

超高压電子顕微鏡による毛髪構造解析

Structure Analysis of Human Hair Fiber with High Voltage Electron Microscopy (HVEM)

小池 謙造^a, 儘田 明^a, 長瀬 忍^a, 吉田 修^b, 鷹岡 昭夫^c
Kenzo Koike, Akira Mamada, Shinobu Nagase, Osamu Yoshida and Akio Takaoka

^a花王株式会社ビューティケア研究センター

^b花王株式会社解析研究所

^c大阪大学超高压電子顕微鏡センター

要 旨 美容に重要である毛髪の構造解析を行った。従来の機器では難しい厚みのある毛髪切片 (2~5 μm) を 2000 kV 以上の超高压条件下で電子顕微鏡を用いて観察することによって、毛髪内部の構造を解析することができた。本手法により、健全毛、ダメージ毛、日本人毛、コーカシアン毛など様々な毛髪を解析した。また、毛髪物性 (曲げ弾性など) を向上させる植物エキスのダメージ抑制効果の解析についても本手法を応用した。

キーワード：毛髪, 3次元構造, トモグラフィ, ヘアケア, 効果

1. はじめに

毛髪は直径約 0.1 mm のファイバーで、一般の人々にとってもたいへんなじみ深い、身近な生体高分子である。本来の生理的意義は、日光や外部刺激からの頭部の保護、保温である。一方、化粧品学的には、美容的な要素が大きく、古来より日本では、「碧の黒髪」、「髪は女の命」などといわれ、特に女性にとって外観上特別に重要な意味を持つものであった。また、現代での日本でも、男女を問わず、ヘアカラーやパーマなどの化学処理によって色や形を自在に変えて、ファッションとして楽しむ傾向にある。このような化学的処理が可能なのは、髪が伸びることで再生するケラチン質を多く含む死んだ細胞・組織であることと、その構造や特性を利用した毛髪用の化粧品や医薬部外品が開発されているからである。ヘアケアに関わる商品の市場は日本で数千億円と言われる大きな市場であり、最近では高機能をうたったシャンプーなどが上市されている。

髪は多少個人差があるものの 1 ヶ月に約 1 cm 伸長する。一般的な肩くらいまでの長さ (25~30 cm) では、約 2 年間の履歴を有することになる。ヘアカラーの高頻度使用やカラーとパーマとの併用などの場合には、感触の悪化など、一般に枝毛、切れ毛などといわれる、髪質の劣化が起こる。この変化は、毛髪の化学処理によるダメージであり、これは現代女性の大きな悩みであり、毛髪科学で解決すべき課題と

なっている。

当ビューティケア研究センターにおいては、さまざまなヘアケア商品の開発以外にも、これまでヘアケア基盤研究の一環として、毛髪の内部構造に起因する髪の見え方の研究^{1,2)}から、髪内部のダメージ (空洞) を補修することによってより美しく見える髪となるヘアケア技術^{3,4)}などを開発してきた。毛髪構造の研究では、くせ毛の原因が内部構造の不均一化である^{5,6)}ことやキューティクルの構造や物性にアジア人とコーカシアンに人種差が存在すること⁷⁾も明らかしてきた。さらに、これらヘアケア研究の本質的な課題として、毛髪の基本構造を知ることがある。

2. 毛髪の構造

毛髪はケラチン繊維であり、図 1 のような基本構造⁸⁾をしている。最外層にはとしては、堅牢なキューティクル層があり、内部には柔軟性に富むコルテックス、中心部にはメデュラがある⁹⁾。

数十年にわたる分子から力学物性まで多岐にわたる毛髪研究が行われてきた。その結果から、その組成や構造は、図 1 のような、立体的な構造モデルが描かれてきている。しかしこれまで、毛髪構造の内部構造を包含して立体的に表現したものは、その多くがいわゆるモデル図、すなわちイラストであった。毛髪の内部あるいは表面の微細な構造を観察・解析するために、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡 (TEM)、走査型電子顕微鏡 (SEM)、原子間力顕微鏡 (AFM) など、さまざまな手法が導入されてきた。しかしながら、汎用の TEM においては 100 nm 程度の厚みが限界であり、微細な構造に関して内部情報が得られるが、視野も比較的狭く画像も平面

^a 〒131-8501 東京都墨田区文花 2-1-3
TEL & Fax: 03-5630-9885, 03-5630-9326
E-mail: koike.kenzo@kao.co.jp
2008 年 8 月 18 日受付

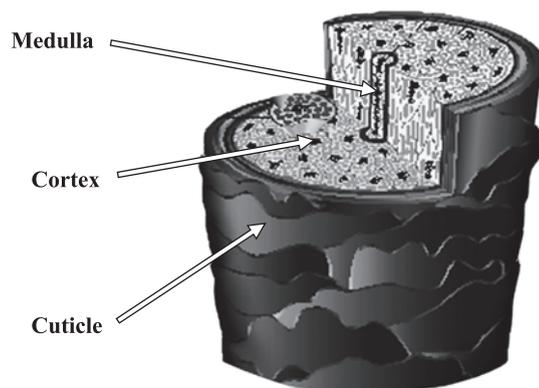


図1 毛髪の基本構造

的であった。またSEMあるいはAFMにおいては得られるものは立体的な画像であるが、基本的には表面情報であった。これまでは、これらのデータを複合的に利用して立体画像をイメージすることは可能ではあるが、毛髪内部情報も含めた「実像」を3次的に表現することは難しかった。

そこで今回、初めての試みとして数十～数百ナノメートルの分解能を保持したまま、広視野で毛髪の3次元構造を解析するために、大阪大学の超高圧電子顕微鏡を用いて解析を行った¹⁰⁾。本電子顕微鏡は、3000 kVまでの加速電圧が可能で、汎用の透過型電子顕微鏡の10倍以上の透過性能を持ち、毛髪のようなケラチン繊維からなる硬いたんぱく質であっても、数 μm の厚みを持った試料が観察可能であった。一方、最近では、医療用X線CT、MRIに代表されるように、さまざまな分野で3次的に構造を取り扱う情報処理技術が研究されている。そこで、毛髪の微細な3次元構造解析を行うためには、数 μm の厚みを持った試料をサブミクロン、できればナノスケールの分解能で観察することに加え、得られたデータの情報解析技術が必要であると考えた。このために、コロラド大学で作成された3次元解析ソフトであるIMOD¹¹⁾を用いた。このソフトウェアは3D-TEMの分野では、多くの研究者が利用するとともに、改良されより使いやすくなってきている。

以上の目的で、大阪大学・超高圧電子顕微鏡センターと共同で毛髪の構造解析研究に取り組んだ。本手法を用いて、種々の毛髪断面の観察を行った。日本人毛（健常毛）、化学処理によるダメージ毛、人種の異なる毛髪、植物エキス（ユーカリエキス）を長期使用者の毛髪などの観察を行い、それらの構造の違いなどについて考察を行った。さらに本研究では、毛髪内部構造の3次元データ解析・映像化を試みた。

3. 超高圧電子顕微鏡による観察方法¹²⁾

毛髪試料は日本人女性、外国人女性からサンプリングした。グルタルアルデヒド、四酸化オスミウムにて化学固定、エポキシ樹脂に包埋後、2 μm （場合によっては3～5 μm ）厚さの切片として調製した。毛軸に対して水平あるいは垂直方

向の切片の両方を調製した。染色は、厚み方向を均一に染めるために、長谷川らの手法¹⁰⁾で、加温しながら酢酸鉛溶液で染色を行った。厚さ2 μm の人毛サンプルの観察には、加速電圧2000 kVで行った。最高電圧の3000 kVでは厚さ5 μm までのサンプルが観察できた。画像の取得はHVEM付属のCCDカメラ（4096×4096 pixels）を用いた。試料を水平から+7°および-7°に傾けた2枚の画像を取得することにより、ステレオ観察（簡易立体画像観察）し、内部状態を確認した。3次元画像解析は、平均粒径40 nmの金粒子をサンプル表面に載せ、水平角に対して+70°から-70°まで2度ごとに71枚の画像を得た。3D-トモグラフィー作成は、コロラド大学作成の「IMOD」¹¹⁾ソフトウェアを使用した。

4. 毛髪の観察結果

4.1 日本人毛

2 μm 厚さの日本人女性の根本付近からサンプリングした化学処理履歴のない毛髪（健常毛、直径100 μm ）の切片を観察した。毛軸に対して垂直方向の切片（横断面）および軸と平行方向の切片（縦断面）の観察を行った。

まず、横断面の顕微鏡画像を図2に示す。毛髪内部のメデュラ、コルテックス、キューティクルなどの主要な構造が厚みを持って立体的に観察された。最も内側にはメデュラがあり、試料調整時に空洞化していた。最外層のキューティクルでは、エンドキューティクルとエキソキューティクルの違いが染色の濃淡で判別できた。濃淡ペアで1枚であることから5～6枚が重なっていることがわかった。その内部、コルテックスにおいては、細胞膜複合体（cell membrane complex, CMC）に分けられたコルテックス細胞が直径数 μm であることがわかった。これはケラチン化した細胞の名残である。その内部に、黒い顆粒状のもの、メラニン顆粒が数多く確認できる。これまで、メラニンの分布はキューティクルには殆ど存在せず、コルテックス内ではほぼ均等に分布していると考えられ

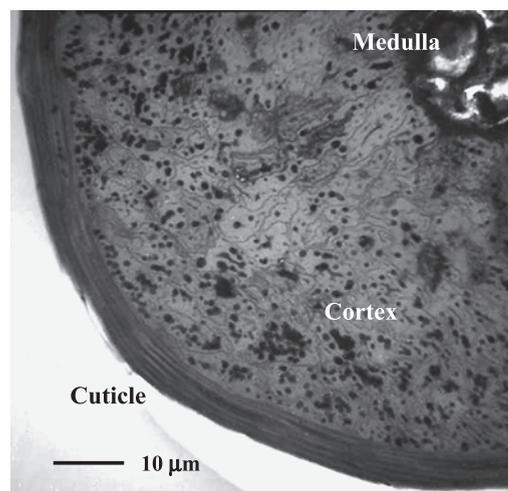


図2 日本人毛の断面の電子顕微鏡像（横断面：軸方向に垂直な断面）

ていたが、今回得られた画像から解析すると、外周部と内部とのメラニンの存在比は約4倍であり¹³⁾、外周部に偏った分布状態であることがわかった。別の日本人毛でも同様な結果が得られている。ヘアカラーやヘアブリーチは、このメラニンを分解することで髪色を明るくすることができるが、髪全体を処理する剤であり、メラニン以外の組織にもダメージを与えてしまう。今後、外周部に多いメラニンを狙った分解・脱色技術を実現すれば、ヘアカラーの低ダメージ化につながると思われる。メラニンの外周部への偏在性は、今後、ヘアカラー技術開発などに役立つ有用な知見である。

縦断面の顕微鏡画像を図3に示す。コルテックス細胞が非常に縦長の形状であることがわかり、そのコルテックス内において縦軸方向にメラニンが、列上に並んだ状態で配置していることがわかる。メラニンの毛包での生成過程を考えると^{8,9)}、メラノサイトで作られたメラニンが、順次泡のように、毛髪内に取り込まれていることが想像される。外周部のキューティクル付近にメラニンが多くあり、横断面の結果と同様であった。

4.2 3次元観察(3D-TEM)

毛髪サンプルの高解像度での観察が可能となったコルテックスの一部を詳細にステレオ観察(図4)した結果、内部のメラニン、CMCなどが確認できたことから、コルテックス細胞の内部構造の3次元化を試みた。+70°から-70°まで2度ごとに撮影した71枚の画像からCGによる3次元再構成(three dimensional reconstruction)により、トモグラフ(図5a)を得、さらには3次元イメージング(図5b)を行った。この結果、コルテックス細胞数個分の内部の構造が3次元で表現できた。今回は鉛染色を選択して、細胞内のタンパク質を殆ど染めなかったため、細胞外部の膜(CMC)や内部のメラニンの配置がよくわかった。縦方向についても、トモグラフまで観察した。これらの結果から、コルテックスの細胞1つ1つの構造、CMC、メラニンの配置などが確認でき、毛髪内部の3次元構造が再現された。

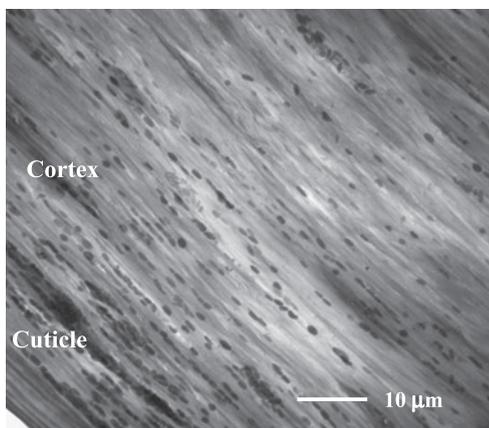


図3 日本人毛の断面の電子顕微鏡像
(縦断面:軸方向に平行な断面)

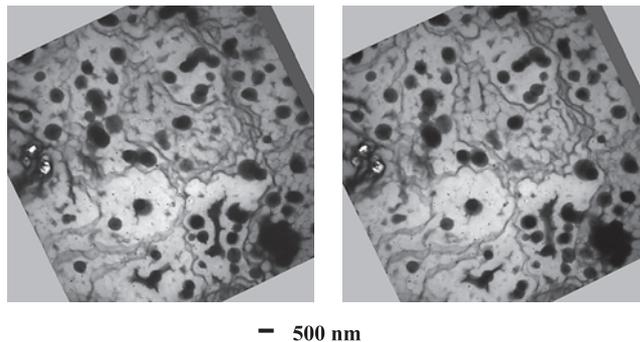


図4 毛髪内部構造のステレオ観察画像(±7度)

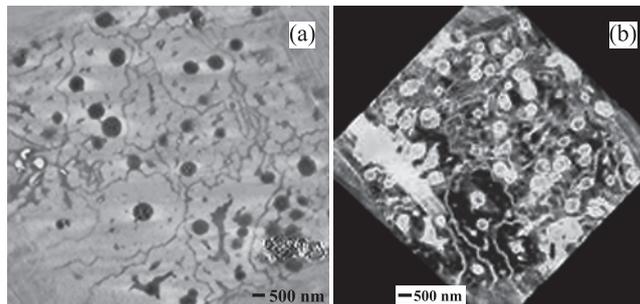


図5 毛髪内部の3次元像
(a) トモグラム(厚さ中間付近) (b) 3次元再構成像

4.3 コーカシアン毛(人種の異なる髪)

表1に示すように、人種によって髪の色・形は大きく異なる⁹⁾。1例として、コーカシアン毛の観察を行った。今回試料に用いたコーカシアンの毛髪は、アジア人の髪よりもかなり細く(短径約40μm、長径約60μm)、色もブロードであった。このサンプルであれば、超高圧電子顕微鏡の視野に毛髪断面がほぼ入るため、髪全体の観察が可能であった(図6)。この観察からは、アジア人との人種差の特徴として、細い、楕円形状、メラニン顆粒の数が少ない、核残渣が多い、メデュラがないなどのことがわかった。

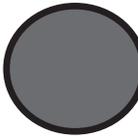
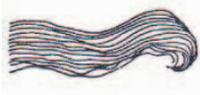
4.4 化学処理ダメージ毛の観察

傷んだ髪として、化学処理によるダメージした日本人毛(厚さ3μm)の観察を行った。ヘアカラー処理歴が8回あり、感触、外観とも極度のダメージ毛であった。この毛髪の先端付近を観察した結果、外周部のキューティクルは完全になくなっており、ほとんどのメラニンは分解によって欠落しており、メラニン顆粒のサイズよりも大きい数μm以上の空洞が観察された。ヘアカラー剤は、アルカリ条件下で過酸化水素によりメラニンを分解するが、繰り返し使用することで、たんぱく質への作用による分解、流出が起これ、内部が空洞化すると考えられている⁸⁾。実際には、これらのダメージは個人差が大きく、観察された髪は、極度に傷んだ髪といえる。

4.5 植物エキスの毛髪への効果

化学処理によるダメージは極めて深刻な問題であり、この

表1 様々な人種の毛髪形状

毛髪形状	全体外観	形状	断面	特徴
日本人 (アジア)				<ul style="list-style-type: none"> 直毛が多い 黒い:メラニン多い 太い
コーカシアン(欧米)				<ul style="list-style-type: none"> ウェーブ 明るい髪色 (ブロード~ブラウン) メラニン少ない 細い
アフリカン				<ul style="list-style-type: none"> 縮毛 黒い メラニン多い

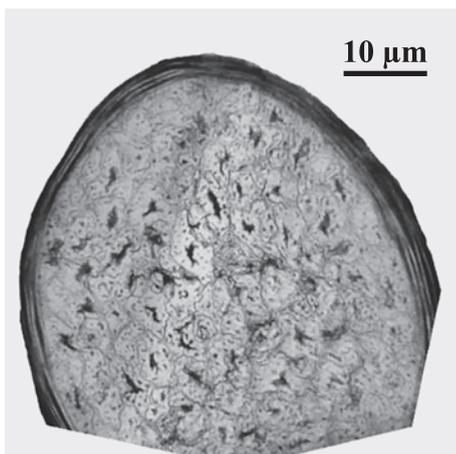


図6 5 μm厚のコーカシアン毛の断面の電子顕微鏡像
(横断面:軸方向に垂直な断面)

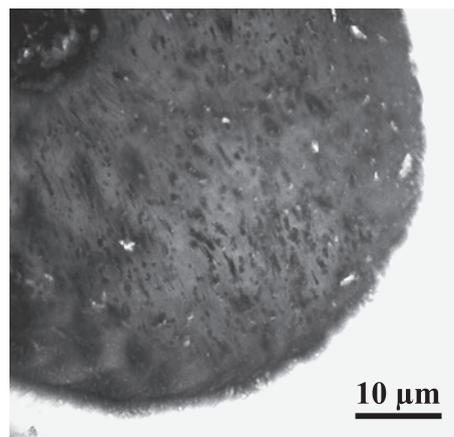


図7 極度にダメージした日本人毛の断面の電子顕微鏡像
(横断面:軸方向に垂直な断面)

補修や改善する技術が求められている。そのダメージを抑制する効果のある植物エキスとその効果を紹介する。

当ビューティケア研究センターでは、ヘアケア用化粧品への応用に関連して、植物エキスの頭皮・毛髪への影響を調べている。その結果、ユーカリエキスに頭皮・頭髪の状態を改善できる事が見出された¹⁴⁾。これまで皮膚に対する効果としては、ユーカリエキス塗布により、皮膚のセラミド量が増加し皮膚の状態(バリア機能など)が改善することが報告されている¹⁵⁾。そして、ユーカリエキスの頭皮へ効果を調べた結果、1ヶ月以上の長期塗布により、頭皮だけでなく新たに生育してきた毛髪の物性(艶強度・弾性など)が変化・改善されることがわかった¹⁶⁾。その効果を構造的に検証するため、電子顕微鏡による観察を行った。試料として、ハリ・コシ(曲げ弾性)および毛髪のツヤが向上していた長期(30ヶ

月以上)パネル(1人)から採取したユーカリエキスローションを塗布した頭皮から生えてきた髪とプラセボローションを使用した髪を比較した。超高圧電子顕微鏡による毛髪断面の薄切片(厚さ3 μm)を調製し、プラセボ・ユーカリエキス塗布毛間の構造を比較した。その結果、プラセボ毛ではヘアカラーなどの化学処理により根元から毛先に行くに従って多くの空洞が観察された。一方、ユーカリエキス塗布毛ではヘアカラー処理7回後の毛先でも殆ど空洞は生成していなかった。このことからツヤなどの外観が良好なのは空洞化が抑制されているためと考えられた。その空洞化を評価するため、3次元観察(3D-TEM)を行い空洞を立体的なイメージとして現した(図8)。図8から、ダメージによる空洞化が少ない効果が確認できる。

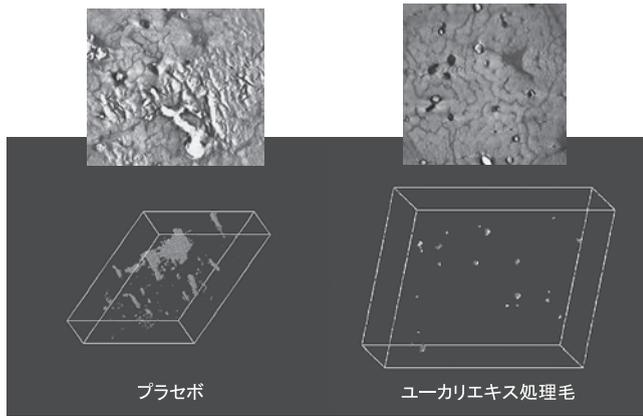


図8 毛髪のダメージ(空洞)と3次元化による評価
各上: 顕微鏡画像, 下: 空洞を3次元化したCG, サイズ:
W24×H24×D3 μm

5. 終わりに

大阪大学超高压電子顕微鏡センターの協力を得て、今回初めてサブミクロンのスケールで毛髪試料を解析することにより、毛髪内部の3次元構造の一端が見えてきた。本手法によって、様々な毛髪サンプルの構造的な比較が行えることも明らかとなった。本研究を継続し、解析技術向上による詳細で緻密な3次元構造的な構造解析を行っていききたい。また、毛髪サブミクロンレベルでの変化のマクロ構造への影響や毛髪物性と連動した構造解析などを行って行きたいと考えている。

謝 辞

超高压電子顕微鏡による毛髪観察には、文部科学省ナノテクノロジー支援プロジェクトのご協力を頂きました。

- 1) Nagase, S., Shibuichi, S., Ando, K., Kariya, E. and Satoh, N.: *J. Cosmetic Science*, **53**, 89–100 (2002)
- 2) Nagase, S., Satoh, N. and Nakamura, K.: *J. Cosmetic Science*, **53**, 387–402 (2002)
- 3) Okamoto, M., Yakawa, R., Mamada, A., Nagase, S., Shibuichi, S., Kariya, E. and Satoh, N.: *J. Cosmetic Science*, **54**, 353–366 (2003)
- 4) Itou, T., Nojiri, M., Ootsuka, M. and Nakamura, K.: *J. Cosmetic Science*, **54**, 139–151 (2006)
- 5) Kajiura, Y., Watanabe, S., Itou, T., Nakamura, K., Iida, A., Inoue, K., Yagi, N., Shinohara, Y. and Amemiya, Y.: *J. Struct. Biol.*, **155**, 438–444 (2006)
- 6) Kajiura, Y., Watanabe, S., Itou, T., Iida, A., Shinohara, Y. and Amemiya, Y.: *Applied Crystallography*, **38**, 420–425 (2005)
- 7) 高橋俊江, 林 留美, 岡本昌幸, 井上滋登: フレグランスジャーナル, No. 4, 52–57 (2007)
- 8) 松崎 貴, 新井幸三, 上甲恭平, 細川 稔, 中村浩一: 毛髪科学技術者協会 (編), 「最新の毛髪科学」, フレグランスジャーナル社, 東京, 2003, p. 262–283
- 9) C.R. Robbins: 山口真主 (訳), 毛髪の科学, フレグランスジャーナル社, 東京, 2006, p. 1–101
- 10) Hasegawa, N., Takaoka, A. and Mori, H.: *J. Electron. Microsc.*, **37s**, 237 (2002)
- 11) Kremer, J.R., Mastronarde, D.N. and McIntosh, J.R.: *J. Struct. Biol.*, **116**, 71–76 (1996)
- 12) Koike, K., Yoshida, Y., Mamada, A., Watanabe, T., Hasegawa, T., Kuwae, A. and Takaoka, A.: *J. Cosmetic. Science*, **55**, s25–s27 (2004)
- 13) Mamada, A., Koike, K., Nagase, S., Yoshida, O., Hasegawa, T., Matoba, K. and Takaoka, A.: Proc. 16th Int. Microscope Conference (IMC-16) Sapporo
- 14) 小池謙造: 化学と工業, **58**, 485–487 (2005)
- 15) Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M. and Hidano, A.: *J. Invest. Dermatol.*, **96**, 523–526 (1991)
- 16) Mamada, A. and Nakamura, K.: *J. Cosmetic Science*, **58**, 485–494 (2007)