

セルフリサイクルから代替毛髪デバイスの開発

— ヘアケアサイエンスへの応用 —

藤井 敏弘

信州大学 繊維学部 応用生物学系

1. 背景

自然科学の最近の最大トピックスとして、人工多機能性幹細胞 (iPS) の樹立とその応用があげられる。この功績が認められ2012年のノーベル生理学・医学賞に京都大学の山中伸弥教授が受賞されたことは、多くの日本人に勇気や希望を与えるニュースであった。これは「自分由来の細胞で、自分を治療する技術」であるため、移植医療に代わる再生医療として注目され多額の予算が投入されている。一方、2010年度の「国民医療費」は37兆円におよぶと報道されており、前年度と比べて約1.4兆円以上もの増加となっている。この原因として注目すべき点は、高齢者の増加による部分よりもCT、MRI、内視鏡などの診断や治療に使用している「高度医療技術」による治療費が挙げられている。iPS細胞やES細胞から作られる細胞、セルシート、組織などが治療に利用できるようになれば臓器移植を待つ人々にとっては福音となるが、さらなる高額な医療費を国民に負担させることになる。このため、低コストで品質の高い医療用の材料と診断・治療技術が社会的に求められる時代となってきている。

「セルフリサイクルとは、動物や他者の生体組織・材料を使わず、本人由来の生体物質（組織、成分）を原料として、本人が使用するためのしくみ」と定義した。この概念を2002年から提唱して、これを実証する研究・開発を進めている [1, 2]。この原材料として想定できる毛髪、爪、血液などの中で、特に毛髪

に注目した。この理由として、毛髪は多くの人にとって廃棄している生体物質であることに加え爪と比べて大量に入手が可能である。これをフィルム、ゲル、微粒子、ファイバーなどへと加工する技術を開発すれば、安全・安心で生体適合性に優れた医用基材への開発につながると考えた。この概念に基づいて作られるものを“セルフリサイクル製品”、また、必要な技術を“セルフリサイクル技術”と呼んでいる。

一般に毛髪の役割は、①各種刺激からの内部組織の保護（暑さ寒さに対する防御、外部からの衝撃に対する防御、メラニン色素による紫外線からの防御）、②生理機能（水銀や砒素などの毒物の排泄、老廃物の皮膚を通しての排泄、感覚機能）、③ファッション（男女の魅力のポイント、アンチエイジング）。これ以外に「生物資源」の要素が重要になってくると私たちは考えている。

この根拠として、下記に示すように毛髪が多くの特性をもっているからといえる。①痛みを伴わず、特定の個人から採取ができる。②再生産される組織である。③日本で生合成している毛髪量を試算すると約20トン/日もあり、世界では1,000トン/日を越えている。④血液を含む他の生体組織と比べて、含水量が20%未満と極端に低く、タンパク質に富んでいる。⑤冷凍・冷蔵設備などが不要で、長期間の保存も容易である。切断された髪の毛はゴミとして廃棄処分されているが、私たちはこれを「もったいない」という考えから資源と

して考えて、セルフリサイクルというコンセプトを創った。

2. 毛髪ダメージとなぜケラチンフィルムは必要か

ヘアケア関連製品の開発において、正確なヘアダメージの評価は必須である。今までの研究開発においては2つの大きな問題点があった。

①実験材料が毛髪自体であるため、人種、民族、国、地域、個人、頭の部位のみならず1本の毛髪においても根元と毛先では異なる不均一な試料といえる。このため、正確なダメージ評価には膨大な数の実験データを必要としている。

②ダメージ評価は、表1に示すように人の触覚や形態学的方法が用いられているため、感度は高いが定量性どころか数値化が困難で、再現性が低い。

表1 ヘアダメージの分析・評価方法

ダメージ評価法
官能（視覚・触覚など）
キューティクルの形態
毛髪内部の形態
機械的特性
タンパク質構造の変化
カルボニル形成
システイン酸形成
タンパク質の溶出

このため、均一性の高い毛髪試料あるいは代替毛髪が必要とされている。これに、簡便で数値化できるダメージ分析・評価する手法が求められている。これらのニーズに応えるために、毛髪タンパク質の効率的な可溶化とフィルムへと転換する技術を利用してケラチンフィルムを作製し、代替毛髪とした。毛髪がもつ3次元構造とは異なり、2次元のフィルムは取り扱い面においても優れていた。また、毛髪試料で生じているダメージ現象の多くはフィルムにおいても高感度で再現されることを報告しており、ヘアダメージの分析・評価に利用できることを明らかとしてきている [3]。

3. 信大法とケラチンフィルムの形成

毛髪ケラチンを利用するために私たちは信大法と呼んでいる可溶化方法を開発した [14]。この方法は、毛髪、爪、羊毛などの硬ケラチンを含む組織に有効で、タンパク質分解がほとんどないケラチン（毛髪タンパク質）溶液を短時間で簡便に調製することが可能である。過去にヘアカラー・パーマなどのケミカル施術履歴のない毛髪を用いて信大法によりタンパク質を可溶化した。

ケラチンを含めた中間径フィラメントに属するタンパク質群は変性剤を使用して脱重合させた後でも、自己集合能を保持している。溶液条件により再重合を促し元のフィラメントを形成させることができる。ケラチン溶液

表2 ケラチンフィルムを使用したヘアダメージ評価のまとめ

要因	測定対象	ケラチンフィルム	毛髪との比較
紫外線	カルボニル形成	◎	約10倍
ブリーチ (H ₂ O ₂)	カルボニル形成	◎	約10倍
	システイン酸形成	◎	約10倍
パーマ	透明性	◎	特有の反応？
	溶出性	◎	2,000倍以上
熱	色差	◎	同じ
	溶出性	◎	約2倍

は各種変性剤との組合せや pH を下げることで、凝集体を誘導してフィルム状に成型することができる。方法や溶液の組合せから、プレキャスト法、ポストキャスト法、ソフトポストキャスト法と命名した [1, 2, 5]。これらのフィルムを再度信大法溶液で可溶化するとケラチン、低分子量のケラチン結合タンパク質 (KAPs)、高分子量タンパク質を主成分としており、目立った分解は見られなかった。

ここでは、ケラチンフィルムを培養シャーレにプレキャスト法を用いて作製したものを使用した。このフィルムは滑らかな表面をしており、ベージュ色を帯びた白色で不透明である。その微細構造は、直径が $1\mu\text{m}$ 以下の粒子がフィラメント様に集合してスポンジ状の網目構造を作っていることが SEM で観察される (図 1)。よほど強く指で触らなければ剥がれ落ちや指に粉体が付くことはないため、様々な実験に耐えられることを明らかとしてきている。

4. ケラチンフィルムを利用したヘアダメージの評価

毛髪のダメージ要因である ①紫外線、②ブリーチ、③パーマ、④熱処理が引き起こしている代表的なダメージの分析結果を、毛髪試料と比較して紹介する。

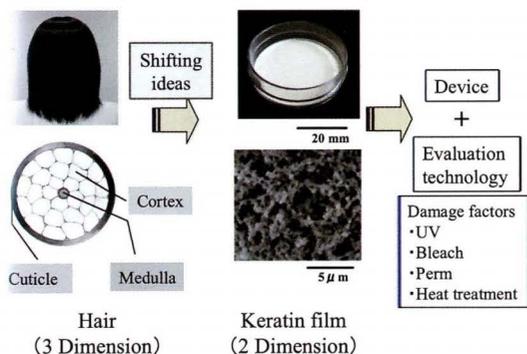


図 1 ヘアダメージの分析・評価の流れ

4.1 紫外線

紫外線照射によって皮膚に生じるカルボニル基は、これに特異的に結合する蛍光試薬 (fluorescein-5-thiosemicarbazide) を用いて測定されている [6]。この手法を毛髪試料とケラチンフィルムにあてはめ蛍光顕微鏡で観察したところ、照射時間に比例して蛍光強度は増大した。蛍光顕微鏡で得られた像を画像処理して数値化することもできた。しかし、毛髪試料の特性である不均一性と3次元であることから、多くのサンプル数と測定数を必要とすることが問題であった [7]。ケラチンフィルムを使用すると毛髪試料と同様に照射時間に比例して蛍光強度は顕著に増大し、高い相関 (係数0.95 以上) を示した (図 2)。毛髪を使用した場合と比較して、フィルムでの感度が約10倍高くなり、再現性もよいことを明らかとした。真夏の30分に相当する紫外線曝露によって生じるカルボニル化タンパク質の検出に成功している。また、データの再現性と取り扱いにおいてもフィルムの方が毛髪試料よりも優れていた [8, 9]。省力化のために、現在は蛍光プレートリーダーを使用して測定をしている。

4.2 ブリーチ (酸化)

システインを大量に含むことがケラチンの特性であり、シスチンを形成して安定なファ

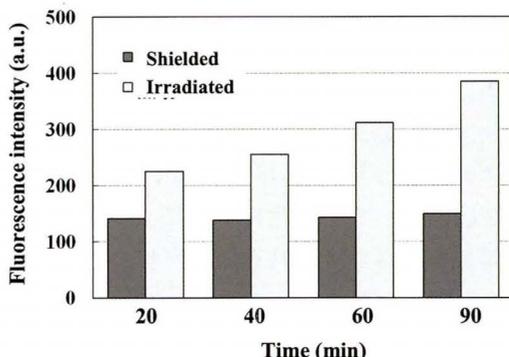


図 2 紫外線照射によるケラチンフィルムのカルボニル化タンパク質の生成

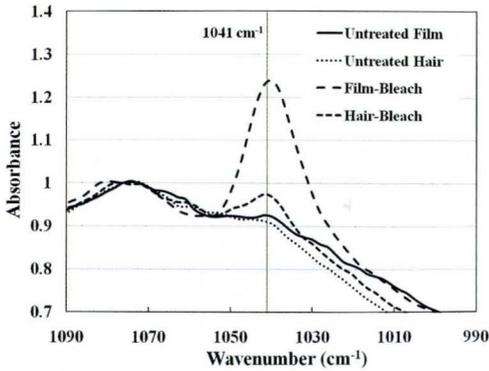


図3 プリーチ処理前後のケラチンフィルムと毛髪試料のFT-IRスペクトル

イパー構造を作っている。ブリーチ剤などによる酸化処理により、ジスルフィド結合が酸化してダメージ分子のシステイン酸が生じることが知られている [10, 11]。FT-IR を使用してシステイン酸の形成を調べた (図3)。未処理毛髪とフィルムではほとんど検出できないが、3%の過酸化水素水を含むブリーチ剤で処理すると、システイン酸に相当する1041 cm^{-1} 付近にピークが出現した。ケラチンフィルムの方が毛髪試料と比べて5倍以上も感度が高かった [3, 12]。ケラチンフィルムと毛髪の FT-IR スペクトルは非常に類似していることから、ケラチンフィルムは毛髪試料の代替となる証拠のひとつが示された。

4.3 パーマ (還元-酸化)

パーマ施術は還元剤と酸化剤の組合せの2段階でなされている。第1段階では、還元剤処理によりケラチンフィラメント間などにあるシスチンのジスルフィド結合を切断して、システインとする。ヘアスタイルを整えた後、第2段階として、酸化剤処理によりシステイン間を再結合させて共有結合を作り、フィラメント構造を安定させて髪型を固定する。

パーマ還元剤で多用されているチオグリコール酸溶液で毛髪を処理すると、ケラチンは溶出しませんが、ユビキチン (7kDa) や S100 (10

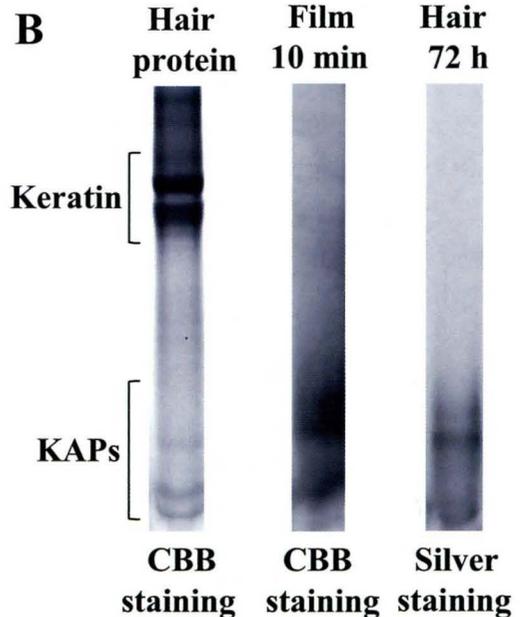
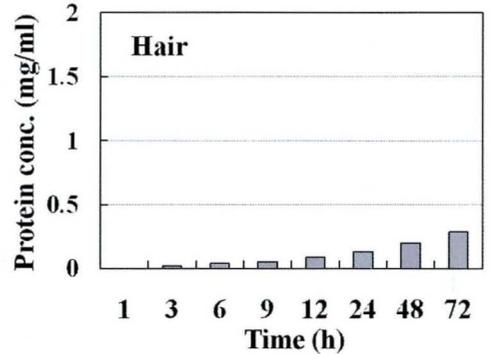
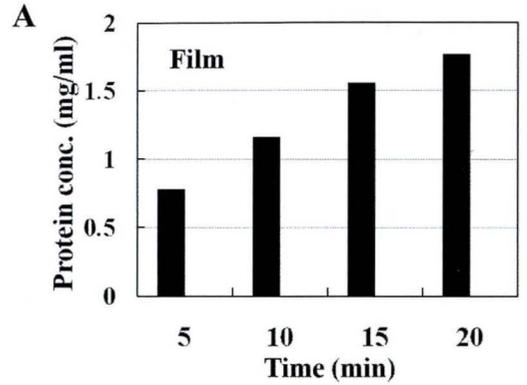


図4 パーマ還元剤 (チオグリコール酸 ; TGA) によるタンパク質の溶出 (A) とトリシン /電気泳動 (B)

kDa)といった低分子量タンパク質と KAPs が外溶液に回収される [13]。このことは、毛髪内で-SS-結合の解離とともにフィラメント構造が壊され、タンパク質の不可逆的な溶出が生じることが想定される。この現象はヘアダメージの指標と考えられる。ケラチンフィルムを使用して400 mM チオグリコール酸で処理した場合、毛髪試料と同様に大部分を構成しているケラチンの溶出は見られないが低分子量 KAPs の溶出が見られた (図4)。興味深いことに、毛髪では数日かかっている溶出量がケラチンフィルムでは 5分以内に溶出ができるため、約2,000倍も感度が高い代替毛髪であることが示された [3, 14, 15]。さらに、電気泳動での検出は毛髪からのサンプルは高感度な銀染色が必要であるのに対して、フィルムからのサンプルは通常のクマシーブリリアントブルー染色で行えるため、簡便であった。

上記したようにケラチンフィルムは不透明な淡ベージュ色で、微細なネットワーク構造から作られている。還元処理によりケラチンフィルムは透明性が生じ、下に置いた文字が肉視で判読できるようになる [14-16]。この透明化にともない、微細なネットワーク構造が崩れ、より滑らかな構造体へと変化する。次に、還元処理後のフィルムに酸化処理を施すと、興味深いことに、還元処理により透明化したフィルムは白色で不透明フィルムへと戻った。また、未処理ほど明確ではないが、ネットワーク構造の再構築が観察された。この結果は、フィルム外観の透明性の変化と網目構造の消失・再構築とが関連しているものと考えられた。この可逆的变化は数回繰り返すことができることから、パーマ効果の指標となることが期待されている。

4.4 熱

ヘアアイロンやドライヤーが引き起こす熱ダメージの分析は、毛髪キューティクルの形態観察で主に行われているため定性的な評価

が主となっている。耐熱シャーレ内で作製したケラチンフィルムは200℃、60分までの加熱処理に耐えられるため、毛(白)髪と比較することができる。熱における反応性においてもケラチンフィルムと毛髪試料は類似した色の変化が生じる。加熱処理後の両サンプルを還元剤と変成剤を含む溶液を使いタンパク質の溶解性が調べたところ、温度に依存して溶解量が低下することを見出している。この変化量はフィルムが約2倍高く、直線性がある温度範囲が広いことが明らかとなった。これに関しては本誌に詳しく述べているので、詳細は省略する [17]。

5. まとめ

ヘアケア関連製品の開発のためのテスト用毛髪は、ボランティアや販売会社から提供されている。未処理の毛髪、特にまとまった量の同一人物由来の毛髪の入手は困難となってきた。さらに、ヒトを含め動物試験を使って開発した化粧品の販売は、EU 諸国では既に禁止されている。このため代替毛髪・代替皮膚の開発と新しい試験方法が益々求められていくことが予測される。

紫外線、ブリーチ(酸化)、パーマ(還元と酸化)、熱の4つのダメージ要因がケラチンフィルムと毛髪試料に与えている影響を表2にまとめた。還元剤で処理を受けたときの透明化と微細構造の変化以外はいずれも毛髪試料で反応する現象がケラチンフィルムでも見られた。熱による溶解性は約2倍であるが、紫外線によるカルボニル形成とブリーチによるシステイン酸形成は約10倍、パーマ還元による KAPs の溶出量は約2,000倍とケラチンフィルムを使用すると、高感度あるいは短時間で検出できた。このことは、毛髪で生じている初期段階のダメージを分析・評価できることから、新たなコンセプトをもつ製品開発や新規の機能原材料のスクリーニングに利用できる。いずれのダメージ要因に関しても、より

均一なケラチンフィルムから得られるデータの再現性は高かった。また、シャーレ内で多くの反応が行えるため作業効率が高く、取り扱いの面からも利便性の高いデバイスといえる。

日常生活の中でのヘアダメージは複数の要因が相加的、時には相乗的に加わり生じている。私たちは、加熱処理をした後のケラチンフィルムへのパーマ1剤処理が引き起こす透明性や低分子量 KAPs の溶出を調べたところ、100°C以上で加熱処理したフィルムにおいては、未加熱フィルムと比べて透過性や溶出量が抑えられることを見出している [18]。このことは、アイロンなどの高熱で処理されている頭髮においては、そのパーマ効果が低下することをフィルムの特性から検出している可能性を示唆した。

パーソナルユースと廃棄毛髪を資源と見なす発想から始めた“セルフリサイクル研究”はケラチンフィルムという作品となった。これは多くの人達の毛髪を混ぜて使用した平均的な毛髪を具現化しているため、発想を再転換させることにより創り出された。一連のモノづくりと分析技術の確立の中で、剥離型ケラチンフィルムの作製に成功している。これを、人工皮膚へと昇華させることができれば、化粧品分野のみならず医用材料としての応用が期待できる。

謝 辞

本研究の一部は、基盤研究 (B) の助成を受けたものである。本研究の遂行に尽力していただきました伊藤弓子 研究支援推進員へ深謝致します。

【参考文献】

- [1] 藤井敏弘, バイオインダストリー, 19, 5-10 (2002)
- [2] 藤井敏弘, 小林俊一, 日本化粧品学会誌, 30, 5-9 (2006)
- [3] Fujii T., J. Biol. Macromol., 12, 3-15 (2012)
- [4] Nakamura A., Arimoto M., Takeuchi K., and Fujii T., Pharm. Bull., 25, 569-572 (2002)
- [5] Fujii T., Ogiwara D., and Arimoto M., Biol. Pharm., Bull., 27, 89-93 (2004)
- [6] Fujita H., Hirao T., and Takahashi M.: Skin Research and Technology, 13, 84-90 (2007)
- [7] Kawasoe T., Watanabe T., and Fujii T., J. Jpn. Cosmet. Sci., 34, 287-291 (2010)
- [8] Kawasoe T., Watanabe T., and Fujii T., J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn 45, 100-107 (2011)
- [9] 川副智行, 藤井敏弘, コスメティックステージ, 4(6), 26-32 (2010)
- [10] Kon R., Nakamura A., Hirabayashi N., and Takeuchi K., J. Cosmet. Sci., 49, 13-22 (1998)
- [11] Signori V. and Lewis D. M., Int., J. Cosmet. Sci., 19, 1-13 (1997)
- [12] Fujii T. Ito Y., Watanabe T., and Kawasoe T., J. Cosmet. Sci., 63, 15-25 (2012)
- [13] Inoue T., Ito M., and Kizawa K., J. Cosmet. Sci., 53, 337-344 (2002)
- [14] 藤井敏弘, フレグランス ジャーナル, 39, 26-32 (2011)
- [15] Kawasoe T., Takayama S., Ito Y., and Fujii T., J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc., 35, 306-311 (2011)
- [16] 大久保和美, 田中智也, 川副智行, 伊藤弓子, 藤井敏弘, 毛髪科学, 110, 20-23 (2012)
- [17] 藤井敏弘, 伊藤弓子, 毛髪科学, 110, 14-19 (2012)
- [18] 藤井敏弘, フレグランス ジャーナル, 40, 55-60 (2012)



プロフィール

氏 名：藤井敏弘

所 属：信州大学繊維学部応用生物学系 教授

連絡先：長野県上田市常田 3-1 5-1

TEL：0268-21-5518 FAX：0268-21-5511

e-mail: fujii1@shinshu-u.ac.jp

略 歴：名古屋市立大学大学院医学研究科博士後期課程単位修得退学
博士（医学）、信州大学助手、Baylor 医科大学へ留学、信州大
学助教授を経て現職

専門分野：生体高分子、生体材料工学、タンパク質工学