



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 | 財団法人高輝度光科学研究センター | 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1 |
| 八木直人 | 財団法人高輝度光科学研究センター | 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1 |
| 八田一郎 | 財団法人高輝度光科学研究センター 福井工業大学工学部原子力技術応用工学科 | 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1 〒910-8505 福井県福井市学園 3-6-1 |

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³⁾。コルテックスの X 線回折プロファイルを図. 1 に示す。これは、図. 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

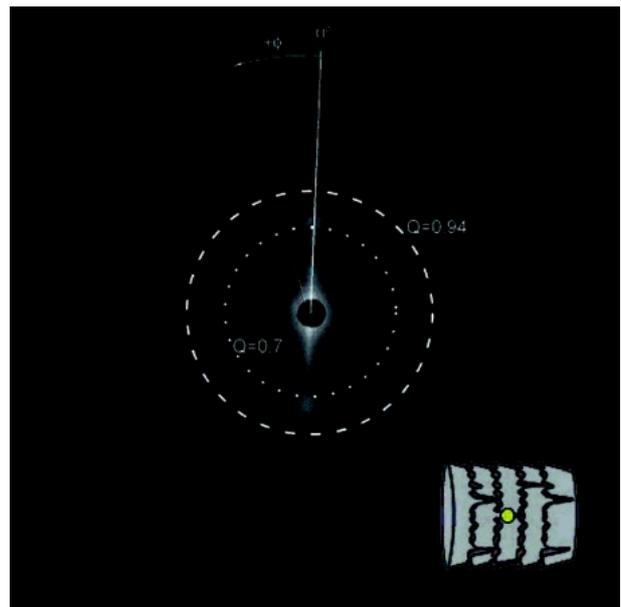


Fig. 1 A typical X-ray diffraction profile of cortex. Inset: schematic diagram of hair and X-ray.

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 (図. 1 の $\phi = 0^\circ$, 赤道方向と呼ぶ) に強く表れる⁴⁾。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

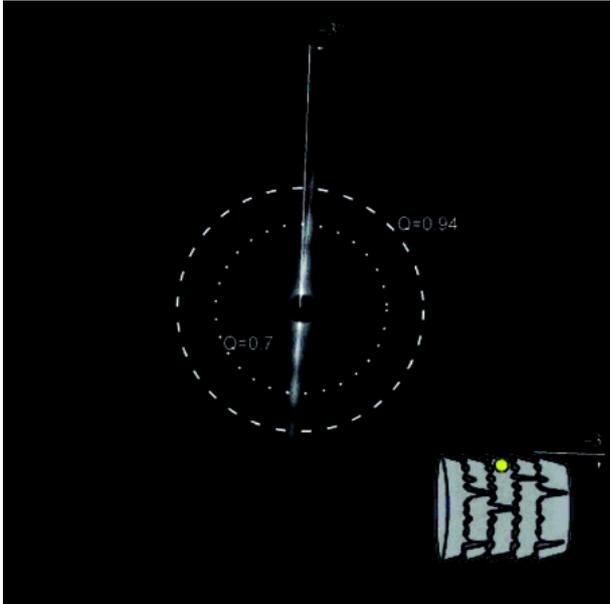


Fig. 2 A typical X-ray diffraction profile of cuticle. Inset: schematic diagram of hair and X-ray.

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 BL40XU⁵⁾ 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⁶⁾。ラットの髭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 2 μm 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

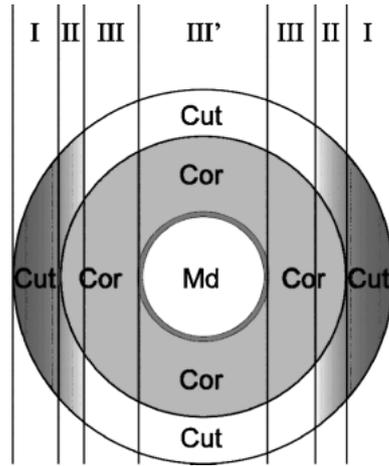


Fig. 3 Schematic diagram of the cross section of rat whisker and four regions denoted by I, II, III and III'. Cut, Cor and Md indicate cuticle, cortex and medulla, respectively.

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 $Q = (4\pi/\lambda) \sin(2\theta/2) = 0.70$ (nm^{-1}) の点線で示される散乱角は、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。 $\lambda (= 0.08 \text{ nm})$ は X 線の波長、 2θ 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' で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' 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

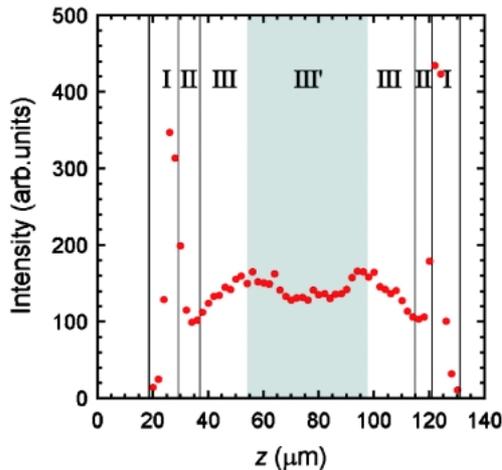


Fig. 4 Peak intensity (closed circle) estimated in an intensity profile along a ring of $Q=0.70 \text{ nm}^{-1}$ at each scanning position of z .

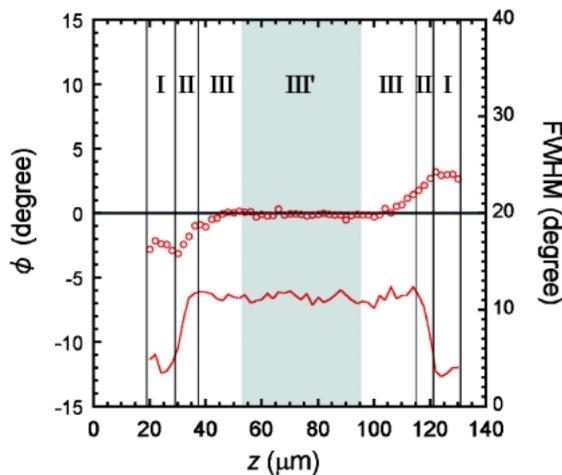


Fig. 5 Tilt angle (open circle, see ϕ of Fig. 1) and FWHM (line) of an equatorial peak from cuticle estimated in an intensity profile along a ring of $Q=0.70 \text{ nm}^{-1}$ at each scanning position of z .

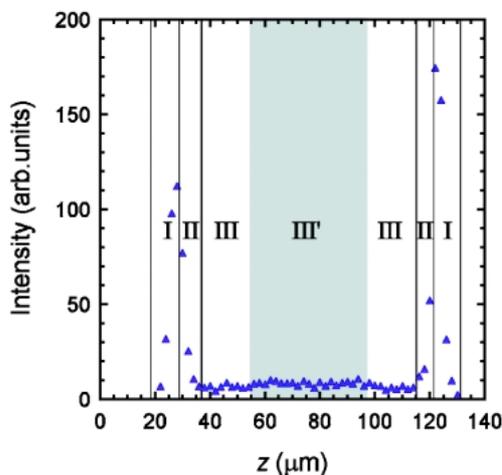


Fig. 6 Peak intensity (closed triangle) in an intensity profile along a ring of $Q=0.94 \text{ nm}^{-1}$ at each scanning position of z .

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 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した。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樣な構造体ではなく, 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 $\pm 11^\circ$ 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 $Q=1.3 \text{ nm}^{-1}$ のピークのプロットの近くにある \blacklozenge 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 \blacklozenge)⁷⁾。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

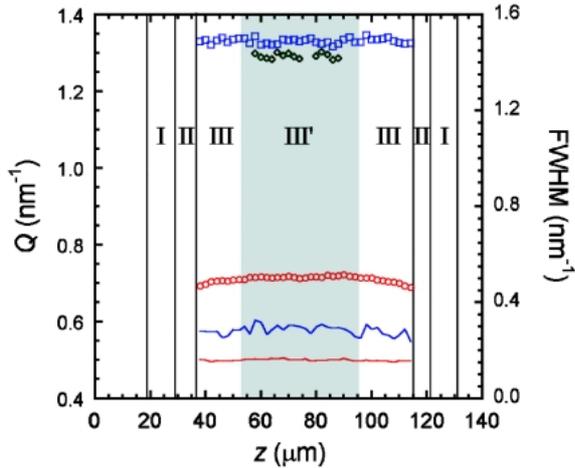


Fig. 7 Peak positions (open symbols) and FWHM (line) of two equatorial peaks observed from cortex at each scanning position of z .

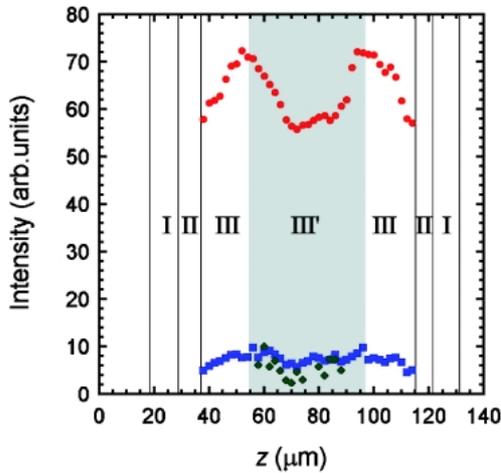


Fig. 8 Peak intensities (closed symbols) of two equatorial peaks observed from cortex at each scanning position of z .

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⁸⁾。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。 $Q=0.7 \text{ nm}^{-1}$ 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、 $Q=1.3 \text{ nm}^{-1}$ 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 $Q=0.7 \text{ nm}^{-1}$ (●) および $Q=1.3 \text{ nm}^{-1}$ (■) 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、 $Q=1.3 \text{ nm}^{-1}$ の強度 (Fig. 8の■) が $Q=0.7 \text{ nm}^{-1}$ 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⁴⁾) 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 19.0 nm ($Q=0.33 \text{ nm}^{-1}$), 9.7 nm ($Q=0.65 \text{ nm}^{-1}$), 6.48 nm ($Q=0.97 \text{ nm}^{-1}$), 4.89 nm ($Q=1.28 \text{ nm}^{-1}$) 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^{6,9)}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

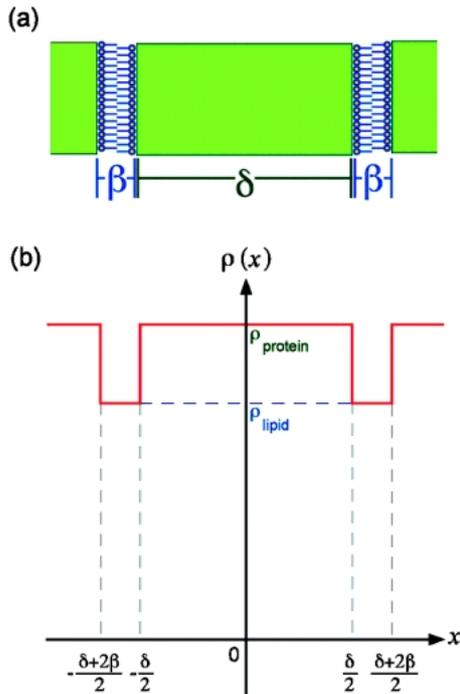


Fig. 9 (a) Schematic diagram of the cross section of the cell membrane complex composed of β , δ and β layers, and outer bulk part composed of the cuticle cells in the centrosymmetric structure. (b) Electron density profiles, $\rho(x)$, of the cell membrane complex structure.

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○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と比較すると、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。

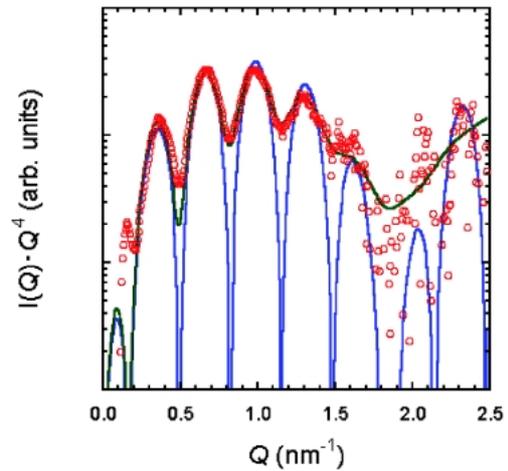


Fig. 10 Intensity given by $I(Q)Q^4$ as a function of Q for a rat whisker.

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³⁾。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¹⁰⁾。また、実際の処方 (パーマントウェーブ、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¹¹⁾。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

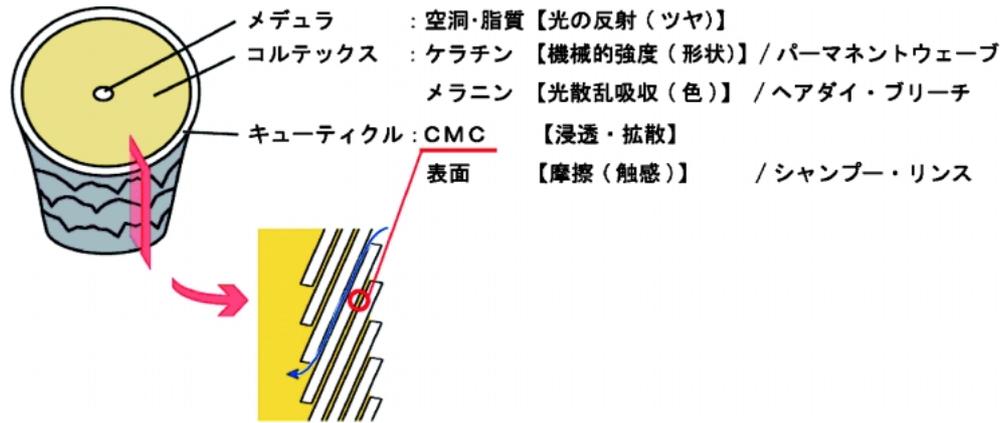


Fig. 11 Schematic diagram of the cross section, functions and treatments of hair. Inset: longitudinal section of hair cuticle.

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。毛髪に興味をもつ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

- 1) C. Bouillon and J. Wilkinson: *The science of hair care*, 2nd ed. (CRC Press, 2005).
- 2) L. N. Jones: *Clin. Dermatol.* **19**, 95-103 (2001).
- 3) T. Matsuzaki, K. Arai, K. Joko, M. Hosokawa and K. Nakamura: 最新の毛髪科学, (Fragrance Journal Ltd., 2003).
- 4) M. E. Rafik, J. Doucet and F. Briki: *Biophys. J.* **86**, 3893-3904 (2004).
- 5) K. Inoue, T. Oka, T. Suzuki, N. Yagi, K. Takeshita, S. Goto and T. Ishikawa: *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A*, **467-468**, 674-677 (2001).
- 6) N. Ohta, T. Oka, K. Inoue, N. Yagi, S. Kato and I. Hatta: *J. Appl. Crystal.* **38**, 274-279 (2005).
- 7) R. D. B. Fraser, T. P. MacRae, G. E. Rogers and B. K. Filshie: *J. Mol. Biol.* **7**, 90-91 (1963).
- 8) L. Kreplak, F. Briki, Y. Duvault, J. Doucet, C. Merigoux, F. Leroy, J. L. Leveque, L. Miller, G. L. Carr, G. P. Williams and P. Dumas: *Int. J. Cosme. Sci.* **23**, 369-374 (2001).
- 9) L. Kreplak, C. Merigoux, F. Briki, D. Flot and J. Doucet: *Biochim. Biophys. Acta* **1547**, 268-274 (2001).
- 10) 井上敬文, 岩本佳倫, 太田 昇, 井上勝晶, 八木直人: 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 (2005).
- 11) 井上敬文, 岩本佳倫, 太田 昇, 井上勝晶, 八木直人: 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 (2006).

● 著者紹介 ●



太田 昇
財団法人 高輝度光科学研究センター・
協力研究員
E-mail: noboru_o@spring8.or.jp
専門：X線回折
【略歴】
2003年より現職



八木直人
財団法人 高輝度光科学研究センター・
主席研究員
E-mail: yagi@spring8.or.jp
専門：非結晶 X線回折
【略歴】
1975年東京大学物理工学科卒業，1980
年東北大学医学部助手，1982年医学博
士，1990年東北大学医学部講師，1997
年より現職



八田一郎
福井工業大学・JASRI/Spring-8
E-mail: hatta@fukui-ut.ac.jp;
hatta@spring8.or.jp
専門：生物物理学
【略歴】
1967年3月東京工業大学大学院理工学
研究科 博士課程修了（物理学専攻），
理学博士，1967年4月東京工業大学理
学部物理学助手，1976年4月名古屋
大学工学部応用物理学助教授，1985
年10月名古屋大学工学部応用物理学
教授，2002年3月名古屋大学名誉教授，
2002年4月福井工業大学工学部教授，
2006年8月勲高輝度光科学研究セン
ター コーディネーター 兼務

Structural analysis of cell membrane complex of hair cuticle by micro-beam X-ray

Noboru OHTA Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI),
1-1-1 Kouto, Sayo, 679-5198 Japan

Naoto YAGI Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI),
1-1-1 Kouto, Sayo, 679-5198 Japan

Ichiro HATTA Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI),
1-1-1 Kouto, Sayo, 679-5198 Japan
Faculty of Engineering, Fukui University of Technology,
3-6-1 Gakuen, Fukui, 910-8505 Japan

Abstract Small-angle diffraction experiment using high-flux microbeam X-ray is a powerful tool to investigate cell-membrane-complex structures in hair cuticle with micron-order thickness without interference from other hair structures. The cell membrane complex structure in the hair cuticle is composed of three layers, that is, β -, δ - and β -layers. We proposed a quantitative analysis to estimate the thickness of β and δ layers in the cell membrane complex.