

## 赤外顕微鏡による角層を構成する成分の可視化 Visualization of the Component of Skin by Using an Infrared Microscopic Mapping Method

渡邊 紘介, 鈴木 和之, 前田 貴章, 伊藤 廉  
Kousuke Watanabe, Kazuyuki Suzuta, Takaaki Maeda, Len Ito

(株)ミルボン  
Milbon Co., Ltd.

老化の一つの指標とされているタンパク質のカルボニル化が、頭皮や毛髪に起こるということを我々は見出してきており、更にこのタンパク質の修飾を抑える効果成分を見出してきている。この新たな現象を多角的な視点から検証すべく、今回は毛髪と頭皮角層のカルボニル化の検出を試みた。その結果、毛髪のカルボニル化を検出することはできなかったが、頭皮角層のカルボニル化を有意に検出できたので、その事例を報告する。

**キーワード：** 赤外顕微鏡、角層、タンパク質、カルボニル基

### 背景と研究目的：

スキンケアの分野では、加齢に伴う変化としてタンパク質のカルボニル化が注目されている[1][2]。カルボニル化は酸化によって起こるタンパク質の修飾であり、老化の一つの指標とされている。様々な年齢の女性の毛髪についてカルボニル化度を測定したところ、加齢に伴い毛髪のカルボニル化が進行しており、その進行が襟足部よりも頭頂部で顕著であることを見出してきた[3]。さらに、我々は毛髪の変化だけでなく頭皮においても、加齢に伴って角層タンパク質のカルボニル化が頭頂部にて顕著に起こることを報告した[4]。また、様々な年齢の女性の毛髪を観察調査した結果、うねり毛が頭頂部から生え始め、加齢に伴って襟足まで範囲を拡大しながら増加していくことも確認している[5]。これらは毛髪、頭皮共に頭頂部から、加齢変化が進行することを示唆しており、毛髪と頭皮の加齢変化に相関関係を見出しつつある。

タンパク質のカルボニル化は抗酸化力の低下に伴って発生する活性酸素によって促進されることから[1]、発生した活性酸素の除去がカルボニル化の抑制に有効である。我々は、レスベラトロールなどの抗酸化成分による方法と、細胞内で活性酸素を除去する酵素の発現を促進する方法の、2つを組み合わせることで、頭皮のカルボニル化の抑制ができるかどうかを検証した。市販のヒト表皮角化細胞を用いてカタラーゼの発現を促進する成分の探索を行い、様々な植物抽出液を検討した結果、トウキ *Angelica acutiloba* の根から抽出して得られたエキス(以下アンジェリカエッセンス)に、高いカタラーゼの発現促進効果を確認した[6]。抗酸化成分としてレスベラトロール、カタラーゼ発現促進成分としてアンジェリカエッセンスを配合した乳液を調製し、インフォームドコンセントを得た被験者 10 名(25~43 歳)に右半頭のみ 2 か月の継続使用テストを実施した。使用前と、2 週間、1 か月、2 か月経過時に、テープストリップ法による頭頂部角層の採取し蛍光観察の結果より、角層タンパク質のカルボニル化度は、2 か月使用後に乳液塗布部位で有意な低下が見られた[6]。この新たな現象を多角的な視点から検証する必要があると考えられる。上記蛍光観察では、染色した角層を観察する際に、角層が多重剥離した部位は蛍光強度が強く観察されるため、観察結果がカルボニル化によるものなのか、それとも角層が多層に重なっていることによるものなのかの判別が困難であるという課題がある。また蛍光色素染色といった煩雑な作業が必要であるという点もある。本研究では、これらの課題に対し、SPring-8 BL43IR の赤外顕微鏡を用い、毛髪の頭皮角層のカルボニル化の検出とイメージマッピングの取得を目的に実験を行った。

### 実験：

前述乳液の連続使用によって、最も頭皮角層のカルボニル化を抑制する効果を示した被験者から落屑した頭皮角層(フケ)と抜去した毛髪を試料として実験を行った。頭皮角層と毛髪を BL43IR

の赤外顕微鏡のステージにあるフッ化バリウム板上に置き、透過測定を行った。測定はマッピングステージを使用して  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$  単位で行い、入射された光源の強度を調整し、各測定点に対して  $600\text{-}4000\ \text{cm}^{-1}$  の波数にて赤外吸収スペクトルを得た。この時のアパーチャーサイズは  $6\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$  とし、積算回数は 64 とした。頭皮角層中および毛髪中のタンパク質由来のアミド II(N-H)の吸収ピーク( $1600\text{-}1470\ \text{cm}^{-1}$ )と、カルボニル基(C=O)の吸収ピーク( $1750\text{-}1710\ \text{cm}^{-1}$ )の面積値を算出し[7]、角層および毛髪の厚みの影響を除くためにアミド II の吸収を基準として C=O の面積を補正し、左右の頭皮から得られた角層をそれぞれ N=3 以上測定した平均輝度の比較を図 1 に示した。このように得られた積分データの典型例をマッピングデータとして図 2 に示した。

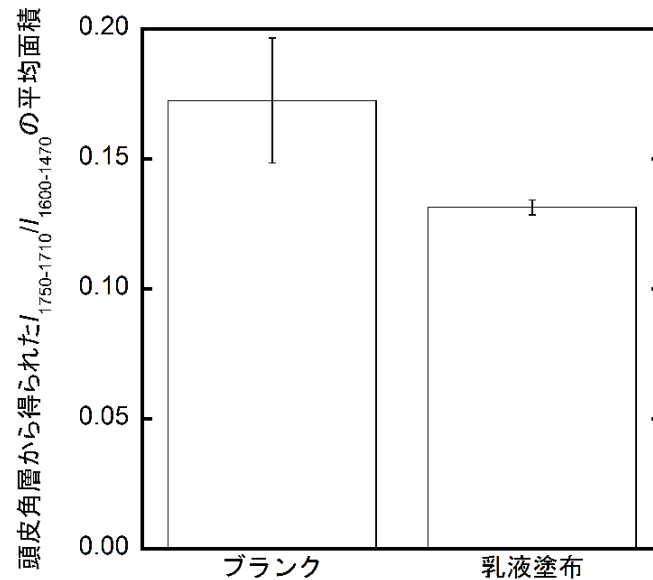


図 1. 乳液を使用していない部位(ブランク)と乳液塗布部位から落屑した頭皮角層の各測定点におけるカルボニル基/アミド II ( $I_{1710-1750}/I_{1470-1600}$ )の平均面積

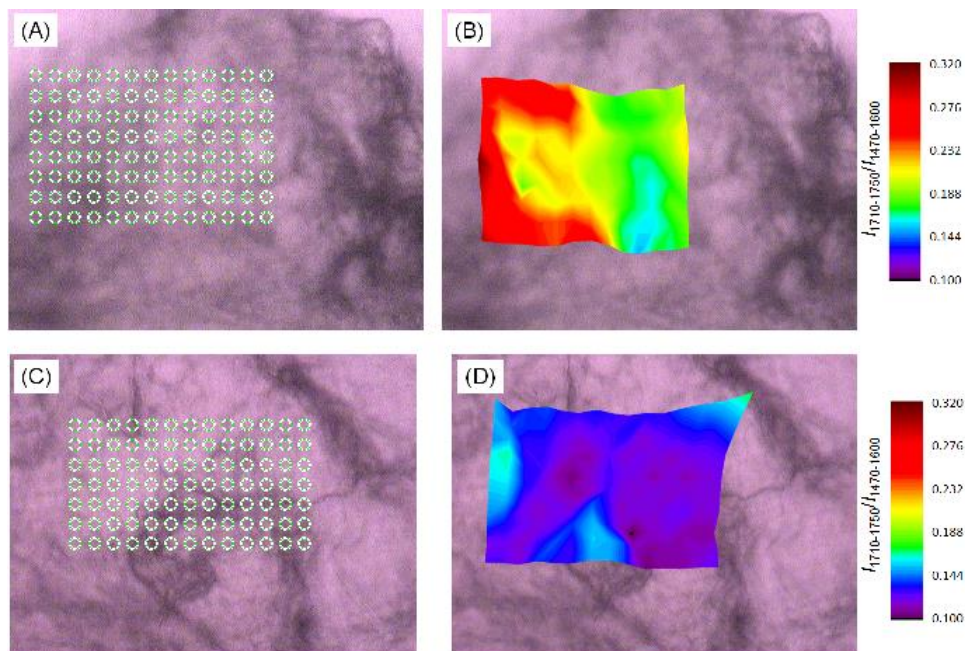


図 2. SPring-8 BL43IR の赤外顕微鏡を用いた頭皮角層(フケ)のマッピングデータ(典型例)  
 A, 乳液を使用していない部位から落屑した頭皮角層の写真(○部分は測定点); B, (A)にマッピングデータを重ね合せた写真;  
 C, 乳液を 2 か月連続使用した部位から落屑したの頭皮角層の写真(○部分は測定点); D, (C)にマッピングデータを重ね合せた写真

## 結果および考察：

蛍光標識により毛髪および頭皮のタンパク質のカルボニル化を有意に確認できた検体に対して測定を試みたが、毛髪におけるタンパク質のカルボニルに由来する有意なピークを検出することができず、毛髪のイメージマッピングを断念した。なお、ラボソースの赤外光でも毛髪のカルボニル基が検出されなかったことから、赤外光を用いた毛髪のカルボニル基の検出は困難であると現在のところ考えている。

頭皮角層の各測定点におけるタンパク質のカルボニル基に由来するピークの平均面積を求めたところ、図 1 のように連続使用した頭皮角層における平均面積はブランクに比べ小さく、タンパク質のカルボニル化が抑えられているということを示唆した。このデータの一つを用いてイメージマッピングを行ったところ、全体的に角層のカルボニル基のピークから算出された強度値が不均一に分布していることを確認した。また、乳液未塗布のブランク部位の角層(図 2B)と比較して、乳液塗布部位の角層(図 2D)は、角層横断面のどの測定点においても吸収強度が低くなっている様子が観察された。

本実験は、前述の蛍光観察の結果から支持できるものと考えられるが、SPring-8 BL43IR の赤外顕微鏡を用いた場合は、蛍光色素染色といった煩雑な作業が不必要であるというメリットがある。また蛍光観察では、染色した角層を観察する際に、角層が多重剥離した部位は蛍光強度が強く観察されるため、観察結果がカルボニル化によるものなのか、それとも角層が多層に重なっていることによるものなのかの判別が困難であるという課題がある。その一方で、本測定ではたとえ角層が重なっていたとしても、タンパク質のアミド由来のピークを基準に厚さ情報の補正と共に、強度データをはっきりと観察・解析することができる。これらのことから、SPring-8 BL43IR の赤外顕微鏡と蛍光観察を組み合わせることでより信憑性の高い分析を行うことが可能になると考えられるため、汎用的に分析ができるように測定条件の検討をさらに進めていきたい。

また、培養皮膚細胞のマッピングにも試みたが、固定条件やサンプルデリバリーの条件を本課題時間内に精査することができず、次期の課題としてクリアしていきたいと考えている。

## 参考文献：

- [1] H. Fujita et al., *Skin Research and Technology*, **13**, 84 (2007).
- [2] I. Iwai et al., *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, **42**, 16 (2008).
- [3] 渡邊紘介、第 39 回関西毛髪技術者協会学術大会, (2014).
- [4] 櫻井勇希ら、第 14 回日本抗加齢医学会総会, (2014).
- [5] F. Tanimura et al., *Fragrance J.*, **42**, 64 (2014).
- [6] Y. Sakurai et al., *Fragrance J.*, **42**, 82 (2014).
- [7] C. Dubief, *Cosmetics & Toiletries*, **107**, 95-102 (1992).