

博士学位論文

題 目

分光学的手法を用いた毛髪構成成分の解析法の確立と加齢毛への応用

担当指導教員名 森田 成昭

申請年月日 2024年 1月 22日

申請者専攻・コース名 先端理工学コース

学 生 番 号

氏 名 布施 直也

大阪電気通信大学大学院

博士論文の概要

論文題目 分光学的手法を用いた毛髪構成成分の解析法の確立と加齢毛への応用

毛髪は、人の見た目の印象を決定する要素の一つである。ヘアスタイルや髪色を変えると、自分のもとより人の受ける印象が大きく変わるため、健康的で美しい髪が望まれている。近年、毛髪における化学処理やヘアスタイリング行動によるダメージが深刻化している。毛髪の化学処理には、メラニンを分解して髪色を明るくするブリーチ処理や、ジスルフィド結合の酸化還元反応によるパーマメントウェーブ処理などが挙げられる。これらの処理によって毛髪の色や形状をコントロールできる反面、毛髪の構造や構成成分、および物性を変化させてしまうというデメリットを持っている。また、日常におけるヘアスタイル行動として、ドライヤーやヘアアイロンなどの熱器具の使用、手ぐしやブラシなどによる毛髪を引っ張る行為は、生活者が望むヘアスタイルを維持できる反面、ダメージが蓄積しやすくなり、結果的により髪の扱いにくさが低下する。このようなヘアケアの現場で起きている諸問題については、現状最適な解析方法がなく、毛髪の階層ごとによる分析ができ、現場での問題を精度よくシミュレートできるような評価手法が望まれている。

本研究では、物質の化学的特性を分析するのに有用な技術であり、毛髪を対象とした分析に汎用されている赤外分光分析(IR)に着目した。これは、ケラチンタンパク質や脂質や水分が、C、H、O、NおよびSなどの元素から構成されており、中赤外領域で同時に観測しやすいことが理由に挙げられる。また、測定方法を変えることで毛髪組織のさまざまな構造に焦点を絞って測定でき、その測定方法によっては非破壊で毛髪を評価できることも大きな利点である。しかし、毛髪はケラチンタンパク質をはじめ、脂質、水分、メラニンなどの多くの構成成分から成り、さらに複雑な階層構造を取ることから、各官能基におけるIRピークがオーバーラップしやすく、解析が困難であるという課題も存在する。そのため、毛髪を対象としたIRを用いた研究は、毛髪の基本的な理解に留まるものが多く、ヘアケアの応用という面では不十分であるのが現状である。

そこで本研究では、毛髪科学研究の分野に、多変量スペクトル分解(MCR)や二次元相関分析(2DCOS)などのケモトリックスの手法を組み合わせ、ヘアケア現場での問題を精度よくシミュレートできるような評価手法の開発を目的とした。また、実際のヘアケアの問題を解決し、毛髪化粧品業界への実質的な貢献を目標とした。

第1章では毛髪の構造ならびにヘアケアの現場で実際に起きている諸問題を述べ、第2章では、本研究で主に使用した顕微赤外分光分析(顕微IR)とケモトリックスについて概要を記載した。第3章では、顕微IRを用いて、未処理毛とブリーチ処理毛の水分挙動を空間的かつ時間的にイメージングし、任意の部位における水分量を数値化する手法を開発した。さらに、この手法を加齢毛に適用し、湿度変化による毛髪の形状変化と水分挙動との関係性を評価した。第4章では、顕微IRとMCRを用いて毛髪内部タンパク質のケラチンタンパク質の二次構造を迅速かつ機械的にイメージングする手法を開発した。さらにこの手法と生化学的手法、および熱力学的手法を用いて、加齢毛の水分反応性向上におけるメカニズムについて、特に毛髪内部タンパク質の変性に着目して解析を実施した。さらに加齢毛の基礎的研究をベースに、還元アミノ化反応を用いた毛髪改質技術の開発を試みた。第5章では、顕微ATRとMCRを組み合わせることで、未処理毛とブリーチ処理毛を日常に起こり得る力学的負荷で反復延伸をした際に生じる毛髪内部の構造変化を定量化する方法を開発した。また得られたデータについて2DCOSによる解析を行い、反復延伸による構造変化の順序を明らかにした。第6章では、加齢に伴って生えてくる、うねりやくせ、広がりがある毛髪を“ゆがみ毛”として、そのゆがみ毛が日常的なコーミングでよりうねり/くせが強くなってしまふ原因について、第5章にて開発した手法を用いて解析した。さらに要因を解明した後に、実際に毛髪化粧品業界への実質的な貢献を目指し、ゆがみをケアするシーズの探索を実施し、最終的にはゆがみ毛における技術情報の開発を行った。

以上のように、本研究では、顕微IRおよび顕微ATRで得られた膨大なスペクトルデータをケモトリックスの手法を用いて解析を行うことにより、ヘアケアの現場で実際に起きている問題を解明した。また、IRデータ解析を主としながらも、分光分析と測定原理が異なる生化学的および熱力学的分析を適宜組み合わせることで、加齢性の毛髪に特有の髪乱れのメカニズムを一次構造から高次構造までをシームレスに明らかにすることができた。

担当指導教員名 森田 成昭

申請者氏名 布施 直也

大阪電気通信大学大学院

博士学位論文

題 目

分光学的手法を用いた毛髪構成成分の解析法の確立と加齢毛への応用

担当指導教員名 森田成昭

申請年月日 2023年1月22日

申請者専攻・コース名 先端理工学コース

学 生 番 号

氏 名 布施直也

目次

第1章 緒言	
1.1 毛髪の構造とヘアケアの現場で起きている諸問題について	1
1.2 本研究の目的	3
1.3 本論文の構成	4
1.4 本論文の新規性	5
1.5 参考文献	5
第2章 実験方法及び解析方法	
2.1 赤外分光法(IR)の原理	8
2.2 顕微 IR とその測定モードについて	8
2.3 IR スペクトルの前処理方法	9
2.4 ケモメトリックス	10
2.5 参考文献	12
第3章 毛髪内部の水分挙動評価法の開発と加齢毛への応用	
3.1 緒言	14
3.2 実験方法	15
3.3 結果と考察	16
3.4 結論	24
3.5 参考文献	24
第4章 毛髪タンパク質の二次構造イメージング法の開発と加齢毛への応用	
4.1 緒言	27
4.2 実験	28
4.3 結果と考察	31
4.4 結論	41
4.5 参考文献	42
第5章 反復延伸による毛髪内部成分の構造変化評価法の開発	
5.1 緒言	45
5.2 実験	46
5.3 結果と考察	47

5.4 結論	53	
5.5 参考文献	53	
第6章 反復延伸によるゆがみ毛の構造変化解析とヘアケア商品技術情報の開発		
6.1 緒言	56	
6.2 実験	57	
6.3 結果と考察	60	
6.4 結論	73	
6.5 参考文献	73	
第7章 総括		76
第8章 本研究の投稿論文、発表実績、および受賞		78
謝辞	82	

第1章 緒言

1.1 毛髪の構造とヘアケアの現場で起きている諸問題について

毛髪は、人の見た目の印象を決定する要素の一つである。ヘアスタイルや髪色を変えると、自分はもとより人の受ける印象が大きく変わるため、健康的で美しい髪が望まれている。とりわけ日本では女性の身だしなみの心得として語り継がれてきた言葉、一髪二姿（いちかみにすがた）があり、身なりを着飾るよりも、まず、第一に髪を美しくすることが女性の美德とされてきた[1, 2]。

毛髪はキューティクル(Cuticle)、コルテックス(Cortex)、メデュラ(Medulla)という3つの層構造とその間を埋める細胞膜複合体(Cell membrane complex; CMC)と呼ばれる組織から成る[3]。毛髪断面のイメージ図を Figure 1 に示す。

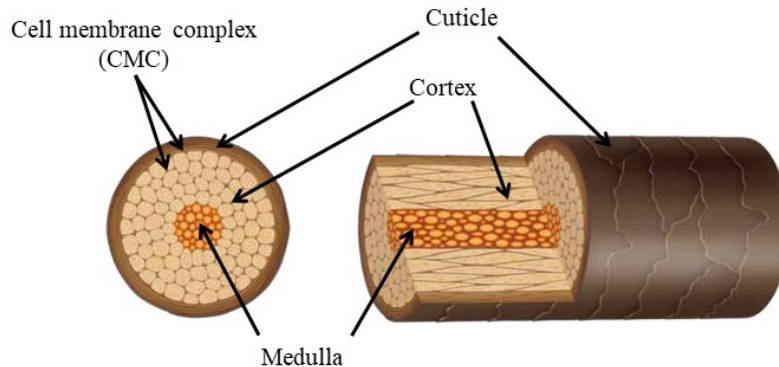


Figure 1 A schematic diagram of the human hair illustrating its dimensions and layering.

キューティクルは幅約 500 nm、長さ約 5 μm のうろこ状の組織で、日本人の平均では 5～8 枚程度重なって存在している[4]。また、キューティクルは一番外側の組織であるため、化学処理や外環境による影響を受けやすいことが知られている[5, 6]。キューティクルの内側にあるコルテックスはケラチンタンパク質から成る繊維状の組織であり、主に中間径フィラメント (IF, Intermediate Filament) タンパク質と中間径フィラメント関連タンパク質 (IFAP, IF associated protein, マトリックスタンパク質) という 2 種のタンパク質で構成されている[7, 8]。毛髪組織においてコルテックスは毛髪の 85% 程度を占めていることから、毛髪の物性の多くはコルテックスの物性に支配されていると考えられる。メデュラは毛髪を中心に存在する空孔の多いタンパク質組織であるが、毛髪によっては存在しない場合もある[9]。CMC は、キューティクル-キューティクル間、キューティクル-コルテックス間、もしくはコルテックス-コルテックス間に存在する非ケラチンタンパク質組織のことと呼ぶ[10]。CMC は水の通り道と言われており、他のケラチン組織に比べて親水性の高い組織である。このように毛髪 1 本は複雑な階層構造を取っているため、毛髪の階層ごとによる解析が必要である。

近年、毛髪における化学処理やヘアスタイリング行動によるダメージが深刻化してい

る。毛髪は化学処理には、メラニンを分解して髪色を明るくするブリーチ処理や、ジスルフィド結合の酸化還元反応によるパーマネントウェーブ処理や縮毛矯正などが挙げられる。これらの処理によって毛髪の色や形状をコントロールできる反面、毛髪は構造や構成成分、および物性を変化させてしまうというデメリットをもっている。例えば、ブリーチ処理はキューティクルの浮き上がりや剥がれ落ちを発生させ、表面摩擦が向上し、手触りを悪化させてしまう[11]。さらにブリーチ処理によって水分応答性や毛髪内部水分量の変化が起こり、乾燥によるパサつきやヘアスタイルの崩れが起きやすくなってしまふ[12, 13]。また、日常におけるヘアスタイリング行動として、ドライヤーやヘアアイロンなどの熱器具によるスタイリング、手ぐしやブラシなどによる毛髪を伸ばしたり引っ張ったりする行為などが挙げられる。これらの化粧行動によって、生活者が望むヘアスタイルを維持できる反面、ダメージが蓄積し、切れ毛が起りやすくなり、毛髪はツヤが低下することが報告されている[14-16]。

このようなダメージを解析するために様々な手法が考案されている。例えば、ブリーチ処理による水分応答性や毛髪内部水分量を評価するために、光学顕微鏡観察による毛径計測 [17]、重量変化[18]、カールフィッシャー滴定法[19]など、いくつかの方法が汎用されている。特に、脱色した毛髪は膨潤挙動は、未処理の毛髪よりも大きいことが実証されており、酸化によって生じる変化の相対的な程度を推定するために使用されてきた[17]。さらに毛髪内部の水分分布における詳細な研究として、低温走査型電子顕微鏡(cryo-SEM)を用いて含水状態におけるハイダメージ毛の水分の局在を可視化する方法などが開発されてきた[20]。しかし、これらの方法では、どれだけ量の水が内部のどこまでに浸透したかをリアルタイムで解析することはできない。一方、髪を美しく見せるために日々のスタイリング行動は重要であるが、手ぐしやブラシなどによる毛髪を伸ばしたり引っ張ったりする行為についても数多く研究報告がなされている。例えば、毛髪を延伸して切れ毛を生じさせてその切断パターンを観測した研究[16]や、毛髪繊維をある一定の長さになるまで引っ張り、その後時間を追って応力減衰を追跡した応力緩和に関する研究[21]、などが存在する。しかしながら、これらの力学的負荷をかけた従来の引張試験では、負荷をかける速度が極めて遅く、毛髪横断面における応力が非常に大きいので、生活者の毛髪に実際に起こっている負荷をシミュレートするには適していなかった。そのため、コーミングやブラッシングといった日常で生じうるダメージの影響を近似できる、反復延伸試験法が考案されている。Gamez-Garcia は、7.0%から 15%の伸長率で毛髪を反復延伸した結果、キューティクルのリフトアップが起こることを報告している[22]。しかしながら、この反復延伸試験法で評価できるのは毛髪表面の形態変化観察のみであり、毛髪内部を解析することはできない。このように、現場で起きているヘアケアに関する諸問題について最適な解析方法がなく、毛髪は階層ごとによる分析ができ、現場での問題を精度よくシミュレートできるような評価手法が望まれている。

毛髪をサンプルとした分析手法は、X線散乱分析[23, 24]をはじめとして、原子間力顕微鏡(AFM) [25]、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)[26]、飛行時間型二次イオン質量分析法 (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry ; TOF-SIMS) [27, 28]、示差走査熱量分析(DSC)[29, 30]、赤外分光法(Infrared spectroscopy ; IR)[31-33]、ラマン分光法[34, 35]、および近赤外分光法[36, 37]などさまざまあり、その分析用途や前処理の要否などによって使い分けられる。ここで毛髪を対象とした分析手法をまとめた表を Table 1 に示す。例えば、X線散乱分析は古くから毛髪は結晶構造の解析に用いられており、近年ではくせ毛の内部構造や、パーマ処理による毛髪構造の変化を解析した報告がなされている[24]。

Table 1 Comparison of measurement methods

Methods	Preprocessing	Non-destructive	Accuracy	Environment	Target
XRD	×	×	○		Crystal structure
HPLC	×	×	○		Amino acid, lipids
IR	△	○	○		Molecular vibrations
Raman	△	○	○		Molecular vibrations
NIR	○	○	△		The overtone and combination tone of molecular vibration
DSC	×	×	○		Crystal structure, hydration
AFM	△	○	○		Mechanical properties
TOF-SIMS	○	○	△	Vacuum	Morphological properties
SEM	○	○	○	Vacuum	Morphological properties
TEM	×	○	○	Vacuum	Morphological properties

この中でも IR は、物質の化学的特性を分析するのに有用な技術であり、毛髪を対象とした分析に汎用されている[31–33]。これは、ケラチンタンパク質や脂質や水分が、C、H、O、N および S などの元素から構成されており、中赤外領域で同時に観測しやすいことが理由に挙げられる。また、測定方法を変えることで毛髪組織のさまざまな構造に焦点を絞って測定でき、その測定方法によっては非破壊で毛髪を評価できることも大きな利点である。また、全反射測定法(Attenuated Total Reflection ; ATR) を用いることで毛髪のキューティクル表面のみの吸収スペクトルを得ることができ、ブリーチ処理や紫外線照射によって生じたスルホン酸基を評価することでダメージ度を見積もることができる[38–40]。さらに、顕微赤外分光分析(顕微 IR) を用いることでコルテックス全体の吸収スペクトルを得ることができ、毛髪内部の脂質とタンパク質の局在や毛髪内部に浸透した成分のイメージング方法が考案されている[41–43]。また、透過型電子顕微鏡(TEM)、走査型電子顕微鏡(SEM)、および TOF-SIMS は、微細に毛髪形状や内部構造を評価する方法があるが[44–46]、真空環境が必須であるのに対して、IR は現場で起こっている通常的环境でも計測できることも利点のひとつである。しかしながら、毛髪はケラチンタンパク質をはじめ、脂質、水分、メラニンなどの多くの構成成分から成り、さらに複雑な階層構造を取ることから、各官能基における IR 吸収ピークがオーバーラップしやすく、解析が困難であるという課題も存在する。そのため、毛髪を対象とした IR を用いた研究は、毛髪の基本的な理解に留まるものが多く、ヘアケアの応用、すなわち化粧品産業への実質的な貢献という面では不十分であるのが現状である。

1.2 本研究の目的

これまで述べてきたように、毛髪の構造や構成成分は、物理的・化学的ダメージや外環境によって大きく変化し、その毛髪の得意な性質を理解するために様々な測定手法が用い

られてきた。特に IR は通常ヘアスタイル行動が行われる環境下で毛髪の階層構造を非破壊で測定できる点にメリットがあるが、毛髪化粧品への実質的な応用にまで活かされた研究がない。そこで、本研究では IR を用いた毛髪科学研究の分野に多変量スペクトル分解 (MCR) や二次元相関分析 (2DCOS) といったケモメトリックスの手法 [47–50] を取り入れることで微細で正確な解析を実施し、現場での問題を精度よくシミュレートできるような評価手法の開発を第一の目的とした。さらにヘアケアの現場で実際に起きている諸問題を解決し、実際の商品開発や技術情報に結び付ける研究を実施し、毛髪化粧品業界への実質的な貢献を目指した。

1.3 本論文の構成

本論文は、緒言である第 1 章、本研究で横断的に用いた顕微 IR に関する実験方法を記述した第 2 章、論文の検討内容とその結果について記述した第 3 章～第 6 章、および結言である第 7 章によって構成される。本研究では、ヘアケアの現場でもよく起きている具体的な問題として毛髪の化学的ダメージや加齢による水分応答性の向上および反復延伸行為による切れ毛やくせうねりの増大の悩みを取り上げ、MCR や 2DCOS といったケモメトリックスの手法を組み合わせた赤外分光法を用いた実験を主としながら、適宜、生化学的分析や熱分析を用いて毛髪内部状態を評価する手法を開発した。また、毛髪化粧品業界への実質的な貢献を目指し、開発した毛髪内部評価手法を用いて、加齢毛やゆがみ毛に対応したヘアケア製品の商品情報を完成させた。

第 3 章では、顕微 IR を用いて、未処理毛とブリーチ処理毛の毛髪内部の水分挙動を空間的かつ時間的にイメージングし、任意の部位における水分量を数値化する手法を開発した。さらに、この手法を加齢毛の解析に適用し、湿度変化による毛髪の形状変化と水分挙動との関係性を評価した。

原著論文：

- N. Fuse, M. Matsui and Y. Matsue, *Analytical Sciences*, 38, 601–605 (2022).
Title: Temporal and spatial visualization of water uptake into human hair studied by infrared microscopy.
- N. Fuse, M. Isobe, M. Matsui and Y. Matsue, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists of Japan*, 56, 239–246 (2022).
Title: Age-Related Carbonylation of Hair Causes Irregular Shapes.

第 4 章では、顕微 IR と MCR を用いて毛髪断面における毛髪内部タンパク質のケラチンタンパク質の二次構造を迅速かつ機械的にイメージングする手法を開発した。さらにこの手法と生化学的手法、および熱力学的手法を用いて、加齢毛の水分応答性向上におけるメカニズムについて、特に毛髪内部タンパク質の変性に注目して解析を実施した。さらに加齢毛の基礎的研究をベースに、ヘアケアの応用、すなわち化粧品産業への実質的な貢献という面で還元アミノ化反応を用いた毛髪改質技術の開発を試みた。

原著論文：

- N. Fuse, M. Isobe, M. Matsui and Y. Matsue, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists of*

Japan, 56, 239–246 (2022).

Title: Age-Related Carbonylation of Hair Causes Irregular Shapes.

- N. Fuse, S. Morita and Y. Matsue, *International Journal of Cosmetic Science*, 2023, in press.

Title: Age-related hair denaturation related to Protein Carbonyls

第5章では、顕微 ATR と MCR を組み合わせることで、未処理毛とブリーチ処理毛を日常に起こり得る力学的負荷で反復延伸をした際に生じる毛髪内部の構造変化を定量化する方法を開発した。また得られたデータについて 2DCOS による解析を行い、反復延伸による構造変化の順序を明らかにした。

原著論文：

- N. Fuse, Y. Matsue and S. Morita, *Analytical Sciences*, 39, 229–234 (2023).

Title: Prediction of breakage in human hair caused by cyclical extension using infrared spectroscopy coupled with multivariate curve resolution.

第6章では、加齢に伴って生えてくる、うねりやくせ、広がりがある毛髪を“ゆがみ毛”として、そのゆがみ毛が日常的なコーミングでよりうねり/くせが強くなってしまう原因について、第5章にて開発した手法を用いて解析した。さらに要因を解明した後に、実際に毛髪化粧品業界への実質的な貢献を目指し、ゆがみをケアするシーズの探索を実施し、最終的にはゆがみ毛における技術情報の開発を行った。

原著論文：

- 布施直也，榎本可奈子，生山玲奈，森田成昭，松江由香子，*日本化粧品技術者会誌*, 2023, in press.

Title: 反復延伸によるゆがみ毛の形状変化ならびにそのケア方法の開発

1.4 本論文の新規性

従来の IR を用いた毛髪の解析は、各官能基における吸収ピークがオーバーラップしたスペクトルや、煩雑で人の手が入りやすいカーブフィッティングなどの方法を用いていた。その研究成果は毛髪の基本的な理解に留まるものが多く、商品につながるような毛髪化粧品産業への実質的な貢献には至っていない。本研究では、顕微 IR および顕微 ATR で得られた膨大なスペクトルデータをケモメトリックスの手法を用いて解析を行うことにより、ヘアケアの現場で実際に起きている問題を解明した。また、IR データ解析を主としながらも、分光分析と測定原理が異なる生化学的および熱力学的分析を適宜組み合わせることで、加齢性の毛髪に特有の髪乱れのメカニズムを一次構造から高次構造までをシームレスに明らかにすることができた。

1.5 参考文献

1. 佐山半七丸，速水暁齋，*都風俗化粧伝* (1813)
2. 津田紀代，*日本衣服学会誌*, 53(2), 60–65 (2010)

3. C. Popescu, H. Hocker, *Chem. Soc. Rev.*, 36, 1282–1291 (2007)
4. J. R. Smith, J. A. Swift, *J. Microsc.*, 206, 182–193 (2002).
5. 新條善太郎, 定井正直, 中村晶, 西川直樹, *日本化粧品技術者会誌*, 28, 66–76 (1994)
6. M. L. Tate, Y. K. Kamath, S. B. Ruetsch, H. D. Weigmann, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 44, 347–371 (1993)
7. D. A. D. Parry, P. M. Steinert, *Q. Rev. Biophys.*, 32, 99–187, (1999).
8. N. R. Watts, L. N. Jones, N. Cheng, J. S. Wall, D. A. D. Parry, A. C. Steven, *J. Struct. Biol.*, 137, 109–118 (2002).
9. R. Wagner, I. Joekes, *J. Cosmet. Sci.*, 58, 359–368 (2007).
10. C. R. Robbins, *J. Cosmet. Sci.*, 60, 437–465 (2009)
11. 布施直也, 松井正, *日本化粧品技術者会誌*, 53, 278–286 (2019)
12. A. N. Syed, H. Ayoub, *Cosmet & Toilet.*, 117, 57–64 (2002).
13. S. B. Harnby, *Cosmet & Toilet.*, 116, 35–40 (2001)
14. C. R. Robbins, *Chemical and physical behavior of human hair 4th ed.*, (Springer, NewYork, 2002).
15. Y. Kamath, H. D. Weigmann, *J. Appl. Poly. Sci.*, 27, 3809–3833 (1982).
16. Y. Kamath, H. D. Weigmann, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 35, 21–43 (1984).
17. W. Barnard, H. White, *Textile Res. J.*, 24, 695–704 (1954).
18. P. B. Stam, R. F. Kratz, H. J. White, *Textile Res. J.*, 22, 448–465 (1952).
19. M. Okamoto, R. Yakawa, A. Mamada, S. Inoue, S. Nagase, S. Shibuichi, E. Kariya, N. Satoh, *J. Cosmet. Sci.* 54, 353–366 (2003).
20. 栗原亮子, 齋藤ゆかり, 今井健仁, 丹羽正直, *日本化粧品技術者会誌*, 46, 264–270 (2012)
21. M. S. Robinson, B. J. Rigby, *Textile Res. J.*, 55, 597–600 (1985).
22. M. Gamez–Garcia, *J. Cosmet. Sci.*, 49, 213– (1998).
23. 伊藤隆司, 梶浦嘉夫, *表面技術*, 60(9), 575–578 (2009)
24. M. Fukuda, Y. Marubashi, T. Nawa, R. Ikuyama, *J. Cosmet. Sci.*, 69, 121–130 (2018)
25. 北野宏樹, *表面科学*, 29(7), 427–431 (2008)
26. 西田憲市, 成原政治, 堤一博, 伊東晋治, *鑑識科学*, 6(2), 109–115 (2002)
27. T. Kojima, H. Kitano, M. Niwa, K. Saito, Y. Matsushita, K. Fukushima, *Surface and Interface Analysis*, 43, 562–565 (2011)
28. T. Kojima, H. Yamada, M. Isobe, T. Yamamoto, M. Takeuchi, D. Aoki, Y. Matsushita, K. Fukushima, *Skin Research and Technology*, 20, 416–421 (2014).
29. 太田裕子, 福増章夫, 西村優子, 中村邦雄, *繊維学会誌*, 52, 43–48 (1996)
30. F. J. Wortmann, C. Springob, G. Sendelbach, *J. Cosmet. Sci.*, 53, 219–228 (2002)
31. C. B. Baddiel, *J. Mol. Biol.*, 38, 181–199 (1968)

32. E. Hoting, M. Zimmermann, S. Hilterhaus–Bong, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 46, 85–99 (1995).
33. A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 1073–1101 (2007)
34. A. Kuzuhara, T. Hori, *Textile Res. J.*, 72, 285–289 (2002)
35. 葛原亜紀夫, *高分子論文集*, 69, 313–325 (2012)
36. 宮前裕太, 山川弓香, 尾崎幸洋, *日本化粧品技術者会誌*, 22–30, 41 (2007)
37. 竹山舞子, 菊地良栄, 熊谷昌則, 天野敏男, 尾関徹, 藤原一彦, 小川信明, *分析化学*, 58, 667–673 (2009)
38. J. Strassburger, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 36, 61–74 (1985)
39. U. Schumacher–Hamedat, Föhles, H. Zahn, *Textilveredlung*, 21, 121–125 (1986).
40. E. Hoting, M. Zimmermann, S. Hilterhaus–Bong, *J. Cosmet. Sci.*, 46, 85–99 (1995)
41. 稲益悟志, 森脇太郎, 池本夕佳, *SPring-8/SACLA 利用研究成果集*, 3, 388–391 (2015)
42. 稲益悟志, 森脇太郎, 池本夕佳, *日本化粧品技術者会誌*, 50, 209–217 (2016)
43. L. Kreplak, J. Doucet, P. Dumas, F. Briki, *Biophys. J.*, 87, 640–647 (2004)
44. P. Prem, K.J. Dube, S.A. Madison, J. Bartolone, *J. Cosmet. Sci.*, 54, 395–409 (2003)
45. 今井健仁, 丹羽正直, 川村秀登, 梅村知也, 木村勝, 中野隆, *日本化粧品技術者会誌*, 44, 208–215 (2010)
46. 今井健仁, 中村友紀, 丸橋佑基, 中野隆, *日本化粧品技術者会誌*, 53, 9–15 (2019)
47. 千川純一, *Biored. Res. Trace. Elements*, 16(4), 265–275 (2005)
48. 尾崎幸洋, 宇田明史, 赤井俊雄, *化学者のための多変量解析 ケモメトリックス入門*, 講談社サイエンティフィク (2002)
49. 長谷川健, 尾崎幸洋, *分析化学*, 54, 1–26 (2005)
50. 森田成昭, 尾崎幸洋, *高分子*, 67, 680–682 (2018)
51. 森田成昭, *日本結晶成長学会誌*, 49, 1–9 (2022)

第2章 実験方法および解析方法

2.1 赤外分光法(IR)の原理

赤外分光分析 (Infrared spectroscopy; IR) は、対象物における赤外光領域の吸収挙動等の違いについて分光器を用いて調べる分析手法である。現在の赤外分光器の多くはフーリエ変換(Fourier transform)方式であるため、通称 FT-IR とも呼ばれる。赤外分光分析は、化学結合に関する情報を与えるため、異物分析などのトラブル対応から製品開発における材料・組成分析まで幅広く用いられている。また、各種分析手法の中でも、前処理・測定が容易かつ迅速な場合が多いため、分析初心者が取組み易い手法でもある。有機物の赤外分光分析では赤外光を波長ではなく、1 cm の間にある波の数で表す波数 (wavenumber) 単位で扱う場合が多い。波数 $\tilde{\nu}$ と波長 λ の関係は $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ の関係にあり、($\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$) $= 10^7/(\lambda/\text{nm})$ である。赤外分光分析においては、4000–400 cm^{-1} の波数を中心とした中赤外の波数域がよく利用される[1]。FT-IR 装置の原理については成書[2, 3]に委ねるが、次節では本研究で横断的に用いた顕微赤外分光分析装置(顕微 IR)の概要について述べる。

2.2 顕微 IR の概略とその測定モードについて

顕微 IR は赤外顕微鏡と FT-IR を組み合わせた機器の総称であり、一般的に 100 μm から数 μm までの大きさのサンプルやそのサンプルの微小領域を測定する手法として用いられている。測定原理は、FT-IR の赤外光を顕微鏡部に取り入れ、カセグレンと呼ばれるミラーで反射させながら集光して測定する。微小領域を測定する場合は、高感度な Mercury Cadmium Telluride (MCT) 検出器を使用するのが一般的である。

顕微 FT-IR の大きなメリットとして、試料の状態によって透過法、正反射法、および全反射法 (ATR) の3つの測定方法を選択できる点が挙げられる。透過法は試料に光を照射して、透過した光を検出する方法である。透過法で用いる試料は、薄い膜状にする必要があり、測定は試料を含まない状態で測定する I_0 スペクトルと、試料を含む状態で測定する I スペクトルから、 $A = -\log_{10}(I/I_0)$ によって吸光度スペクトルを得る。毛髪を透過法で測定する場合は、マイクロトームなどで毛髪の薄片を作成することが多い[4, 5]。正反射法は金属の試料台に試料を置き、光の反射を測定する方法である。有機物が金属上にあるとき、光は金属表面まで達してから反射するので、物質によって異なる吸収スペクトルが得られる。正反射法では、主に金属表面のコーティング分析などに用いられることが多い[6, 7]。全反射法 (ATR) は、前処理がほとんど必要ないため、顕微 FT-IR において汎用されている。測定方法は試料をプリズムに密着させ、浅い入射角でプリズム側から試料側に照射した際に起こる光の全反射を利用し、プリズムと試料の界面で発生するエバネッセント波による光吸収を検出する方法である。試料を非破壊で測定できるため、異物分析や故障解析などに用いられている[8-10]。しかし、試料とプリズムを密着させて分析するため、連続して分析を行なう際にはプリズムに転写・残留した成分の有無を確認して、残留した成分がある場合には洗浄を行なう必要がある。また、試料表面に凹凸がある場合や密着させる位置によっては良好なスペクトルが得られない場合もある。以上のように、3つの測定モードそれぞれに様々な注意点があるため、これらのことを念頭におき顕微 IR を活用すべきである。

本研究で顕微 IR を用いた理由のひとつは、毛髪 1 本には複雑な階層構造が存在し[11]、顕微 IR の測定領域が階層ごとによる解析に適しているためである。毛髪の直径は 80~120 μm であり、顕微 FT-IR のアパーチャーや測定ステップなどの諸条件を変更することで、キューティクル層、コルテックス層、およびメデュラ層の各層における情報を得ることができると考えられる。2 つ目の理由は、大気雰囲気での測定であることから環境自由度が高く、実際にヘアケアの現場で起こっている諸問題にも適用できるからである。なお、研究にて開発した毛髪内部の水分挙動や毛髪内部タンパク質における二次構造のイメージングならびに定量に関しては顕微 IR の透過モードを使用し、反復延伸による毛髪内部における構成成分の構造変性については顕微 IR の ATR モードを使用した。

2.3 IR スペクトルの前処理方法

一般的にスペクトルデータは、分光装置の特性や様々な環境要因による外乱の影響を受けるため、データの前処理を必要とすることが多い。その前処理にはいくつかの方法が存在し、その良し悪しによって解析結果に大きな影響を与えることがしばしば発生する。ここでは本研究で使用したスペクトルデータに関係する前処理について整理する。なお、本章で言及した前処理法以外にもベースライン補正、差スペクトル、およびデータ補間などの方法[2]が存在するが、本論文では割愛する。

・微分処理[12]

微分処理とは、スペクトルを強度 A の波数 $\tilde{\nu}$ による微分 ($d^n A/d\tilde{\nu}^n, n = 1, 2$ は微分の階数) によって、波数の関数として表す処理である。微分スペクトルの算出方法としては、点の集合であるスペクトルデータで隣接する 2 点の差から算出する差分法や、多項式近似を利用する Savitzky-Golay 法などがある[12]。スペクトルの 1 次微分や 2 次微分を用いることで、スペクトルのピークや変曲点の波数位置を精度よく求めることが可能である。特にバンド形状が幅広いタンパク質の赤外および近赤外領域のスペクトルについて有効である[13, 14]。1 次微分スペクトルでは、微分スペクトルの強度が 0 になる波数が、2 次微分スペクトルでは極小値を表す波数が、それぞれ元のスペクトルのピーク波数位置に該当する。一次微分処理を行うことで加算的に加わるベースラインドリフトを除去することができ、2 次微分のピーク強度は原スペクトルにおけるピーク強度に比例するため、それを使って定量分析を行うことができる。また、線型的に増加するベースラインドリフトも除去することができる。このように、スペクトルのわずかな強度変化が強調されるため、定性的な解析に有用であるが、2 次微分では一般的にスペクトルに含まれるノイズ情報に影響されやすくなるため、次節で述べるスムージングによる平滑化処理が必要となる。

・スムージング[12, 15, 16]

測定データは必ずノイズを含んでおり、その S/N 比が多変量解析に大きな影響を与える。このノイズには装置の特性による回避できないノイズも含まれるため、S/N 比向上のためには前処理が必要不可欠になる。ランダムノイズを軽減するには十分に測定の積算回数を増やすことが効果的だが、それでも軽減できないものに対してはスムージングという手法がよく用いられる。スムージングのアルゴリズムとしては、単純移動平均法、

Savitzky–Golay 法、適応化平滑法、Binomial 法が用いられる。その中でも、Savitzky–Golay 法が用いられることが多く、測定波形が各データ点の近傍において多項式曲線で表現できると仮定して、最小二乗法近似を用いて実測スペクトルと多項式曲線を組み合わせ、真の値を決定する[17]。本研究ではスペクトル波数 x_i と吸光度 y_i があるとき、その値を中心として近傍を含めた $2m+1$ 点が 2 次の多項式で記述できると仮定し、補正している。一般的に平均する前後のポイント数が広ければ、ノイズの低減効果は大きくなる。しかしスムージング処理の問題点は、ポイント数を大きくして効果を上げれば上げるほどバンドの波形がひずむ点である。必要以上のポイント数の増加はスペクトルの形状をゆがめることにつながるため、状況に合わせたスムージングポイント数 m の決定を慎重に行わなければならない。

2.4 ケモメトリックス

ケモメトリックス (Chemometrics) とは、化学 (chemistry) と計量学 (metrics) を合わせた造語で、「数学的手法や統計的手法を適用し、最適手順や最適実験計画の立案・考案を行うとともに、科学データから得られる情報を最適化する」と定義される[18]。このケモメトリックス法を最初に取り入れた分光法が近赤外分光分析(NIR)法であり、現在では、赤外、ラマン、テラヘルツ分光の分野においても盛んに応用されるようになっている[19–21]。IR スペクトルなどに代表される吸収スペクトル解析のためのケモメトリックスは、classical least squares (CLS)回帰法に帰着できると考えられ、吸収分光法を使って定量分析を行う場合、スペクトルのバンド強度 (吸光度) を試料の濃度と関連づけた Lambert–Beer の法則を用いるのが一般的である。本研究では、ケモメトリックスの中でも多変量スペクトル分解(MCR)を用いた。MCR は、取得したスペクトルを純スペクトルとその成分の強度プロファイルに分解し、混合物の成分を識別して定量化する化学分析手法である[22–25]。MCR の重要なメリットとして、構成成分に関する基本情報がない場合にも適用できることである[26]。さらに、カーブフィッティングのようなスペクトル解析では解析方法に任意性が残り、時系列データや 2 次元イメージングデータのような膨大なスペクトルを分析するには煩雑であり時間がかかってしまうのに対して、MCR のようなスペクトル分解の手法は、膨大なデータ解析を機械的かつ迅速に処理できるため非常に有用である。以上のようなメリットより、生体適合性ポリマーにおける経時的な水和挙動を解析した研究[27]をはじめとして、エポキシ樹脂、酵母細胞、合金などの多種多様なサンプルに対して有用性が研究されており、重複バンドの分離において明瞭な IR スペクトルを取得できることが報告されている [28–30]。

さらに、本研究では前述した MCR のほかに、二次元相関分光法を用いて反復延伸によるブリーチ処理毛の破断やゆがみ毛の曲率増加に至るまでの毛髪内部構造変化のプロセスを解析した。一般化二次元相関解析法は、1993 年に野田により提案され、二つのスペクトル変数における信号変化の相関を二次元面にプロットする解析手法である[31]。外部摂動により引き起こされた核磁気共鳴 (NMR) や IR やラマン、NIR といった分光データについてもさまざまな解析手法が提案されている。また、この手法は摂動が同じであれば IR と NIR などの異なるスペクトル領域についても同じ解釈が可能となる[32]。2DCOS では、「同時相関」と「異時相関」と呼ばれる 2 種類の相関が用いられ、相関マップから得られる同時相関強度と異時相関強度の符号の組み合わせで摂動に対する信号強度変化のプロセスを視覚的に捉えることができる。

同時・異時相関スペクトルは次のような式で導かれる。まず摂動 t_j を変化($j=1,2, \dots,m$)さ

せて観測されたスペクトルを $y(\nu, t_j)$ とする。各波数の吸光度について平均値 $\bar{y}_j(\nu)$ を計算し、その値を $y(\nu, t_j)$ から引いたものを動的スペクトルとする。したがって、動的スペクトルは

$$\bar{y}_j(\nu) = y(\nu, t_j) - \bar{y}(\nu)$$

となる。同時相関スペクトル $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ は次のように与えられる。

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m (\bar{y}_j(\nu_1) \cdot \bar{y}_j(\nu_2))$$

一方、異時相関スペクトルは $\Psi(\nu_1, \nu_2)$ は次式で与えられる。なお、 N_{jk} はヒルベルト-野田変換行列を示している。

$$\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \bar{y}_j(\nu_1) \cdot \sum_{k=1}^m N_{jk} \bar{y}_j(\nu_2)$$

ここで M_{jk} は以下であらわされるヒルベルト-野田変換行列である。

$$M_{jk} = \begin{cases} 0 & j = k \\ 1/\pi(k-j) & \text{otherwise} \end{cases}$$

同時相関スペクトルは、対角線上 $\nu_1 = \nu_2$ にある自己相関ピーク(autopeaks)と、それ以外の交差ピーク(crosspeaks)よりなる対称的なスペクトルであり、ピークの強度および位置により、各測定によって得られたスペクトルの化学的な情報を示すようになっている。自己相関ピークがおのおのの官能基の局所的環境を反映するのに対し、対角線より外れた箇所に見られる交差ピークは、官能基間の相互作用の有無を示す。異時相関スペクトルは、同時相関スペクトルと異なり対角線に沿って反対称となっており、 ν_2 において観測されたスペクトル強度 $\bar{y}_j(\nu_2)$ に 90° の位相遅れを与えた後に、 $\bar{y}_j(\nu_1)$ との相関を計算して現れる相関である。これは正弦波では位相が 90° 異なる2つの信号間の相関は0となる。すなわち、摂動が加えられた際、 ν_1, ν_2 におけるスペクトル強度の変化が互いに完全に同期していたとすれば、 $\bar{y}_j(\nu_2)$ に 90° の位相遅れを与えられたものと、との間には相関は発生しない。言い換えれば、もしこのような相関が発生したとすると、 $\bar{y}_j(\nu_1)$ の間には摂動に対する応答に遅れが存在することを意味する。したがって、異時相関スペクトルを調べることで、各波数間の変化の順序を明らかにすることができる。

以上のように本章では、代表的なケモメトリックスの手法を述べてきた。重要なことは、複雑な階層構造を持ち、様々な構成成分より成る毛髪に対して、ケモメトリックスの手法は有効であるにも関わらず、先行研究[33]では毛髪の基本的な性質の理解に留まっていることである。本研究では、毛髪組織の階層ごとによる解析が可能で、測定環境が実際にヘアケアの現場で起こっている諸問題にも適用できる顕微 IR で得られたスペクトルをケモメトリックスの手法を用いて解析することとした。ケモメトリックスの手法を適用することで、毛髪の微細な構造変化をモニタリングすることができ、ヘアケアの現場で起こっ

ている諸問題の解明のみならず、それらの問題の発生を予測する測定モデルの開発まで応用できると考えられる。

2.5 参考文献

1. JIS K 0117, 赤外分光分析通則, 2017
2. 古川行夫, 高柳正夫, 長谷川健, 赤外・ラマン分光法, 日本分光学会編, 講談社, 東京 (2009)
3. 田隅三生, 赤外分光測定法 基礎と最新手法, 日本分光学会編, エス・ティ・ジャパン, 東京 (2012)
4. 稲益悟志, 森脇太郎, 池本夕佳, 日本化粧品技術者会誌, 50, 209–217 (2016)
5. 鈴田和之, 渡邊鉦介, 前田貴章, 伊藤廉, 繊維学会誌, 72(1), 1–8 (2016)
6. 大西晃宏, 日本接着学会誌, 44(5), 174–179 (2008)
7. 七尾英孝, 星靖, 滝渡幸治, 森誠之, トライボロジスト, 62(4), 296–299 (2017)
8. 山中洋一郎, 北川淳一, 中丸裕樹, 表面技術, 65(11), 531–538 (2014)
9. 井口昭則, 林崇太, 平林秀雄, 山田和志, 西村寛之, 成型加工, 26(9), 444–449 (2014)
10. T. Ponnuswamy, O. Chyan, *Analytical Sciences*, 18, 449–453 (2002)
11. C. Popescu, H. Hocker, *Chem. Soc. Rev.*, 36, 1282–1291 (2007).
12. A. Savitzky, M. J. E. Golay, *Anal. Chem.* 36, 1627 (1964)
13. S. Yoshida, H. Yoshida, *Biopolymers*, 74, 403–412 (2004).
14. 宮前裕太, 山川弓香, 尾崎幸洋, 日本化粧品技術者会誌, 41, 22–30 (2007)
15. P. Marchand, L. Marmet, *Rev. Sci. Instrum.*, 54, 1034 (1983)
16. 南茂夫, 科学計測のための波形データ処理, CQ 出版 (1986)
17. 南茂夫, 科学計測のためのデータ処理入門, CQ 出版 (2001)
18. M. Otto, *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, Wiley, Weinheim (2016)
19. 長谷川健, スペクトル定量分析, 講談社 (2005)
20. 尾崎幸洋, 分光学入門, 産業図書株式会社 (1997)
21. 尾崎幸洋, 宇田明史, 赤井俊雄著, 化学者のための多変量解析, 講談社 (2002)
22. J. H. Jiang, Y. Liang, Y. Ozaki, *Intell. Lab. Syst.* 71, 1–12 (1995)
23. J. Toft, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 29, 189–212 (1995)
24. F. C. Sanchez, B. van de Borgaert, S. C. Rutan, D. L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 34, 139 (1996)
25. J. H. Jiang, Y. Ozaki, *Appl. Spectrosc. Rev.* 37, 321–345 (2002)
26. 長谷川健, 尾崎幸洋, 分析化学, 54, 1–26 (2005)

27. S. Morita, M. Tanaka, Y. Ozaki, *Langmuir*, 23, 3750–3761 (2007).
28. H. Yamasaki, S. Morita, *Spectrochimica Acta Part A*, 197, 114–120 (2018).
29. C. K. Huang, M. Ando, H. Hamaguchi, S. Shigeto. *Anal. Chem.*, 84, 13, 5661–5668 (2012).
30. V. Gupta, A. K. Rai, T. Kumar, A. Tarai, G. Manoj Kumar Gundawar, A. K. Rai, *Analytical Sciences* 40, 53–65 (2024)
31. I. Noda, *Appl. Spectrosc.*, 47, 1329–1336 (1993).
32. I. Noda, *Analytical Sciences*, 23, 139–146 (2007).
33. 野田勇夫, *高分子*, 39(3), 214–217 (1990).

第3章 毛髪内部の水分挙動評価法の開発と加齢毛への応用

3.1 緒言

毛髪は水分に敏感であることが知られている。過去にはその特性を利用して湿度を測定するために使用されていた[1]。化粧品学の観点から見ると、この水分応答性の高さは髪のも物性や外観における様々な変化として現れる。例えば、相対湿度の変化により伸縮性や動的弾性率が増減することや、ウォーターセットした毛束が高湿度や低湿度にさらされるとヘアスタイルを保持できなくなることが報告されている[2, 3]。近年、多彩なヘアカラーやスタイリングを楽しむ人が増えており、それらの美容行為による髪のダメージは深刻になっている。例えば、ブリーチ処理は毛髪色素の発色団（メラニン顆粒）の分解を引き起こして毛髪の明度を向上させるが、毛髪タンパク質の副反応も同時に起こってしまう[4, 5]。その副反応として、ブリーチ処理によりキューティクル表面の 18-メチルエイコサン酸（18-MEA）の除去とジスルフィドの分裂によりスルホン酸が生成され、結果として毛髪における水分応答性が上がることが報告されている[5]。

毛髪の水分量の測定は顕微鏡観察による毛径計測、重量変化、およびカールフィッシャー滴定法などいくつかの方法が汎用されている[4-7]。特に、ブリーチ処理剤にて脱色した毛髪(ブリーチ処理毛)の膨潤挙動は、未処理の毛髪よりも大きいことが実証されており、酸化によって生じる変化の相対的な程度を推定するために使用されてきた。さらに毛髪内部の水分分布における詳細な研究として、クライオ SEM を用いた含水状態におけるハイダメージ毛の水分の局在をサブミクロンオーダーで可視化する方法などが開発されてきた[8]。しかし、これらの方法ではどれだけの量の水が内部のどこまでに浸透したかをリアルタイムで解析することはできない。また、毛髪はキューティクル、コルテックス、およびメデュラという階層構造を取るため[9]、毛髪内部の水分挙動を評価するためには各構造の詳細な検討が必要である。

そこで本研究では、顕微 IR を用いて、未処理毛とブリーチ処理毛の毛髪内部の水分挙動を空間的かつ時間的にイメージングし、任意の部位における水分量を数値化することを目的とした。なお、ブリーチ処理毛は既に外部水分に応答性が高い性質を持っているため比較対象としている。さらに、加齢にともない湿度変化による曲率の上昇が起こる、つまりくせやうねりが強くなるという実際のヘアケアの現場で起きている問題についても、本研究で確立した評価方法を用いて、加齢毛における水分浸透性や曲率の変化を解析した。

3.2 実験方法

3.2.1 毛髪試料と試薬

未処理毛はビューラックス株式会社(東京)より購入した。加齢毛は、健康な 40 代から 60 代の日本人女性を対象として、書面によるインフォームドコンセントを得た上で、頭皮に近い根元部分から採取した。ブリーチ処理毛は、未処理毛を 3.0%過酸化水素および 1.2%アンモニアを含むブリーチ水溶液に 40 分間浸漬し、その後精製水で十分にすすいだ毛髪とした。上述したすべての毛髪サンプルは、ごみや一時的なセット形状を除去するため、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム(SLS)水溶液(5.0%)で洗浄し、精製水ですすいだのち、測定前日に 25 °C, 50 RH%の温湿度環境にて順化され、試験に供された。

重水(99.8 %同位体)は、関東化学株式会社(東京)から入手した。なお、洗浄に用いた SLS の構造式は Figure 1 に示す。

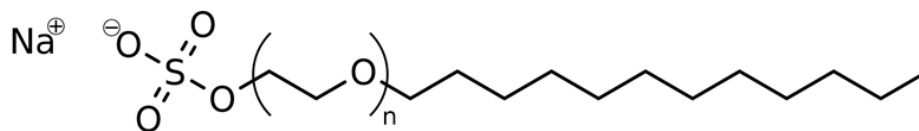


Figure 1 Chemical structure of Sodium Laureth Sulfate (SLS).

3.2.2 毛髪切片の作成

顕微 IR 測定に用いる毛髪切片を準備するために、各毛髪を厚さ 0.5 mm のポリエチレンテレフタレートプレートに置き、UV レジン樹脂にて包埋して UV ランプで 25 分間照射した。次に、工業用回転式マイクローム Leica RM2265 (Leica Biosystems 社, 東京) を使用して、厚さ 6.0 μm の平滑な切片を作製し、そのあとにピンセットで毛髪部分とレジン樹脂部分に取り分けて毛髪部分を試験に用いた。なお、本操作において UV による毛髪構成成分の変化がないことを確認している。

3.2.2 顕微 IR 測定

回転式マイクロームにて作製した毛髪切片への重水の浸透及び蒸散挙動を評価するために、Figure 2 に示す 2 つのダイヤモンドウィンドウを備えたフローセルを新たに開発した。毛髪切片は 2 つのダイヤモンドウィンドウの間に密着して挟まれていることを実態顕微鏡にて確認した。したがって、外部から毛髪に作用する重水や乾燥空気は測定中において毛髪切片のスライス面ではなく、キューティクルそのものに接触する。

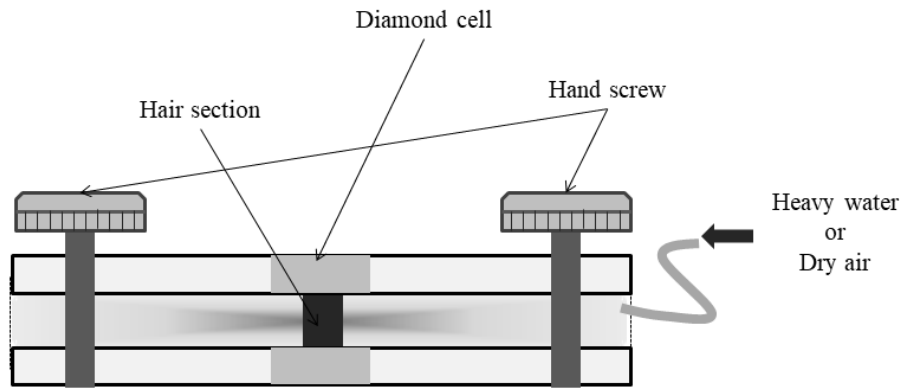


Figure 2 Schematic diagram of diamond cell developed in this study. A smooth hair section of 6.0 μm thickness is sandwiched between the cells, and the hand screw is tightened while observing with stereomicroscope. After confirming that there are no cracks in the section, heavy water and dry air are fed into the cell to obtain an infrared absorption spectrum.

水分挙動評価は、フローセルに 200 μL の重水を注入したあと、Figure 3 に示した測定点であるポイント 1-6 (メデュラからキューティクルまで) について、顕微 FT-IR (iN-10, Thermo Scientific 社, ウォルサム, 米国) を使用してラインスキャン法にて 10 μm ごとに測定した。なお、この時のフローセル内の D_2O の数密度は約 $7.8 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$ と算出された。また、タンパク質の分布を可視化するために、毛髪切片をマッピングステージに置き、透過率を測定した。ラインスキャンおよびマッピングの測定条件は、アパーチャサイズを $10 \times 10 \mu\text{m}$ 、波数分解能を 8 cm^{-1} 、各スペクトルのスキャン回数を 256 回、測定範囲を $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ とした。

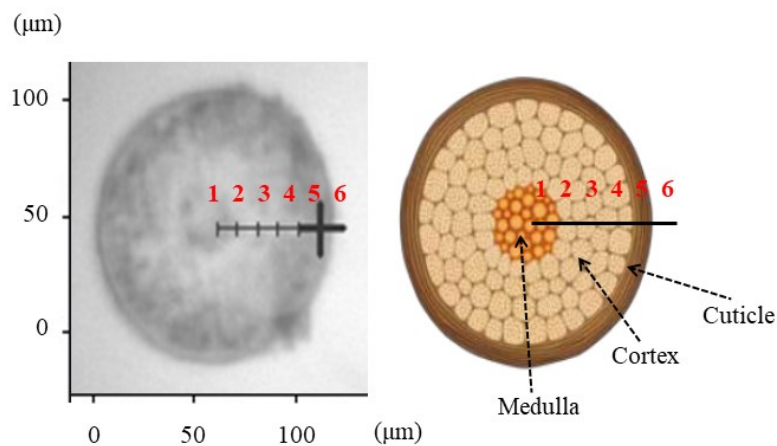


Figure 3 Optical microscopic image of untreated hair. The straight line is a measurement point of line mapping, and was measured every 10 μm from the medulla to cuticle (point 1-6).

3.2.4 毛髪の曲率測定

毛髪繊維の曲率は、Nagase らによって以前に報告された内容[10]をもとに測定した。具体的には、毛髪を 25 °C の精製水に 10 分間浸漬して、一次的なウォーターセットを除去した。次に、毛髪をイメージスキャナー (GTX830, セイコーエプソン株式会社, 東京, 日本) 上に置き、毛髪形状の 2 次元画像を取得し、根元から毛先における毛髪の長さに沿った各曲線の曲率を分析しました。毛髪の色は毛髪の形状にほとんど影響を与えないため、カラー処理した毛髪を区別せずに形状測定を行った。

3.2.5 統計解析

未処理毛とブリーチ処理毛の水分挙動を比較するために、Student's *t* test により検定を実施した。40 代毛髪と他の年代(50 代毛髪および 60 代毛髪)との水分挙動の比較のために、Dunnett's multiple comparison test による有意差検定を実施した。なお、有意水準は $p < 0.05$ と定義した。

3.3 結果と考察

3.3.1 水分挙動評価法の開発

重水は、化学反応性や溶媒の性質の点で軽水とほとんど変わらないため、タンパク質の質量分析や構造解析に使用されてきた[11–14]。本研究では、重水は軽水とは異なり、2500 cm^{-1} 付近に赤外吸収ピークが存在することから、試験前に毛髪に内在している水分とキューティクルより浸透してきた水分は重水を用いることで区別するために使用した。

Figure 3 は、ラインマッピング法によって得られた、未処理毛に重水を 30 分間浸透させた後に、4 時間乾燥させながら測定した IR スペクトルの経時的な二次元イメージングを示している。未処理毛では、重水浸透後 10 分で 2500 cm^{-1} 付近の O–D 伸縮振動由来のバンド強度が上昇し、内部への重水浸透を可視化することができた。(Figure 3 b)。重水浸透 30 分後では重水がポイント 1、つまりメデュラ層の領域に到達したことがわかった (Figure 3 c)。このように Figure 3 b から Figure 3 c への変化は、重水が髪の外側から内側に浸透したことを示している。そのあとセル内に乾燥空気を送り込むと、乾燥後 3 時間ではまだ毛髪内部に重水が残っていたが (Figure 3 e)、乾燥 4 時間後には毛髪に浸透した重水が完全に蒸散していることが確認された (Figure 3 f)。この評価手法により、キューティクルからの重水の浸透挙動を任意の場所でリアルタイムに可視化することが可能になった。なお、1540 cm^{-1} 付近の N–H 変角振動に帰属されるアミドIIのバンド強度も経時的に変化しており、重水浸透によりその強度は減少し、乾燥工程中に重水浸透前の強度に戻った。これは毛髪内部タンパク質が重水と作用することでアミド基の水素が重水素に置換されて–CONH–から–COND–と変化したことによるものと考えられる。

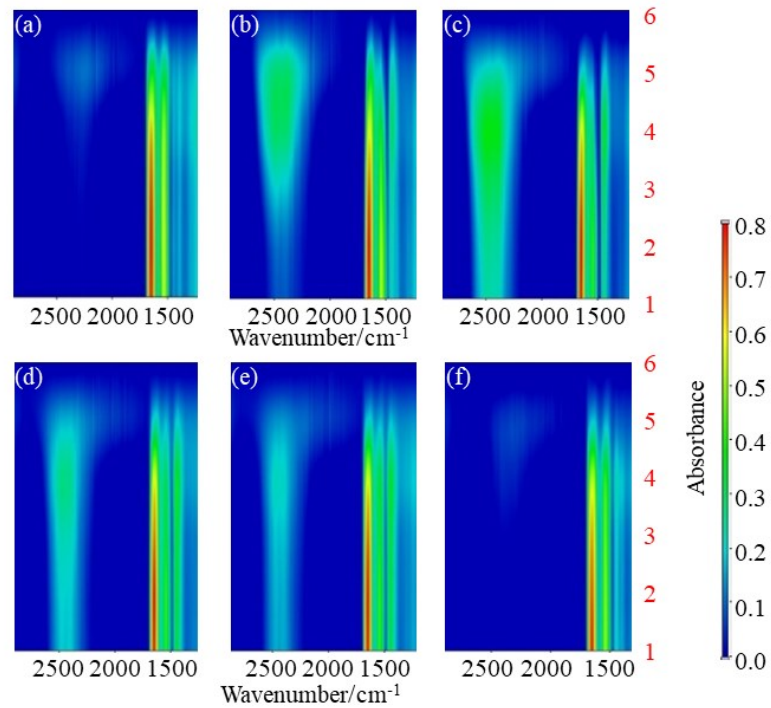


Figure 4 The IR spectra imaging of untreated hair under the condition of heavy water penetration and drying process at 25°C and 50% relative humidity. (a), heavy water penetration for 0 min; (b), heavy water penetration for 10 min; (c), heavy water penetration for 30 min; (d), drying process for 2 h; (e), drying process for 3 h; (f), drying process for 4h. Red indicates high absorbance, and blue indicates low absorbance. The right vertical axis shows the measurement points from points 1 to 6 shown in Figure 3.

Figure 5 は、未処理毛髪における Figure 3 に示すポイント 3 での時間依存的な IR スペクトルを示している。これらのスペクトルにおける O-D 伸縮強度を求めることで、任意の地点における水分挙動を定量的に評価することができる。

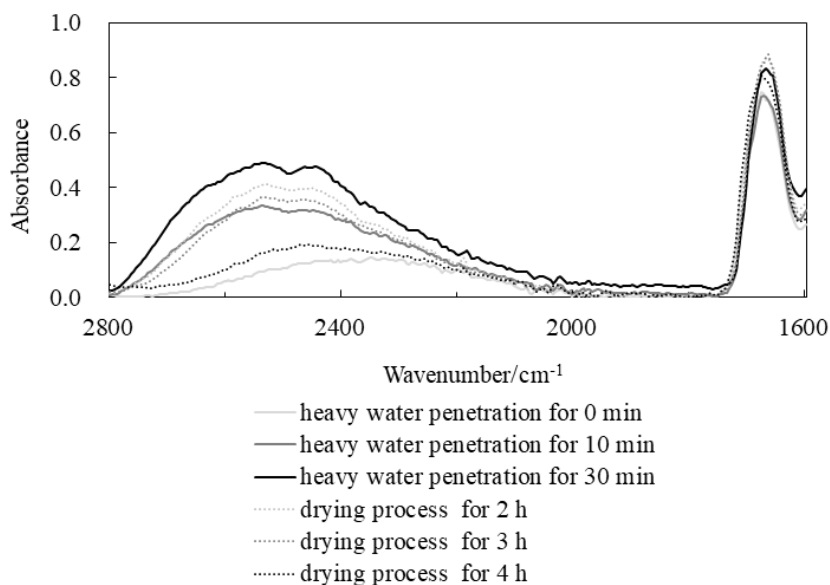


Figure 5 Time dependency IR spectra in the cortex (point 3 shown in Figure 4) of untreated hair.

次に、測定点 1、3、および 5 における重水の経時的な吸光度について、未処理毛とブリーチ処理毛で比較した (Figure 6)。なお、測定点はそれぞれ、メデュラ、コルテックス、およびキューティクル層に対応する。どの測定点においても、ブリーチ処理毛は未処理毛と比較して高い水分浸透性を示した。特に測定点 1 では重水処理 20 分後から乾燥 20 分後までの間、ブリーチ処理毛の含水率が未処理毛に比べて有意に高いことが明らかになった (Figure 6a)。また、重水はどの測定点でも、未処理毛よりもブリーチ処理毛の方が 1 時間早く完全に蒸散した。これらの結果により、毛髪内部のどの部位においても水分挙動をリアルタイムで定量化する方法を確立した。未処理毛とブリーチ処理毛において水分挙動が異なる理由の 1 つは、毛髪タンパク質の酸化分解である可能性がある。毛髪にはシスチン由来のジスルフィド結合 (R-S-S-R) が多く含まれており、ブリーチ処理によるジスルフィドの酸化分解には 2 種類の開裂パターンが提案されている[6]。1 つは、ほとんどの化学酸化剤の存在下で起こる経路である S-S 開裂であり、もう 1 つは C-S 開裂と言われている。S-S 開裂には、ジスルフィド結合の段階的な酸化が含まれ、その後、一酸化シスチン (R-SOS-R) や二酸化シスチン (R-SO₂S-R) などの酸化中間体を介してスルホン酸 (R-SO₃H) が形成される。一方、C-S 分裂は最初にジスルフィド開裂によってスルフェン酸 (R-SOH) を形成し、これが徐々にさらに酸化されてスルフィン酸 (R-SO₂H) になり、スルホン酸が形成される。どちらの場合も、最終的な酸化生成物がスルホン酸であることが重要であり、スルホン酸の増加により毛髪内部が親水性になったと考えられる。このようなジスルフィド結合開裂によるスルホン酸の生成以外にも、ブリーチ処理によるキューティクルのバイメタル性が充進されることでリフトアップが起きた可能性や[15]、ブリーチによって生成されたメラニンホールに水が物理的に充填された可能性[8]も考えられ、その結果として水分応答性が上昇したことも考えられる。

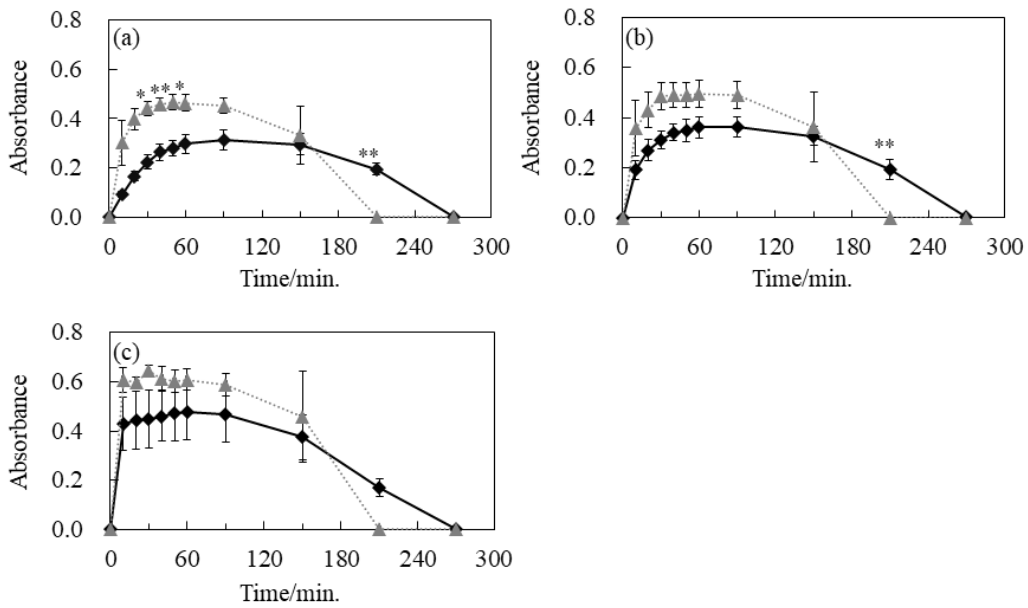


Figure 6 Water behavior of untreated hair (◆) and bleached hair (▲) in the (a) point 1, (b) point 3 and (c) point 5 shown in Figure 3, respectively. The O-D stretching peak intensity at approximately 2500 cm^{-1} under the condition of heavy water penetration in the first 30 min and after drying process for 4 h. Data are shown as the mean \pm SE ($n = 3$). ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs. bleached hair.

次に、ブリーチ処理によるタンパク質の分解分布を明らかにするために、S-S 開裂またはチオエステル結合の酸化程度を反映することが報告されている[16-18]、毛髪切片中の 1040 cm^{-1} 付近のスルホン酸 ($\text{R-SO}_3\text{H}$) の IR スペクトルイメージングを測定した(Figure 7)。ブリーチ処理毛は、未処理毛と比較してどの部位においてもスルホン酸の増加が見られ、キューティクル層だけではなく、最内層のメデュラ層まで起こっていることが確認された。ラマン分光法を用いた研究において、ブリーチ処理により S-S 開裂が起こることが報告されており[19]、今回のブリーチ処理によるスルホン酸の増加挙動と一致する。したがって、Figure 6 に示される測定点 1 における未処理毛とブリーチ処理毛における水分含量の有意な差は、ブリーチによって引き起こされる内部レベルへの損傷によるものである可能性がある。

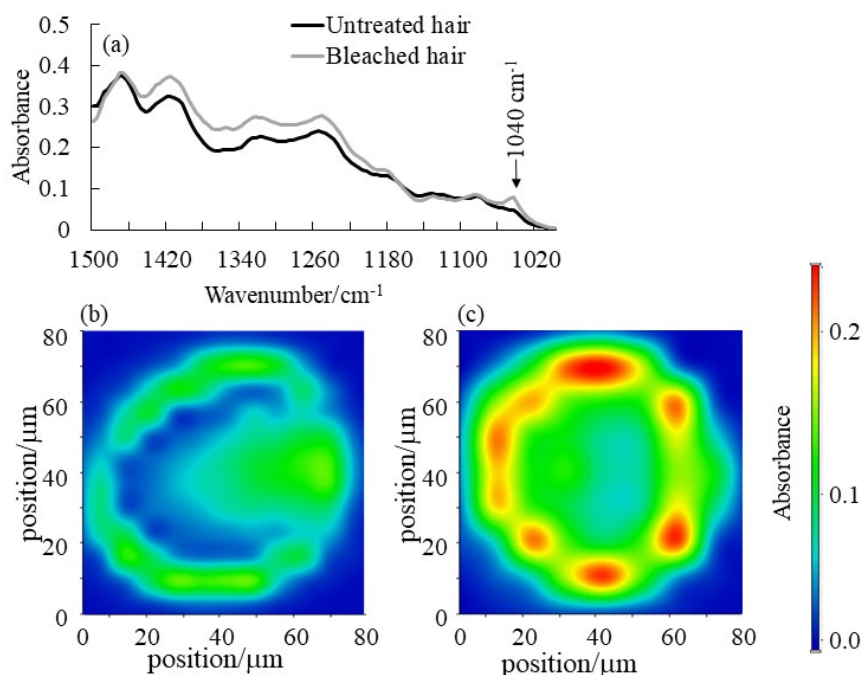


Figure 7 (a): The IR spectra in the cortex (point 3 shown in Figure 3) of untreated and bleached hair in the range of 1000–1500 cm^{-1} . The IR imaging of the SO_3H located at 1040 cm^{-1} in (b) untreated and (c) bleached hair under the condition of 25°C and 50% relative humidity. In the figure, red indicates high absorbance, and blue indicates low absorbance. The white bar in the figure indicates 50 μm .

最後に、本章で確立した本評価法を用いて加齢毛の水分挙動を年代ごとにイメージングした(Figure 8–10)。その結果、40代と50代の水分挙動はほぼ同じであった。60代の毛髪では、直後から急激に毛髪内部に重水が浸透し、さらに乾燥30分後から60分後にかけて顕著な蒸散が認められた。測定点3、すなわちコルテックス層における重水の経時的な吸光度をプロットした結果をFigure 11に示す。60代毛髪の重水処理10分後から20分後におけるO–Dの吸光度は、40代毛髪および50代毛髪と比べて2倍から3倍ほどの値を示し、それぞれの時間帯において40代毛髪と比べ有意差が見られた。また乾燥工程において60代毛髪は特徴的な挙動を示し、乾燥開始から乾燥30分後までは40代毛髪と比較して有意に吸光度が高かったが、乾燥30分後から60分後にかけてはO–Dの吸光度が0.59から0.15に急激に減少したことが確認できた。ゆえに、60代毛髪は、40代毛髪および50代毛髪と比べて水分応答性が顕著に上昇したことが示唆された。

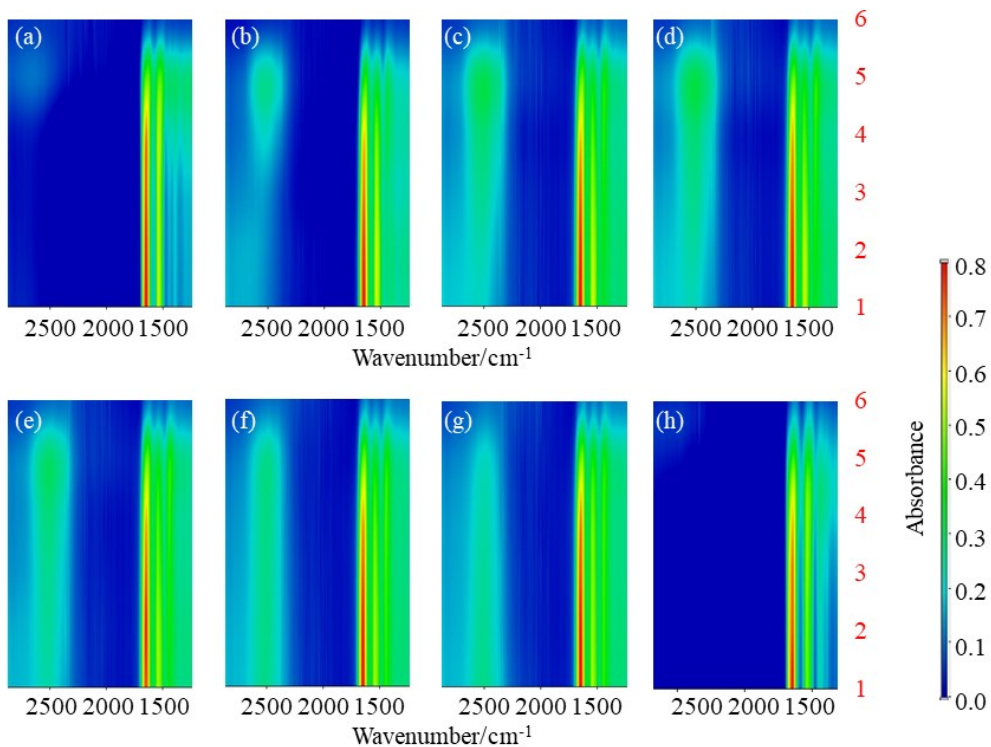


Figure 8 The IR spectra imaging of 40s hair under the condition of heavy water penetration and drying process at 25°C and 50% relative humidity. (a), heavy water penetration for 0 min; (b), heavy water penetration for 10 min; (c), heavy water penetration for 30 min; (d), drying process for 30 min; (e), drying process for 1 h; (f), drying process for 2 h; (g), drying process for 3 h; (h), drying process for 4 h. Red indicates high absorbance, and blue indicates low absorbance. The right vertical axis shows the measurement points from points 1 to 6 shown in Figure 3.

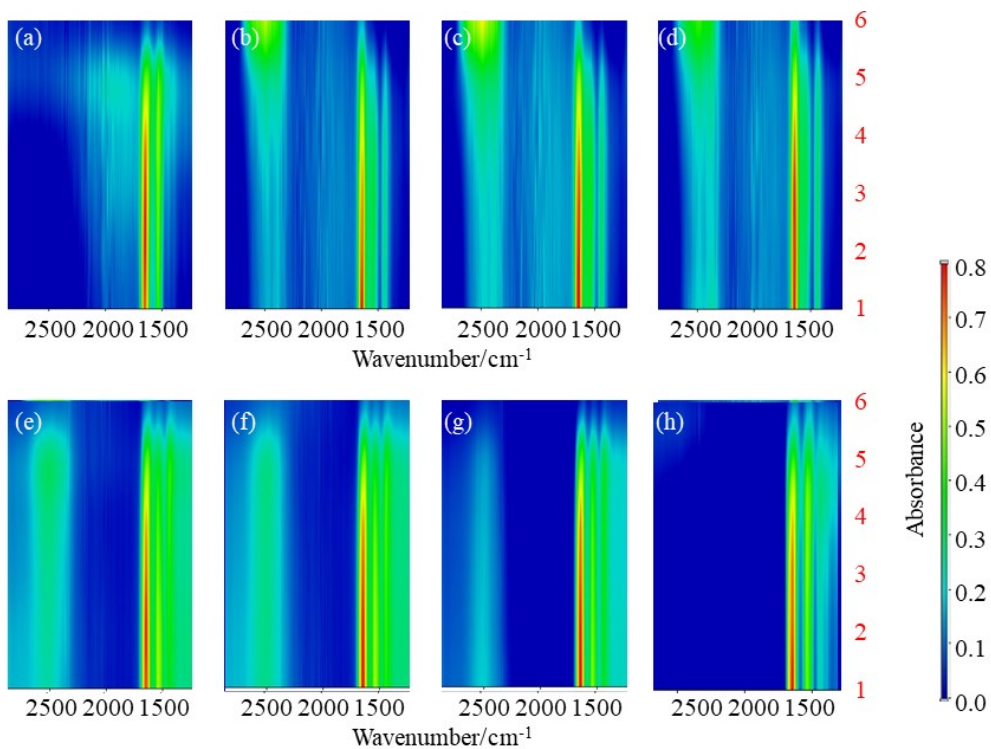


Figure 9 The IR spectra imaging of 50s hair under the condition of heavy water penetration and drying process at 25°C and 50% relative humidity. (a), heavy water penetration for 0 min; (b), heavy water penetration for 10 min; (c), heavy water penetration for 30 min; (d), drying process for 30 min; (e), drying process for 1 h; (f), drying process for 2 h; (g), drying process for 3 h; (h), drying process for 4 h. Red indicates high absorbance, and blue indicates low absorbance. The right vertical axis shows the measurement points from points 1 to 6 shown in Figure 3.

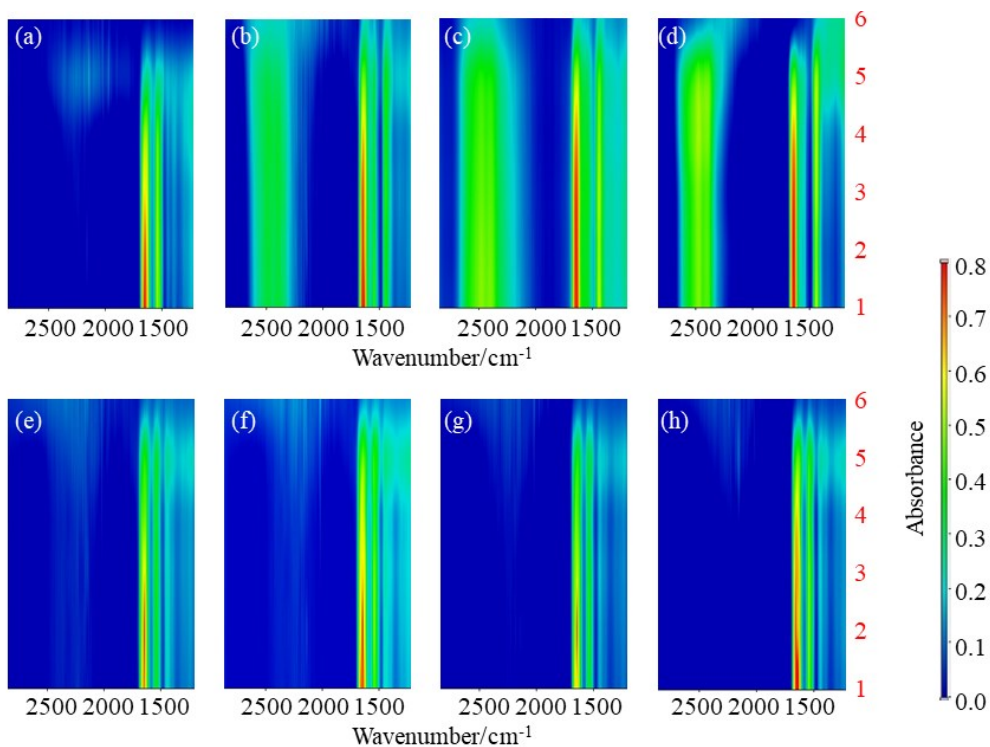


Figure 10 The IR spectra imaging of 60s hair under the condition of heavy water penetration and drying process at 25°C and 50% relative humidity. (a), heavy water penetration for 0 min; (b), heavy water penetration for 10 min; (c), heavy water penetration for 30 min; (d), drying process for 30 min; (e), drying process for 1 h; (f), drying process for 2 h; (g), drying process for 3 h; (h), drying process for 4 h. Red indicates high absorbance, and blue indicates low absorbance. The right vertical axis shows the measurement points from points 1 to 6 shown in Figure 3.

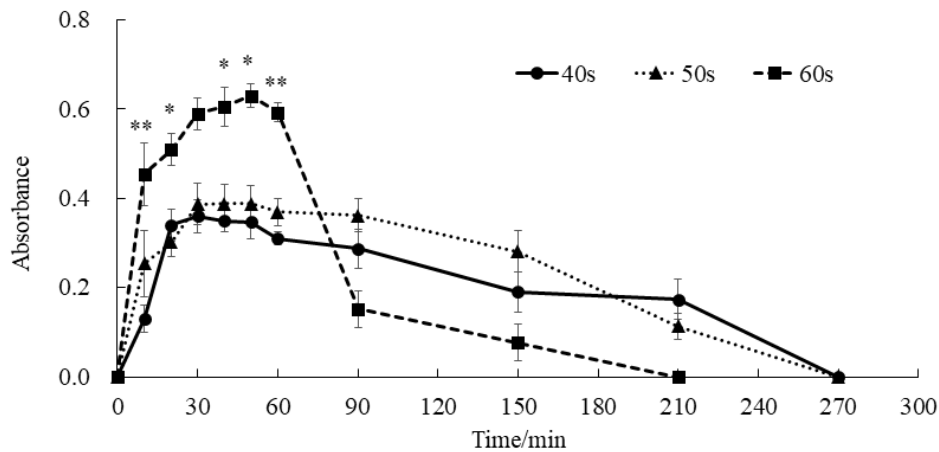


Figure 11 Water behavior of age-related black and white hairs of Japanese woman in the cortex (point 3 shown in Figure 8-10). The O-D stretching peak intensity at approximately 2500 cm^{-1} under the condition of heavy water penetration in the first 30 min and after drying process 25°C and 50% RH for 4 h. Data are shown as the mean \pm SE ($n=3$). $**p < 0.01$ and $*p < 0.05$ vs. 40s hair.

また、各加齢毛髪について湿度を変化させた際の外観を観察した結果、高湿度および低湿度において髪の乱れが起こっていることが確認された(Figure 12)。さらにこの髪の乱れを数値化するために、毛髪1本ごとの曲率を計測したところ、湿度変化および加齢にともなって曲率が上昇していることを見出した(Figure 13)。毛髪内部の水分保持には毛髪組織の80%以上を占めるコルテックス層が重要な役割を担っていることが言われており[20]、加齢にともない湿度による影響を受けやすくなった一因も加齢によるコルテックス層の内部変性にあると推測される。なお、加齢毛の詳細な内部解析の結果は次章で述べる。

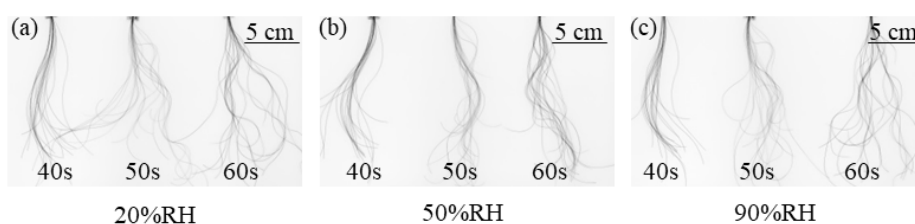


Figure 12 Images of hair fiber shape after exposure at different RH conditions at 25°C . (a): 20% RH, (b):50% RH, (c):90% RH. From left to right, hair bundles are from women in their 40s, 50s and 60s.

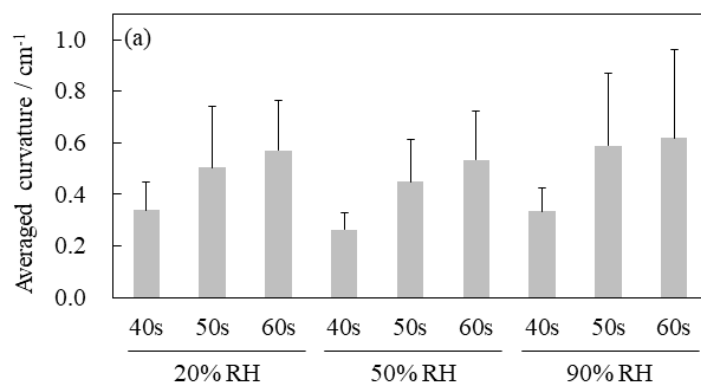


Figure 13 Average curvature of (a) each humidity range and (b) all age groups in black and white hairs at the same subjects in Figure 12.

3.4 結論

ヘアケアの現場で実際に起きている、水分による髪乱れの解明のため、FT-IR 顕微鏡を用いてキューティクルに浸透した重水を分析することで、毛髪に取り込まれた水分の局在を任意の時点でリアルタイムに可視化および定量化することに成功した。未処理毛とブリーチ処理毛との比較においては、毛髪内部のどの部位においても、未処理毛よりもブリーチ処理毛で水分浸透速度と水分蒸散速度が高いことが明らかになった。このような未処理毛とブリーチ処理毛の水分挙動の違いは、ジスルフィド結合とチオエステル結合の酸化によって最終的な酸化物であるスルホン酸の形成が起これ、毛髪全体が親水化したことを示唆している。さらに本評価手法を加齢毛に適用した結果、湿度変化による加齢毛の曲率の上昇と水分浸透性および水分蒸散性に代表される水分応答性の上昇に相関性があることが推測された。毛髪水分の恒常性には毛髪の大部分をしめるコルテックス領域が関与していることから、加齢毛の研究をさらに進めるために、ケモメトリックスの手法を用いてオーバーラップした IR スペクトルからタンパク質の二次構造をイメージングする方法を開発することとした。

3.5 参考文献

1. C. Trowbridge, *Science* 4, 62–65 (1896)
2. J. Menkart, L. J. Worfram, I. Mao, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 17, 769–65 (1966)
3. M. M. Breuer, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 23, 447–470 (1972)
4. H. Zahn, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 17, 687–701 (1966)
5. C. R. Robbins, C. Kelly, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 20, 555–564 (1969)
6. C. R. Robbins, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 22, 339–348 (1971)
7. W.E. Swift, J.A. Maclaren, *The chemistry of organic sulfur compounds*, ed. by N. Kharasch, F.J. Meyers, vol. 2. Pergamon Press, New York (1966)

8. 栗原亮子, 齋藤ゆかり, 今井健仁, 丹羽正直, *日本化粧品技術者会誌*, 46, 264–270 (2012)
9. C. Popsco, H. Hocker, *Chem. Soc. Rev.*, 36, 1282–1291 (2007)
10. S. Nagase, Y. Kajiura, A. Mamada, H. Abe, S. Shibuichi, N. Satoh, T. Itou, Y. Shinohara, Y. Amemiya, *J. Cosmet. Sci.*, 60, 637–648 (2009)
11. C.B. Baddiel, *J. Mol. Biol.*, 38, 181–199 (1968)
12. V. Katta, B.T. Chait, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 5, 214–217 (1991)
13. A.D. Kline, W. Braun, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, 189, 377–382 (1986)
14. J. Pflugrath, E. Wiegand, R. Huber, L. Vertesy, *J. Mol. Biol.*, 189, 383–386 (1986)
15. 布施直也, 松井正, *日本化粧品技術者会誌*, 53, 278–286 (2019)
16. H. Zahn, H.G. Gattner, *Formation and structure of human hair* ed. By P. Jollès, H. Zahn, H. Höcker. Birkhaeuser, Basel (1997)
17. E. Hoting, M. Zimmermann, S. Hilterhaus–Bong, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 46, 85–99 (1995)
18. 稲益悟志, 森脇太郎, 池本夕佳, *日本化粧品技術者会誌*, 50, 209–217 (2016)
19. A. Kuzuhara, *Biopolymers*, 81, 506–217 (2006)
20. C. R. Robbins, *Chemical and physical behavior of human hair 4th ed.*, (Springer, NewYork, 2002)

4.1 緒言

髪は肌と同様に加齢に伴い変化する。ヘアスタイルや髪の色を変えると、自分のもとより人の受ける印象が大きく変わるため、髪はアンチエイジング効果に対して非常に重要な位置づけである。近年、女性の社会進出や食生活・生活環境の変化といった髪へのストレスの増加や、人に見られることへの意識の向上により、加齢による髪の衰えを感じやすくなっている。本研究で行った50代日本人女性208人を対象とした髪の意識調査によると、70%以上の方が白髪(White hair)に悩んでいることが明らかとなっている(Figure 1)。その白髪ケアを目的として、髪の色味を補正するための研究が行われてきた[1-5]。近年では、白髪の染色特性は、染料または酸化染料モノマーの浸透速度だけでなく毛髪中の金属の量的差異によっても直接影響されることを明らかにした研究[6]や、ナノスケール二次イオン質量分析計(Nano-SIMS)を用いて、毛髪層構造ごとに発生する染色箇所を詳細に解析した研究[7]などがある。一方、調査の中で見えてきた興味深いこととして、はね(Sticking out)、うねり(Curved)、そして広がり(spread out)といった、いわゆるヘアスタイルの乱れについて各悩みを合計すると白髪に次ぐ回答になっていることが分かった(Figure 1)。

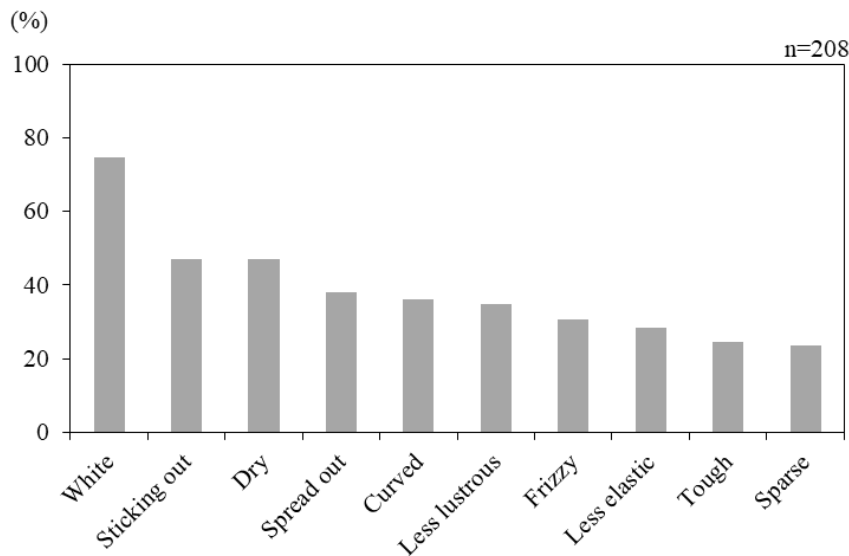


Figure 1 Benchmark survey on hair problems among Japanese women in their fifties in 2019.

実際、加齢による毛髪の変化は、白髪のみならず、密度、光沢、水分含量、およびキューティクルの形態変化においても広く報告されている[8-10]。また、加齢にともなう毛髪の物理的特性の変化のみではなく、その変化と毛髪内部の変性を結び付けた研究例も存在する。例えば、シンクロトロン放射マイクロビーム X 線回折を使用した構造分析により、毛髪微細構造の横方向分布と曲率の増加を関連付けた研究[11]や Keratin associated protein

5(KAP5)の発現が毛髪ヤング指数と正の相関があるという研究[12]などがある。しかし、加齢にともない髪の乱れが感じやすくなることと毛髪内部のタンパク質構造の変性との関係は未解明であり、ヘアケアの現場で起きている実際の課題として残ったままである。

毛髪内部のタンパク質構造の解析方法として赤外分光法(IR)は古くから用いられている[13-15]。特に α -ヘリックスや β -シートといった局所的立体構造についての二次構造解析には、1600-1700 cm^{-1} に吸収スペクトルを持つアミドIバンドを用いることが多い。毛髪のアミドIバンドは、スペクトル強度は高いがブロードな形状をしているため、解析にはカーブフィッティングやピーク分離などの方法により、二次構造の情報を抽出することが一般的[16, 17]である。しかしながら、カーブフィッティングやピーク分離のようなスペクトル解析では解析方法に任意性が残り、時系列データや2次元イメージングデータのような膨大なスペクトルを分析するには煩雑であり時間がかかってしまうことが問題である。そのような任意性や煩雑を解消する方法としてケモメトリックスがあり、中でも多変量スペクトル分解(MCR)のようなスペクトル分解の手法は、膨大なデータ解析を機械的かつ迅速に処理できるため非常に有用である[18-20]。しかしながら、このような利点があるにも関わらず、毛髪におけるIR解析には適用されていないのが現状である。

本章では、毛髪内部の水分保持に重要な役割を担い、毛髪組織の80%以上を占めるコルテックス層[21]に着目し、そのコルテックス層における加齢にともなうタンパク質構造変化を解析するため、構造単位ごとに異なる解析手法で評価した。具体的には、タンパク質のアミノ酸配列を示す一次構造の解析には、蛍光染色およびウェスタンブロッティングといった生化学的手法、局所的立体構造を示す二次構造の解析は顕微赤外分光分析(顕微IR)とMCRを組み合わせた分光学的手法、タンパク質全体の構造を示す三次構造の解析には示差走査熱量計(DSC)を用いた熱力学的手法をそれぞれ適用した。さらに、加齢にともなうタンパク質の変性は不可逆的ではあるが、有機合成分野において汎用されるアルデヒドとケトンを実アミンへ変換する還元アミノ化反応[22-24]を毛髪科学分野に転用することで、加齢毛における毛髪内部タンパク質の改質を試みたので、併せて報告する。

4.2 実験

4.2.1 毛髪試料と試薬

加齢毛は、健康な40代から60代の日本人女性を対象として、書面によるインフォームドコンセントを得た上で、頭皮に近い根元部分から採取した。すべての毛髪サンプルは、ごみや一時的なセット形状を除去するため、界面活性剤であるポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム(SLS)の水溶液(5.0%)で洗浄し、精製水ですすいだのち、測定前日に25°C、50 RH%の温湿度環境にて順化され、試験に供された。緩衝液として用いた2-(N-morpholino)thanesulfonic acid (MES)およびphosphate buffered saline(PBS)は富士フィルム和光純薬株式会社、fluorescein-5-thiosemicarbazide(5-FTSC)ならびに5-Ethyl-2-methylpyridine borane complex(PEMB)はSigma、4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl)およびmaleimideは東京化成工業株式会社より、それぞれ入手した。なお、MES、5-FTSC、PEMB、NBD-Cl、maleimideの構造式はFigure 2のとおりである。

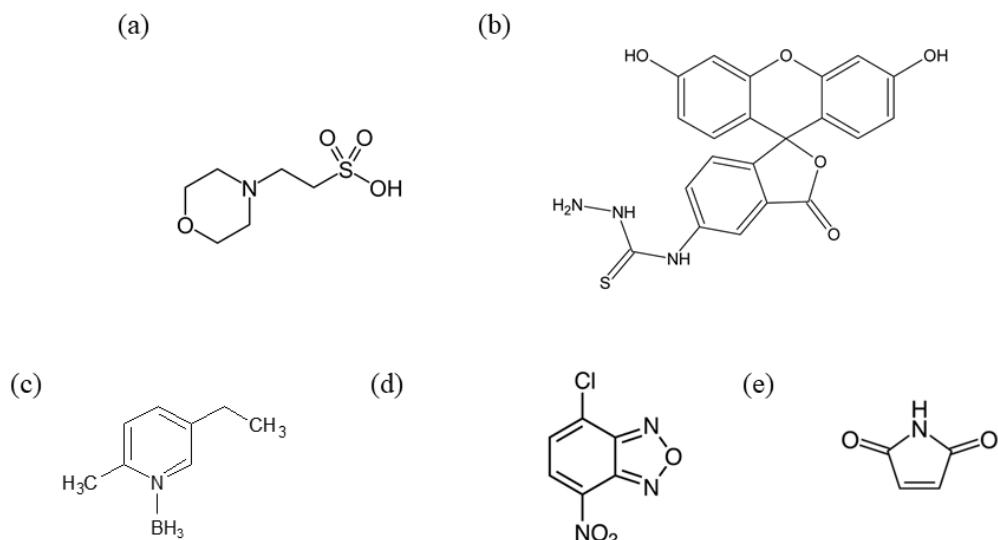


Figure 2 Chemical structure of (a) 2-(N-morpholino) thanesulfonic acid, (b) fluorescein-5-thiosemicarbazide, (c) 5-ethyl-2-methylpyridine borane, (d) 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole, (e) maleimide.

4.2.2 毛髪切片の作成

顕微 IR 測定に用いる毛髪切片を準備するために、各毛髪を厚さ 0.5 mm のポリエチレンテレフタレートプレートに置き、UV レジン樹脂にて包埋して UV ランプで 25 分間照射した。次に、工業用回転式ミクロトーム Leica RM2265 (Leica Biosystems 社, 東京) を使用して、厚さ 6.0 μm の平滑な切片を作製し、そのあとにピンセットで毛髪部分とレジジン樹脂部分に取り分けて毛髪部分を試験に用いた。

4.2.3 蛍光染色試験

4.2.3.1 カルボニル化タンパク質の可視化および定量化

4.2.2. の方法で得られた毛髪切片について、Kawasoe ら[25]の方法に従って 20 μM 5-FTSC/0.1 M MES-Na(pH 5.5)に浸漬させ、暗室で 1 時間反応させた。その後 PBS で毛髪を 4 回洗浄し、蛍光顕微鏡(Keyence BZ-X810、Keyence、大阪、日本)にて観察した。得られた画像は Image J ソフトウェア (Rasband, W.S., U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いて解析し、毛髪切片面積あたりの蛍光輝度をカルボニル化度とした。なお、 C_{40s} と C はそれぞれ 40 代の毛髪と各年代のカルボニル化されたタンパク質の蛍光強度を示す。

$$\text{carbonylated protein ratio (\%)} = \frac{C}{C_{40s}} \times 100$$

4.2.3.2 タンパク質の側鎖アミノ基の可視化および定量化

4.2.2. の方法で得られた毛髪切片について、Masaki ら[25]の方法に従ってタンパク質側鎖アミノ基を可視化および定量化した。具体的には、得られた毛髪切片を PBS (pH 6.8) に室温で 10 分間浸漬して水和させ、次に 2 M maleimide を含む PBS (pH 6.8) にて 37 °C で 24 時間反応させ、毛髪内の SH 基をブロックした。次に脱イオン水で洗浄後、毛髪切片を 25 μM NBD-Cl を含む 0.1 M NaHCO₃ 水溶液にて室温で 2 時間インキュベートし、蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-X810, Keyence, 大阪, 日本)を使用して観察した。得られた画像は、毛髪内のアミノ基を定量するために、Image J ソフトウェア (Rasband, W.S., U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) を使用して分析した。なお、 A_{40s} と A はそれぞれ 40 代の毛髪と各年代の毛髪のアミノ基の蛍光強度を示す。

$$\text{Amino groups in the hair (\%)} = \frac{A}{A_{40s}} \times 100$$

4.2.4 Western blotting 試験

毛髪タンパク質の抽出は、毛髪および爪用タンパク質抽出キット (HD-021, Invent Biotechnologies, Inc., Plymouth, USA) を使用した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンをスタンダードとして使用する Bradford 法[26]により計算した。毛髪タンパク質抽出物は 1 レーンあたり 4.0 μg とし、ゲル濃度を 12.0 % (w/v) とした、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-poly-acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)を実施した[27]。泳動後、一方のゲルは、クマシ-ブリリアントブルー(CBB)染色 (EzStain Aqua, ATTO Corporation, 東京, 日本)を使用して各タンパク質を染色した。もう一方のゲルは、ポリビニリデンジフロライド(PVDF)メンブレンにタンパク質を転写した。カルボニルタンパク質を検出するために、Goto ら[28]の方法に従いカルボニルタンパク質ウェスタンブロット検出キット (ROIK03, SHIMA Laboratories Co., Ltd., 東京, 日本)を使用した。具体的には、PVDF 膜を 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 溶液で 5 分間処理して、カルボニル基を誘導体化した。次にブロッキングバッファー(EzBlock Chemi, ATTO Corporation, 東京, 日本)で 30 分間インキュベートした後、メンブレンを 1:2000 希釈の抗 DNPH 抗体および 1:4000 希釈の抗ウサギ IgG 抗体で 25 °C で 1 時間反応させた。抗体反応は、Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Inc., New York, USA)を使用して検出した。

4.2.5 顕微 IR 分析

毛髪横断面の IR スペクトルを得るために、FT-IR 顕微鏡 (iN-10, Thermo Scientific, Waltham, USA) を使用した。まず、4.2.2 の手順に従い、6.0 μm の平滑な切片を作成した。作成された毛髪切片をマッピングステージ上に置き、下記条件にて測定した。測定条件は、アパーチャーを 10 μm × 10 μm、分解能を 8 cm⁻¹、測定波数範囲を 4000–650 cm⁻¹、積算回数を 256 とした。得られたスペクトルは、Unscrambler X (ver.10.5, Camo Software AS, Oslo, Norway)を用いて、次数を 3、平滑化点数を 9 として、スムージングおよび二次微分を行った。さらにこれらのスペクトルは Unscrambler X を用いて MCR 分析され、各スペクトルにおける毛髪のケラチンタンパク質の二次構造情報を導出した。そして、MCR で得られた各測定ポイントにおける二次構造情報は、Origin Pro (ver. 2021b, OriginLab Corporation, Massachusetts, USA)を使用して二次元イメージング処理を行った。

4.2.6 高圧示差走査熱量計(HPDSC)測定

毛髪タンパク質の三次構造の安定性を評価するために HPDSC 測定を行った。各年代の毛髪を約 1 cm ごとに切断した後、液体窒素を用いて粉碎してパウダー状にした。その後、パウダー状にした毛髪 5 mg をステンレス製耐圧パン(日立ハイテクサイエンス, 東京, 日本)に量り取り、蒸留水 10 μ L を加えて密閉した。密閉したパンを室温で 2 日間順化させた後、示差走査熱量計(DSC6220、セイコーインスツル, 千葉, 日本)を用いて、30–200 $^{\circ}$ C の温度範囲にて、昇温速度 10 $^{\circ}$ C/min、窒素ガス流量を 40 mL/min 条件で測定した。

4.2.7 還元アミノ化反応

毛髪 100 mg を、201 mg の PEMB を含む 28%アンモニア水溶液/メタノール：酢酸 (10 : 1) 反応液 5.5 mL に、室温で 4 日間浸漬させた。反応後、毛髪をメタノールで 4 回洗浄した。

4.2.8 統計解析

50 代毛髪の還元アミノ化反応前後の比較に Student's *t* test を用い、毛髪のカルボニル化度、アミノ酸残基、および DSC の各測定データにおける 40 代毛髪と他の年代(50 代毛髪および 60 代毛髪)との比較のために、Dunnett's multiple comparison test による有意差検定を実施した。なお、有意水準は $p < 0.05$ と定義した。

4.3 結果と考察

4.3.1 加齢毛における毛髪内部タンパク質の構造解析

前章にて加齢毛の形態変化および毛髪内部の水分挙動を評価した結果、湿度変化による加齢毛の曲率の上昇と、水分浸透性および水分蒸散性などの水分応答性の上昇と相関性があることが推測された。毛髪内部水分の保持性には毛髪組織の 80%以上を占めるコルテックス領域が関与していることから[29]、特に毛髪の構造安定性や強度に大きく関与する毛髪内部タンパク質に着目し、生化学的手法、分光学的手法、および熱力学的手法を用いてタンパク質の構造単位ごとの解析を行い、加齢毛の形態変化ならびに水分挙動変化のメカニズムを解明することとした。

まず、タンパク質のアミノ酸配列を示す一次構造について評価した。5-FTSC にて蛍光標識したカルボニル化タンパク質の局在および定量結果を Figure 3 に示す。撮影画像のとおり、カルボニル化タンパク質は毛髪全体に発現していること、さらに加齢にともない蛍光強度が上昇していることが確認できた。次に、40 代女性の毛髪の蛍光強度を 100 としたときの 50 代ならびに 60 代女性の毛髪の蛍光強度率を求めた(Figure 3d)。その結果、50 代ならびに 60 代の毛髪は、40 代と毛髪と比較して蛍光強度が有意に高く、加齢にともないカルボニル化が進行することが明らかとなった。なお、本試験で用いた 5-FTSC はカルボニル化タンパク質のみを特異的に検出するわけではなく、例えば毛髪内部の不飽和脂肪酸が酸化されてケトン基が生成された場合も検出してしまう。しかしながら、毛髪タンパク質と比較して毛髪内部の不飽和脂肪酸の存在量は極めて少ないため、本試験の結果に影響を及ぼすことはないと考えられる。

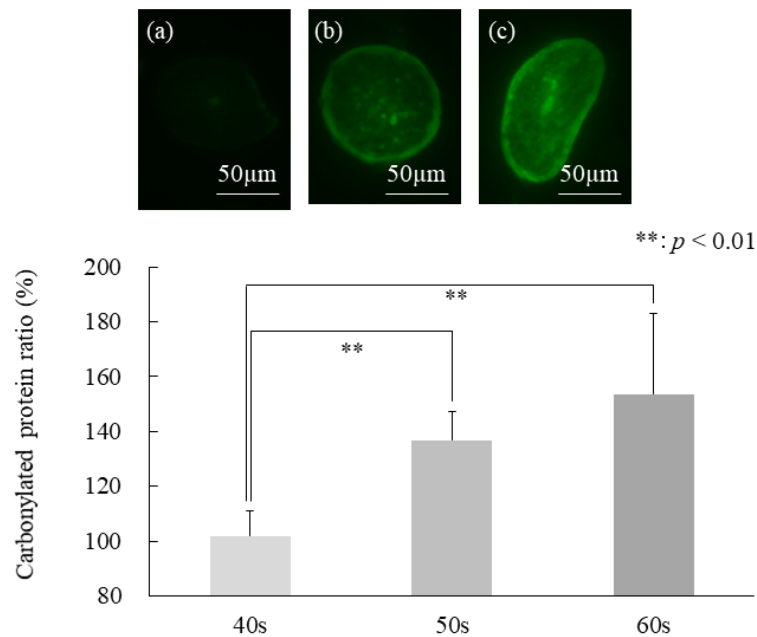


Figure 3 Localization of carbonylated proteins in the cross-section of hair for each age group. The vertical axis indicates amount (%) of carbonylated proteins with 40s as 100. (a) 40s hair ; (b) 50s hair, (c) 60s hair. (d) The carbonylated protein ratio in cross-section hair of white hair to black hair for each age group. ** $p < 0.01$ vs. 40s hair (Dunnnett's multiple comparison test).

皮膚科学における先行研究において、加齢により角層がカルボニル化することが報告されており[30, 31]、毛髪においても加齢によりカルボニル化することを初めて見出した。タンパク質のカルボニル化には、Reactive oxygen species (ROS)および Reactive nitrogen species (RNS)が作用して塩基性アミノ酸残基の酸化によって引き起こされるという研究がある[32, 33]。そこで、加齢によるタンパク質の側鎖塩基性アミノ酸への影響を評価するため、NBD-Clで標識したアミノ基の局在ならびに蛍光強度を求めた(Figure 4)。その結果、毛髪タンパク質の塩基性アミノ酸残基は毛髪全体に発現しており、加齢にともない蛍光輝度が有意に減少していることが確認できた。これは加齢にともないカルボニル化挙動と逆の挙動を示すものであった。そのため、毛髪タンパク質においても塩基性アミノ酸残基の酸化にともないカルボニル化タンパク質が増加することが示唆された。

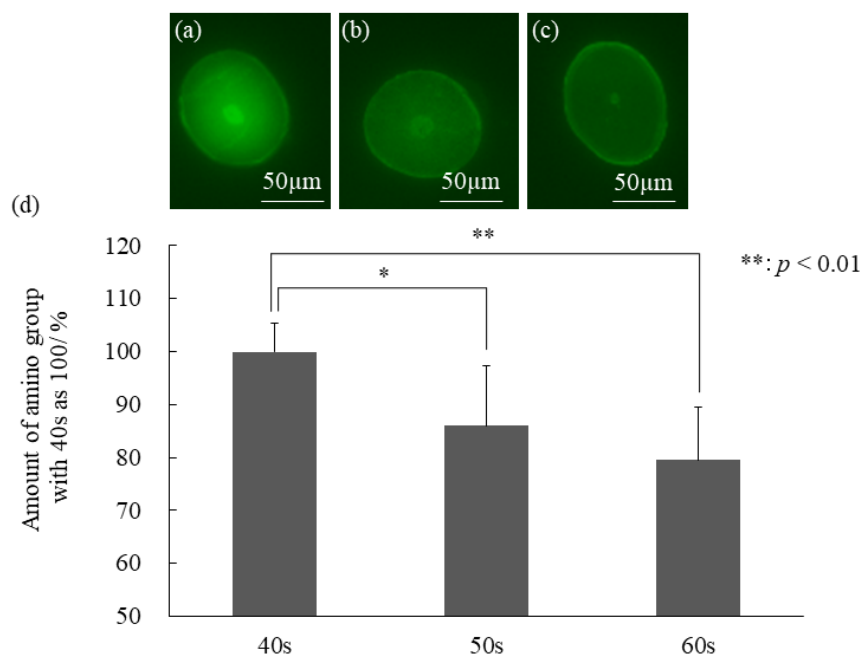


Figure 4 Localization of amino group in the cross-section of hair for each age group. The vertical axis indicates amount (%) of amino group with 40s as 100. (a) 40s hair, (b) 50s hair and (c) 60s hair ; (d) Changes of amino group were measured by fluorescence intensities. Scale bar, 50 μ m. Data are shown as the mean \pm SD (n = 10). * $p < 0.05$ vs 40s hair, ** $p < 0.01$ vs. 40s hair (Dunnett's multiple comparison test).

続いて、タンパク質のカルボニル化の部位を検出するために、加齢毛のコルテックス層におけるタンパク質画分を抽出した。その結果、40代毛髪、50代毛髪、および60代毛髪から抽出されたタンパク質画分の濃度は、それぞれ422 μ g/ml, 358 μ g/ml, 324 μ g/mlであり、40代および50代の毛髪タンパク質画分の希釈率は1.30および1.11となった。コルテックス層における毛髪タンパク質は、中間径フィラメント(Intermediate filament; IF)と中間径フィラメント関連タンパク質(Intermediate filament associated protein; IFAP)から構成され、さらにIFは分子量の異なるI型ケラチン(40–50 kDa)とII型ケラチン(55–65 kDa)に分類される[34–36]。なお、IFAPは高硫黄タンパク質から成る低分子のため、6–30 kDaにバンドが現れる[37]。Figure 5は単位タンパク質におけるI型ケラチンタンパク質、II型ケラチンタンパク質、およびIFAPの発現量を示す。SDS-PAGEの結果より、高分子量の領域に主要なバンドが2つ確認でき、それらはバンド位置よりIFのサブユニットであるI型ケラチンタンパク質とII型ケラチンタンパク質の発現であることが分かった(Figure 5a)。また低分子領域においてもIFAP(6–30 kDa)に起因するバンドも存在した。また各年代の発現量を比較すると、加齢にともないIFの両サブユニットならびにIFAPに対応するバンド強度が減少することが明らかになった。また、タンパク質濃度を各年代で揃えて電気泳動を行ったことより、IFやIFAP以外のタンパク質が加齢に伴い増加することが示唆された。これまでに加齢毛のタンパク質画分における研究では疎水性タンパク質の割合が20代女性と30代以降の女性では異なることが報告されているが[38]、各年代に分けてIFとIFAPの発現量を評価した例はなく、加齢にともなってIFとIFAPの発現量は減少することを初めて見出した。さらに、各年代に分けてIFとIFAPのカルボニル化度を求めるため、抗DNPH抗体を使用したウェスタンブロットティング法にて検討を行った(Figure 5b)。その結果、興味深いことにII型ケラチンタンパク質の領域のみバンドが見られ、さらに加齢にともない

そのバンド強度が上がっていることが明らかとなった。前述したようにこの強度変化は、Figure 3 で示した蛍光標識を用いた毛髪内部のカルボニル化タンパク質の結果とよく一致する。またカルボニル化部位について、II型ケラチンタンパク質はリシンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸残基の含有量が多いことが報告されていることから[34, 36]、カルボニル化がII型ケラチンタンパクで起きやすいと考えられる。

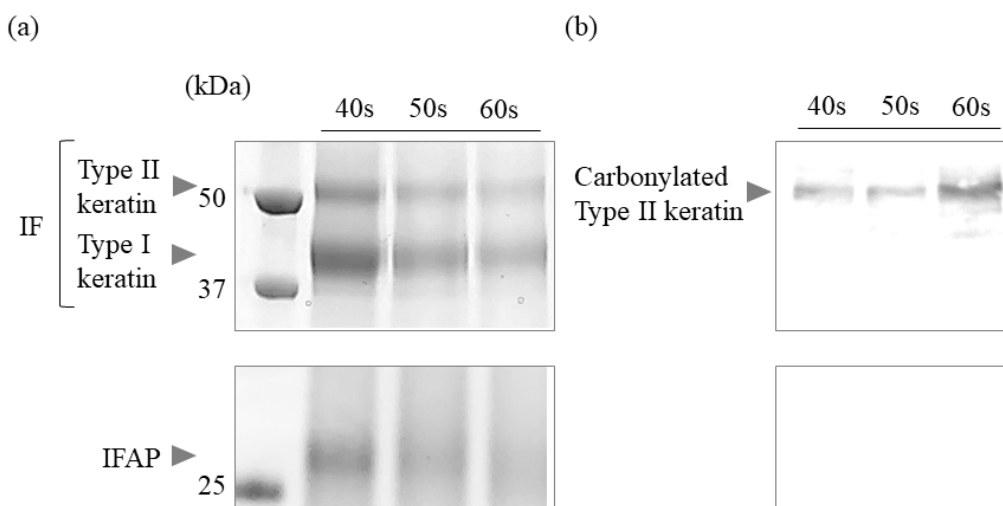


Figure 5 SDS-PAGE and western blotting analysis of hair protein. (a) IF and IFAP expression for each age group. In each lane, 4.0 μg protein was applied and stained with Coomassie Brilliant Blue. (b) Carbonylated IF and IFAP for each age group using anti-DNPH antibody.

上記のように、IFのサブユニットが加齢により変性することが明らかとなったが、一次構造が変化することでIFの持つ局所的立体構造である二次構造にも影響があると推測される。そこで顕微IRを用いて、各年代の毛髪横断面のIRスペクトルを取得し、得られたスペクトルについて多変量スペクトル分解(MCR)を実施することとした。MCRは取得したスペクトルを純スペクトルとその成分の強度プロファイルに分解し、混合物の成分を識別して定量化する化学分析手法である[39-42]。そして重要なメリットとして、構成成分に関する基本情報がない場合にも適用でき、カーブフィッティングのようなスペクトル解析と異なり、2次元イメージングデータのような膨大なスペクトルを機械的かつ迅速に処理できることが挙げられる。今回は、各年代の毛髪横断面における400点以上のIRスペクトルについて、スムージングや二次微分処理を行ったうえでMCRを実施した(Figure 6)。毛髪内部におけるIRスペクトルにおけるアミドI領域は、吸光度が高いがブロードのピーク形状となっており、そのままでは二次構造の情報を抽出することができない(Figure 6a)。そこでスムージングや二次微分処理により、ベースラインドリフトを除去し、S/N比を上昇させ、定量分析のためのスペクトル前処理を行った(Figure 6b)。得られた二次微分スペクトルに対してMCR分析を行い、アミドI領域において α -ヘリックスや β -シートなどの8つの成分スペクトルが得られた(Figure 6c, Table 1)。この結果は、カーブフィッティングを用いた先行研究[43]とよく一致していた。

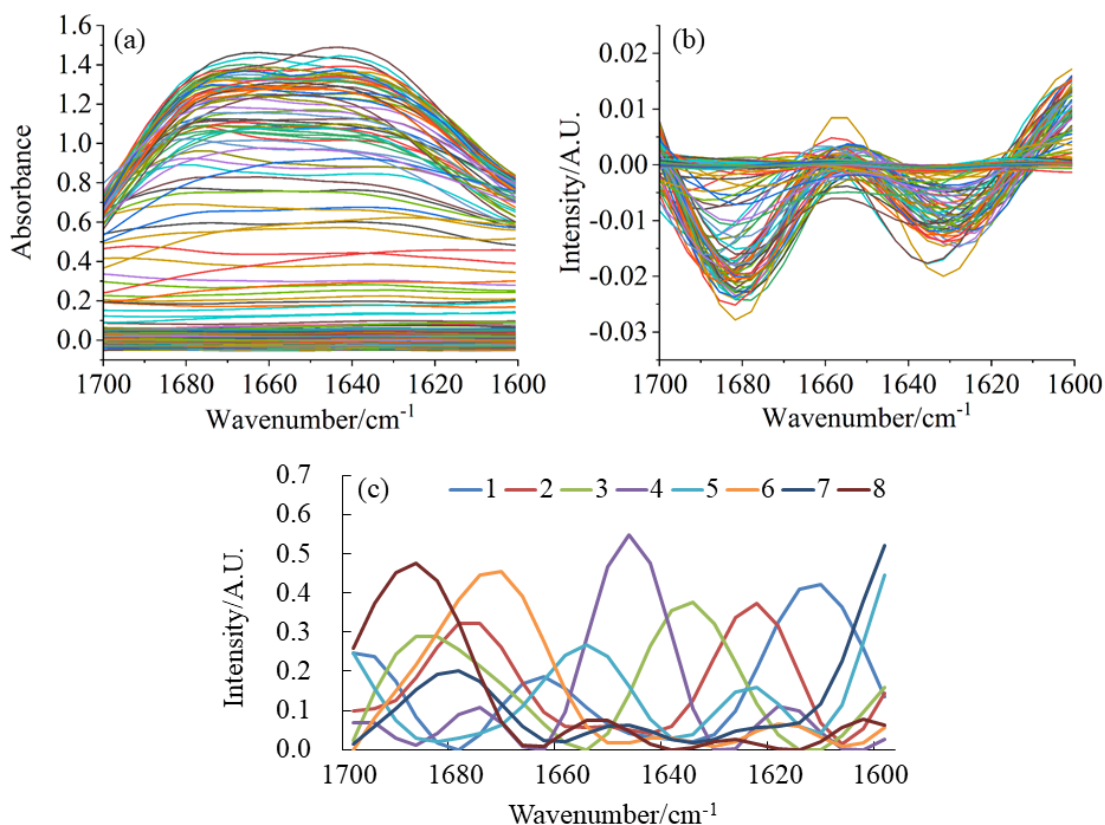


Figure 6 (a) IR spectra of 40s hair in the 1600–1700 cm^{-1} region, and (b) their second derivatives. (c) Spectral waveforms obtained from the second derivative spectra by MCR.

Table 1 Spectral waveforms obtained from the second derivative spectra by MCR and assignments to each components for hair protein.

Components (Figure 6c)	Band frequency/ cm^{-1}	Assignment
1	1612	Tyrosine and tryptophan
2	1624	β -sheet
3	1636	β -sheet
4	1648	Random coil
5	1656	α -helix
6	1670	β -turn
7	1680	β -turn
8	1688	β -sheet

次にこの MCR 解析結果によって算出された 1656 cm^{-1} の α -ヘリックスの信号強度における二次元イメージング画像を作成することにより、加齢による構造変化を詳細かつ視覚的に捉えることができると考えた。Figure 7 は、MCR 解析を行う前の IR スペクトルでの 1656 cm^{-1} の吸光度マッピングである。アミド I はブロードなバンドであり、様々な二次構

造の情報が含まれているため、これらのマッピングは毛髪タンパク質の存在量を示すと考えられる。結果として、40代毛髪および50代毛髪において毛髪タンパク質量はほとんど変わらないことが確認された。一方、60代毛髪は毛髪中心付近では40代毛髪および50代毛髪と同等の毛髪タンパク質量であるが、コルテックスの外側、いわゆるキューティクルとコルテックスの境界付近では、毛髪タンパク質量が減少していることが見受けられた。

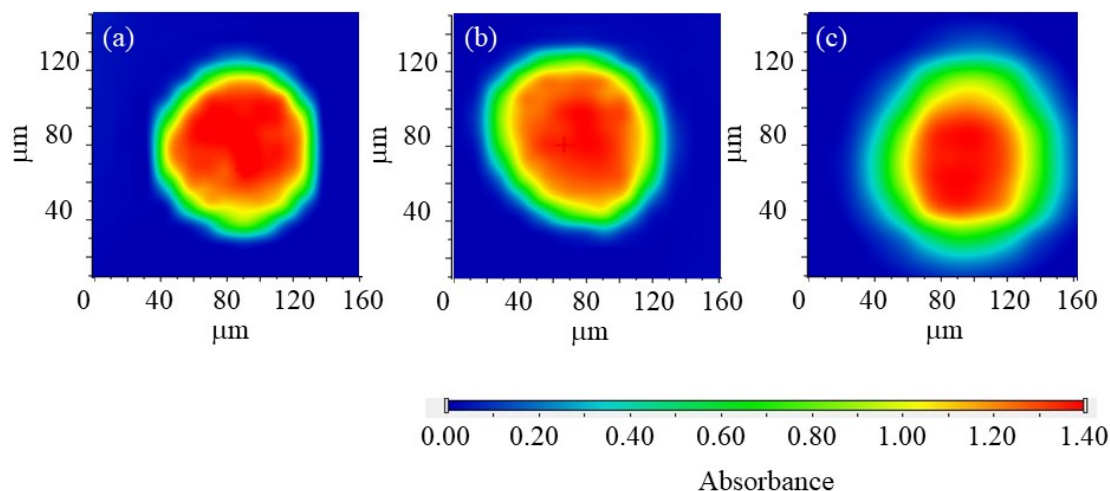


Figure 7 IR spectra imaging at 1656 cm^{-1} assigned to the α -helix component in (a) 40s hair, (b) 50s hair and (c) 60s hair. Red indicates high absorbance, and blue indicates low absorbance.

そして、MCR 解析結果によって算出された 1656 cm^{-1} の α -ヘリックスの信号強度における二次元イメージング画像を Figure 8 に示す。40代毛髪では α -ヘリックスのコルテックス層を中心として全体的に信号強度が高いことが分かった。逆に、50代毛髪では、コルテックス層においても α -ヘリックスの信号強度が低くなっており、60代毛髪は50代毛髪よりもさらに α -ヘリックスの信号強度が低下していることが明らかとなった。カルボニル化しやすい塩基性アミノ酸残基であるリジンとアルギニンは α -ヘリックス構造の形成を促進することが報告されている[44]。そのため、加齢にともなう毛髪内部の α -ヘリックスの減少は、リジンとアルギニンのカルボニル化、いわゆるタンパク質一次構造の変性によるものであることを示唆している。また別の文献では、 α -ヘリックスの減少がタンパク質の凝集と疎水性につながることを報告されている[45]。したがって、毛髪内部タンパク質における二次構造の変性が毛髪内部水分挙動に影響を与えた可能性が考えられる。

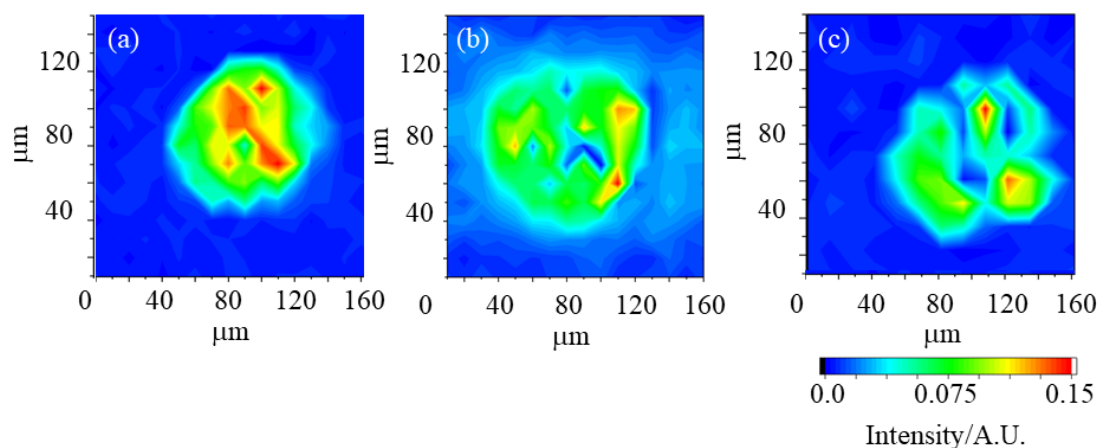


Figure 8 IR spectra imaging at 1656 cm^{-1} assigned to the α -helix component obtained after MCR processing of hair sections for each age. (a) 40s hair, (b) 50s hair and (c) 60s hair. Red indicates high absorbance, and blue indicates low absorbance.

加齢にともなう毛髪内部タンパク質の二次構造の変性によって、さらに高次のタンパク質構造、つまり三次構造にも変性が起きている可能性が考えられる。そこで、毛髪タンパク質の IF および IFAP における三次構造の安定性を評価するために HPDSC 測定を行った。実際の DSC のチャートを Figure 9 に示す。IF および IFAP で起きた構造変性は、変性エンタルピー (ΔH_D) と変性温度 (T_D) から求めることができる。これは水分を含んだ毛髪が $150\text{ }^\circ\text{C}$ から $200\text{ }^\circ\text{C}$ の範囲で溶解する現象を利用したものであり、 ΔH_D は IF に含まれる α -ヘリックスの存在量と構造完全性を示し、 T_D は IFAP の架橋密度ならびに安定性を示すことが知られている[46]。ここで、各年代の ΔH_D と T_D を Table 2 に示す。 ΔH_D は、40 代毛髪において最も高い値を示し、加齢にともないその値が低下していることが明らかとなった。特に 60 代毛髪では 40 代毛髪と比べて、有意に ΔH_D が低下するといった結果が得られた。この結果は、加齢によって IF 内の α -ヘリックスの存在量が低下し、構造安定性が減少したことを示す可能性があり、Figure 7 における毛髪内部における α -ヘリックスの信号強度のイメージング結果とよく一致している。酸化還元剤で処理された毛髪は ΔH_D が減少することが明らかとなっており、それに伴い IF の立体構造が変化したことが報告されている[47]。カルボニル化は自然界で起こる酸化の一種であることから、加齢による毛髪タンパク質のカルボニル化が IF の立体構造の変化を引き起こすことは十分に起こり得ると考えられる。 T_D も、 ΔH_D と同様の挙動を示し、40 代毛髪と比べて、50 代毛髪および 60 代毛髪は有意に T_D が低下していることが分かった。 T_D の低下挙動は、SDS-PAGE における IFAP の発現量に起因する 6–30 kDa 付近のバンド強度低下の結果(Figure 5a)および IR スペクトルを用いた 1656 cm^{-1} の吸光度マッピング(Figure 7)とよく一致する。このことから、加齢によって、IFAP の変性および構造安定性の低下が起こることによって、水分保持性などの IFAP が本来持つ作用も変化し、前章にて明らかとなった加齢による毛髪内部の水分挙動の変化につながるものと考えられる。

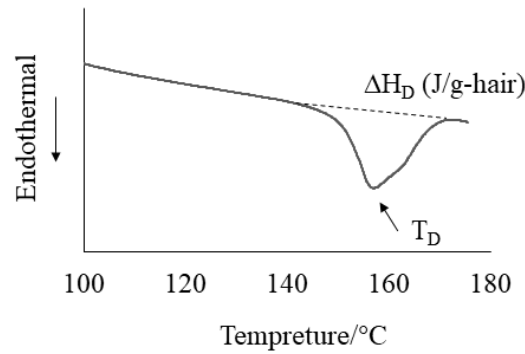


Figure 9 Typical DSC curve of water sorbed hair. The location of the peak gives the denaturation temperature T_D , and its area, with respect to the baseline, gives the denaturation enthalpy ΔH_D .

Table 2 Mean values and standard deviations for denaturation temperature T_D and enthalpies ΔH_D measured by HPDSC experiment for age-related hairs (heating rate 10 °C/ min). ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs 40s hair (Dunnett's multiple comparison test).

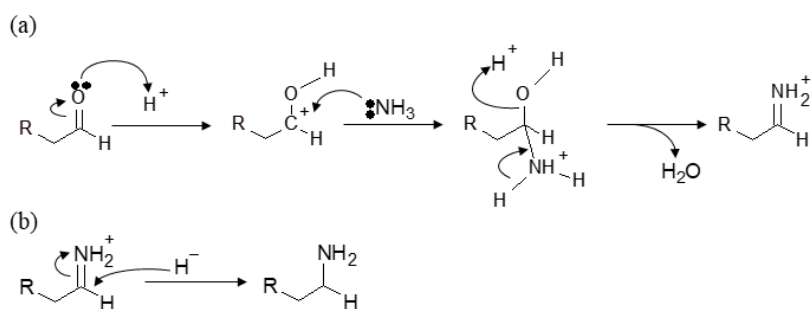
years	T_D , °C	ΔH_D , J/g-hair
40s	155.6 ± 0.4	17.7 ± 0.4
50s	153.3 ± 0.3 *	15.1 ± 1.0
60s	150.7 ± 0.3 **	11.8 ± 0.7 *

以上のように、本節では加齢毛を各年齢層の女性から採取し、毛髪内部のタンパク質における構造解析を生化学的、分光学的、および熱力学的手法を用いて実施した。その結果、加齢にともない構造単位ごとに変性が起きていることが明らかとなった。そしてその変性の過程として、IFのサブユニットであるII型ケラチンにおける塩基性アミノ酸残基のカルボニル化を律速とした、二次構造モチーフの一種である α -ヘリックスの減少、最終的にはIFおよびIFAPの安定性の低下を見出した。しかしながら、カルボニル化がすべての加齢による毛髪変性を説明できるわけではなく、タンパク質のカルボニル化と α -ヘリックスの変性、IFおよびIFAPの変性との間の確実な因果関係は、引き続き研究される必要がある。その研究のためには、カルボニル化に関する以前の研究で行われているような、 H_2O_2 で毛髪のタンパク質を酸化する方法や、アクロレインで処理する方法を試す必要があると考えられる[7, 15]。また、加齢にともなう構造変化はカルボニル化が一因であることが分かったが、カルボニル化は不可逆的反応であり、一度カルボニル化してしまったタンパク質を元に戻すことは困難である。そこで、有機合成分野において汎用されるアルデヒドとケトンを実アミンへ変換する還元アミノ化反応[22-24]に着目し、毛髪改質技術として転用することを試みたので次節にて詳細に言及する。

4.3.2 還元アミノ化反応を用いた加齢毛改質技術の開発

前節では、加齢による毛髪内タンパク質の構造変化がカルボニル化の律速となっている可能性を示した。加齢は言うまでもなく生物学的に不可逆な事象であるため、加齢にともなう毛髪内部タンパク質のカルボニル化も一度起こってしまうと元に戻すことは非常に難しいといえる。近年では毛髪処理剤として、水素結合やファンデルワールス力、イオン結合ではなく、化学修飾による共有結合性の毛髪改質剤がトレンドとしてある[48, 49]。共有結合は他の結合力に比べて非常に強力であり、洗髪などで簡単には落ちないことが期待される一方で、化学反応を伴うため利用できる条件がかなり限定される。このような背景のもと、加齢毛の改質技術として他業界からの技術転用を試み、その中で有機成分分野において汎用されている還元アミノ化反応に着目した。還元アミノ化は、アルデヒドとケトンを実アミンへ変換する 1 ステップの反応である。Scheme 1 に示すとおり、還元アミノ化反応の、ステップ 1 は酸触媒とアミンによるイミニウムカチオンの生成、ステップ 2 は水素化物を使用したイミニウムカチオンの還元である。

今回は、加齢毛の基礎的研究をベースに、ヘアケアの応用、すなわち化粧品産業への実質的な貢献という面で還元アミノ化反応を用いた加齢毛に対する毛髪改質技術の開発を試みた。



Scheme 1 Reductive amination of aldehydes. (a) Step 1: Production of iminium cation. (b) Step 2: Reduction of iminium cation using hydride.

同一人から得た毛髪において、還元アミノ化反応の処理をした毛髪内部のカルボニル化タンパク質局在の結果を Figure 10 に示す。同一人の黒髪と白髪を比べてみると、白髪はカルボニル化タンパク質がより多いことが分かった。毛髪のメラニンはカルボニル化の要因となる ROS や RNS を除去するはたらきがあることが知られている[50]。白髪はそのメラニンがない、もしくはほとんどないために、ROS や RNS が除去されずタンパク質が酸化されやすい環境にあり、結果としてカルボニル化タンパク質が多いと考えられる。また、還元アミノ化反応を処理した毛髪は処理前と比較して、毛髪内部の蛍光強度が減少しており、不可逆的なカルボニル化反応により生成されたカルボニル化タンパク質が、アミノ基に変換されたことを示唆している。

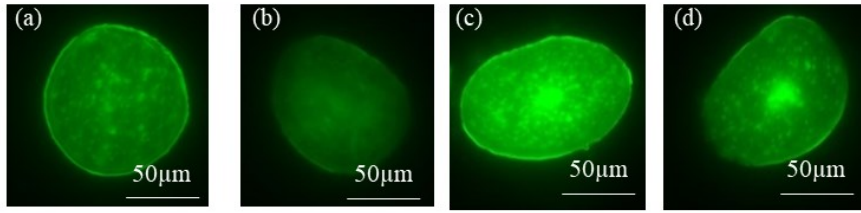


Figure 10 Localization of carbonylated proteins in the hair cross-section of a Japanese woman in her 50s. (a), black hair; (b), black hair treated with reductive amination; (c), white hair; (d), white hair treated with reductive amination.

さらに、還元アミノ化処理した毛髪内部の水分挙動ならびに曲率について評価した。その結果、還元アミノ化処理を行った50代の白髪毛は、水分浸透性の低下、水分浸透量の減少、および水分保持性の上昇が確認できた。特に、水分保持性に関しては同一人の黒髪と同様の挙動を示した(Figure 11)。また、各湿度域における曲率を測定したところ、20%RHおよび90%RHにおいて、還元アミノ化処理した毛髪の曲率が低下した。特に90%RHでは還元アミノ化処理をしていない毛髪と比較して、有意差が見られた(Figure 12)。このような毛髪の形状ならびに水分挙動を改善することができた一因として、還元アミノ化反応によりカルボニル化タンパク質が減少したものと推察している。

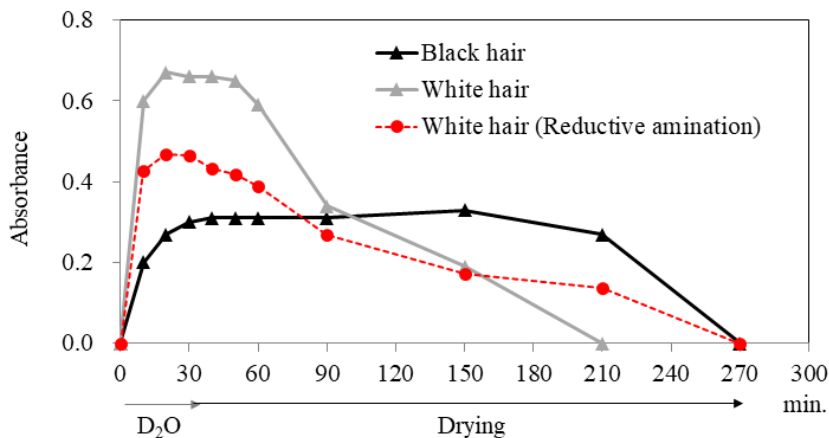


Figure 11 Water behavior of black hair (▲) and white hair (▲) and reductive amination treated white hair (●) of a Japanese woman in her 50s in the cortex (point 3). The O–D stretching peak intensity at approximately 2500 cm^{-1} under the condition of heavy water penetration in the first 30 min and after drying process 25°C and 50% RH for 4 h.

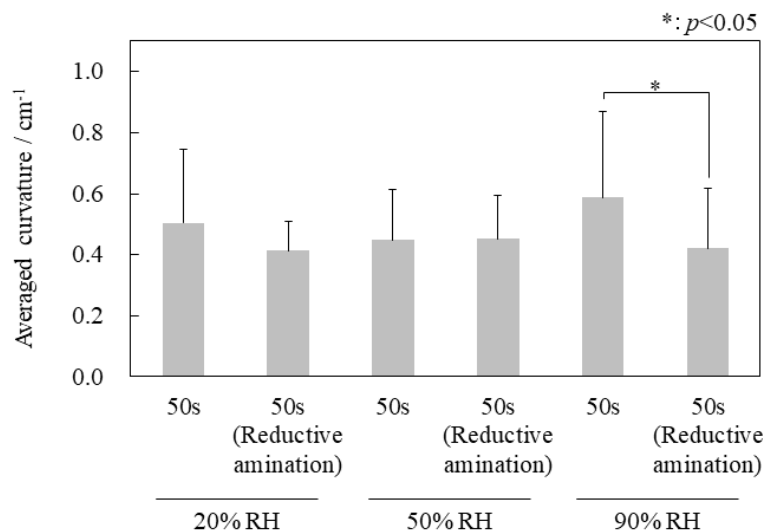


Figure 12 Averaged curvature of hair fibers for the same subjects in Figure 11. * $p < 0.05$ vs. 50s hair at 90% RH (Student's *t*-test).

以上のように、本研究は、生体材料による還元的アミノ化処理が可能であることを初めて示した。PEMBは水素化ホウ素の中でも化学的に安定であり、副生成物として有害物質を生成しないため、本研究で使用した。しかしながら、化粧品におけるPEMBの安全性はまだ確認されていないため、すぐに商品化することはできない。今後は、今回の成果を活かして新規材料の探索を進めるとともに、最終的には、ヘアケアの応用への実質的な貢献という面で還元アミノ化反応を用いた加齢毛に対する毛髪改質技術を完成させたいと考えている。

4.4 結論

本章では、加齢にともなう湿度変化による毛髪の曲率上昇と水分挙動の変化について、顕微IRとケモメトリックスの手法を組み合わせることでタンパク質の二次構造をイメージングする方法を確立し、その他さまざまな測定手法を用いて加齢毛の毛髪変性メカニズムの解明を構造分類ごとに行った。毛髪内部の水分保持に重要な役割を担い、毛髪組織の80%以上を占めるコルテックス層におけるタンパク質に着目し、そのアミノ酸配列を示す一次構造の解析を行ったところ、加齢にともない毛髪タンパク質のアミノ基は減少し、カルボニル化が進むことが明らかとなった。特にカルボニル化については、IFのサブユニットであるII型ケラチンに起こりやすいことを突き止めた。局所的立体構造を示す二次構造の解析は顕微IRとMCRを組み合わせた分光学的手法で新規評価手法を開発した。その手法を用いた結果、 α -ヘリックスの含有量が加齢にともない減少することをイメージングできた。さらにHPDSCを用いてタンパク質全体の構造を示す三次構造の解析をしたところ、 ΔH_D と T_D の減少が起きていたため、IFとIFAPの構造安定性の低下が示唆された。このようなタンパク質のカルボニル化が律速となり次々と毛髪内部の高次構造の変性が起きた結果として、加齢にともなう湿度変化による毛髪の曲率上昇と水分挙動の変化につながったものと考えられる。さらに、ヘアケアへの応用という実質的な貢献を目的に、有機成分

野において汎用されるアルデヒドとケトンをアミンへ変換する還元アミノ化反応をヘアケアに転用することで、加齢毛における毛髪内部タンパク質の改質を試みた。これまで加齢にともなうタンパク質の変性は不可逆的であることは通説であったが、本研究により生体材料による還元的アミノ化処理が有効であることを初めて示した。また、この還元アミノ化処理により、加齢毛のカルボニル化度は減少し、水分挙動や高湿度下における曲率が有意に改善することを見出した。ヘアケアの現場で実際に起きている問題として水分による髪の乱れに対する悩みがあるが、本章において、加齢毛においてその髪乱れのメカニズムを解明およびそのシーズ開発を達成した。引き続き、化粧品産業への実質的な貢献を意識してソリューション開発を進めていく予定である。

4.5 参考文献

1. 畠山 樹, *日本化粧品技術者会誌*, 28(3), 238–253 (1994)
2. 岩本佳倫, *Fragrance J.*, 29, 33–38 (2001)
3. 上甲恭平, 吉勝友美, 坂田佳子, *繊維学会誌*, 62, 280–286 (2006)
4. H. Yasunaga, Y. Ishii, T. Komoda, T. Shinkawa, K. Kajiwara, H. Urakawa, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 29, 301–309 (2007)
5. 安永秀計, *色材協会誌*, 81(10), 388–394 (2008)
6. T. Imai, M. Niwa, H. Kawamura, T. Umemura, M. Kimura, T. Nakano, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, 44, 208–215 (2010)
7. T. Kojima, H. Yamada, T. Yamamoto, Y. Matsushita, K. Fukushima, *Colloids Surf. B*, 106, 140–144 (2013)
8. K. Nishimura, M. Nishino, Y. Inaoka, Y. Kitada, M. Fukushima, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, 13, 134–139 (1989)
9. T. Imai, H. Kaga, M. Niwa, *10th ASCS Conference Proceedings*, 32–33, 2011
10. M. Tajima, C. Hamada, T. Arai, M. Miyazawa, R. Shibata, A. Ishino, *J. Dermatol. Sci.*, 45, 93–103 (2007)
11. S. Nagase, Y. Kajiura, A. Mamada, H. Abe, S. Shibuichi, N. Satoh, T. Itou, Y. Shinohara, Y. Amemiya, *J. Cosmet. Sci.*, 60, 637–648 (2009)
12. M. Hagihara, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.* 50, 2–7 (2016)
13. C. B. Baddiel, *J. Mol. Biol.*, 38, 181–199 (1968)
14. E. Hoting, M. Zimmermann, S. Hilterhaus–Bong, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 46, 85–99 (1995).
15. A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 1073–1101 (2007)
16. L. Kreplak, J. Doucet, P. Dumas, F. Briki, *Biophys. J.* 87, 640–647 (2004).
17. Y. Zhou, R. Rigoletto, D. Koelmel, G. Zhang, T. W. Gillece, L. Foltis, D. J. Moore, X. Qu, C. Sun, *J. Cosmet. Sci.*, 62, 265–282 (2011)
18. 尾崎幸洋, 宇田明史, 赤井俊雄, *化学者のための多変量解析 ケモメトリックス入門*, 講

談社サイエンティフィック (2002)

19. 長谷川健, 尾崎幸洋, *分析化学*, 54, 1–26 (2005)
20. 森田成昭, 尾崎幸洋, *高分子*, 67, 680–682 (2018)
21. C. Popescu, H. Hocker, *Chem. Soc. Rev.*, 36, 1282–1291 (2007)
22. E. W. Baxter, A. B. Reitz, *Organic Reactions*, 59, 1–170 (2004)
23. S. Sato, T. Sakamoto, E. Miyazawa, Y. Kikugawa, *Tetrahedron* 60, 7899–7906 (2004)
24. O. I. Afanasyev, E. Kuchuk, D. L. Usanov, D. Chusov, *Chem. Rev.*, 119, 23, 11857–11911 (2019)
25. T. Kawasoe, T. Watanabe, T. Fujii, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, 34, 287–291 (2010)
25. H. Masaki, D. Sinomiya, Y. Okano, M. Yoshid, T. Iwabuchi, *Int. J. Cosmet. Sci.* 43, 764–771 (2021)
26. M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254 (1976)
27. U. K. Laemli, *Nature*, 227, 680–685 (1970)
28. S. Goto, A. Nakamura, Z. Radak, H. Nakamoto, R. Takahashi, K. Yasuda, Y. Sakurai, N. Ishii, *Mech. Ageing. Dev.*, 107, 245–253 (1999)
29. C. R. Robbins, *Chemical and physical behavior of human hair 4th ed.*, (Springer, New York, 2002), 386–473.
30. I. Iwai, T. Hirao, *Skin. Pharmacol. Physiol.*, 30, 41–46 (2008)
31. Y. Kobayashi, I. Iwai, N. Akutsu, T. Hirao, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 30, 35–40 (2008).
32. J. Y. Suzuki, M. Carini, D. A. Butterfield, *Antioxidants & Redox Signaling*, 12, 323–325 (2010).
33. 戸田年総, *基礎老化研究*, 35, 17–22 (2011)
34. H. W. Heid, E. Werner, W. W. Franke, *Differentiation*, 32, 101–119 (1986)
35. L. Langbein, M. A. Rogers, H. Winter, S. Praetzel, U. Beckhaus, H. R. Rackwitz, J. Schweizer, *J. Biol. Chem.*, 274, 19874–19884 (1999)
36. L. Langbein, M. A. Rogers, H. Winter, S. Praetzel, U. Beckhaus, H. R. Rackwitz, J. Schweizer, *J. Biol. Chem.*, 276, 35123–35132 (2001)
37. T. Fujii, *J. Biol. Macromol.*, 12(1), 3–15 (2012)
38. 伊藤廉, *Fragrance J.*, 40, 51–54 (2012)
39. J.H. Jiang, Y. Liang, Y. Ozaki, *Intell. Lab. Syst.* 71, 1–12 (1995)
40. J. Toft, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 29, 189–212 (1995)
41. F. C. Sanchez, B. van de Borgaert, S.C. Rutan, D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 34, 139 (1996)
42. J.H. Jiang, Y. Ozaki, *Appl. Spectrosc. Rev.* 37, 321–345 (2002)
43. S. Kobayashi, K. Watanabe, K. Suzuta, H. Aoyama, L. Ito, *The IFSCC Congress 2020 Yokohama proceedings*, 196–205 (2020)
44. J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Science*, 240, 1648–1652 (1988)

45. M. Sunde, C. Blake, *Adv. Protein. Chem.* 50, 123–159 (1997).
46. F. J. Wortmann, H. Deutz, *J. Appl. Polym. Sci.*, 48, 137–150 (1993)
47. A. J. Grosvenor, S. Deb–Choudhury, P. G. Middlewood, A. Thomas, E. Lee, J. A. Vernon, J. L. Woods, C. Taylor, F. I. Bell, S. Clerens, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 40, 536–548 (2018)
48. 吉田正人, 鈴田和之, 上門潤一郎, 新井幸三, *日本化粧品技術者会誌*, 48, 190–199 (2014)
49. 石森綱行, *日本化粧品技術者会誌*, 57, 2–8 (2023)
50. 青木仁美, *日本化粧品技術者会誌*, 42, 9–14 (2018)

5.1 緒言

毛髪におけるダメージの性質理解は、化粧品科学にとって非常に重要なものとなっている。毛髪ダメージにはカラー、ブリーチ、パーマなどの化学的処理によるものや、ブラッシングによる物理的行為によるものがある。特にブラッシングによる引っ張りは、日常の整髪行動により繰り返されるダメージであり、このダメージが蓄積すると毛髪の破断(切れ毛)を起こして、消費者の髪悩みに繋がってしまう。この髪悩みを探索するため、2021年に日本人女性46名を対象にベンチマーク調査を行ったところ、そのうち85%が乾燥中に髪を引っ張り、伸ばす行為を行っているという回答があった。ゆえに、生活者の大多数は日常的に髪をブラッシングしている事実が判明した。しかしながら、この日常的なブラッシングには引っ張りダメージが内在していると考えられるが、それについては現在のところ研究例がほとんどない。

ブラッシングなどを想定した毛髪の延伸特性や引っ張りによるダメージを評価するためにいくつかの実験方法が確立されており、例えば、応力/ひずみ法、振動法、応力緩和法、伸張回転法などがある[1-7]。これらの実験方法は、髪に対する荷重ストレスと引っ張りの特性を理解するという点では貴重であるが、非常に低いひずみ速度が使用され、さらに非常に高い応力がかかった状態で行われるため、日常的なブラッシングによるダメージについてはほとんど情報が得られない。

最近では、従来の試験法では見出すことができない髪へのダメージを明らかにするため、日常的なブラッシング、いわゆる反復延伸による毛髪ダメージをシミュレートするような、疲労試験や反復延伸試験の評価手法の開発が実施されている。Kamathらは、黒人毛髪の機械的疲労をテストし、低負荷レベルの複数回伸長での毛髪ダメージの原因を調査した[8]。反復延伸試験は、Gamez-Garciaによって検討されており、湿度と温度が制御された条件下で日常に起こり得るひずみ強度にて、50回から200回の反復延伸を実施した研究では、延伸回数依存的にキューティクルのリフトアップが起こることが報告されている[9]。しかし、引っ張りにおける強度は主にコルテックス層が影響する報告[1, 2, 10]があるにもかかわらず、反復延伸による毛髪の各構成成分であるタンパク質や脂質の内部変化はまだ明らかではない。したがって、反復延伸によって引き起こされる毛髪内部のダメージを予測できる分析技術がヘアケアの現場で実際に必要とされている。

赤外分光法(IR)は、物質の化学的特性を分析するのに有用な技術であり、毛髪内部の化学的変化を分析するためにも多く使用されている[11-13]。しかし、タンパク質や脂質などの生体試料のスペクトルは多くのバンドが重なり合って構成されているため、広範囲にわたって多くの情報が埋もれてしまい、解析が困難である。近年、その解析手法として多変量スペクトル分解(MCR)が注目されている。MCRは測定されたスペクトルを純粋なスペクトルとその成分の強度プロファイルに分解し、混合物の成分を識別して定量化するケモメトリックス手法である[14-17]。とりわけ、MCRの重要な点は、構成成分に関する基本情報がない場合にも適用できることである[18]。リボソーム不活化タンパク質、限外濾過膜、生体適合性ポリマーなどの複雑かつ多様なサンプルを対象として、IRにおけるMCRの有用性が研究されており、重複バンドの分離におけるMCRの可能性が検討されている[19-21]。このような有用な手法であるにもかかわらず、MCRは毛髪のIRスペクトル分析

には適用されていない。

本研究の目的は、IR と MCR を組み合わせることで IR スペクトルに存在する毛髪構成成分における官能基を同定し、反復延伸による毛髪の構造変化を定量化することである。さらにヘアケアの現場で実際に起きている問題として、ダメージ毛髪で起こる切れ毛にフォーカスし、日常的なブラッシングによって起こる切れ毛の予測について、本評価手法の有効性を検討した。

5.2 実験

5.2.1 毛髪試料

未処理毛は、健康な 20 代日本人女性を対象として、書面によるインフォームドコンセントを得た上で、頭皮に近い根元部分から採取した。ブリーチ処理毛は、未処理毛を 3.0% 過酸化水素および 1.2% アンモニアを含むブリーチ水溶液に 40 分間浸漬し、その後精製水で十分にすすいだ毛髪とした。上述したすべての毛髪サンプルは、ごみや一時的なセット形状を除去するため、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム水溶液(5.0%)で洗浄し、精製水ですすいだのち、測定前日に 25 °C, 50 RH% の温湿度環境にて順化され、試験に供された。

5.2.2 ヒステリシス測定

毛髪の両端を治具で固定し、テクスチャーアナライザ (Stable Micro Systems, Surrey, UK) の自動モードを使用して、180 mm/min の速度で 5.0% まで伸張させた。この操作を 100 回適用し、荷重と除荷曲線の積分値とともに応力-ひずみ(ヒステリシス)曲線を記録し、下記式より 5.0% のヒステリシス比を算出した。

$$\text{Hysteresis ratio} = \frac{\text{Work regained in unloading from 5.0\% extension}}{\text{Work required to extend by 5.0\%}}$$

5.2.3 キューティクルの剥離方法

毛髪の内部構造を分析するために、ダイヤモンドやすり(#600, RYOBI, 広島)を使用してキューティクルを除去した。なお、剥離に際してキューティクルが均一に除去できるよう、デジタルマイクロスコープ(VK-X250, Keyence, 大阪)で毛髪の直径を確認しながら行った。Figure 1 は、反復延伸試験に使用した毛髪のキューティクルを除去する前後のデジタル顕微鏡写真を示す。キューティクルを除去した後はコルテックス層が露出していることが確認できる。

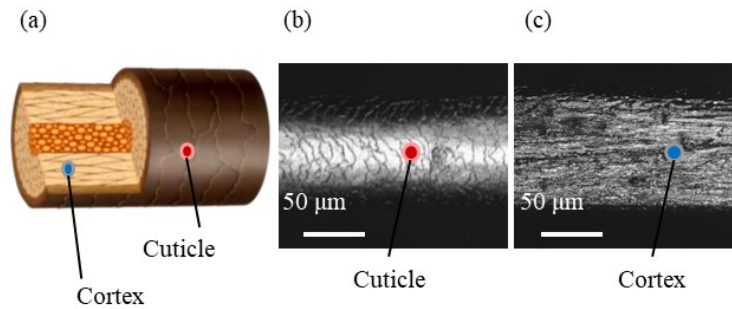


Figure 1 (a) A schematic illustration of cortex inside covered several cuticle layers and digital microphotographs of hair fiber (b) before and (c) after cuticle removal.

5.2.4 顕微全反射顕微鏡顕微(顕微 ATR)測定

毛髪の両端を治具で固定し、テクスチャーアナライザ (Stable Micro Systems, Surrey, UK) の自動モードを使用して、180 mm/min の速度で 5.0% まで伸張させた。この操作を 1 回として、合計 100 回行った。延伸 5 回ごとに毛髪をテクスチャーアナライザから取り外し、顕微 ATR (iN-10, Thermo Scientific, Waltham, USA) を用いて毛髪のコルテックス層における IR スペクトルを取得した。測定条件は、アパーチャーを $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ 、分解能を $8\ \text{cm}^{-1}$ 、測定波数範囲を $4000\text{--}650\ \text{cm}^{-1}$ 、積算回数を 64 とした。

5.2.5 スペクトル解析

顕微 ATR にて得られた毛髪のスペクトルは、Unscrambler X 10.5 ソフトウェア (version 10.5, Camo Software AS, Oslo, Norway) により、Savitzky-Golay 法を用いて平滑化と二次微分による前処理を行った[22, 23]。なお、すべての二次微分スペクトルは、平滑化点を 9、と多項式時数を 3 として計算した。さらに、これらのスペクトルは、ケラチンタンパク質の構造と毛髪内部の脂質の挙動を調べるために、MCR 解析に用いた。シスチン酸化中間体とスルホン酸における相関性を評価するために、2DShige ソフトウェアを使用して、 $1000\text{--}1150\ \text{cm}^{-1}$ の範囲におけるスペクトルを二次元相関分光分析(2DCOS) を行った[24]。

5.2.6 統計解析

Student's *t* test により有意差検定を実施した。なお、有意水準は $p < 0.05$ と定義した。

5.3 結果と考察

反復延伸試験の結果、未処理毛は延伸 100 回で破断は起きなかったが、ブリーチ処理毛は延伸 85 回で破断が起こった。その際のヒステリシス比を示したのが Figure 2 である。未処理毛は延伸回数によらず一定の値を示したが、ブリーチ処理毛では破断直前に大きく値が減少した。このように、破断が起きた場合にヒステリシス比の減少が起きることは確認できたが、この方法では破断直前に値が変化するため、切れ毛を予測することはできな

った。

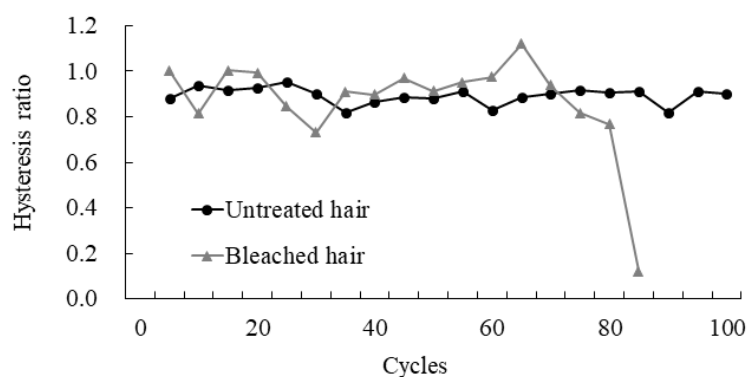


Figure 2 Extension cycles-dependent hysteresis ratio of untreated and bleached hair

ブリーチ処理毛の破断につながる毛髪の内構造変化を評価するために、コルテックス層における IR スペクトルを取得した(Figure 3)。毛髪内部における IR スペクトルには、タンパク質、脂質、水、メラニン顆粒などのさまざまな構成成分が広範囲に重複していた。MCR は、大規模なデータ行列をいくつかの純粋な成分とその応答プロファイルに分解するために広く使用されている多変量解析の一種である[14–17]。この研究では、前処理した二次微分スペクトルを使用して、反復延伸による毛髪の内構造変化を分析し、スペクトル変化が $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ 、 $1700\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$ 、および $1000\text{--}1060\text{ cm}^{-1}$ の範囲で観察されることを見出した。

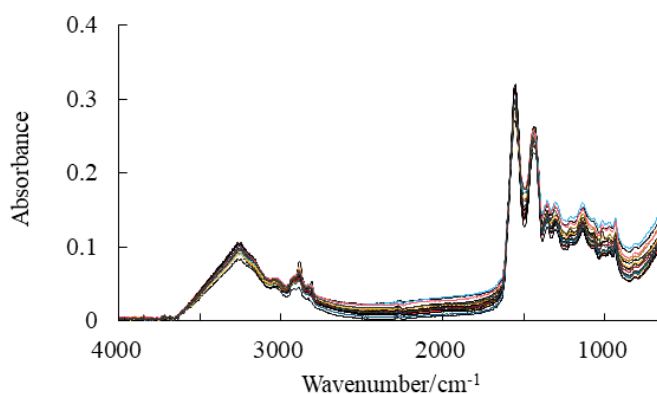


Figure 3 Extension cycles-dependent IR spectra of the bleached hair.

Figure 4 に、ブリーチ処理毛における $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ の範囲でそれぞれ IR スペクトル、二次微分スペクトル、および MCR によって得られた成分スペクトルを示す。 2852 cm^{-1} および 2924 cm^{-1} に位置する顕著なバンドは CH_2 に帰属された[25, 26]。Figure 4c の点線でプロットされた成分スペクトルは、CH 残基、つまり CH_3 、フェルミ共鳴、ゴースト信号などから生じていると考えられる。ゆえに MCR を用いることで、 CH_2 と CH 残基を適切に分離できることが明らかになった。反復延伸による CH_2 の信号強度変化において、ブリーチ処理毛は反復延伸前に比べて延伸 55 回目と 60 回目で CH_2 の信号強度が有意に増加していることが確認された。未処理毛についてもブリーチ処理毛と同様のデータ解析を行った結果、延伸回数依存的に CH_2 の信号強度が徐々に増加しました(Figure 4)。一方、CH 残基のプロファイルは、未処理毛およびブリーチ処理毛の両方で延伸回数依存的な変化はみられなかった。

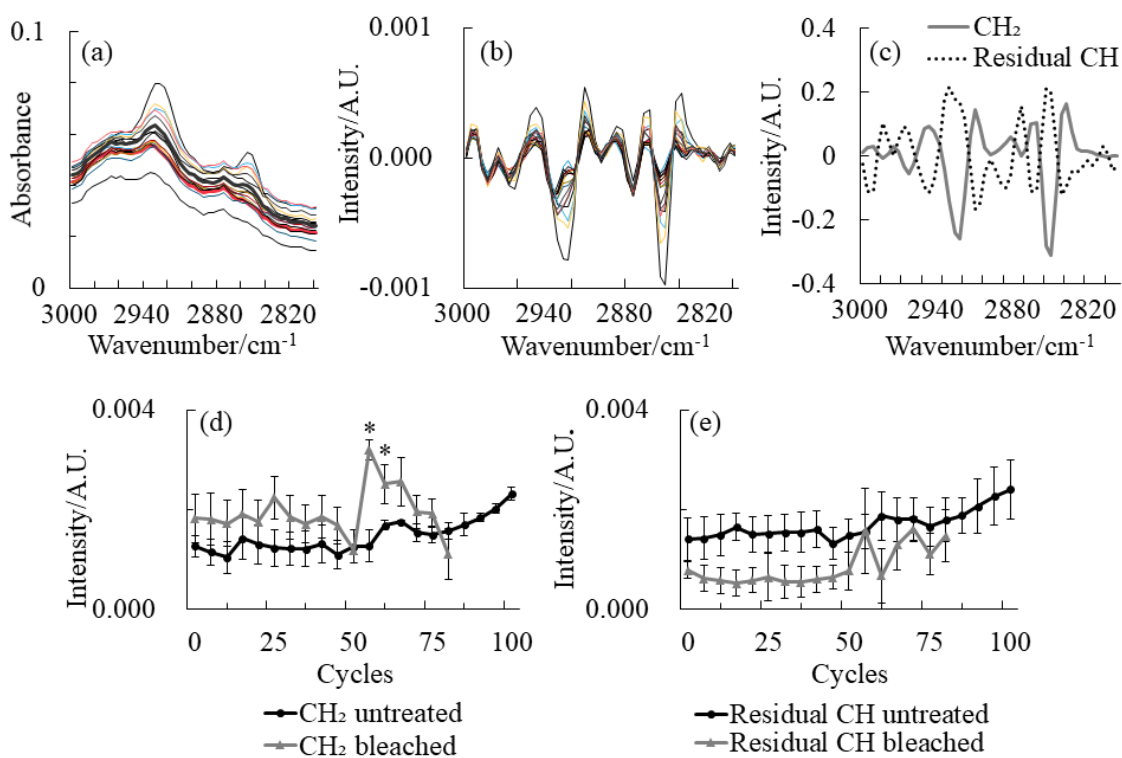


Figure 4 (a) IR spectra of the bleached hair in the $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ region, and (b) their second derivatives. (c) Component spectra and intensity profiles of (d) CH_2 and (e) residual CH obtained from the second derivative spectra by MCR. Data are shown as the mean \pm SE ($n = 3$). * $p < 0.05$ vs. bleached hair before cyclical extension.

$1700\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$ の波数範囲はアミド I の高波数領域側のカーブ部分に相当し、カルボニル基のピークが存在することが報告されている[27, 28]。Figure 5 は、ブリーチ処理毛の $1700\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$ の範囲における IR スペクトル、二次微分スペクトル、MCR による成分スペクトルをそれぞれ示している。Figure 5c において、実線でプロットされた成分は主にカ

ルボニル基から生じたものであり、 1740 cm^{-1} と 1720 cm^{-1} の $\text{C}=\text{O}$ のダブルレットの負のピークはそれぞれ飽和と不飽和のアルキル鎖帳を持つカルボニル基に帰属された[29]。点線でプロットされた成分は、 $\text{C}=\text{O}$ 、チオ酢酸 (COSH)、フェルミ共鳴、および二次導関数に由来するゴースト信号から生じている可能性が推測される。この MCR 解析の結果から、 $1700\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$ の波数範囲には 2 つの成分スペクトル成分が存在することが明らかになった。ブリーチ処理毛の反復延伸による $\text{C}=\text{O}$ のプロファイルは、 CH_2 挙動とほぼ一致しており、延伸前と比較して 55 回の延伸で有意に増加したが、未処理毛は変化しなかった。毛髪内部の主な脂質は、スクアレン、ワックスエステル、トリアシルグリセロール、遊離脂肪酸、コレステロール、セラミド、およびコレステロール硫酸などから構成されていることが知られており[30, 31]、別の研究ではキューティクルを剥離させた毛髪におけるメチレン強度の増加は、脂質含有量を示すと報告している[32]。ブリーチ処理毛では、 CH_2 と $\text{C}=\text{O}$ のプロファイルが見かけ上一致することから、反復延伸によって引き起こされる毛髪内部の構造変化の結果として、毛髪内部のワックスエステルやトリアシルグリセロールなどの脂質が表面に移行する可能性が考えられた。一方、未処理毛では、これらの成分プロファイルが一致していないため、これらの脂質の表面移行は起こらないと推測される。コルテックス層の構造は、高度に組織化された結晶タンパク質である中間径フィラメント(IF)と、IF を取り囲む非晶質の IF 関連タンパク質(IFAP)から構成される[33]。Crewther らは、IF がコイルドコイル構造の α -ヘリックスタンパク質からなるセクションを含むことを報告している[34]。未処理毛における CH_2 の信号強度のみが徐々に増加することは、反復延伸により、 α -ヘリックスタンパク質に構造変性が起こった、もしくは疎水性相互作用が減少して結晶タンパク質が非晶質状態に移行したことを示している可能性がある。

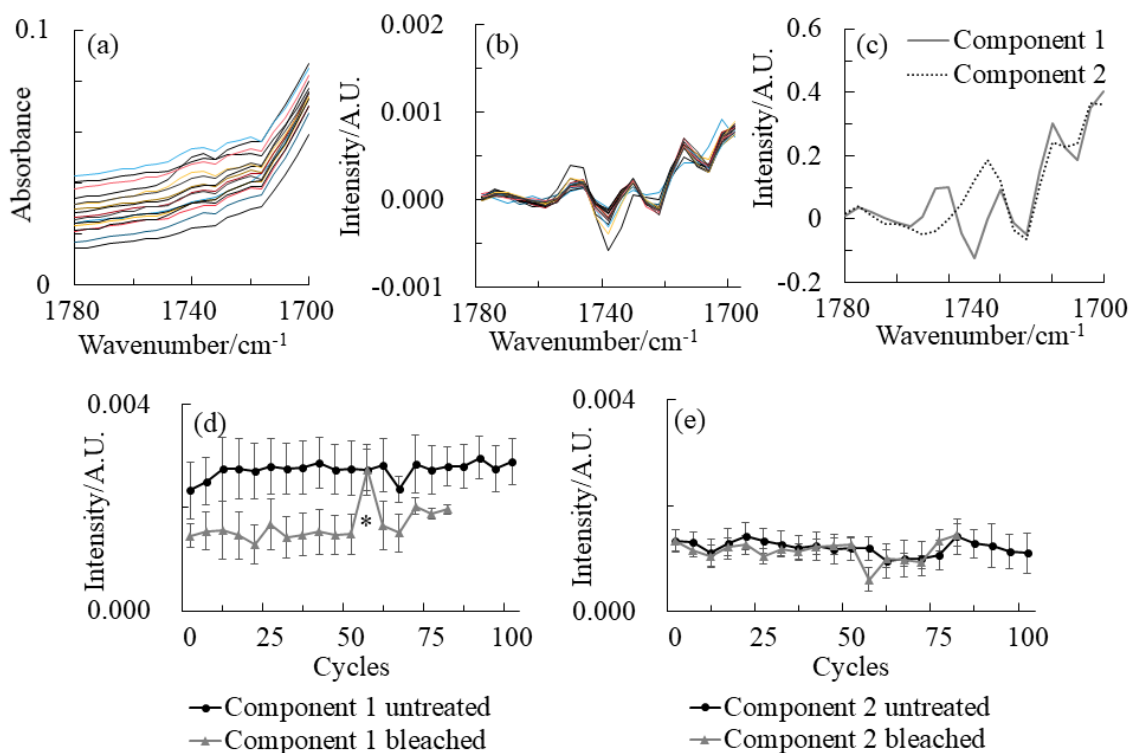


Figure 5 (a) IR spectra of the bleached hair in the 1700–1780 cm^{-1} region, and (b) their second derivatives. (c) Component spectra, intensity profiles of (d) component 1 and (e) component 2 obtained from the second derivative spectra by MCR. Data are shown as the mean \pm SE ($n = 3$). * $p < 0.05$ vs. bleached hair before cyclical extension.

Figure 6 は、ブリーチ処理毛における 1000–1060 cm^{-1} の波数範囲の IR スペクトル、二次微分スペクトル、および成分スペクトルを示している。MCR の結果、Figure 6c のとおり、チオエステル結合およびジスルフィド結合(R-S-S-R)の開裂により生成されるスルホン酸(R-SO₃H)と C-O が、それぞれ 1040 cm^{-1} および 1020 cm^{-1} 付近で確認することができた。[29, 35]。ブリーチ処理毛の SO₃H のプロファイルは、延伸前と比較して延伸 75 回目で有意に増加したが、未処理毛髪プロファイルは変化しなかった(Figure 6d)。このように、摂動を反復延伸回数とした多量の IR スペクトルについて、MCR を用いることで延伸回数依存的な毛髪内部構造変化を定量する方法を確立できた。本研究では未処理毛およびブリーチ処理毛について同じ試験を 3 回行った。例えば、ブリーチ処理毛における CH₂ のプロファイルは延伸回数 55 回目で有意な増加、SO₃H のプロファイルは延伸前と比較して延伸 75 回目で有意な増加と必ずしもなるわけではなかった。しかし、3 回の試験についての測定データにいずれも大幅なブレはなく、CH₂ の強度上昇の後に SO₃H の強度上昇が起こることは確認しており、毛髪の破断を予測するための有効なツールになり得ると考えられる。

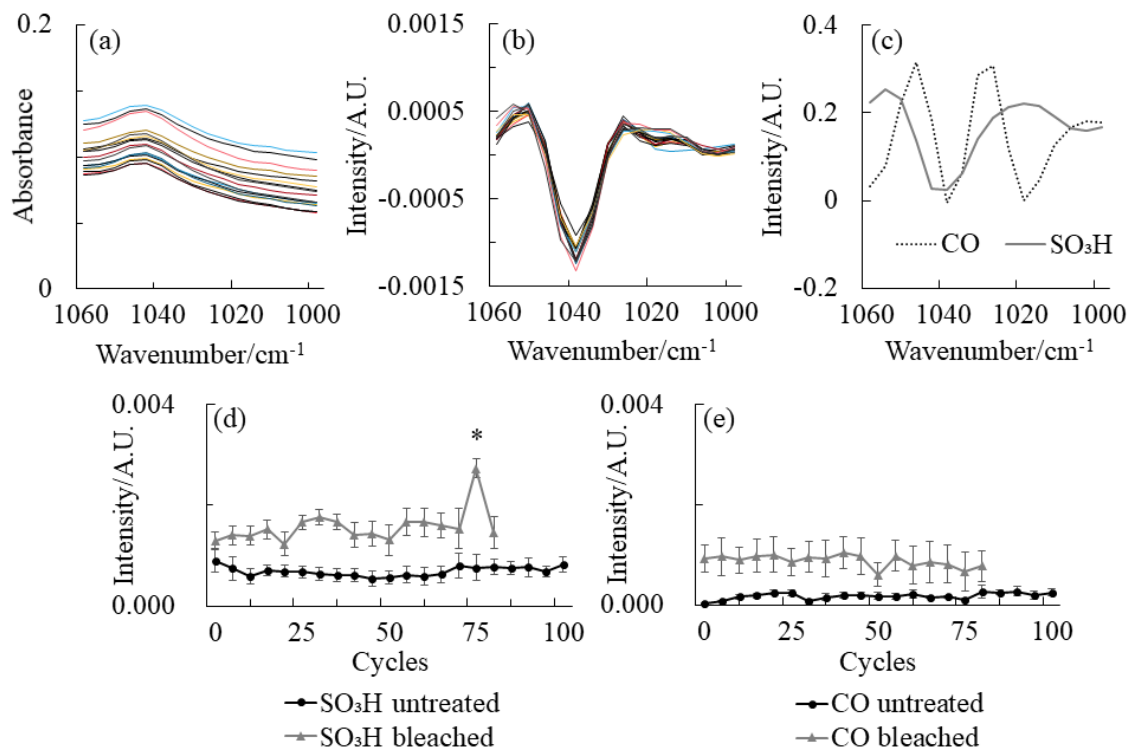


Figure 6 (a) IR spectra of the bleached hair in the 1000–1060 cm^{-1} region, and (b) their second derivatives. (c) Component spectra, intensity profiles of (d) SO_3H and (e) CO obtained from the second derivative spectra by MCR. Data are shown as the mean \pm SE ($n = 3$). * $p < 0.05$ vs. bleached hair before cyclical extension.

ブリーチ処理毛の SO_3H の振動強度が一度上昇して、その後減少する挙動は、 $-\text{SH}/-\text{SS}$ -変換による応力緩和によるものと考えられる。これまでに繊維や結晶性ポリマーフィルムにおける延伸中のラジカル形成について多くの研究が行われてきた[36, 37]。ラジカルに関する近年の論文では、切断によって生成されたチールラジカルが酸素と反応し、最終的に酸化されてスルホン酸が生成することが報告されている[38]。このことから、 SO_3H の信号強度の増加の一因は、反復延伸によって毛髪中に生成されるラジカルによるものと考えられる。一方、ブリーチ処理によってジスルフィド結合 (R-S-S-R)の酸化によってもスルホン酸が生成され、このことについては2種類の生成経路が提唱されている[39]。その生成経路の1つは S-S 開裂であり、もう1つの経路は C-S 開裂である。どちらの経路であっても SO_3H は最終的な酸化物であるが、それに至るシスチン酸化中間体の生成パターンは異なる。そこで反復延伸によって生成され得るシスチン酸化中間体の生成パターンを明らかにするために、2DCOS を 1000–1150 cm^{-1} の波数範囲で計算した。2DCOS は温度、濃度、時間などの特定の摂動下で測定された一連のスペクトルデータに対して分析できるため[40]、今回は延伸回数を特定の摂動として扱うことにした。同時相関はバンド強度の変化の類似性を表し、2つのバンドの強度が同じ方向に変化する場合は正の同時相関、強度が異なる方向に変化する場合は負の相関となる。また、異時相関スペクトルの交差ピークの符号により、バンド強度変化の順序を把握することができる。Figure 7は、スムージングを使用して前処理されたブリーチ処理毛の IR スペクトルから構築した同時相関、異時相関スペクトルを示す。延伸回数 85 回までのデータから構築された同時相関スペクトルでは、[1125 cm^{-1} 、1040 cm^{-1}]および[1125 cm^{-1} 、1070 cm^{-1}]の正の相関ピークが観察された。1070 cm^{-1} および 1120 cm^{-1} の正のピークは、それぞれシスチン中間酸化生成物であるシスチン一酸化物およびシスチン二酸化物に帰属された[12, 41]。これは、シスチン一酸化物およびシスチン二酸化物が反復延伸によって増加することを示唆している。異時相関スペクトルの正および負の相関ピークは、それぞれ [1070 cm^{-1} 、1125 cm^{-1}] および [1040 cm^{-1} 、1073 cm^{-1}] において確認された。このことより、まず反復延伸によりシスチン一酸化物が形成され、次にシスチン二酸化物が形成され、最後にスルホン酸が形成されることが明らかとなった。以上より、ジスルフィド結合が開裂することによるスルホン酸の生成経路としては、シスチン酸化中間体を介したスルホン酸の形成が行われる、 S-S 開裂が主要な経路であると考えられる。

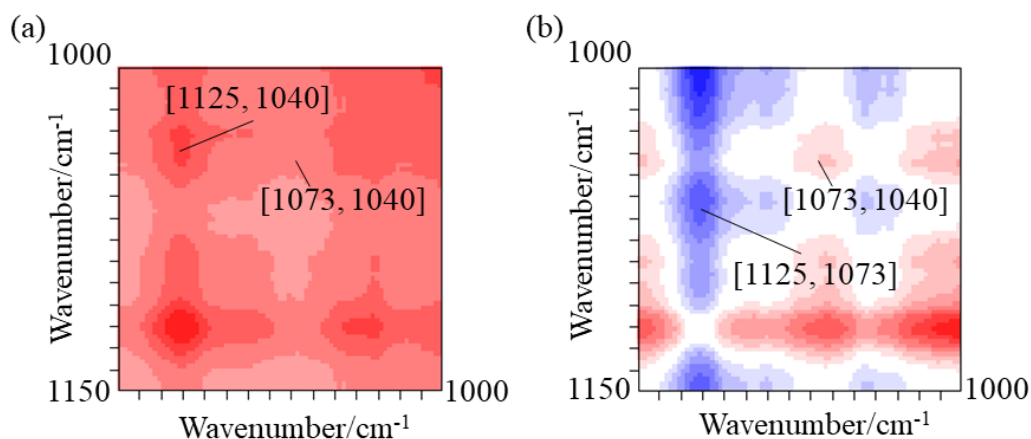


Figure 7 (a) Synchronous and (b) asynchronous 2D correlation spectra constructed using the IR spectra up to 85 cycles of the bleached hair in the 1000–1150 cm^{-1} region. Red and blue areas in the 2D map represent positive and negative correlations, respectively.

5.4 結論

IR と MCR と組み合わせて毛髪内部の 3 つの官能基を分析することにより、反復延伸による毛髪内部構造の変化を同定および定量化することに成功した。この分析手法により、破断が起こったブリーチ処理毛では、3 つの官能基、つまり CH_2 、 $\text{C}=\text{O}$ 、および SO_3H の増加が見られた。本研究は、毛髪の破断には少なくとも 2 段階の構造変化があることを示唆している。最初のステップはワックスエステルやトリアシルグリセロールなどの内部脂質の表面移動であり、第 2 ステップはジスルフィド結合とチオエステル結合の切断によるスルホン酸の形成である。従来の毛髪の破断を評価する方法では経時的な構造変化を分析することができず、その一手法である毛髪ヒステリシス比の測定では、毛髪が切れた場合にのみ、その比率が減少する。そのため、ヘアケアの現場で実際問題として起こっている切れ毛の悩みについて事前に対処することができない。本研究で確立した分析手法は、反復延伸による毛髪内部の構造変化について特定の官能基をモニタリングすることで、毛髪の破断を事前に予測することができ、切れ毛が起こる前にヘアトリートメントなどのヘアケア施術を受けることが可能である。本研究のような現実には起こっている問題を良くシミュレートした分析手法を起点とした毛髪化粧品の開発を進めることで、高性能で満足度の高いヘアケア商品が実現できると考えられる。次章では、本研究にて確立した反復延伸による毛髪内部構造変化評価法を髪ゆがみの悩みに対して応用し、ヘアケア製品の開発につなげた研究成果について述べる。

5.5. 参考文献

1. A. Elliot, *Textile Res. J.*, 22, 84–88 (1952).

2. C. R. Robbins, R. Crawford, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 42, 59–67 (1991)
3. W. J. Simpson, *Textile Inst.*, 51, T675 (1965)
4. P. Huck, C. Baddiel, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 22, 401–410 (1971)
5. E. T. Kubu, D. Montgomery, *Textile Res. J.*, 22, 778–782 (1952)
6. F. Hirsh, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 11, 26–31 (1960)
7. L. Rebenfeld and C. Dansizer, *Textile Res. J.*, 33, 458–465 (1963)
8. Y. K. Kamath, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 35, 21–43 (1984)
9. M. Gamez–Garcia, *J. Cosmet. Sci.*, 49, 213–222 (1998)
10. M. Feughelman, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 33, 385–406 (1982)
11. C. B. Baddiel, *J. Mol. Biol.*, 38, 181–199 (1968)
12. E. Hoting, M. Zimmermann, S. Hilterhaus–Bong, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 46, 85–99 (1995).
13. A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 1073–1101 (2007)
14. J. H. Jiang, Y. Liang, Y. Ozaki, *Intell. Lab. Syst.*, 71, 1–12 (1995)
15. J. Toft, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 29, 189–212 (1995)
16. F. C. Sanchez, B. van de Borgaert, S. C. Rutan, D. L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 34, 139–171 (1996)
17. J. H. Jiang, Y. Ozaki, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 37, 321–345 (2002)
18. T. Hasegawa, Y. Ozaki, *BUNSEKI KAGAKU*, 54, 1–26 (2005)
19. M. Sánchez, A. Scirè, F. Tanfani, A. Ausili, *Biochimica Biophysica Acta*, 1854, 1357–1364 (2015)
20. J. K. Jensen, J. M.A. Rubio, S. B. Engelsen, F. van den Berg., *Intell. Lab. Syst.*, 144, 39–47 (2015)
21. A. Tanabe, S. Morita, M. Tanaka, Y. Ozaki, *Appl. Spectrosc.*, 62, 46–50 (2008)
22. A. Savitzky, M. J. E. Golay, *Anal. Chem.*, 36, 1627–1639 (1964)
23. R. J. Barnes, M. S. Dhanoa, S. J. Lister, *Appl. Spectrosc.*, 43, 772–777 (1989)
24. <https://sites.google.com/site/shigemorita/>
25. N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy 3rd Edition*, (Academic Press, Massachusetts, 1990)
26. P. Pienpinijthama, C. Thammacharoen, S. Naranitad, S. Ekgasit, *Spectrochim. Acta Pt. A: Mol. Bio. Spectrosc.*, 197, 230–236 (2017)
27. 平松弘嗣, *蛋白質科学会アーカイブ*, 2, e054 (2009)
28. C. Dubief, *Cosmetics & Toiletries*, 107, 95–102 (1992)
29. H. Horiguchi, *Summary of infrared absorption pictures: the foundation and practice of organic structural chemistry* (Sankyo Shuppan, Tokyo, 1977)
30. W. S. Lee, *J. Dermatol. Sci.* 64, 153–158 (2011)

31. Y. Masukawa, H. Narita, G. Imokawa, *J. Cosmet. Sci.* 56, 1–16 (2005)
32. T. Takahashi, S. Yoshida, *Lipids*, 49, 905–917 (2014)
33. C. Popescu, H. Höcker, *Chem. Soc. Rev.*, 36, 1282–1291 (2007)
34. W. G. Crewther, L. M. Dowling, P. M. Steinert, D. A. D. Parry, *Int. J. Biol. Macromol.* 5, 267–274 (1983)
35. H. Zahn, H. G. Gattner, *Formation and Structure of Human Hair*, P. Jollès, H. Zahn, H. Höcker, Eds., 1997, Birkhaeuser Verlag, Basel.
36. D. Campbell, A. Peterlin, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters*, 6, 481–485 (1968)
37. T. Nagamura, M. Takayanagi, *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, 12, 2019–2034 (1974).
38. C. Schöneich, *Molecules*, 24, 4357–4372 (2019)
39. C. R. Robbins, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 22, 339–348 (1971)
40. I. Noda, A. E. Dowrey, C. Marcott, G. M. Story, Y. Ozaki, *Appl. Spectrosc.* 54, 236A–248A (2000)
41. S. Ratnapandian, S.B. Warner, Y.K. Kamath, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 49, 309–320 (1998)

6.1 緒言

髪は、肌と同様に年齢とともに変化する。たとえば白髪が増えたり、髪のボリュームが減ったりするが、さらに毛髪にうねりやくせといった形状の変化が生じることがある[1-3]。このうねりやくせのある毛髪が多くなると、手触りが悪くなり、外観を損なうとともに、まとまりにくい、セットしにくいといったスタイリングに関する問題が生じる。これまでに日本人女性を対象とした Web 調査において、35 歳からの髪の悩みは、「髪の傷み」から「髪の衰え」へ変化し、髪質が変わったと実感するのは「うねり」「くせ」「パサつき」であるという報告がなされている[4]。このような加齢に伴って生えてくる、うねりやくせ、広がりがある毛髪を“ゆがみ毛”として Figure 1 に示す。これまでにゆがみ毛の研究において、顕微赤外分光分析(顕微 IR)を用いて同一人からサンプリングした直毛とゆがみ毛における内部観察をした結果、ゆがみ毛にのみ脂質の局在があることが報告されている[5]。しかしながら、髪のゆがみについてはまだまだ不明な点も多く、特に髪のゆがみと日々のスタイリング行動との関係性は分かっていない。

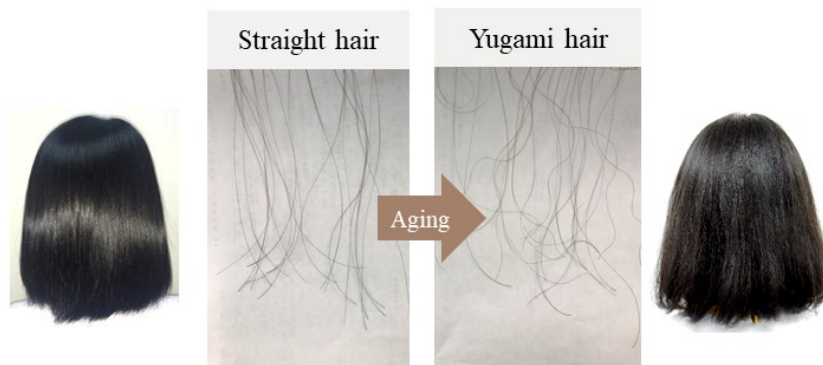


Figure 1 Hair appearance of a monitor with age-related curved hair, so called “yugami” hair.

髪を美しく見せるために日々のスタイリング行動は重要であるが、髪を整える際に髪を引っ張るまたは伸ばす行為によって力学的負荷がかかることが報告されている[6-12]。これらの力学的負荷をかけた従来の引張試験では、負荷をかける速度が極めて遅く、毛髪横断面における応力が非常に大きいので、生活者の毛髪に実際に起こっている負荷をシミュレートするには適していなかった。そのため、コーミングやブラッシングといった日常で生じるダメージの影響を近似できる力学的疲労試験や反復延伸試験法が考案されている。Kamath らは、20g 重から 40g 重の負荷を最大 10 万回かける疲労試験を行い、キューティクルのリフトアップや割れが起こることを報告している[13]。Gamez-Garcia が検討した、7.0%から 15%の伸長率における反復延伸試験においても、キューティクルのリフトアップが起こることを報告している[14]。しかしながら、引っ張りや延伸による負荷は主にコルテックス層に影響するという報告[15, 16]があるにもかかわらず、力学的疲労試験や反

反復延伸試験法で評価したのは毛髪表面の形態観察のみであり、毛髪内部を解析するまでには至っていない。

毛髪内部を解析する方法は、X線散乱[17, 18]、原子間力顕微鏡(AFM) [19]、飛行時間型二次イオン質量分析法 (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry ; TOF-SIMS) [20, 21]、DSC(示差走査熱量分析)[22, 23]、赤外分光法(IR)[24-26]、ラマン分光法[27, 28]などさまざまあり、特に IR は、キューティクル、コルテックス、およびメデュラといった毛髪の各構造に焦点を絞って測定でき、その測定方法によっては非破壊で毛評価できることが大きな利点を持つ。しかし、タンパク質や脂質などの生体試料のスペクトルは多くのバンドが重なり合って構成されているため、解析が困難である。そこで前章では、ケモメトリックスのひとつの手法である多変量スペクトル分解(MCR)[29-32]を用いて、反復延伸による毛髪内部の構造変化について特定の官能基をモニタリングする手法を確立し、破断の予測に用いた。

本研究では、まず髪のゆがみに悩む生活者に対してヘアスタイリングに関する行動調査を行い、ヘアケア現場で実際に起きている問題について探索した。次に、日常のヘアスタイリング行動として良く行われる、髪を繰り返して伸ばす行為(反復延伸)がゆがみ毛の形状変化に及ぼす影響を測定した。そして、前章で確立した反復延伸による毛髪内部構造変化評価法を適用するとともに、高圧示差走査熱量測定(HPDSC)を用いてゆがみ毛の形状変化の一因となる毛髪内部タンパク質の構造安定性についても解析した。最後に、反復延伸による髪ゆがみの増大をケアするソリューションの開発を実施したので報告する。

6.2 実験

6.2.1. ゆがみ毛保有者のヘアスタイリング行動調査

30歳代から40歳代の日本人女性に対して、「髪の長さが耳より下」、「パーマを施術していない」、「髪のくせ・うねりが気になる」、「元々のくせ・うねりはない」、「くせ・うねりの場所は一部にある」と回答した方をゆがみ毛保有者とし、計465名に対してヘアスタイリング行動における質問を実施した。なお、アンケートの回答期間は、2021年9月16日から2021年9月21日であった。

6.2.2 毛髪採取および試薬

未処理毛は、健康な40代日本人女性を対象として、書面によるインフォームドコンセントを得た上で、頭皮に近い根元部分から直毛ならびにゆがみ毛を採取した。すべての毛髪サンプルは、ごみや一時的なセット形状を除去するため、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム水溶液(5.0%)で洗浄し、精製水ですすいだのち、測定前日に25℃、50RH%の温湿度環境にて順化され、試験に供された。なお、ゆがみケア成分として用いたPPG-2アルギニンは日油株式会社(東京)より入手した。なお、PPG-2アルギニンの構造式はFigure 2のとおりである。

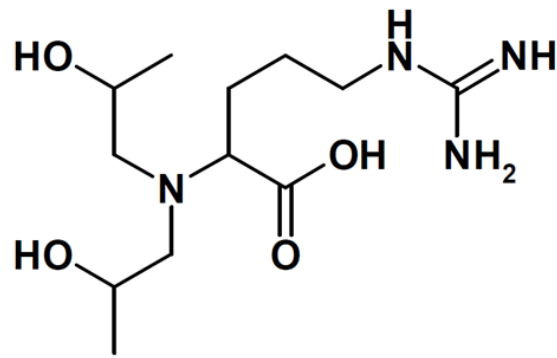


Figure 2 Chemical structure of PPG-2 Arginine.

6.2.3. 毛髪の扁平率ならびに曲率の測定

直毛は根元から 1, 3, 6 cm の箇所における部分、ゆがみ毛は毛髪のカール部分の長径 a , 短径 b , ならびにカール半径 r を算出した。カール半径は、毛髪全体をイメージスキャナ (GTX830 type, セイコーエプソン株式会社, 東京) で撮影し、得られた二次元画像からカール部分における半径を解析した。なお、扁平率 E ならびに曲率 C は式(1)ならびに式(2)より求めた。

$$E = \frac{a - b}{a} \quad \dots (1)$$

$$C = \frac{1}{r} \quad \dots (2)$$

6.2.4. 毛髪の繰り返しコーミング試験

ゆがみ毛保有者女性 1 名より採取した直毛とゆがみ毛を毛束化し、Figure 3 のように 2 本のロールブラシにて毛束をはさみこみ 3000 回のコーミングを実施した。なお、コーミング 1000 回ごとに毛束の外観の写真を撮影した。



Figure 3 Combing test using a roll brush.

6.2.5 キューティクルの剥離方法

毛髪の内部構造を分析するために、ダイヤモンドやすり(#600, RYOBI, 広島)を使用してキューティクルを除去した。なお、剥離に際してキューティクルが均一に除去できるよう、デジタルマイクロスコープ(VK-X250, Keyence, 大阪)で毛髪の直径を確認しながら行った。

6.2.6 顕微全反射顕微鏡顕微(顕微 ATR)分析

毛髪の両端を治具で固定し、テクスチャーアナライザ (Stable Micro Systems, Surrey, UK) の自動モードを使用して、180 mm/min の速度で引張過重が 0.3 N に達するまで伸張させた。この操作を 1 回として、合計 500 回行った。延伸 25 回ごとに毛髪をテクスチャーアナライザから取り外し、顕微 ATR(iN-10, Thermo Scientific, Waltham, USA)を用いて毛髪のコルテックス層における IR スペクトルを取得した。測定条件は、アパーチャーを $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ 、分解能を $8\ \text{cm}^{-1}$ 、測定波数範囲を $4000\text{--}650\ \text{cm}^{-1}$ 、積算回数を 64 とした。

6.2.7 スペクトル解析

顕微 ATR にて得られた毛髪のスペクトルは、Unscrambler X 10.5 ソフトウェア (version 10.5, Camo Software AS, Oslo, Norway) により、Savitzky-Golay 法を用いて平滑化と二次微分による前処理を行った[33, 34]。なお、すべての二次微分スペクトルは、平滑化点を 9、と多項式時数を 3 として計算した。さらに、これらのスペクトルは、ケラチンタンパク質の構造と毛髪内部の脂質の挙動を調べるために、MCR 解析に供した。そしてこれらのスペ

クトルは、ケラチンタンパク質の構造変化を調べるために、MCR 解析に用いられた。スルホン酸生成およびタンパク質の構造変化を評価するために、2DShige ソフトウェアを使用して、1000–1080 cm⁻¹ および 1600–1700 cm⁻¹ の範囲におけるスペクトルを二次元相関分光分析(2DCOS) を行った[35]。

6.2.8 顕微 IR 分析

毛髪横断面の IR スペクトルを得るために、顕微 FT-IR (iN-10, Thermo Scientific, Waltham, USA) を使用した。工業用回転式マイクローム Leica RM2265 (Leica Biosystems 社, 東京) を使用して、厚さ 6.0 μm の平滑な切片を作製し、その毛髪切片をマッピングステージ上に置き、下記条件にて測定した。測定条件は、アパーチャーを 10 μm × 10 μm、分解能を 8 cm⁻¹、測定波数範囲を 4000–650 cm⁻¹、積算回数を 256 とした。

6.2.9 高圧示差走査熱量計(HPDSC)測定

毛髪タンパク質の三次構造の安定性を評価するために HPDSC 測定を行った。各年代の毛髪を約 1 cm ごとに切断した後、液体窒素を用いて粉碎し、パウダー状にした。その後、パウダー状にした毛髪 5 mg をステンレス製耐圧パン(日立ハイテクサイエンス, 東京)に量り取り、蒸留水 10 μL を加えて密閉した。密閉したパンを室温で 2 日間順化させた後、示差走査熱量計(DSC6220, セイコーインスツル, 千葉)を用いて、30–200 °C の温度範囲にて昇温速度 10 °C/min、窒素ガス流量を 40 mL/min 条件で測定した。

6.2.10 毛髪引張強度の測定

直毛およびゆがみ毛について 80±10 μm の太さの毛髪を 60 本選別し、毛髪の直径をダイヤルシクネスゲージ(DS-1211, 新潟精機, 新潟)にて計測した。次いでテクスチャーアナライザ (Stable Micro Systems, Surrey, UK)を用いて毛髪が破断した時の荷重を測定し、毛髪直径 m と破断荷重 F の値から式(3)を用いて単位面積当たりの引っ張り荷重(引張強度; H)を算出した。

$$H = F / \pi \left(\frac{m}{2}\right)^2 \quad \dots (3)$$

6.2.11 統計解析

直毛およびゆがみ毛の反復延伸前後の変化の評価のため Student's t test を、PPG-2 アルギニンの効果検証については Turkey-Kramer test により検定を実施した。なお、有意水準は $p < 0.05$ と定義した。

6.3 結果と考察

6.3.1 ゆがみ毛の形状変化ならびに構造変化解析

本研究では、加齢に伴って生えてくる、うねりやくせや広がりがある毛髪を“ゆがみ毛”

として、そのゆがみ毛を形態学的パラメータによって数値化し、日常のヘアスタイリング行動としてよく行われる、髪を繰り返し伸ばす行為が及ぼす形状変化や構造変化について分析した。さらに反復延伸を利用したゆがみ毛のケア方法についても検証を行った。

ゆがみ毛保有者にアンケートを実施したところ、髪のをねり/くせ・ゆがみ対策として、髪を引っ張る行為を最も多く行うことが分かった(Figure 4a)。さらに日常的に繰り返し髪を引っ張る群では、自身の髪のみとまり実感が低下していることを見出した(Figure 4b)。これらの調査結果より、日ごろから髪のをねりやくせ、ゆがみ対策として行っている繰り返し髪を引っ張る行為がさらに髪を扱いにくくさせてしまい、髪のをがみが解決しないままになっていることが予想された。

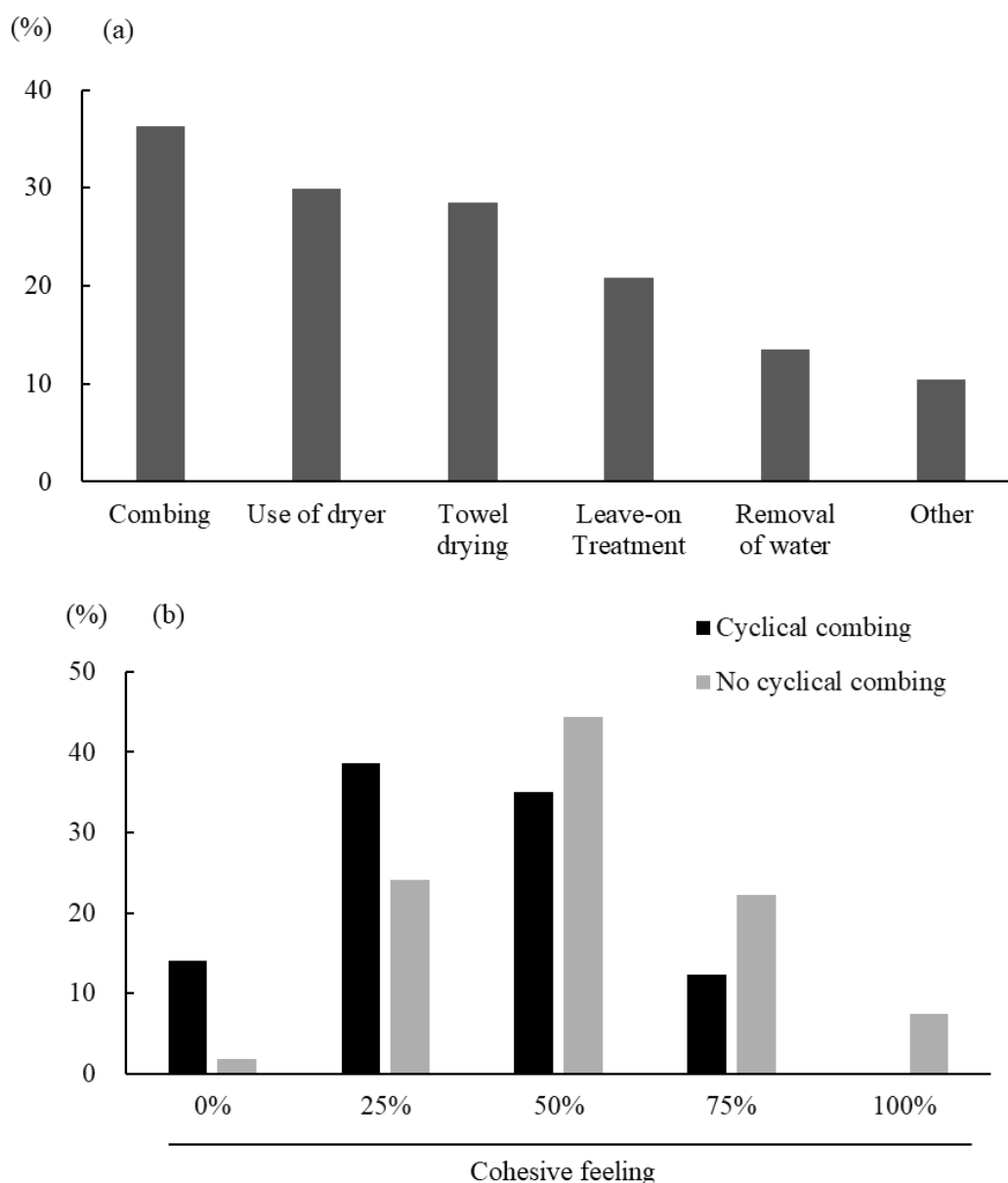


Figure 4 Questionnaire results for Japanese women with age-related curved hair, so called “yugami” hair.(a): Most common hair care behavior, (b): Relation between cyclical combing and cohesive feeling.

そこで、髪がゆがみが解決しないというヘアケアの現場で実際に起きている問題について、毛髪を使用したシミュレーション試験を実施することとした。試験に先立ち、これまでは美容師による目視で採取していた直毛ならびにゆがみ毛について、扁平率と曲率の数値によって規格化することとした。直毛とゆがみ毛の規格を Table 1 に示す。この規格により、定性的な採取ではなく、定量的に直毛とゆがみ毛を採取することが可能となった。

Table 1 Standards for Straight and Yugami hair

	Straight hair	Yugami hair
Ellipticity	< 0.082	0.082 – 0.390
Curvature (cm ⁻¹)	< 0.49	0.49 – 1.79

Table 1 の規格に従いサンプリングした、直毛とゆがみ毛をそれぞれ毛束にし、3000回の繰り返しコーミングを行った結果を Figure 5 に示す。直毛は繰り返しコーミングの前後で大きな変化が生じなかったが、ゆがみ毛ではくせ・うねりが大きくなり、髪がよりゆがんでしまうことが確認できた。

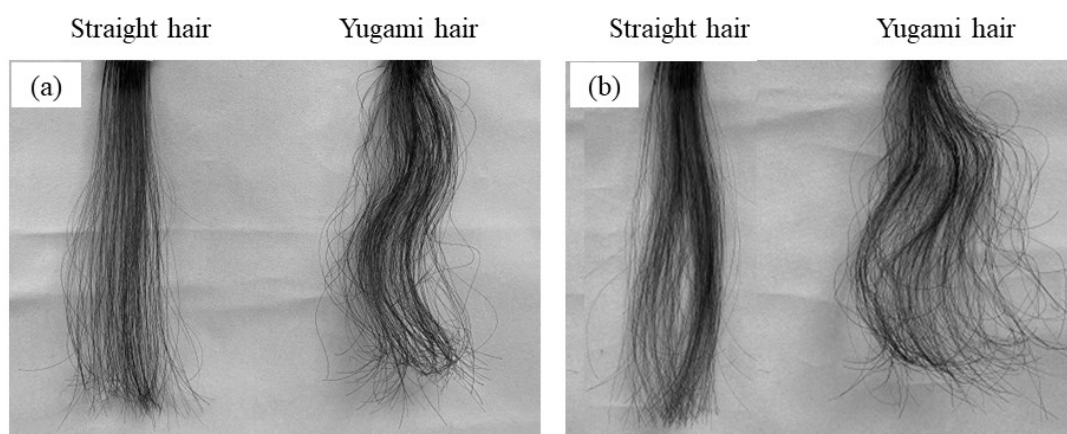


Figure 5 Images of hair fibers shape (a) before and (b) after combing 3000 times.

次に、ブラッシングやコーミングなどの日常的にヘアケア行動で起こり得る引っ張り強度について、0.3 N の荷重ストレスにおける反復延伸試験を行った(Figure 6)。0.3 N の荷重ストレスで延伸した場合、伸長率として約 5.0 %に換算され、一般にフック領域をすこし抜けた降服領域に該当し、コーミングやブラッシングを反映した系に相当するといわれる

[36]。反復延伸前の平均曲率は、直毛は 0.210 cm^{-1} 、ゆがみ毛は 0.936 cm^{-1} であった。両毛髪に対して 500 回の反復延伸を行った結果、反復延伸後におけるゆがみ毛の曲率は 1.307 cm^{-1} となり、反復延伸前と比較して有意に曲率が上昇した。一方、直毛は反復延伸後の曲率は 0.302 cm^{-1} となり、大きな変化は認められなかった。以上より、このゆがみ毛の有意な曲率の上昇が、髪ゆがみに悩む生活者が抱く、日常的に繰り返し髪を引っ張ったことによるまとまり感の低下に寄与していると考えられた。

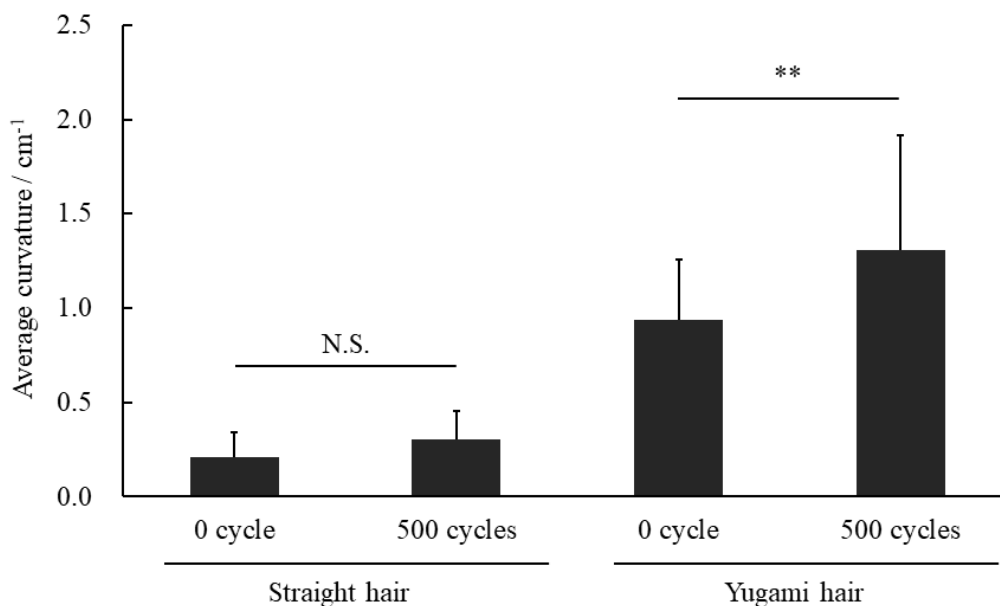


Figure 6 Average curvature changes of straight and yugami hair caused by cyclical extension. Data are shown as the mean \pm SE ($n = 30$). “N.S.” indicates not significant. ** $p < 0.01$ vs. yugami hair before cyclical extension.

上記曲率の増加には毛髪内部構造の変性に関連していると考え、前章で確立した反復延伸による構造変化解析法をゆがみ毛に適用することとした。まずは、直毛ならびにゆがみ毛ともに、500 回延伸を行った際の IR を取得した。ゆがみ毛の IR スペクトルを Figure 7 に示す。次に、ゆがみ毛における $2800\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$ の範囲でそれぞれ MCR によって得られた IR スペクトル、二次微分スペクトル、および成分スペクトルを示す(Figure 8)。 2852 cm^{-1} および 2924 cm^{-1} に位置する顕著なバンドは CH_2 に帰属された[37, 38]。Figure 6c の点線でプロットされた成分スペクトルは、CH 残基、つまり CH_3 、フェルミ共鳴、ゴースト信号などから生じていると考えられる。ゆがみ毛における $2800\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$ の範囲には、 CH_2 と CH 残基が存在することが明らかになった。反復延伸による CH_2 の信号強度変化において、ゆがみ毛は反復延伸前に比べて延伸 125 回目において CH_2 の信号強度が増加傾向であることが確認されたが、直毛では CH_2 の信号強度のプロファイルに変化は認められなかった。また、CH 残基のプロファイルは、直毛およびゆがみ毛の両方で延伸回数依存的な変化はみられなかった。

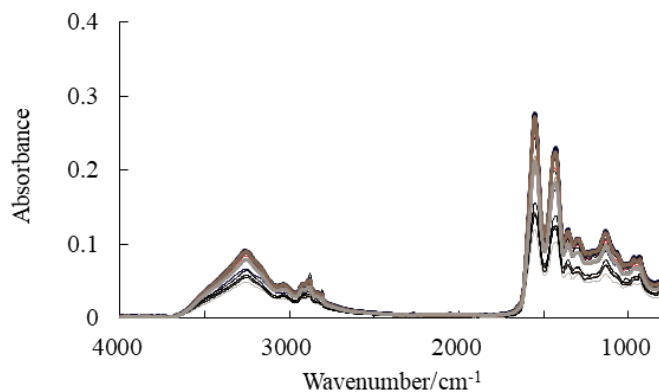


Figure 7 Extension cycles–dependent IR spectra of Yugami hair.

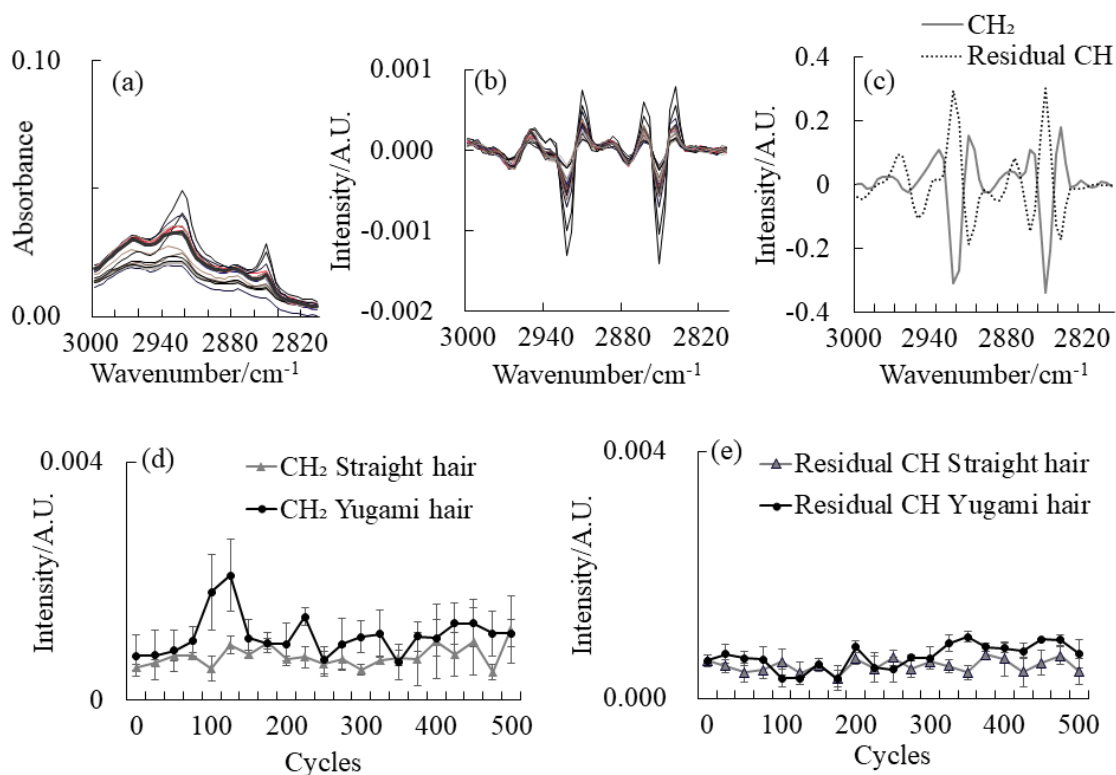


Figure 8 (a) IR spectra of the Yugami hair in the 2800–3000 cm^{-1} region, and (b) their second derivatives. (c) Component spectra and intensity profiles of (d) CH_2 and (e) residual CH obtained from the second derivative spectra by MCR. Data are shown as the mean \pm SE ($n = 3$). * $p < 0.05$ vs. bleached hair before cyclical extension.

Figure 9 は、ブリーチ処理毛の $1700\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$ の範囲における IR スペクトル、二次微分スペクトル、MCR による成分スペクトルをそれぞれ示している。Figure 9c において、実線でプロットされた成分は主にカルボニル基から生じたものであり、 1740 cm^{-1} と 1720

cm^{-1} の $\text{C}=\text{O}$ のダブルレットの負のピークはそれぞれ飽和と不飽和のアルキル鎖帳を持つカルボニル基に帰属される[39]。点線でプロットした成分は、 $\text{C}=\text{O}$ 、チオ酢酸 (COSH)、フェルミ共鳴、および二次導関数に由来するゴースト信号から生じている可能性が推測される。この MCR 解析の結果から、 $1700\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$ の波数範囲には $\text{C}=\text{O}$ おならびに COSH の 2 つの成分スペクトル成分が存在することが明らかになった。ゆがみ毛の反復延伸による $\text{C}=\text{O}$ のプロファイルは、 CH_2 挙動とほぼ一致しており、延伸前と比較して 125 回の延伸で増加した。ゆがみ毛では、 CH_2 と $\text{C}=\text{O}$ のプロファイルが見かけ上一致することから、反復延伸によって引き起こされる毛髪内部の構造変化の結果として、毛髪内部のワックスエステルやトリアシルグリセロールなどの脂質が表面に移行する可能性が考えられた。一方、直毛では、 CH_2 と $\text{C}=\text{O}$ の成分プロファイルが変化していないため、上記脂質の表面移行は起こらないと推測される。コルテックス層には S-S 結合が豊富に存在することが報告されているため[40]、反復延伸によりゆがみ毛においてのみ -SH/-SS- 変換による応力緩和が起こり、結果的に COSH の強度増加が起きていると思われる。

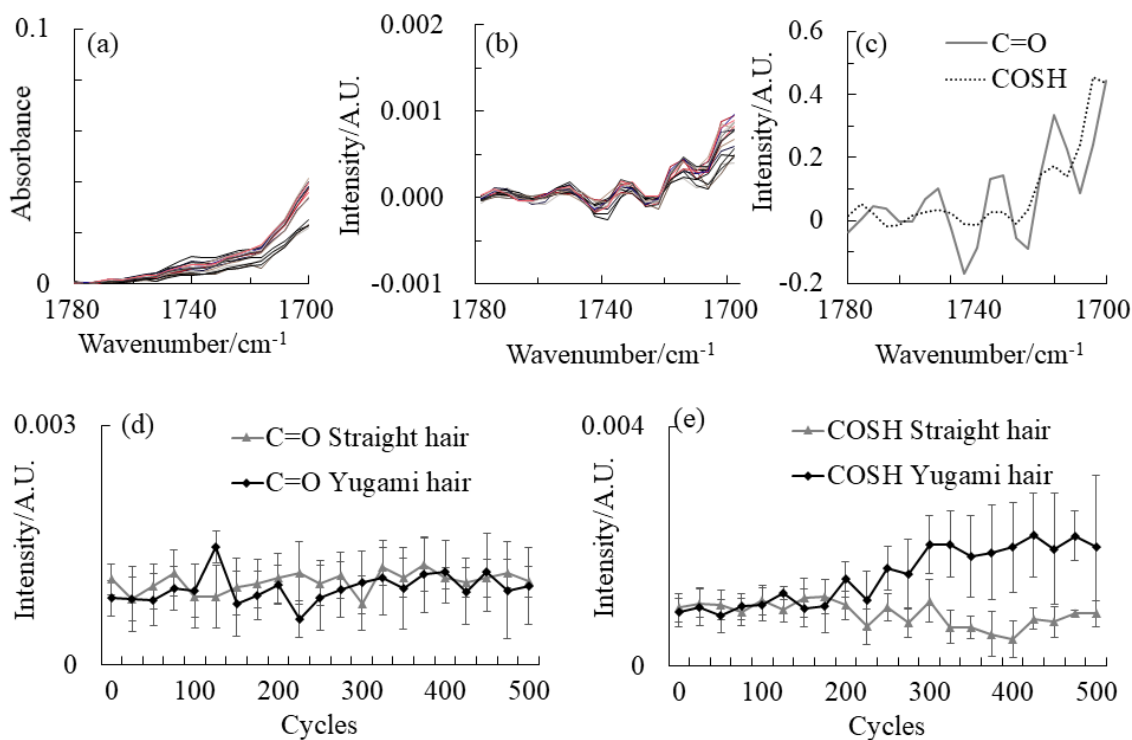


Figure 9 (a) IR spectra of the Yugami hair in the $1700\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$ region, and (b) their second derivatives. (c) Component spectra, intensity profiles of (d) component 1 and (e) component 2 obtained from the second derivative spectra by MCR. Data are shown as the mean \pm SE ($n=3$). * $p < 0.05$ vs. bleached hair before cyclical extension.

次に、ゆがみ毛における $1000\text{--}1060\text{ cm}^{-1}$ の波数範囲の IR スペクトル、二次微分スペクトル、および成分スペクトルを示す(Figure 10)。MCR の結果、チオエステル結合およびジスルフィド結合(R-S-S-R)の開裂により生成されるスルホン酸($\text{R-SO}_3\text{H}$)と C-O が、それぞれ 1040 cm^{-1} および 1020 cm^{-1} 付近で確認することができた[41]。ゆがみ毛の SO_3H のプロファイルは、延伸前と比較して延伸 225 回目で増加したが、直毛では変化しなかった

(Figure 10d). 前章においても反復延伸によりブリーチ処理毛の SO_3H の振動強度を見出したが、ゆがみ毛においても延伸中に毛髪中にラジカルが生成し[42]、その結果として S-S 結合が酸化され、最終的にスルホン酸が生成されたものと考えられる。

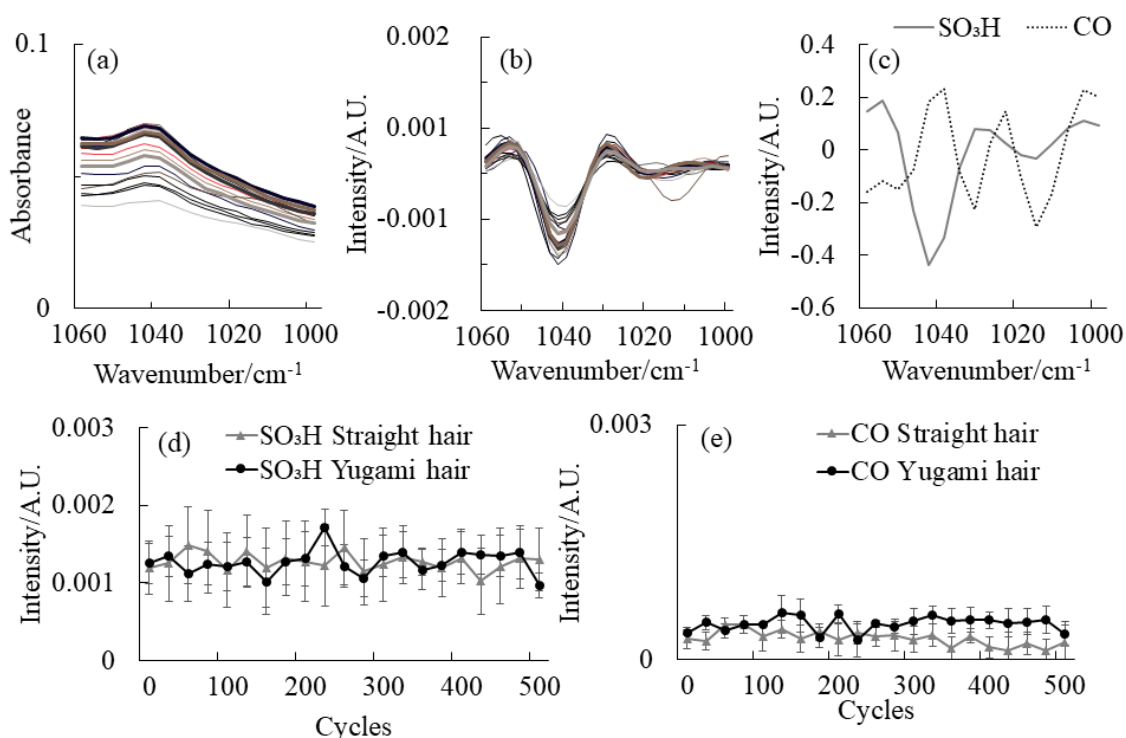


Figure 10 (a) IR spectra of the Yugami hair in the 1000–1060 cm^{-1} region, and (b) their second derivatives. (c) Component spectra, intensity profiles of (d) SO_3H and (e) CO obtained from the second derivative spectra by MCR. Data are shown as the mean \pm SE ($n = 3$). * $p < 0.05$ vs. bleached hair before cyclical extension.

続いて、ゆがみ毛におけるスルホン酸の生成経路を確認するために、2DCOS を 1000–1150 cm^{-1} の波数範囲で実行した。Figure 11 は、スムージングを使用して前処理されたゆがみ毛の IR スペクトルから構築した同時相関、異時相関スペクトルを示す。1070 cm^{-1} および 1120 cm^{-1} の正のピークは、それぞれシスチン中間酸化生成物であるシスチン一酸化物およびシスチン二酸化物に帰属された[25, 43]。延伸回数 500 回までのデータから構築された同期相関スペクトルでは、すべての波数範囲において正の相関ピークが観察されたため、延伸回数依存的にシスチン中間酸化生成物やスルホン酸が増加したことを示唆している。また、異時相関スペクトルの特徴的な負の相関ピークが[1070 cm^{-1} 、1040 cm^{-1}] および [1125 cm^{-1} 、1070 cm^{-1}] において確認された。このことはシスチン中間酸化生成物の前にもスルホン酸が生成されたことを示唆している。シスチン中間酸化生成物を經由してスルホン酸に至る経路として S-S 開裂パターンがあるが、もうひとつのスルホン酸生成経路として、シスチン中間酸化生成物を經由せずに C-S が段階的に酸化されていく C-S 開裂パターンが存在する[44]。このような、シスチン中間酸化生成物より前にスルホン酸が生成された一因として、ゆがみ毛の反復延伸では C-S 開裂パターンが先に起こっている可能性が考えられる。

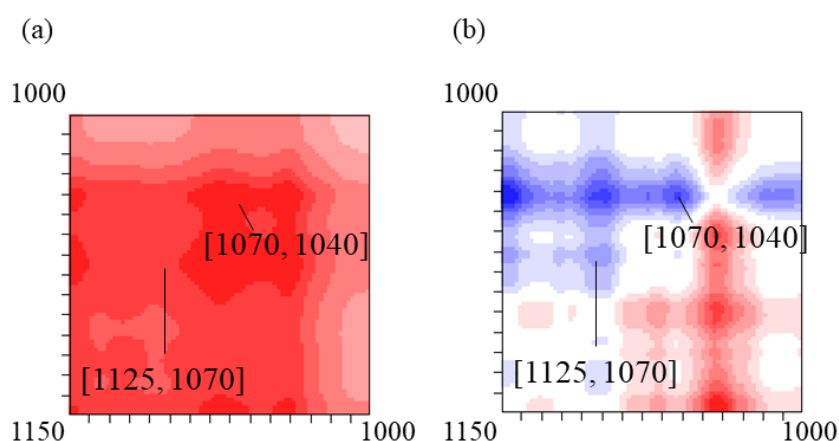


Figure 11 (a) Synchronous and (b) asynchronous 2D correlation spectra constructed using the IR spectra up to 500 cycles of the Yugami hair in the 1000–1150 cm^{-1} region. Red and blue areas in the 2D map represent positive and negative correlations, respectively.

延伸を行うと、毛髪タンパク質の二次構造のひとつである α -ヘリックスが β 構造化する、いわゆる β 転移という現象が起こることが X 線解析や IR の分析結果により明らかになっている[45–47]。そこで、同じくタンパク質の構造変化であるスルホン酸の生成との関連性を調査することとした。Figure 12 は、スムージングを使用して前処理した 1000–1080 cm^{-1} ならびに 1600–1700 cm^{-1} のゆがみ毛の IR スペクトルから構築した同時相関、異時相関スペクトルを示す。1640 cm^{-1} および 1670 cm^{-1} は、それぞれ β シートおよび β ターン構造に関する波数領域であることが報告されている[48, 49]。同期相関スペクトルにおいて、[1040 cm^{-1} , 1640 cm^{-1}] および [1040 cm^{-1} , 1670 cm^{-1}] に正の相関ピークが観察されたため、延伸回数依存的にスルホン酸ならびに β 構造が増加したと考えられる。また、異時相関スペクトルも同様に特徴的な正の相関ピークが[1040 cm^{-1} , 1640 cm^{-1}] および [1040 cm^{-1} , 1670 cm^{-1}] において確認された。このことは、スルホン酸の生成のあとに β 転移が起きたことを示唆している。コルテックス層における毛髪タンパク質は、主に中間径フィラメント (IF, Intermediate Filament) タンパク質と中間径フィラメント関連タンパク質 (IFAP, IF associated protein, マトリックスタンパク質) という 2 種のタンパク質から構成されている[50, 51]。また、IF 分子内、IF 分子間、さらに IF-IFAP 間には S-S 結合が豊富に存在することが知られている[40]。以上をふまえると、スルホン酸の生成のあとに β 転移が起こった一因として、反復延伸により IF に関する S-S 結合の開裂が起き、IF 自体の構造安定性が保持できなくなった結果として、 β 転移が起こることが推測された。

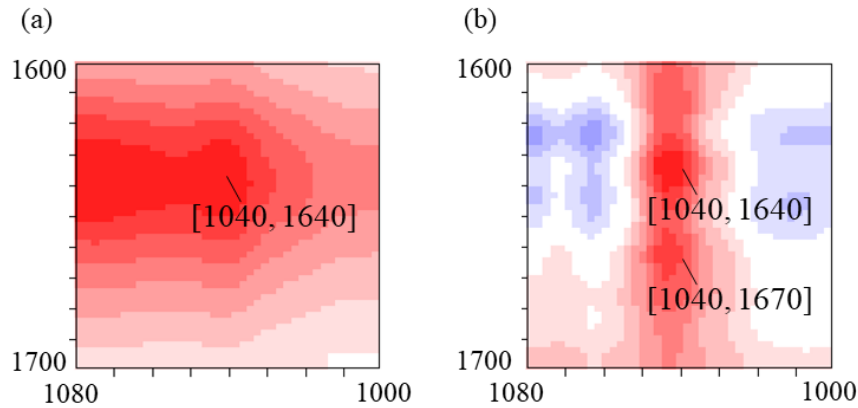


Figure 12 (a) Synchronous and (b) asynchronous 2D correlation spectra constructed using the IR spectra up to 500 cycles of the Yugami hair in the 1000–1080 cm^{-1} and 1600–1700 cm^{-1} region. Red and blue areas in the 2D map represent positive and negative correlations, respectively.

次に、上記 IF ならびに IFAP の安定性を評価するために HPDSC を行った。IF および IFAP で起きた構造変性は、変性エンタルピー(ΔH_D) と変性温度(T_D) から求めることができる。これは、水分を含んだ毛髪が 150 °C から 200 °C の範囲で溶解する現象を利用したものであり、 ΔH_D は IF に含まれる α -ヘリックスの存在量と構造完全性を示し、 T_D は IFAP の架橋密度ならびに安定性を示すことが知られている[52]。ここで、直毛およびゆがみ毛における反復延伸前後の ΔH_D と T_D を Figure 13 と Figure 14 に示す。その結果、ゆがみ毛は反復延伸により ΔH_D が有意に減少したことが明らかになった。一方で直毛は反復延伸による ΔH_D の変化が認められなかった。また、 T_D は、直毛およびゆがみ毛ともに反復延伸による変化が見られなかった。この結果は、ゆがみ毛は反復延伸により IF 内の α -ヘリックスの存在量が低下し、構造安定性が減少したことを示唆しており、Figure 12 における 2DCOS の結果とよく一致している。

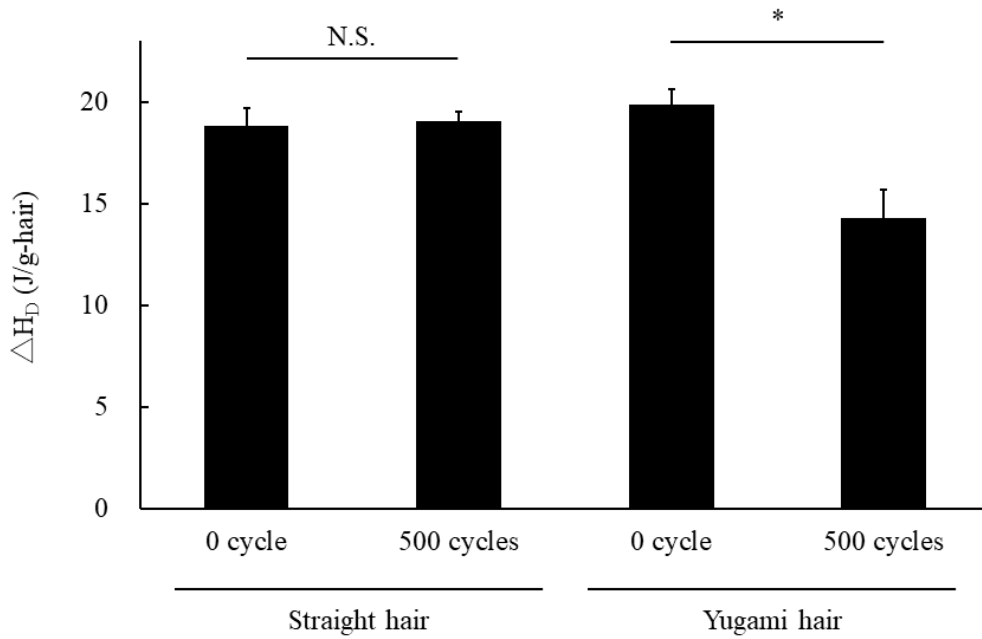


Figure 13 Denaturation enthalpy (ΔH_D) of straight and yugami hair caused by cyclical extension measured by HPDSC (heating rate 10 °C / min, nitrogen draft of 60 mL / min. Data are shown as the mean \pm SE (n = 5). “N.S.” indicates not significant. * $p < 0.05$ vs. yugami hair before cyclical extension.

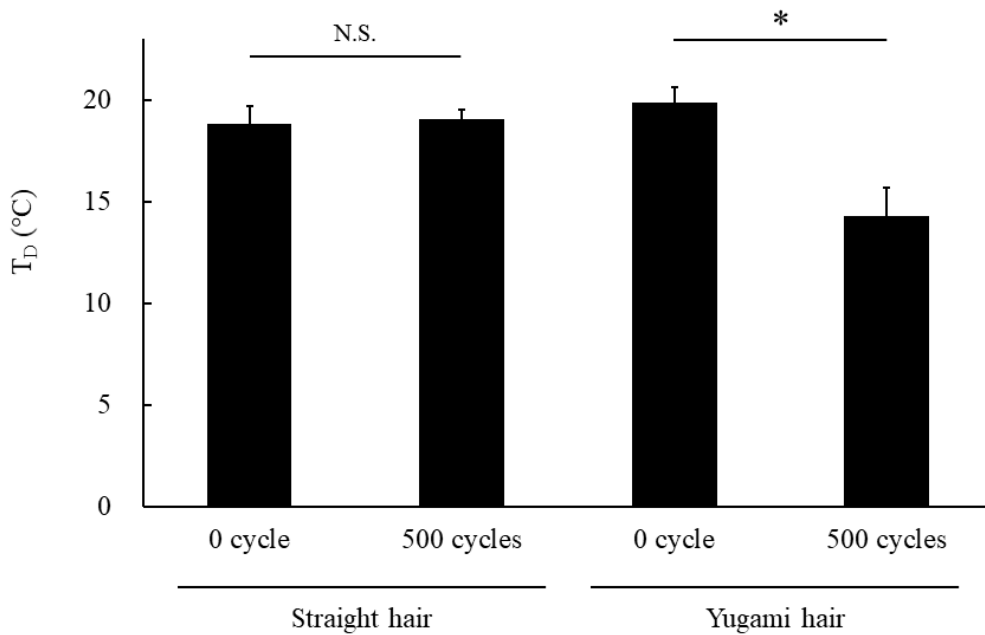


Figure 14 Denaturation temperature (T_D) of straight and yugami hair caused by cyclical extension measured by HPDSC (heating rate 10 °C / min, nitrogen draft of 60 mL / min. Data are shown as the mean \pm SE (n = 5). “N.S.” indicates not significant. * $p < 0.05$ vs. yugami hair before cyclical extension.

以上のことから、髪のかゆみに悩む方の行動調査より、日常的に繰り返し髪を引っ張る

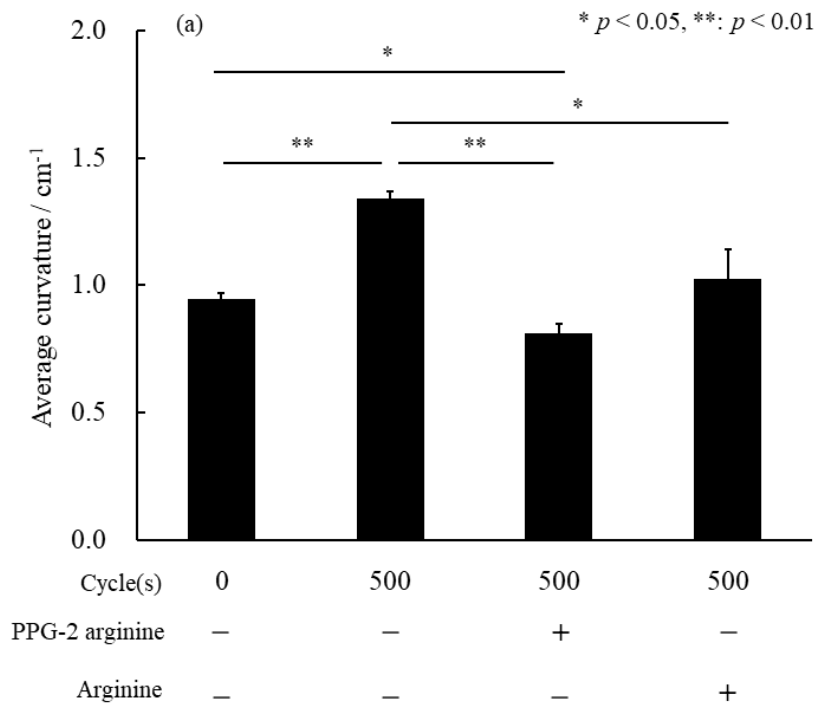
行為が髪の毛のまとまり感を低下させることを明らかにした。その髪の毛のまとまり感低下を定量的に測定したところ、ゆがみ毛は日常的に起こりうる荷重ストレスにて反復延伸を行うと、反復延伸前と比較して優位に増加することを見出した。また、その曲率増加の要因を前章で確立した毛髪内部の構造変化解析法を用いて検討した結果、反復延伸により毛髪内脂質の表面移行が起こり、さらに S-S 結合開裂によるスルホン酸の生成のあとに IF 内の α -ヘリックスの β 転移が発生した結果、IF 自体の構造安定性が低下したことが示唆された。ゆえに、毛髪内部の構造安定性の低下がゆがみ毛の曲率を増加させ、生活者の悩みにつながっていることが予想されたため、反復延伸によっても構造安定性を維持する成分で毛髪を予防・補修することができれば、ゆがみが増大しないと考えられた。そこで次に、有効成分を見出し、製品に応用することで化粧品産業への実質的な貢献を目指した検討を行った。

6.3.2 生活者のヘアケア行動に着目したゆがみ毛ケア技術の開発

前節では、反復延伸による毛髪内タンパク質の構造変化がゆがみ毛の曲率増加の一因となっている可能性を示した。毛髪内部を補修する成分として、アルギニンなどの塩基性アミノ酸の効果が報告されている[53]。本研究では、分子内にヒドロキシプロピル基を有し、アルギニンよりも毛髪へのなじみに優れる PPG-2 アルギニン(Figure 2)に着目し、ゆがみ毛におけるケア効果を検証した。

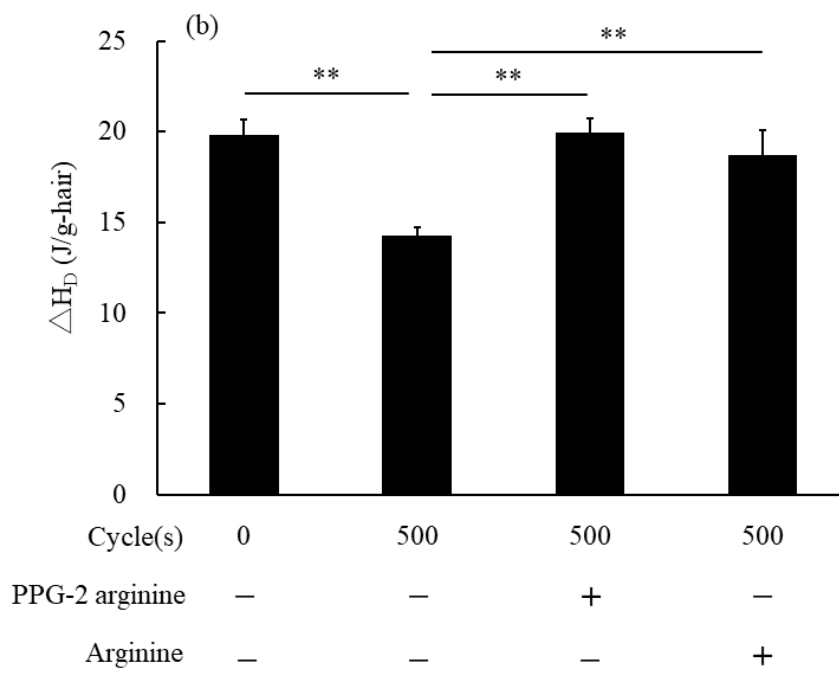
アルギニンおよび PPG-2 アルギニンについてそれぞれ 1.0%水溶液を作成し、それらの水溶液にゆがみ毛を 12 時間浸漬させた後、500 回の反復延伸前後における、曲率変化、 ΔH_D 、および引張強度を求めた。その結果、PPG-2 アルギニンは、反復延伸による曲率上昇を抑制する効果があることが明らかになった(Figure 15a)。一方でアルギニンではその効果が見られなかった。

n = 30



n = 5

** $p < 0.01$



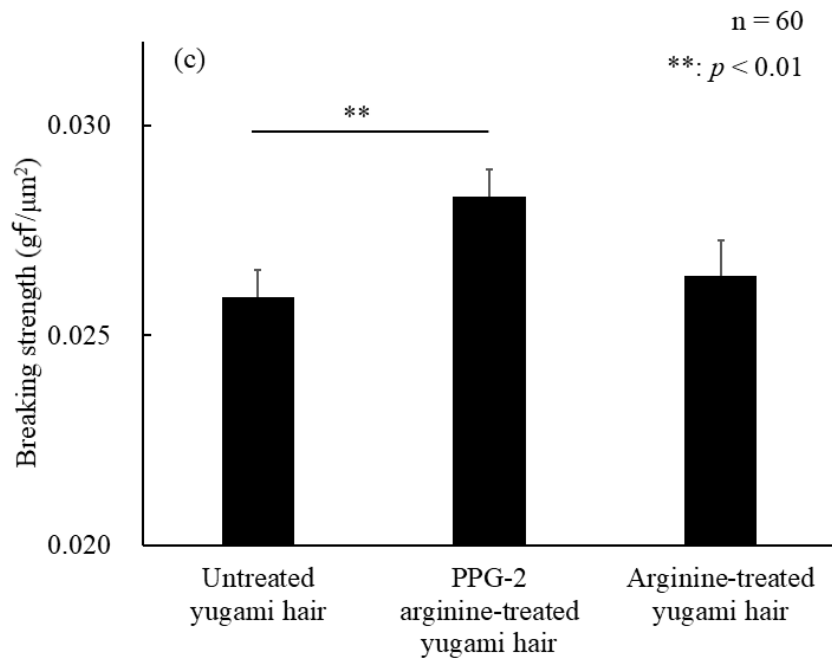


Figure 15 Effect of arginine and PPG-2 arginine treatment on yugami hair. (a) Average curvature changes of yugami hair caused by cyclical extension, (b) Denaturation enthalpy (ΔH_D) of yugami hair caused by cyclical extension, (c) breaking strength. Data are shown as the mean \pm SE.

上記抑制効果には、PPG-2 アルギニンが毛髪内部に浸透したことがひとつの要因であると考え、顕微 IR を用いて二次元イメージングを実施した。具体的には、PPG-2 アルギニン中のカーボイミン残基は 3340 cm^{-1} に特徴的なバンドが見られるため[39]、 3340 cm^{-1} の吸光度にて処理前後の IR スペクトルイメージングを取得した。その結果、PPG-2 アルギニンは毛髪内部、特にコルテックス層に多く浸透していることを確認した(Figure 16)。

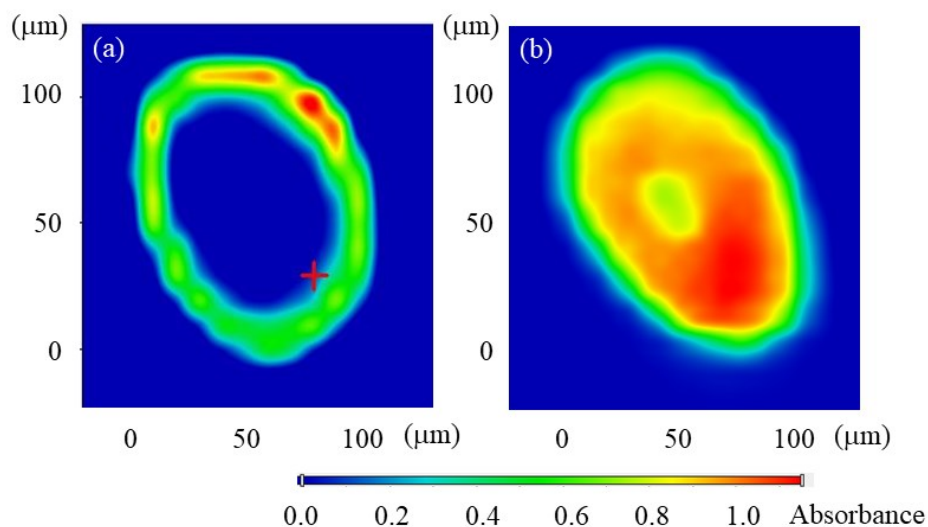


Figure 16 The IR imaging of the $-\text{C}=\text{NH}$ located at 3340 cm^{-1} in (a) untreated and (b) PPG-2 arginine-treated yugami hair under the condition of $25\text{ }^\circ\text{C}$ and humidity, 50%. In the figure, red indicates high absorbance, and blue indicates low absorbance.

さらに、HPDSC 測定の結果、吸熱ピークの低下も抑制させる効果が見られ、 ΔH_D の値は反復延伸前の 19.90 J/g-hair と同程度の 19.98 J/g-hair であった(Figure 15b)。さらに、引張強度は PPG-2 アルギニン処理により有意に上昇することが明らかとなった(Figure 15c)。先行研究において、グアニジル基は、例えばグルタミン酸やアスパラギン酸といった毛髪の酸性アミノ酸残基と相互作用することが報告されている[54]。PPG-2 アルギニンにも構造中にグアニジル基があることから、毛髪タンパク質中の酸性アミノ酸残基と相互作用することで、 ΔH_D 値の低下抑制、つまり IF の構造安定性の保持効果が発揮され、その結果として引っ張り強度の上昇につながったものと考えられる。

6.4 結論

本研究により、ゆがみ毛保有者における行動調査を実施して、反復延伸によるゆがみ毛の形状ならびに構造の変化を解析した結果、以下のことが明らかとなった。

- ① ゆがみ毛保有者のヘアケア行動は、髪を引っ張る(伸ばす)行為が最も多く、繰り返し髪を引っ張ることによってまとまりが低下することを実感していた。そしてこの実感は、繰り返しコーミング試験の結果とよく一致した。
- ② 日常にヘアケア行動で起こり得る荷重ストレスで反復延伸試験を行った結果、ゆがみ毛のみ有意に曲率が上昇した。この曲率上昇の一因として、毛髪内部タンパク質における構造変性、特に IF 構造の不安定化が示唆された。
- ③ PPG-2 アルギニンの反復延伸を利用したゆがみ低減効果を見出した。その作用機序として PPG-2 アルギニンが毛髪内部に浸透し、構造中のグアニジル基が毛髪内部タンパク質の酸性アミノ酸残基と相互作用して IF の構造安定性を保持し、引張強度を向上させたことによるものと推測された。

以上のように、ヘアケア現場で実際に起きている問題を精度よくシミュレートできるような評価手法の開発を用いて、その要因を解明することに成功した。毛髪化粧品業界への実質的な貢献を目指し、実際の商品開発や技術情報に結び付けることができた。今後も、ゆがみ毛保有者のヘアケア行動によって実際に起きている問題をさらに解析し、生活者の実感に合わせた髪のゆがみケア技術の開発を引き続き進めていきたい。

6.5 参考文献

1. M. P. Birch, J. F. Messenger, A. G. Messenger, *Br. J. Dermatol.*, 144, 297–304 (2001)
2. M. Tajima, C. Hamada, T. Arai, M. Miyazawa, R. Shibata, A. Ishino, *J. Dermatol. Sci.*, 45, 93–103 (2007)
3. S. Nagase, Y. Kajiura, A. Mamada, H. Abe, S. Shibuichi, N. Satoh, T. Itou, Y. Shinohara, Y. Amemiya, *J. Cosmet. Sci.*, 60, 637–648 (2009)
4. 稲益悟志, *化学工業日報*, 2013年12月11日, 7面
5. 稲益悟志, 森脇太郎, 池本夕佳, *日本化粧品技術者会誌*, 50, 209–217 (2016)

6. M.S. Robinson, B.J. Rigby, *Textile Res. J.*, 55, 597–600 (1985).
7. C. R. Robbins, R. Crawford, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 42, 59–67 (1991)
8. W. J. Simpson, *Textile Inst.*, 51T, 675 (1965)
9. P. Huck, C. Baddiel, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 22, 401–410 (1971)
10. E. T. Kubu, D. Montgomery, *Textile Res. J.*, 22, 778–782 (1952)
11. F. Hirsh, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 11, 26–31 (1960)
12. L. Rebenfeld, C. Dansizer, *Textile Res. J.*, 33, 458–465 (1963)
13. Y. K. Kamath, S. B. Hornby, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 35, 21–43 (1984)
14. M. Gamez–Garcia, *J. Cosmet. Sci.*, 49, 213–222 (1998)
15. A. Elliot, *Textile Res. J.*, 22, 783–786 (1952).
16. M. Feughelman, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 33, 385–406 (1982)
17. 伊藤隆司, 梶浦嘉夫, *表面技術*, 60(9), 575–578 (2009)
18. M. Fukuda, Y. Marubashi, T. Nawa, R. Ikuyama, *J. Cosmet. Sci.*, 69, 121–130 (2018)
19. 北野宏樹, *表面科学*, 29(7), 427–431 (2008)
20. T. Kojima, H. Kitano, M. Niwa, K. Saito, Y. Matsushita, K. Fukushima, *Surface and Interface Analysis*, 43, 562–565 (2011)
21. T. Kojima, H. Yamada, M. Isobe, T. Yamamoto, M. Takeuchi, D. Aoki, Y. Matsushita, K. Fukushima, *Skin Research and Technology*, 20, 416–421 (2014).
22. 太田裕子, 福増章夫, 西村優子, 中村邦雄, *繊維学会誌*, 52, 43–48 (1996)
23. F. J. Wortmann, C. Springob, G. Sendelbach, *J. Cosmet. Sci.*, 53, 219–228 (2002)
24. C. B. Baddiel, *J. Mol. Biol.*, 38, 181–199 (1968)
25. E. Hoting, M. Zimmermann, S. Hilterhaus–Bong, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 46, 85–99 (1995).
26. A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 1073–1101 (2007)
27. A. Kuzuhara, T. Hori, *Textile Res. J.*, 72, 285–289 (2002)
28. 葛原亜紀夫, *高分子論文集*, 69, 313–325 (2012)
29. J. H. Jiang, Y. Liang, Y. Ozaki, *Intell. Lab. Syst.*, 71, 1–12 (1995)
30. J. Toft, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 29, 189–212 (1995)
31. F. C. Sanchez, B. van de Borgaert, S. C. Rutan and D. L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 34, 139 (1996)
32. J. H. Jiang, Y. Ozaki, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 37, 321–345 (2002)
33. A. Savitzky, M. J. E. Golay, *Anal. Chem.*, 36, 1627 (1964)
34. R. J. Barnes, M. S. Dhanoa, S. J. Lister, *Appl. Spectrosc.*, 43, 772 (1989)
35. <https://sites.google.com/site/shigemorita/>
36. C. R. Robbins, *Chemical and physical behavior of human hair 4th ed.*, (Springer, NewYork, 2002), 445–543

37. N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy 3rd Edition*, (Academic Press, Massachusetts, 1990)
38. P. Pienpinijthama, C. Thammacharoen, S. Naranitad, S. Ekgasit, *Spectrochim. Acta Pt. A: Mol. Bio. Spectrosc.*, 197, 230 (2017)
39. H. Horiguchi, *Summary of infrared absorption pictures: the foundation and practice of organic structural chemistry* (Sankyo Shuppan, Tokyo, 1977)
40. C. Popescu, H. Hocker, *Chem. Soc. Rev.*, 36, 1282–1291 (2007)
41. H. Zahn, H. G. Gattner, *Formation and Structure of Human Hair*, P. Jollès, H. Zahn, H. Höcker, Eds., 1997, Birkhaeuser Verlag, Basel.
42. C. Schöneich, *Molecules*, 24, 4357 (2019)
43. S. Ratnapandian, S.B. Warner, Y.K. Kamath, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 49, 309 (1998)
44. C. R. Robbins, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 22, 339–348 (1971)
45. W. T. Astbury, A. Street, *General. Trans. Roy. Soc.* 230A, 75–101 (1931)
46. E. G. Bendit, *Nature*, 179, 535 (1957)
47. L. Kreplak, J. Doucet, P. Dumas, F. Briki, *Biophys. J.* 87, 640–647 (2004).
48. A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 1073–1101 (2007)
49. S. Kobayashi, K. Watanabe, K. Suzuta, H. Aoyama, L. Ito, *The IFSCC Congress 2020 Yokohama proceedings*, 196–205 (2020)
50. D. A. D. Parry, P. M. Steinert, *Q. Rev. Biophys.*, 32, 99–187, (1999).
51. N. R. Watts, L. N. Jones, N. Cheng, J. S. Wall, D. A. D. Parry, A. C. Steven, *J. Struct. Biol.*, 137, 109–118 (2002).
52. F. J. Wortmann, H. Deutz, *J. Appl. Polym. Sci.*, 48, 137–150 (1993)
53. 森部利江, 青野恵, 由木大, 廣島俊輔, 柿澤恭史, 小出操, *日本化粧品技術者会誌*, 50, 98–103 (2016)
54. E. Oshimura, H. Abe, R. Oota, *J. Cosmet. Sci.*, 58, 347–357 (2007).

第7章 総括

毛髪における諸問題は数多くあるが、本研究では特にヘアスタイリング行動の実際の現場にて生じている問題を解決するために、非破壊かつ微視的变化を評価できる顕微赤外分光法と MCR や 2DCOS といったケモメトリックスの手法を用いて、毛髪内部の構造変化を評価した。中赤外領域では軽水と重水のバンド域が異なることを利用して、外部からキューティクルへ浸透する水分を重水にすることで、リアルタイムかつ任意の部位における水分量がイメージングできる手法を開発した。その開発手法を用いてブリーチ処理毛の毛髪内部水分挙動を分析した結果、未処理毛と比較して水分浸透速度ならびに蒸散速度が速いことが明らかになった。これは、ブリーチ処理毛の持つ特有のパスつきや高湿度によるヘアスタイルの崩れやすさと一致しているものであった。

加齢にともない湿度変化による曲率の上昇が起こる、つまりくせうねりが強くなってしまいう問題があるが、この問題についても水分挙動評価を用いて解析することにした。40代、50代、および60代の毛髪を比較すると、加齢にともない水分浸透速度ならびに蒸散速度が速いことが明らかになり、中湿度から高湿度または中湿度から低湿度に毛髪的外部環境を変化させたときの平均曲率上昇の一因となることが示唆された。さらに、その加齢にともなう水分挙動の変化の要因は、毛髪内部の水分保持を担うコルテックス領域にあると考え、毛髪断面スペクトルを顕微 IR で得たのちに、MCR を用いて毛髪タンパク質の二次構造のイメージングを試みた。その結果、MCR によって毛髪横断面の 300~500 ピークセルにおけるそれぞれのケラチンタンパク質のアミド I 領域を迅速かつ半自動的に解析でき、イメージングする手法を開発することに成功した。この手法により、アミド I 領域における二次構造の成分スペクトルは全部で 8 成分あり、カーブフィッティングを用いた既報の分析結果と一致した。この手法を用いて、二次構造のモチーフのひとつである α -ヘリックス存在量の各年代におけるイメージングを実施したところ、加齢にともない、 α -ヘリックス存在量が低下していることが明らかとなった。この二次構造の変化は、加齢によるケラチンタンパク質のカルボニル化による一次構造の変性によるものであること、さらに α -ヘリックス存在量の低下が IF や IFAP の高次構造の不安定化に寄与していることが、蛍光染色やウェスタンブロットティングなどの生化学的手法や HPDSC の実験結果によって示唆された。

次に、ヘアスタイリングの現場にて生じている問題として、日常における髪の繰り返し引っ張り、いわゆる反復延伸行為に着目した。ブリーチ処理などで損傷を受けた毛髪は、反復延伸で切れてしまうことがあり、生活者の悩みにつながっている。この反復延伸による切れ毛を予防するために、顕微 ATR と、分光学的手法である MCR ならびに 2DCOS を活用して、毛髪内部構造を解析する方法を開発した。その方法を用いてブリーチ処理毛の解析を行った結果、反復延伸により CH_2 と C=O の信号強度が反復延伸前と比較して同時かつ有意に上昇し、そのあとに SO_3H が有意に上昇することが明らかとなり、毛髪が破断するまでの構造変化を初めて捉えることに成功した。 CH_2 と C=O の信号強度上昇は毛髪脂質のワックスエステルなどが反復延伸により内部から表面に移行したことによると推測され、 SO_3H の信号強度の上昇は毛髪内部ケラチンタンパク質におけるジスルフィド結合の開裂によると考えられた。さらに 2DCOS を用いて反復延伸によるジスルフィド結合の開裂パターンを評価した結果、 $-\text{SOS}-$ や $-\text{SO}_2\text{S}-$ が先に生成された後に SO_3H が生成されたことがわかり、ブリーチ処理によって起こる S-S 開裂パターンと類似した挙動であることが明らかとなった。

開発した上記解析手法を用いて、加齢にともない増えてくる、うねり/くせが出て扱いにくい髪、いわゆるゆがみ毛についても解析を試みた。同一人から採取した直毛とゆがみ毛を反復延伸すると、ゆがみ毛のみが反復延伸前後で有意な曲率が起こっていた。この現象の要因を解析した結果、ブリーチ処理毛の破断と類似した、 CH_2 と C=O の信号強度上昇とそのあとの SO_3H の信号強度の有意な上昇が明らかとなった。さらに2DCOSで構造解析を行うと、ジスルフィド結合の開裂にともなう SO_3H の生成のあとに、二次構造のモチーフのひとつである β シートの増加が起こっていることを見出した。 β シートの増加はタンパク質の局所的な凝集が起こっていると推測され、HPDSCでもIFやIFAPの不安定化を裏付ける結果を得ることができた。

本研究の内容は、いずれもヘアスタイリング行動の実際の現場にて生じている問題であり、生活者悩みの解明ならびにそのソリューション開発に対応するものである。また、毛髪のIRスペクトルとMCRと2DCOSなどの分光学的手法を組み合わせることは、複雑な構造を持ち、様々構成成分によって成る毛髪の解析方法のひとつとして非常に有効であると考えられた。本研究成果は、従来技術では分かり得なかった事実であり、実際に現場で起こっている諸問題を良くシミュレートしたものであるため、毛髪科学における重要な知見となるものと考えられる。研究の結果、得られた知見はすべて商品開発等にフィードバックするとともに、論文発表や新聞への掲載、特許出願も行った。本研究のような、現実に起こっている問題を良くシミュレートした実験果から毛髪化粧品の開発を進めることで、高性能で満足度の高いヘアケア商品が実現し、人々の生活の質の向上に貢献できると期待している。

第 8 章 本研究の投稿論文、発表実績、および受賞

1. 本学位論文に関わる原著論文

N. Fuse, M. Matsui and Y. Matsue, *Analytical Sciences*, 2022, 38, 601–605.

Title: Temporal and spatial visualization of water uptake into human hair studied by infrared microscopy.

N. Fuse, M. Isobe, M. Matsui and Y. Matsue, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists of Japan*, 2022, 56, 239–246.

Title: Age-Related Carbonylation of Hair Causes Irregular Shapes.

N. Fuse, Y. Matsue and S. Morita, *Analytical Sciences*, 2023, 39, 229–234.

Title: Prediction of breakage in human hair caused by cyclical extension using infrared spectroscopy coupled with multivariate curve resolution.

N. Fuse, S. Morita and Y. Matsue, *International Journal of Cosmetic Science*, 2023, in press.

Title: Age-related hair denaturation related to Protein Carbonyls

布施直也, 榎本可奈子, 生山玲奈, 森田成昭, 松江由香子, *日本化粧品技術者会誌*, 2023, in press.

Title: 反復延伸によるゆがみ毛の形状変化ならびにそのケア方法の開発

2. その他の原著論文

M. Ueda-Wakagi, R. Mukai, N. Fuse, Y. Mizushima and H. Ashida, *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 16288–16299.

Title: 3-*O*-Acyl-epicatechins Increase Glucose Uptake Activity and GLUT4 Translocation through Activation of PI3K Signaling in Skeletal Muscle Cells

布施直也, 松井正, *日本化粧品技術者会誌*, 2019, 53(4), 278–286.

Title: キューティクルのバイメタル性コントロールによるヘアケア技術開発

3. 解説, 他

布施直也, 磯辺真人, 松江由香子, *毛髪科学* 129, 21–24 (2022)

Title: 加齢にともなう毛髪のカルボニル化と還元アミノ化反応を用いた毛髪改質技術

布施直也, 松江由香子, フレグランスジャーナル, 50(11), 24–29 (2022)

Title: 顕微 IR を用いた毛髪内部への水分浸透可視化技術の開発とその応用

4. 学会発表

布施直也, 松井正, 日本化学会第 97 春季年会, 口頭 (神奈川, 2017)

Title: 顕微 FT-IR を用いた毛髪内水分浸透可視化

布施直也, 松井正, 松江由香子, 平成 30 年度繊維学会秋季研究発表会, ポスター (福井, 2018)

Title: 顕微 FT-IR を用いた毛髪内部の水分挙動可視化

布施直也, 松井正, 松江由香子, 第 85 回 SCCJ 研究討論会, 口頭 (東京, 2019)

Title: カルボニル化による水分保持能低下が髪の老け見えに影響する

N. Fuse, M. Isobe, M. Matsui, Y. Matsue, The 31st IFSCC Congress, Podium (Yokohama, 2020)

Title: Age-related carbonylation of hair causes irregular shape

布施直也, 松江由香子, 森田成昭, 第 81 回分析化学討論会, 口頭 (web, 2021)

Title: 反復延伸行為による毛髪内部の構造変化解析

磯辺真人, 布施直也, 松江由香子, 第 73 回日本生物工学会大会, 口頭 (web, 2021)

Title: カルボニル化した加齢毛髪タンパク質の修復方法の開発

布施直也, 磯辺真人, 松江由香子, 第 12 回毛髪科学研究発表会, 口頭 (web, 2022)

Title: 加齢にともなう毛髪のカルボニル化と還元アミノ化を用いた毛髪改質技術

布施直也, 森田成昭, 松江由香子, 第 47 回日本化粧品学会, 口頭 (東京, 2022)

Title: 加齢にともなうタンパク質のカルボニル化と毛髪内部の構造変性

布施直也, 森田成昭, 松江由香子, 第 27 回高分子分析討論会, 口頭 (愛知, 2022)

Title: 加齢にともなうタンパク質のカルボニル化と毛髪内部の構造変性

布施直也, 榎本可奈子, 生山玲奈, 森田成昭, 松江由香子, 第 89 回 SCCJ 研究討論会, 口頭 (東京, 2022)

Title: 反復延伸によるゆがみ毛の形状および構造の変化について

布施直也, 松江由香子, 第 83 回分析化学討論会, 口頭 (富山, 2023)

Title: 多検体ガス吸着量装置を用いた毛髪表面状態や水分吸着に関する研究

磯辺真人, 布施直也, 松江由香子, 令和 4 年度繊維学会年会, ポスター (東京, 2023)

Title: 窒素同位体を用いた質量分析によるタンパク質化学修飾の確認方法

N. Fuse N, Y. Matsue, S. Morita, 2DCOS–XII, Poster (web, 2023)

Title: Changes in internal structure of age related curved hair caused by cyclical extension studied by 2D IR correlation spectroscopy

5. 特許

松井正, 布施直也, 特許第 6802458 号

発明の名称: 毛髪の水分浸透測定方法

松井正, 布施直也, 特許第 6913944 号

発明の名称: 毛髪タンパク質の水との相互作用測定方法

松井正, 布施直也, 特許第 7058857 号

発明の名称: 毛髪タンパク質の水との相互作用測定方法

布施直也, 磯辺真人, 松井正, 松江由香子, 特願 2021–031412

発明の名称: 毛髪のカルボニル化タンパク低減剤

布施直也, 森田成昭, 特願 2021–165033

発明の名称: 毛髪の評価方法、及び毛髪化粧品又は毛髪処理剤の評価方法

布施直也, 榎本可奈子, 鈴木徳宏, 特願 2022–186301

発明の名称: 毛髪の反復延伸による曲率増加の抑制剤

榎本可奈子, 鈴木徳宏, 布施直也, 特願 2023-064098

発明の名称: 毛髪化粧品

鈴木徳宏, 榎本可奈子, 布施直也, 特願 2023-064099

発明の名称: 毛髪化粧品

6. 受賞

Analytical Sciences Hot Article Award in 2022

謝辞

本研究は大阪電気通信大学工学部基礎理工学科 森田研究室、およびクラシエ株式会社 ホームプロダクツカンパニー ビューティケア研究所において行われました。この研究を行うにあたり、多くの方々にご指導、ご助力を賜りました。この場を借りまして感謝の意を表します。

森田成昭教授には、セミナーにて私が直接アポイントを取った際に快く迎え入れていただき、指導教官として終始懇切なご指導ご鞭撻を賜りました。ここに深謝の意を表します。また、研究に関することだけでなく、学会発表の仕方や論文の査読結果に対する対応など、私自身が困っていた時に親身に相談に乗っていただき多くのご助言をいただき、大変嬉しく思っています。同工学部環境科学科教授 齊藤 安貴子先生、ならびに同工学部環境科学科教授 湯口宜明先生には副査としてご助言を戴くとともに、本論文の細部にわたりご指導をいただきました。ここに感謝申し上げます。

また、森田研究室の皆様には、常に温かく迎えていただき、研究以外のことも話し合うことができ刺激を受けることができました。心から感謝しております。

そして、本研究を実施するにあたり、関西学院大学 尾崎幸洋名誉教授、デラウェア大学 野田勇夫教授には、暖かいご指導、勇気づけのお言葉を賜りまして、厚く御礼申し上げます。

クラシエ(株)の松井正さんには、私が赤外分光を始めるきっかけを与えていただきました。また試行錯誤の日々に付き合ってください、一企業人として研究活動のありかたなど、基礎研究のいろはを教えてくださいました。同じく、クラシエ(株)の松江由香子さんには毛髪的基础研究を行う環境を整えていただき、研究成果を共に喜び合うことができ、さらに多くのご助言をいただきました。

そして大学時代の恩師である、兵庫県立大学 辻啓介名誉教授、そして神戸大学 芦田均教授には、学生時代から公私ともに厳しくも暖かい指導をいただき、研究者を目指す道筋を立てていただけたことを本当に感謝しております。

最後に、私を暖かく見守り、背中を押し続けてくれた妻、大きな励ましの声で応援してくれたふたりの娘に感謝の意を表します。