太陽光紫外線に暴露された毛髪の酸化度の X線イメージングによる画像化

東海大学工学部原子力工学科

伊藤敦

Oxidative damage in human hair induced by the exposure of external oxidants and its protection is one of the important issues in the health care against ageing of hair. Although many studies on the UV damage to hair have been reported including structural changes of the outermost part of hair, cuticle area, there are few studies to detect the area of oxidation from cuticle to the inside areas called cortex and medulla, depending on the kinds of solar UV radiation.

We have developed an imaging method of oxidative damage in human hair by X-ray spectromicroscopy with submicron resolution at the K absorption edge of sulfur. The method enabled us to obtain the distribution of cysteic acid, one of the oxidation products of cystine, a major amino acid in human hair. In addition, such X-ray imaging method has an advantage in the detection of oxidative damage deep inside the hair with a thickness of about 0.1 mm. The X-ray spectromicroscopy system was installed at the synchrotron radiation facilities, Photon Factory at Tsukuba.

The oxidative damage by the black light UVA lamp with an emission peak around 365nm was observed at only the surface of the hair at a short exposure, but with prolonged exposure, the damage was extended over the whole area of the hair. Since the UVA exposure of the short exposure case by the UVA lamp corresponds to about 2 hr exposure of solar UV at noon on the clear day of May at the location of Tokai university Shonan campus, our data strongly suggest that even one day exposure to solar-UV induces significant oxidative damage to hair. In contrast to UVA, UVB damage by the UVB lamp with an emission peak around 315nm seems to be limited in the cuticle region, probably because of its low permeability.

1. 緒 言

我々が日常的に浴びている太陽光UV (290-400nm) は、 長波長領域のUVA (320-400nm) と短波長領域のUVB (290-320nm) に分類される。これらのUVが毛髪にダメ ージを引き起こすことはよく知られており、総説にもまと められている^{1.2}。特に酸化ダメージについては、UV暴露 による損傷ばかりでなく、oxidative dyeによる染色のメ カニズム、脱染色の防止などの観点からの研究も多い³⁻⁵⁾。 毛髪損傷を検出する手段としては、化学的な分析や構造変 化によるものがほとんどであり⁶⁾、最近の研究では表面の キューティクル構造の変化を原子間力顕微鏡、走査型電子 顕微鏡などで損傷を画像化(可視化)したものが報告されて いるが、いずれも高分解能ではあるが表面構造を検出する のみで、毛髪内部を観察するには至っていない⁷⁾。

しかしながら、特にUVAは毛髪表面だけでなく、深部 にも到達するにもかかわらず、毛髪表面のキューティクル から内部のコルテックス、さらに中心部のメデュラに至る 毛髪全体の酸化ダメージの分布を非侵襲的に観察する手段 がこれまでになかった。本研究では、我々がこれまでに開 発してきたブリーチ処理毛髪の酸化ダメージの分布を検出



X-ray imaging of oxidative damage of human hair exposed to solar ultraviolet radiation

Atsushi Ito

Department of Nuclear Engineering, School of Engineering, Tokai University するX線顕微鏡による手法を、UVA及びUVB照射毛髪に 適用することによって、表面から内部に至る酸化ダメージ の全容を紫外線の種類に応じて明らかにする。これによっ て将来的な酸化ダメージ防護剤の開発のための基礎的情報 を提供することを目的とする。

2. 方法

2.1. X線分光顕微法

X線顕微鏡はX線によって物質の内部を可視光顕微鏡よ り高分解能で観察する手段である。波長が可視光より短い ため、原理的に高分解能が達成されること、電子顕微鏡に 比べて物質への透過率が高いため、厚い試料でも観察可能 なこと、などが利点としてあげられる。特に本研究で用い たX線分光顕微法は、分子を識別して画像化するX線顕微 鏡特有の手法である。我々はこれまでにX線分光顕微法を 毛髪を構成するイオウ含有アミノ酸(シスチンとその酸化 物システイン酸;図1に化学構造式を示す)に適用できる





ことを報告してきた^{8.9)}。概要を以下に示す。

物質のX線吸収スペクトルを測定すると、含有元素特有 の鋭い吸収が観察される(吸収端と呼ばれる)。さらにその 吸収端近傍のX線エネルギー(波長)を細かく測定すると、 当該元素を含む分子種に特有の吸収微細構造が観察される (Near Edge X-ray Absorption Fine Structure; NEXAFS と呼ばれる)。毛髪を構成する主なアミノ酸であるシスチ ンのイオウ吸収端における NEXAFS とその酸化物システ イン酸の NEXAFSを図2に示す。シスチン画像は図の(a) と(b)のX線エネルギーで撮影した画像の差分により、シ ステイン酸画像は図の(c)と(d)で撮影した画像の差分によ り求められる。一例として、図3に女性毛髪における両分 子の分布を示す。シスチンは毛髪の主成分であることから 全体に分布する(メデュラは密度が低いためシスチンが少 ない)。一方、システイン酸はキューティクルに多く分布し、 毛髪表面の酸化が大きいことがわかる。

この手法を我々はX線光源として放射光と組み合わせた X線密着顕微鏡(検出器はX線ズーミング管)を用いて実現 した。放射光は強度の高い単色X線を得るのに必須であり、 X線密着顕微鏡は0.5ミクロンの分解能をもち、視野のズ ーミングが可能な生体試料に適した顕微鏡装置である¹⁰⁾。 放射光施設は茨城県つくば市のPhoton Factoryを利用した。

2.2. UV照射

UVA照射にはブラックライト(FL15BLB、ニッポ電機)、 UVB照射にはUVBランプ(FGL-15E、ニッポ電機)を用 いた。それぞれ、UVA領域に365nmをピークとしたブロ ードな発光スペクトル、UVB領域に315nmをピークとし たブロードな発光スペクトルをもつ。UV強度はそれぞれ 1.40mW/cm²及び2.34mW/cm²であった(UVX Digital Radiometer, UVP Inc., CA, USAによる測定)。さらに、 実際の屋外の太陽光UVの作用を調べるために、東海大学 湘南校舎にて2019年5月(晴天)の日中での照射も行った。 UV強度は時刻と天候状況によって変化したが、平均して UVAが1mW/cm²、UVBが0.5mW/cm²であった。照射 時間は、人が日中現実的に屋外に滞在する場合を考慮して、 2時間、4時間、6時間とした。一方、ランプ照射時間に ついては、屋外でのUV光量とほぼ同程度となるように調 節した。表1に太陽光UVの光量をまとめた。



(a)と(b)のエネルギーで取得された画像の差分がシスチン画像、(c)と(d)のエネ ルギーで取得された画像の差分がシステイン酸画像を与える。



表1	太陽光UVの照射時間とUVA、	UVB光量

照射時	間 UVA 照射光量	UVB 照射光量
(分)	(kJ/m^2)	(kJ/m ²)
120	72	36
240	144	72
360	216	108

※東海大学湘南校舎での測定(2019年5月の晴天時)

図3 人毛髪断面のシスチン及びシステイン酸の分布 (a)シスチン画像、(b)システイン画像。白い部分が分子が多い領域を示す。

2.3. 毛髪試料

毛髪は市販の日本人女性由来のものを用いた。X線顕微 鏡観察のために、照射後の毛髪に対して垂直スライサー (HS-1、ジャスコエンジニアリング)を用いて約20ミクロ ン厚の切片試料を作製し、エタノールに懸濁後、シリコン フレームに支持された窒化シリコン膜(100nm厚、Silson, UK)上に滴下し風乾させた(図4)。

3. 結果

図5にUV照射を行った毛髪におけるシステイン酸の分 布画像を疑似カラーを用いて示した。3種類のどのUVに



図4 窒化シリコン膜上の毛髪切片 1mm角の窒化シリコン膜(100nm厚)に載せられたX 線顕微鏡観察用の毛髪切片の光学顕微鏡画像。周囲 の黒い領域はシリコンフレーム(0.38mm厚)。



図5 X線顕微鏡によるシステイン酸の分布画像(疑似カラー表示) (a):未照射、(b):太陽光UV照射(光量108kJ/m²)、(c),(d):UVA照射(光量はそれぞれ201.6kJ/m² と302.4kJ/m²)、(e),(f):UVB照射(光量はそれぞれ168.5kJ/m²と252.7kJ/m²)。矢印はUVの照 射方向。

おいても照射方向部位が最も酸化度が高く、内部に行くに つれて低くなった。(c), (d)のUVA照射試料ではかなり内 部まで酸化が進んでいる。特に光量の大きい(d)ではほぼ 均一に酸化しているように見える。一方、(e), (f)のUVB 照射試料では表面と内部の酸化の差が大きい。これらの結 果は、UVAに比べてUVBは透過率が低いことによるもの と考えられる。

これらの画像をもとにキューティクル、コルテックス、 メデュラの3領域の酸化度の定量化を試みた。縦軸はシス テイン酸の吸収の程度(OD; Optical Density)をシスチンと システイン酸を合計した全量で規格化したものとした。測 定面積は、キューティクルで1.3ミクロン角、コルテック スは5.4 ミクロン角、メデュラは1.9 ミクロン角の平均値 を求めた。なお、試料周囲のバックグラウンドの数値の補 正も行った。キューティクルの酸化度はいずれのUVも光 量とともに増加した。興味深いのはUVAではコルテック ス、メデュラの内部領域での酸化が光量とともに進行した のに対して(パネルaの赤丸印)、UVBでは増加がほとんど 見られないことである(パネルb)。また、太陽光UVの場合、 最も光量の大きい試料(324 kJ/m²)の酸化度が他より小さ いのは説明し難く再現性を確認する必要があるが、他の3 点を見ると毛髪内部の酸化度が有意に上昇する結果とはな らなかった。これらの結果は、実際の太陽光ではUVAよ りUVBの作用が重要と解釈できる。

4. 考察

X線顕微鏡による酸化度分布測定法によって、UVA、 UVB、太陽光の3種による酸化度分布の違いを求めるこ とができた。また、X線顕微鏡の高分解能の特徴生かして、 キューティクル、コルテックス、メデュラの3領域におけ る酸化度の違いを明らかにすることができた。結果は以下 のようにまとめられる。

- いずれのUVでもキューティクルの酸化が顕著であった。またそれは光量に依存して増加した。
- 2) UVAは毛髪内部のコルテックス、メデュラでも有意 に酸化を誘発した。一方、UVBでは酸化はキューティ クルに限られているように見える。これはUVBの透過 度が低いためと考えられる。
- 3)太陽光UVはUVBの光量依存性に近く、内部の酸化 は顕著ではなかった。しかし、放射光施設を利用する本 実験では、1年間の限られたビームタイムの関係から多 くの試料測定に制限があり、今後、より明確な結論を出 すために、再現性向上に向けてさらに測定数を増やすこ とが必要である。

太陽光UVの最も低い照射光量試料は、2時間照射であった。この試料でもキューティクルからコルテックス表層 部にかけて有意な酸化が観察されたことは確かな結果であ る(図5b、図6c)。2時間の屋外活動は一般的であり、帽 子の着用、さらに加えて、皮膚を防護するためのサンスク リーン剤のような毛髪酸化防止の防護剤の開発が望まれる。







(a) UVA、(b) UVB、(c) 太陽光UV

なお、本成果については以下の学会で英語発表を行った。 M. Torigata and A. Ito, Imaging of oxidative damage in human hair exposed to solar-UV radiation by X-ray spectromicroscopy at the S-K absorption edge, The 15th Symposium of Japanese Research Community on X-ray Imaging Optics (第15回X線結像光学シンポジウム), Sendai, 2019年10月25日

(引用文献)

- V. Signori, Review of the current understanding of the effect of ultraviolet and visible radiation on hair structure and options for photoprotection, *J. Cosmet. Sci.*, 55, 95-113 (2004).
- 2) A.C. Nogueira *et al.*, About photo-damage of human hair, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 165-169 (2006).
- 3) Y. Zhou *et al.*, Protection of oxidative hair color fading from shampoo washing by hydrophobically modified cationic polymers, *J. Cosmet Sci.*, **60**, 217–238 (2009).
- T. Kojima *et al.*, Investigation of dyeing behavior of oxidative dye in fine structures of the human hair cuticle by nanoscale secondary ion mass spectrometry, *Skin Res. Technol.*, **21**, 295–301 (2015).

- 5) T. Kojima *et al.*, Dyeing regions of oxidative hair dyes in human hair investigated by nanoscale secondary ion mass spectrometry, *Colloids Surf B: Biointerfaces*, **106**, 140-144 (2013).
- M.N. Chandrashekara and C. Raganathaiah, Chemical and photochemical degradation of human hair: a freevolume microprobe study, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **101**, 286–294 (2010).
- M. Richena and C.A. Rezende, Effect of photodamage on the outermost cuticle layer of human hair, J. *Photochem. Photobiol. B: Biology*, 153, 296-304 (2015).
- A. Ito *et al.*, Application of XANES profiles to X-ray spectromicroscopy for biomedical specimens: Part I. Discrimination of macromolecules with sulfur atoms, *J. X-Ray Sci. Technol.*, **19**, 249–260 (2011).
- 9) T. Inoue *et al.*, Application of XANES profiles to X-ray spectromicroscopy for biomedical specimens: Part II. Mapping oxidation state of cysteine in human hair, *J. X-Ray Sci. Technol.*, **19**, 313-320 (2011).
- A. Ito *et al.*, X-ray contact microscopy system for spectromicroscopy of biological specimens, *J. Synchrotron Radiat.*, 5, 1099-1101 (1998).