

3P079

振動和周波検出赤外超解像顕微鏡を用いた毛髪内部の分子構造解析

(東工大・資源研¹、花王株式会社ビューティケア研究センター²) 田島朋樹¹、佐藤孝樹¹、
菊地克也¹、藤井正明¹、長瀬 忍²、平野祐司²、伊藤隆司²、酒井 誠¹

Molecular structure analysis of the human hair inside by using VSFG detected IR super-resolution microscopy

(Tokyo Institute of Technology¹, Kao Corporation²) Tomoki Tajima¹, Takaki Sato¹, Katsuya Kikuchi¹,
Masaaki Fujii¹, Shinobu Nagase², Yuuji Hirano², Takashi Itou², Makoto Sakai¹

【序】ヒトの毛髪は分子構造解析は、医療、化粧品業界において重要なテーマであり長年にわたって研究が行われている。毛髪の直径は 30~120 μm 程度であり、外側からキューティクル、コルテックス、メデュラの 3 層の部位に分けられる。コルテックスは毛髪全体の 8 割以上を占め、殆どがケラチタンパク質で構成されており、 α ヘリックス構造が集合した中間径フィラメント (IF) を形成して毛髪の方に沿ってファイバー状に並んでいる [1]。近年、加齢や経年劣化によって生じた毛髪のカールや、熱圧力による形状変化、ヘアブリーチの施行による色素変化などの外観から確認できる様々な変化が、コルテックスの内部構造、特にケラチタンパク質の二次構造あるいは IF の配向 (四次構造) と関係していると推測されており、赤外分光を中心に多くの研究がされている [2]。しかしながら、赤外分光法を応用した赤外顕微鏡では空間分解能が赤外光の波長に比例した回折限界によって制限されるため 10 μm 程度となり、コルテックス内部の局所的な観察は困難である。従って、コルテックス全体が均一に変化しているのか局所的に変化しているのかは明らかになっていない [3]。そこで、我々が開発した振動和周波発生 (VSFG) 法による赤外超解像顕微鏡を毛髪観察に適用する [4]。この方法では赤外吸収を可視の VSFG 光の発生により検出できるため、空間分解能は可視光に対する回折限界で決まり、高い空間分解能での観察が可能になる。昨年我々は、この顕微鏡法を用いることで毛髪内部をサブマイクロメートルの空間分解能で赤外分光イメージングが可能なることを報告した [5]。本研究では、髪の色やカールの程度の異なる毛髪、ブリーチ及び熱圧力の外部処理を施工した毛髪の赤外分光イメージングを行い、外観から確認できる様々な変化がコルテックス内部のどのような構造変化と関係しているかを明らかにする。

【実験】VSFG 法の原理図を図 1 に示す。VSFG は、赤外光と可視光を同時に入射した時、そのエネルギー和に相当する VSFG 光が発生する非線形光学過程である。測定に用いた赤外光と可視光は、再生増幅器によって増幅された Ti : Sapphire レーザーのピコ秒パルスを変換することで得られた。光の波長には赤外光に 2800-3600 nm 及び 7200-8500 nm、可視光に 613 nm を用いた。これらの光をビームコンバイナーで同軸に合わせ、CaF₂ レンズ ($f=100$) を用いて毛髪試料上に照射した。発光は背面から対物レンズ

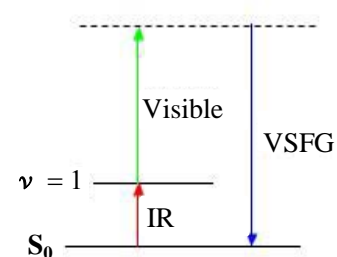


図 1 VSFG 法の
エネルギーダイアグラム

を用いて集め、VSFG 発光のみが透過するバンドパスフィルターを通した後に ICCD カメラ上に結像した。毛髪試料は、エポキシ樹脂に包埋した後、マイクロトームで 3 μm に横断面を切り出し、カバーガラス上に載せエタノールで馴染ませることによりガラス上に半固定したものをを用いた。

【結果と考察】 カールがコルテックスの内部構造にどのような変化を与えるかを観察するために、カールの程度の異なる毛髪の超解像赤外分光イメージングを行った。図2で表されるカール半径が10.0 cm（直毛）、2.1 cm、1.0 cm（カール毛）の白髪の透過像を図3(a)、(c)、(e)に示す。試料の毛髪横断面は、毛髪のカールの内側が右側に位置するように設定し観察した。透過像より、中央から外側にかけてメデュラ、コルテックス、キューティクルがそれぞれ明瞭に観察できている。(b)、(d)、(f)は(a)、(c)、(e)に対してアミドⅢバンドの振動数(1260 cm^{-1})に相当する赤外光を入射したときの超解像赤外イメージである。全ての試料において、コルテックスから非常に強い発光が観測された。コルテックスは α ヘリックス構造のケラチタンパク質で占められていること、また、ケラチタンパク質を含まないメデュラ、及びケラチタンパク質がランダムコイル構造を取っているキューティクルが発光していないこと、さらにはVSFG法の特性により(b)、(d)、(f)においてケラチタンパク質の α ヘリックス構造を選択性高く観察出来ていると結論した（詳細は4A19参照）。発光の分布に着目すると、直毛である(b)においてはコルテックス全体で均一な発光が観察されるが、(d)、(f)とカール半径が小さくなるにつれてカールの内側に偏って分布している。さらに、(b)、(d)、(f)上の様々な部位においてVSFGスペクトルを測定したところ、いずれも 1260 cm^{-1} （アミドⅢバンド）、 2940 cm^{-1} （CH伸縮振動）、 3330 cm^{-1} （OH伸縮振動）にバンドが観測され全く同一のスペクトルが得られた（図3(g)に黒点部のVSFGスペクトルのみを示す）。カールの異なる試料でもVSFGスペクトルが類似していることから、どの試料でもケラチタンパク質が α ヘリックス構造を保持している一方、発光の分布が異なることから α ヘリックス構造の配向や密度分布が変化すると推測できる。これは、コルテックスを構成しているIFの配向や密度が変化するケラチタンパク質の四次構造変化が生じたと推測できる。講演では、ブリーチや熱圧力処理した毛髪の結果も含めてコルテックス内部にどのような構造変化を与えるかを議論する。

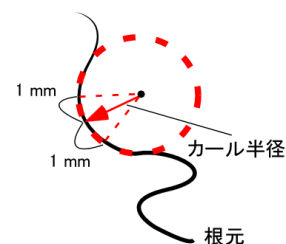


図2 カール半径の模式図

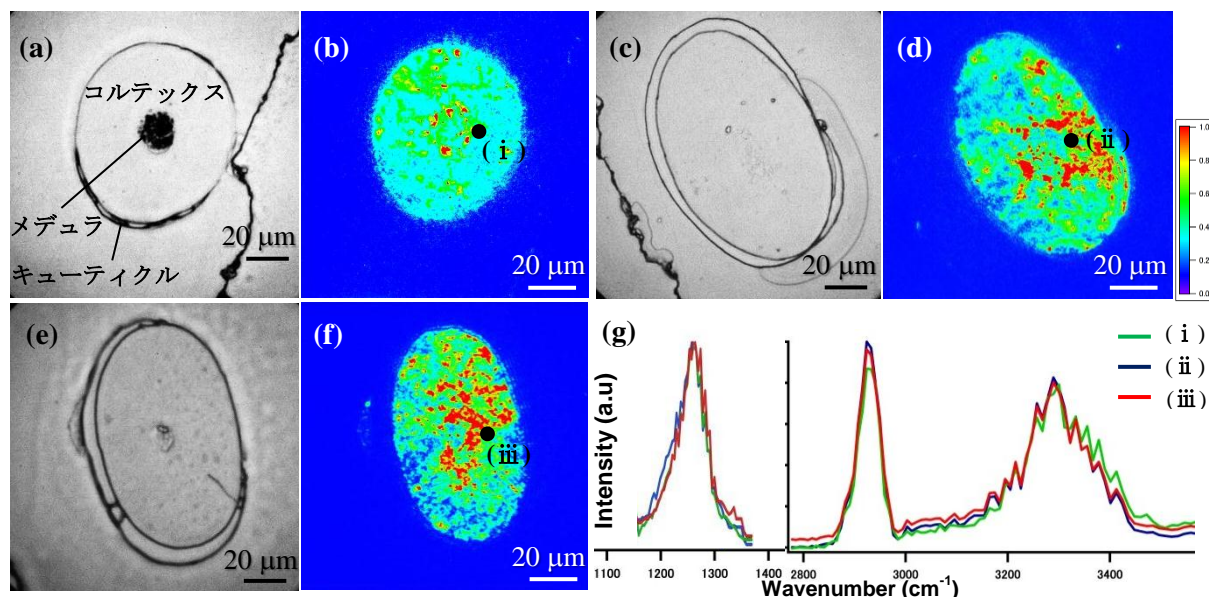


図3 (a)、(c)、(e)はカール半径が10.0 cm、2.1 cm、1.0 cmの白髪の透過像。(b)、(d)、(f)は(a)、(c)、(e)に対するアミドⅢバンド(1260 cm^{-1})の超解像赤外分光イメージ。(g)は(a)、(c)、(e)におけるVSFGスペクトル((b)、(d)、(f)上の黒点の部位で観測した)。試料は全て横断面で厚さ $3\text{ }\mu\text{m}$ 、カールの内側は右側に設定した。

【参考文献】 [1] S. Nagase et al., *J. Soc. Cosmet. chem.*, **43**, 3 (2009). [2] G. L. Carr et al., *J. Soc. Cosmet. chem.*, **51**, 73 (2000). [3] K. L. A. Chan et al., *Appl. Spectrosc.*, **59**, 149 (2005). [4] K. Inoue et al., *Appl. Spectrosc.*, **64**, 3 (2010). [5] 菊池克也 他, 第5回分子科学討論会, 4P083 (2011).