

ケラチンフィルムを用いた還元剤・酸化剤処理の評価

○大久保和美^{*1}、田中 智也^{*1}、川副 智行^{*1}

伊藤 弓子^{*2}、藤井 敏弘^{*2}

^{*1}株式会社 資生堂、^{*2}信州大学 繊維学部

1. 緒言

パーマ施術では、第1剤の還元作用により毛髪内のジスルフィド(SS)結合を切断し、続く第2剤の酸化作用により切れたSS結合を再結合させる。毛髪内部での還元・酸化作用は、毛髪のウェーブ形成やダメージ発生に影響を及ぼすため、パーマ処理毛髪を用いた詳細な研究がなされてきている¹⁾。しかしながら、毛髪は簡単に採取でき処理・加工も容易であるが、個体差や損傷履歴によるバラつきが精査な実験を行う上で問題になる。これを解決するために、我々は毛髪抽出タンパク質をフィルム状に自己集合させたケラチンフィルムを毛髪モデルとして提案している^{2,3)}。このケラチンフィルムは、毛髪と同様にケラチンとケラチン関連タンパク質(KAPs)より構成され、同じ性質を示すフィルムを大量に作製できる。この利点を活かすのに加え、短時間の紫外線曝露による毛髪タンパク質の酸化²⁾や、ブリーチによるシステイン酸³⁾を簡便で高感度に検出できることを見出している。

今回、我々は還元剤/酸化剤の濃度変化及び繰り返し処理によるケラチンフィルムの立体構造の変化を、フィルムの透過性、SEMによる観察、FT-IRによる構造解析により検討した。

2. 実験

2.1 ケラチンフィルムの作製と還元・酸化処理

毛髪タンパク質は化学処理履歴のない日本

人毛髪から信大法⁴⁾を用いて抽出した。ケラチンフィルムはこのタンパク質溶液を用いて、酢酸によるプレキャスト法⁵⁾でプラスチックシャーレに作製した。

0-400 mM チオグリコール酸ナトリウム(TG)溶液(pH 9.4)、0-50 mM 臭素酸ナトリウム(BR)溶液(pH 7.0)で還元/酸化処理(25°C、10分)を行った。

また、400 mM チオグリコール酸アンモニウム(ATG)溶液(pH 9.0)、500 mM BR溶液(pH 6.5)で還元/酸化処理(25°C、10分)を1~5回繰り返し行った。

2.2 SEM 観察

処理後のフィルムは外観を肉視で微細構造を走査型電子顕微鏡 S-2000 (株日立 社製)で観察を行った。

2.3 透過度測定

分光光度計 U-3010 (株日立 社製)により可視領域(380~750 nm)におけるケラチンフィルムの透過率を測定し、その平均値を透過度とした。

2.4 FT-IR 測定

還元処理、還元・酸化処理を繰り返し行ったケラチンフィルムを FT-IR (ATR 法) Nicolet MAGNA-IR 560 (Thermo (株) 社製)による分析を行った。アミド I (1650 cm⁻¹付近)の計測結果からタンパク質二次構造解析ソフト IR-SSE (日本分光(株) 社製)を用いて二次

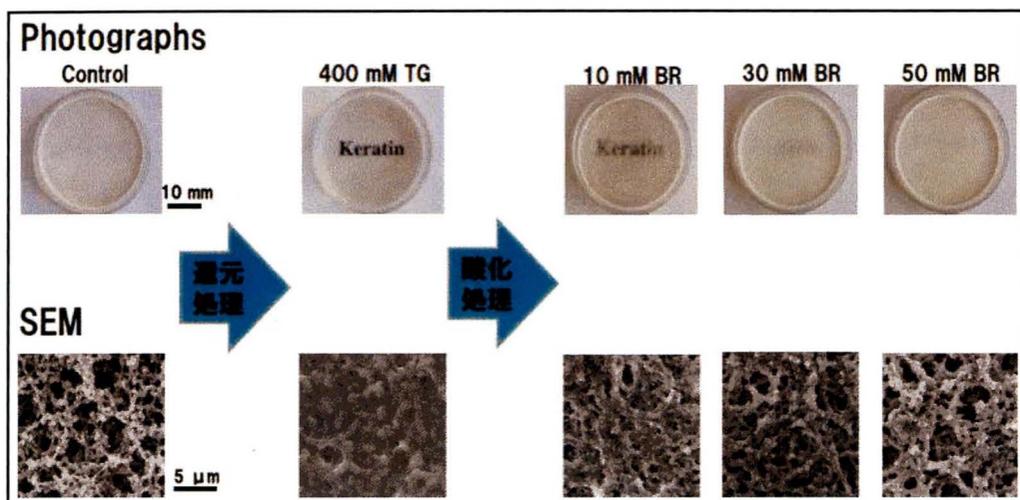


Fig. 1 還元・酸化処理によるケラチンフィルムの形態

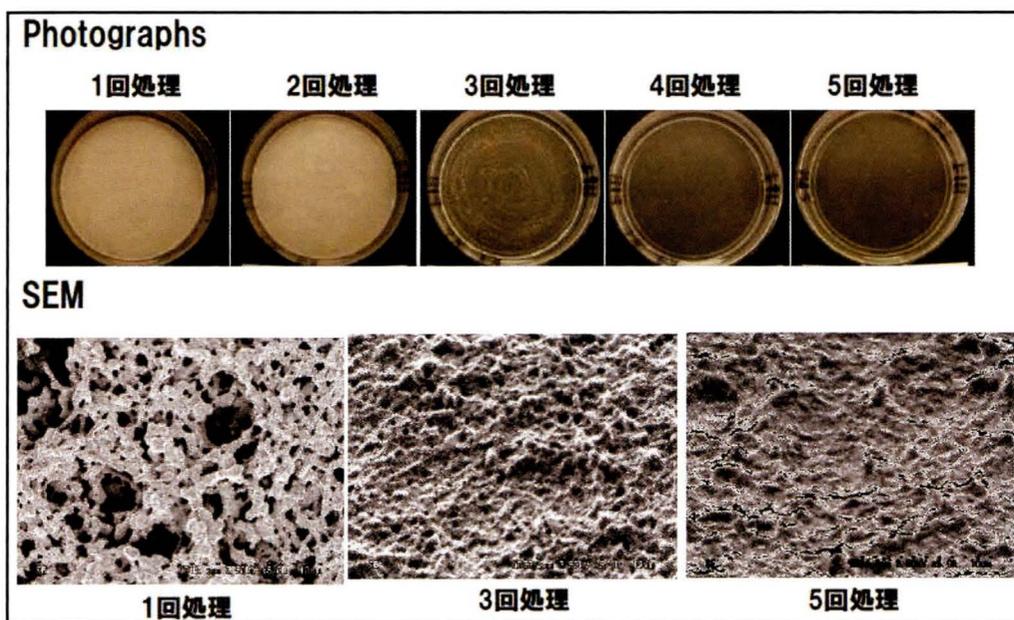


Fig. 2 繰り返し処理によるケラチンフィルムの形態

構造の割合を算出した。

3. 結果

3.1 SEM 観察

3.1.1 還元剤・酸化剤濃度による影響

ケラチンフィルムを、0-400 mM TG 溶液、400 mM TG 処理後に0-50 mM BR 溶液で処理し、外観と SEM 像による観察を行った。不透明で白色のケラチンフィルムは顆粒状構

造体を伴う網目状の立体的な微細構造が確認された。フィルムは還元剤により濃度依存的に透明となり、顆粒状構造と網目構造が消失した平滑構造へと変化した。興味深いことに、還元処理により透明であったフィルムは、酸化処理により濃度依存的に不透明へと変化して、顆粒状構造と網目構造が再構築された (Fig. 1)。

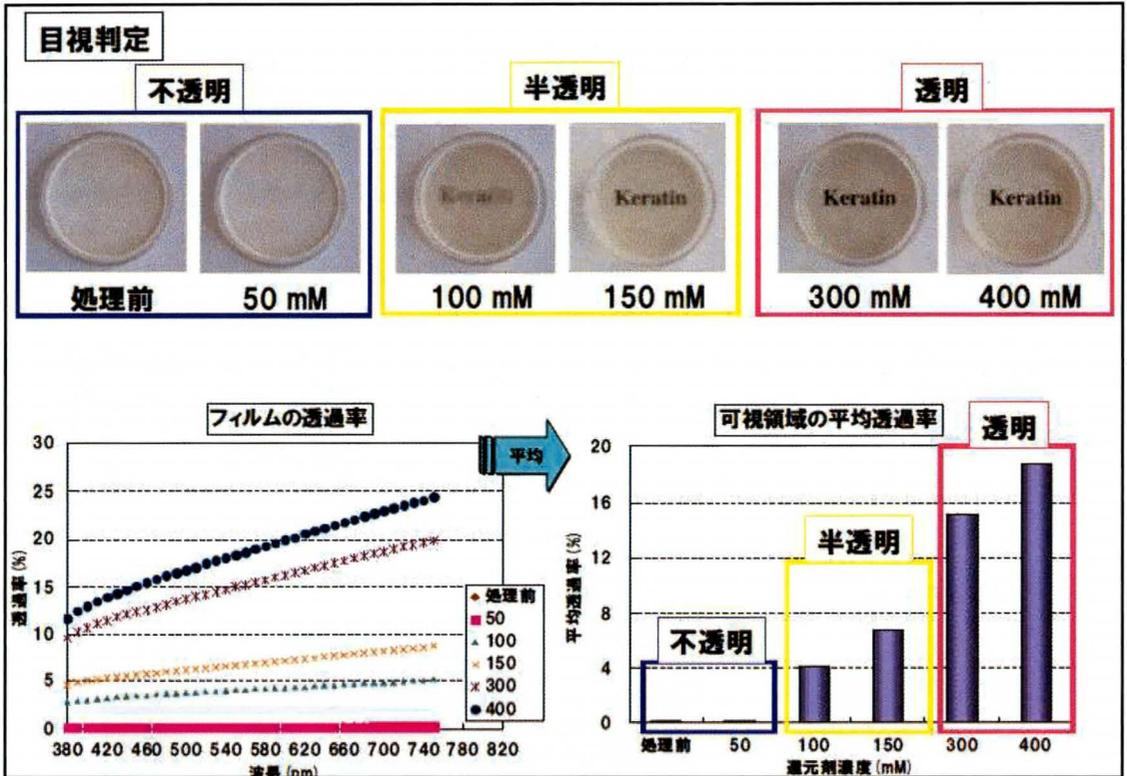


Fig. 3 フィルムの透過度の定量化

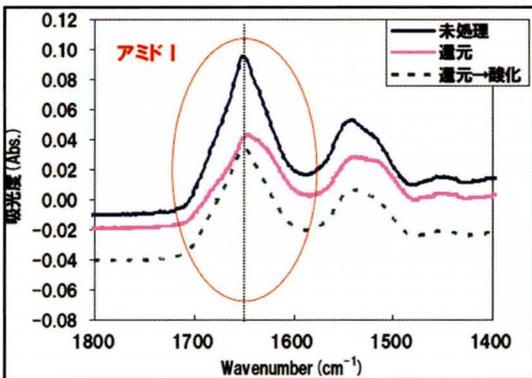


Fig. 4 還元処理、還元・酸化処理によるFT-IR測定結果

3.1.2 還元・酸化繰り返し処理による影響
還元・酸化処理を繰り返しても1~2回まで透明-不透明と可逆的な変化が観察された。しかし、さらに処理を繰り返すと酸化処理をしても不透明へ戻らず、透明な平滑構造のままとなった (Fig. 2)。

Table 1 二次構造の組成比

試料	組成比 (%)			
	α -Helix	β -Sheet	β -Turn	Other
未処理	33	20	22	25
還元	19	35	22	24
還元→酸化1回	31	22	23	24

3.2 透過度の測定

還元剤の濃度によって透明性の違うフィルムを用いて、分光光度計により透過率の測定を行った。

その透過率の平均を算出し、フィルムの透過度として定量化する方法を確立した。またその結果は目視と相関のある結果となった (Fig. 3)。

3.3 ケラチンフィルムの FT-IR 測定

還元処理を行ったフィルムは透明性が高くなり、FT-IR の結果から未処理と比べてアミ

ド I (1650 cm^{-1} 付近) のピーク位置・形が変化していた (Fig. 4)。アミド I について二次構造解析を行ったところ、 α -Helix の割合が減少し、 β -Sheet 含量が増加していた。また、還元処理後に酸化処理をしたフィルムは、 β -Sheet 量が減少し、 α -Helix 量が増加しており、未処理フィルムの組成比に近い値に戻った (Table 1)。つまり、ケラチンフィルムは還元・酸化状態に応じて、 α -Helix \leftrightarrow β -Sheet と可逆的に変化できる性質をもつことが示唆された。

還元・酸化を繰り返し処理したフィルムでは α -Helix \leftrightarrow β -Sheet の可逆的な変化が見られなくなり、その比率も固定される結果となった。

4. 考察

今回の結果、ケラチンフィルムを構成しているタンパク質の立体構造は還元・酸化反応の影響を受けやすく、形態の変化が透明性の変化として捉えられることが示された。そのフィルムの透明性は、アミド I 中の組成比と関連していることが明らかとなった。すなわちケラチンフィルムの透明性が、アミド I の変性の指標となり得ることが確認された。(α -Helix \rightarrow β -Sheet : 透明、 β -Sheet \rightarrow α -Helix : 不透明)

α -Helix \leftrightarrow β -Sheet の可逆性が維持される

状態から不可逆に移行する過程は今後の検討課題ではあるが、ジスルフィド結合の損傷以外に毛髪損傷の指標としてケラチンを含めた毛髪内部タンパク質の二次構造変化による毛髪の変性の可能性が示唆された。

ケラチンフィルムにおける α -Helix \leftrightarrow β -Sheet の可逆性の維持が、二次構造変化による毛髪の変性を低減することにつながると思われる。これを立証することにより、新たな損傷の少ないパーマ剤の開発が可能となり、その簡易的な評価法としてケラチンフィルムの利用が期待される。

【引用文献】

- 1) Wortman, F.-J., Souren I., J. Soc. Cosmet. Chem., 38, 125-140 (1987)
- 2) Kawasoe T., Watanabe T., Fujii T., J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn., 45(2), 100-107 (2011)
- 3) Kawasoe T., Takayama S., Ito Y., Fujii T., J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc., 35(4), in press (2011)
- 4) Nakamura A., Arimoto M., Takeuchi K., Fujii, T., Biol. Pharm. Bull., 25, 569-572 (2002)
- 5) Fujii T., Ogiwara D., Arimoto M., Biol. Pharm. Bull. 27, 89-93 (2004)



プロフィール

氏名：大久保 和美

所属：株式会社 資生堂 プロフェッショナルグローバルマーケティング部

連絡先：神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1

TEL : 045-590-6444 FAX : 045-590-6429

専門分野：毛髪科学、評価試験