

2-2. 試料毛髪および化学処理毛の調製

short-termでの化学処理に用いた毛髪試料は、化学処理の履歴がない20代中国人女性の毛髪（平均直径0.071mm）を1.0%SDS水溶液で25℃、10分間洗浄後、30分間水洗した後に自然乾燥させて用いた。

パーマ毛およびヘアダイ毛は第3章と同様に調製した(図5-1および図5-2で使用)。パーマ毛はTGを還元剤として用いた。損傷度の異なるパーマ毛およびヘアダイ毛は表5-1の条件で調製した(図5-3および図5-4で使用)。

表 5-1 損傷度の異なるパーマ毛およびヘアダイ毛の処理条件

損傷の程度	用いた製剤と処理回数	
	ヘアダイ毛	パーマ毛
超高ダメージ毛	HB1回 + B1回	—
高ダメージ毛	D10回 + B1回	P10回+S T 2回
ダメージ毛	Dを12回	Pを12回
低ダメージ毛	Dを6回	Pを6回
未処理毛	0回	0回

HB：ブリーチ処理，45℃，40m i n

B：ブリーチ処理，R T，40m i n

D：ヘアダイ処理，R T，30m i n。

P：パーマ処理，R T，第1剤15m i n，第2剤15m i n

S T：ストレートパーマ処理，R T，第1剤15m i n、第2剤15m i n

製剤はすべて市販品を用い、浴比はすべて10倍量を採用。

long-term に用いた毛髪試料は実生活者の毛髪を提供していただいた。化学処理毛はシステイン系パーマ処理を2カ月毎に繰り返している20代の日本人女性の毛髪およびヘアダイ処理を2カ月毎に繰り返している20代の日本人女性の毛髪を用いた。未処理毛は化学処理の履歴のない5歳、20代および40代の日本人女性の毛髪を用いた。これらの毛髪を1.0% SDS水溶液で25℃、10分間洗浄し、30分間水洗した後に自然乾燥させて用いた。

2-3. 毛髪のプロテアーゼ処理

Pronase E を用いて第3章と同様に行った。

2-4. アミノ酸分析

第2章と同様に行った。なお、本加水分解条件ではアスパラギンとグルタミンはそれぞれの酸タイプであるアスパラギン酸とグルタミン酸に転換する。従って、検出されたアスパラギン酸は Asx として、グルタミン酸は Glx として表した。

2-5. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

第2章と同様に行った。

2-6. 水分保持率

第2章と同様に行った。

2-7. 破断強度の測定

第3章と同様に行った。

第3節 実験結果と考察

3-1. short-term の化学処理毛のプロテアーゼ分解性

パーマやヘアダイ処理ではアミノ酸組成が変化することが報告されている。図 5-1 に short-term で調製した TG パーマ4回処理毛、ヘアダイ4回処理毛および未処理毛のアミノ酸組成を示した。未処理毛に比べるとパーマ毛とヘアダイ毛ではシスチン (Cys) が若干減少していた。シスチンは未処理毛の 17.3% に対して、パーマ5回処理毛で 16.1%、ヘアダイ5回処理毛で 16.2% であった。また、未処理毛に比べるとパーマ毛とヘアダイ毛ではシステイン酸 (Cya) が増加していた。システイン酸は未処理毛の 0.77% に対して、パーマ毛で 1.6%、ヘアダイ毛で 2.0% であった。この結果はパーマ処理とヘアダイ処理によりシスチンが切断されてシステイン酸に酸化されていることを示している。しかし、それぞれの毛髪のアミノ酸量はシスチン量に比較すると 10% 程度であり、シスチンの一部しか酸化切断していないことが分かった。また、その他アミノ酸組成は3種類の毛髪で、ほとんど差がないことが分かった。

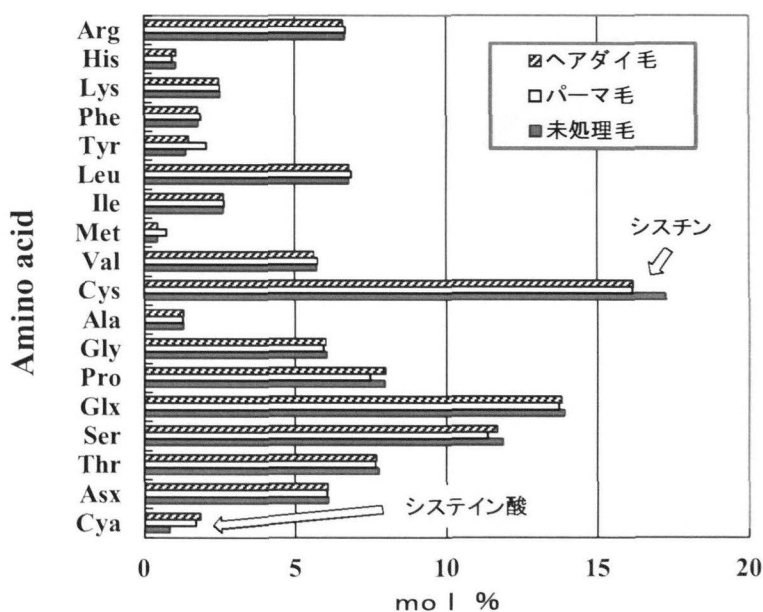


図 5-1 未処理毛および化学処理毛のアミノ酸組成

TG パーマ4回処理毛とヘアダイ4回処理毛のプロテアーゼ処理前後の表面形態および分解率を図 5-2 に示した。プロテアーゼ処理前のヘアダイ毛 (a) とパーマ毛 (b) との間には優位な表面形態の差は認められなかった。一方、プロテアーゼ処理後の表面形態から、ヘアダイ毛 (c) よりもパーマ毛 (d) での分解が促進することが分かった。分解率はヘアダイ毛 (c) で 13.1%、パーマ毛 (d) で 24.5%であった。従って、SEM の外観がプロテアーゼ分解率を反映することが分かった。ここで、キューティクル層は毛髪全体の 10~15%を占めているといわれているが (86)、プロテアーゼ分解後のヘアダイ毛 (c) とパーマ毛 (d) はキューティクルが残存しているために、毛髪内部のコルテックスも分解していると考えられる。特に、パーマ毛 (d) は分解率がと高いことから、コルテックス部の分解がヘアダイ毛 (c) よりも促進していると考えられる。

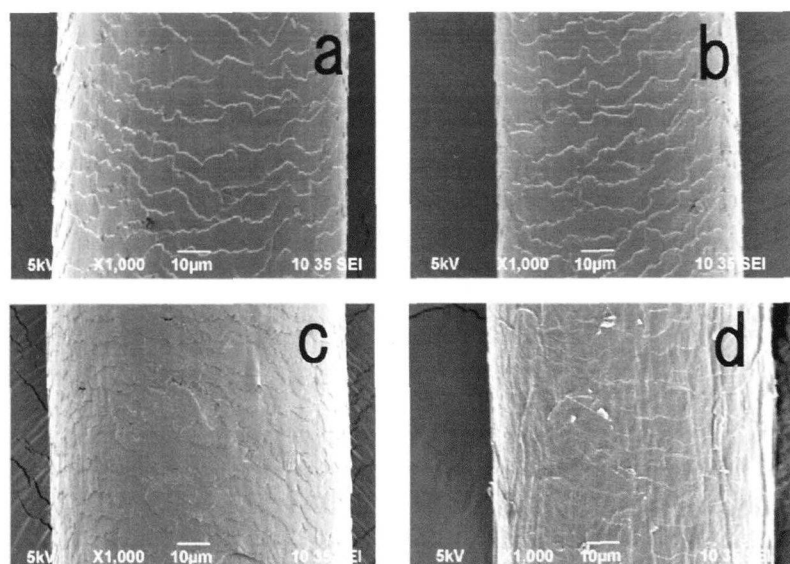


図 5-2 プロテアーゼ処理前後の化学処理毛の表面形態
(a) ヘアダイ4回毛処理前 (b) パーマ4回毛処理前
(c) ヘアダイ4回毛処理後 (分解率 13.1%)
(d) パーマ4回毛処理後 (分解率 24.5%)

損傷度の異なるパーマ毛およびヘアダイ毛の水分保持率と分解率の関係を調べた。図 5-3 に示したように、パーマ毛とヘアダイ毛は異なる領域にプロットされた。同程度の分解率で比較した場合、パーマ毛はヘアダイ毛より著しく水分保持率が高いことが分かった (104)。この結果は、ヘアダイ毛に比べてパーマ毛は水中での膨潤性が高いことを示している。パーマは還元が続く酸化処理により、シスチンが切断後に再形成される。この 2 つの反応でシステイン酸が生成するとともにタンパク質間距離も広がると考えられる (44)。一方、ヘアダイ毛ではシスチンの酸化的切断は 1 つの反応で起こる。しかし、その切断量は前述の図 5-1 のようにわずかであることから、タンパク質間距離は広がらないと推測される。このようにパーマ毛ではヘアダイ毛より著しく水分保持率が高いことからプロテアーゼの作用もパーマ毛で促進したと考えられる。

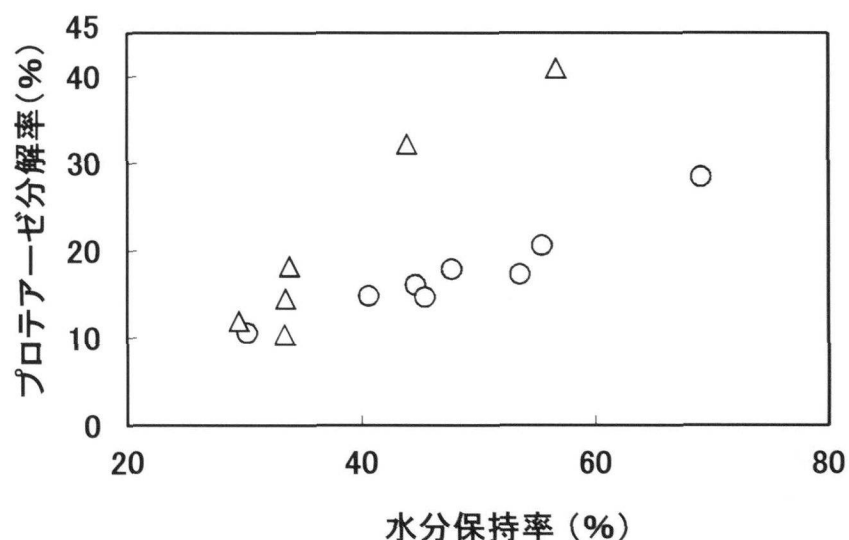


図 5-3 ヘアダイ毛とパーマ毛における水分保持率
△：ヘアダイ毛, ○：パーマ毛

次いで、パーマ毛およびヘアダイ毛の破断強度とプロテアーゼ分解率の関係を調べた。図 5-4 に示したように、パーマ毛とヘアダイ毛は異なる領域にプロットされた。同程度の分解率で比較した場合、パーマ毛はヘアダイ毛より破断強度が著しく低かった。この結果は、ヘアダイ毛に比べてパーマ毛は乾燥状態でもろいことを示している。前述の第 2 章で調製したケラチン繊維が乾燥状態で非常にもろくなっていることから類推すると、パーマの還元剤処理過程でも、本来の柔軟で強固な毛髪の構造がもろくなると推測される。

また、前述の図 5-1 ではパーマ毛とヘアダイ毛のシスチン量はほぼ同じであったことから、破断強度の違いはシスチン以外の影響であると考えられる。パーマ毛ではヘアダイ毛に比べて α -ヘリックスが減少することが知られており (38)、このような高次構造の変化が繊維の強度に影響している可能性がある。図 5-3 の結果を考慮すると、パーマ毛はヘアダイ毛に比べて水分保持率が高いことからタンパク質も変性していると考えられ、この影響が繊維の強度低下に影響していると推測される。

このように、プロテアーゼ分解率と他の物性値との関係を調べることで、パーマ毛とヘアダイ毛の構造解析に利用できることが分かった。

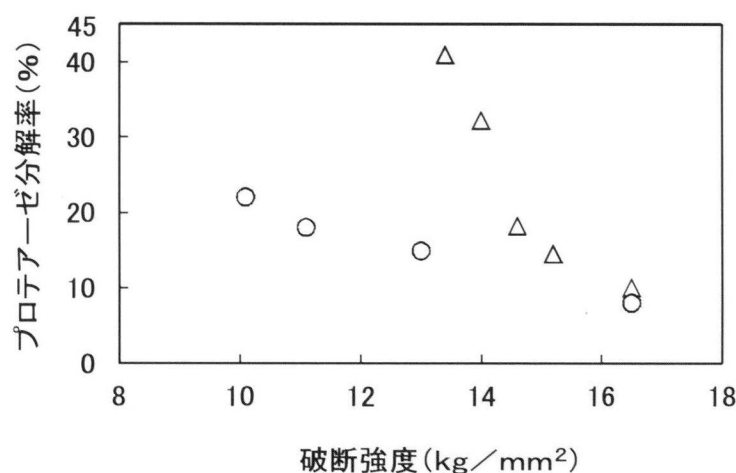


図 5-4 ヘアダイ毛とパーマ毛における破断強度プロテアーゼ分解率
△：ヘアダイ毛, ○：パーマ毛

3-2. long-term の化学処理毛のプロテアーゼ分解性

long-term の化学処理毛のプロテアーゼ分解率を図 5-5 に示した。ヘアダイ被験者の毛髪（20 代女性）は、根本部分から毛先方向へ行くに従ってプロテアーゼ分解率が上昇し、分解率の上昇は他の毛髪に比べて著しかった。また、毛先部分では根本部分に比べて分解率が著しく高いことから、過度のタンパク質変性が起きていると考えられた。

CYS パーマ被験者の毛髪（20 代女性）も根本部分から毛先方向へ行くに従ってプロテアーゼ分解率が上昇した。前述の short-term のパーマ・ヘアダイ毛と比較すると long-term のパーマ・ヘアダイ毛の分解率は逆転していた。これは long-term のパーマ毛ではタンパク質変性効果の弱い CYS で処理されたため（83）、あるいは long-term のヘアダイ毛では紫外線など環境要因に基づく損傷を受けやすいためと推測される（9, 105, 106）。

他方、化学処理の履歴のない被験者の毛髪（20 代女性）では、部位の違いによるプロテアーゼ分解率の有意な差は認められなかった。さらに、化学処理の履歴のない 2 名の被験者の毛髪（5 歳, 40 代）を用いて検討した場合も部位の違いによるプロテアーゼ分解率の有意な差は認められなかった。

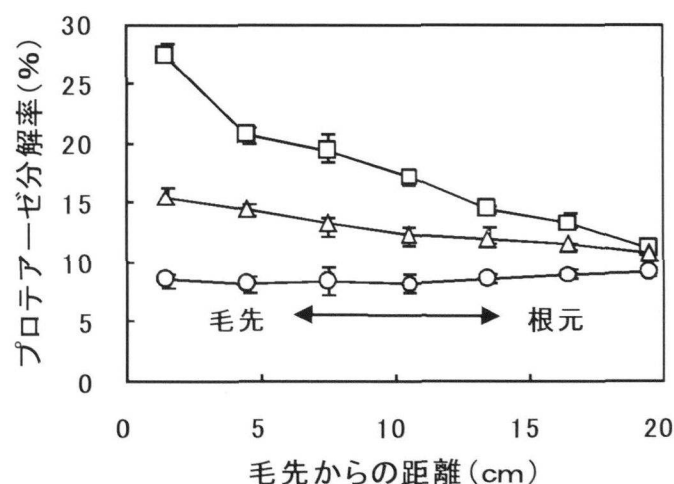


図 5-5 毛髪の各部位とプロテアーゼ分解率 (n = 3, 平均値 ± 標準偏差)
□ : ヘアダイ施術毛, △ : CYS パーマ施術毛, ○ : 毛髪処理の履歴なし

これは新規な知見であり、未処理毛でも洗髪やブラッシング時の摩擦、熱による乾燥などの物理的要因および日光照射等による環境要因に基づく損傷を受けているために、従来の化学的手法・物理的手法を用いた場合、常に毛先部分での損傷が検出される(51, 53, 103)。しかし、この種の損傷はMfタンパク質を変性させないと考えられることから(17)、化学処理の履歴のない被験者の毛髪ではプロテアーゼによる分解が促進しなかったと考えられる。

この化学処理の履歴が異なる3名の毛髪の表面形態を図5-6に示した。未処理毛：根本部分(U-R1)はキューティクルの先端が明瞭であったが、そのプロテアーゼ処理後(U-R2)はキューティクル先端がわずかに滑らかになっていた。一方、毛先部分(U-T1)もキューティクルの先端が明瞭であったが、そのプロテアーゼ処理後(U-T2)は表面がわずかに滑らかな外観を呈していた。しかし、プロテアーゼ処理後の根本部分U-R2と毛先部分U-T2を比較するとわずかな差であった。

パーマ処理毛：根元部分(P-R1)はキューティクルの先端がわずかに不明瞭であり、そのプロテアーゼ処理後(P-R2)はキューティクル先端がわずかに滑らかになった。一方、毛先部分(P-T1)はキューティクルの先端が若干不明瞭であったが、そのプロテアーゼ分解後(P-T2)はキューティクル先端が分解により不規則な外観を呈し、毛髪表面に縦方向のシワ様の外観が観察された。このようにプロテアーゼ分解後のパーマ毛の毛先P-T2は未処理毛の毛先U-T2と比較すると、毛髪表面が分解していることが明らかであった。

ヘアダイ毛：根本部分(D-R1)はキューティクルの部分的な浮きが観察されたが、そのプロテアーゼ分解後(D-R2)はキューティクル表面が分解され、滑らかで不明瞭な外観を呈していた。一方、毛先部分(D-T1)はキューティクルが全体的に削れて不規則な外観であった。そのプロテアーゼ分解後(D-T2)はキューティクルが完全に分解され、コルテックス細胞の縦方向の溝が観察された。

このように、毛髪の化学的損傷が増すことによりプロテアーゼによる分解

が促進することがSEMによる表面形態の観察からも明らかとなった。未処理毛とパーマ・ヘアダイ毛の表面形態は若干の差が認められる程度であっても、プロテアーゼ処理をすることにより、損傷が増幅されて著しい差が出るのが分かった。特に毛先方向ではこの損傷の差がさらに著しくなることが明らかとなった。さらに、この表面形態の違いは前述の分解率の知見を反映することが分かった。

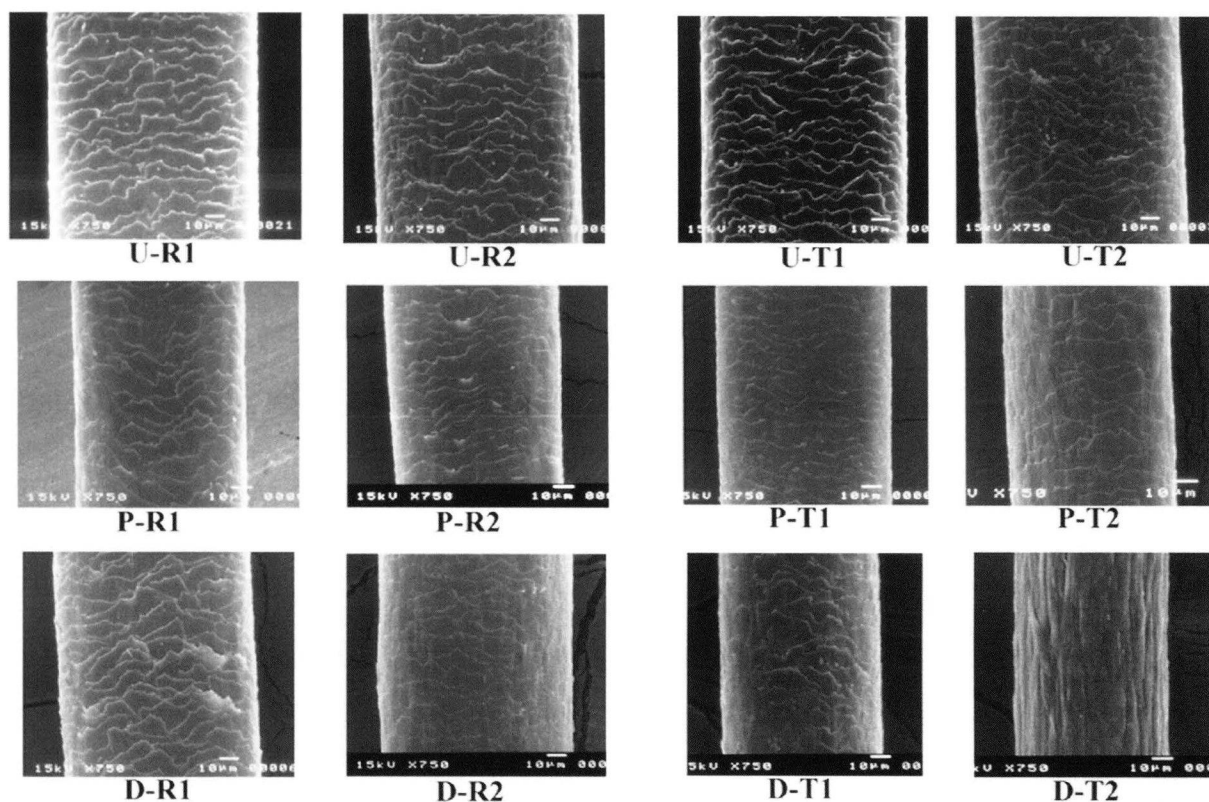


図 5-6 プロテアーゼ処理前後の履歴の異なる毛髪

U-R1:プロテアーゼ処理前の未処理毛（根本），

U-R2:プロテアーゼ処理前の未処理毛（根本）

U-T1:プロテアーゼ処理前の未処理毛（毛先），

U-T2:プロテアーゼ処理前の未処理毛（毛先）

P-R1:プロテアーゼ処理前のパーマ毛（根本），

P-R2:プロテアーゼ処理前のパーマ毛（根本）

P-T1:プロテアーゼ処理前のパーマ毛（毛先），

P-T2:プロテアーゼ処理前のパーマ毛（毛先）

D-R1:プロテアーゼ処理前のヘアダイ毛（根本），

D-R2:プロテアーゼ処理前のヘアダイ毛（根本）

D-T1:プロテアーゼ処理前のヘアダイ毛（毛先），

D-T2:プロテアーゼ処理前のヘアダイ毛（毛先）

第4節 まとめ

パーマ毛とヘアダイ毛の損傷を short-term および long-term の2つの視点から比較検討した。

short-term の化学処理の場合、プロテアーゼ処理後の SEM による観察から、ヘアダイ毛よりもパーマ毛での分解が進行していた。また、プロテアーゼ分解率の比較からもヘアダイ4回毛の13.1%に対しパーマ4回毛では24.5%と分解率が著しく高かった。ヘアダイ4回処理毛とパーマ4回処理毛のシステイン酸量は、未処理毛に比べると増加していた。しかし、それぞれの毛髪のシステイン酸量はシスチン量に比較すると10%程度であり、シスチンの一部しか酸化切断していないことが分かった。また、ヘアダイ毛ではシスチンの酸化切断は部分的に起こる結果、水分保持率が低く、プロテアーゼ分解率が低かったと考えられる。一方、パーマ毛ではシスチンの酸化切断は2段階で起こる。還元処理でシスチンが切断されてタンパク質間距離が広がり、続く酸化処理でタンパク質間距離は完全に元に戻らないと考えられる。このためパーマ毛では水分保持率が高くなり、プロテアーゼ分解率も高くなったと考えられる。さらに、ヘアダイ毛とパーマ毛のプロテアーゼ分解率と破断強度との関係を調べ、同程度の分解率で比較するとヘアダイ毛に比べてパーマ毛の繊維強度が低かった。これらの結果、ヘアダイ毛よりもパーマ毛でタンパク質が変性し、この影響が繊維の強度低下に影響していると推測される。毛髪の本質的な性質を見た場合、ヘアダイ毛に比べてパーマ毛は水中で膨潤しやすく、乾燥状態でもろいことが分かった。

long-term の化学処理の場合、パーマやヘアダイ施術者の異なる毛髪の部位でプロテアーゼ分解性を比較したところ、根元より毛先での分解性が高かった。化学処理をしていない被験者の毛髪は部位に関係なく分解性が同じことが分かった。この結果、従来の汎用法では識別が困難であった実生活者の毛髪における化学処理の履歴が識別できることが明らかとなった。

第6章 頭髪化粧品開発への利用

第1節 序

頭髪用化粧品メーカーの最優先課題は、毛髪に対して損傷の少ない頭髪化粧品の開発である。そこで化粧品製剤の毛髪に対する損傷を比較して本方法の実用性を検証した。

第2章～第5章までは毛髪に焦点を当てたために、プロテアーゼ処理温度を比較的緩和な37℃に設定したが、本章では化粧品製剤の評価に焦点を当てたために、より実用的な短時間での処理を試みた。この目的のため耐熱性であるPronase Eを用いて処理温度を70℃に設定して検討を行い、処理時間を決定した。そして先ず、パーマ第1剤に異なるイオン性の界面活性剤を配合した場合のプロテアーゼ分解性を比較した。次いで、異なる市販のパーマ第2剤で処理した場合のプロテアーゼ分解性を比較した。最後に、パーマ第1剤のpHを変化させた場合のプロテアーゼ分解性に及ぼす影響を調べた。

第2節 実験方法

2-1. 試薬

界面活性剤は汎用される市販の化粧品グレード：アニオン性としてSodium Dodecyl Sulfate (商品名：アルスコープ LN-90PW)、ノニオン性としてLaureth-9 (商品名：ニッコール BL-9EX)、両性としてCocamidopropyl Betaine (商品名：レボン2000)、カチオン性としてCetrimonium Chloride (商品名：カチナール CTC-70ET)を用いた。市販のパーマ第2剤はA (アリミノ製ホットコスメアフターエマルジョン、カチオン系乳化クリーム)、J (ジェニック製ウェーブエッセンス SE ストレッチ II、アニオン系乳化クリーム)、M (ミルボン製プレジューム C/T、ノニオン系溶液)、D (デミ製ウェーブ ネオT60、

ノニオン系溶液) を用いた。その他の試薬は第 3 章と同じものをそのまま用いた。

2-2. 試料毛髪および化学処理毛の調製

第 4 章と同じ毛髪試料を用いた。パーマ処理を行う場合も第 4 章に準じて操作した。

2-3. 毛髪のプロテアーゼ処理

Pronase E を用いて温度を 70°C にした以外は第 3 章と同様に行った。

2-4. システイン酸強度の測定

毛髪中のシステイン酸はシスチンの酸化により生成することから、損傷の指標としてシステイン酸強度の測定が近年汎用されている (104, 107)。システイン酸強度は、赤外分光光度計 (IR) により測定したスペクトルより、システイン酸のピーク (1040 cm^{-1} 付近) の高さをアミド I 吸収のピーク (1634 cm^{-1} 付近) の高さで割り、相対強度として表した。毛髪表面のシステイン酸は、KRS-5 プリズムを用いた ATR 法により測定した。毛髪全体システイン酸は、繊維を乳鉢ですりつぶして粉末にした後、KBr 錠剤法により測定した。

2-5. 市販製品の成分分析

パーマ第 2 剤は酸化剤として臭素酸ナトリウムが主剤として配合され、これ以外の成分が種々の目的で配合される。このため、成分表示のない製品 J および M と D の成分分析を行った。溶液状の製品 M、製品 D は乾燥後に極性の異なる溶媒で抽出して分画した。乳化クリーム状の製品 J はカラムクロマトグラフィーで極性の異なる区分に分画した (108)。これら分画部をガスクロマトグラフィーおよび FT-IR を用いて分析した。得られたデータを化粧

品データベースとの比較より成分の同定と定量を行った。この分析結果を表6-1に示した。

表 6-1 実験に用いた市販パーマ第2剤の組成

【製品A：クリーム状】水 (83%)，臭素酸Na (6.1%)，イソノナン酸イソノニル，ベヘニルアルコール，ジメチコン，水添ポリイソブテン，ステアアルトリモニウクロリド，他（配合量の多い順）

【製品J：クリーム状】水 (84%)，臭素酸Na (6.9%)，セタノール (2.4%)，POE セチルエーテルリン酸 (2.0%)，モノステアリン酸 PEG (1.9%)，モノステアリン酸グリセリン (0.6%)，固パラ (0.5%)

【製品M：溶液状】水 (89%)，臭素酸Na (7.8%)，POE・POP 型界面活性剤+ POE 型界面活性剤 (1.1%)，ポリクオタニウム-11 (0.6%)，シリコーン (0.25%)

【製品D：溶液状】水 (85%)，臭素酸Na (7.6%)，POE 型界面活性剤 (2.0%)，ポリクオタニウム-11 及び 6 (0.8%)，クエン酸Na (少量)

- * ジメチコンおよびシリコーンはシリコーン油
- * ステアアルトリモニウクロリドはカチオン性界面活性剤
- * POE はポリオキシエチレンの略、POE セチルエーテルリン酸はアニオン性界面活性剤
- * PEG はポリエチレングリコールの略、モノステアリン酸 PEG はノニオン性界面活性剤
- * POP はポリオキシプロピレンの略
- * ポリクオタニウム-11 および 6 はいずれもカチオン性高分子

第3節 実験結果と考察

3-1. プロテアーゼ分解条件の検討

プロテアーゼ処理時間を決定するために、プロテアーゼ処理時間と分解率との関係を調べた。代表的な分解プロファイルを図 6-1 に示した。図より 70℃での分解プロファイルは、前述の 37℃での分解プロファイル(第3章, 図 3-3)と比較すると、最大分解に要する時間は短縮しているものの非常に類似した挙動を示した。未処理毛は処理1時間で分解が促進し、処理5時間で分解はほぼ停止した。パーマ3回処理毛は処理1時間までは分解が速やかで、それ以降は分解が緩やかになり、処理5時間以降は分解率がほぼ一定になった。得られた知見から、プロテアーゼ処理時間は8時間に決定した。

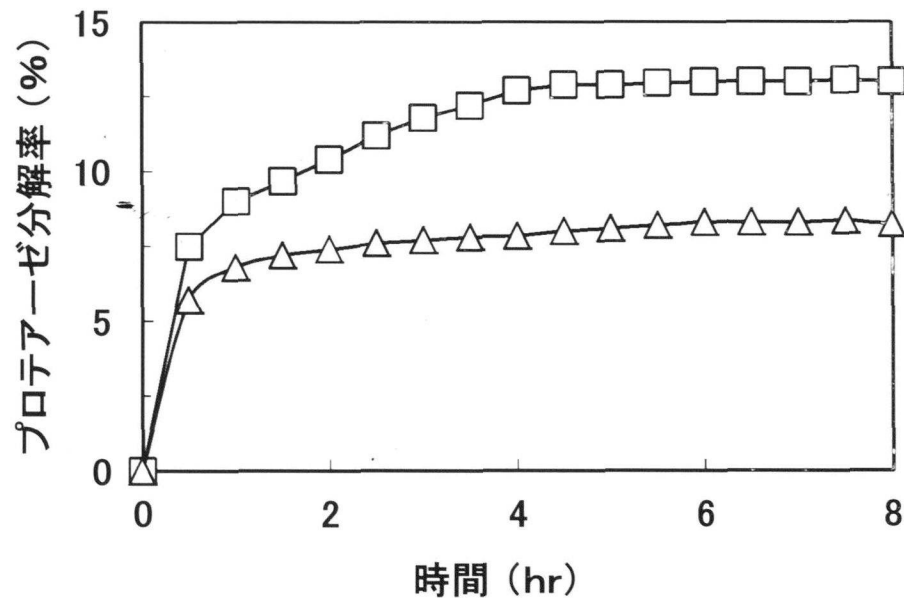


図 6-1 Pronase E による毛髪の分解プロファイル (70℃)

□ : パーマ毛 (3回), △ : 未処理毛

パーマ処方では、油性成分の乳化・可溶化を目的に界面活性剤が配合される。そこで先ず、この界面活性剤の影響を調べた。異なる界面活性剤を配合したTGパーマ第1剤で処理後、パーマ第2剤で処理したパーマ毛を調製した。このパーマ毛のプロテアーゼ分解率を図6-2に示した。アニオン、ノニオン界面活性剤配合系の第1剤で処理した毛髪では、界面活性剤無添加系と同じ分解率であった。一方、両性界面活性剤配合系では分解率が上昇し、カチオン界面活性剤配合系では分解率が減少した。従って、両性界面活性剤配合系では毛髪の変性が進行し、カチオン界面活性剤を配合系ではそれが抑制されていると考えられる。カチオン界面活性剤は、アニオン性のTGとコンプレックスを形成するために、または、第1剤のpH(8.6)では毛髪がマイナスのチャージを帯びているために、カチオン界面活性剤の吸着量が多く、アニオン性のTGの吸着量が減少し、毛髪への作用が抑制されたと推測される。

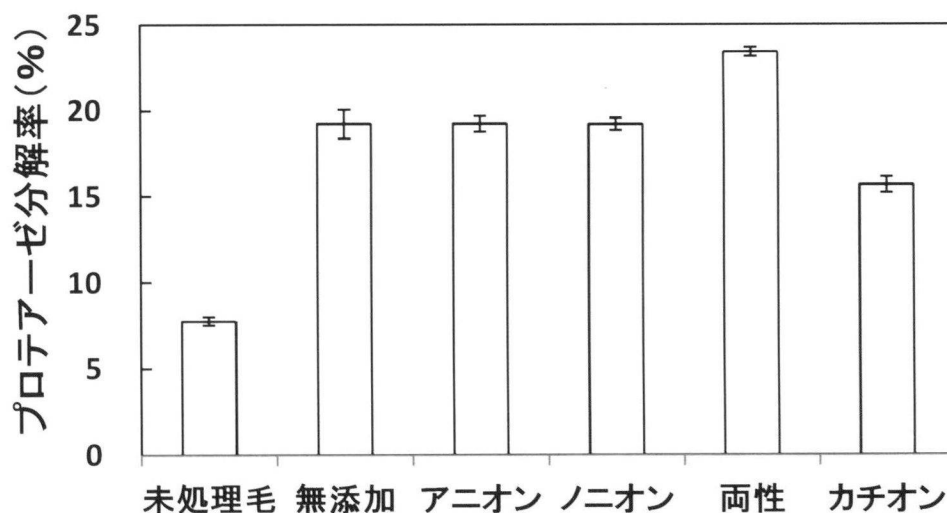


図6-2 1%界面活性剤配合のTG第1剤に続き第2剤で3回処理した毛髪の分解率, n=3, 平均値±標準偏差

次いで、パーマ処理におけるパーマ第2剤の影響を調べた。パーマ第2剤は異なる市販製品A（カチオン系乳化クリーム）、J（アニオン系乳化クリーム）、M（ノニオン系溶液）、D（ノニオン系溶液）を用いた。同じパーマ第1剤で処理後、異なる市販パーマ第2剤で処理したパーマ毛の分解率を図6-3に示した。異なる市販第2剤で処理したにもかかわらず、それぞれの毛髪の分解率には著しい差が認められなかった。製品Dでは分解率がやや小さいことからタンパク質の変性が抑制されていると考えられる。製品Dはカチオンポリマーを比較的多量に配合するために、この影響と推測される。他方、未処理毛を2剤のみで90分処理した毛髪の分解率は7.8%であり、未処理毛と同じ分解率であることが分かった。この結果、タンパク質の変性は第1剤処理時に進行し、第2剤処理時の影響は少ないことが分かった。

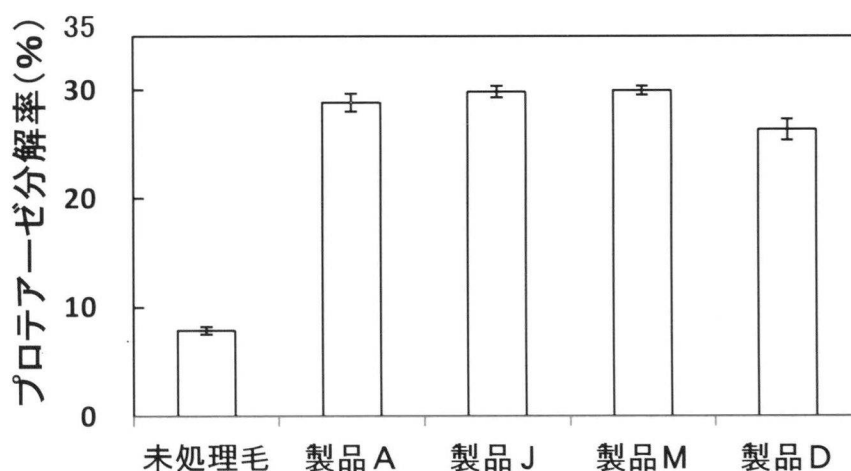


図 6-3 TG第1剤に続き異なる第2剤製品で3回処理した毛髪の分解率
n = 3, 平均値±標準偏差

最後にパーマ第1剤におけるpHの影響を調べた。CAパーマ第1剤のpHを変化させて官能評価を行ったところ、pHが9.0~9.5でごわつき感が増すことが示された。この官能評価の結果を数値的に裏付けることを目的に、近年、損傷評価法として汎用されるシステイン酸強度およびプロテアーゼ分解率を比較した。図6-4に示したようにシステイン酸強度は、毛髪表面ではパーマのpHに関係なくほぼ一定であった。また、毛髪全体のシステイン酸強度はパーマ処理により上昇したが、官能評価の結果を裏付ける知見は得られなかった。他方、プロテアーゼ分解率はパーマ処理により値が上昇して、pH9.0~9.5で著しく上昇したことから官能評価の結果と一致することが分かった。一般消費者は官能評価により毛髪の損傷を実感することから、プロテアーゼ分解率はより実用的な評価方法と考えられる。以上の結果、毛髪に対する頭髪化粧品の損傷を評価する上でプロテアーゼ分解率は実用的であることが明らかとなった。

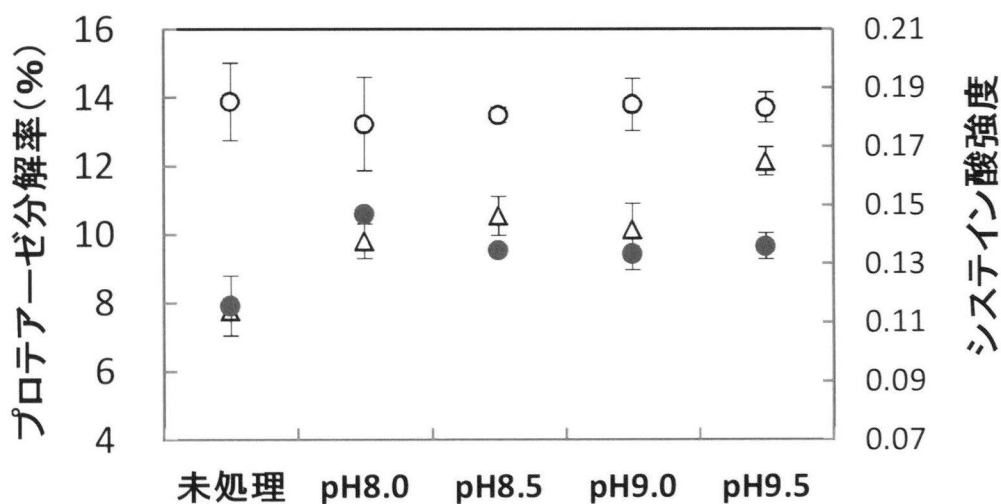


図6-4 pHの異なるCA第1剤に続き第2剤で5回処理した毛髪の性状
n = 3, 平均値±標準偏差, ○:システイン酸強度(毛髪表面),
●:システイン酸強度(毛髪全体), △:プロテアーゼ分解率

第4節 まとめ

異なるパーマ製剤の毛髪に対する損傷を比較して本方法の実用性を検証した。実用性を目的に、耐熱性である Pronase E を用いて処理温度を 70℃に設定したところ、毛髪の分解は5時間でほぼ一定になった。

パーマ第1剤に異なるイオン性の界面活性剤を配合した場合のプロテアーゼ分解性を比較したところ、アニオン、ノニオン界面活性剤配合の第1剤で処理した毛髪は、界面活性剤無添加系と同じ分解率であった。一方、両性界面活性剤配合系では分解率が上昇し、カチオン界面活性剤配合系では分解率が減少した。

異なる市販のパーマ第2剤で処理した場合のプロテアーゼ分解性を比較したところ、分解率には著しい差が認められなかったものの、カチオンポリマーを比較的多量に配合する製品では分解率がやや小さいことが示された。

パーマ第1剤のpHを変化させた場合のプロテアーゼ分解性に及ぼす影響を調べたところ、プロテアーゼ分解率はパーマ処理により値が上昇した。pH9.0~9.5でプロテアーゼ分解率は著しく上昇したことから官能評価の結果と一致することが分かった。

第7章 総括

本研究ではまず、毛髪的主要タンパク質のプロテアーゼ分解性を調べた。次いで、毛髪の化学損傷とプロテアーゼによる分解挙動との関係を調べた。また、毛髪の損傷部位の解析を行い、得られた知見を応用して化学処理毛の構造解析を試みた。最後に、化粧品製剤の毛髪に対する損傷を比較して本方法の実用性を検証した。

第2章より、モデルケラチンはシスチン含有量が低いとプロテアーゼ分解率が高く相関関係が認められた。未処理毛ではこの相関関係から外れて分解率が著しく低かった。SEMによる観察からはマイクロフィブリル(Mf)が主に分解されていることが示された。これらの知見から、プロテアーゼは毛髪中の変性したMfを分解していることが分かった。また、モデルケラチンおよび未処理毛の水分保持率とプロテアーゼ分解性との間には高い相関関係が認められた。したがって、水分保持率は化学処理毛のプロテアーゼ分解性の指標になると考えられる。また、水分保持率測定は短時間で簡便に行えることから、ケラチン由来素材などの生分解性試験を行う前の予備実験やスクリーニングへの利用が期待される。

第3章より、従来の直接SEM観察に比べて、プロテアーゼ処理後にSEM観察する本定性分析は未処理毛と化学処理毛の差が優位に識別できることを示した。また、プロテアーゼ分解率を用いる定量分析の場合、プロテアーゼ分解率が毛髪の損傷度と相関していることが分かった。さらに、プロテアーゼ分解率は汎用される破断強度とも相関関係があることが分かった。プロテアーゼ分解率は破断強度に比べると測定誤差が極めて小さく、3回測定の平均値を比較することで十分に実用的であることも分かった。毛髪の構造解析の結果、本方法における毛髪の損傷検出の原理は、変性したタンパク質部分の膨潤性が高くなり、この部分のプロテアーゼ分解が促進することが示された。従来法では毛髪の損傷を化学的・物理的方法で評価していたが、本手

法はタンパク質、特に Mf を構成する α -ヘリックスの変性を捉えることが新規な点である。

第4章では、まず、3種類の還元剤で処理した還元毛およびパーマ毛のプロテアーゼ分解性を比較し、パーマ毛での分解率が低いことを明らかにした。また、3種類のパーマ毛の分解率は差が小さく、3種類の還元毛の分解率は差が非常に大きいことが分かった。これは、パーマ毛では酸化剤処理によりタンパク質の構造が密になったためと考えられる。また、パーマ毛では還元剤処理で構造変化が起こっているものの、これが酸化剤処理ではもとに戻らないことを示唆していた。プロテアーゼ分解率は用いた還元剤の還元力と関連しており還元毛およびパーマ毛は双方とも CYS 処理 < CA 処理 < TG 処理の順で高くなった。さらに、水分保持率もこの順序で上昇した。X線回折からは TG パーマ毛が CA パーマ毛や CYS パーマ毛よりも著しく α -ヘリックスが減少（変性）することが示された。これらの知見から、還元剤の還元力が、タンパク質の変性や水分保持率の程度に密接に関係し、この要因がプロテアーゼ分解性に影響すると考えられた。

第5章では、化学処理毛を short-term と long-term の2つの視点から比較検討した。short-term のヘアダイ毛とパーマ毛のプロテアーゼ分解性を比較したところ、パーマ毛での分解性が高いことが分かった。また、ヘアダイ毛に比べてパーマ毛は水分保持率が高かった。これらの結果、ヘアダイ毛に比べてパーマ毛でタンパク質が変性することが示唆された。そして、この要因によりパーマ毛はヘアダイ毛に比べて破断強度が低かったと推測される。long-term でのパーマやヘアダイ施術者の毛髪のプロテアーゼ分解性を比較したところ、根元より毛先での分解性が高いことが分かった。化学処理をしていない被験者の毛髪は部位に関係なく分解率が同じことを見いたした。この結果、従来の汎用法では識別が困難であった実生活者の毛髪における化学処理の履歴が識別できることが新規な知見として得られた。近年のヘアダイの流行で、毛髪から人種や年齢の特定が困難になった。また、白髪を黒色に

染毛して商用販売する偽装なども行われているようである。しかし、本手法を用いることで簡便に未処理と化学処理毛の識別が可能であることから裁判科学への利用も期待される。

第6章では、第2章～第5章とは逆に化粧品製剤に焦点を当てた。化粧品製剤の毛髪に対する損傷を比較して本方法の実用性を検証した。プロテアーゼ分解率は、毛髪サンプルを同時に測定できることから、頭髮化粧品の毛髪に対する損傷を一斉に評価する場合に威力を発揮することが分かった。また、官能評価の結果とも一致することから、より実用的な評価方法であり、頭髮化粧品開発時のルーチン分析に適していることが分かった。

毛髪の損傷を評価する場合、繊維に特化した機器や高価な分析装置が必要であった。しかし、本方法は特別な装置を必要とせず簡便であることから、繊維を専門としない研究機関でも簡単に評価が可能である。得られた成果から、本方法は毛髪損傷の評価および構造解析のルーチン手法として有効であることが明らかとなった(104)。

本方法の原理は、変性したタンパク質部分をプロテアーゼが分解することを利用して、タンパク質の変性試験への応用も期待される。還元剤も含めて化粧品原料全般および処方系の毛髪に対するプロテアーゼ分解率を調べ、より毛髪に対する損傷の低い処方開発への利用が考えられる。また、モデルケラチンを用いた場合もパーマ剤の損傷評価や紫外線による損傷の検出・定量化への試みがすでに行われており、今後、異なった視点からの応用が期待される(109, 110)。さらに、タンパク質の変性試験として焦点を当てた場合、毛髪と同じケラチンである皮膚の肌荒れの評価にも応用可能と考えられる。肌荒れは美容師の最大の離職理由であるものの、肌荒れを考慮した製品設計は現在のところ行われていない。従って、皮膚タンパク質に対する変性試験に利用した場合、肌荒れの低い処方の開発が可能となり、美容師の作業改善になるばかりでなく、新たな商品開発の切り口になるものと期待される。

引用文献

- 1) 日本化粧品技術者会編, 化粧品辞典, 丸善, 東京, P.802-816 (2003).
- 2) 田村建夫, 走査型電子顕微鏡による損傷毛の観察 —毛髪損傷の実例—, フレグランスジャーナル, **9**(46), 98-102 (1981).
- 3) P. Busch, K. Thiele, D. Fischer, and D. Hollenberg, Testing permanent waves, *Cosmetics & Toiletries*, **111**, 41-54 (1996).
- 4) 瀧上昭治, ヘアダメージにおよぼすブリーチとパーマメント処理の影響, 毛髪科学, No.106, 20-24 (2010).
- 5) 堀内照夫, 機器分析による毛髪の物理化学的評価について, フレグランスジャーナル, **12**(55), 69-86 (1990).
- 6) 堀内照夫, 一ノ瀬昇, 柏一郎, 損傷毛の物理的性質, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **14**, 116-119 (1980).
- 7) S. Hilterhaus-Bong and H. Zahn, Contributions to the chemistry of human hair: III. Protein chemical aspects of permanent waving treatments. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **11**, 221-231 (1989).
- 8) 毛髪工学に関する研究開発, 北陸先端科学技術大学院大学先端科学技術研究調査センター年報, 第4号, 99-100 (2000).
- 9) C. R. Robbins, Chemical Composition. In *Chemical and physical behavior of human hair* (4th Ed), Springer Verlag, New York, pp. 63-104 (2002).
- 10) R. D. B. Fraser and T. P. MacRae, Keratins. In *Conformation in fibrous proteins and related synthetic polypeptides*, Academic Press, New York, pp.469-551 (1973).
- 11) 新井幸三, 羊毛および毛髪の架橋構造と力学物性, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **37**, 63-83 (2003).
- 12) 松崎 貴, 新井幸三, 上甲恭平, 細川 稔, 中村浩一, 最新の毛髪科学(毛髪科学技術者協会編), フレグランスジャーナル社, 東京, pp. 59-259 (2003).
- 13) M. Menefee, Component distributions in keratins and their estimation from amino

- acid analysis. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **36**, 17-30 (1985).
- 14) 石井泰博, 白井邦郎, 毛と羽毛の科学と利用, 科学と工業, **74**, 69-74 (2000).
- 15) 西沢達也, 岩部晃一, 毛髪及び毛髪製品 —その相互作用について—, フレグランスジャーナル, **3**(11), 18-30 (1975).
- 16) M. Spei, and R. Holzem, Thermoanalytical investigations of extended and annealed keratins. *Colloid & Polymer Science*, **265**, 965-970 (1987).
- 17) R. Kon, A. Nakamura, and N. Hirabayashi, Analysis of the damaged components of permed hair using biochemical technique. *J. Cosmet. Sci.*, **49**, 13-22 (1998).
- 18) A. Franbourg and F. Leroy, Hair structure, function, and physicochemical properties. In *The Science of Hair Care* (Claude, B., John, W. Eds), CRC Press, Boca Raton, p. 1-66 (2005).
- 19) 新井泰裕, 最新ヘアカラー技術 特許にみる開発動向, フレグランスジャーナル社, p. 7 (2004).
- 20) 西田勇一, 細川 稔, 伊藤武利, 青野 恵, 各種ダメージによる毛髪への影響と新修復剤, フレグランスジャーナル, **30**(8), 33-41 (2002).
- 21) T. Inoue, M. Ito, and K. Kizawa, Labile proteins accumulated in damaged hair upon permanent waving and bleaching treatments, *J. Cosmet. Sci.*, **53**, 337-344 (2002).
- 22) 染矢慶太, 化学処理後の頭髪損傷 その機構と対処法, 化学と生物, **43**, 476-480 (2005).
- 23) 山内 力, ブラッシングによる枝毛発生に関する研究, すてきにヘアケア (’97ヘアケア読本Ⅲ), NOW企画, 東京, 112-115 (1997).
- 24) H. Gamez-Garcia, The Cracking of Human Hair Cuticles by Cyclical Thermal Stresses. *J. Cosmet. Sci.*, **49**, 141-153 (1998).
- 25) 中村浩一, ダメージヘアつやとりペア ～カラーリング時代の美しい髪の実現～, 第19回コロイド・界面技術シンポジウム, 東京, 36-43 (2002).
- 26) C. R. Robbins and C. Kelly, Amino acid composition of human hair, *Textile Res J.*, **40**, 891-896 (1970).

- 27) 金高節子, 富沢庫司朗, 伊与博美, 中村良治, 毛髪物の物性およびタンパク構造に対する紫外線の影響, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **27**, 424-431 (1993).
- 28) 青野 恵, 各種要因による毛髪へのダメージとその修復, *フレグランスジャーナル*, **35**(6), 42-48 (2007).
- 29) 川副智行, 藤山泰三, 清水秀樹, 毛髪へのダメージに伴う毛髪微細構造の変化, *日本化粧品学会誌*, **4**, 273-279 (2007).
- 30) I. J. Kaplin, A. Schwan, and H. Zahn, Effects of cosmetic treatment on the ultrastructure of hair, *Cosmetics & Toiletries*, **97**, 22-26 (1982).
- 31) 龍田真伸, 植村雅明, 鳥居健二, 松岡昌弘, 紫外線による毛髪への赤色化とダメージ, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **21**, 43-49 (1987).
- 32) 山内 力, 志村勝之, フーリエ変換赤外分光光度計による毛髪ダメージの分析, *皮膚と美容*, **24**(3), 27-33 (1992).
- 33) G. G. Gumprecht, K. Patel, and R. P. Bono, Effectiveness of reduction and oxidation in acid and alkaline permanent waving, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **28**, 717-732 (1977).
- 34) C. R. Robbins and C. Kelly, Amino acid analysis of cosmetically altered hair, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **20**, 555-564 (1969).
- 35) S. S. Sandhu and C. R. Robbins, A sensitive fluorescence technique using dansyl chloride to assess hair damage, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **40**, 287-296 (1989).
- 36) S. Hilterhaus-Bong and H. Zahn, Contributions to the chemistry of human hair: II. Lipid chemical aspects of permanent waved hair. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **11**, 167-174 (1989).
- 37) 新井幸三, パーマネントウェーブの化学と物理, *毛髪科学*, No.92, 8-18 (2003).
- 38) F.-J. Wortman, C. Springob and G. Sendelbsch, Investigation of cosmetically treated human hair by differential scanning calorimetry in water. *J. Cosmet. Sci.*, **53**, 219-228 (2002).
- 39) 瀧上昭治, ダメージヘアのメカニズム研究, *フレグランスジャーナル*, **35**(6),

- 19-24 (2007).
- 40) N. Nishikawa, Y. Tanizawa, S. Tanaka, Y. Horiguchi, and T. Asakura, Structural change of keratin protein in human hair by permanent waving treatment, *Polymer*, **39**, 3835-3840 (1998).
- 41) 井上敬文, 伊藤真由美, 木澤謙司, パーマ処理およびブリーチ処理による毛髪蛋白質の不安定化, *フレグランスジャーナル*, **30**(8), 55-60 (2002).
- 42) 山内 力, 未発表データ
- 43) S. Ogawa, K. Fujii, K. Kaneyama, and K. Arai, Action of thioglycolic acid and *l*-cystein to disulfide cross-links in human fibers during permanent waving treatment, *Sen'i Gakkaishi*, **64**, 137-144 (2008).
- 44) R. R. Wickett, Disulfide bond reduction in permanent waving, *Cosmetics & Toiletries*, **106**, 37-47 (1991).
- 45) 小川 聡, 藤井一樹, 金山勝美, 新井幸三, 上甲恭平, 永久毛髪矯正の理論とその応用, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **34**, 63-71 (2000).
- 46) 井上 潔, パーマネント・ウェーブ用剤の製品評価技術, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **28**, 223-237 (1994).
- 47) 井上哲男編著, 毛髪の話し, 文藝春秋, p.124-161 (2003).
- 48) 小川 聡, 徳田澄美, 藤井一樹, 金山勝美, 上甲恭平, ケラチン繊維の還元, 熱, 及びそれに続く酸化処理による構造変化, *繊維学会誌*, **60**, 1-8 (2004).
- 49) 野村義宏, 獣毛および羽毛ケラチンの可溶化とその利用, *ファインケミカル*, **36**, No.12, 5-12 (2007).
- 50) M. L. Tate, Y. K. Kamath, S. B. Buetsch and H. -D. Weigmann, Quantification and prevention of hair damage, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **44**, 347-371 (1993).
- 51) 山内 力, 牛島ひろみ, 森田資隆, 村上裕二, 横山憲二, 民谷栄一, 毛髪ダメージ度の簡易評価法の検討, *Chemical Sensors (Proceedings of the 32nd Chemical Sensor Symposium)*, Kobe, Supplement A, 17, 142-144 (2001).

- 52) D. W. Cannell and L. E. Carothers, Permanent waving: utilization of the post-yield slop as a formulation parameter, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **29**, 685-701 (1978).
- 53) 安田正明, 曾我部敦, 野田 章, 毛髪物性に関する研究 2 —毛髪のねじり応力評価法と応力の作用機序—, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **36**, 262-272 (2002).
- 54) 山口順士, 小金沢有希, 炭田康史, 堀越俊雄, 南野博美, 第4回A S C S インドネシア大会論文報告会講演要旨集, 大阪, 21-25 (1999).
- 55) 日本化粧品技術者会編, 化粧品の有用性 —評価技術の進歩と将来展望—, 薬事日報社, p.400-408 (2001).
- 56) V. G. Kulkarni, Further studies on the microfibrils from wool keratin. Part I: The isolation of microfibrils, *Textile Res. J.*, **45**, 833-835 (1975).
- 57) E. Suzuki, W. G. Grewther, R. D. B. Fraser, T. P. MacRae and N. M. McKern, X-ray diffraction and infrared studies of an α -helical fragment from α -keratin, *J. Mol. Biol.*, **73**, 275-278 (1973).
- 58) M. Kojima, M. Kanai, M. Tominaga, S. Kitazume, A. Inoue and K. Horikoshi, Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01, *Extremophiles*, **10**, 229-235 (2006).
- 59) S. Yamamura, Y. Morita, Q. Hasan, S. R. Rao, Y. Murakami, K. Yokoyama and E. Tamiya, Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur, *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 595-600 (2002).
- 60) Z. Ignatova, A. Gousterova, G. Spassov, and P. Nedkov, Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*, *Can. J. Microbiol.*, **45**, 217-222 (1999).
- 61) 宮本武明, 網屋毅之, 稲垣 博, 羊毛繊維の酵素分解性, 繊維学会昭和 56 年度年次大会発表会, p.71 (1981).
- 62) A.M.S.Kamal, Y.Nomura, Y.Ishii, and K.Shirai, Properties of bovine hair

- keratins solubilized with thioglycolate, *J. Am. Leather Chem. Association*, **93**, 272(1998).
- 63) H. P. J. Bennett and S. Solomon, Use of pico-tag methodology in the chemical analysis of peptides with carboxyl-terminal amides, *J. Chromatogr.*, **359**, 221-230 (1986).
- 64) C. Yamauchi, W. Okazaki, T. Yoshida and A. Karasawa, Enzymatic degradation of keratin films and keratin fibers prepared from human hair, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 994-997 (2008).
- 65) F. Miyazawa, T. Tamura, and F. Nozaki, Alternation of amino acid composition and keratinolysis of hair due to chemical damage. In *Biology and Disease of the Hair* (K. Toda, Y. Ishibashi, Y. Hori, and F. Morikawa Eds.), University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 659-667 (1976).
- 66) M. A. Manuszak, E. T. Borish, and R. R. Wickett, Reduction of human hair by cysteamine and ammonium thioglycolate: A correlation of amino acid analysis and single-fiber tensile kinetic data, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **47**, 213-227 (1996).
- 67) N. Kohara, M. Kanei, and T. Nakajima, Effect of reduction and succinylation on water absorbance of wool fibers, *Textile Res. J.*, **71**, 1095-1098 (2001).
- 68) K. Yamauchi, A. Yamauchi, T. Kusunoki, A. Khoda, and Y. Konishi, Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films, *J. Biomed. Mat. Res.*, **31**, 439-444 (1996).
- 69) 山内 清, ケラチンの化学と利用, *高分子*, **50**, 240-243 (2001).
- 70) J. M. Gillespie, *Biochemistry and Physiology of the Skin I* (L. A. Goldsmith Ed.), Oxford University Press, London, p.475—510 (1983).
- 71) M.B.Rao, A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 597-635 (1998).
- 72) 白浜博幸, 水馬潔志, 安田 源, 新規ラクチドコポリマーの合成とそのプ

- ロテアーゼによる分解, 日本油化学会誌, **45**, 459-466 (1996).
- 73) V. Wilkerson, The chemistry of human epidermis. II. The isoelectric point of the stratum corneum, hair, and nails as determined by electrophoresis, *J Biol Chem*, **112**, 329-335 (1935).
- 74) 井出裕介, 藤井敏弘, ヒト毛髪およびフィルムのプロテアーゼによる分解, 高分子論文集, **61**, 190-193 (2004).
- 75) 一島栄治, 食品工業と酵素, 朝倉書店, 東京, p.90-110 (1983).
- 76) 株式会社アリミノ著, プロのケア力, 髪書房, 東京, 22-23 (2007).
- 77) Mi-Ok Han, Jae An Chun, Jin-Woo Lee and Chung-Han Chung, Effects of permanent waving on changes of protein and physicomorphological properties in human head hair, *J. Cosmet. Sci.*, **59**, 203-215 (2008).
- 78) 上甲恭平, 羊毛繊維製品の水系洗濯化について, 第18回ケラチン研究会講演要旨, 大阪, (2003).
- 79) E.G.Bendit, Infrared absorption spectrum of keratin. I. Spectra of α -, β -, and supercontracted keratin, *Biopolymers*, **4**, 539-559 (1966).
- 80) H.Nolte, D.B.Bishop, and H.Höcker, Effects of proteolytic and lipolytic enzymes on untreated and shrink-resist-treated wool, *J. Text. Inst.*, Part1, No.1, 212-226 (1996).
- 81) J.A.Swift, Chemical composition of various morphological components isolated from human hair cuticle, *Cosmetics & Toiletries*, **91**, 46-47 (1971).
- 82) R.Kon, A. Nakamura, and K.Takeuchi, Artificially damaged hairs: preparation and application for the study of preventive ingredients, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **20**, 369-380 (1998).
- 83) 上甲恭平, ケラチン繊維の構造からみたプロテクト機能 —クチクルおよび細胞膜複合体の役割—, 第19回コロイド・界面技術シンポジウム, 東京, 1-10 (2002).
- 84) 吉村由里香, 大江 猛, 安部郁夫, 澤田和也, 羊毛酵素処理における界面活

- 性剤前処理の酵素反応促進効果, 繊維学会誌, **59**, 35-39 (2003).
- 85) A. Karasawa, T. Yoshida, C. Numata, J. Tanaka, and M. Okano, Effect of cysteamine on reduction of human hair, *IFSCC International Conference*, Florence (2005).
- 86) J. A. Swift, "Formation and Structure of Human Hair," In *Morphology and Histochemistry of human hair* (P. Jollès, H. Zahn, and H. Höcker, Eds), Birkhäuser Verlag, Switzerland, p.149-175 (1997).
- 87) C. Yamauchi and W. Okazaki, Application of an Enzymatic Method for Identifying Hair Treatments, *J. Health Sci.*, **53**(6), 708-714 (2007).
- 88) C. Yamauchi, W. Okazaki, K. Inoue, and A. Sakaino, Enzymatic method for assessing hair damage with reduction and subsequent oxidation, *Sen'i Gakkaishi*, **63**, 33-38 (2007).
- 89) D. J. Lyman and J. Murray-Wijelath, Fourier transform infrared attenuated total reflection analysis of human hair: comparison of hair from breast cancer patients with hair from healthy subjects, *Appl. Spectrosc.*, **59**, 26-32 (2005).
- 90) T. Miyazawa and E. R. Blot, The infrared spectra of polypeptides in various conformation: Amide I and II bands, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 712-719 (1961).
- 91) F.-J. Wortmann, C. Popescu, and G. Sendelbach, Nonisothermal denaturation kinetics of human hair and the effects of oxidation, *Biopolymers*, **83**, 630 – 635 (2006).
- 92) 大崎敦士, 岡田倫子, 山本和司, 上甲恭平, 毛髪の結晶融解挙動におよぼすジスルフィド結合の影響, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **43**, 86-94 (2009).
- 93) 鷲家真吾, 西山頌子, 新還元剤チオグリセリンの可能性, 毛髪科学, No.103, 12-18 (2008).
- 94) 渋谷 彰, 中村圭一, 低ダメージ性パーマメントウェーブ用還元剤「ブチロラクトンチオール」の開発, フレグランスジャーナル, **38**, No.2, 49-53 (2010).
- 95) M. C. Landers, S. Law and F. J. Storrs, Permanent-wave dermatitis: Contact allergy

- to cysteamine hydrochloride, *Am. J. Contact Dermatitis*, **14**, 157-160 (2003).
- 96) K. Inoue, Y. Iwakiri, and T. Hatakeyama, Hair permeability, *Cosmet. & Toilet.*, **111**, 33-39 (1996).
- 97) 葛原亜起夫, 田畑 功, 堀 照夫, 顕微分光光度法によるチオグリコール酸およびL-システインの毛髪内部拡散挙動の研究, *繊維学会誌*, **59**, 128-132 (2003).
- 98) K. Suzuta, S. Ogawa, K. Fujii, K. Kaneyama, and K. Arai, Application of rubber elasticity theory to swollen hair for elucidating the disulfide cross-linked structure of cosmetically treated hair, *24th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists*, Osaka, PD-175 (2006).
- 99) C. Yamauchi, W. Okazaki, K. Inoue, and A. Sakaino, Enzymatic method for assessing hair damage with reduction and subsequent oxidation, *Sen'i Gakkaishi*, **63**, 33-38 (2007).
- 100) 坂部寛, 宮本武明, 稲垣博, 羊毛ケラチン Low-sulfur 成分タンパク質膜の延伸および熱処理に伴う構造変化, *繊維学会誌*, **37**, 273-278 (1981).
- 101) K. Arai and S. Arai, Grafting onto wool: 9. Alpha and beta forms in keratin-polymer system, *Int. J. Biol. Macromol.* **2**, 355-360 (1980).
- 102) 北野宏樹, 原子間力顕微鏡による毛髪内部組織への化学処理の影響について, *フレグランスジャーナル*, **37**, No.6, 49-53 (2009).
- 103) 大西一行, 坂野俊宏, 藤原延規, 毛髪の個人識別における FT-IR ダイアモンドセル法の応用, *衛生化学*, **39**, 247-250 (1993).
- 104) 山内 力, プロテアーゼを用いたパーマ毛の損傷評価, *毛髪科学*, No.106, 25-33 (2010).
- 105) S. B. Ruetsch, Y. Kamath, and H.-D. Weigmann, Photodegradation of human hair: An SEM study, *J. Cosmet. Sci.*, **51**, 103-125 (2000).
- 106) 上村洋一, 高井貴美恵, 安達 敬, 矢羽 薫, 吉岡一成, 毛髪の損傷評価法 (I) —多点引張試験法による毛髪の引張強度測定—, *J. Soc. Cosmet.*

Chem. Japan, **21**, 127-138(1987).

- 107) 中村圭一, 弱酸性カーリング剤「スピエラ[®]」の作用機序解析, 毛髪科学, No.106, 32-35 (2010).
- 108) 中村正樹, カラムクロマトグラフィーを用いた化粧品の迅速分析法, 科学と工業, **62**(2), 60-66 (1988).
- 109) 藤井敏弘, 高山俊輔, 伊藤弓子, 渡辺智子, 川副智行, 毛髪タンパク質フィルムを利用したパーマ液による損傷評価, 第35回日本化粧品学会一般研究発表要旨・討論, V-R20 (2010).
- 110) 勅使河原喬史, 渡辺智子, 藤井敏弘, 紫外線による毛髪ダメージの検出・定量化と毛髪ダメージを防御する水性製剤の開発, フレグランスジャーナル, **38**(11), 26-32 (2009).

研究業績

【1】 関連論文

1. C. Yamauchi, A. Mochizuki, K. Takayama, S. Suzuki, A. Sakaino, and W. Okazaki, Enzymatic approach to analyze the effects of mercaptans on hair, *J. Cosmet. Sci.*, **60**, 527-535 (2009).
2. C. Yamauchi, W. Okazaki, T. Yoshida, and A. Karasawa, Enzymatic Degradation of Keratin Films and Keratin Fibers Prepared from Human Hair, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 994-997 (2008).
3. C. Yamauchi and W. Okazaki, Application of an Enzymatic Method for Identifying Hair Treatments, *J. Health Sci.*, **53**(6),708-714 (2007).
4. C. Yamauchi, W. Okazaki, T. Yoshida, A. Karasawa, and K. Shimoda, Properties of Partially Extracted Hairs and their Degradability by Proteases, *Sen'i Gakkaishi*, **63**, 235-240 (2007).
5. C. Yamauchi, W. Okazaki, K. Inoue, and A. Sakaino, Enzymatic method for assessing hair damage with reduction and subsequent oxidation, *Sen'i Gakkaishi*, **63**, 33-38 (2007).
6. 山内 力, プロテアーゼを用いたパーマ毛の損傷評価, 毛髪科学, No.106, 25-33 (2010).

【2】 参考論文

1. 山内 力, 牛島ひろみ, 森田資隆, 村上裕二, 横山憲二, 民谷栄一, 毛髪ダメージ度の簡易評価法の検討, *Chemical Sensors (Proceedings of the 32nd Chemical Sensor Symposium)*, Kobe, Supplement A,17, 142-144 (2001).
2. 山内 力, ブラッシングによる枝毛発生に関する研究, すてきにヘアケア ('97ヘアケア読本Ⅲ), NOW企画, 東京, p.112-115 (1997).

3. 山内 力, 志村勝之, フーリエ変換赤外分光光度計による毛髪損傷の分析, 皮膚と美容, **24**(3), 27-33 (1992).
4. T. Iida, C. Yamauchi, and F. C. Chang, Reversed-Phase High-Performance Thin-layer Chromatography of Mono-, Di- and Trisubstituted Bile Acid Methyl Esters, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* ,**6**, 617-620 (1983).

【3】その他（学会発表等）

1. 山内力, 牛島ひろみ, 民谷栄一, 特開 2002-277462, ヘア損傷度の測定方法およびそのためのキット
2. 山内 力, 酵素プロテアーゼを用いたパーマ毛の損傷評価, 第1回毛髪科学技術者協会研究発表会 (2009).
3. 山内 力, 牛島ひろみ, 森田資隆, 村上裕二, 横山憲二, 民谷栄一, 毛髪ダメージ度の簡易評価法の検討, 2001年(春)電気化学会第68回大会, 3P21 (2001).
4. 黒瀬伸治, 牛島ひろみ, 山内 力, 森田資隆, 村上裕二, 横山憲二, 民谷栄一, 毛髪ダメージ度評価の簡便法の開発, 2001年電気化学秋季大会, P2K30 (2001).
5. 大田真子, 岡崎 渉, 山内 力, 法定色素分解菌のスクリーニングおよび部分精製酵素による分解について, 2004年度材料技術研究会討論会公演要旨集, p.77 (2004).
6. 寺井規哲, 勝又雅子, 山内 力, 岡崎 渉, ポリオキシエチレン型界面活性剤の微生物分解過程について, 日本農芸化学会 2002年度大会 大会要旨, p.233 (2002).
7. 寺井規哲, 山内 力, 勝又雅子, 岡崎 渉, ノニルフェノールエトキシレートにおける微生物分解過程について, 平成14年度日本生物工学会大会プログラム, p.143 (2002).

8. 岡崎 渉, 寺井規哲, 勝又雅子, 山内 力, 大熊廣一, 界面活性剤分解微生物の検索と微生物センサへの応用, 日本農芸化学会 2001 年度大会, (2001).
9. 杉山邦夫, 山内 力, アルキリデンマロン酸の光反応, 日本大学生産工学部第 19 回学術講演会, p.39-40 (1986).
10. 山内 力, 西岡 鑑, 松本太郎, 平井長一郎, 粗製ナタネ油の揮発性成分について, 日本大学生産工学部第 18 回学術講演会, p.45-46 (1985).

謝辞

本研究は多くの方々がかかわっています。始動したのは、北陸先端科学技術大学院大学で研究員として在籍した時であり、産学共同研究として始まりました。この時に出向をご許可いただきました株式会社アリミノ代表取締役社長田尾有一氏に深謝いたします。また、研究を進めるうえでコーディネートしていただきました取締役会長田尾兵二氏、取締役星野ゆり氏に深謝いたします。

北陸先端科学技術大学院大学では指導教授であった民谷栄一教授（現大阪大学）はじめ横山憲二助教授、教員の方々、実務をお教えいただきました博士後期過程の山村昌平氏ならびに学生の方々には大変お世話になりましたことを感謝いたします。また、研究を遂行する上で、株式会社ビーロードに出向して金沢市に在住しました。この期間に、株式会社ビーロード代表取締役社長彦田庸三氏はじめ取締役研究部長牛島ひろみ氏ならびに社員の方々にはいろいろとご便宜をいただきましたことを、ここで心よりお礼申し上げます。

国立大学法人群馬大学機器分析センター瀧上昭治准教授にはD S Cのデータを取って頂くと共に、実験データおよび毛髪に関するに関する有意義なディスカッションをしていただきましたことをお礼申し上げます。

化粧品コンサルタントT. J. L i n博士には貴重なご助言や英語報文の校正をしていただきましたことをお礼申し上げます。

リトル・サイエンティスト代表取締役工学博士野村恭稔氏、当社薬事管理室井上潔氏、当社狭山研究所岡野みのる氏、吉田禎氏、柄沢（境野）彩氏には実験データに関する有意義なディスカッションをしていただきましたことを大変感謝しております。

さらに、社内では、発表・報告会などの際に、東松山研究所、狭山研究所、本社マーケティング部の方々に有意義なご意見をいただきました。特に私

の所属する東松山研究所の境野敦氏はじめ研究員の方々には多大なご協力をいただきましたことを感謝いたします。

また、本論文および関連報文作成の際には家族の応援と支援がありましたことを感謝いたします。

さらに、本論文の作成に際しては、多くの方々のご理解とご協力を得ました。特に、東洋大学生命科学部道久則之教授、一石昭彦教授、長谷川輝明准教授には適切なアドバイスをいただきましたことをここで感謝いたします。

最後に、本研究の一部は東洋大学生命科学部の施設をお借りいたしました。そして、東洋大学生命科学部岡崎渉教授には、本研究を始めた当初より多岐にわたるご指導をしていただきました。また、英語報文の投稿に際しては、内容全般に関するディスカッションや丁寧な推敲をしていただきました。岡崎教授は、株式会社アリミノで短い期間でしたが上司としてご指導いただきました。さらに、その後も20年の間にわたり懇意にさせていただき、今回の学位取得に際しては、一方ならぬご尽力とご厚意を頂きましたことに大変感謝しております。

