

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360375

研究課題名(和文) 廃棄生体組織を利用したセルフリサイクル技術の開発

研究課題名(英文) Development of self-recycling technology for reuse of biomedical tissues

研究代表者

藤井 敏弘 (FUJII, Toshihiro)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：50126702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,500,000円

研究成果の概要(和文)：“生体組織を利用したセルフリサイクル技術の開発”のテーマで実施した。生体組織としてはヒト毛髪を選択した。この理由は、簡便に採取でき、自身の体の一部を原料にするために生体適合性が高く、安心な加工品の作製が期待できるからである。自己集合できる性質を利用して作製した毛髪ケラチンフィルムは、UVとパーマ処理に加えて、ブリーチ、加熱、カラーリングおよび摩擦処理に対して、毛髪と類似した反応性を示した。このフィルムは化粧品を効率的に開発するための代替毛髪として利用できる。次に、ゾル-ゲル変化が繰り返すことにより、ケラチンゲルを作製する技術を開発し、環境の応答性を示すためDDS用基材としての利用が考えられる。

研究成果の概要(英文)：A study was advanced on the theme of "Development of self-recycling technology for reuse of biomedical tissues". Human hair is adopted as the target material, because some biochemical and medical products can be actually prepared from part of ourselves. Furthermore, we utilized the characteristic of the self-organization of hair keratin filaments, because this approach will be safe and highly biocompatible.

Base on these ideas, keratin film was prepared from human hair proteins. This film exhibited similar responsibilities to hair tissue to the bleach, heating, color and friction treatments as well as UV and perm treatments. Thus, keratin film will be used as a substitute device for human hair to develop cosmetics efficiently. We also prepared a keratin gel which excels transparency when a sol change was repeated. The keratin gel will be used as a substrate material of drug delivery system of the environmental response type.

研究分野：生体高分子、生体材料工学

キーワード：セルフリサイクル 安全・安心材料 廃棄生体組織 再生・再利用 刺激応答材料 薬物送達基材 毛髪代替染色材料 水評価

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は2002年から「セルフリサイクル」の概念を提唱して、これを実証する研究・開発を進めている。この概念に基づいて作られるものを“セルフリサイクル製品”と名付け、「動物や他者の生体組織・材料を使わず、本人由来の生体物質（組織、成分）を原料として、本人が使用するための品」と定義した。また、これに必要な技術を“セルフリサイクル技術”と呼んでいる<sup>(①)</sup>。この原材料として毛髪と爪、特に毛髪組織に注目した。この理由として、毛髪は多くの人にとって廃棄している生体物質であることに加え、血液と比べて採取する負担が小さく、爪と比べて大量に入手が可能である。これをフィルム、ゲル、微粒子、ファイバーなどへと加工する技術を開発すれば、安全・安心で生体適合性に優れた医用基材への開発につながる考えた。

(2) 最近のトピックスとして、人工多機能性幹細胞（iPS）の樹立とその応用があげられる。これは「自分由来の細胞で、自分を治療する技術」であるため、移植医療に代わる再生医療として注目され、多額の予算が投入されている。一方、「国民医療費」は40兆円にもおよび、毎年の増加額は約1兆円と報じられている。この一因としては、MRI、内視鏡などの診断や治療に使用している「高度医療技術」の進歩が挙げられている。iPS細胞などがセルシートや組織などに加工され、治療に利用できるようになれば福音となるが、さらなる医療費を国民に負担させることになる。今後、低コストで品質の高い医療用の材料と診断・治療技術を社会が求めてくることが想定できる。

## 2. 研究の目的

(1) 医薬品や化粧品分野での動物を使用しない代替法による試験や、アレルギー体質の増加は、人に優しいバイオ製品を求めている。自己由来の毛髪を安全・安心なパーソナ

ル型フィルム/シートとゲルに変換する技術の開発は、医療や美容への寄与など社会的な意義は高いと考えられる。

(2) 私たちは比較的大量に採取ができ、再生産される持続型資源の毛髪に注目している。この40~50%はケラチンから作られており、繊維構造を共通にもつ細胞骨格タンパク質の中間径フィラメントに属している。ケラチン単量体は自己集合し、直径10 nmの枝分かれがないフィラメントとなる。私たちが開発した信大法で抽出したケラチンは単量体と成っており、分解も極めて少ない。これに加えて、適度な溶液条件下では自己集合を引き起こし凝集体としてシャーレなどに回収できる。このためケラチン分子が構造に関わる機能を有していることを示しており、この方法で作られる加工品は高い生体適合性をもつことが想定できる。自己集合によるものつくりと評価を進めた。

(3) 人工皮膚は3つに大別されており、化粧品開発用から火傷、怪我、皮膚潰瘍、美容成形用まで利用範囲は広い。本課題では、ハードルが低い簡易皮膚代替物としてのフィルム/シートを中心としてゲルと合わせて、創傷被覆材などへの発展型加工品の創出を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 毛髪の特性を生かした、安心・安全で生体適合性に優れたパーソナルユースに対応できる皮膚代替フィルム/シートとケラチンゲルを創出する技術開発と、これらの加工品の評価系を構築し研究を進める。

(2) 化学的な処理履歴がないヒト由来の毛髪を、尿素、チオ尿素、還元剤から構成される信大法溶液で可溶化した。このサンプルは分解物が僅かで、主成分であるケラチンに加えて低分子量のケラチン結合タンパク質（KAPs）が含まれていた。この信大法溶液を改良してケラチンとKAPsを選択的に分離できる条件を試行し、ケラチン単独のフィルム

/シートとゲルの作製するために利用している。

(3) ケラチンフィルム/シートの作製は、毛髪タンパク質を酢酸と混合後に蒸留水を満たしたシャーレにキャストして作製するプレキャスト法と変成剤と還元剤の溶液条件から塩化ナトリウム、塩化マグネシウム溶液を満たしたシャーレにキャストするソフトポストキャスト法で作製した。ケラチンゲルは、低イオン強度下で凝集しない条件で毛髪タンパク質を抽出し、約 17%含まれているシステインの-SH 基を-S-S-結合へと結合させることにより作製した。

(4) ケラチンフィルム/シートの評価は、還元-酸化応答性（還元剤と酸化剤による耐性、外観、透過性、微細構造、質量変化、溶出性とその成分分析）、熱感受性（耐熱性、色差計による着色性、タンパク質の溶解性）、摩擦と吸着（界面活性剤処理の耐性、摩擦感テスターによる摩擦測定、EDS と FT-IR による吸着成分の分析）、ヘアカラー剤による着色と退色（染色剤処理への耐性、色差計と分光光度計による着色分析、FT-IR によるシステイン酸の分析、水による退色性）を行い、ヘアケア製品の開発用の代替毛髪への応用を展開している(2)。ケラチンゲルは、ゲル成分の分析、保水性、高分子の保持と放出の試験を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ケラチンフィルムの作製と性質を中心に成果が得られた。前者においては、シャーレ類などの支持体上での形成に加えて、天然成分との組合せによる剥離型フィルムの成型ができるようになり、成型面から人工皮膚への利用と熱感受性などへの展開が可能となった。また、従来までの白色/不透明とは異なる薄茶色/透明型フィルムの形成が可能となった(図1)。後者においては、従来型ケラチンフィルムを中心とした還元-酸化応答性とそれを利用した環境応答性をもつフ

ィルムへの展開。界面活性剤への耐性、触感に通じる摩擦応答、吸着性を示すことを見出し、それを利用したシャンプー類の評価と皮膚/肌への展開。新型ケラチンフィルムの透明性を利用したカラー剤による染色にとどまらず、退色評価へも展開することができた。一方、ケラチンゲルは化学架橋剤を使わず還元-酸化応答性を利用して作製ができるようになり、他のタンパク質をゲル内に封入してその遊離への基礎試験の段階に入ることができた。

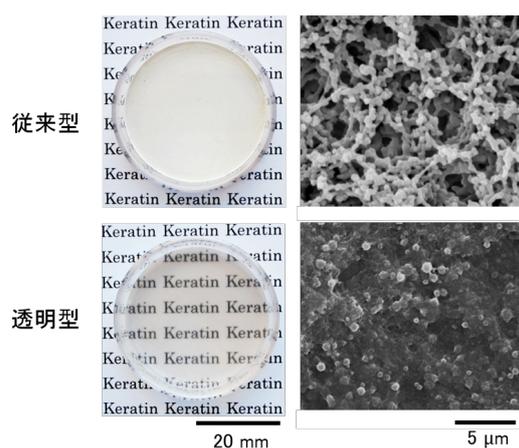


図1 2種類のケラチンフィルムの外観とSEM像

(2) 毛髪のタンパク質面からの特徴として、システイン含量が高いことと直径 10 nm のフィラメントを集合した繊維構造をとることができる点にある(3)。システインからもたらされる高次繊維構造体の形成と維持は-S-S-結合による寄与が大である。このため、ケラチンフィルムを還元剤で処理して-S-S-結合を切断すると、不透明な状態から透明なフィルムへと変化した。興味深いことに、これを酸化処理すると元の不透明フィルムへと戻った(図2)。不透明状態における数百ナノメートルの粒子/フィラメントからなる特有の微細構造は、還元による透明状態では滑らかな構造体に変化して、さらなる酸化処理により元の構造体へ戻る可逆的な変化が観察された。毛髪の場合と同様に、還元状態における KAPs のみの選択的な遊離がフィルムにおいても簡便に検出できることから、へ

アダメージの指標としての活用が考えられる(④)。還元-酸化に応答した透明-不透明性と微細構造の変化はフィルムを 170°C以上で 10 分間加熱すると消失した(図 2)。



図 2 還元-酸化応答性と加熱前処理の影響

(3) 不透明型と透明型ケラチンフィルムをシャンプー類で処理して、外観、微細形態、質量面で調べたところ、変化はほとんど見られなかった。平均摩擦係数 (MIU) 測定において、両フィルムは毛髪よりも高感度で有意な低下が生じていた(図 3)。フィルムは吸着能をもつこともあり、毛髪に加えて皮膚/肌をモデルとした生体材料としての可能性も示されてきている。

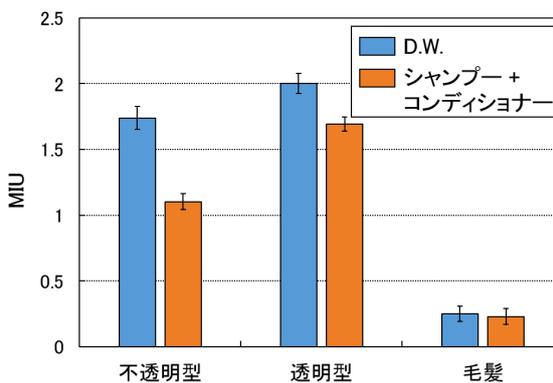


図 3 MIU 値とシャンプー類処理の影響

(4) ケラチンゲルは化学架橋剤の添加により形成されるが、弱還元状態下で可溶化しているケラチン水溶液に酸化剤を添加することにより綺麗なハイドロゲルが形成されることがわかってきた(図 4)。多様なフィルム/シートとゲルの形成とその形態や諸性質と利用への入り口段階は達成できたため、香

粧品領域での活用を基盤として、個別対応可能なパーソナル型簡易型人工皮膚への段階に展開していく予定である。

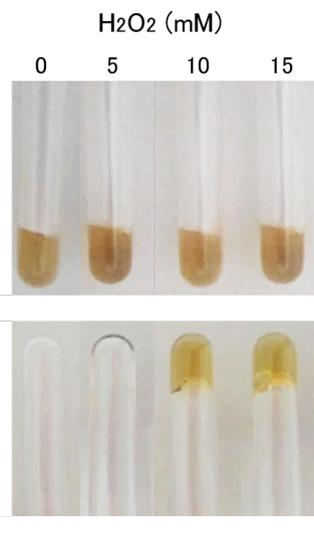


図 4 過酸化水素濃度とゲル形成

〈引用文献〉

- ① 藤井敏弘, 小林俊一: セルフ-リサイクルに向けたヒト毛髪タンパク質からの個人対応材料の開発. 日本香粧品学会誌, 30, 2006, 5-9
  - ② 藤井敏弘: 毛髪から作られるケラチンフィルム. コンパーテック, 10, 2014, 97-101
  - ③ Robbins C.R.: "Chemical and physical behavior of human hair" 4th ed., Springer-Verlag, New York, 2002, 1-473
  - ④ Inoue T., Ito M., Kizawa, K.: Labile proteins accumulated in damaged hair upon permanent waving and bleaching treatments. J. Cosmet. Sci., 53, 2002, 337-344
5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
- [雑誌論文] (計 13 件)
- ① Fujii T., Takashima Y., Takayama S., Ito Y, Kawasoe T.: Effects of heat treatment on human hair keratin film. J.

Jpn. Cosmet. Sci. Soc., 査読有り, 37(3).  
2013, 165-170

- ② Fujii T., Takayama S., Ito Y.: A novel purification procedure for keratin-associated proteins and keratin from human hair. J. Biol. Macromol., 査読有り, 13(3), 2013, 92-106
- ③ Fujii T., Ito Y., Watanabe T., Kawasoe T.: Effects of oxidative treatments on human hair keratin films. J. Cosmet. Sci., 査読有り, 63(1), 2012, 15-25
- ④ Fujii T.: Hair keratin film as a substitute device for human hair; Application in hair care science. J. Biol. Macromol., 査読有り, 12(1), 2012, 3-15

[学会発表] (計 30 件)

- ① 藤井敏弘、林香、猪股良平、伊藤弓子：ケラチン結合タンパク質を欠いたヒト毛髪ケラチンフィルムの作製とその性質；第 135 回日本薬学会講演要旨集 28PB pm132/P173 (2015) デザインクリエイティブセンター 兵庫県 神戸市
- ② 藤井敏弘、比嘉善一、伊藤弓子：プレキャスト法によるケラチン結合タンパク質を欠いたヒト毛髪ケラチンフィルムの作製とその性質；第 69 回繊維学会予稿集、69(1) 3H07 (2014) タワーホール船堀 東京都江戸川区
- ③ 藤井敏弘、伊藤弓子：毛髪由来のケラチン結合タンパク質の新しい調製方法とその応用；日本化粧品学会第 38 回学術大会講演要旨, 9 (2013) 有楽町朝日ホール 東京都千代田区
- ④ 藤井敏弘、伊藤弓子、高山俊輔、ライクマン桃代：加熱と還元処理がヒト毛髪ケラチンフィルムに与える影響；第 61 会高分子学会年次大会予稿集 61(1), 1788 (2012) パシフィコ横浜 神奈川県横浜

市

[図書] (計 1 件)

- ① 藤井敏弘、川副智行：技術情報協会 皮膚の測定・評価法バイブル, 毛髪の見えないダメージを可視化したい, 2013 740 (323-328)

[その他]

ホームページの新設

<http://fiber.shinshu-u.ac.jp/fujii-lab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 敏弘 (FUJII Toshihiro)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：50126702