

要旨

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

株式会社アリミノ 山内 力

パーマントウェーブ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は化粧品業界において重要な課題となっている。現在、毛髪の損傷を評価するには高価な装置を必要とし、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。本研究では、特別な装置を必要とせず操作が簡便な毛髪のプロテアーゼ処理に着目し、毛髪の損傷評価、構造解析および頭髪化粧品開発への利用を目的とした。

1. はじめに

毛髪は、15%前後のシスチンによって高度に架橋しているケラチンタンパク質である。組織的に、毛髪表面は鱗片状のキューティクルで覆われ、その内部の領域はコルテックスと呼ばれる。コルテックスは、シスチン約21%のマトリックス (Ma) およびシスチン約7%のマイクロフィブリル (Mf) と呼ばれるタンパク質から構成されている。

毛髪の損傷は、物理的要因、環境的要因、化学的要因に大別できる。本研究で焦点を当てた化学的要因は、2つの化学反応に関係する。1つはパーマントウェーブ (パーマ)、他はヘアダイあるいはブリーチである。

パーマは毛髪を変形させた状態で還元剤 (第1剤) を塗布して、シスチンをシステインに還元する。続いて酸化剤 (第2剤) によりシスチンを再形成させてウェーブを形成させる美容処理である。ヘアダイとブリーチは、同じ化学反応に基づいている。アルカリ性の第1剤と過酸化水素を含む第2剤を混合させて毛髪に塗布する。このとき、過酸化水素の分解を伴う酸化が主反応として起き、この酸化反応により毛髪の色調を変化させる美容処理である。

現在、毛髪の化学的損傷を評価する方法として走査型電子顕微鏡 (SEM) や破断強度の測定が汎用される。しかし、これらの方法は、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。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。処理は主に毛髪を

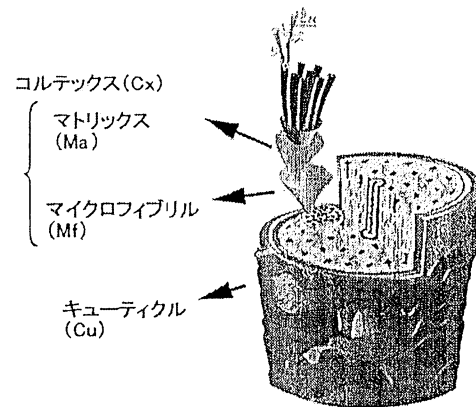


図1 毛髪繊維の階層構造模式図

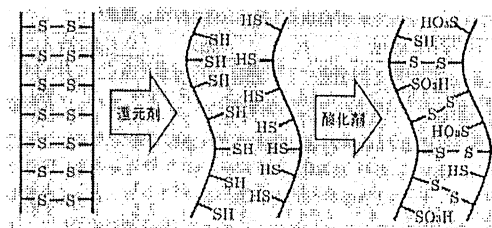


図2 パーマ処理によるシスチンの変化

0.05%Proteinase K あるいは 0.05%Pronase E 中で 37°C、96 時間インキュベートし、プロテアーゼ分解率（毛髪の減量率）あるいは SEM 観察により評価した。なお、用いたプロテアーゼの性質を表 1 に示した。

2. 毛髪のプロテアーゼ分解の特徴とその要因

プロテアーゼで分解されるパーマ毛の部位を調べることを目的とした。

まず、定性分析として未処理毛とパーマ 6 回処理毛の表面を SEM により観察したところ、形態的な差はわずかであった。そこで、プロテアーゼ処理後に SEM で観察したところ、未処理毛では若干分解が進行していたが、パーマ 6 回処理毛では著しく分解が促進していた。この結果、直接 SEM 観察では識別できない未処理毛と化学処理毛の差が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。

パーマ処理回数の上昇に伴う IR スペクトルの変化を調べたところ、Mf を構成している α -ヘリックスの吸収が減少し、 α -ヘリックス構造が崩壊したランダムコイルの吸収が増加していた。さらに、パーマ 6 回処理毛とヘアダイ 6 回処理毛を用いて、プロテアーゼによる分解部位をアミノ酸分析により解析したところ、Mf に一致することが分かった。以上の結果、毛髪は化学的な損傷が増すにしたがって、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た。

Mf の分解をモデルケラチンにより検証した。毛髪の主要構成タンパク質である Ma あるいは Mf は、2-メルカプトエタノール濃度の違いで選択的に抽出できる。そこで、抽出部および抽出残渣より 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、Mf リッチ繊維を調製した。同じ形状のケラチン同士を比較すると、Mf フィルムは Ma フィルムよりも分解率が高く、Mf リッチ繊維も Ma リッチ繊維よりも分解率が高かった。プロテアーゼ処理後にこれらの繊維を SEM 観察したところ、Mf が分解していると考えられる外観を呈していた。この結果、プロテアーゼは変性した毛髪ケラチンの Mf 部分を主に分

表 1 用いたプロテアーゼの性質

	Proteinase K	Pronase E
安定 pH	7.5~12.0	5.0~9.0
MW	18.5 kDa	34 kDa
熱安定性	60°C まで	70°C まで

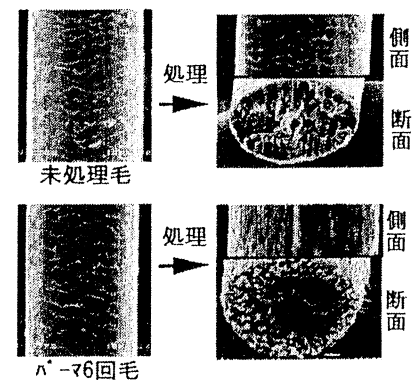


図 3 プロテアーゼ処理前後の毛髪の表面形態

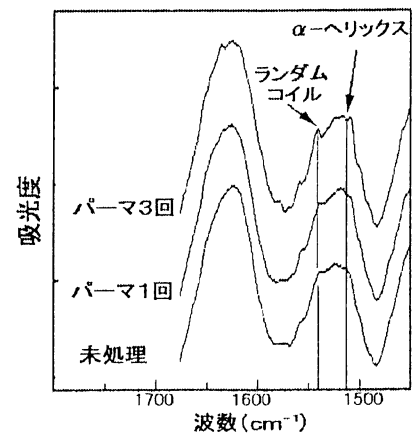


図 4 パーマ処理回数と IR スペクトル

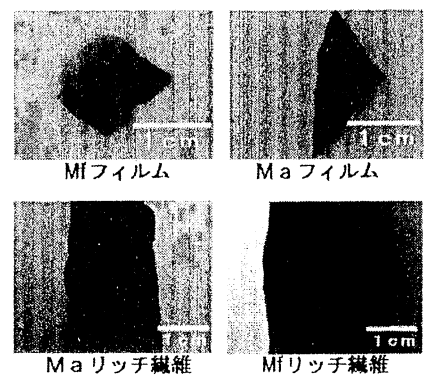


図 5 調製した 4 種類のモデルケラチン

解していると考えられた。

3. 還元剤処理毛のプロテアーゼ分解性

3種類の還元剤でパーマ毛を調製し、そのプロテアーゼ分解性の違いと要因を調べることを目的とした。チオグリコール酸 (TG)、システアミン (CA)、システイン (CYS) を用いて、毛髪のスチンを切断後にブロック化した還元毛、および再形成させたパーマ毛を調製した。還元毛とパーマ毛の分解性を比較し、パーマ毛の構造解析を行うことで、考察を行った。

還元時間とプロテアーゼ分解率の関係を図6に示した。還元毛とパーマ毛は、いずれの還元剤でも、還元時間の増加に伴って分解率が上昇した。また、いずれの毛髪も、処理時間に関係なく CYS 処理、CA 処理、TG 処理の順で高くなった。パーマ毛と還元毛を比較してみると、パーマ毛の分解率が低かった。これは、パーマ処理におけるシステインの再形成の影響と考えられた。

しかし、パーマ毛でも還元時間の増加に伴って分解率が緩やかに上昇することから、構造の変化が起きており、この変化は酸化処理では元に戻らないことを示唆している。

3種類のパーマ毛を SEM で観察したところ、CYS パーマ毛、CA パーマ毛、TG パーマ毛の順番で分解が促進していることが分かった。また、CYS パーマ毛、CA パーマ毛、TG パーマ毛の分解率は 16.2%、16.9%、19.2%であり表面形態を反映していた。さらに、これら3種類のパーマ毛のX線回折によると、TG パーマ毛では、 α -ヘリックスの減少が大きいことが分かった。従って、TG パーマ毛が他のパーマ毛に比べて分解率が高かった理由は、 α -ヘリックス部の変性が高いことが原因と考えられた。

4. 異なる化学処理毛のプロテアーゼ分解性

パーマ毛とヘアダイ毛の損傷の違いに関しては研究例がないことから、この2種類の毛髪の比較検討を目的とした。まず、定量分析としてプロテアーゼ分解率を比較したところ、パーマ毛、ヘアダイ毛はいずれも損傷度(処理回数)が上昇すると、プロテアーゼ分解率も上昇した(図8)。プロテアーゼ分解率と毛髪の化学的損傷

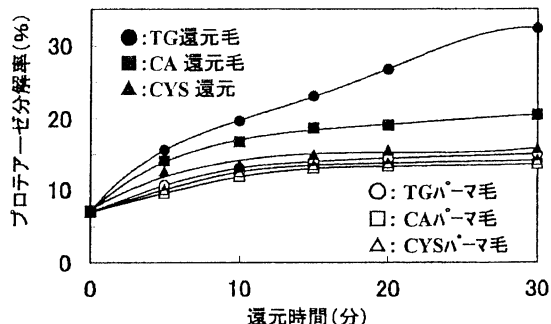


図6 還元時間の変化とプロテアーゼ分解率(2剤処理15分)



図7 プロテアーゼ処理後のパーマ毛(3回処理)の表面形態

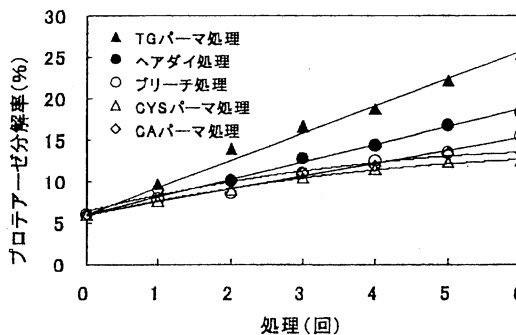


図8 化学処理の回数とプロテアーゼ分解率との関係
n=3, 平均値±標準偏差

は、相関していることから、プロテアーゼ分解率が損傷の指標になると考えられた。

次に、一般的な条件でパーマ毛とヘアダイ毛を調整して SEM 観察したところ、形態的な差は認められなかった (図 9)。そこで、プロテアーゼ処理後に SEM 観察したところ、ヘアダイ毛よりもパーマ毛での分解が促進することが分かった。また、プロテアーゼ分解率もパーマ毛で高いことが分かった。

異なる損傷度のパーマ毛およびヘアダイ毛の分解率と水分吸収率との関係を調べたところ、パーマ毛とヘアダイ毛は異なる領域にプロットされた。同じ分解率で比較した場合、パーマ毛はヘアダイ毛よりも著しく水分保持率が高いことが分かった (図 10)。この結果は、同じ程度の分解率ではパーマ毛がヘアダイ毛よりも水分を含みやすいことを示している。

パーマ毛およびヘアダイ毛の分解率と破断強度との関係を調べたところ、パーマ毛とヘアダイ毛は、異なる領域にプロットされた (図 11)。同じ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低かった。この結果は、同じ分解率ではパーマ毛がヘアダイ毛よりもろいことを示している。

このように、プロテアーゼ分解率と他の損傷の指標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。

5. 頭髪用化粧品開発などへの利用

プロテアーゼ分解率を応用することを目的とした。まず、損傷度の異なるヘアダイ毛を調製し、汎用される破断強度とプロテアーゼ分解率との関係を調べた。図 12 に示したように、破断強度とプロテアーゼ分解率との間には、高い相関関係が認められた。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が著しく小さいことから、

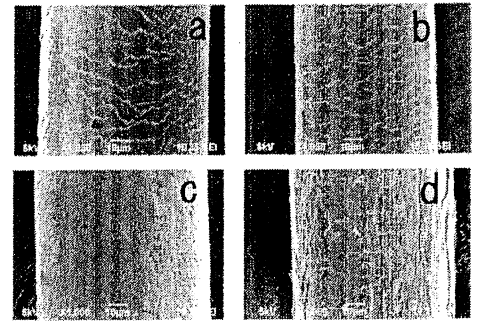


図 9 プロテアーゼ処理前後の化学処理毛
ヘアダイ 4 回毛：処理前 (a) および処理後 (c)
パーマ 4 回毛：処理前 (b) および処理後 (d)

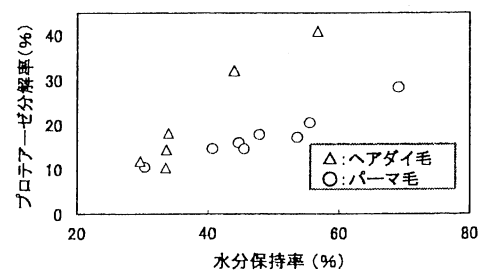


図 10 水分保持率とプロテアーゼ分解率の関係

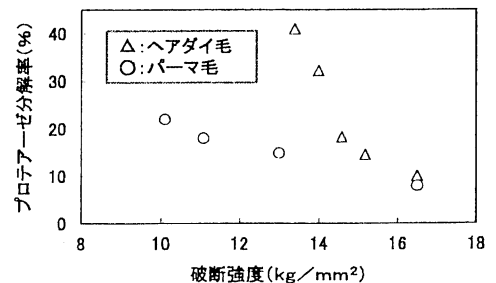


図 11 破断強度とプロテアーゼ分解率の関係

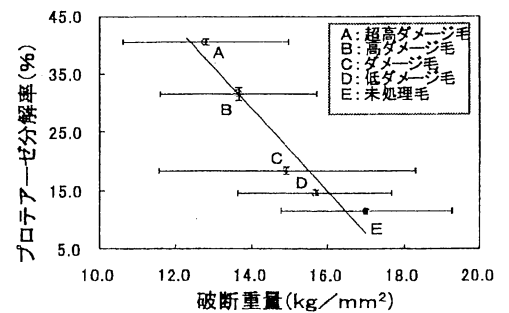


図 12 異なるヘアダイ毛における分解率と破断重量
プロテアーゼ分解率 (n=3, 平均値±標準偏差)
破断重量 (n=10, 平均値±標準偏差)

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た。

次いで、パーマ処方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。先ず、異なる界面活性剤 (SAA) を配合したパーマ第1剤の影響を調べた。図13に示したように、アニオン、ノニオン界面活性剤配合系で処理した毛髪は、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処理した毛髪は分解率が上昇し、カチオン界面活性剤配合系では分解率が減少した。このように、TG パーマ第1剤に配合される界面活性剤のイオン性によって毛髪の損傷が異なることが明らかとなった。続いて、市販パーマ第1剤56製品(28社)に配合されるSAAのイオン性を調査したところ、カチオン界面活性剤がもっともよく使用されていることが分かった。これは、官能的に滑りがよくなることと、柔らかさを感じることを配合の目的と考えられる。

次いで、CAパーマ第1剤のpHを変化させて処理した毛髪の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、汎用されるSEM、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。SEM観察ではpH9.5で処理された毛髪でわずかにキューティクルの浮き上がりが観察されたが、他の毛髪と比較すると優位な差ではなかった。図14に示した破断強度の比較では、パーマ処理により破断強度が低下した。また、pHの上昇に伴って破断強度も緩やかに低下したが、官能評価の結果を裏付ける知見は得られなかった。一方、プロテアーゼ分解率で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。一般消費者は損傷を官能として知覚することから、プロテアーゼ分解率は実用的な損傷評価法であることが分かった。

次に、自然風化毛への利用を試みた。自然風化毛は長期間の環境要因による損傷を受けた毛髪である。環境要因による損傷は日照射、洗髪・タオルドライ時の摩擦、ドライヤーの熱などであり、毛先方向での損傷が蓄積されている。まず、従来の損傷

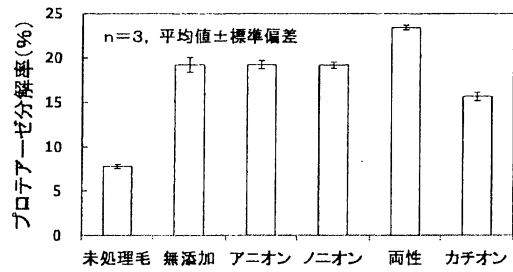


図13 1%界面活性剤配合のTG第1剤に続き第2剤で3回処理したパーマ毛髪の分解率

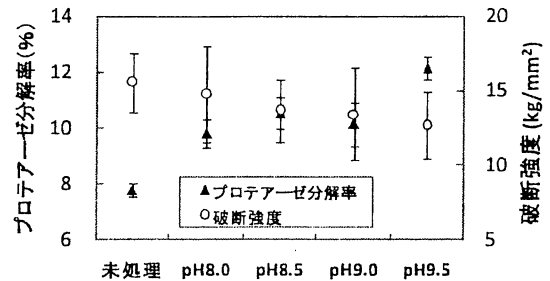


図14 pHの異なるCA第1剤に続き第2剤で5回処理したプロテアーゼ分解率(n=3, 平均値±標準偏差) 破断重量(n=10, 平均値±標準偏差)

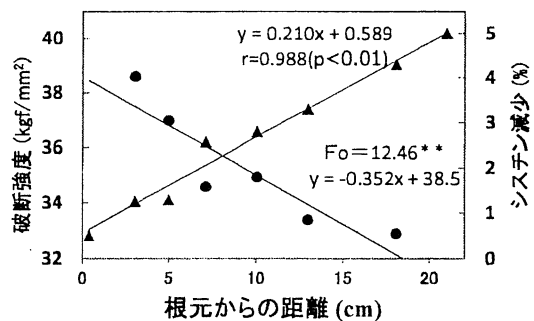


図15 従来法を用いた自然風化毛の損傷評価

評価による自然風化毛の例を図15に示した。破断強度を用いた場合毛先方向で判断強度が低下しており、シスチン減少(アミノ酸分析)を用いた場合も毛先方向でシスチン量が減少しており、毛先方向での損傷が高いことを示している。

一方、プロテアーゼ分解率を用いた場合の損傷評価を図16に示した。毛髪は、美容院で2か月に1度パーマ施術あるいはヘアダイ施術を行っている毛髪、および化学処理の履歴のない被験者の毛髪を用いた。パーマ、ヘアダイ施術者の毛髪では、根元部分に比べて毛先部分での分解率が高くなり、毛先方向で損傷が高いことを示していた。他方、化学処理の履歴のない毛髪では、いずれの部位でも分解率に差は認められなかった。この結果、従来法では不可能であった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。従来の手法で常に検出される未処理毛の毛先方向の損傷は、Mfの変性には関与しないと考えられることから、毛先方向でのプロテアーゼ分解が促進しなかったと考えられる。

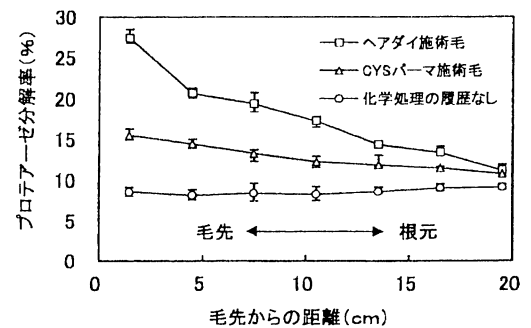


図16 プロテアーゼを用いた自然風化毛の損傷評価

6. まとめ

プロテアーゼ処理を利用した本方法は毛髪の損傷評価、構造解析および頭髪化粧品開発におけるルーチン分析として実用的であることが明らかとなった。本方法の新規性および従来法に対して優れている点は以下のようにまとめることができる。

1. 化学処理によって毛髪中の α -ヘリックス部が変性する。この部分をプロテアーゼが分解することが本方法における損傷検出の原理と考えられる。
2. 直接SEM観察では毛髪の化学損傷の差が識別できないが、プロテアーゼ処理を併用すると明瞭に識別できる。
3. プロテアーゼ分解率は特別な装置を必要とせず、数値で測定でき、測定誤差が極めて小さかった。また、毛髪損傷の指標になることから、ルーチン評価法として実用的と考えられる。
4. プロテアーゼ分解率は官能評価を反映することから、頭髪化粧品の毛髪に対する損傷評価を行う上で実用的である。
5. 化学処理の履歴のない自然風化毛のプロテアーゼ分解率は、どの部位を測定しても一定であった。この結果、従来法では不可能であった化学処理の履歴が識別できることが分かった。