マイクロビームX線を用いた毛髪キューティクル中の細胞膜複合体構造の解析

太田 昇¹, 八木直人¹, 八田一郎^{1,2}

1財団法人高輝度光科学研究センター、2福井工業大学工学部原子力技術応用工学科

¹〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1、²〒910-8505 福井県福井市学園 3-6-1

キーワード: 毛髪、キューティクル、マイクロビームX線回折

要旨: 高密度なマイクロビームX線を用いた小角回折実験は,複雑な構造体を含む試料から目的の構造体の散乱だけを観測できるので,数ミクロン厚の毛髪キューティクル中の細胞膜複合体(CMC)構造を調べる強力なツールとなる。CMCは、 β 層、 δ 層および β 層の3層構造で形成されている。CMCの β 層および δ 層の厚さを見積もるための定量的な解析法を提案する。

1. はじめに

放射光施設が20世紀後半に登場し,高い指向性お よび高い輝度のX線が利用できるようになった。さら に第三世代放射光施設によりミクロンオーダーのX線 ビーム径が得られるようになり,局所領域の回折実験 に用いられるようになった(マイクロビームX線回折)。 これは,細い高密度なX線ビームを目的とする微細領 域だけに照射すれば,その他の構造体による散乱を抑 えられ,質の良いデータが得られるためである。毛髪 に限れば,X線回折は20世紀前半にはすでに行われて いた。毛髪束,1本の毛髪,毛髪の局所構造のように 微小領域からの散乱を得る工夫がなされてきた歴史と いってもいい。マイクロビームX線を用いた毛髪キュ ーティクルからの散乱実験はその典型であろう。今回, 主としてその解析と応用について解説する。

2. 毛髪のX線回折

哺乳類の毛は直径 10~250 µm であり、アジア系の ヒト毛髪では直径 45~125 µm である。¹⁾ 毛髪の大部分 はコルテックスと呼ばれる組織から成り、ここでは分 化した多角形の細胞が毛軸方向(毛の伸びる方向)に 伸びている。細胞内部ではハード α ケラチン分子が毛 軸に沿って配列しており、階層的な充てん構造が形成 されている。²⁾ 毛髪の機械的性質はこのコルテックス 部で決まっている。⁸⁾ コルテックスのX線回折プロフ ァイルを Fig. 1 に示す。これは、Fig. 1 の挿入図に示す ように毛軸をほぼ水平にして記録したものである。ケ ラチン分子は 24 から 32 本集まって中間径フィラメン トと呼ばれる繊維を形成するが、それらの繊維間距離 に相当する回折ピークが縦方向(Fig. 1 の $\phi=0^\circ$ 、赤道



Fig. 1 A typical X-ray diffraction profile of cortex. Inset: schematic diagram of hair and X-ray.



Fig. 2 A typical X-ray diffraction profile of cuticle. Inset: schematic diagram of hair and X-ray.

方向と呼ぶ)に強く表れる。³⁾毛髪中心付近に位置す るメデュラは、ケラチン繊維の無い部分で、脂質など で満たされていることが多い。これは毛軸に沿って存



Fig. 3 Schematic diagram of the cross section of rat whisker and four regions denoted by I, II, III and III'. Cut, Cor and Md indicate cuticle, cortex and medulla, respectively.

在したりしなかったりする。これらのメデュラおよび コルテックスの構造は、キューティクルと呼ばれる扁 平化した細胞の積み重なりで被われている。これは, 内部構造を守るために存在していると考えられる。キ ューティクルのX線回折プロファイルをFig.2に示す。 これは水平に置いた毛髪のエッジ領域にマイクロビー ムX線を照射して得られたもので、キューティクル細 胞は水平方向へ広がり垂直方向に積み重なっている。 キューティクル細胞は毛根から毛先に向かって 2~3° の傾きを持っており, 鱗状に張付いた外観をもつ (Fig. 11 挿入図にキューティクル細胞を模式化した)。毛髪 を手に取り2本の指で毛根から毛先に向かってしごい てみると、その逆方向のしごきよりも抵抗が小さいた めにキューティクルの存在と方向性を感じることがで きる。回折像においても、キューティクル (Fig. 2) と コルテックス (Fig. 1) の散乱ピークの傾きは約3°異な ることが分かる。要約すると、毛髪は中心からメデュ ラ、コルテックス、キューティクルと配置されており、 キューティクルとコルテックスは散乱プロファイルお よびその配向角度によって区別できる。

3. マイクロビームX線を用いた毛髪スキャン

高密度X線を持った SPring-8 の BL40XU⁴⁾ では,直 径 5 μm のピンホールを光路上に置くことで高フラッ クスのマイクロビームX線が得られる。⁵⁾ ラットの髭



Fig. 4 Peak intensity (closed circle) estimated in an intensity profile along a ring of Q=0.70 nm⁻¹ at each scanning position of *z*.



Fig. 5 Tilt angle (open circle, see Φ of Fig. 1) and FWHM (line) of an equatorial peak from cuticle estimated in an intensity profile along a ring of Q=0.70nm⁻¹ at each scanning position of *z*.

を水平方向に固定し、毛髪外から毛髪中心に向かい、 さらに毛髪外に向かって2μmステップで垂直に動か した。この髭は薄白色透明であり、光学顕微鏡下でメ デュラの空間が毛軸に沿って連続的に存在することを 確認できる。ラットの髭は、Fig.3に示すようにマイク ロビームX線回折によって4つの領域、キューティク ル(Cut)のI、キューティクルとコルテックス(Cor)のII、 コルテックスのIIIおよびコルテックスとメデュラ (Md)のIII'に分離できる。得られた回折像の1枚1枚か ら特定の散乱角における円周に沿った強度プロファイ ルを切り出す。そのプロファイルに対してピーク形状 をローレンツ関数と仮定して解析を行った。Fig.1およ びFig.2のQ=(4π/λ)sin(2θ/2)=0.70 (nm⁻¹)の点線で示され



Fig. 6 Peak intensity (closed triangle) in an intensity profile along a ring of Q=0.94 nm⁻¹ at each scanning position of *z*.

る散乱角は、中間径フィラメント間距離に由来する散 乱ピークと、キューティクルの2番目のピークが観察 される領域である。 λ (=0.08 nm)はX線の波長, 2 θ は散 乱角である。Fig. 4 には強度, Fig. 5 には赤道方向ピー クからの傾きと広がり(半値全幅(FWHM))をそれぞ れ示す。Fig. 4 では領域Ⅰ,Ⅱでは比較的強い強度ピー クを形成しており、領域Ⅱ、Ⅲ、Ⅲ, Ⅲ, ℃は比較的強度が 弱いことがわかる。また、領域ⅢおよびⅢ'の境界を明 確に区別することは難しいが、領域Ⅲ'では凹の強度変 化があるように見える。Fig.5の傾きと半値全幅の測定 では、領域 I では約3°あるいは約-3°に反射が傾いてお り、半値全幅は狭い。領域Ⅱ、Ⅲ、Ⅲ、11、へ移動するに従 い, 傾き角が 0°に近づき, かつ半値全幅が広がってい る。キューティクルとコルテックスの境界(領域Ⅱ) では、半値全幅の広いコルテックスの散乱が半値全幅 の狭いキューティクルの散乱と重なるために、コルテ ックスからの寄与が入ると半値全幅は傾き角よりも敏 感に変化する。したがって、キューティクルとコルテ ックスの区別には半値全幅が重要となる。

キューティクルの散乱がどの領域で見られるか、つまりどれほど内部の散乱に影響を及ぼしているかを見るために、*Q*=0.94 (nm⁻¹)の円周上の強度プロファイルの解析結果を Fig. 6 に示す。この散乱角はキューティクルにおける3番目の強度ピーク位置(Fig. 1)にあたるが、コルテックスでは目立った散乱ピークは得られない領域である(Fig. 2)。Fig. 6 は、ローレンツ関数で解析した結果を示す。領域 I、IIで強度ピークを形成している点は Fig. 4 と同様であるが、その内部の領域III、III、では強度変化は平坦である。したがって、II



Fig. 7 Peak positions (open symbols) and FWHM (line) of two equatorial peaks observed from cortex at each scanning position of *z*.



Fig. 8 Peak intensities (closed symbols) of two equatorial peaks observed from cortex at each scanning position of *z*.

とⅢの境界が区別でき、キューティクルとコルテック スの散乱が重なって観察される領域Ⅱが明瞭に識別で きる。これらの円周上の強度プロファイルに対する解 析によって、毛髪の回折像は4つの種類(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ およびⅢ')に分けられると解釈できる。

Fig. 3 に、上述の 4 つの領域と毛髪中のメデュラ (Md),コルテックス (Cor) およびキューティクル (Cut)の関係の模式図を示す。Fig.4 において、毛髪 外側からX線が毛髪内に入ると、まずX線ビームが通 過する部分のキューティクルの体積が増えるために散 乱強度が増える。毛髪中心へ向かうとキューティクル の体積は若干減るが、キューティクルの散乱強度が減 る主な理由は、下述のようなキューティクルの構造か ら、回折条件を満たせない部分の割合が増えるためで あろう。X線とキューティクル面が平行な角度からお およそ 35°以上傾くと、散乱条件を満たすキューティ クルは殆んどなくなる。キューティクルは一様な構造 体ではなく、方向性を持っているため、特定の方向か らX線を照射しないと回折が生じないのである。キュ ーティクルの解析においては、コルテックスからの散 乱の影響がない散乱像を用いなければならない。した がって、マイクロビームX線を用いてキューティクル のみの回折像を得て解析するためには、領域 I で最も 強い強度を得ることが必要な条件と考えている。

一方, コルテックスに関しては常に回折条件を満た すので,透過するX線上のコルテックスの体積が主に 散乱強度に寄与するとみなすことができる。例えば, Fig.4 の領域IIIで散乱強度が増えるのはX線ビームが 通過する部分の体積増加が原因であり,領域III,で凹型 の強度分布になるのはコルテックスの体積が空洞のメ デュラによって減少するためであると解釈できる。実 際,このようなコルテックスをドーナツ型のモデルを 用いX線にビームが通過する領域の体積計算すること によって,強度変化と同様の変化が得られる。これら 領域IIIおよびIII,では,前述のようにキューティクルの 明確なスポットは観察されないが,キューティクルは ごく僅かであるがX線の吸収等には寄与すると考えら れる。

領域ⅢおよびⅢ'の位置で得られた回折像(Fig. 1) で、毛軸に垂直な方向(赤道方向)に沿って±11°の範 囲で扇状に平均積算したプロファイルの解析結果を Fig. 7 および Fig. 8 に示す。コルテックス領域から得ら れた2つのピーク位置とその半値全幅を Fig.7 に、2 つのピークのピーク強度を Fig. 8 に示す。Fig. 7 の Q=1.3nm⁻¹のピークのプロットの近くにある令は,領 域Ⅲ'のところどころ見られる脂質に由来する散乱で ある (Fig. 8 では◆)¹¹⁾。しかしながら, 領域Ⅲ'では X線の光路上に毛髪のメデュラ、コルテックス、キュ ーティクルおよびキューティクル表面が存在し, 脂質 がどの領域に存在していたかを特定することは難しい。 ヒト毛髪の場合では、メデュラ領域に脂質が多く分布 していると報告されている。⁹ ラットの髭の場合には, クロロフォルム:メタノール(=2:1)溶液で長時間超 音波洗浄してもこの脂質の散乱が得られたので、X線 回折で解析される脂質がキューティクル表面にある可 能性は低いと我々は考えている。

この脂質以外のαケラチンの階層構造にも触れて みよう。*Q*=0.7nm⁻¹の散乱ピーク位置(Fig. 7の○)は

外側ほど散乱角が小さくなり、中間径フィラメント間 距離が増加していることが分かる。この領域において、 Fig. 5 では外側ほど傾き角が 0°よりずれている。した がって、毛髪の外側ほど中間径フィラメントが傾いて いるために、中間径フィラメント間距離が広がってい ると解釈できる。一方, Q=1.3nm⁻¹の幅広い散乱ピー ク位置(Fig. 7 の□)は外側でも殆んど変化していない。 Fig. 8 の強度分布に関しては Q=0.7nm⁻¹ (●) および *Q*=1.3nm⁻¹ (■) は、どちらもコルテックスの体積変化 にしたがって同様に変化している。毛髪外側において, Q=1.3nm⁻¹の強度 (Fig. 8 の■) が Q=0.7nm⁻¹の強度 (Fig. 8 の●)に比べて顕著に減少することはなく、かつ、 目立った半値全幅の増大もない。したがって、ラット の髭の場合、これら2つのピークは異なる階層構造、 つまり中間径フィラメント間距離に由来する散乱と, その内部構造(コイルドコイル構造を持つαケラチン 分子が2本合わさってプロトフィラメントを作り、こ れが 6~8 本集まって中間径フィラメントを形成して いる³⁾)に由来する散乱とに分けて解析することが必 要である。

4. キューティクルの構造解析

キューティクル以外の部分からの散乱が最も少な い回折像(Fig. 2)では,赤道線上 19.0nm(Q=0.33nm⁻¹), 9.7nm(Q=0.65nm⁻¹), 6.48nm(Q=0.97nm⁻¹), 4.89nm (Q=1.28nm⁻¹)の位置に回折ピークが見られる。この キューティクルの散乱プロファイルを解析するために, キューティクル中の内部構造モデル^{3.7)}を示す。

キューティクルは、動物種によってさまざまな厚さ をもつ。メリノウールでは1層ほどしかないが、ヒト においては約500 nmの厚さの扁平な角化細胞が約10 層積み重なっている。ヒトの角質細胞の場合、電子顕 微鏡写真では表面がうねっており、厚さのばらつきも 大きい。扁平化した厚さ 500 nm の角化細胞間は細胞 膜複合体 (CMC) と呼ばれ, 電子顕微鏡観察では特徴 的な3層構造を形成していることが知られている。3 層の中心層は、約15 nm 厚で、主に親水的なタンパク 質で形成されておりδ層と呼ばれている。このδ層の 両側に, 脂肪酸や極性脂質の他に細胞側のタンパク質 と化学的に結合する脂質を含む脂質層があり、β 層と 呼ばれ, それぞれ約5 nm の厚さがある。したがって, 電子顕微鏡観察で CMC は 25 nm ほどの厚さと見積れ る。その他に電子顕微鏡では、エキソキューティクル (扁平細胞の外側半分),エンドキューティクル(扁



Fig. 9 (a) Schematic diagram of the cross section of the cell membrane complex composed of β , δ and β layers, and outer bulk part composed of the cuticle cells in the centrosymmetric structure. (b) Electron density profiles, $\rho(x)$, of the cell membrane complex structure.



Fig. 10 Intensity given by $l(Q)Q^4$ as a function of Q for a rat whisker.

平細胞の内側半分), A レイヤー (CMC のエキソキュ ーティクル側 70 nm), i レイヤー (CMC のエンドキ ューティクル側の数 nm) などが観察されている。キ ューティクルから得られた回折像には,これらすべて の構造情報が含まれるが,回折ピークには脂質とタン パク質による層状でかつ高い電子密度差をもつ CMC 構造が主に寄与すると考えられる。

このような構造情報から CMC の解析モデルを立てた。要点は,(1)個々の CMC 構造は同じ構造である。

(2)約 500 nm の細胞を隔てた CMC 構造間において 干渉効果は生じない。(3) CMC は Fig. 9 に示すよう



Fig. 11 Schematic diagram of the cross section, functions and treatments of hair. Inset: longitudinal section of hair cuticle.

な脂質とタンパク質の電子密度分布を持つ。これらの 仮定のもとに計算された散乱プロファイルが Fig.10 の 青線である。ただし、CMC 以外の構造に関しては等方 的な散乱を与えるバックグラウンドとみなしている。 実際, Fig. 2 において特定の散乱角に対する円周上の強 度プロファイルは, CMC の散乱ピーク以外は平坦であ った。したがって、CMC 構造を解析するための散乱の バックグラウンドとしては、同じ散乱像でキューティ クルの散乱以外の領域の散乱を平均積算して用いてい る。そのように差し引いた CMC のプロファイルは Fig.10 の〇で示されている。この散乱プロファイルと 理論プロファイルを比較すると、ピークの頂点位置は 一致しているが,溝の深さについては再現していない。 電子顕微鏡写真において CMC のβ層およびδ層の厚 さにばらつきが見られるが、それを考慮していないた めに散乱プロファイルの溝の深さが浅くなると考えら れる。そこで、CMC のβ層およびδ層それぞれの厚さ がガウス分布に従うと仮定した場合のプロファイルを Fig.10 の緑線で表している。この理論プロファイルで は、溝を含めて散乱プロファイルを再現していること が分かる。ここでは、β層の厚さ、δ層の厚さ、β層お よびδ層のばらつきは、それぞれ 3.34 nm, 15.72 nm, 0.39 nmおよび1.15 nmであると見積もることができた。 電子顕微鏡観察ではδ層およびβ層の厚さが見積もら れているが、それだけでなく、染色をせずに直接δ層 およびβ層の厚さおよびそれぞれの層厚のばらつきを 含めて解析できることを示している。

5. 産業応用

Fig.11 は、毛髪の内部構造とその機能および対象と なる毛髪処理についてまとめたものである。メデュラ は、空洞であったり脂質が充てんされていたりするこ とによって可視光の反射に関係し、毛髪のツヤといっ た見た目の影響について考察されている。⁸⁾ コルテッ クスに関しては、機械的強度があるために毛髪の形状 に影響を及ぼしている。また、メラニンが分布してお り、可視光の散乱吸収効果によって毛髪の色に影響が ある。毛髪表面は摩擦や毛髪間の静電的相互作用を生 じる部分である。洗髪はその表面状態を変えるので、 毛髪の感触を改善するシャンプーやリンスなどの成分 が検討されている。このように多彩な毛髪の機能に対 して、化粧品を中心とした産業応用を考える場合、X 線回折が得意とすることは分子レベルの集合体構造の 解析であり、マイクロビームX線によってその空間分 布を知ることができる。この手法は、本来の毛髪構造 に与える化粧品の影響を考察する手段ともなるが、そ の対象となるものはヒト毛髪であろう。ここで示した CMC 構造解析はラットの髭に関する研究であるが、ヒ ト毛髪においても同等の散乱プロファイルが得られる ので、ヒト毛髪へ応用できる。

キューティクル中のCMCを介して毛髪内部への物 質の拡散・透過が行われており(Fig.11 挿入図の青矢 印は,扁平細胞間(CMCのδ層)の透過経路を示す), 実際,透過能を溶剤処理によって変化させたときにβ 層・δ層の厚みをマイクロビームX線回折から見積も ると,染色量とδ層の厚さの間に密接な関係が高いこ とが分かった。⁹また,実際の処方(パーマネントウ ェーブ,ヘアダイ,トリートメント等)を想定した溶 液中におけるCMC構造解析も行われている。¹⁰この ような物質の浸透メカニズムの解明が,浸透効果に優 れたパーマ剤等の製品開発につながる応用研究になる であろう。

6. おわりに

X線回折を用いた計測では、電子顕微鏡観察とは異 なり、様々な外部条件下で毛髪を分子レベルで直接観 察が行える。しかしながら毛髪の構造は複雑であり、 得られた情報を十分に解析することができなければ、 内にかくれている物質の浸透などのメカニズムを明ら かにできない。広い分野の研究者の積極的な取り組み を期待したい。

参考文献

- C. Bouillon and J. Wilkinson (2005) *The science of hair care*, 2nd ed., CRC Press.
- 2) L.N. Jones, Clin. Dermatol. 19 (2001) 95-103.
- M.E. Rafik, J. Doucet, F. Briki, *Biophys. J.* 86 (2004) 3893-3904.
- K. Inoue, T. Oka, T. Suzuki, N. Yagi, K. Takeshita, S. Goto, T. Ishikawa, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A*, 467-468 (2001) 674-677.
- N. Ohta, T. Oka, K. Inoue, N. Yagi, S. Kato, I. Hatta, J. Appl. Crystal. 38 (2005) 274-279.
- L. Kreplak, F. Briki, Y. Duvault, J. Doucet, C. Merigoux, F. Leroy, J.L. Leveque, L. Miller, G.L. Carr, G.P. Williams, P. Dumas, *Int. J. Cosme. Sci.* 23 (2001) 369-374.
- L. Kreplak, C. Merigoux, F. Briki, D. Flot, J. Doucet, Biochim. Biophys. Acta 1547 (2001) 268-274.
- 8) T. Matsuzaki, K. Arai, K. Joko, M. Hosokawa, K. Nakamura (2003) *最新の毛髪科学*, Fragrance Journal Ltd.
- 9) 井上敬文,岩本佳倫,太田昇,井上勝晶,八木直 人 (2005) マイクロビーム X 線を用いたヒト毛髪 キューティクルの構造解析,第57回 SCCJ 研究討 論会講演要旨集,5-8.
- 井上敬文,岩本佳倫,太田昇,井上勝晶,八木直 人 (2006) 水溶液中でのヒト毛髪構造の X 線回折 法を用いた解析,第58 回 SCCJ 研究討論会講演要 旨集,58-61.
- R.D.B. Fraser, T.P. MacRae, GE. Rogers, B.K. Filshie (1963) J. Mol. Biol. 7, 90-91.