

メラニン顆粒の三次元構造研究

ホーユー株式会社総合研究所 今井健仁

要旨

ヒト毛髪のメラニン顆粒(メラノソーム)は0.5~1.0 μm 程度の紡錘形であるが、高密度な構造で電子顕微鏡においてもコントラスト差が出にくいいためその内部構造はあまり分かっていない。本研究では電子線の高い透過性と電子線走査による生体試料へのダメージ低減を狙いとして、超高压走査透過電子顕微鏡によるメラニン顆粒の内部構造の解析を試みた。連続傾斜像から三次元再構築像を作成し、メラニン顆粒内部の vesicle や amyloid fibril のようすなどが観察された。

1. 序論

1-1. はじめに

本研究会は小角 X 線散乱を利用した研究討議が主目的であるが、本稿ではしばしばそれと対比されて用いられる電子顕微鏡を利用したヒト毛髪の三次元構造観察について紹介する。電子顕微鏡にも長所と短所があり、それらを理解した上で小角 X 線散乱の長所をより引き出すとともに、互いに補完的に利用して科学の真理を追究する一助となれば幸いである。

1-2. 毛髪について

毛髪はケラチンというタンパク質で形成されている直径約 80 μm の繊維状組織で、図1に示すように外側からキューティクル(毛小皮)、コルテックス(毛皮質)、メデュラ(毛髄質)で構成されている。毛根の末端付近の細胞は生きているが、皮膚の角質層や爪と同様に毛幹部は死んだ細胞の集まりである。よって、日常生活における洗髪、ブラッシング、日光暴露、ヘアカラーやパーマなどの化学処理により組織がダメージを受けても自己修復することはできない。毛髪は3~6年周期で生えかわり、また理美容院で切られることもあるが、毛先にいくにつれて一定程度のダメージは蓄積しやすい性質がある。

図1右ではコルテックスの外周部にメラニン顆粒(メラノソーム)とよばれる無数の黒い点を確認できる。メラニン顆粒の中にはメラニン色素が含まれている。キューティクルやコルテックスは実質無色のため、メラニン色素が髪色の正体である。メラニン色素の多い毛髪が黒髪であり、少ない毛髪がブラウンやブロンド毛、ほとんどない毛髪が白髪である。

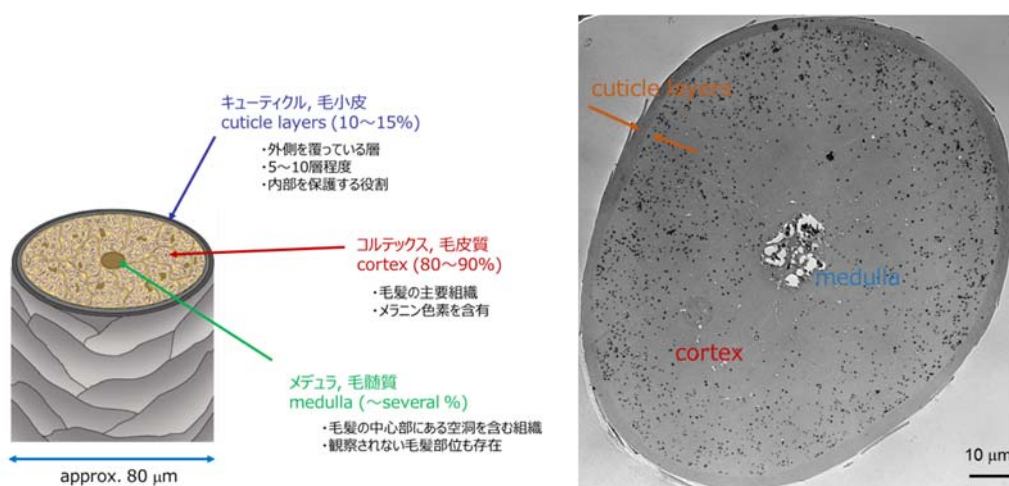


図1 毛髪の模式図(左)および横断面 TEM 像(右)

1-3. 毛髪の三次元構造観察の現状

1950年代に透過電子顕微鏡(TEM)が登場するとともに、毛髪の基本的な微細構造についても報告されている¹²。TEMでは0.1 μm程度に薄スライスした試料を観察するため、得られる情報は基本的に二次元の観察像となる。しかし、加速電圧を高めた超高圧TEM(HV-TEM)では分厚い試料でも観察像が得られる。厚さ2 μmの試料に対して少しずつ傾斜かけて取得した複数の観察像から、毛髪全体の三次元構造の再構築像が得られている³。

TEMに少し遅れて走査電子顕微鏡(SEM)が登場するが、SEMは表面の立体構造を観察するのに適しており、内部の情報は得られない。近年、内部の三次元構造を観察する手法として収束イオンビーム走査電子顕微鏡(FIB-SEM)が登場した。これは、イオンビームで毛髪断面を少し削りSEMで断面観察という操作を繰り返してデータを蓄積し三次元構造にしていくものであり、メラニン顆粒の三次元分布と変化が観察されている⁴。生体試料では電子染色をしてもTEMほどのコントラストは得られにくい、削りカスがしばしば観察の妨害となるなど課題もあるが、今後の発展が期待される。

1-4. TEMによる毛髪観察の実際

今日までに明らかにされている毛髪微細構造の観察像の多くがTEMによるものである。TEMは分解能が十分に高く、適切な試料調製を行えば鮮明な高コントラスト像を得ることができ、信頼性の高い確立された手法である。

一方、特に毛髪では試料調製が煩雑で難しく(It's an Art!⁵)、常にアーティファクトの懸念がつきまとう。具体的には包埋時に樹脂はほとんど浸透しないため観察像でヒビ割れやシワ、部分的な欠損が発生しやすい。この傾向はダメージさせた毛髪の方が強く、香粧学的な研究では大きな課題の一つである。

1-5. 毛髪メラニン顆粒の三次元構造観察

メラニン顆粒は0.5~1.0 μm 程度の紡錘形であるが、その内部構造はあまり分かっていない。これは、皮膚や細胞等のメラニン顆粒(メラノソーム)に比べてかなり密な構造であるとみられること、メラニン顆粒は非常に電子染色されやすくコントラスト差が出ないことが原因と考えられる。

そこで本研究では超高压走査透過電子顕微鏡(HV-STEM)によるメラニン顆粒の内部構造の解析を試みた。HV-STEM では電子線の透過性が高く、分厚い切片に対しても透過像が得られるという利点を利用して傾斜像を複数撮影してコンピュータで三次元像を再構築することが可能である。さらに、電子線を走査して像を得るため、毛髪のような生体試料に対してもアーティファクトや観察中のドリフトの軽減が期待される。

2. 実験

2-1. 試料調製

STEM 用の試料調製も、基本的には TEM 用と同じである。化学処理履歴のない日本人の黒髪を試料として用いた。組織固定をするため毛髪を1%四酸化オスミウム溶液に4時間浸し、エタノールで脱水処理後、epoxy 樹脂で包埋した。トリミング後、ダイヤモンドナイフで厚さ500 nmの毛髪縦断面の超薄切片を作製した。その後、10%酢酸鉛溶液に20分間浸して電子染色をして TEM 用の試料とした。

メラニン顆粒の幅は500 nm程度であるため、この厚さの切片にちょうど収まるメラニン顆粒を観察することにより、メラニン顆粒1個全体を観察できるとともにメラニン顆粒周辺の毛髪組織によるノイズを最小限にすることができると考えられる。ソフトウェアの自動コントラスト調整により電子染色をしなくてもある程度のコントラストは得られるが、メラニン顆粒の観察においては電子染色をした方がより良好な観察像が得られた。

2-2. 観察および解析⁶

HV-STEM(JEM-1000K RS, JEOL Ltd., Japan)は加速電圧1,000 kVで観察した。3D解析時に妨害となるため、観察対象以外のメラニン顆粒があまり映りこまないような場所を探し、 $-66^\circ \sim +68^\circ$ の間で 2° ごとに傾斜角度を変えながら対象のメラニン顆粒の観察像を約68枚取得した。続いて、ソフトウェア(TEMography, System in Frontier Inc., Japan)にて三次元再構築像を作成した。

3. 結果

メラニン顆粒のSTEM像の一例(図2左)および三次元再構築像(図2右)を示す。なお、三次元再構築像はメラニン顆粒の一般的なTEM像と同じようなコントラストとなるように調整しているが、STEMはADF像で取得しているため逆コントラストとなっている。

メラニン顆粒の外周部にはvesicleが点在し(図2左a)、縦方向にはamyloidとみられる繊維が複数存在する(図2左b)。Vesicleは毛髪以外のメラニン顆粒においてもしばしば観察されるが、

詳細は分かっていない。メラノーマ細胞では縦方向に並んで配列している amyloid 繊維も確認されているが⁷、本実験の三次元観察像からは楕円状に巻いているようすが観察された。

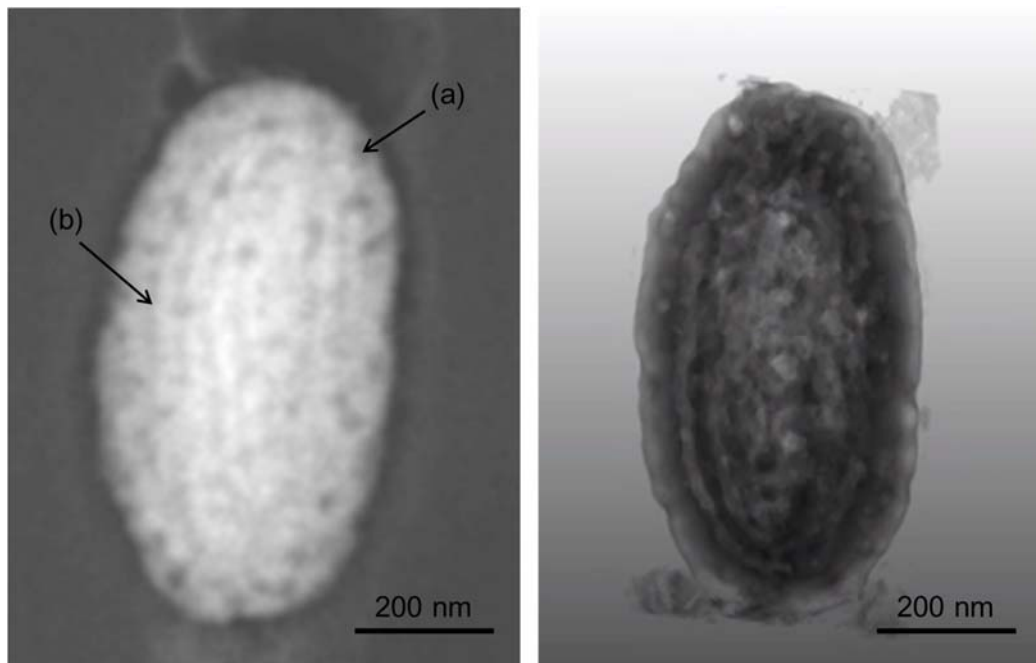


図 2. HV-STEM によるメラニン顆粒の STEM 像(左)および三次元再構築像(右)
(a) vesicle, (b) amyloid fibril

4. 謝辞

本研究は、文部科学省委託事業ナノテクノロジープラットフォーム課題として物質・材料研究機構微細構造解析プラットフォームの支援を受けて、名古屋大学未来材料・システム研究所超高压電子顕微鏡施設にて実施されました。

参考文献

- 1 N. A. Barnicot *et al.*, *Ann. Hum. Genet.*, **19**, 231 (1955)
- 2 M. S. C. Birbeck *et al.*, *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **3**, 203 (1957)
- 3 K. Koike *et al.*, *J. Cosmet. Sci.*, **55**, S25 (2004)
- 4 吉川ほか, 第 73 回 SCCJ 研究討論会 (2013)
- 5 J. A. Swift, Morphology and histochemistry of human hair. In: Jollès P, Zahn H, Höcker H (eds), *Formation and Structure of Human Hair*, pp 149–175, (Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland), 1997
- 6 T. Imai *et al.*, *Microscopy*, **65**, 185 (2016)
- 7 I. Hurbain *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105**, 19726 (2008)