

(別紙様式 14)

2013年8月 25日

論文の内容の要約

氏名	津田 祐一
学位の種類	博士（農学）
学府又は研究科・専攻	連合農学研究科 応用生命科学専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文名	水鳥羽毛ケラチンの特性解析とその有効利用に関する研究

【論文の内容の要約】

（分量の制限はありません。課題設定、方法論、実験・解析、結論・考察など、当該論文の全体がわかる形で作成のこと）

水鳥羽毛ケラチンの特性解析とその有効
利用に関する研究

2013. 9

津田 祐一

目 次

要旨	1
1 編 羽毛由来加水分解ケラチンの繊維改質剤としての特性解析	4
1.1 緒言	4
1.2 試料および実験方法	4
1.2.1 試料	4
1.2.2 羽毛ケラチン加水分解物（羽毛分解物）の調製法	5
1.2.3 アミノ酸分析法	5
1.2.4 分子量分析法	6
1.2.5 ATR-FTIR 分析法	6
1.2.6 試験毛髪 の 作製法	7
1.2.7 毛髪撥水性評価法	7
1.2.8 引っ張り強度測定法	7
1.2.9 毛髪浸透性評価法	7
1.2.10 統計処理	8
1.3 結果および考察	8
1.3.1 アミノ酸分析	8
1.3.2 分子量分析	10
1.3.3 ATR-FTIR スペクトル分析	10
1.3.4 羽毛および羊毛分解物の毛髪表面撥水性への影響	12
1.3.5 羽毛および羊毛分解物の毛髪引っ張り強度への影響	13
1.3.6 羽毛および羊毛分解物の毛髪繊維への浸透性	13
1.4 小活	15
2 編 パーマネントウェーブ形成における主要な毛髪構成成分の変化と羽毛由来加水分解ケラチンの効果	16
2.1 緒言	16

2.2	試料および実験方法	18
2.2.1	試料	18
2.2.2	毛髪成分分画法	18
2.2.3	電子顕微鏡観察法	20
2.2.4	リング形成処理法	20
2.2.5	ブリーチ毛髪作製法	20
2.2.6	ウェーブ特性評価法	20
2.2.7	アミノ酸分析法	21
2.2.8	チオール基定量法	22
2.2.9	毛髪物性測定法	22
2.2.10	統計処理	22
2.3	結果および考察	23
2.3.1	毛髪成分の抽出量	23
2.3.2	毛髪外観変化	23
2.3.3	リング形成力	25
2.3.4	パーマネントウェーブにおける羽毛分解物の影響	26
2.4	小活	34
	引用文献	35
	謝辞	41

要旨

ケラチンは、角質組織（表皮、毛髪、爪、羊毛、羽毛、角、爪、蹄、鱗）を構成する主要な繊維状タンパク質である。ケラチンを含む組織は、哺乳類、爬虫類、鳥類に見られる。ケラチンの主な役割は、環境要因からのバリア機能である。ケラチン素材は、羊毛および羽毛が衣料や寝具素材として利用されている他は産業的に利用されていない。ケラチン素材をタンパク質として応用するためには、可溶化する必要がある。そのため、様々な可溶化技術が開発されている。しかし、産業的に実用化されている可溶化ケラチンは少ない。

羽毛は、鳥の全体重の 10%を占める組織であり、90%以上がタンパク質で構成されている。羽毛は、食肉加工の副産物として産生され、世界中から年間数百万トン産生されると推測される。この羽毛は、一部が高温蒸気分解して肥料または家畜飼料として利用されているが、大部分は廃棄処分されている。廃羽毛の処理方法は焼却処分であり、埋め立て廃棄することも行われている。焼却は空気汚染を引き起こし、埋め立ては分解が遅く、広大な土地が必要となる。そのため、世界中で産出される廃羽毛を生物資源とし、有効に利用する事が望まれる。

そこで本研究では、羽毛ケラチン加水分解物（羽毛分解物）の特性解析を行い、羽毛分解物の特徴を羊毛分解物と比較することで明らかにし、産業的な利用用途について検討した。次に、化粧品原料としての利用について羽毛分解物の効果を検証した。さらに、毛髪カラーリングおよびパーマネントウェーブ処理における羽毛分解物の効果について明らかにした。最後に、羽毛分解物の有効利用を推進するにあたり、大量に、かつ安価に生産・供給可能な羽毛酸化分解物の製造方法を開発した。得られた結果の概要を以下にまとめる。

第1章、第1節では、羽毛分解物と市販されている羊毛分解物の特性比較を行った。その結果、羽毛分解物には疎水性アミノ酸が多く含まれ、加水分解により、原料素材のケラチン分子より低分子化していた。FTIR 分析において、アミド I 領域の吸収ピークより、ケラチンの二次構造は保持されているのが明らかになった。羽毛分解物の人毛繊維および羊毛繊維への補修効果については、損傷毛髪を羽毛分解物で処理することで、毛髪表面の疎水性を改善し、損傷毛

髪強度を増加させた。羊毛繊維においては、羽毛分解物で処理することにより、羊毛繊維の櫛通り性を高め、弾力性、滑り性、磨耗からの耐久性を改善した。よって、人毛および羊毛などの繊維の改質剤としての利用が可能であることが明らかとなった。

第2節では、羽毛分解物の毛髪用化粧品原料としての利用について検証した。その結果、羽毛分解物は、ブリーチによる毛髪構造劣化を抑制し、損傷を予防する効果を示した。さらに、ブリーチにより損傷した毛髪に対して、毛髪表面の滑らかさ、強度および保持水分量を改善し、損傷を補修する効果があることも明らかとなった。また、羽毛分解物で毛髪を処理することで、毛髪カラーリング、パーマントウェーブといった毛髪化学処理の効果が高まることも明らかとなった。羽毛分解物は、医薬部外品原料規格にも適合しており、毛髪用化粧品原料として有用な素材となり得る事を明らかにした。

第3節では、羽毛分解物が毛髪カラーリングの効果を高める作用機構において、羽毛分解物中に含まれるアミノ基およびカルボキシル基の影響について検討した。その結果、酸化染料存在下で、羽毛分解物中のアミノ基およびカルボキシル基は、染色性に関与しておらず、酸化による毛髪構造変化を抑制することで染色性を高めていると推測された。酸性染料および塩基性染料存在下では、羽毛分解物中のアミノ基およびカルボキシル基量を調整することで、染色性を高める事ができる可能性が示唆された。

第4節では、チオグリコール酸を用いたパーマントウェーブ形成において、ウェーブセットに関与する毛髪構成成分を明らかにすると共に、羽毛分解物を用いて、ブリーチ処理を繰り返した毛髪においてウェーブ形成力が回復するメカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、毛髪構成成分であるキューティクル、マトリックスおよびマイクロフィブリルにおいては、マイクロフィブリルが必須の毛髪構成成分であることを明らかとした。また、羽毛分解物処理によりウェーブ形成力が回復するのは、パーマントウェーブ処理による毛髪の損傷を抑制し、ウェーブ形成能を保持させることで起きていることを明らかにした。

第2章では、経済的かつ環境に配慮した羽毛分解物の製造方法を開発する目的で、酸化法を用いた羽毛の可溶化方法を検討した。その結果、羽毛を過酸化水素お

よびアンモニアで可溶化できた。その可溶化法は、前処理としての羽毛の粉碎、可溶化のための加圧および精製のための特殊な設備を必要とせず、簡便かつ短時間（2日間）で高純度の羽毛酸化分解物を得ることが可能となった。得られた羽毛酸化分解物の平均分子量や純度をコントロールすることも可能であり、用途に適した分子量を持つ羽毛酸化分解物を選択的に製造することを可能とした。これらのことから、羽毛酸化分解法は、コストおよび環境面から優位性が高く、大規模な処理も可能なため、大量かつ安価に生産可能な羽毛の可溶化法である事が明らかとなった。

以上のことより、羽毛分解物は繊維の改質剤、特に毛髪用化粧品原料として利用可能である事が明らかとなった。また、大量かつ安価に生産可能な羽毛の可溶化法を開発することができたことは、今後の羽毛分解物の利用および用途の拡大をもたらすと考えられる。廃羽毛を生物資源として有効に利用するための一助となる事を願っている。

1 編 羽毛由来加水分解ケラチンの繊維改質剤としての特性解析

1.1 緒言

廃羽毛は年間数百万トンになると推測され、環境問題となっている。そのため、世界中で産出される廃羽毛を生物資源とし、有効にリサイクルする事が望まれている。

廃羽毛の有効利用に関して様々な利用法が報告されている。例えば、家畜飼料としての利用【Onifade, 1998; Gupta, 2006】やフィルム【Schrooyen, 2000; Moore, 2006】、肥料【Cao, 2011】、生分解性ポリマー【Barone, 2006A and B; Ullah, 2011】、木材の補強剤【Endo, 2004 and 2010】などが挙げられる。しかし、家畜飼料としての利用以外には商業的に使用されていない。一方、羽毛ケラチンと比較して、羊毛ケラチンの利用についての報告は多くなされている。特に、バイオメディカルや化粧品への利用に関する報告が多く見受けられる。例えば、Rouseらはケラチンをベースとしたバイオマテリアルの医療への応用について総説をまとめている【Rouse, 2010】。また、Barbaらは羊毛タンパク、ペプチドのハンドケア、ヘアケア材料としての効果について【Barba, 2007, 2010A, B and C】、Lanzilottaらは羊毛ケラチンの毛髪保護効果について【Lanzilotta, 2007】、Fernandesらはキューティクルケラチンペプチドを合成し、化粧品原料として評価を行っている【Fernandes, 2012】。

廃羽毛の有効利用法を開発する上で、羽毛ケラチンの性質を知ることは重要である。本研究室では羽毛の可溶化法を開発し、特許を出願している【野村, 2006】。そこで、この可溶化法により分解させた羽毛ケラチン加水分解物（羽毛分解物）を、市販されている羊毛ケラチン加水分解物（羊毛分解物）と比較することにより、羽毛分解物の特性を明らかにすることを目的とした。また、人毛繊維を用いて羽毛分解物の評価を行った。

1.2 試料および実験方法

1.2.1 試料

水鳥羽毛および羊毛は東洋羽毛工業㈱より提供された。羊毛ケラチン加水分解物（羊毛分解物）は㈱成和化成社製のプロモイス WK を用いた。毛髪試料には㈱ビューラックス社製の人毛（黒髪 100%）を用いた。その他の薬品は和光

純薬工業より購入した。

1.2.2 羽毛ケラチン加水分解物（羽毛分解物）の調製法

野村らの方法【野村, 2006】に準じ、羽毛分解物を調製した。水鳥羽毛を 10g/L の水酸化ナトリウム溶液を用いて 120℃で 10 分間オートクレーブを行うことで分解させた。羽毛と水酸化ナトリウム溶液の重量比は 1 : 10 で行った。分解液を 6M 塩酸で中和し、遠心分離して未分解物を除去後、蒸留水に対して透析を行った。透析による脱塩の後、凍結乾燥し、羽毛分解物を調製した。

1.2.3 アミノ酸分析法

Sato らの方法に準じ、アミノ酸分析を行った【Sato, 1992】。各試料を減圧下、6M 塩酸を用いて、110℃、18 時間塩酸加水分解を行った。塩酸加水分解後、塩酸を揮発させた後、蒸留水に再溶解させたものをサンプルとした。標準液としてアミノ酸混合標準液 H 型にプロリンおよびヒドロキシプロリンを 5.0μmol/ml、ヒドロキシリジンおよびシステイン酸を 2.5μmol/ml となるように添加したものを調製した。サンプルおよび標準液を試験管（マルエム社製；ダーラム管）に入れ、真空乾固させた。アルカリ処理液（メタノール：トリエチルアミン：水=7：2：1）を試験管に注入し、真空乾固させ、アルカリ処理液を入れた際に白煙が生じなくなるまでこの操作を繰り返した。さらに誘導液（メタノール：トリエチルアミン：水：フェニルイソチオシアネート=7：1：1：1）を注入し、密封して室温で 20 分間反応させることにより、サンプル中のアミノ酸を標識した。反応終了後、2 時間真空乾固し、溶離液 A（3%アセトニトリル、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0）を適当量添加し、超音波により結晶を破碎した。0.45μm フィルターでろ過し、ろ液を 4℃、8,000×g、3 分間遠心分離し、不溶物を除去した。この溶液を HPLC で分析した。

HPLC 条件

カラム：TSKgel ODS-80TsQA

溶離液 A：3%アセトニトリル、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)

溶離液 B：60%アセトニトリル

グラジエント条件：0min(B 0%),15min(B 70%),25min(B 100%),26min(B 100%),27min(B 0%)

流速：1.0ml/min

カラム温度：40℃

UV 検出条件：254nm

ポンプ：TOSOH DP-8020

オートサンプラー：TOSOH AS-8020

カラムオーブン：TOSOH CO-8020

UV 検出器：TOSOH UV-8020

デガッサー：TOSOH SD-8022

1.2.4 分子量分析法

ケラチン分解物の平均分子量を測定するため、ゲルろ過を行った。試験条件は以下の通り行った。

カラム：昭和電工社製、AsahipakGF-1G 7B、AsahipakGF-510HQ、AsahipakGF-310HQ

移動相：45%アセトニトリル、55%水、0.1%トリフルオロ酢酸

流速：0.5ml/min

カラム温度：40℃

UV 検出条件：215nm

ポンプ：TOSOH DP-8020

オートサンプラー：TOSOH AS-8020

カラムオーブン：TOSOH CO-8020

UV 検出器：TOSOH UV-8020

デガッサー：TOSOH SD-8022

標準試料：カタラーゼ (M_w230,000)、アルドラーゼ (M_w158,000)、ウシ血清アルブミン (M_w68,000)、オボアルブミン (M_w45,000)、キモトリプシノーゲン A (M_w25,000)、シトクロム C (M_w12,500)、インシュリン (M_w5,808)、バシトラシン (M_w1,400)、グリシルーグリシルーグリシルーグリシルーグリシルーグリシン (M_w360.3)、グリシループロリル-アラニン (M_w243)、フェニルアラニン (M_w165)

平均分子量の測定は、付属の計算ソフト(マルチステーション GPC-8020 ver 7.03)を用いて、標準物質から算出した検量線より求めた。

1.2.5 ATR-FTIR 分析法

羽毛および羽毛分解物の ATR-FTIR スペクトルを Universal ATR Sampling Accessory を付属したパーキンエルマー社製、PerkinElmer Spectrum One FTIR spectrophotometer を用いて記録した。積算回数 16 回、分解能 4cm^{-1} 、 $4000\sim 400\text{cm}^{-1}$ の条件で行った。

1.2.6 試験毛髪を作製法

毛束を 2%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液に 5 分浸漬し、流水ですすぎを行うことで汚れを落とした後、自然乾燥させて未処理毛髪を作製した。この未処理毛髪をブリーチ液（3.6%過酸化水素、0.9%アンモニア含む）に 40°C で 30 分間浸漬し、流水ですすぎを行った後、自然乾燥させて損傷毛髪を作製した。この損傷毛髪を 5%羽毛分解物または羊毛分解物水溶液に 40°C で 10 分間浸漬し、流水で 30 秒間すすいだ後、自然乾燥させて羽毛分解物および羊毛分解物処理毛髪を作製した。毛髪はすべて温度 25°C 、湿度 50%の恒温恒湿室で保管した。

1.2.7 毛髪撥水性評価法

毛髪撥水性の評価は Nishida らの方法を参考にして行った【Nishida, 2004】。毛髪を 10mm の長さに切断し、スライドガラス上に置いた。この毛髪片に純水 $0.5\mu\text{l}$ を慎重に滴下し、直ぐに光学顕微鏡にて毛髪片と水滴との接触角を測定した。

1.2.8 引っ張り強度測定法

毛髪引っ張り強度は、島津製作所製 EZ-test EZ-S を用いて測定した。直径 $70\mu\text{m}$ の毛髪を選定し、測定に使用した。10mm/sec の速度で毛髪に対して縦軸方向に引っ張り、破断点を記録した。温度 25°C 、湿度 50%の条件下で行った。

1.2.9 毛髪浸透性評価法

Kuzuhara の方法に準じ、羽毛および羊毛分解物の毛髪への浸透性を評価した【Kuzuhara, 2011】。毛髪を包埋剤（サクラファインテックジャパン(株)社製；Tissue-Tek O.C.T. 4583 compound）を用いて -20°C にて包埋し、凍結ブロックを作成した。この凍結ブロックからミクロトーム（Leica Microsystems 社製；Leica CM3050S）を用いて横軸方向に $10\mu\text{m}$ 厚の切片を切り出し、スライドガラスに貼付し、自然乾燥させた。この凍結切片に 0.001%メチレンブルー溶液を適量滴下し、室温で 5 分間染色した。染色された毛髪切片を光学顕微鏡にて観察を行った。

1.2.10 統計処理

エクセル統計ソフト Statcel 2 により統計処理を行った。すべてのパラメータは、Tukey-Kramer（危険率 5 または 1%）により、統計処理を行った。データは、平均値±標準偏差で示した。

1.3 結果および考察

1.3.1 アミノ酸分析

羽毛、羊毛、羽毛分解物及び羊毛分解物のアミノ酸組成を Table 1 に示した。原料素材である羽毛、羊毛の比較では、リシン、ヒスチジンが羊毛に多く含まれ、グリシン、プロリンが羽毛に多く含まれている他は大きな差は見られなかった。原料素材と加水分解物の比較では、羽毛はスレオニン、リシン、システイン、メチオニンが加水分解により大きく低下していた。羊毛はシステイン、メチオニンが大きく低下していた。羽毛、羊毛共にシステイン酸のみ加水分解により大きく増加していた。ケラチン組織中のシステインは可溶化過程で減少し、システイン酸が増加する傾向にあることが報告されている【Goddard, 1934; Nagai, 1970】。そのため、加水分解により、羽毛分解物、羊毛分解物共にシステインが減少し、システイン酸が増加したと考えられた。加水分解物同士の比較では、原料素材の違いを反映している他は、羽毛分解物中のスレオニン、システインが羊毛分解物よりも少なかった。全体的に加水分解によりアミノ酸組成が大きく変化していなかったため、加水分解によるアミノ酸組成への影響は少ないと考えられた。しかし、親水性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン、チロシン、リシン、アルギニン）、疎水性アミノ酸（メチオニン、アラニン、バリン、プロリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン）およびその他のアミノ酸（ヒスチジン、グリシン、システイン、システイン酸）に大別すると、加水分解の影響が若干見られた。羽毛においては、原料素材では親水性アミノ酸が 39.2%、疎水性アミノ酸が 39.6%であるのに対し、羽毛分解物では親水性アミノ酸が 35.5%、疎水性アミノ酸が 44.2%であった。羊毛においては、原料素材では親水性アミノ酸が 47.4%、疎水性アミノ酸が 33.8%であるのに対し、羊毛分解物では親水性アミノ酸が 51.6%、疎水性アミノ酸が 32%であった。加水分解により、羽毛では疎水性アミノ酸含有率

が高まり、羊毛では親水性アミノ酸含有率が高まっていた。また、羽毛分解物は羊毛分解物よりも疎水性アミノ酸の含有率が高く、疎水性が高いことが示唆された。

Table 1 羽毛、羊毛およびその分解物のアミノ酸組成(%)

	Feather	Wool	Feather hydrolysate	Wool hydrolysate
Aspartic acid	5.9	5.3	8.0	6.9
Glutamic acid	6.3	10.3	9.4	13.3
Serine	13.5	10.8	10.8	12.1
Threonine	5.7	7.9	1.7	8.8
Tyrosine	3.0	3.4	2.3	2.1
Lysine	0.9	3.2	0.4	2.8
Arginine	3.9	6.5	2.9	5.6
Histidine	0.3	0.8	0.2	0.8
Glycine	13.2	7.9	18.2	10.5
Half-cystine	7.5	9.9	1.3	4.2
Cysteic acid	0.3	0.4	0.6	0.9
Methionine	2.0	2.8	1.3	1.2
Alanine	4.4	4.4	7.1	6.3
Valine	7.4	6.1	8.4	5.3
Proline	11.3	6.6	12.7	7.2
Isoleucine	4.2	3.5	3.7	2.6
Leucine	7.1	7.6	8.3	7.7
Phenylalanine	3.2	2.8	2.7	1.7
total	100.1	100.2	100.0	100.0

ている【Zoccola, 2009; Cardamone, 2010; Tsobkallo, 2012】。羽毛ケラチンには β シートが多く含まれ、羊毛ケラチンには α ヘリックスが多く含まれる。アミド I 領域における羽毛および羊毛分解物の最大吸収はそれぞれ 1637 cm^{-1} 、 1648 cm^{-1} であった。二次構造に変化が起きると、吸収ピークがシフトする事が報告されている【Ullah, 2011】。羽毛分解物の最大吸収は β シートに帰属する範囲に近く、羊毛分解物の最大吸収は α ヘリックスに帰属する範囲に近い。これは、加水分解の過程により、部分的に二次構造が破壊されたため、羽毛分解物では β シートの含有率、羊毛分解物では α ヘリックスの含有率が減少したことを示している。しかし、それぞれの最大吸収が β シートまたは α ヘリックスに帰属する範囲に近い値を示しているため、羽毛ケラチンおよび羊毛ケラチンの二次構造が完全に破壊されていないことが示唆された。Cardamon はタイトに水素結合が形成される立体的な α ヘリックスと平面的な β シート構造の形状の違いから、ケラチンの α ヘリックス含有率が減少し、 β シート含有率が高まるにつれ、ケラチン分子の柔軟性が高まると推測している【Cardamone, 2010】。このことから、 β シートが多く含まれる羽毛分解物は、羊毛分解物よりも高い柔軟性を示す分子構造を持っている事が推測された。

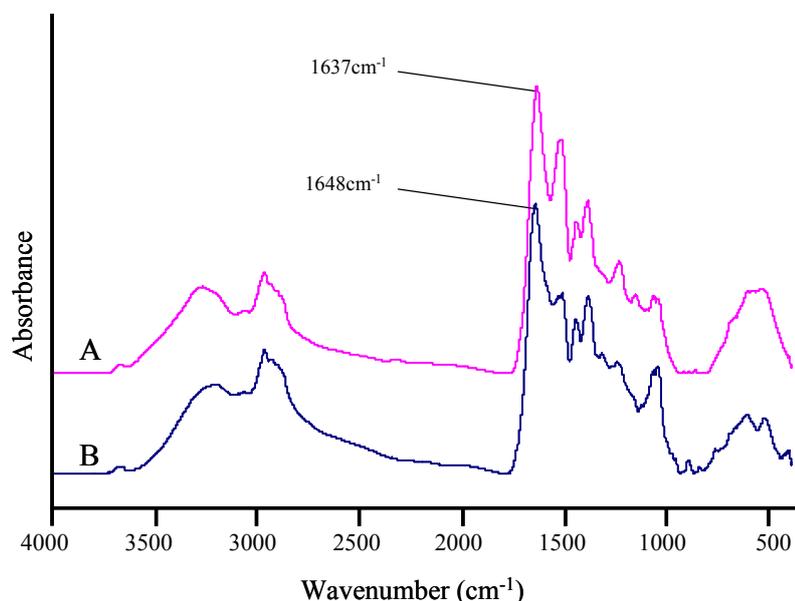


Figure 2. ATR-FTIRによる羽毛および羊毛分解物の吸収スペクトル図 (A) 羽毛分解物、(B) 羊毛分解物。Universal ATR Sampling Accessoryを付属したパーキンエルマー社製、PerkinElmer Spectrum One FTIR spectrophotometerを用いて記録した。積算回数16回、分解能4cm⁻¹、4000~400cm⁻¹の条件で行った。

1.3.4 羽毛および羊毛分解物の毛髪表面撥水性への影響

毛髪繊維を用いて、物質表面の撥水性への影響について評価を行った。毛髪繊維は化学処理によって、影響を受ける事が知られている【Tate, 1993; Nishida, 2004; Barba, 2010B and C】。物質に対する水の接触角は様々な要因により影響を受ける。例えば、表面の不均一性、粗さ、変形、立体構造、極性、吸湿発散性などが挙げられる。毛髪は形態学的に、2つの層に分けることが出来る。一つは毛髪内部構造であるコルテックスであり、もう一つは毛髪表面構造のキューティクルである。無傷の毛髪表面は疎水性のキューティクルで覆われている【Jones, 1997】。ブリーチ処理によって起きる毛髪表面（キューティクル）の過酸化は、キューティクルの疎水性の減少を引き起こし、水と毛髪との接触角は減少する【Nishida, 2004】。Table 2 に毛髪繊維と水との接触角を示した。未処理毛髪にブリーチ処理を行い、損傷毛髪とした結果、接触角が 86.1 ± 7.3 から 72.5 ± 7.5 に減少していた。そのため、ブリーチ処理により、毛髪表面のキューティクルが酸化され、表面疎水性が減少している事が分かった。羽毛および羊毛分解物で損傷毛髪を処理した毛髪の接触角は 81.8 ± 5.3 、 78.8 ± 7.9 に増加していた。この接触角の増加は、羽毛および羊毛分解物処理により、損傷毛髪表面の疎水性が回復し、毛髪表面にケラチン分解物がコーティングされている事が示唆された。特に羽毛分解物処理毛髪のほうが羊毛分解物処理毛髪よりも接触角の増加が大きく、損傷毛髪に対して統計的な有意差が得られた。この違いは、羽毛分解物中には疎水性アミノ酸が高含有されていることに起因すると考えられ、羽毛分解物処理は繊維表面の疎水性を高める能力が高い事が示された。

Table 2 毛髪繊維と水との接触角へのケラチン分解物処理の影響(n = 10)

	Untreated hair	Damaged hair	Feather hydrolysate -treated hair	Wool hydrolysate -treated hair
Contact angle (°)	86.1 ± 7.3^a	72.5 ± 7.5	81.8 ± 5.3^a	78.8 ± 7.9

Result expressed as mean \pm SD

^a vs Damaged hair (P < 0.05; Tukey-Kramer test)

1.3.5 羽毛および羊毛分解物の毛髪引っ張り強度への影響

引っ張り強度は、繊維の強度を評価するのに用いられている。平均破断点を Table 3 に示した。未処理毛髪の破断点は 125.9 ± 7.0 gf であったのに対し、ブリーチ処理を行った損傷毛髪では破断点が 95.9 ± 9.3 gf になり、有意に低下していた。損傷毛髪に羽毛または羊毛分解物で処理を行った毛髪繊維の破断点は、 111.1 ± 6.6 gf または 103.0 ± 5.9 gf に有意に上昇していた。また、羽毛分解物処理毛髪の破断点の上昇は、羊毛分解物処理毛髪の破断点よりも高く、損傷毛髪に対して統計的な有意差が得られた。毛髪内部構造であるコルテックスが毛髪繊維の強度に影響を与え、毛髪表面構造であるキューティクルは影響を与えない事が報告されている【Robbins, 1991】。そのことから、羽毛および羊毛分解物は毛髪内部構造に作用することで、繊維の強度を高めるものと思われる。

Table 3 毛髪引っ張り強度へのケラチン分解物処理の影響(n = 20)

	Untreated hair	Damaged hair	Feather hydrolysate -treated hair	Wool hydrolysate -treated hair
Breaking point (gf)	125.9 ± 7.0 ^a	95.9 ± 9.3	111.1 ± 6.6 ^a	103.0 ± 5.9

Result expressed as mean \pm SD

^a vs Damaged hair (P < 0.05; Tukey-Kramer test)

1.3.6 羽毛および羊毛分解物の毛髪繊維への浸透性

羽毛および羊毛分解物の毛髪への浸透性を評価するために、損傷毛髪および羽毛、羊毛分解物処理毛髪の断面切片を作成し、切片をメチレンブルーで染色し、光学顕微鏡にて観察を行った。ケラチンの等電点は約 4.8~6.0 であるため【Feughelman, 1985】、ケラチン分解物は等電点以上でアニオン性を示す。したがって、中性付近において、塩基性染料であるメチレンブルーは、毛髪繊維へ浸透したケラチン分解物および毛髪タンパク質とイオン結合する。

予備試験を行い、メチレンブルー染色により、損傷毛髪が染色されない条件で染色を行った。そのため、メチレンブルーにより染色された箇所は、毛髪内

に浸透した羽毛および羊毛分解物にイオン結合していると考えられる。Figure 3 に損傷毛髪および羽毛、羊毛分解物処理毛髪の切片写真を示した。損傷毛髪では、キューティクル部とコルテックス部にメチレンブルーの吸着が見られなかった。これに対し、羽毛および羊毛分解物で処理した毛髪では、キューティクル部およびコルテックス部にメチレンブルーの吸着が見られた。このことより、羽毛および羊毛分解物は毛髪繊維に浸透するものと思われる。羊毛分解物で処理した毛髪よりも羽毛分解物で処理した毛髪のほうが、より毛髪繊維の中心部に染料が吸着している様子が観察された。

加水分解タンパク質、ペプチドおよびアミノ酸がどのように毛髪内に浸透拡散するかを理解することは繊維改質剤の開発において重要である。様々な加水分解タンパク質、ペプチド、アミノ酸の毛髪繊維への浸透、吸着について調べられている。Swiftらは小麦加水分解物、Silvaらは17残基の合成ペプチドを対象として、蛍光染料を用いて評価している【Swift, 2000; Silva, 2007】。また、Kuzuharaは卵白加水分解物、コラーゲン加水分解物、アミノ酸、ジおよびトリペプチドを対象として、塩基性染料とラマンスペクトル分析【Kuzuhara, 2011】、Naitoらはケラチン加水分解物を対象としてシステイン由来のチオール基量【Naito, 1987】およびTamagawaらはケラチン、コラーゲン、カゼインおよびシルク加水分解物を対象として、カラム循環法を用いて評価している【Tamagawa, 1993】。加水分解ケラチンにおいては、毛髪繊維への浸透性は分子量に依存しており、低分子の方が高分子よりも浸透しやすい事が報告されている【Naito, 1987; Tamagawa, 1993】。また、Naitoらはケラチン分子中に含まれるチオール基が毛髪タンパク質に結合すると報告している【Naito, 1987】。Kuzuharaは遊離の親水性アミノ酸は毛髪繊維に浸透しづらく、疎水性アミノ酸は毛髪繊維に浸透しやすいことを報告している【Kuzuhara, 2011】。羽毛分解物は羊毛分解物よりもわずかに分子量が大きく、システイン量も少ないが、毛髪繊維に深く浸透していた。羽毛分解物が羊毛分解物よりも毛髪繊維に深く浸透していたのは、疎水性アミノ酸が羽毛分解物中に多く含まれる事が原因であると推測された。また、羊毛分解物処理よりも羽毛分解物処理の方が高い毛髪強度を示したことから（Table 3）、羽毛分解物は毛髪内部に深く浸透していることが示唆された。

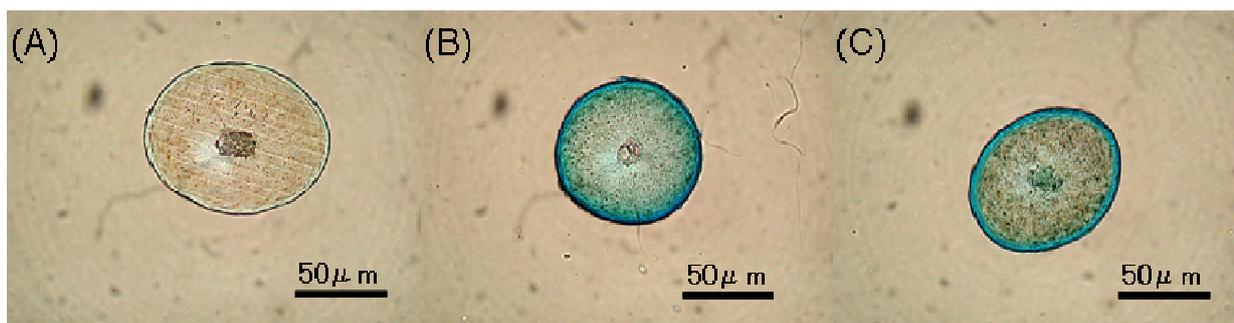


Figure 3. メチレンブルー染色後の毛髪断面写真

(A) 損傷毛髪、(B) 羽毛分解物処理毛髪、(C) 羊毛分解物処理毛髪。

試験毛髪を横軸方向に $10\mu\text{m}$ 厚の切片を切り出し、スライドガラスに貼付し、自然乾燥させた。この凍結切片に 0.001% メチレンブルー溶液を適量滴下し、室温で5分間染色した。染色された毛髪切片を光学顕微鏡にて観察を行った。

1.4 小活

家禽産業の副産物である羽毛は、日本国内で20万トンに達する。部分的には、フェザーミールとして肥料や飼料として利用されているが、大部分は廃棄されている。そこで廃羽毛を有効利用する効率的な用途開発を行う目的で、羽毛分解物と市販されている羊毛分解物の特性比較を行った。アミノ酸分析より、羽毛分解物には疎水性アミノ酸が多く含まれていた。加水分解により、原料素材のケラチン分子より低分子化していたが、FTIR分析において、ケラチンの二次構造は保持されているのが示された。羽毛分解物および羊毛分解物の人毛繊維への補修効果について調べた。損傷毛髪を羽毛分解物および羊毛分解物で処理することで、毛髪表面の疎水性を改善し、損傷毛髪の強度を増加させた。これらの改善は、羊毛分解物で処理された毛髪に比べ、羽毛分解物で処理された毛髪で有意であり、毛髪繊維への浸透性も羽毛分解物の方が高かった。この結果は、羽毛分解物の高い疎水性によるものであると考えられる。よって、人毛繊維の改質剤として利用が可能と思われる。特に、繊維への強度、疎水性の付与および環境要因による劣化を低減させる事が期待される。さらに、 α ヘリックスよりも柔軟性に優れると考えられる β シート構造が保持されていることから、羽毛分解物はフィルムや生分解性プラスチックなど様々な形状、柔軟性、疎水性が求められる成型素材への利用も適していると考えられる。本研究の結果は、羽毛の廃棄に伴う環境汚染を減らし、廃羽毛を有用な生物資源へと転換するための新しい方法の開発に役立つ事が期待される。

2 編 パーマネントウェーブ形成における主要な毛髪構成成分の変化と羽毛由来加水分解ケラチンの効果

2.1 緒言

パーマネントウェーブは毛髪スタイルを変更させる手法の一つとして広く行われている。パーマネントウェーブ処理は2つのプロセスより成り立っている【Inoue, 1994】。1つ目のプロセスは、還元剤により毛髪中に約16%含まれるシステイン残基由来のジスルフィド結合を開裂させ、軟化させることである【Bradbury, 1977】。2つ目のプロセスは、酸化剤を用いて、還元剤により生成したチオール基を再結合することで毛髪の形状を整えることである。そのため、毛髪や羊毛を用いて、分子内の架橋構造やその理学特性に関する研究が行われている【Arai, 2003】。

人毛髪は羊毛と組織学的に類似の構造を持っており、キューティクルとコルテックスに大別できる。その存在比は、コルテックスが80~88%、キューティクルが10~15%である【Scanavez, 2004; Mcnevin, 2005】。Figure 4に毛髪の階層構造を示した。キューティクルは外小皮とも呼ばれ、厚さ0.5 μm のうろこ状の構造をしており、毛髪においては5~9層重なって構成され、毛髪を覆っている【Worlfram, 1971】。これに対し、コルテックスは毛皮質とも呼ばれ、その構造や分子量、アミノ酸組成から、さらに繊維状タンパク質のマイクロフィブリルとマイクロフィブリル間を充足する球状タンパク質であるマトリックスに分けることができる【Robbins, 1994】。キューティクル、マトリックス、マイクロフィブリルには、シスチン残基が存在するため【Kon, 1998B】、パーマネントウェーブ形成にどの組織が大きく関与しているかは明確ではない。パーマネントウェーブ処理による毛髪の構造変化および物理化学的特性の変化について様々な研究が行われている。パーマネントウェーブ処理を行うことにより、毛髪中のマイクロフィブリルの量が減少する【Kon, 1998B】、 α ヘリックス構造が減少しランダム化する【Nishikawa, 1998; Kuzuhara, 2005A and 2006】、毛髪中のジスルフィド結合量が減少する事が報告されている【Ogawa, 2008】。また、毛髪中のジスルフィド結合の特性の違いから、毛髪コルテックスには3種類のジスルフィド結合が存在していると考えられている【Arai, 1996; Naito, 1996A and B】。ミクロ

フィブリル分子間およびマイクロフィブリル分子—マトリックス分子間の分子間ジスルフィド結合と分子内ジスルフィド結合である。さらに、パーマ剤の毛髪への作用の違いについても研究されており、還元剤の種類により毛髪への浸透性が異なり【Okano, 1998; Kuzuhara, 2005B】、還元剤が作用するジスルフィド結合の種類が異なっていると考えられている【Ogawa, 2008; Suzuta, 2012】。これらの研究により、パーマントウェーブ形成はコルテックスが関与していると推測される。しかしながら、直接的に毛髪構成成分（キューティクル、マトリックス、マイクロフィブリル）とパーマントウェーブ形成への相関を観察した研究はほとんどない。

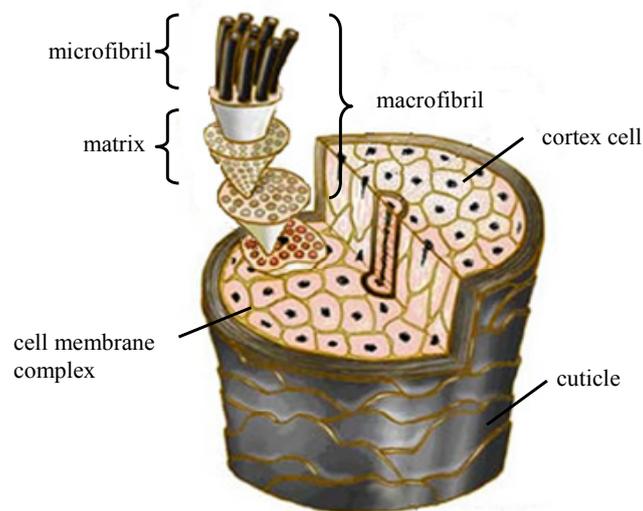


Figure 4. 人毛髪の階層構造

本研究では、キューティクル、マトリックス、マイクロフィブリルを除去、溶出させた毛髪を調製した。この毛髪を用いて、還元剤としてチオグリコール酸を用いた場合のウェーブセットに関与する毛髪構成成分を明らかにすることを目的として行った。また、毛髪にブリーチ処理を繰り返すことでウェーブ形成しにくくなる。ブリーチ処理を行った毛髪に加水分解ケラチンや人毛から抽出したペプチドを毛髪に処理することでウェーブ形成力が回復することが報告されている【Naito, 1987; Washika, 2012】。第1章、第2節において、羽毛ケラチン加水分解物（羽毛分解物）がブリーチ毛髪のパーマントウェーブ率を向上

させることを示した。そこで、羽毛分解物を用いて、ブリーチ処理を繰り返した毛髪のウェーブ形成力が回復するメカニズムについて、肉眼観察と毛髪引っ張り特性を用いて考察した。

2.2 試料および実験方法

2.2.1 試料

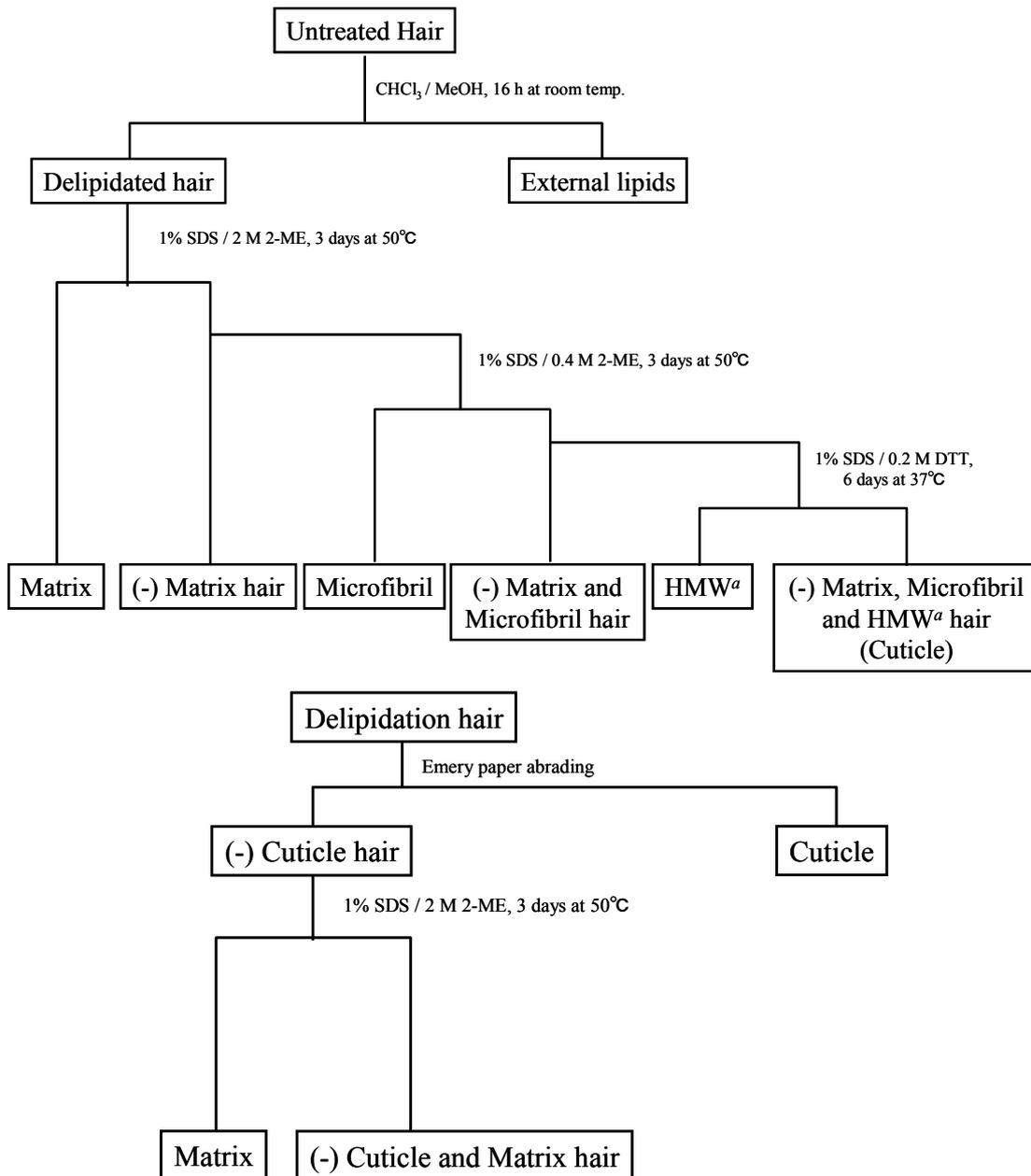
羽毛ケラチン加水分解物（羽毛分解物）は第1章、第2節で調製した羽毛分解物粉末を用いた。毛髪試料には(株)ビューラックス社製の人毛（黒髪 100%）を用いた。

2.2.2 毛髪成分分画法

Konらの方法を参考にして行った【Kon, 1998】。毛髪成分溶出方法を Figure 5 に示した。毛髪毛束を 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で洗浄して未処理毛髪を作成した。未処理毛髪 1g に対して 100g のクロロホルム/メタノール (2:1) 溶液に室温で 16 時間浸漬して脱脂を行った。脱脂毛髪を 20mm の長さに裁断し、20mg ずつマイクロチューブに採取し、1% SDS、2M 2-メルカプトエタノールを含む 2ml の 25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.3) を添加し、50°C で 3 日間反応させた。反応終了後、25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.3) で数回置換して洗浄し、毛髪からマトリックス成分を溶出させた。さらに 1% SDS、0.4M 2-メルカプトエタノールを含む 2ml の 25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.3) に置換し、50°C で 3 日間反応させた。反応終了後、水で数回置換して毛髪からマイクロフィブリル成分を溶出させた。さらに、1% SDS、0.2M ジチオトレイトールを含む 2ml の 25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.3) に置換し、37°C で 6 日間反応させた。反応終了後、水で数回置換して毛髪から高分子量タンパク質(HMW)を溶出させた。成分溶出後の毛髪は、マイクロチューブから取り出し、2% 臭素酸ナトリウム水溶液に室温で 10 分浸漬後、水で数回置換し、室温で自然乾燥させ、マトリックス成分を除去した毛髪[(-)matrix hair]、マトリックスおよびマイクロフィブリル成分を除去した毛髪[(-)matrix and microfibril hair]、マトリックス、マイクロフィブリル成分および高分子量タンパク質(HMW)を除去した毛髪[(-)matrix, microfibril and HMW hair]を調製した。

脱脂毛髪を毛先から根元方向にサンドペーパーで慎重に擦過した。キューテ

イクルの除去具合は光学顕微鏡で確認しながら擦過し、キューティクルを除去した毛髪[(-)cuticle hair]を作成した。この毛髪を 20mm に裁断し、上記条件でマトリックス成分を除去し、キューティクルおよびマトリックス成分を除去した毛髪[(-)cuticle and matrix hair]を作成した。



^a High molecular weight protein

Figure 5. 毛髪構成成分の分画法

2.2.3 電子顕微鏡観察法

各成分溶出後の毛髪の構造変化を JEOL 社製、JFC-1200 を用いて金蒸着後、走査型電子顕微鏡（KEYENCE 社製；VE-9800）を用いて観察した。

2.2.4 リング形成処理法

各成分溶出後の毛髪を 10 本、水を張ったガラスシャーレに 10 分浸漬後、パーマ液 1 剤（6%チオグリコール酸アンモニウム、2.4%モノエタノールアミン、pH 9.3）に室温で 5~20 分間浸漬して毛髪を軟化させ、水で 5 分間洗浄を行うことで軟化毛髪を調製した。この軟化毛髪を直径 5mm のガラス棒に巻きつけ、パーマ液 2 剤（6%臭素酸ナトリウムを含む 20mM リン酸緩衝液、pH 6.7）をピペットで適量滴下し、室温で 10 分間酸化反応を行った。次いで、ピペットで水を滴下し、洗浄を行い、水を張ったガラスシャーレに毛髪を浸漬した。毛髪を水中ですべて 1 本ずつにばらした後、再度集めて束にした。水に浸漬してから 5 分後に観察を行った。

2.2.5 ブリーチ毛髪作製法

未処理毛髪をブリーチ液（0.9%アンモニアを含む 3.6% 過酸化水素水、pH10）に 40℃で 30 分間浸漬することでブリーチ処理を行い、毛髪を水道水で十分に水洗した。水洗後、タオルドライ、ドライヤー乾燥を行い、ブリーチ処理毛髪を作製した。ブリーチ処理を 1~3 回行った毛髪を作製した。

2.2.6 ウェーブ特性評価法

毛髪 20 本を 1 束とし、接着剤で根元を固定した。直径 7mm のガラス棒に毛束の接着側をビニルテープで固定し、毛髪長が 24cm になるように毛先を切りそろえた。Figure 6 に示すように、ガラス棒に 2cm の幅になるように毛髪が重ならないよう均一に 10 周巻き付け、余った毛先をビニルテープで固定した。前処理はロッドを水または 5%羽毛分解物水溶液(pH5.5) に、室温で 10 分間浸漬することで行った。その後、ロッドにパーマ液 1 剤（6%チオグリコール酸アンモニウム、2.4%モノエタノールアミン、pH9.3）を適量塗布し、ラップを巻いた後、室温で 15 分間還元反応を行った。反応終了後、流水で 1 分間水洗した。中間処理は、ロッドを水または 5%羽毛分解物水溶液（pH5.5）に室温で 10 分間浸漬することで行った。その後、ロッドにパーマ液 2 剤（6%臭素酸ナトリウムを含む 20mM リン酸緩衝液 pH6.7）を適量塗布し、ラップを巻いた後、室温

で 10 分間酸化反応を行った。反応終了後、流水で 1 分間水洗した。最後に、毛先側のビニルテープを慎重にはがし、毛先を 2cm 裁断し、毛束をガラス棒から慎重に取り外した。水中で毛束の根元側を上にして吊り下げた。湿潤状態での毛束の根元から毛先までの見かけの長さとしてウェーブ回転数を測定した。その後、毛束を水中から取り出し、毛束の根元側を上にして吊り下げ、室温で自然乾燥させた。乾燥後、吊り下げた状態で毛束の根元から毛先までの見かけの長さとしてウェーブ回転数を測定した。ウェーブ率の計算は以下の式の通り行った。

$$\text{ウェーブ率 (\%)} = 100 - \{(A - B) / (C - B)\} \times 100$$

A : パーマ処理後の見かけの長さ、B : 巻き幅 (2cm)、C : 毛束の長さ = 22cm
ウェーブ保持率の計算は以下の式を用いて行った。

$$\text{ウェーブ保持率 (\%)} = D_d / D_w \times 100$$

D_d : 乾燥状態でのウェーブ率、 D_w : 湿潤状態でのウェーブ率

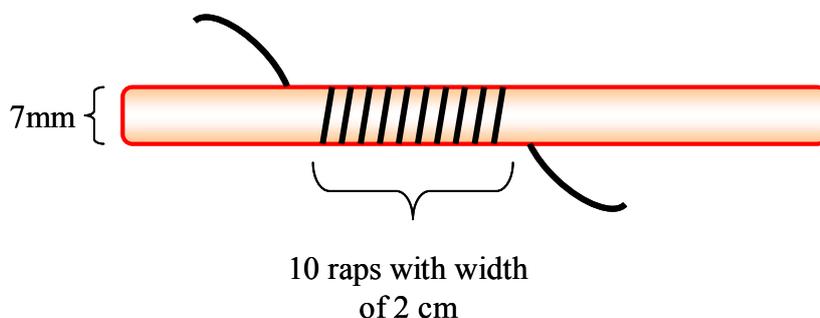


Figure 6. パーマネントウェーブ処理時のロッドへの毛束巻きつけ法

毛髪20本を1束とし、接着剤で根元を固定した。直径7mmのガラス棒に毛束の接着側をビニルテープで固定し、毛髪長が24cmになるように毛先を切りそろえた。ガラス棒に2cmの幅になるように毛髪が重ならないよう均一に10周巻き付け、余った毛先をビニルテープで固定した。

2.2.7 アミノ酸分析法

羽毛分解物を 6M 塩酸を用いて、真空下で 110°C、18 時間加水分解を行った。この溶液を、第 1 章、第 1 節、1.1.2.3 に記載したアミノ酸分析法に準じてアミ

ノ酸分析を行った。

2.2.8 チオール基定量法

Schrooyen らの方法に準じ、羽毛分解物中に含まれる遊離チオール基量およびジスルフィド結合由来のチオール基量を測定した【Schrooyen, 2000】。標準物質は 0.1M 塩酸に溶解させた L-システインまたは L-シスチンを用いた。

遊離チオール基量の測定は、以下の手順で行った。100mg の 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB)を 1ml の 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.5、0.1mM EDTA 含む) に溶解させ、さらに同緩衝液 99ml に希釈し、2.5mM DTNB 溶液を調製した。96 穴プレートにサンプル液とサンプル液の 5 倍量の 2.5mM DTNB 溶液を添加し、室温で 30 分間振とうさせた。反応後、TECAN Infinite M200 micro plate reader を用いて、412nm の吸光度を測定した。すべての操作は遮光で行った。

ジスルフィド結合由来チオール基量の測定は以下の手順で行った。15ml 容遠沈管で 100mg の DTNB を 10ml の 1M 亜硫酸ナトリウム水溶液に溶解させた。1 M 塩酸で pH7.5 に調整し、フタをはずし、アルミホイルで全体を覆った後、37℃の温浴上で 20 時間振とうさせた。この溶液を 0.5ml ずつ分注し、-20℃で保存した。このストック液を 100 倍量の 100mM 亜硫酸ナトリウム水溶液 (pH9.5、5mM EDTA 含む) に添加して 2.5mM 2-nitro-5-thiosulphobenzoate (NTSB)溶液を調製した。96 穴プレートにサンプル液とサンプル液の 5 倍量の 2.5mM NTSB 溶液を添加し、室温で 30 分間振とうさせた。反応後、TECAN Infinite M200 micro plate reader を用いて、412nm の吸光度を測定した。すべての操作は遮光で行った。

2.2.9 毛髪物性測定法

毛髪引っ張り強度およびヤング率は島津製作所製、EZ-test EZ-S を用いて測定した。直径 75 μ m の毛髪を選定し、測定に使用した。50mm/min の速度で毛髪に対して縦軸方向に引っ張り、破断点とヤング率を記録した。温度 25℃、湿度 50%の条件下 (乾燥状態) または、測定前に温度 25℃の水中に 1 時間浸漬 (湿潤状態) した毛髪を使用した。

2.2.10 統計処理

エクセル統計ソフト Statcel 2 により統計処理を行った。F 検定を行った後、

Mann-Whitney's U test (危険率 1%) により、統計処理を行った。データは、平均値±標準偏差で示した。

2.3 結果および考察

2.3.1 毛髪成分の抽出量

Kon らは、還元剤の種類や条件を調整することで、毛髪からマトリックス、マイクロフィブリルおよび高分子量タンパク質(HMW)を溶出させることができることを報告している【Kon, 1998B】。この方法を用いて、毛髪からマトリックス、マイクロフィブリルおよび HMW を溶出させ、キューティクルのみ残留させた。各成分溶出後の毛髪重量を測定し、そこから算出した成分量を Table 4 に示した。コルテックス成分 (マトリックスおよびマイクロフィブリル) は全毛髪量の約 80% を占め、キューティクルは約 17% であった。この結果は、Kon ら【Kon, 1998B】の報告と類似しており、良好に毛髪成分の分画が行われている事が示唆された。

Table 4 毛髪成分の構成比 (n=6)

	Whole hair	Matrix	Microfibril	HMW ^a	Cuticle
%	100.0	28.6 ± 2.5	51.1 ± 1.3	3.1 ± 1.0	17.3 ± 1.0

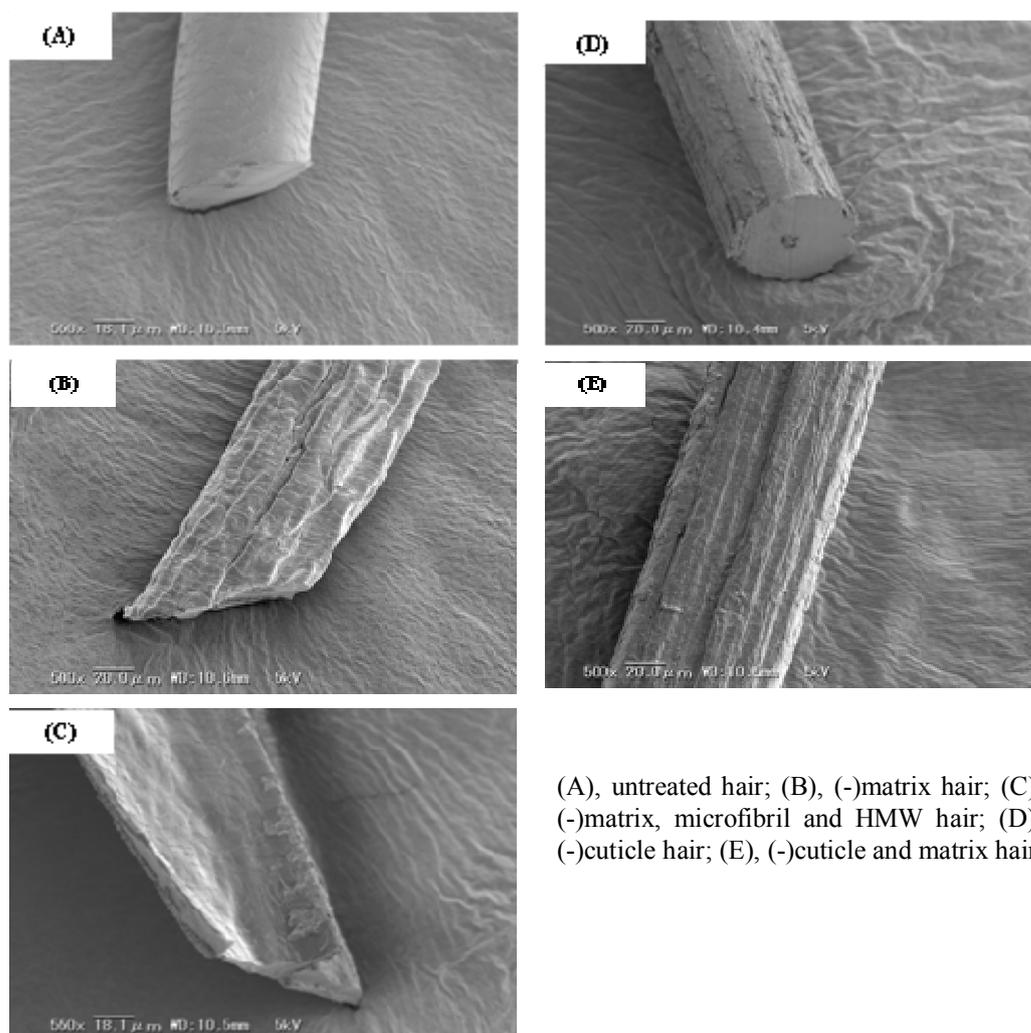
Result expressed as mean ± SD

^a High molecular weight protein

2.3.2 毛髪外観変化

成分溶出後の毛髪電子顕微鏡写真を Figure 7 に示した。未処理毛髪は綺麗な円筒形を示していた (Figure 7A)。マトリックス成分を溶出させた毛髪は内部成分が溶出したことにより、表面に凹凸ができていた (Figure 7B)。マトリックス成分、マイクロフィブリル成分および HMW を溶出させた毛髪では、キューティクルのみ残留し、薄い板状になっていたことから、毛髪内部成分が、ほぼ完全に消失していることが示唆された (Figure 7C)。サンドペーパーにより物理的にキューティクルを除去した毛髪では、若干表面に擦過傷ができているものの、キューティクルが完全に除去されている様子が観察された (Figure 7D)。キュー

ティクルを除去後、マトリックス成分を溶出させた毛髪では、マトリックス成分が溶出し、Figure 7Bと同様に表面に凹凸ができていた。Figure 4の毛髪の階層構造からは、マトリックス成分が完全に除去されていた場合、マイクロフィブリル繊維が観察されると考えられる。しかし、マイクロフィブリル繊維の1本1本が観察されず、全体が一つの繊維としてまとまっていることから、完全にマトリックス成分が除去され、マイクロフィブリルのみ残留しているわけではないことが観察された。



(A), untreated hair; (B), (-)matrix hair; (C), (-)matrix, microfibril and HMW hair; (D), (-)cuticle hair; (E), (-)cuticle and matrix hair

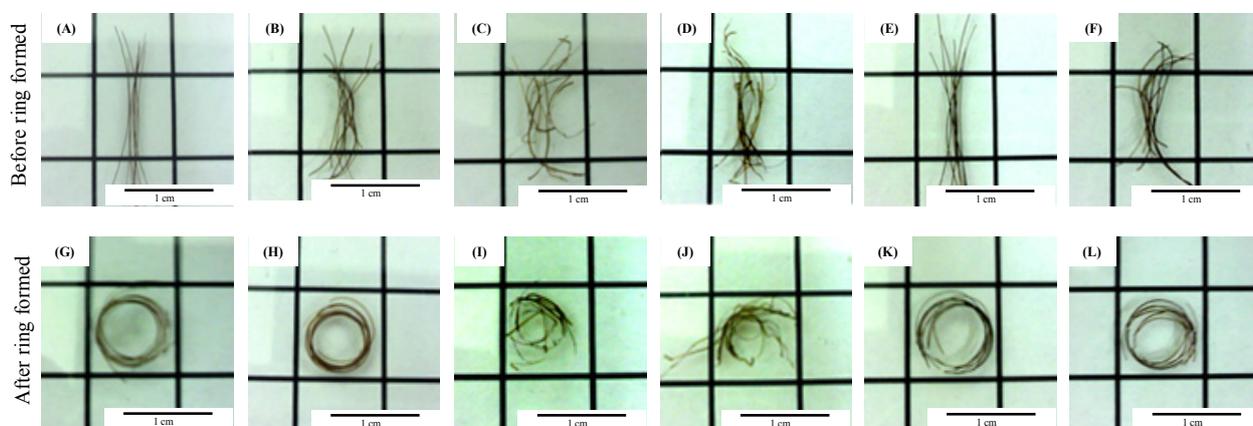
Figure 7. 毛髪構成成分溶出後の走査型電子顕微鏡観察写真

毛髪構成成分溶出後の毛髪を試料台に載せ、金蒸着後、走査型電子顕微鏡を用いて観察を行った。

2.3.3 リング形成力

成分溶出後の毛髪を直径 5mm のガラス棒に巻きつけ、パーマ処理を行い、水洗後、水に浸漬した結果を Figure 8 に示した。リング形成処理前の毛髪ではリングが形成されていなかった (Figure 8A-F)。リング形成処理後では、未処理毛髪では均一なリングが形成されているのが観察された (Figure 8G)。さらに、マトリックス成分を溶出させても、リング形成力にほとんど影響は見られず、ほぼ均一なリングが観察された (Figure 8H and L)。また、キューティクルを物理的に除去した毛髪でもほぼ均一なリングが観察された (Figure 8K)。しかし、ミクロフィブリル成分を溶出させた毛髪では、均一なリングが形成されなかった (Figure 8I and J)。電子顕微鏡写真からは、マトリックス成分が完全に除去されていたわけではないことが示されたが (Figure 7E)、マトリックスと同様にキューティクル成分を除去してもリング形成力に影響は見られなかった。Amaya らによれば、パーマネントウェーブ処理毛髪は、2 段階によって安定化される【Amaya, 2012】。一次結合は、分子間ジスルフィド結合の再結合である。還元により開裂したジスルフィド結合が、酸化により再結合する。酸化反応を行った時点で、目的とする形状に合わせ、ジスルフィド結合が新たに再配列された形で結合する。二次結合は、水素およびイオン結合の形成である。乾燥・脱膨潤過程において、還元/酸化が不十分であり、歪みが解消され、再配列されたジスルフィド結合が形成されていない領域が元の形状に戻ろうとする力が働く。さらに、重力負荷に対する応力も発生する。それらの応力と一次結合とのバランスにより水素結合、イオン結合が形成され、最終的な形状が安定化される。コールドパーマと呼ばれる一般的なパーマ処理では、一次結合終了時の状態が目的とする形状（酸化反応を行った時点での形状）により近く、二次結合が発生した状態では形状が変化している。つまり、二次結合終了時の形状は、一次結合終了時の形状より劣っており、一次結合終了時よりも優れた形状を示すことはない。そのため、一次結合終了時の形状が目的とする形状に、より近いことが重要であり、一次結合がパーマネントウェーブにおける形状形成の根本的な要素であると考えられる。もし、キューティクルとマトリックス成分が一次結合における形状形成力に重要な役割を果たしていた場合、これらの成分の除去はリング形成力に何らかの影響を与えると考えられる。それゆえ、Figure 8

の結果から判断すると、マイクロフィブリルは、パーマントウェーブの一次結合において、キューティクルおよびマトリックスよりも重要な役割を果たしている事が示唆された。Wortmann と Kure は、毛髪の曲げセットにマトリックスの寄与は少なく、主にマイクロフィブリルが関与していると主張している【Wortmann, 1990】。さらに、キューティクルを人工的に除去した毛髪でもウェーブ形成するという報告がある【Wortmann, 1994】。これらのことは、本研究の結果と一致していた。



(A), untreated hair; (B), (-)matrix hair; (C), (-)matrix and microfibril hair; (D), (-)matrix, microfibril and HMW hair; (E), (-)cuticle hair; (F), (-)cuticle and matrix hair; (G), untreated hair after ring formed; (H), (-)matrix hair after ring formed; (I), (-)matrix and microfibril hair after ring formed; (J), (-)matrix, microfibril and HMW hair after ring formed; (K), (-)cuticle hair after ring formed; (L), (-)cuticle and matrix hair after ring formed

Figure 8. 毛髪構成成分を溶出させた毛髪のリング形成処理前後写真

成分溶出後の毛髪10本にリング形成処理を行った。毛髪を水中ですべて1本ずつにばらした後、再度集めて束にした。水に浸漬してから5分後に観察を行った。

2.3.4 パーマントウェーブにおける羽毛分解物の影響

繰り返しブリーチ処理を行った毛髪の湿潤、乾燥状態におけるウェーブ特性を調べた。ウェーブ率、ウェーブ保持率、ウェーブ回転数の結果を Table 5 に示した。ブリーチ処理を1回行った毛髪は未処理毛髪と比較してウェーブ率が上昇するが、ブリーチ処理を繰り返すことでウェーブ率は低下し、ウェーブ形成されにくくなる事がわかった。毛髪内部への水分、薬品の浸透経路と考えられている細胞膜複合体がブリーチ処理により損傷し、薬液の浸透が容易になる【Kelch, 2000; Amaya, 2012】。そのため、ブリーチ処理1回ではウェーブ率が上

昇する。しかし、ブリーチ処理を繰り返すことで、毛髪構造の損傷が進行し、ウェーブ率とウェーブ保持率が低下したと考えられた。前処理において、羽毛分解物処理毛髪と水処理毛髪の湿潤状態のウェーブ率に大きな違いは見られなかった。しかし、ブリーチ処理を繰り返した毛髪においては、乾燥状態のウェーブ率に有意な差が見られ、羽毛分解物処理毛髪のウェーブ率が向上していた。この違いは羽毛分解物処理により高いウェーブ保持率が得られたことに起因し、羽毛分解物による前処理で、二次結合時の重力による負荷に対する抵抗性が高まった事が示唆された。中間処理においては、湿潤および乾燥状態に羽毛分解物処理を行うことで、水処理と比較して有意にウェーブ率が向上しているのが示され、ウェーブ保持率も増加傾向にあった。これらの結果より、羽毛分解物による中間処理は、二次結合における重力による負荷に対する抵抗性を高めるだけでなく、一次結合における形状形成力も高めている事が示唆された。Naitoらは、羊毛から加水分解ケラチンを調製し、中間処理で用いている【Naito, 1987】。また、Washikaらは、前処理で毛髪由来のペプチドを用いている【Washika, 2012】。どちらの報告もウェーブ率の向上を示し、前処理および中間処理によりウェーブ率の向上が見られた本研究の結果と一致していた。しかし、本研究の結果から、全体的に前処理よりも中間処理の方がウェーブ率を高める傾向にある事がわかった。ウェーブ回転数は、羽毛分解物による前処理および中間処理の影響はほとんど見られなかった。通常、湿潤状態から乾燥状態への移行時において、ウェーブ回転数は減少する。しかし、本研究でのウェーブ回転数は、すべてのサンプルにおいて増加していた。脱湿潤時におけるウェーブ回転数の変化は、一次結合におけるジスルフィド結合の再配列が不十分な領域から発生する応力が関与していると考えられている。その領域は元の形状に戻ろうとするためウェーブ回転数は減少する。さらに、ウェーブ特性は、ロッドの直径によって変化する事が知られている【Amaya, 2012; Joko, 2013】。ウェーブ特性は、ロッド直径が小さいほうがより顕著に表れる傾向にある。本実験で使用した直径 7mm ロッドは、比較的小さいといえる。それゆえ、ウェーブ回転数の変化が顕著に表れ、毛髪のジスルフィド結合の還元と酸化が充分もしくは過剰に行われていたため、ウェーブ回転数が増加したと考えられる。

Table 5 パーマネントウェーブ特性における羽毛分解物の影響(n=4)

			Bleaching repetitions					
			untreated	1time	2times	3times		
pre-treatment	wet state	water treated-hair	wave efficiency (%)	58.8 ± 1.0	67.0 ± 0.9	67.5 ± 1.3	66.9 ± 1.1	
			rolling number	5.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	
		feather hydrolysate treated-hair	wave efficiency (%)	60.8 ± 1.8	66.5 ± 0.7	67.8 ± 1.0	67.5 ± 0.7	
			rolling number	5.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	10.3 ± 0.3	
	dry state	water treated-hair	wave efficiency (%)	34.1 ± 1.2	38.3 ± 1.2	34.4 ± 1.1	31.6 ± 0.3	
			rolling number	5.5 ± 0.4	10.0 ± 0.0	13.3 ± 0.3	16.0 ± 0.0	
		feather hydrolysate treated-hair	retention rate (%)	58.1 ± 2.7	57.1 ± 2.1	50.9 ± 1.3	47.3 ± 0.7	
			wave efficiency (%)	34.5 ± 0.6	38.0 ± 1.2	38.4 ± 1.3 ^a	35.1 ± 1.2 ^a	
	intermediate-treatment	wet state	water treated-hair	rolling number	5.3 ± 0.3	10.0 ± 0.0	13.0 ± 0.0	16.0 ± 0.0
				retention rate (%)	56.8 ± 1.7	57.2 ± 2.3	56.6 ± 1.2	52.1 ± 2.2
			feather hydrolysate treated-hair	wave efficiency (%)	59.5 ± 0.6	69.0 ± 0.8	73.3 ± 0.6	63.8 ± 0.6
				rolling number	4.0 ± 0.0	7.5 ± 0.0	9.0 ± 0.0	9.9 ± 0.3
dry state		water treated-hair	wave efficiency (%)	58.0 ± 0.9	74.4 ± 1.4	76.5 ± 0.8	67.4 ± 0.9	
			rolling number	4.5 ± 0.6	8.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0	9.6 ± 0.3	
		feather hydrolysate treated-hair	wave efficiency (%)	33.6 ± 1.0	42.5 ± 1.2	38.8 ± 0.3	33.6 ± 0.9	
			rolling number	4.8 ± 0.5	10.5 ± 0.0	12.9 ± 0.3	15.5 ± 0.4	
dry state		water treated-hair	retention rate (%)	56.5 ± 1.4	61.6 ± 1.7	52.9 ± 0.6	52.7 ± 1.2	
			wave efficiency (%)	34.3 ± 0.5	47.0 ± 0.7 ^a	41.8 ± 0.9 ^a	37.9 ± 1.9 ^a	
		feather hydrolysate treated-hair	rolling number	5.0 ± 0.0	10.5 ± 0.0	12.8 ± 0.3	15.1 ± 0.3	
			retention rate (%)	59.1 ± 1.7	63.2 ± 1.6	54.6 ± 0.8	56.2 ± 2.2	

Result expressed as mean ± SD

^a P < 0.01 by Mann-Whitney's U test

本実験で使用した羽毛分解物に含まれる遊離チオール基量およびジスルフィド結合由来のチオール基量、総アミノ酸量を Table 6 に示した。通常、羽毛のケラチンには 7%のシステインが含まれることが知られている【Arai, 1983】。羽毛分解物中に遊離チオール基は検出されず、ジスルフィド結合由来のチオール基は 18.0μmol/g であった。総アミノ酸量は約 5000μmol/g であったことから、羽毛分解物中にはシスチン、システインはほとんど含まれていない事が示唆された。毛髪の過剰な酸化により、ジスルフィド結合が開裂し、シスチン残基が

システイン酸に変化する事が知られている【Zahn, 1986; Tate, 1993】。それゆえ、ブリーチ処理を繰り返すことによるウェーブ率の低下は、毛髪中のジスルフィド結合数の減少によって引き起こされると考えられている。しかし、今回の結果より、羽毛分解物で処理することによるウェーブ率の増加は、毛髪中のシステインおよびシスチン量を増加させた結果によるものではない事が示唆された。Naitoらは、本実験で使用した羽毛分解物よりも多くシスチンを含み、かつシスチン量（6.1～9.32%）の異なる加水分解ケラチンを用いてウェーブ率を測定している。しかし、ウェーブ率とシスチン残基量に相関は見られなかった【Naito, 1987】。また、Washikaらは、シスチン残基を同程度(約3%)含む2つの人毛ペプチドで比較したところ、一方のペプチドでのみウェーブ率の向上が見られていることを報告している【Washika, 2012】。これらの報告は、シスチンを毛髪に供給することは必ずしもウェーブ率を向上させるわけではないことを示唆している。

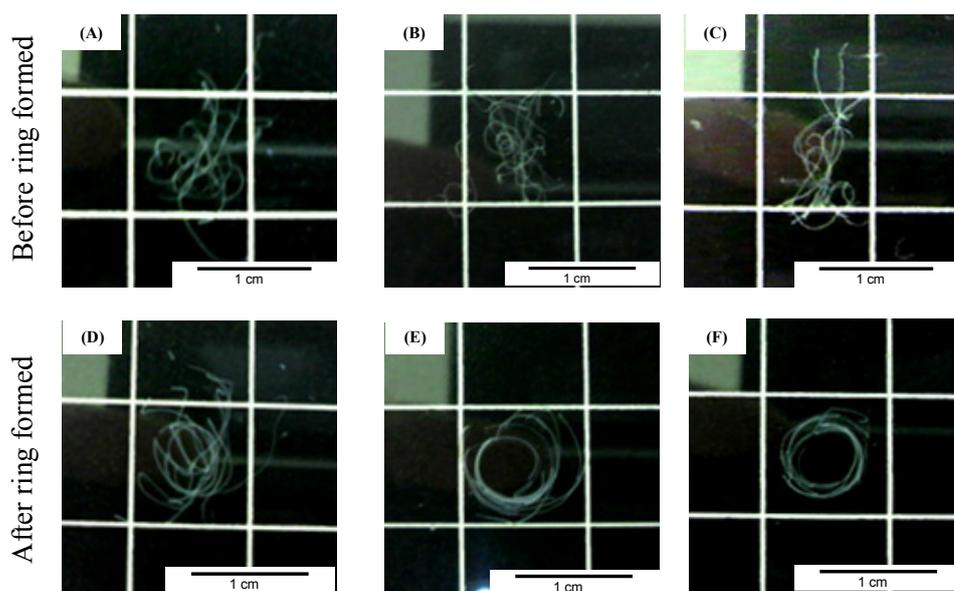
Table 6 羽毛分解物に含まれる SH 基量 ($\mu\text{mol/g}$)

Free SH groups	SH groups from SS bonds	Whole amino acids
Not Detected	18.0	4948.2

ブリーチ処理を3回行った毛髪からキューティクルおよびマトリックス成分を溶出させた毛髪を作成し、羽毛分解物で直接マイクロフィブリルに前処理または中間処理を行った毛髪のリング形成力を調べた (Figure 9)。還元剤に浸漬する直前に、5%羽毛分解物水溶液に室温で10分間浸漬することで前処理を行った。中間処理は、5%羽毛分解物水溶液に酸化剤を処理する直前に、室温で10分間浸漬することで行った。水処理は、酸化剤を処理する直前に、室温で10分間、水に浸漬することで行った。

リング形成処理前の毛髪では、水分吸収による膨潤が生じ、毛髪繊維は均一な形状をしていなかった (Figure 9A-C)。リング形成処理後のブリーチ未処理毛髪では、キューティクルおよびマトリックス成分を除去しても均一なリングが形成されていた (Figure 8F)。これに対し、ブリーチ処理を3回行った毛髪で

は、ほとんどリングを形成していなかった (Figure 9D)。これらの結果により、パーマメントウェーブの安定化の過程における一次結合時のマイクロフィブリルの形状形成能は、ブリーチ処理の繰り返しにより低下する事がわかった。これとは対照的に、羽毛分解物で前処理または中間処理を行った毛髪では、均一なリングが形成されていた (Figure 9E and F)。このことは、羽毛分解物を直接的にマイクロフィブリルに作用させることで、一次結合における形状形成能が回復していることを示唆している。しかし、羽毛分解物による前処理および水前処理において、湿潤状態でのウェーブ率に違いがほとんど見られず、羽毛分解物による中間処理ではウェーブ率の向上が見られている (Table 5)。それゆえ、羽毛分解物による中間処理は、羽毛分解物による前処理よりもマイクロフィブリルに対して作用している可能性が高いことが示唆された。加えて、羽毛分解物による中間処理毛髪は、羽毛分解物による前処理毛髪よりも、より均一なリングを形成していた。羽毛分解物による中間処理は、湿潤状態において、羽毛分解物前処理よりも形状形成能をより高める事が示され、Table 5の結果とも一致していた。



(A), water-treated hair; (B), feather hydrolysate-pre-treated hair; (C), feather hydrolysate-intermediate-treated hair; (D), water-treated hair after ring formed; (E), feather hydrolysate-pre-treated hair after ring formed; (F), feather hydrolysate-intermediate-treated hair after ring formed

Figure 9. ブリーチ処理3回後、キューティクルおよびマトリックスを溶出させた毛髪のリング形成処理前後の写真

リング形成処理時にパーマ液1剤に浸漬する直前に、5%羽毛分解物水溶液に室温で10分間浸漬することで前処理を行った。中間処理は5%羽毛分解物水溶液にパーマ液2剤を処理する直前に室温で10分間浸漬することで行った。水処理はパーマ液2剤を処理する直前に室温で10分間、水に浸漬することで行った。

ブリーチ処理後、ストレートパーマの手法で、ロッドに巻かずにパーマネント処理を行った毛髪を調製した。乾燥または湿潤状態における毛髪物性を調べた。毛髪強度（破断点）と弾力性（ヤング率）の結果を Table 7 および Table 8 に示した。破断点とヤング率は、ブリーチ処理を繰り返すことで低下していた。ブリーチ処理毛髪にパーマ処理を行うことで、さらなる低下が見られた。しかし、羽毛分解物処理により、パーマ処理による破断点とヤング率の低下を抑制している傾向が見られた。湿潤状態において、マイクロフィブリルが縦軸方向への引っ張り強度に重要な因子である事が報告されている【Feughelman, 1982】。このことは、パーマネントウェーブ処理によるマイクロフィブリルの損傷が、ケラチン処理により低減される傾向にあることを示唆している。Sakuraiらはウェーブ形成における重力の影響をしらべ、ウェーブ形成に重力が大きく関わっていることを報告している【Sakurai, 2010】。そのため、高い弾力性を持った繊維は、縦軸方向への荷重に対して高い抵抗性を持った構造をしていると言える。

パーマネントウェーブ処理直後の湿潤時の形状を、より保ちやすい構造にしているものと思われる。ブリーチ処理やパーマネントウェーブ処理により、毛髪の強度、弾力性が低下する事が知られている【Robbins, 1991; Tate, 1993; Nishikawa, 1998; Inoue, 2002; Kuzuhara, 2005B】。また、加水分解タンパク質による毛髪処理は、毛髪の強度と弾力性を向上させることが報告されている【Naito, 1987; Lanzilotta, 2007; Silva, 2007; Barba, 2010B and C】。Table 7 および Table 8 より、パーマネントウェーブ処理における羽毛分解物処理は、毛髪の強度と弾力性の低下を抑制する効果を示した。その結果、ウェーブ保持率の増加が示唆された。

Table 7 毛髪引っ張り強度への羽毛分解物の影響(n = 10)

	bleaching repetitions	untreated	pre-treatment		intermediate-treatment	
			water	feather hydrolysate	water	feather hydrolysate
dry state	0	134.6 ± 11.1	118.4 ± 14.8	120.8 ± 17.3	118.1 ± 15.6	120.5 ± 13.5
	1	123.3 ± 13.2	106.4 ± 12.7	115.1 ± 9.0	110.5 ± 11.5	111.8 ± 13.3
	2	116.1 ± 11.7	94.0 ± 11.9	101.8 ± 9.8	97.4 ± 12.4	102.1 ± 12.5
	3	102.2 ± 11.0	87.2 ± 12.3	91.6 ± 14.7	85.2 ± 11.3	89.5 ± 8.7
wet state	0	107.1 ± 9.5	97.7 ± 9.7	100.6 ± 10.5	94.9 ± 16.4	95.7 ± 14.0
	1	98.9 ± 8.1	85.2 ± 11.4	86.4 ± 6.4	84.7 ± 11.6	89.0 ± 7.8
	2	90.9 ± 10.0	67.9 ± 7.9	70.8 ± 11.3	71.8 ± 12.5	75.0 ± 14.9
	3	81.9 ± 13.7	57.1 ± 11.6	63.8 ± 14.8	60.4 ± 9.9	66.9 ± 11.9

Result expressed as mean (gf) ± SD

Table 8 毛髪弾性率（ヤング率）への羽毛分解物の影響(n = 10)

	bleaching repetitions	untreated	pre-treatment		intermediate-treatment	
			water	feather hydrolysate	water	feather hydrolysate
dry state	0	642.5 ± 52.2	573.1 ± 58.4	599.6 ± 74.7	572.3 ± 63.6	598.0 ± 59.6
	1	590.1 ± 50.5	531.1 ± 43.1	550.8 ± 34.1	524.4 ± 71.7	540.5 ± 32.4
	2	543.1 ± 53.5	475.3 ± 43.9	494.8 ± 55.0	478.6 ± 45.7	493.8 ± 37.1
	3	461.8 ± 57.8	403.8 ± 53.2	426.5 ± 57.0	390.0 ± 41.8	413.5 ± 30.5
wet state	0	351.9 ± 28.1	313.5 ± 48.9	327.2 ± 35.9	310.8 ± 37.3	319.2 ± 35.1
	1	314.3 ± 32.3	263.9 ± 34.6	281.0 ± 30.8	259.8 ± 23.2	271.4 ± 34.0
	2	290.4 ± 29.6	224.3 ± 34.2	249.3 ± 41.2	217.5 ± 30.4	233.2 ± 31.0
	3	279.5 ± 25.8	187.5 ± 28.3	212.7 ± 31.5	179.7 ± 29.3	202.6 ± 26.9

Result expressed as mean (kgf/mm²) ± SD

2.4 小活

チオグリコール酸を用いたパーマネントウェーブ形成において、マイクロフィブリルは、必須の毛髪構成成分である。また、マイクロフィブリルは、キューティクルおよびマトリックスよりも、パーマネントウェーブ処理における分子間ジスルフィド結合の再結合（一次結合）による形状形成に大きな役割を果たしている。ウェーブ率は、ブリーチ処理を繰り返し、毛髪を損傷させることで低下する傾向が見られたが、羽毛分解物処理をパーマネントウェーブ処理に追加することにより、有意にウェーブ率を向上させた。本実験で使用した羽毛分解物には、システインおよびシスチンはほとんど含まれていなかった。このことから、ウェーブ率の向上は、毛髪中のシステインおよびシスチン量を増加させることによって引き起こされたわけではない事が示唆された。パーマネントウェーブにおける羽毛分解物処理は、毛髪の損傷を抑制する効果を示した。そのため、羽毛分解物処理により高いウェーブ率を示すのは、パーマネントウェーブ処理自体による毛髪の損傷を抑制し、ウェーブ形成能を保持させることで起きていると考えられた。

引用文献

- Amaya M., Sawada M., Yoshida H., Joko K. Effect of the pretreatment to permanent wave formation of hair, *Sen'i Gakkaishi*, **68**, 283-289 (2012).
- Arai K. Cross-linking structure and mechanical properties of wool and hair, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, **37**, 63-83 (2003).
- Arai K. M., Takahashi R., Yokote Y., Akahane K. Amino-acid sequence of feather keratin from fowl, *Eur. J. Biochem.*, **132**, 501–507 (1983).
- Arai K., Naito S., Dang V. B., Nagasawa N., Hirano M. Crosslinking structure of keratin. VI. number, type, and location of disulfide crosslinkages in low-sulfur protein of wool fiber and their relation to permanent set, *J. Appl. Polym. Sci.*, **60**, 169-179 (1996).
- Barba C., Mendez S., Lanzilotta A. D., Kelly R., Parra J. L., Coderch L. Wool peptide derivatives for hand care, *J. Cosmet. Sci.*, **58**, 99–107 (2007).
- Barba C., Marti M., Lanzilotta A. D., Manich A., Carilla J., Parra J., Coderch L. Effect of wool keratin proteins and peptides on hair water sorption kinetics, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **102**, 43–48 (2010A).
- Barba C., Scott S., Kelly R., Parra J. L., Coderch L. New anionic surface-active agent derived from wool proteins for hair treatment, *J. Appl. Polym. Sci.*, **115**, 1461–1467 (2010B).
- Barba C., Scott S., Lanzilotta A. D., Kelly R., Manich A., Parra J. L., Coderch L. Restoring important hair properties with wool keratin proteins and peptides, *Fibers and Polymers*, **11**, 1055–1061 (2010C).
- Barone J. R., Schmidt W. F., Gregoire N. T. Extrusion of feather keratin, *J. Appl. Polym. Sci.*, **100**, 1432–1442 (2006A).
- Barone J. R., Schmidt W. F. Effect of formic acid exposure on keratin fiber derived from poultry feather biomass, *Bioresource Technology*, **97**, 233–242 (2006B).
- Bradbury J. H. The structure and chemistry of keratin fibers, *In: Advances in Protein Chemistry*, vol. 27, Anfinsen C. B. (Eds), Academic Press, New York, p. 111 (1977).

- Cao Z. J., Lu C. D., Luo L. S., Deng Y. X., Bian Y. G., Zhang X. Q., Zhou M. H. Composition analysis and application of degradation products of whole feathers through a large scale of fermentation, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **19**, 2690–2696 (2011).
- Cardamone J. M. Investigation the microstructure of keratin extracted from wool: peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR), *J. Mol. Struct.*, **969**, 97–105 (2010).
- Endo R., Kawahara Y., Kimura T. Shrinkproof and reinforcing effects of duck feather hydrolysate on the treatment of archaeological waterlogged wood, *Sen'I gakkaiishi*, **60**, 64-68 (2004).
- Endo R., Kamei K, Iida I., Yokoyama M., Kawahara Y. Physical and mechanical properties of waterlogged wood treated with hydrolyzed feather keratin, *J. Archaeological Sci.*, **37**, 1311-1316 (2010).
- Fernandes M. M., Lima C. F., Loureiro A., Gomes A. C., Cavaco-Paulo A. Keratin-based peptide: biological evaluation and strengthening properties on relaxed hair, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **34**, 338-346 (2012).
- Feughelman M. The physical properties of alpha-keratin fibers, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **33**, 385-406 (1982).
- Feughelman M. Keratin, *Encyclopedia of polymer science and engineering*, Kroschwitz J. I. (Eds) vol. 8, Wiley, New York, p. 566–600 (1985).
- Fraser R. D. B., MacRae T. P., Rogers G. E. *Keratins: their composition, structure and biosynthesis*, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 8-23 (1972).
- Goddard D. R., Michaelis L. A study on keratin, *J. Biol. Chem.*, **16**, 605–614 (1934).
- Gupta R., Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 21–33 (2006).
- Inoue K. Instrumental methods for evaluating of permanent waves, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, **28**, 223-237 (1994).
- Inoue T., Ito M., Kizawa K. Labile proteins accumulated in damaged hair upon permanent waving and bleaching treatments, *J. Cosmet. Sci.*, **53**, 337-344 (2002).
- Joko K., Sakurai K., Morimoto Y. Effects of some waving treatment conditions on

- the permanent waving performance of human hair, *Sen'i Gakkaishi*, **69**, 8-12 (2013).
- Jones L. N., Rivett D.E. The role of 18-methyleicosanoic acid in the structure and formation of mammalian hair fibers, *Micron*, **28**, 469–485 (1997).
 - Kelch A., Wessel S., Will T., Hintze U., Wepf R., Wiesendanger R. Penetration pathways of fluorescent dyes in human hair fibres investigated by scanning near-field optical microscopy, *J. Microscopy*, **200**, 179-186 (2000).
 - Kon R., Nakamura A., Hirabayashi N., Takeuchi K. Analysis of the damaged components of permed hair using biochemical technique, *J. Cosmet. Sci.*, **49**, 13-22 (1998B).
 - Kuzuhara A. Analysis of structural change in keratin fibers resulting from chemical treatments using raman spectroscopy, *Biopolymers*, **77**, 335-344 (2005A).
 - Kuzuhara A., Hori T. Reduction mechanism of L-cysteine on keratin fibers using microspectrophotometry and raman spectroscopy, *Biopolymers*, **79**, 324 -334 (2005B).
 - Kuzuhara A. Analysis of structural changes in permanent waved human hair using raman spectroscopy, *Biopolymers*, **85**, 274-283 (2006).
 - Kuzuhara A. Raman spectroscopic analysis of L-phenylalanine and hydrolyzed eggwhite protein penetration into keratin fibers, *J. Appl. Polym. Sci.*, **122**, 2680–2689 (2011).
 - Lanzilotta A. D., Kelly R., Scott S., Chahal S. New keratin isolates: actives for natural hair protection, *J. Cosmet. Sci.*, **58**, 405–411 (2007).
 - Moore G.R.P., Martelli S.M., Gandolfo C., Sobral P.J.A., Laurindo J.B. Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films, *Food Hydrocollids*, **20**, 975–982 (2006).
 - Nagai Y., Nishikawa T. Alkali solubilization of chicken feather keratin, *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 16–22 (1970).
 - Naito S., Oshima K. The adsorption of keratin hydrolysate to hair and its effect, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, **21**, 146–155 (1987).
 - Naito S., Arai K., Hirano M., Nagasawa N., Sakamoto M. Crosslinking structure of

- keratin. V. number and type of crosslinks in microstructures of untreated and potassium cyanide treated human hair, *J. Appl. Polym. Sci.*, **61**, 1913-1925 (1996A).
- Naito S., Arai K. Type and location of SS linkages in human hair and their relation to fiber properties in water, *J. Appl. Polym. Sci.*, **61**, 2113-2118 (1996B).
 - Nishida Y., Ito T., Hosokawa M., Aono M., Yokomaku A., Konta H., Iimura K., Kato T., Sugiyama K. Repairing effects of diglucosyl gallic acid on coloring-damaged hair, *J. Oleo Sci.*, **53**, 295–304 (2004).
 - Nishikawa N., Yanizawa Y., Tanaka S., Horiguchi Y., Asakura T. Structural change of keratin protein in human hair by permanent waving treatment, *Polymer*, **39**, 3835-3840 (1998).
 - Okano M., Oka H., Hatakeyama T., Endo R. Effect of thiol structures on reduction of hair, *J. Soc. Chem. Jpn.*, **32**, 43-51 (1998).
 - Ogawa S., Fujii K., Kaneyama K., Arai K. Action of thioglycolic acid and L-cysteine to disulfide cross-links in hair fibers during permanent waving treatment, *Sen'i Gakkaishi*, **64**, 137-144 (2008).
 - Onifade A. A., Al-Sane N. A., Al-Musallam A. A., Al-Zarban S. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources, *Bioresource Technology*, **66**, 1–11 (1998).
 - Robbins C. R., Crawford J. Cuticle damage and the tensile properties of human hair, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 59–67 (1991).
 - Robbins C. R. “*Chemical and Physical Behavior of Human Hair*”, Harbison J.(Eds), 3rd ed, Springer-Verlag, New York, p30 (1994).
 - Rouse J. G., Dyke M. E. V. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications, *Materials*, **3**, 999–1014 (2010).
 - Sakurai K., Joko K. Effects of some relaxation treatments on the waving performance of the permanent waving procedure of human hair, *Sen'i Gakkaishi*, **66**, 272-279 (2010).
 - Sato K., Tsukamasa Y., Imai C., Ohtsuki K., Shimizu Y., Kawabata M. Improved

- method for identification and determination of ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by high-performance liquid chromatography separation, *J. Agric. Food Chem.*, **40**,806-810 (1992).
- Scanavez C., Joeques I., Zahn H. Extractable substances from human hair: a discussion about the origin of the holes, *Colloids Surf. B*, **39**, 39–43 (2004).
 - Schrooyen P. M. M., Dijkstra P. J., Oberthur R. C., Bantjes A., Feijen J. Partially carboxymethylated feather keratin. 1. properties in aqueous systems, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4326–4334 (2000).
 - Silva C. J. S. M., Vasconcelos A., Cavaco-Paulo A. Peptide structure: its effect on penetration into human hair, *J. Cosmet. Sci.*, **58**, 339–346 (2007).
 - Suzuta K., Ogawa S., Takeda Y., Kaneyama K., Arai K. Intermolecular disulfide cross-linked structural change induced by permanent wave treatment of human hair with thioglycolic acid, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **63**, 177-196 (2012).
 - Swift J. A., Chahal S. P., Challoner N. I., Parfrey J. E. Investigations on the penetration of hydrolyzed wheat proteins into human hair by confocal laser-scanning fluorescence microscopy, *J. Cosmet. Sci.*, **51**, 193–203 (2000).
 - Tamagawa S., Shintani H., Yoshioka M. Sorption and desorption of oligopeptide from hair, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, **27**, 469–473 (1993).
 - Tate M. L., Kamath Y. K., Ruetsch S. B., Weigmann H. D. Quantification and prevention of hair damage, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **44**, 347–371 (1993).
 - Tsobkallo K., Aksakal B., Darvish D. Analysis of the contribution of the microfibrils and matrix to the deformation processes in wool fibers, *J. Appl. Polym. Sci.*, **125**, E168–E179 (2012).
 - Ullah A., Vasanthan T., Bressler D., Elias A. L., Wu J. Bioplastics from feather quill. *Biomacromolecules*, **12**, 3826-3832 (2011).
 - Washika S., Yoshii N., Fukuta S., Nishiyama S., Umemoto S., Asano Y., Kawahara Y. Effects of the treatments with the peptides extracted from human hairs on the physical properties of bleached human hair, *Sen'i Gakkaishi*, **68**,14-17 (2012).
 - Worlfram L. J., Lindemann M. K. O. Some observations on the hair cuticle, *J. Soc.*

Cosmet. Chem., **22**, 839-850 (1971).

- Wortmann F. J., Kure N. Bending relaxation properties of human hair and permanent waving performance, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **41**, 123-139 (1990).
- Wortmann F. J., Kure N. Effects of the cuticle on the permanent wave set of human hair, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **45**, 149-158 (1994).
- Zahn H., Hilterhaus S., Strubmann A. Bleaching and permanent waving aspects of hair research, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **37**, 159-175 (1986).
- Zoccola M., Aluigi A., Tonin C. Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes, *J. Mol. Struct.*, **938**, 35-40 (2009).
- 野村義宏,相原道郎,中島大輝,見城静司,佃光明,津田祐一,可溶化ケラチンの製造法,特許 2008-154843 (2006).

謝辞

本論文の作成にあたり長きに亘りご指導賜りました東京農工大学農学部教授野村義宏博士に心より感謝申し上げます。また、貴重な助言とご指導を頂きました東京農工大学農学部教授 西山敏夫博士ならびに宇都宮大学農学研究科教授 東徳洋博士に感謝申し上げます。

本論文の精読と批評をして頂きました茨城大学農学部教授 米倉政実博士ならびに東京農工大学農学部 三浦豊博士に御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、御協力を頂きました京都大学生存圏研究所教授杉山淳司博士に御礼申し上げます。

最後に、現職場 東洋羽毛工業株式会社 柳場弘取締役社長、ケラチン事業部 見城静司部長をはじめ部員の皆様に御礼申し上げます。