

# ネイルケアに利用可能な加水分解ケラチン内包カゼイン骨格ミクروسフェアの開発及び基礎特性評価

桑木 貴之 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, k0499294@kadai.jp)  
 福島 真理成 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, k3799997@kadai.jp)  
 大角 義浩 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, ohzuno@ms.kagoshima-u.ac.jp)  
 幡手 泰雄 (株式会社 MC ラボ, mc-labo@nifty.com)  
 塩盛 弘一郎 (宮崎大学 工学部, shiomori@cc.miyazaki-u.ac.jp)  
 清山 史朗 (都城工業高等専門学校 物質工学科, shiroh@miyakonojo-nct.ac.jp)  
 武井 孝行 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, takei@cen.kagoshima-u.ac.jp)  
 吉田 昌弘 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, myoshida@cen.kagoshima-u.ac.jp)

## Preparation and characterization of hydrolyzed keratin-loaded casein microspheres for nail care

Takayuki Kuwaki (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)  
 Marina Fukushima (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)  
 Yoshihiro Ohzuno (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)  
 Yasuo Hatate (MC Labo Co., Ltd., Japan)  
 Koichiro Shiomori (Faculty of Engineering, University of Miyazaki, Japan)  
 Shiro Kiyoyama (Department of Chemical Science and Engineering, Miyakonojo National College of Technology, Japan)  
 Takayuki Takei (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)  
 Masahiro Yoshida (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

### 要約

ネイル文化の浸透に伴って、マニキュアや除光液中の薬剤による爪の色素沈着やひび割れなどの事例が増加している。一度傷ついた爪は自己修復が不可能であるため、適切なケアが必要である。現在、爪の主成分であるケラチンの加水分解物が注目されている。加水分解ケラチンは、酸性下で瞬時に凝集するという特性を持つことから、加水分解ケラチンを爪に塗布し、酸性下で爪上に固定化することで傷ついた部分を補修および保護できると考えられる。しかし、加水分解ケラチンは特異的な臭いを持ち、固体粉末状でも“ベタつき”があるため、ハンドリング性に問題がある。本研究では、この問題を解決するために、加水分解ケラチンを内包したミクロスフェア(MS)を調製した。MSの壁材には、生体由来のタンパク質であり、安全性の高いカゼインを使用した。MSは、water-in-oil(W/O)エマルジョン系での水相中の加水分解ケラチンおよびカゼインをグルタルアルデヒドによって架橋することにより調製した。はじめに、MSの凍結乾燥時の凍結温度がMSの構造および力学的強度に与える影響について調査した。MSの断面観察により、凍結温度が高い場合(-20℃)では、膜厚が厚く、内部に大きな空孔が観察された。凍結温度が低い場合(-196℃)では、膜厚が薄く、小さな空孔が数多く観察された。圧縮強度測定において、凍結温度を低くすることでMSの強度が低くなることが確認された。また、その破断荷重は、成人のピンチ力(指で物をつまむ力)の最低値であると考えられる0.7 Nよりも低かった。つまり、-196℃で凍結乾燥したMSは誰でも容易に指で潰すことができることから、そのMSを傷やひび割れた爪の上で潰し、内包した加水分解ケラチンを傷ついた部位に塗布することで爪を補修できると考えられる。次に、W/Oエマルジョンの水相と油相の体積分率 $\Phi_{w/o}$ (水相体積/油相体積)がMSの特性に及ぼす影響を調査した。体積分率 $\Phi_{w/o}$ を増加させてもMSの回収率はほとんど変化しなかった。これより、本研究のMS調製法は、ネイルケア用加水分解ケラチン内包MSの効率的な大量生産法として有望であると考えられる。

### キーワード

圧縮強度, 加水分解ケラチン, カゼイン, ネイルケア, ミクロスフェア

### 1. はじめに

日本のネイル市場は年々拡大する傾向にある。その規模は、今日では年間2,000億円であり、ネイルサロンは日本全国に約1万5千店舗存在する(日本ネイリスト協会, 2010)。ネイル市場拡大の背景として、美容意識の向上や、女性の社会進出に伴う身だしなみの一部として、ネイル文化が浸透したことが挙げられる。世界最大のネイル市場を持つアメリカは1兆2,000億円の市場規模で、店舗数は約7万である。この両国の人口比率から比較すると、日本では拡大の余地のある市場だ

といえる。しかし、ネイル装飾の普及とともに増加すると考えられる問題として、爪にマニキュアやそれを落とす除光液を使用することによる色素沈着やひび割れなどが挙げられる(Guarneri et al., 2010)。これらが原因となり、爪の黄ばみや割れやすくなるという二次的問題も生じる。爪は一度傷つくとも自己修復が不可能である。そのため、爪の補修や保護に有効な成分を与えるなどの適切なネイルケアが必要である。現在、その有効成分としてケラチンの加水分解物が注目されている。ケラチンは爪や髪を構成する主要なタンパク質である(Endo et al., 2008)。加水分解ケラチンは、酸性下で瞬時に凝集するという特性を持つことから、加水分解ケラチンを爪に塗布し、酸性下で爪上に固定化することで傷やひびの入った部分の補修および保護ができると期待される。しかし、加水

分解ケラチンは特異的な臭いを有し、固体粉末状態でも“ベタつき”があるため、ハンドリング性に問題がある。

本研究では、加水分解ケラチンの問題点を克服するため、それを内包したマイクロスフェア (MS) の作製に取り組んだ。MS内に封入することにより、内包物の臭気を大幅に低減できることが広く知られている (近藤, 1990)。また、加水分解ケラチン特有の“ベタつき”も改善できると考えられる。さらに、粒子径の制御が可能となり、ハンドリング性の向上が期待できる。MS壁材材料として生体安全性の高いタンパク質であるカゼインを使用した (Song et al., 2009)。これまでに、water-in-oil (W/O) エマルジョンの水相中でタンパク質をグルタルアルデヒドにより架橋することによってMSを調製する方法が報告されている (Ghosh et al., 2009; Latha and Jayakrishna, 1994; Latha et al., 1995; Lee and Rosenberg, 1999)。本研究では、同様に、W/Oエマルジョンを用い、カゼインおよび加水分解ケラチンをグルタルアルデヒドにより架橋することでMSを調製し、その基礎特性評価を行った。特に、MSの凍結乾燥時の凍結温度とその強度の関係について調査した。

## 2. 実験

### 2.1 試薬

ヘキサン、ソルビタンモノオレエート、25%グルタルアルデヒド水溶液、カゼイン、水酸化ナトリウムは和光純薬工業株式会社製のもの、加水分解ケラチンは福元技研株式会社より提供されたものを使用した。

### 2.2 MSの調製

図1にMSの調製スキームを、図2にカゼインのアミノ酸残

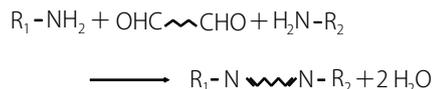


図2：カゼインのアミノ酸残基とグルタルアルデヒドとの架橋反応機構

基とグルタルアルデヒドとの架橋反応機構を、表1にMSの調製条件を示す。水相総重量に対し、8.0 wt%になるようにカゼインを蒸留水に加えた。カゼインを溶解させるために0.5 M水酸化ナトリウム水溶液を加え、水溶液のpHを8.0に調整した。続いて、水相総重量に対し、6.7 wt%となるように加水分解ケラチンをこの水溶液に溶解した (水相)。ヘキサン 131 gに1.0 wt%のソルビタンモノオレエートを溶解させた (油相)。ジャケット付き三口セパラブルフラスコ (容量1,000 ml、口内径120 mm、VIDREX製)に油相を加え、テフロン製4枚羽根攪拌翼を用いて、200 rpm (NZ-1000、EYERA製)、温度25℃で攪拌を行った。その油中に水相を滴下し、3 min攪拌し、W/Oエマルジョンを調製した。その後、架橋剤水溶液である25%グルタルアルデヒド水溶液 (添加相、表1参照)を、カゼインの重量に対して6.6倍添加し、1 h架橋反応を進行させた。続いて、調製したMSを濾過により回収した後、200 mlの温水 (60℃)で5回洗浄した。MSを冷凍庫 (-20℃)内で12 h静置、または液体窒素 (-196℃)中に15 min浸すことでMSを凍結した後、24 h真空乾燥を行った。回収したMSの回収率を以下の定義式により算出した。ここで、Rは回収率(%)、Qは回収したMSの重量(g)、 $W_k$ は仕込み加水分解ケラチン重量(g)、 $W_c$ は仕込みカゼイン重量(g)である。

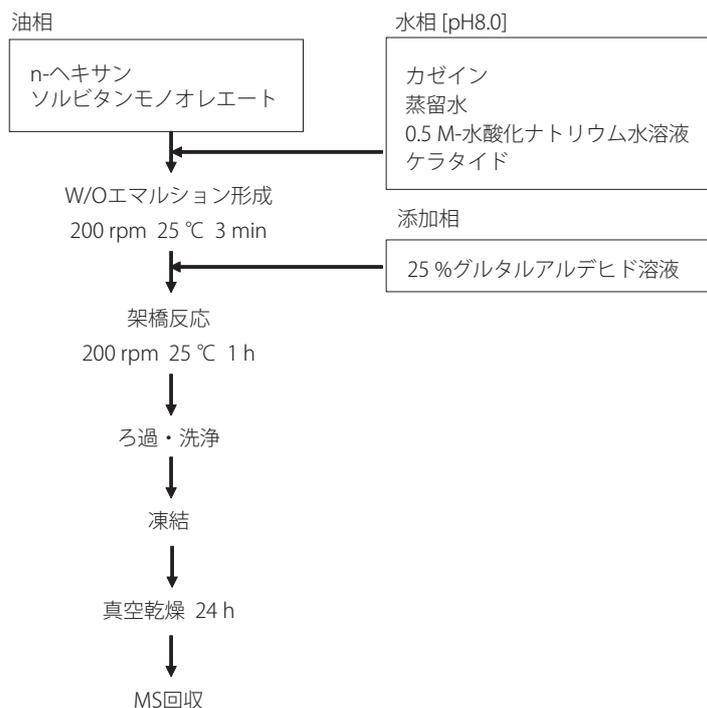


図1：MSの調製スキーム

表1：MSの調製条件

サンプル名		A	B	C	D	E	F	G
水相	カゼイン(g)	1.2		1.7	3.4	4.3	5.2	6.9
	蒸留水(g)	10.8		15.3	30.6	38.7	46.8	62.1
	0.5 M-水酸化ナトリウム水溶液(g)	2.0		2.8	5.6	7.1	8.4	11.1
	加水分解ケラチン(g)	1.0		1.4	2.8	3.6	4.3	5.8
	pH	8.0						
	体積(ml)	14.0	20.0	40.0	50.0	60.0	80.0	
油相	ヘキサン(g)	131.0						
	ソルビタンモノオレエート(g)	1.3						
	体積(ml)	200.0						
体積分率 φw/o (g)		0.07	0.10	0.20	0.25	0.30	0.45	
添加相	25 % グルタルアルデヒド水溶液(g)	7.9	11.2	22.4	28.3	34.2	45.4	

$$R = Q \times 100 / (W_k + W_0) \quad (1)$$

### 2.3 走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察

SEM (S-3000N、日立製) を用いて調製したMSの表面および断面の形態観察を行った。

### 2.4 実体顕微鏡観察

実体顕微鏡 (SMZ1500、Nikon 製) を用いてMSの形態観察を行った。

### 2.5 平均粒子径測定

実体顕微鏡で撮影した写真より200個のMSの粒子径を測り、その平均粒子径を算出した。

### 2.6 圧縮試験

テンシロン万能試験機 (RTC-1210A型、株式会社エー・アンド・ディ製) を用い圧縮試験を行った。MS 1個に対し圧縮速度1.0 mm/minで圧力をかけ、MSの破断が観察されるまで圧縮を続けた。この試験にはサンプルAおよびB (表1参照) の粒子径450 ~ 550 μmのMSを使用した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 凍結温度の影響

本研究では、傷やひび割れた爪の上で加水分解ケラチン内包MSを潰し、その内包物を傷やひび割れた部位に塗布することで、爪を補修することを想定している。従って、開発を目指すMSは指で潰すことのできる低強度なものでなければならない。そこで最初に、MSの凍結温度 (-20 °C または -196 °C) がMSの強度に及ぼす影響を検討した。表2にMSの回収量、回収率および平均粒子径を示す。凍結温度を変化させてもそれらの値に大きな変化はなかった。図3にMSのSEM観察写真を、図4にMSの実体顕微鏡観察写真を示す。凍結温度 -20 °C で調製したMSの膜厚は厚く、内部に大きな空孔 (直

表2：凍結温度がMSの回収量、回収率および平均粒子径に及ぼす影響

サンプル名	A	B
回収量(g)	1.5	1.4
回収率(%)	69	63
平均粒子径(μm)	566 ± 93	545 ± 71

径: 数百 μm) が観察された (図3(b))。一方、凍結温度 -196 °C で調製したMSの膜厚は薄く、断面には小さな空孔 (直径: ~ 40 μm) が数多く観察された (図3(d))。この内部構造変化の理由として、凍結温度の違いに起因したMS内部の氷結晶サイズの違いが考えられる。これについて以下に考察する。高分子ヒドロゲルなどの水を溶媒とする物質を凍結する場合、はじめに、被凍結物質の内部に微小な氷結晶が生成する (Yokoyama et al., 1986)。続いて、それら氷結晶が成長・合一し、大きな氷結晶が生じる。氷結晶は水分子のみから構成されるため、高分子は氷結晶内には組み込まれず、氷結晶の外の液体状態の水の中に排除され、その部分における高分子濃度が劇的に上昇する。ゲル中にグルタルアルデヒドなどの高分子架橋剤が含まれている場合、その濃縮部で高分子が強固に架橋され、それがマトリクス部分となる。真空乾燥などにより、氷結晶を除去すると、その部分は空孔となる。凍結温度が高い (-20 °C) と、対象物が完全に凍結するまでに時間がかかるため、その間、氷結晶が徐々に成長・合一でき、結果として大きな氷結晶が生じる。一方、凍結時の温度が低い場合 (-196 °C) には、早期に物質が完全に凍結してしまうため、氷結晶は十分に成長できず、その結晶サイズは小さい。今回採用した2つの凍結温度においても上記と同様の機構によりMS内部の孔のサイズに違いがあったと考えられる。

図5に強度測定結果を示す。-20 °C または -196 °C で凍結したMSの破断荷重はそれぞれ、2.3 N または 0.5 N であった。こ

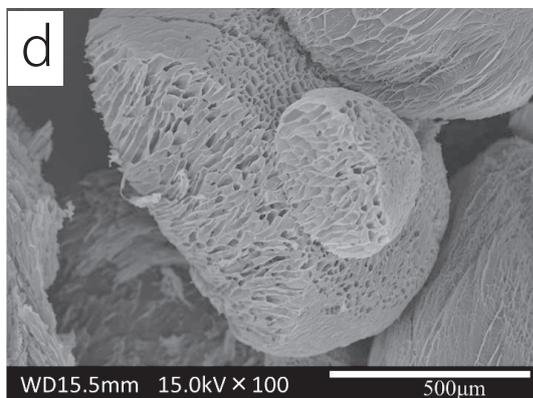
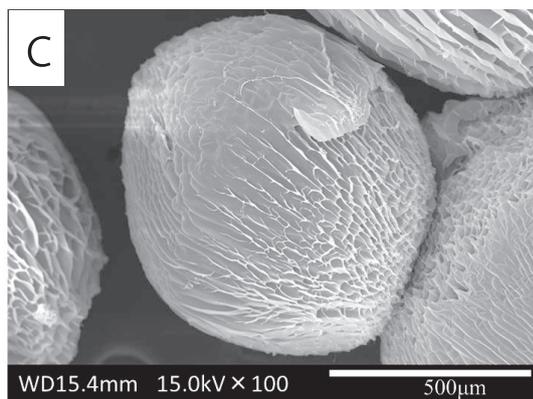
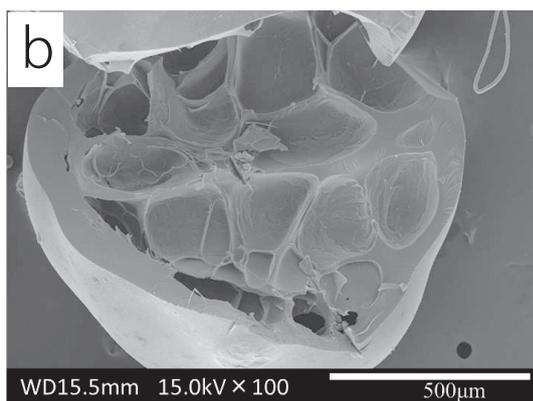
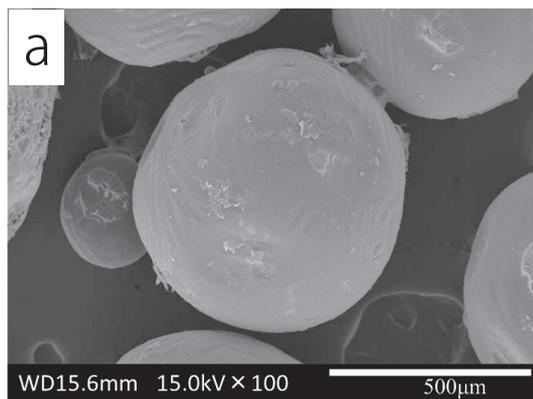


図3：-20℃で凍結させたMSの(a)表面または(b)断面および-196℃で凍結させたMSの(c)表面または(d)断面のSEM写真

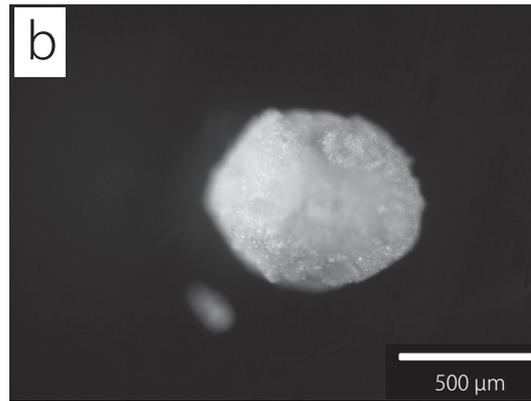
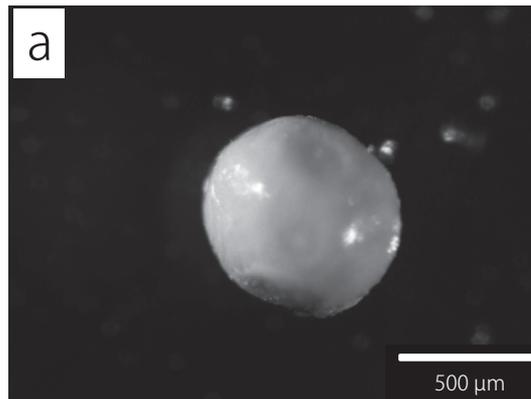


図4：(a) -20℃または(b) -196℃で凍結させたMSの実体顕微鏡写真

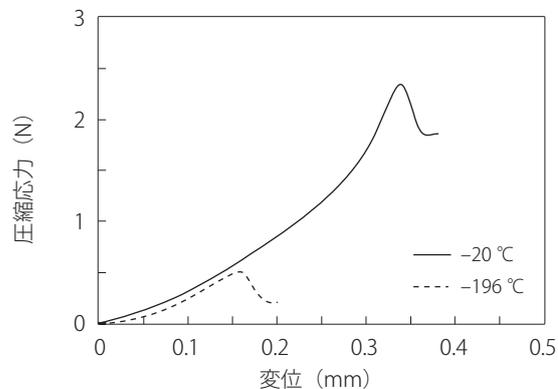


図5：凍結温度がMSの力学的強度に及ぼす影響

れより、凍結温度を低くすることでMSの強度が低くなるということが明らかとなった。これは、図3(d)に示すように、MSのマトリクス部位が薄く脆弱であったためだと考えられる。本研究では指の上で潰すことができる低強度なMSの作製を目的としている。成人のピンチ力(指で物をつまむ力)は、健康状態に大きく依存するが、その最低値は0.7 N程度であると考えられる(安田他, 2010)。凍結温度が低い場合(-196℃)のMSの破断応力は上述のとおり0.7 N以下であることから、このMSは誰もが潰すことのできる低強度のものであるといえる。よって、以降は凍結温度として-196℃を採用した。なお、水相に加水分解ケラチンのみを溶解させた場合、MSは調製

できなかった。一方、水相にカゼインのみを溶解させた場合には同様のMSを調製できた。この結果より、本研究のMSの調製には、カゼインの添加が必須であることが示された。

### 3.2 水相と油相の体積分率の影響

目的としたMSを効率よく調製するには、水相と油相の体積比を表す“体積分率 $\Phi_{w/o}$ ”が高い方が良い。そこで、体積分率がMSの基礎特性に及ぼす影響について検討した。図6に体積分率変化に伴うMSの回収量および回収率を、図7にMSの平均粒子径を示す。体積分率を変化させても回収率、平均

粒子径に大きな変化は見られなかった。このように、体積分率を増加しても回収率が下がることはなかったことから、本カプセル調製法は、MSの効率的な大量生産法として有望であると考えられる。また、水相にカゼインのみを添加した条件で調製したMSの回収率は $95 \pm 1\%$ であった。加水分解ケラチンを内包した場合も、カゼインの回収率が95%と仮定して、加水分解ケラチンの内包効率(=回収したMS内に含まれる加水分解ケラチン重量 $\times 100$  / 仕込みの加水分解ケラチン重量)を算出した(図8)。その値は20~31%であり、これより調製したMSは15~21 wt%の加水分解ケラチンを含んでいると考えられる(図8)。

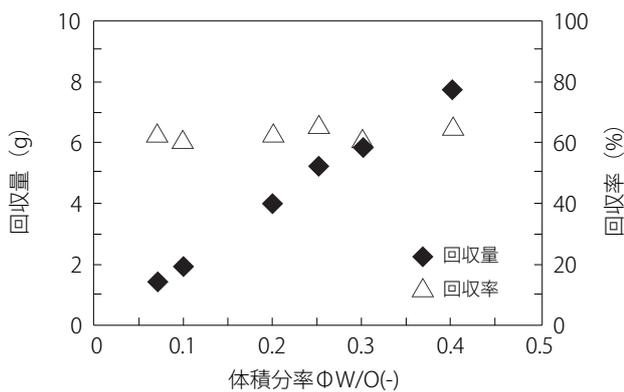


図6：体積分率 $\Phi_{w/o}$ とMSの回収量および回収率の関係

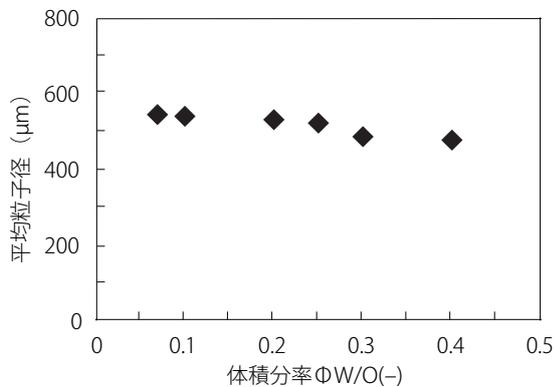


図7：体積分率 $\Phi_{w/o}$ とMSの平均粒子径の関係

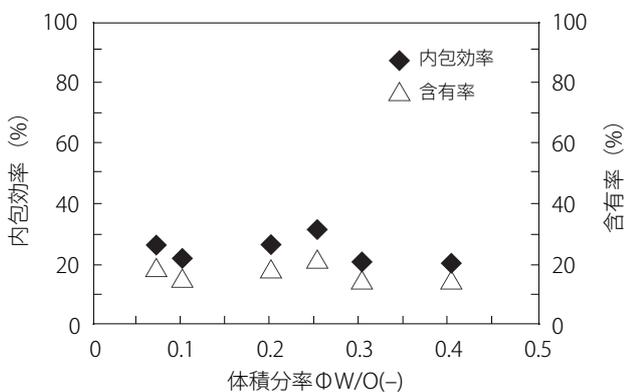


図8：体積分率 $\Phi_{w/o}$ と加水分解ケラチンの内包効率および含有率の関係

### 4. まとめ

本研究では、カゼインを壁材とした加水分解ケラチン包括MSを調製した。MSの凍結乾燥時の凍結温度を下げることで、指で潰すことのできる低強度なMSを調製できた。また、体積分率 $\Phi_{w/o}$ を上げても回収率が大きく変化しないことを確認した。本MSは傷やひび割れた爪の修復材として有望である。

### 謝辞

加水分解ケラチンは株式会社福元技研にご提供頂いた。ここに付記して謝意を表す。

### 引用文献

- Endo, R., Kamei, K., Iida, I. and Kawahara, Y. (2008). Dimensional stability of waterlogged wood treated with hydrolyzed feather keratin. *Journal of Archaeological Science*, Vol. 35, No. 5, 1240-1246.
- Ghosh, A., Ali, M. A. and Dias, G. J. (2009). Effect of cross-linking on microstructure and physical performance of casein protein. *Biomacromolecules*, Vol. 10, No. 7, 1681-1688.
- Guarneri, F., Guarneri, C. and Cannavò, S. P. (2010). Nail-art and cobalt allergy. *Contact Dermatitis*, Vol. 62, No. 5, 320-321.
- 近藤保(1990). 最新マイクロカプセル化技術 初版. 総合技術センター.
- Latha, M. S. and Jayakrishna, A. (1994). Glutaraldehyde cross-linked bovine casein microspheres as a matrix for the controlled release of theophylline: in-vitro studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol.46, No. 1, 8-13.
- Latha, M. S., Rathinam, K., Mohanan, P. V. and Jayakrishna, A. (1995). Bioavailability of theophylline from glutaraldehyde cross-linked microspheres in rabbits following oral administration. *Journal of Controlled Release*, Vol. 34, No. 1, 1-7.
- Lee, S. J. and Rosenberg, M. (1999). Preparation and properties of glutaraldehyde cross-linked whey protein-based microcapsules containing theophylline. *Journal of Controlled Release*, Vol. 61, No. 1-2, 123-136.
- 日本ネイリスト協会 (2010). ネイル白書 第2版. 日本ネイリスト協会.
- Song, F., Zhang, L., Yang, C. and Yan, L. (2009). Genipin-cross-linked casein hydrogels for controlled drug delivery. *Interna-*

---

*tional Journal of Pharmaceutics*, Vol. 373, No. 1-2, 41-47.

安田直史・村田伸・村田潤 (2010). 軽度要介護後期高齢者女性の手指運動機能と手指筋力・感覚・反応時間との関連. *理学療法科学*, Vol. 25, No. 3, 469-472.

Yokoyama, F., Masada, I., Shimamura, K., Ikawa, T. and Monobe, K. (1986). Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting. *Colloid and Polymer Science*, Vol. 264, No. 7, 595-601.

(受稿：2013年3月29日 受理：2013年4月9日)