

振動和周波検出赤外超解像顕微鏡による日本人黒髪の 超解像赤外分光イメージング

(東工大・資源研) 酒井誠、菊地克也、田島朋樹、藤井正明

Super-resolving IR imaging of Japanese black hair by using VSFG detected IR super-resolution microscope

(Tokyo Tech.) Makoto SAKAI, Katsuya KIKUCHI, Tomoki TAJIMA, Masaaki FUJII

【序】毛髪はケラチタンパク質からなる直径 30-120 μm 程度の階層構造をもつ繊維である。日本人黒髪の毛髪横断面の透過像を図 1 に示すが、中心部がメデュラ、外側を覆っている薄い層がキューティクルであり、メデュラとキューティクルの間の毛髪の85%以上の大部分を占めるのがコルテックスである。コルテックス領域では、 α ヘリックス構造のケラチタンパク質が繊維状に集合して中間径フィラメント (IF) を形成し、毛髪の伸長方向にファイバー状に並んでいることが知られている[1]。近年、毛髪のマクロ形状や物性にはコルテックスの内部微細構造が大きな影響を与えたとの観点から振動分光を中心とした内部構造解析が行われてきた。その一方で、黒髪にはメラニンという色素 (図 1 中のコルテックス領域に色の濃い部分として観察されている) が多く含まれており、蛍光を発するため通常のラマン顕微鏡による観察は困難であり、測定には脱色処理をした毛髪や白髪などメラニンが少ないものを用いる必要がある。また、赤外顕微鏡では、空間分解能が赤外波長で一意にきまる回折限界によって制限されてしまい10 μm 程度と極めて低く、コルテックス内部の局所的な観察は事実上不可能であった。

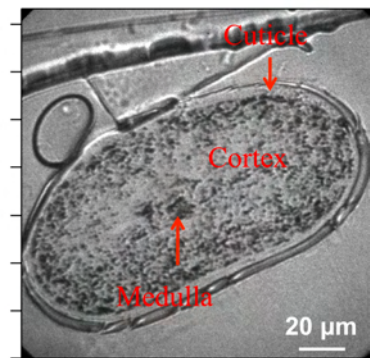


図 1: 日本人黒髪の横断面の透過像 (試料の厚さ: 3 μm)

本研究では、振動和周波発生 (VSFG) 法を光学顕微鏡技術に応用し、赤外光の回折限界を突破した高い空間分解能 (すなわち赤外超解像) を有する赤外顕微鏡[2]を用いて日本人黒髪の超解像赤外分光イメージングを行った。本手法では、メラニンの発光よりも短波長に発生する VSFG 光を検出するため、脱色処理等の必要なくそのまま日本人黒髪の観察が可能であると同時に、空間分解能も VSFG 光の波長 (すなわち可視波長) で一意に決まる回折限界まで向上できるため、図 1 の透過像と同程度の解像度で赤外分光イメージングが可能である。加えて、VSFG 法は 2 次の非線形光学過程であり、非線形感受率 χ^2 に依存するため、反転対称性の破れる表面 (界面) に極めて敏感である。このため、表面に積層した膜構造の観測や表面に吸着した分子配向の観測など数多くの表面 (界面) の分子科学的研究が行われてきた。今回我々は、VSFG 法の特徴である分子配向に関する情報の抽出も期待して超解像赤外分光イメージングを行った。

【実験】励起光源である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波長を波長変換することで得られ、それぞれ赤外光 5-9 μm (1111-2000 cm^{-1}) および可視光 613 nm の光を用いた。これらの光をビームコンバイナーで同軸に合わせ、 CaF_2 レンズ ($f = 100 \text{ mm}$) を用いて毛髪試料に照射した。試料からの VSFG 光は背面から対物レンズ ($\text{NA} = 0.4$) を用いて集め、ノッチフィルター、赤外カットフィルター、バンドパスフィルターを通した後に

結像レンズにより ICCD カメラ上に結像した。毛髪試料には、日本人の黒髪をエポキシ樹脂に包埋した後、マイクロトームで毛髪横断面を切り出し CaF₂ 基板上に載せ、エタノールで馴染ませることにより基板上に半固定したものをを用いた。毛髪の厚さは 3 μm である。毛髪試料は花王株式会社の伊藤隆司博士、長瀬忍氏に提供して頂いた。

【結果と考察】日本人黒髪に VSFG 法を適用し、超解像赤外分光イメージングを行った結果を図 2 に示す。(a) は透過像である。(b) は (a) に対してアミド III バンドの振動数に相当する赤外光 (1260 cm⁻¹) を入射して得られた赤外イメージである。その結果、コルテックス領域では強い発光が観測されるとともに、通常の赤外顕微鏡では観察不可能な、約 1 μm の微小構造 (透過像中で見られるような濃淡) が明瞭に観察されている。前述したように、コルテックス領域には α ヘリックス構造のケラチタンパク質が多く存在しており、今回の結果はアミド III バンド領域において高感度で α ヘリックス構造を検出したものと結論した。一方で、メデュラやキューティクルの発光は非常に弱い、または、全く観測されないことが明らかになった。メデュラ部分は籠がいくつも重なったような形をしており、非ケラチタンパク質で構成されているといわれているため、VSFG 発光が弱いと考えられる。また、キューティクル領域ではケラチタンパク質がランダムコイル構造をとっていると報告されている[1]。ランダムコイル構造の場合、2 次の非線形感受率 χ^2 がほぼ 0 となるので理論上 VSFG は発生しない。これはキューティクル領域から VSFG 発光が全く観測されないことと良い一致を示す。

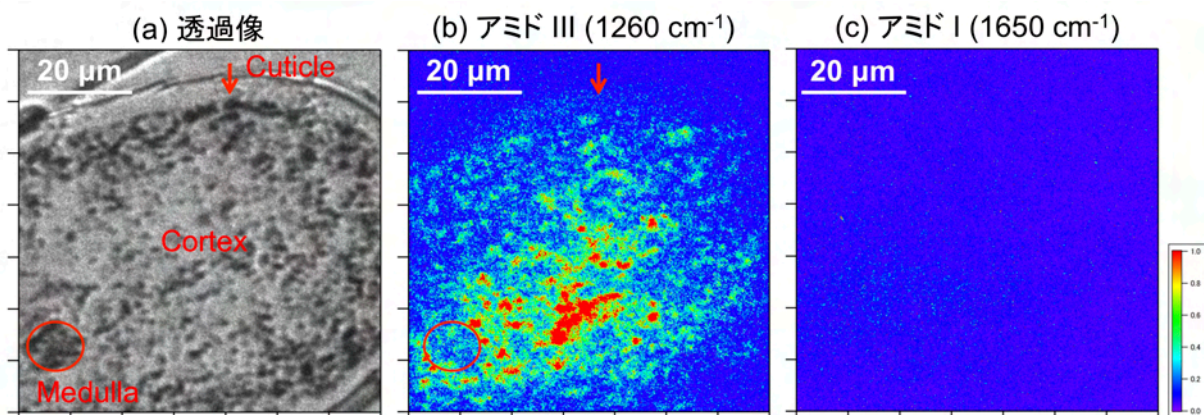


図 2：日本人黒髪の超解像赤外分光イメージング。
(a) 透過像、(b) アミド III における赤外像、(c) アミド I における赤外像

図 2 (c) は赤外振動数をアミド I バンド (1650 cm⁻¹) に変えて赤外イメージングを行った結果である。アミド III バンドの結果と相反して、発光がまったく観測されていないことが明らかとなった。アミド I バンドは主に C=O 伸縮振動モードに対応し、アミド III バンドは C-N 伸縮振動モードに対応する。α ヘリックス構造の場合、両者の振動モードは垂直な関係にあり、分子配向が VSFG 発光強度に大きく影響を与えたことが考えられる。今回の測定においては、α ヘリックス構造がアミド III のみ検出可能な方向へ配向していることを強く示唆している。講演では、測定条件からの検討も含めて分子配向について詳細に議論する。

【参考文献】 [1] Nagase, S.; Shinozaki, T.; Tsuchiya, M.; Tsujimura, H, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **43** (2009) 3. [2] Inoue, K.; Fujii, M.; Sakai, M, *Opt. Express* **17** (2009) 12013.