



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

毛髪のも性解析及び脂質分布、動態に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2015-06-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 俊江 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/51020

毛髪の物性解析及び脂質分布、
動態に関する研究

Analyses of physical property,
lipid-distribution and -dynamics
in human hair

高橋 俊江

序論	4 頁
第 1 章 毛髪脂質研究	7 頁
1 - 1 . 脂質とは	8 頁
1 - 2 . 毛髪とは	14 頁
1 - 3 . 毛髪脂質	21 頁
1 - 4 . 目的	26 頁
1 - 5 . 方法	27 頁
1 - 6 . 結果	36 頁
1 - 7 . 考察	59 頁
1 - 8 . 結論	63 頁
第 2 章 毛髪物性研究	64 頁
2 - 1 . 背景	65 頁
2 - 2 . 目的	66 頁
2 - 3 . 方法	67 頁
2 - 4 . 結果	75 頁
2 - 5 . 考察	83 頁
2 - 6 . 結論	87 頁

第3章 今後の展望	88 頁
参考文献	89 頁
謝辞	100 頁
研究業績目録	102 頁

序論

18 世紀半ばに始まった産業革命により毛織物産業が急激に発展し、その必要に応じて世界中で羊毛の研究が発展した。ニュージーランドの WRONZ (Wool Research Organization of New Zealand Inc.)、ドイツの DWI (Deutsche Wollforschungs Institut)、オーストラリアの CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation) などが専門的な研究機関として挙げられる。産業応用科学の観点から羊毛の構造や物性が精査され、国際的な学会が定期的開催されて現在も続いている。ヒト毛髪研究の歴史は羊毛よりも浅く、人々の生活水準向上に伴う化粧品産業の発達とともに研究対象として注目され始めた。20 世紀半ばには、先行していた羊毛研究で培われた研究基盤を利用して、羊毛同様に繊維としての構造や物性など毛髪そのものの特性の研究が盛んに行われた。当時の先駆的研究者で毛髪研究の教科書的な業績をもたらした Robbins や Swift らは息長く現在も研究を続けている。

毛髪科学は人々の美意識や生活習慣の変遷に応えながらその研究課題をシフトさせていき、外観、感触、スタイルなど感覚に関わる研究へと発展した。それに伴い、初期には学会で羊毛研究の一部として扱われていた毛髪研究が化粧品科学の中で一部門を築き、International Hair-Science Symposium、Applied Hair Science Conference など、毛髪研究に特化した国際会議が開かれるまでに至った。近年では研究のテーマがエイジング、育毛、人種研究など、毛髪を生体の一部として捉えた生活実感に応えるものへとステージを移してきた感がある。

ヒトにとって毛髪は頭部の保護、体温調節、自己表現などの重要な機能

をもつ器官である。頭皮よりも外に出た部分を毛幹、内に入った部分を毛根という。毛幹は直接外界に接するという点で、生体の他の組織とは異なる非常に特殊な環境にある。しかし、角化した細胞から成るため再生機能を持たず、外界からの刺激によって損傷しても自ら回復する事はできない。刺激による損傷挙動も含めた毛幹の様々な特性は、毛根下部の毛球で生合成された時点で決定されている。

多くの毛髪エイジング研究により加齢に伴って毛髪の変化する事が報告されており、その多くは感触や外観の劣化をもたらすものである。しかし、その特性変化は必ずしも一様に進むわけではなく、ある年代において個人差が極めて大きくばらつきを見せる物がある。その事より、筆者は毛髪の生合成の過程で毛球内において加齢を進める、または逆に抗するスイッチが働く場合があるのではないかと考えている。

脂質は生体にとってエネルギー源、組織構築成分、生理機能調節など多様な働きをする。毛髪においても例外ではなく、脂質は毛髪組織の構築、バリア機能維持、粘弾性や潤滑性の発現に加えて、毛球における生合成機構の調節にとっても非常に重要な役割を果たしている。前述した加齢変化に抗する仕組みに脂質が関与する可能性は小さくない。しかし現時点では、生合成過程における毛髪脂質の具体的な機能解明に必要な知見は、脂質の分布、構造、動態のいずれについても十分には得られていない。

本研究においては、まず毛髪の微細構造レベルでの脂質の分布や代謝について研究を進め、毛髪生合成の仕組みに関する脂質の役割解明の端緒を開く事を目指した。次いで毛髪の加齢に伴う特性変化としてキューティクルの損傷挙動を取り上げた。

本論文は以下の 2 編の原著論文を基にして作成した。

主論文 : Takahashi T, Yoshida S (2014) Distribution of Glycolipid and Unsaturated Fatty Acids in Human Hair. *Lipids* 49:905-917

副論文 : Takahashi T, Mamada A, Breakspear S, Ito T, Tanji N (2015) Age-dependent changes in damage processes of hair cuticle. *Journal of Cosmetic Dermatology* 14:2-8

主論文の内容を第 1 章、副論文の内容を第 2 章で扱った。本論文において原著論文からの図表の引用は、出版社からの許可を得たものである。

第 1 章 毛髪脂質研究

脂質の分布、動態、生理学的役割

1 - 1 . 脂質とは

脂質は化学構造ではなく性質に基づいて定義される。Bloor の総説 (1925 年) [1] において、脂質の定義と分類は以下の様になされた。

[定義]

- a . 水に不溶かつエーテル、クロロホルム、ベンゼンなどの溶媒に可溶
- b . 脂肪酸とエステルを形成しているかもしくは形成が可能
- c . 生体によって利用される

[分類]

- ・単純脂質 : Fat (脂肪酸のグリセロールエステル) , Wax
- ・複合脂質 : Phospholipid, Glycolipid, Aminolipid, Sulfolipid など
- ・誘導脂質 (上記の脂質の加水分解物) : Fatty acid, Sterol

2014 年に厚生労働省が刊した「日本人の食事摂取基準 (2015 年版)」策定検討会報告書 [2] では脂質の定義と分類は次の様に記載されている。

「脂質 (lipids) は、水に不溶で、有機溶媒に溶解する化合物である。栄養学的に重要な脂質は、脂肪酸 (fatty acid)、中性脂肪 (neutral fat)、リン脂質 (phospholipid)、糖脂質 (glycolipid) 及びステロール類 (sterols) である。」

本論文ではこれらの定義・分類に従い、かつ外因性の脂質は省いて、生体由来の脂質のみを扱うものとする。

1-1-1. 役割 [1-8]

脂質は生体や食品に含まれ、生理作用物質として非常に重要な役割を担う物質である。生体に蓄積した脂質は代謝されてエネルギーを産生したり、ビタミンやホルモンなど生理機能調節物質の生合成に使われる。また、細胞や細胞膜の構成成分として生体の組織を構築するとともに、細胞内部と外界との情報伝達、外界に対する防御、生合成過程への関与など多様な機能を発揮する。

外界に直接晒される環境にある皮膚と毛髪にとって、脂質の防御機能は特に重要である。それについては後述する。

1-1-2. 複合脂質 [1-6]

他の物質と脂質とが結合したものを複合脂質と呼び、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質などが挙げられる。これらは細胞膜を形成する主要な成分である。

リン脂質はリン酸をモノまたはジエステル形で含む脂質で、細胞膜の約 50% を占める。グリセリン骨格を有するグリセロリン脂質やスフィンゴシンを骨格に持つスフィンゴリン脂質がある。

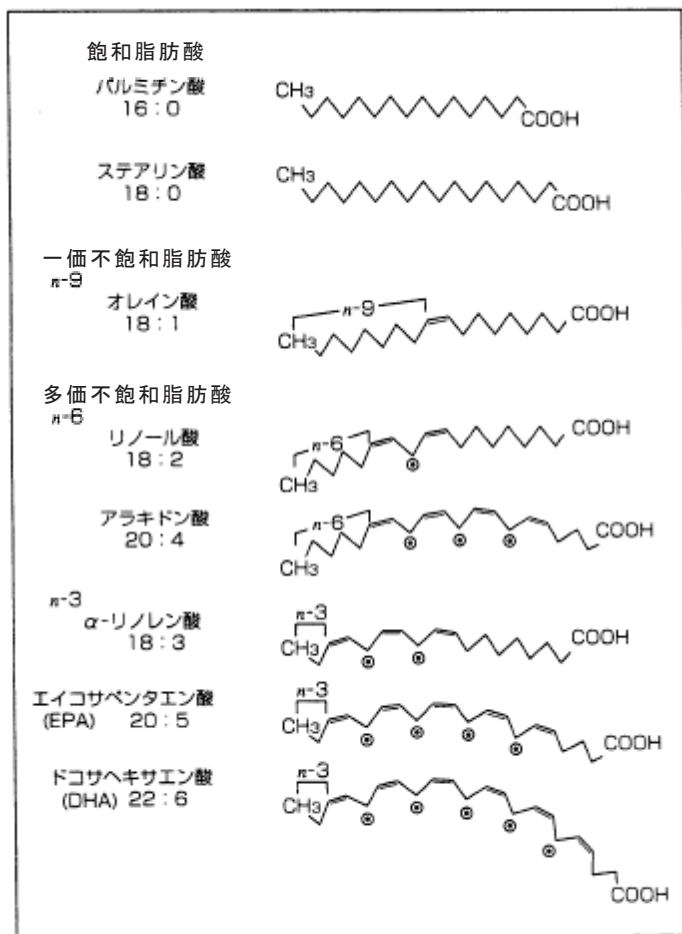
リン脂質に次いでスフィンゴ脂質もまた細胞膜に多く含まれ、細胞表面の受容体としての機能をもつ。皮膚の細胞間脂質の主成分のセラミドは長鎖のアミノアルコールであるスフィンゴシンと脂肪酸が結合したもので、スフィンゴ脂質の一種である。

糖脂質はグルコース、ガラクトース、*N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチルガラクトサミンなどの単糖がグリコシド結合で脂質に結合したものである。細胞膜に存在して安定化させたり、化合物の認識サイトとして働いたりする。糖脂質はその骨格によってグリセロ糖脂質、ステロール糖脂質、スフィンゴ糖脂質に分類される。スフィンゴ糖脂質の内、シアル酸を含有するものをガングリオシドという。これは脳神経系に多量に存在し、神経系の修復、細胞の増殖、シグナル伝達、物質のレセプターなど細胞機能の制御に関わっている。

1-1-3. 飽和、不飽和脂肪酸 [1-5]

脂肪酸には二重結合をもたない飽和脂肪酸と二重結合を有する不飽和脂肪酸がある。前者は化学的に安定だが、後者は酸化され易く比較的不安定である。不飽和脂肪酸の内、二重結合が一つの物は一価不飽和脂肪酸、複数存在するものは多価不飽和脂肪酸（PUFA）と呼ばれる。後者は特に反応性が高くエネルギー源、細胞膜構成物質、生理的活性物質エイコサノイドの原料となるなど生体にとって非常に重要である。また、生体中の不飽和脂肪酸の二重結合は基本的に cis 体なので、不飽和結合数が多いほど分子は屈曲してバルキーな構造となる。細胞膜に存在するリン脂質の不飽和脂肪酸はそのバルキー性のせいでリン脂質に流動性を付与し、組織間の潤滑性を増す。不飽和結合を 6 つも持つドコサヘキサエン酸（DHA）などはその効果が極めて高い。神経細胞は軸索や樹状突起など膜の割合が非常に多い構造であるが、DHA が細胞膜の柔軟性を維持して脳・神経系の健全性に寄与している。

不飽和脂肪酸の内、メチル基末端から数えて最初の二重結合が 3 番目にある物は n-3 系または ω 3、6 番目にある物は n-6 系または ω 6、9 番目にある物は n-9 系または ω 9 と分類される。それぞれ、代表的な脂肪酸は α リノレン酸、リノール酸、オレイン酸である（Fig. 1）。



代表的な脂肪酸と活性メチレン基 (●:フリーラジカルがしやすい位置)

Figure 1 代表的な脂肪酸の構造 (ref. 3 より転載)

不飽和結合数が増える程、反応性の高いメチレン基が増える事と分子の屈曲が強くなる様子が示されている

1-1-4. 必須脂肪酸 [2-15]

必須脂肪酸とは、生体の維持に必要であるにも関わらず生体では合成されないため食餌から摂取する必要がある脂肪酸である。

ヒトの場合には広義ではドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) や α リノレン酸 (C18:3) などの n-3 系脂肪酸とアラキドン酸やリノール酸 (C18:2) などの n-6 系脂肪酸が挙げられる。但し、DHA や EPA は α リノレン酸、アラキドン酸はリノール酸から生合成され得るので、狭義の必須脂肪酸といえば α リノレン酸とリノール酸を指す。必須脂肪酸の欠乏による様々な健康障害が報告されている。例えば α リノレン酸の欠損は鱗状皮膚炎や皮膚萎縮に関与する。

必須脂肪酸は体内でエネルギーに変換されたり、組織に取り込まれたりすると考えられている。ラットを使った実験では分解、排出に 78%、合成に 6% が使われ、16% が脂肪、筋肉、皮膚などの細胞脂質として蓄積すると報告された。しかし、ヒト体内においては、DHA や EPA の合成の原料となる事を除き、残りの大部分がどのような代謝を受けるのかは長年不明のままである。 α リノレン酸が DHA の合成に使われる割合は年齢によって大きく異なる。1 ヶ月齢の乳児ではDHAの 42% がミルクから摂取した α リノレン酸に由来するが、3 ヶ月齢では 11%、7 ヶ月齢では 7% と減少していき、成人では検出限界以下 (<1%) と極めて少ない。成長につれて DHA や EPA の合成以外の代謝経路で α リノレン酸が消費されているのではないかと推測されてはいるが、未だ検証に至っていない。

1 - 2. 毛髪とは [16-27]

頭皮よりも下部を毛根、上部を毛幹という。頭皮の表皮と真皮が毛根を包み込んで陥入した底部の膨らんだ部分を毛球と呼ぶ (Fig. 2)。毛球の基部には毛乳頭が存在し、毛細血管から栄養を取り込んだ毛乳頭内の毛母細胞が細胞分裂を繰り返して増殖、角化する。そうして成長した毛髪が頭皮外へ押し出された部分が毛幹で、日常目に見える毛髪の部分である。

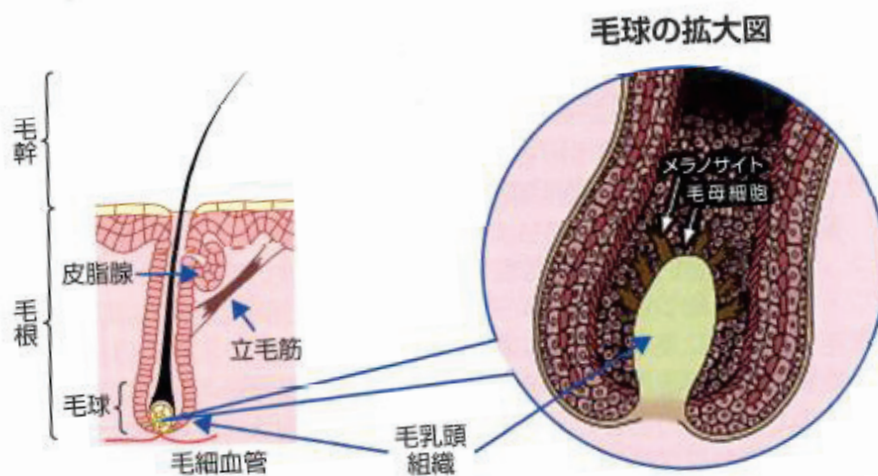


Figure 2 毛髪のなりたち (ref. 17 より転載)

毛髪は直径 40~100 μm 程度の繊維である。日本人毛の場合、本数は約 10~15 万本、生毛密度 (単位面積あたりの本数) は約 200 本/ cm^2 、成長速度は約 1 cm /月である。寿命は多くの場合 5 年程度だが、稀に長く伸び続ける場合もあり、数メートルに達した例が報告されている。

これらの特性は人種によって様々である。例えば生毛密度は Caucasian が Asian、African よりも 2~3 割ほど多い。一方成長速度は Asian が一番早く、次いで Caucasian、African の順と報告されている。

直径と横断面形状は特に人種的な特徴が明らかである。Asian 毛は最も太くて横断面が比較的眞円に近いが、Caucasian 毛は細くて楕円に近く、African 毛の太さは中間で断面は三角形、馬蹄形など非常に多様な形状を示す。以下に代表的な横断面の光学顕微鏡写真を示した (Fig. 3)。

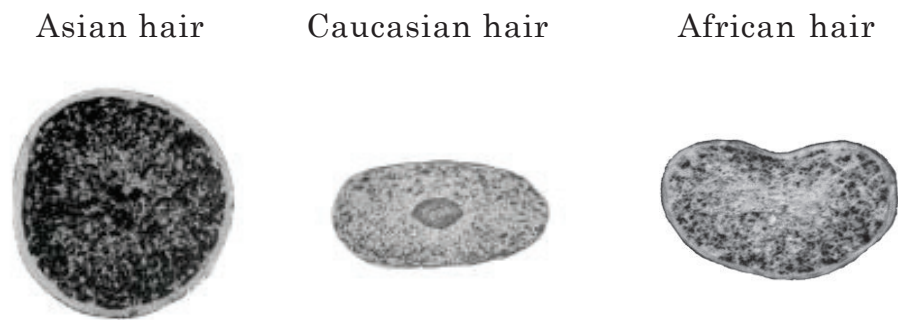


Figure 3 毛髪横断面の光学顕微鏡写真 (Asian 毛、Caucasian 毛は ref. 17 より転載、African 毛は未発表画像)

1-2-1. 組織 [16-19, 28-41]

毛髪を構成する微細構造の走査型顕微鏡 (SEM)、透過型顕微鏡 (TEM) 画像を Figure 4~6 に示す。

毛髪の表面は鱗状のキューティクルが約 7 層積層したキューティクル層で覆われている (Fig. 4, 5)。毛髪の異方性 (順毛、逆毛方向がある) はこの積層構造に因るものである。キューティクルは毛髪の体積の約 15% を占める。健康なキューティクルは滑らかな輪郭、規則的配列と疎水的表面を有し、良好な手触り、毛流れ、ツヤ等に寄与している。

キューティクル細胞は A 層、エキソキューティクルそしてエンドキューティクルの微細構造よりなる (Fig. 6)。各々が含有するシスチンの量には明らかな差があり、A 層 (>30%)、エキソキューティクル (約 15%)、エンドキューティクル (約 3%) の順に多い。シスチンのジスルフィド結合はタンパクの構造の堅牢化に寄与し、その含有量が最も少ないエンドキューティクルはキューティクル細胞中で最も脆い構造である。

キューティクルの内側にはコルテックスが存在する (Fig. 4, 5)。これは主に細長い形状のコルテックス細胞及びコルテックス細胞間質の集合体からなる複雑な構造の組織である。毛髪の体積の約 82% を占め、毛髪全体の強度を担っている。

毛髪の中心部にはメデュラがある (Fig. 4)。これは主にタンパク質と脂質からなる空洞の多い構造で、毛髪体積の約 3% を占める。しかしキューティクルやコルテックスとは異なり、メデュラの存在しない毛髪があるし、1 本の毛髪でも存在する箇所と存在しない箇所とがある。傷んだ毛髪のメデュラは大きいという傾向があり、物性や外観の劣化の原因の一つと考えられている。太い髪は元々メデュラの体積率が高く、細い

髪では低い傾向がある事より、少ないタンパク質である程度の太さの体毛を数多く作るための存在であるとか、空気を抱え込んで保温効果を持つ役割をするなどと考えられている。

キューティクルーキューティクル細胞間、キューティクルーコルテックス間そしてコルテックスーコルテックス細胞間には細胞膜複合体 (Cell membrane complex、CMC と略される) が存在する (Fig. 6)。幅 25 nm 程の帯状の組織で、中央にタンパク質から成る δ 層、その両側に脂質層である β 層 2 つが位置する三層構造をとる。CMC は外部からの物質の主な浸透経路である。

キューティクル間 CMC の β 層の内、内側のキューティクルに接した方を outer β 層と呼ぶ。健康な毛髪表面はこの outer β 層で覆われている。分岐鎖脂肪酸 18 メチルエイコサン酸(18-MEA)はこの outer β 層に偏在してタンパク質にチオエステル結合で結合し、毛髪表面を疎水性に保ち、感触の滑らかさや毛流れの良さに寄与している。

メラノソーム (メラニン顆粒) (Fig. 5) は主にコルテックスに存在し、キューティクルには稀にしか見られない。Asian の黒髪に含まれるメラノソームは米粒状の形状をしており、サイズは長径 0.8 μm 、短径 0.4 μm 程で、黒に近い濃茶色である。繊維状のタンパク質が構造の骨格を形成し、それに高濃度のメラニン色素が結合したもので、脂質二重膜で囲まれている。メラノソームは毛母細胞に存在するメラノサイトで生合成され、その後角化領域へと移動していくが、その生合成～移動の過程に脂質が関与すると推測されている。

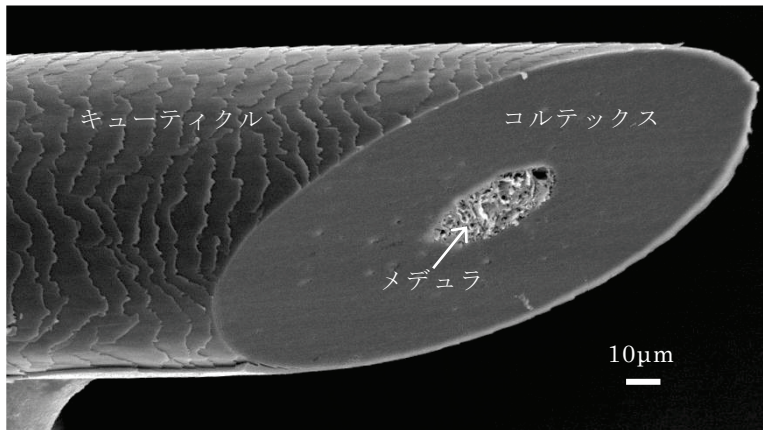


Figure 4 斜めにカットした毛髪の SEM 画像

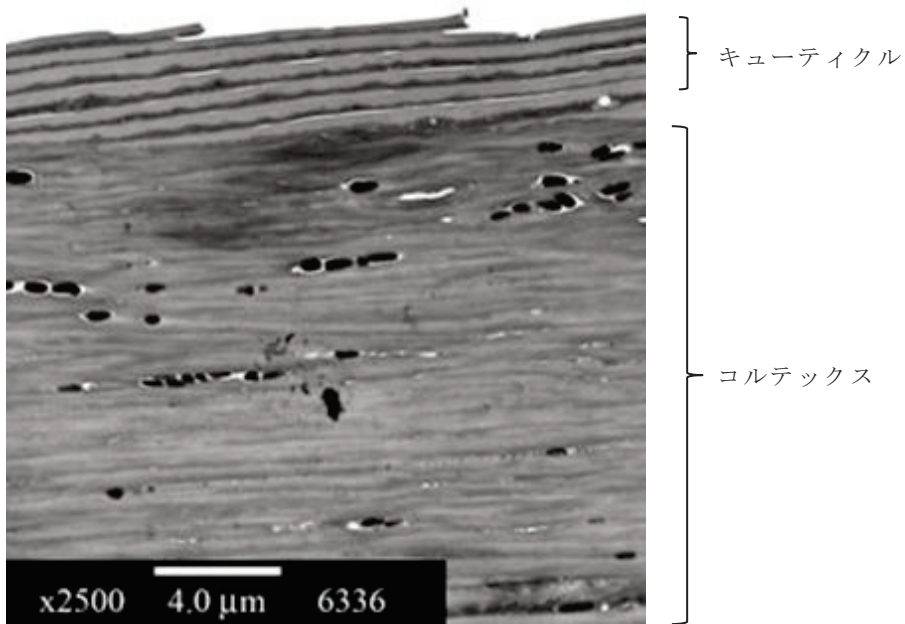


Figure 5 毛髪縦断面 TEM 画像

コルテックス内の黒い顆粒はメラノソーム（メラニン顆粒）

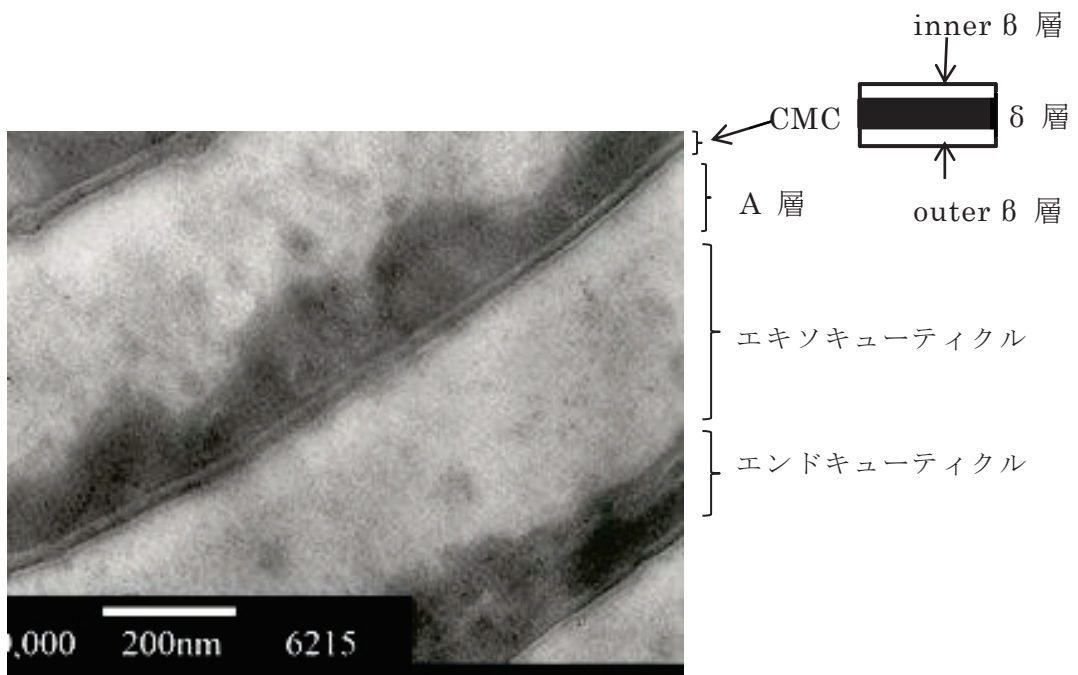


Figure 6 毛髪横断面のキューティクル部分の TEM 画像

1 - 2 - 2 . 構成成分 [16-19, 42]

毛髪を構成する成分の大部分がタンパク質で、65～95 wt% を占める。タンパク質に次いで水分（約 10 wt%）、脂質（1～9 wt%）、そして微量成分（<1 wt%）の無機質（Ca、Mg、Al、Si、Na、K、Zn、Cu 等）が含まれる。無機質は主に汗、食餌、大気や土壌、水から毛髪に移行したものと考えられる。無機質の内のいくつかは、その多寡が様々な病気の発症と密接に関わっている事が報告されている。

1 - 3 . 毛髪の脂質 [16, 43-52]

毛髪において脂質はタンパク質と水に次ぐ主要な構成成分である。皮脂やヘアケア製品などに由来する外因性脂質としてはアルカン、スクアレン、ワックスエステル、中性脂肪、高級アルコール、脂肪酸等、そして毛髪自体に由来する内因性脂質としては脂肪酸、コレステロール、セラミド、コレステロールエステル等が主な物として挙げられる。

1-3-1. 分布 [49-52]

内因性脂質はキューティクルやコルテックスの細胞間 CMC の β 層、メラノソーム結合膜やメデュラに比較的多量に存在している。

毛髪の成長過程に伴って脂質の分布は変化する。Lee らは毛包、内毛根鞘、毛幹の順に、角化進行度の初期から後期にかけてステージごとに脂質を測定し、脂質の割合を以下の様に報告した。

毛包：脂肪酸 > フィトスフィンゴシン > セラミド > コレステロール
> 硫酸コレステロール

内毛根鞘：脂肪酸 > フィトスフィンゴシン > セラミド
> コレステロール > オレイン酸コレステロール

毛幹：フィトスフィンゴシン > 脂肪酸 > セラミド > コレステロール
> 硫酸コレステロール

1-3-2. 糖脂質

羊毛の内部には大量の糖脂質と糖セラミドが含まれる事が報告されている [53]。同様にヒト毛髪にも、微量の糖脂質が含まれると考えられている [54-56]。例えば、血液型 A 型の毛髪抽出物には *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の結合した血液型 A-活性糖脂質が含まれる事が示唆されている。また、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) または GalNAc を骨格の一部として含むステリルグリコシド (SG) 様脂質の存在が 2011 年に報告されている [57]。

1-3-3. 機能

毛髪の脂質は微細構造の脂質膜形成、毛髪表面及び組織間の潤滑化、組織構築成分の生合成の場への輸送、角化後の組織の物性の制御などにおいて様々な重要な役割を果たしている。

例えば、健全毛髪表面に存在する 18-MEA は表面を疎水的に保ち、髪に滑らかな感触を与えている。更に、そのバルキーな構造がキューティクル細胞間 CMC の packing を緩めて、キューティクル間の滑り性を高めて刺激による負荷を低下させる効果を発揮する [33, 37-40]。

18-MEA を持たない先天的な病気であるメープルシロップ尿症患者の毛髪では、キューティクルの構造的な欠損が往々にして観察される [38]。

毛髪の必須脂質量と UV 照射によるダメージを Asian、European、African の 3 人種で比較した研究の結果、必須脂質量の多い Asian 毛が最も UV ダメージが小さかった事より、必須脂質には UV から髪を防御する働きがあると考察された [58]。また、X 線解析により African 毛では内在脂質の存在によってケラチンタンパクの packing 配列が損なわれている事が見出され、高濃度の脂質がケラチン二量体の間に入り込んで構造を変化させたと考えられている [59]。

生合成過程調節機能についても報告されている [60, 61]。マウスでは脂質代謝の遺伝的疾患が炎症や異常成長毛などを起こす数多くの例が報告された。ヒトでは、乳ガン患者の毛髪に見られたケラチンタンパク β シート構造と脂質量の異常がガン切除後には正常に復帰した事より、乳ガンのシグナル伝達分子により毛包内の脂質生合成過程に変化が生じたものと考えられた。

1-3-4. 必須脂肪酸代謝の場としての毛髪 [62, 63]

食事から摂取された必須脂肪酸は体内で代謝される。毛髪はその代謝の場の一つであるかもしれない。

Fu と Sinclair は ^{14}C で 1 位をラベルした α リノレン酸 (ALA) 入りの餌で飼育したモルモットの各組織の ALA 量を測定した。その結果、ラベル化 ALA の 46% 以上が皮膚と体毛の脂質に移行し、とりわけ頭毛及び頭皮中に多く存在する事がわかった。頭部では、非ラベル化物も含めた組織あたりの総 ALA 量は他の組織 (肝臓や膵臓など) と比べてずっと少ないにも関わらず、比放射能が極めて高かった事より、摂取されたラベル化 ALA が代謝される前に速やかに頭部に移行したという事がわかる。更に、ALA の DHA への変換率が非常に小さいという事も見出された。ALA のヒト体内動態はほとんどわかっていないが、このモルモットの研究結果がヒトにも当てはまるとすれば、ALA はヒトの毛髪・頭皮において何か特別な代謝経路を経て何らかの生理学的役割を果たしているのではないかと期待される。

1 - 4 . 目的

脂質の毛髪微細構造レベルでの分布と構造を明らかにし、毛髪内在脂質の役割を考察する。更に、長年に亘りヒト体内動態が謎であった必須脂肪酸の代謝の場として皮膚・毛髪系を捉え、代謝経路や機能について論じる。

1 - 5 . 方法

本論で使用する物質、測定手法の略名を以下に列記した。

ALA: Alpha-linolenic acid

ATR: Attenuated total reflection

CMC: Cell membrane complex

DMOX: 4,4-dimethyloxazoline

ESI-MS: Electro-spray ionization mass spectrometry

ESG: Ester sterlyglycoside

FTIR: Fourier-transform infrared

GalNAc: *N*-Acetyl galactosamine

GCMS: Gas chromatography-mass spectrometry

GlcNAc: *N*-Acetyl glucosamine

HPLC: High performance liquid chromatography

MS: Mass spectrometry

MS/MS: Tandem mass spectrometry

PUFA: Polyunsaturated fatty acid

SEM: Scanning electron microscope

SG: Sterlyglycoside

SGL: Sterlyglycoside-like lipid

TEM: Transmission electron microscope

ToF-SIMS: Time-of-flight-secondary ion mass spectrometry

UPLC: Ultra high performance liquid chromatography

本研究では毛髪表面（キューティクル）、内部（コルテックス、メデュラ、メラニン顆粒）、キューティクルとコルテックスの界面そして毛球とそれぞれの領域で FTIR や MS（ToF-SIMS, GCMS, ESI-MS）などの機器分析によって脂質とその代謝物を検出し構造同定を行った。

[毛髪試料]

10～30 代の日本人女性の毛髪を頭皮から 1 mm 以内の位置でカットし、化学処理履歴の無い部分を測定に用いた。また、自然脱毛した毛髪の毛球部分も使用した。毛髪提供者は研究の目的、試料及び実験データの取り扱い等について倫理基準に則った詳細な説明を受け、同意の上で提供を行った。

実験に先立ち、必要に応じて以下の①、②いずれかの方法で毛髪試料を洗浄し、表面の皮脂、非共有結合脂質や外因性の化学物質を除いた。

①界面活性剤の水溶液（15 wt% Sodium polyoxyethylene lauryl ether sulfate aq. をリン酸で pH 7 に調節）で 3 回洗浄後、更に Ethanol、Hexane で洗浄

②水洗後 Ethanol または Acetone に 2～3 日浸漬

[試薬]

CHCl_3 、Methanol は特級品を関東化学から購入して用いた。脂肪酸のメチルエステル化に使用した HCl-Methanol (5-10%) 液は東京化成、脂肪酸の DMOX 誘導体化に使用した 2-Amino-2-methyl-1-propanol ($\geq 95\%$) は Sigma-Aldrich (USA) から購入した。

メラノソーム単離に用いたパパインとリン酸緩衝液 (pH 6.86) は和光純薬、ジチオエリトロール ($\geq 99\%$) は Sigma-Aldrich から購入した。

[縦二分割毛作製]

毛髪内部の測定の為に、光学顕微鏡観察下でミニ鉋 (Mini-plane, 日本) を用いて縦二分割毛を作製した。

[キューティクル剥離毛作製]

化学処理による脂質変性を避ける為に、次の 2 通りの方法で機械力によってキューティクルを除いた。

①ハブラシ法：キューティクルをリフトアップさせて剥がれ易くする為に 50 mm の毛髪を引っ張り圧縮試験機 TG-500N (ミネベア) を用いて延伸した。延伸は 20°C、20% 相対湿度の条件下で行い、毛髪の状態に応じて切れないように延伸レベルを調節 (最大 135%) した。その後毛髪を取り外し、平らな台上に固定して、毛先から根元に向かってハブラシ GUM #191 (サンスター) で数百回擦った。適宜毛髪表面をレーザ顕微鏡 VK-8700 (キーエンス) で観察し、キューティクル剥離レベルが下記 TB1、TB2 に達するまで、以上の手順を繰り返した。

- ・ TB1 (部分剥離レベル) : キューティクル層の約半分 (約 3~4 層) が残存

- ・ TB2 (ほぼ完全剥離レベル) : キューティクル 1~2 層が残存、コルテックス表面の露出面積は 50% 以下

②ビーズ法: 中心に回転軸のついた直径 130 mm のステンレス製円筒表面に毛髪をテープで貼りつけた (Fig. 7 A)。直径 200 mm のステンレス製円筒状容器にアルミナのビーズ (直径 2 mm) を満たし、そこに A を差し込んだ。A の回転軸を攪拌モーターのスリーワンモータ HEIDON 600G (新東科学) に取り付けて回転させ (Fig. 7 B)、毛髪にビーズを衝突させてキューティクルを削り取った。適宜毛髪表面をレーザ顕微鏡 VK-8700 で観察し、適当なタイミングで表裏を返した。キューティクルが完全に除かれてコルテックス表面全体が露出するまで続けた。これを完全剥離レベル (BD) とする。

TB1、TB2、BD 各々のレベルにつき毛髪を 5~10 本作製し、イオン交換水、Ethanol、Hexane に 1 分ずつ浸漬して風乾した。

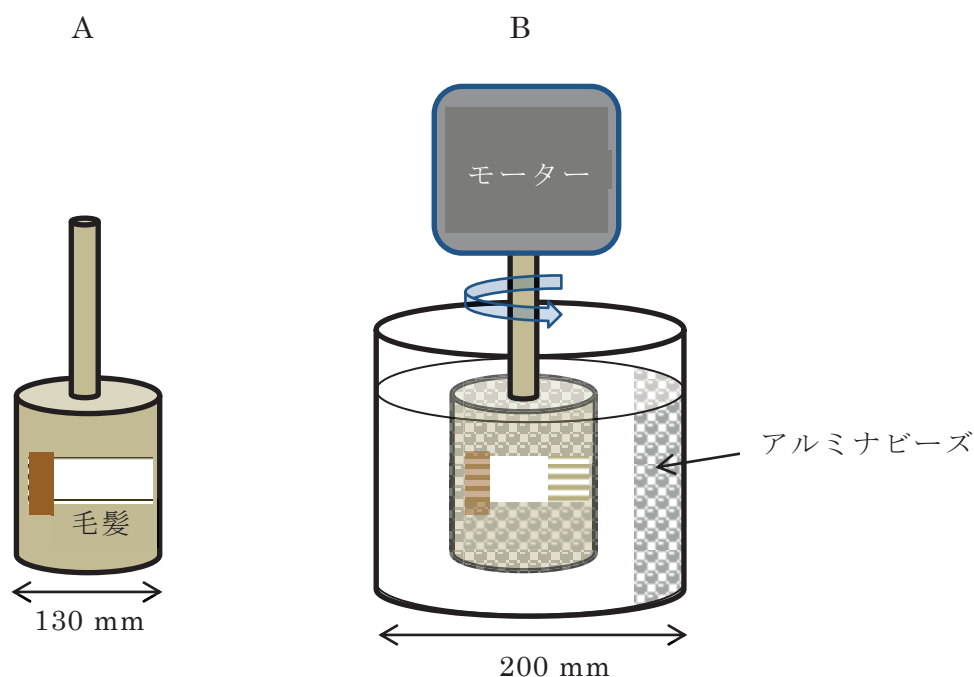


Figure 7 キューティクル剥離方法 (ビーズ法)

[脂質抽出]

毛髪試料を大過剰の蒸留水に 30 分、次いで CHCl_3 -Methanol (Vol 比 2/1) 液に 2 日間浸漬して洗浄後、風乾。蒸留水 0.5 ml と 15% KOH/Ethanol 溶液 0.5 ml を加えて 60°C で 2 hr 加熱し、鹼化を行った。上清をとり、10% HCl aq. 140 μl と Hexane 1 ml を加えて 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌し、二層となった液の上層を採取した。残りの液に更に Hexane 1 ml を加えて攪拌し、上層を採取する工程を 2 回繰り返した。3 回分の上層を合わせ、 N_2 ガスで乾固して脂肪酸を得た。

[脂肪酸のメチルエステル化]

DMOX 誘導体化に先立ち、脂肪酸のメチルエステル化を行った [64]。毛髪抽出脂質に 5% HCl-Methanol 液 0.15 ml と無水 Methanol 0.35 ml を加え、密封したガラス管中で 100°C 、4 hr 加熱した。室温まで冷却した後に 1 ml の Hexane を加え、MS 測定まで -20°C で保存した。MS 測定時には N_2 ガスで溶媒乾固後、10 μl の Hexane を加えて試料とした。

[脂肪酸の DMOX 誘導体化]

分子内の不飽和結合の位置を知るために DMOX 誘導体化を行った [65]。メチルエステル化した脂肪酸を乾燥後、Hexane で洗った 2-Amino-2-methyl-1-propanol 液 (0.5 ml) と混合、 N_2 下でボルテックスミキサーで攪拌し、一晚 150°C で加熱した。室温に冷却後、飽和 NaOH aq. (0.5 ml) とイオン交換水 (0.5 ml) を加えて混合し、ボルテ

ックスミキサーで攪拌。更に 4 ml の Diethylether/Hexane (Vol 比 1/1) を加えて 1 分間攪拌後、3000 rpm で 5 分間遠心分離した。液の上層を採って N₂ 下で乾かし、-20°C で保存した。

[ESG と ESG 様脂質の加水分解]

脂質を 1 ml の 3M HCl と混合して 100°C で 4 hr 加熱し、冷却後、Bligh-Dyer 法に則って脂質層と水/Methanol 層を分画した [66]。両層を濃縮し、-20°C で保存した。加水分解 ESG 様脂質の親水性生成物と標準品の GlcNAc とをアセチル化するには、真空乾燥した試料を THF、無水酢酸、共触媒の 4-(Dimethylamino) pyridine と混合し、室温下 24 hr 反応後に Sodium bicarbonate で中和してアセチル化したサンプルを抽出し、減圧濃縮を行った [67]。

[メラノソームの単離]

以下の方法で毛髪タンパク質を溶解し、メラノソーム（メラニン顆粒）を抽出した [68, 69]。pH 6.86 のリン酸緩衝液 600 g、パパイン 45 g、ジチオエリトリール 6 g の混合液に毛髪 20 g を加え、N₂ 下 50°C で 50 hr 攪拌した。減圧下、membrane filter (PTFE polymer/ADVANTEC cat.No. H020A047A 孔径 0.2 μm) を用いてろ過し、水分がほぼ無くなった時点でイオン交換水を 200 g 加えて更に減圧濾過を行った。次いで iso-Propanol/Hexane/イオン交換水 (Vol 比 6/6/1) 液 200 g を加えて減圧濾過を 2 回行った。更にイオン交換水 200 g を加えて減圧濾過する工程を 3 回繰り返し、60°C、1 hr、10 cmHg で減圧乾燥して固形物を得た。

[メラノソーム結合脂質抽出]

単離したメラノソームを活性剤 Sodium dodecyl sulfate の 5%aq. で洗浄して周辺脂質を除いた。次いで顆粒を $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ (Vol 比 2/1) 中で 30 秒間超音波処理後、 37°C で 1 hr、室温で 2 日間放置してメラノソームに結合した脂質を抽出した。遠心分離を繰り返してメラノソームを除き、結合脂質の溶液を得た。

[脂質分析]

試料の特性と求める情報に応じて以下の機器分析手法を使い分け、あるいは組み合わせて用いた。なお、脂肪酸の定量には C19:0 脂肪酸を内標として用いた。

MS パターンを基に物質の構造帰属を行う際にはデータベースとして Mass Bank <http://www.massbank.jp/> などを用いた。

* FTIR-ATR : 脂質検出に用いた [64]。

・機器 : ML Agilent 5500 Compact FTIR (Agilent Technologies, USA)

または Travel IR (Smith Detection Inc., USA) 。

ダイヤモンドの ATR probe (\varnothing 2 mm) を使用した。

・方法 : 測定毎に 2~3 本の毛髪を用いた。スペクトルの範囲は $4000 \sim 750 \text{ cm}^{-1}$ 、分解能は 8 cm^{-1} とし、48 回積算して得たデータを平均した。

* TLC : メラノソームから抽出した脂質の分画に用いた。

試料の $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ (Vol 比 1/2) 溶液をシリカゲル 60 の TLC プレート (和光純薬) にスポットして展開させた。展開溶媒は $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ (Vol 比 95/12) 。展開後のプレートに 50% 硫酸 aq. をスプレーし、110~130°C に加熱して脂質の検出を行った。

* HPLC : メラノソームから抽出した脂質の分離・分析に用いた。

- ・ 機器 : 蛍光検出装置 RF10A-XL (励起波長 350 nm、蛍光波長 450 nm 島津製作所)、カラム Shim-pack XR-DOS (100×4.6 mm、40°C、島津製作所)、ポンプ L-6200 pump (日立製作所)
- ・ 溶離液 : 50-100% Methanol/0.1% ギ酸 の濃度勾配液、流速は 0.5 ml/min.

* GCMS : 毛球の脂肪酸とその誘導体の構造解析に用いた。

- ・ 機器 : JMS GC-Mate II (日本電子)
カラムは capillary high polarity polyethylene glycol column DB-WAX または DB-WAXetr (Agilent J&W, USA)

* UPLC-ESI-QToF-MS : HPLC で分離した脂質の構造解析に用いた。

- ・ 機器 : UPLC-ESI-QToF-MS Xevo (Waters, USA)
カラムは ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm , 2.1×50 mm)
- ・ 溶離液 : 50-100% Methanol/0.1% ギ酸 の濃度勾配液、流速は 0.3 ml/min.
- ・ 測定条件

MS モード : loading 電荷は capillary に対して 3.0 kV、sampling cone に対して 40 V、extraction cone に対して 2.5 V

MS/MS モード : 衝突エネルギーは 20~80 V の範囲でサンプル濃度に応じて調節した。

* ToF-SIMS : 毛髪表層から内部にかけての脂肪酸の分布を測定した [70-72]。

・機器 : ToF-SIMS IV instrument (ION-ToF GmbH, Münster, Germany)

一次イオンは Bi⁺ (25 keV、0.3 pA)

* SEM : 毛髪表面のキューティクル剥離状態を観察した。

・使用機器 : SEM JSM6330F (日本電子)

試料コーティング装置 ESC-101 (エリオニクス)

・方法 : 毛髪試料を真鍮の SEM 試料台に両面テープで接着し、タングステン蒸着 (厚み~200 Å) を行った。加速電圧 15 kV で SEM 観察を行った。

* TEM : 毛髪内部構造の観察に用いた。

・機器 : TEM H-7100 (日立ハイテクノロジーズ)

ミクロトーム Ultracut N (Reichert-Nissei)

・方法 : 毛髪をエポキシ樹脂 (Oken Epok 812 セット、応研商事) に包埋し、ミクロトームで 100 nm に薄切。酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色後、TEM 観察を行った。

1 - 6 . 結果

1 - 6 - 1 . 毛幹

毛幹部分の脂質分布を確認するため、未処理毛髪及び縦 2 分割した毛髪の FTIR 測定を行い、前者からは毛髪表面、後者からは毛髪内部の情報を得た。

測定結果の 2 次微分スペクトルの内、高波数領域 ($2750 \sim 3100 \text{ cm}^{-1}$) を Figure 8 (A)、低波数領域 ($900 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$) を Figure 8 (B) に示した。毛髪内部の測定スペクトルの主なピークに矢印 (\uparrow) でマークした。

$3010 \sim 3020 \text{ cm}^{-1}$ の吸収が毛髪内部では明瞭に認められたが、毛髪表面ではほとんど見られなかった (Fig. 8 (A))。この波数領域の吸収は $=\text{C-H}$ に帰属され、不飽和脂肪酸の存在を示している。また、 1020 cm^{-1} のピークも毛髪内部で特に大きく、表面で小さい事がみとれた (Fig. 8 (B))。この波数領域のピークは、先の研究 [57] で見出された糖脂質の特徴的なピークと一致している。以上より、毛幹部分の内部には表面よりも多くの不飽和脂肪酸と糖脂質が存在する事が判明した。

1040 cm^{-1} 付近のピークは $-\text{SO}_3\text{H}$ の存在を示し、ケラチンタンパクの $-\text{SH}$ 基の酸化の度合を表す [73]。このピークは毛髪表面の方が内部よりもずっと大きい (Fig. 8 (B)) 事より、毛髪表面のケラチンタンパクは内部と比べて酸化が進んでいる事がわかった。

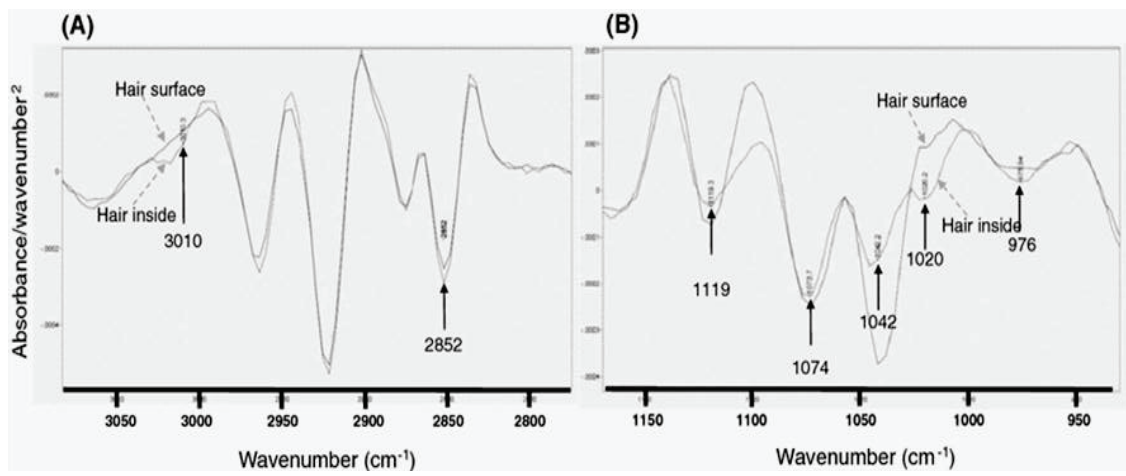


Figure 8 Second derivative FTIR spectra of hair shaft surface and inside of half-cut hair.

1-6-2. 毛幹の表層、内部

次に毛髪内部の不飽和脂肪酸の分布を調べるため、二分割毛断面の表層から中心にかけて、以下の 3 箇所を ToF-SIMS (飛行時間型二次イオン質量分析) 測定を行った。

- ・キューティクル～コルテックス領域 (毛髪表層)
- ・コルテックス領域
- ・コルテックス～メデュラ領域 (毛髪中心)

おおよその測定箇所を Figure 9 に示した。

結果を Figure 10 に示す。3 つの測定領域全てにおいて、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (18:2)、リノレン酸 (18:3) のピークがそれぞれ $m/z = 281.1$ 、 279.1 、 277.1 に明瞭に検出された。これらのピークの強度は、毛髪内部 (コルテックス領域及びコルテックス～メデュラ領域) の方が表層 (キューティクル～コルテックス領域) よりもずっと大きく、特にリノール酸とリノレン酸は表層付近の 2 倍以上、そしてオレイン酸は約 1.25 倍だった。以上より、C18 の不飽和脂肪酸、とりわけ多価不飽和脂肪酸の C18:2 と C18:3 は毛髪表層よりも内部の方により多く分布している事が判明した。

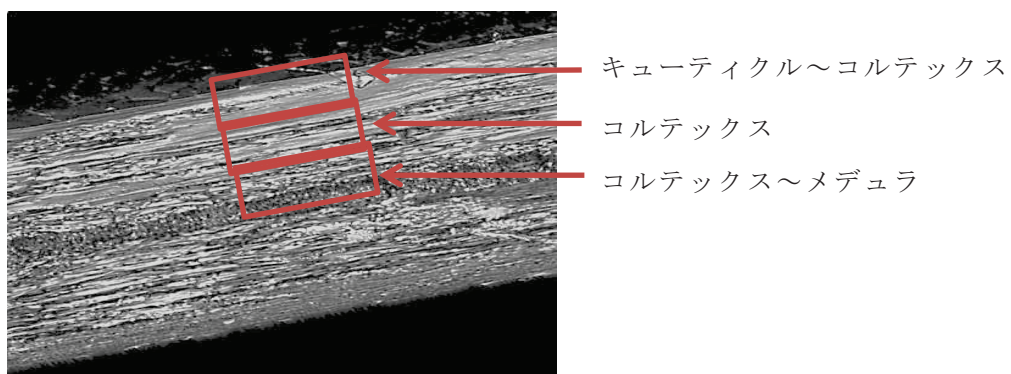


Figure 9 二分割毛断面レーザ顕微鏡画像

ToF-SIMS 測定を行ったおおよその範囲を赤枠で示した。

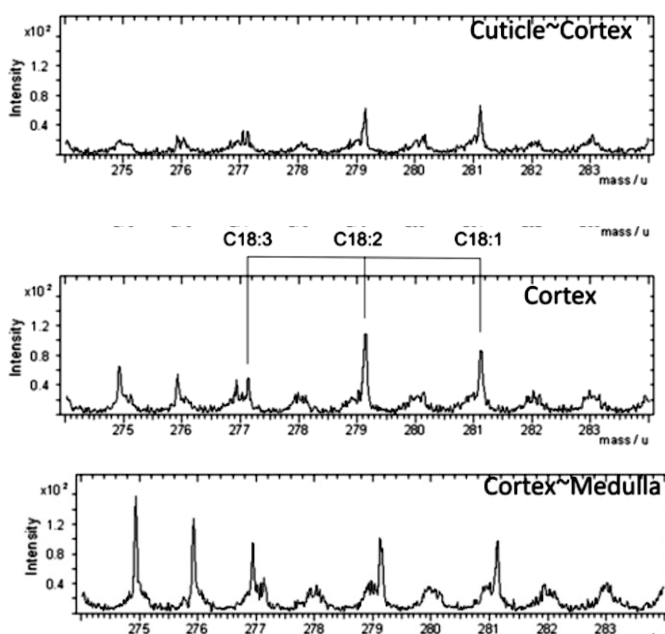



Figure 10 毛髪断面の ToF-SIMS パターン

上から順にキューティクル～コルテックス、コルテックス、コルテックス～メデュラの領域のマススペクトルを示している。いずれの領域においても不飽和脂肪酸（C18:1, C18:2, C18:3）のピークが明瞭に認められた。

1-6-3. キューティクル-コルテックス界面

次いで毛髪表層領域、特にキューティクルとコルテックスの界面の脂質分布を検討する為に未処理毛（キューティクル剥離処理無し）とキューティクル剥離毛の FTIR 測定を行った。Figure 11 (A) にビーズ法でキューティクルが完全に剥離した毛髪表面（BD：完全剥離レベル）、(B) にハブラシ法でキューティクル層が中間くらいまで剥離した毛髪表面（TB1：部分剥離レベル）の SEM 写真を示した。ここで使用した FTIR 機器ではプローブの接面から約 0.5 μm 深い部分が測定範囲の中心である。よって、TB1 の毛髪はキューティクル層の中層、TB2（ほぼ完全剥離レベル）と BD の毛髪においてはキューティクル-コルテックス界面付近が主に測定されていると考えられる。Figure 11 (C) の毛髪断面 TEM 画像中に、各々の脱キューティクルレベルの毛髪におけるおおよその測定範囲を矢印（）で示した。

なお、結果として、BD の毛髪と TB2 の毛髪の FTIR スペクトルはほぼ同様であった。

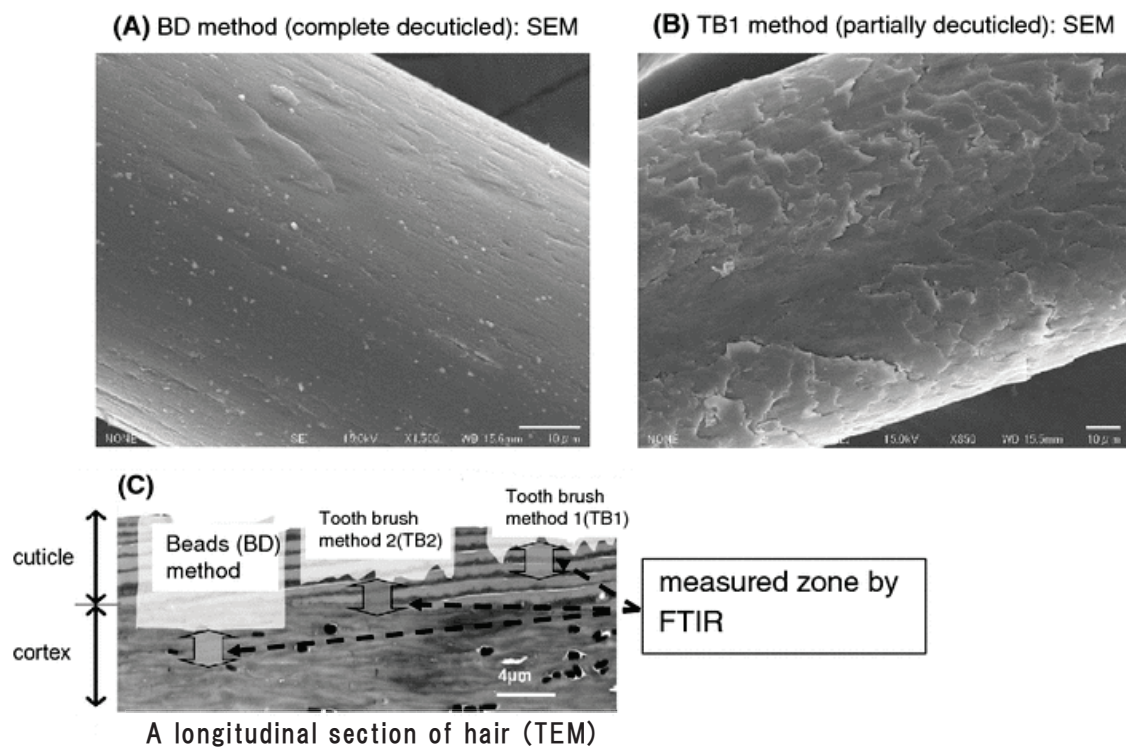


Figure 11 種々の脱キューティクル処理後の毛髪の電顕写真

(A) と (B) は毛髪表面の SEM 画像、(C) は縦断面の TEM 画像

(A) ビーズ法で処理した毛髪 (BD: 完全剥離レベル)

(B) ハブラシ法で処理した毛髪 (TB1: 部分剥離レベル)

(C) 各々の脱キューティクルレベルの毛髪の FTIR 測定範囲を示した

Figure 12 に脱キューティクル処理毛 (TB2) と未処理毛表面のメチレン領域の FTIR 2 次微分スペクトルを示した。2850~2860 cm^{-1} に現れるメチレンの対称伸縮振動吸収は脂肪酸量と強い相関がある事が知られているが、これは脱キューティクル毛の方が明らかに強い。よって、キューティクル-コルテックス界面付近 (脱キューティクル毛の表面) にはキューティクル層 (未処理毛表面) よりも大量の脂肪酸が存在すると考えられ、毛髪内部には表面よりも多くの脂肪酸が存在するという 1-6-1 項の結果が裏付けられた。

次に脱キューティクル処理毛と未処理毛の表面の FTIR スペクトルを Figure 13 (A) に示した。上から順に未処理毛、部分剥離 (TB1) 毛、ほぼ完全剥離 (TB2) 毛のスペクトルである。1020 cm^{-1} のピークは未処理毛では見られなかったが、キューティクルの剥離が進むにつれて大きくなっていった。

脱キューティクル毛 (TB2) と未処理毛との差スペクトルを Figure 13 (B) の上段に示した。1020 cm^{-1} に大きく明瞭なピーク、1120、1300、1370、1550、1640 cm^{-1} に小さいが特徴的なピークが見られた。1020 cm^{-1} のピークはグルコサミン含有物質、1370~1380 cm^{-1} のピークはステロール化合物に特徴的に見られるピークである [74]。参考のため Figure 13 (B) の中段と下段にそれぞれ *N*-Heptanoyl-glucosamine と GlcNAc 標品のスペクトルを示した。

以上の結果はキューティクルとコルテックスの界面付近に脂肪酸含有物質、グルコサミン含有物質とステロール含有物質が存在する事を示すものであり、先に毛髪内での存在が報告 [57] された GlcNAc 含有 ESG 様脂質の存在部位を微細構造レベルで示す結果と考えられる。但し、

現在の解析技術では GalNAc と GlcNAc とを区別する事はできないので、GalNAc 含有脂質であるという可能性は否定できない。

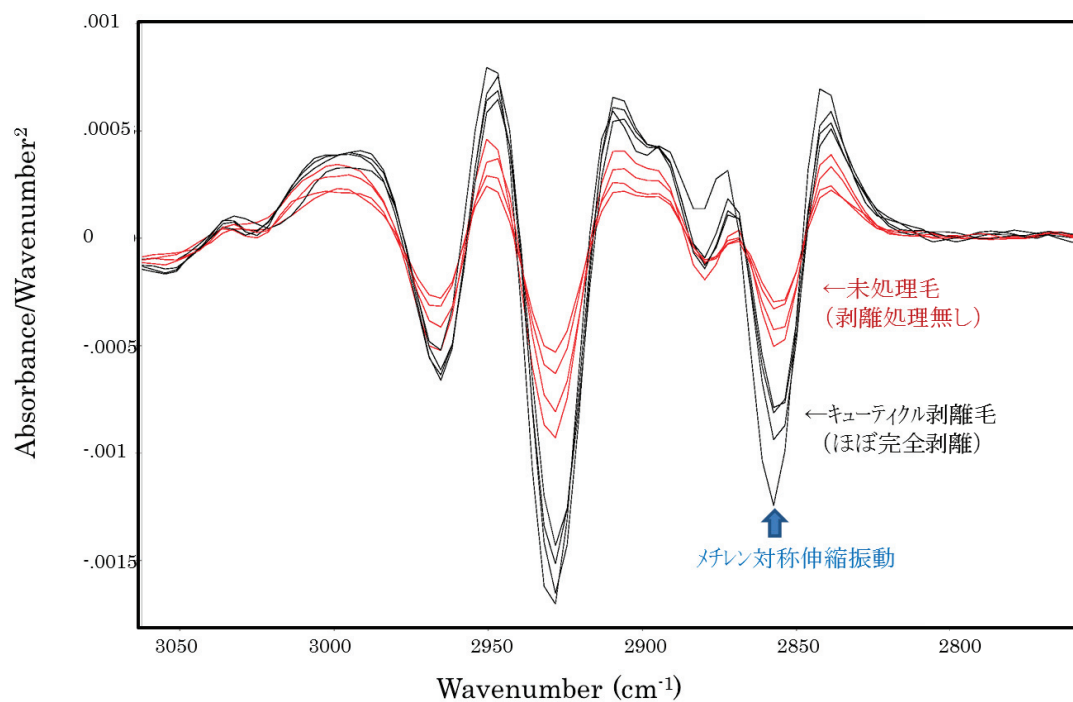


Figure 12 脱キューティクル処理毛 (TB2) と未処理毛の表面のメチレン領域の FTIR 2 次微分スペクトル

脱キューティクル処理毛のメチレンの対称伸縮振動 (2850–2860 cm⁻¹) を矢印 (↑) で示した。

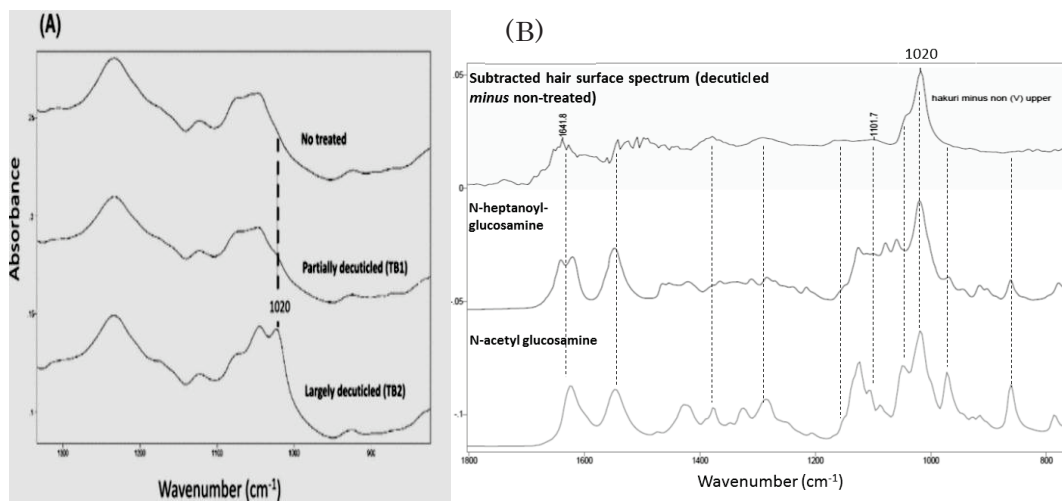


Figure 13 脱キューティクル処理毛と未処理毛の表面の FTIR スペクトル（指紋領域）

- (A) 上から順に未処理毛、部分剥離（TB1）毛、ほぼ完全剥離（TB2）毛のスペクトル。
- (B) 上段は、脱キューティクル毛（TB2）の FTIR スペクトルから未処理毛のスペクトルを差し引いた差スペクトル。中、下段にはそれぞれ *N*-Heptanoyl-glucosamine と GlcNAc のスペクトルを示した。

1-6-4. メラノソーム

ここまでの結果より、不飽和脂肪酸は毛髪表層（キューティクル）には少なく、内部（コルテックス～メデュラ）に多く存在するという事が判明した。毛髪脂質が主に存在するのは CMC や細胞膜など組織の界面と考えられる。そこで、キューティクルにはほとんど存在しないがコルテックスやメデュラに多く存在する組織としてメラノソームに注目し、その結合脂質の分析を行った。

まずメラノソームより抽出した脂質の TLC 分析によって、毛髪内の存在が既に報告されていたグリコシルセラミド様脂質 [57] を検出した。更に、HPLC で分離分析した画分の FTIR 測定により Figure 14 に示すスペクトルを得た。エステルやアミド I の C=O 吸収などセラミドに特徴的な赤外吸収を示している。セラミド構造の存在については MS/MS パターンを基に解析した結果を後述する。

この分画試料を UPLC-ESI-QToF-MS 分析したところ、 $m/z = 885$ と 907 に分子イオンピークが検出された (Fig. 15)。 $m/z = 885$ は水素イオン付加 ($M+H^+$)、 $m/z = 907$ はナトリウムイオン付加 ($M+Na^+$) の分子イオンピークと考えられる事より、この脂質の分子量を 884 と推測した。

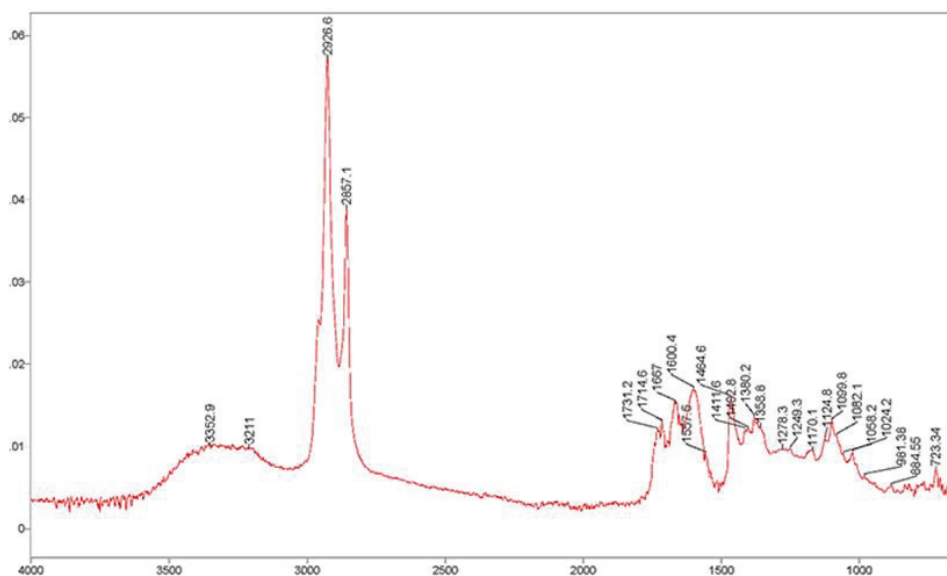


Figure 14 メラノソーム結合脂質の一部の FTIR スペクトル

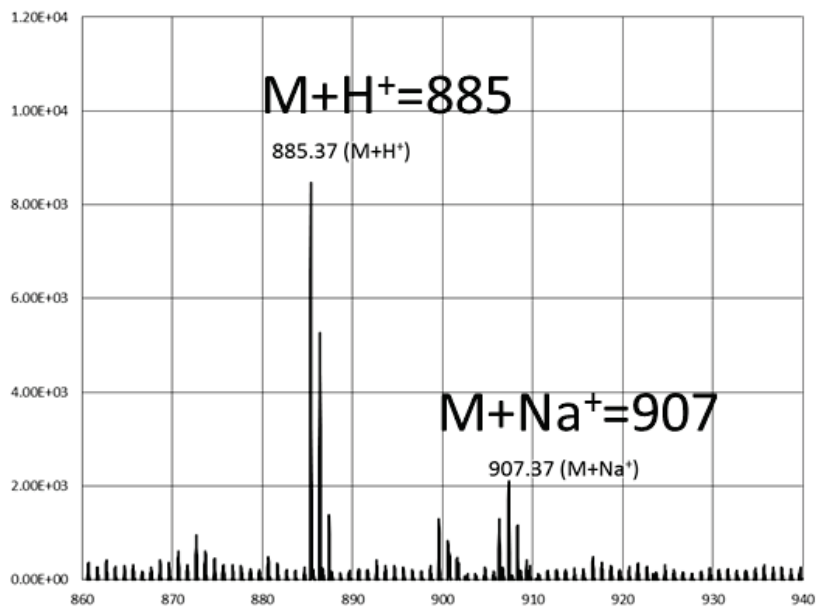


Figure 15メラノソーム結合脂質の ESI-QToF-MS スペクトル

次に、MS/MS により詳細な構造同定を行った。

$m/z = 885$ のターゲットピークに対する positive モードの MS/MS パターンを Figure 16 (A) に示す。MS/MS 分析の際のフラグメンテーションによって生成したと考えられる $m/z = 119$ のフラグメントイオンのピークが観測された。強い衝突エネルギー (80V) を与えた場合に $m/z = 83$ のピークが生じた事より、水 2 分子が脱離した ($119 - 83 = 36$) と推測し、それを基にジヒドロキシ型の短鎖アルキル分子 (Ma) の水素付加イオン ($\text{Ma} + \text{H}^+$) の構造を導き出した。その他の小ピーク群 (Fig. 16 (A')) の m/z 値とあわせて更に帰属を行い、以下の根拠に基づいて Figure 16 (B) に示す水酸化脂肪酸前駆体アルデヒド (Mb, $m/z = 204$) の構造を導いた。

- $m/z = 119$ 、133、163 のピークは Mb が破線で示した位置で開裂して生じた Ma、Mc、Md の水素付加フラグメントイオンに帰属される。
- $m/z = 227$ のピークは Mb の Na^+ 付加分子イオン、 $m/z = 205$ のピークは H^+ 付加分子イオンに帰属される。
- $m/z = 177$ のピークは Mb 分子からアルデヒドが脱離した Me フラグメントに帰属される。

以上より、メラノソーム結合脂質はその分子構造の一部として 3, 6, 8-トリヒドロキシルデカン酸を含むと考えられる。

更に、メチル基末端から数えて 3 位に OH 基が存在する事より、n-3 位に不飽和結合をもつ α リノレン酸 (ALA) 由来の水酸化物であるという可能性が示された。

(A) MS/MS for 885 (m/z)

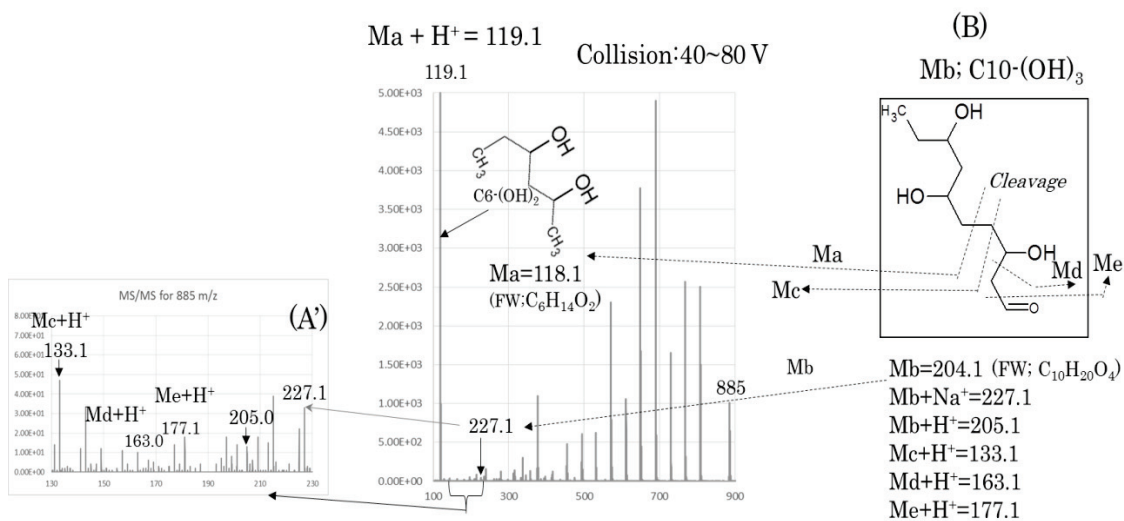


Figure 16 メラノソーム結合脂質の MS/MS パターン及び推測構造図

(A) $m/z = 885$ のターゲットイオンの MS/MS スペクトル。 $m/z = 119.1$ の強いイオンピークは $m/z 118.1$ のフラグメント (Ma) の水素イオン付加体と考えられる。 Ma ($m/z = 118.1$) を脂質の脂肪酸部分に由来するジヒドロキシ C6 アルカンと推測し、その構造を示した。

(A') A に示したスペクトルの内、 $m/z = 130 \sim 230$ の小ピーク群を拡大して示した。

(B) A 及び A' のフラグメントイオンピークを基に導き出した水酸化脂肪酸前駆体アルデヒド (Mb, $m/z = 204$) の推測構造。 MS/MS 測定時に起きるフラグメンテーションの位置を破線で示した。

TLC 及び FTIR の結果より、メラノソーム結合脂質にはセラミド構造が含まれるのではないかと推測される。そこで、皮膚に多く存在するセラミドの一種である 4-Hydroxysphinganine の存在を前提としてターゲットイオンピーク $m/z = 885$ の MS/MS パターンの帰属を行ったところ、 $m/z = 377$ 、 495 のマスピーク (Fig. 17 A) を基に以下の推論を得た。

Ma、Mb 構造を含むセラミドがフラグメンテーションを起こした場合に生成する分子イオンの候補として、Figure 17 B の Cer1 の構造から脱水、 Na^+ 付加した物質 ($m/z = 495$) が考えられる。更に脂肪酸の一部 (Ma) が脱離し、 H^+ 付加した分子イオン ($m/z = 377$) も考え得る。この推論はセラミドの存在の確証ではないものの、存在し得る構造の候補として挙げておく。

更に、 $m/z = 230 \sim 320$ のピーク群を基にして同様に構造の帰属を行った。その結果、Figure 18 に示すスフィンゴイド塩基と水酸化脂肪酸がアミド結合した構造及びフラグメンテーションによって生成したアルデヒド体の構造が導かれた事より、セラミドの存在が推測された。

以上、メラノソーム結合脂質はその構造の一部に水酸化脂肪酸を含み、かつそれがセラミドやスフィンゴイドと結合している可能性を示す結果を得た。

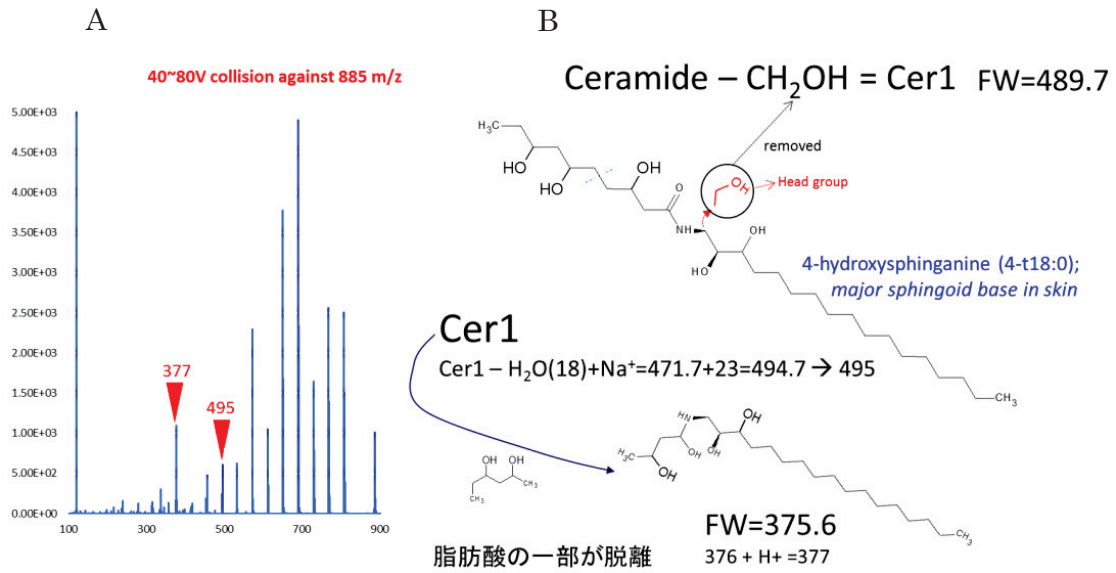


Figure 17 セラミド構造を含むメラノソーム結合脂質の構造候補

Small Fragments in MS/MS for 885 m/z Sphingoid base

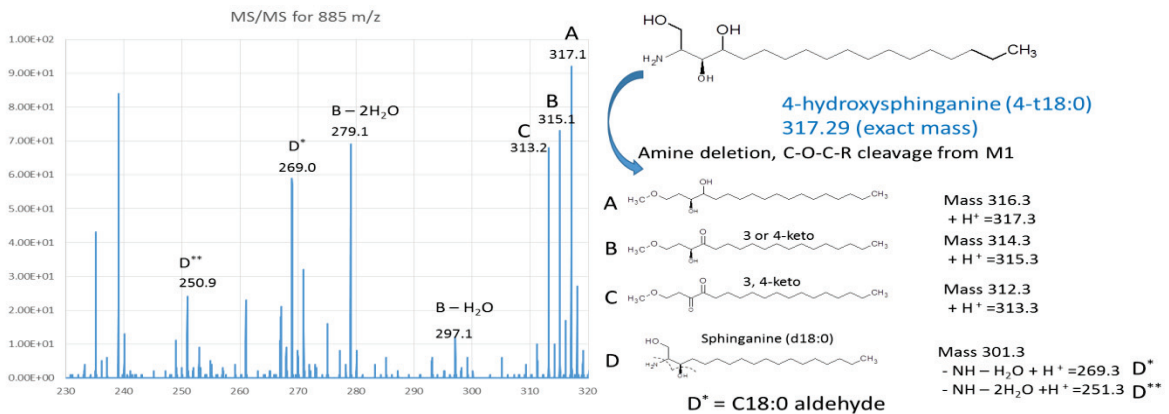


Figure 18 スフィンゴイドを含むメラノソーム結合脂質の構造候補

1-6-5. 毛球

メラノソームは毛球のメラノサイトで生合成される。1-6-4 項で記した様に、メラノソーム結合脂質がその構造の一部として水酸化デカン酸を含むのならば、毛球内に水酸化脂肪酸が存在していると考えられる。そこで、毛球から抽出した脂質を DMOX 誘導体化し、構造同定を行った。GCMS のトータルイオンクロマトグラムを Figure 19 (A) に示す。更に、C18 脂肪酸誘導体のピークが出現する保持時間範囲のトータルイオンクロマトグラムを Figure 19 (B) の上段、DMOX 誘導体の特徴である $m/z = 113, 126$ のフラグメントイオンクロマトグラムを中段、下段に示した。Scan number 954 のピーク (Fig. 19 (B) に矢印で示した) が DMOX 誘導体の特徴を有していた。そのマススペクトルを Figure 20 (A) に示す。ここで観測された分子イオン ($m/z = 333$) 及び他のフラグメントイオンパターンから導いた推測構造を Figure 20 (B) に示す。これより、毛球中に C17:3 n-6 (6 ヒドロキシ (または 6 ケト) (5), 8, 11 ((E), Z, Z) ヘプタデカトリエン酸の酸化物と、そしておそらくはそのケト-エノール互変異性体 (Fig. 20 (C)) とが存在するという可能性が示唆された。これらはセバレン酸 (C18:2 ($\Delta 5, 8$)) または γ リノレン酸 (C18:3 ($\Delta 6, 9, 12$)) から炭素が一個外れた物か、またはアラキドン酸 (C20:4n-6) 由来のエイコサノイド代謝物由来物質ではないかと推測される。しかし、毛球では多価不飽和脂肪酸がごく少量しか検出されないため、これらの多価不飽和脂肪酸 (C18:2、C18:3、C20:4) は速やかに毛球で代謝されるか、または速やかに毛幹に輸送されることが考えられる。

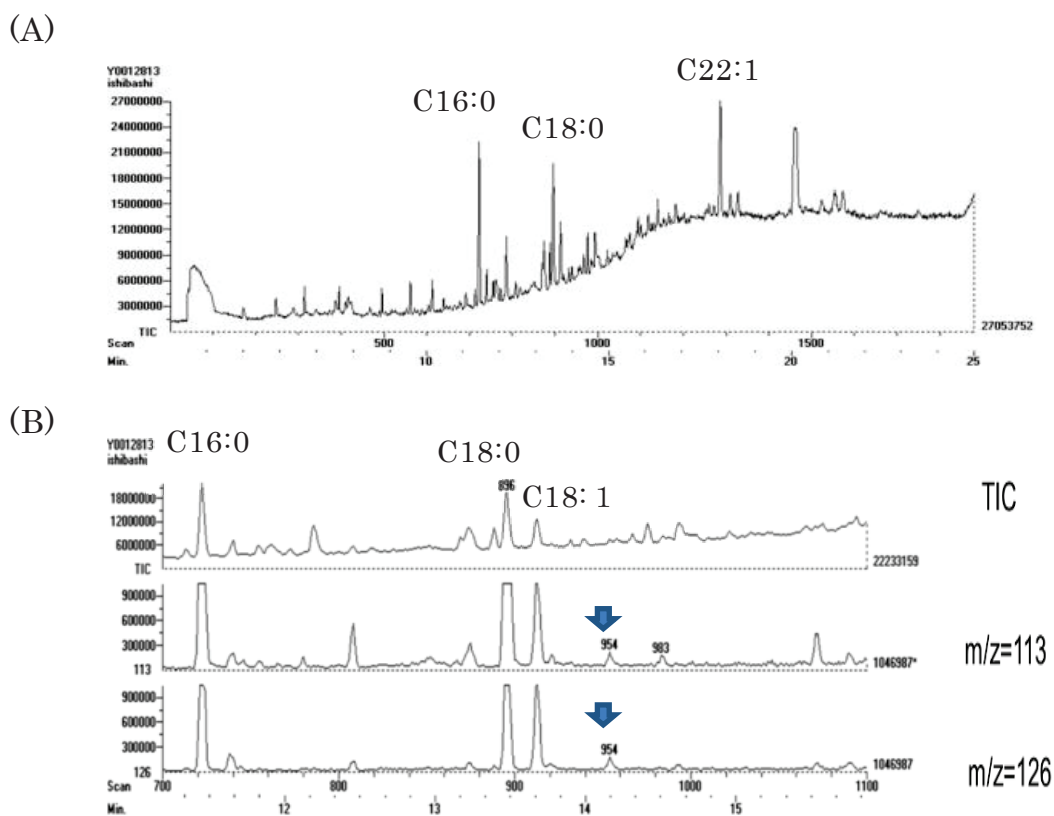
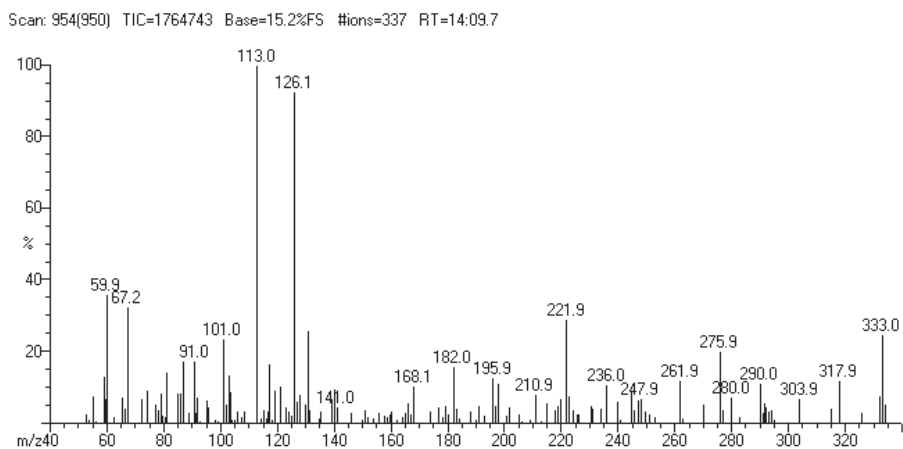


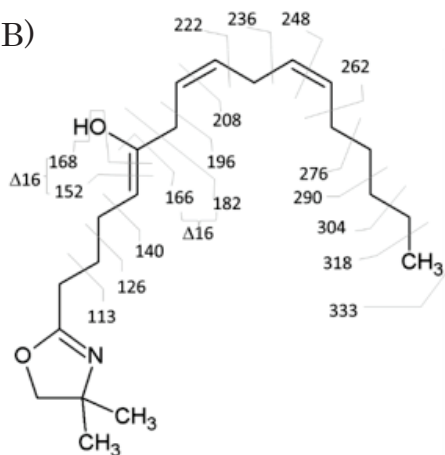
Figure 19 毛球中の脂肪酸-DMOX 誘導体の GCMS スペクトル

- (A) 脂肪酸-DMOX 誘導体のトータルイオンクロマトグラムパターン。主な脂肪酸 (C16:0, C18:0, C22:1) にマーキングした。
- (B) 保持時間 11~16 分のトータルイオンクロマトグラムと $m/z = 113, 126$ のマスクロマトグラム。Scan number 954 のピークに矢印でマーキングした。

(A)



(B)



(C)

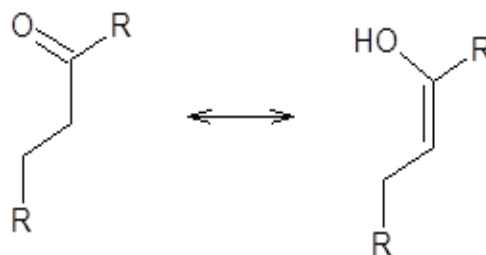


Figure 20 毛球中の脂肪酸-DMOX 誘導体の scan number 954 のピークのマスマスペクトルと推定構造

- (A) GCMS の scan number 954 のピークのマスマスペクトル。m/z = 333 に分子イオン M^+ のピークが検出された。
- (B) A のフラグメントパターンから導かれた脂肪酸-DMOX の推定構造。
- (C) 脂肪酸酸化物の互変異性体。B には 6-hydroxy- $\Delta 5t$ の構造を示したが、C の様にケト体と平衡状態をとっている可能性がある。

次いで、1~3 個の水酸基や不飽和結合を有する水酸化デカン（またはデセン）酸類の存在を前提として、C10 脂肪酸が通常検出される保持時間範囲のトータルイオンクロマトグラム（Fig. 21 (A)）に注目した。

DMOX 誘導体の特徴である $m/z = 113$ 、 126 のフラグメントイオンクロマトグラム及び $m/z = 257$ において scan number 605 にピークが観察された（Fig. 21 (A) に矢印で示した）。このピークのマススペクトルを Figure 21 (B) に示す。ここでの分子イオンピークは $m/z = 256$ 、 257 のいずれかと考えられるが、DMOX 誘導体化された脂肪酸の分子イオンは通常奇数なので 257 の方と考え、フラグメントパターンを体系的に解釈して推測した構造を Figure 21 (C) に示した。MS の際に 6, 8-ヒドロキシルデカン酸-DMOX ($M = 257.4$) から水酸基が 2 つ外れ ($\Delta 18, \Delta 18$; $257.0 \rightarrow 239.0 \rightarrow 220.9$)、次に末端のメチル基が外れる ($\Delta 15$; $220.9 \rightarrow 205.9$) フラグメンテーションが連続して起きたと考え、図中に点線でフラグメンテーションの位置を示した。

$m/z = 256$ のピークについては、以下の 2 つの可能性が挙げられる。

①脂肪酸-DMOX 誘導体ではなく何らかのコンタミ（例えば、DMOX 誘導体化されずに残った C15:0 メチルエステルの分子イオン）である。

$m/z = 256$ のマスクロマトグラムに見られるピークは scan number 604 であって DMOX 誘導体に特徴的な $m/z = 113$ や 126 に見られる scan number 605 のピークとは異なる（Fig. 21 (A)）事より、この可能性は高い。

②同じ数の水酸基を有するデカン酸とデセン酸（6,8-hydroxy- $\Delta 7t$; FW = 255.4）の非共有結合理型（疎水性結合や水素結合など比較的緩い結合理型）の平均値（ $m/z = 255$ 、 257 の平均で 256 ）である。しかし、こちらの可

能性は低いと思われる。

以上の点は、今後の研究において明らかにしていく予定である。

デカン酸のメチル基末端から 3 番目の位置に水酸基が結合している事より、水酸化前の脂肪酸では n-3 の位置 (ω 3) に二重結合が存在していたと推測される。即ち、ALA のような n-3 多価不飽和脂肪酸の代謝物が毛球とメラノソームの両方に存在し、代謝物の一つはおそらく水酸化 C10 脂肪酸であると考えられる。

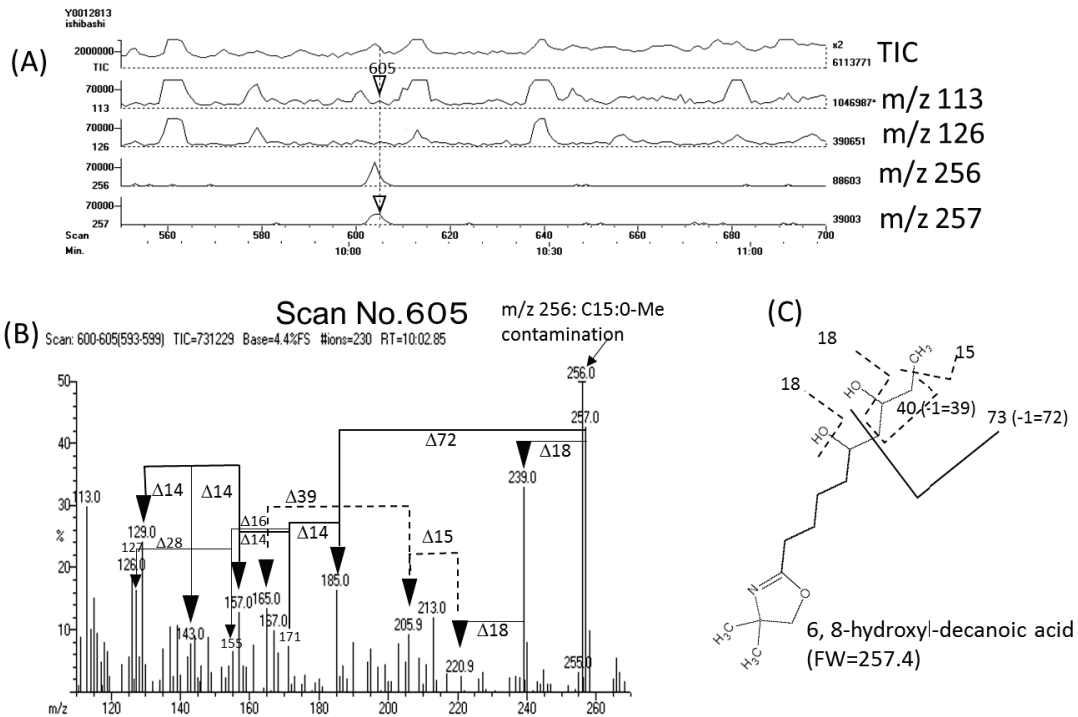


Figure 21 毛球中の脂肪酸-DMOX 誘導体のイオンクロマトグラム、マススペクトル、推定構造

- (A) C10 鎖が通常検出される保持時間の範囲のトータルイオンクロマトグラムと $m/z = 113, 126, 256, 257$ のマスクロマトグラム。矢印は $m/z = 113, 126, 257$ のマスクロマトグラムにおける scan number 605 のピーク位置を示す。 $m/z = 256$ のピーク位置は scan number 604。
- (B) scan number 605 のマススペクトル。重要なマスピーク差にマーキングした。
- (C) B で示したフラグメントイオンパターンから導いた 6,8-ジヒドロキシデカン酸-DMOX 誘導体の構造。破線で示した位置で開裂が起き、B で観測されたマスピーク差 ($\Delta 18, \Delta 18, \Delta 15$) が生じたと考えられる。

1-7. 考察

ステリルグリコシド様脂質は通常は植物、藻、菌や低級真核生物に見られる [75] が、稀にヒトの肝臓の細胞や繊維芽細胞においても存在が指摘されている [76-78]。繊維芽細胞のステリルグリコシドはヒートショックタンパク誘導などのストレス応答シグナル変換の初期段階でメディエーターとして働く事が報告された。毛髪においても GlcNAc (または GalNAc) 含有ステリルグリコシド様脂質の存在が報告されている [57]。本報ではその GlcNAc (または GalNAc) 含有脂質の少なくとも一部は毛幹のキューティクル-コルテックス界面辺りに存在する事を示した。

この脂質はどのような役割を担うのだろうか。

キューティクル-コルテックス間、キューティクル-キューティクル間そしてコルテックス細胞間いずれの界面にも CMC が存在する。これらは外観状似通ってはいるものの、その性状に明らかな差異がある事が報告されている [36, 79, 80]。例えば、Cao らは毛髪を尿素で処理してキューティクルを見かけ上無傷な筒の様な形で毛幹からすっぽりと取り外した。彼らはコルテックスとキューティクルの間の CMC が尿素によって溶解した為に結合性が失われてキューティクルが外れたと考え、キューティクル-キューティクル間 CMC よりもキューティクル-コルテックス界面の CMC の方がこの処理に対して脆いと推測した。

尿素は水素結合を破壊する働きが強い物質である。Cao らの結果は GlcNAc 含有ステリルグリコシド様脂質の様に水素結合豊富な脂質がキューティクル-コルテックス界面に存在するという本研究の結果と矛盾

しない。この脂質は界面の結合を強めてキューティクルのコルテックス接着性を維持する機能を果たしているのかもしれない。

必須脂肪酸のリノール酸や ALA などは生理機能維持に極めて重要であるにも関わらず、ヒト体内における代謝動態が未だほとんど解明されていない。一方、ヒト以外の動物では多くの報告がなされている [81-85]。例えば、同化経路においてこれらの C18 PUFA はそれぞれアラキドン酸 (C20:4n-6) やドコサヘキサエン酸 (C22:6n-3) を含む C20、C22 PUFA に変換され、異化 (分解) 経路においては β 酸化される。ALA の β 酸化と脱飽和は速やかに進行し、体内で検出される量が少ないのはそのためと説明される。更に Fu と Sinclair はモルモットが摂取した ALA が速やかに頭部の皮膚と体毛に移行する事を報告した [63]。もしそれがヒトにもあてはまるなら、摂取した ALA は頭皮と頭髪に速やかに移行すると考えられる。毛髪に存在する ALA 量はとても少ない (1 - 6 - 2 項で示した様にリノール酸やオレイン酸よりも少ない) 事から、移行後速やかに代謝 (β 酸化) されてしまうと考えられる。とはいえ、ALA が摂取後直ちに頭皮や毛髪に移行する理由は謎である。従来の説ではアセチル CoA を生成してエネルギーを供給する事が主な役割とされているが、それだけであろうか？

本研究では ALA が代謝によって中鎖の水酸化脂肪酸に変換し、毛球と毛幹、特にメラニン顆粒に存在する事、そして ALA の酸化代謝物はスフィンゴイドなどの大きな脂質分子の構成成分 (水酸化 C10 脂肪酸) として存在する可能性を示した。

この代謝物には何か特別な役割があるのだろうか。

毛球内のメラノサイトにあるメラノソーム内で、チロシナーゼの働き

によってチロシンからメラニン色素が合成される。未熟な構造のメラノソームの骨格となるタンパク質にメラニン色素が沈着していき、脂質膜がメラノソームを覆い、少量のミネラルを取り込む過程を経てメラノソームは成熟した顆粒構造を形成し、角化域へ移動していく。脂質は顆粒内部にも存在し、強固に結合している。

ALA が β 酸化されて生じる中間体 (C10:3 (2-trans, 4-cis, 7-cis)) は、更にモノオキシゲナーゼやレダクターゼ (hydrogenases) によって代謝されてメラノソーム結合脂質中の水酸化 C10 脂肪酸を生じると推察される。実際、ヒト毛根には脂肪酸 oxygenase の活性が見出されている [86]。一方、ALA の過酸化物としては hydroxyl 体、oxo 体や epoxy 体など多様な過酸化物が存在する [87] 事より、酸化酵素による反応以外に、何らかの理由で発生した活性酸素とのラジカル反応によって過酸化物が生成すると考えられる。実際、メラノサイトのメラニン合成過程ではチロシナーゼによるチロシンの酸化とヒドロキシラジカルの様な活性酸素種の発生によって膜脂質の過酸化が起きる事がよく知られている。これによって毛球や皮膚のメラノサイト中に水酸化脂肪酸の生成が起こるのかもしれない。

遊離リノール酸 (C18:2n-6) がユビキチン-プロテアソーム経路でチロシナーゼの分解を加速する事が報告された [88]。また、植物 (Corchori) の葉に含まれる水酸化脂肪酸がポストゴルジ体中のチロシナーゼ減少を誘導する事が報告された [89]。それらの水酸化脂肪酸の一つは 16-Hydroxy-9-oxo-10E,12E,14E-octadecatrienoic acid (Corchorifatty acid B) であり、n-3 に二重結合をもつ C18 の脂肪酸が水酸化された ALA の酸化代謝物の可能性がある。作用機構は未知であるものの、これ

らの研究は何らかの脂肪酸がメラノソーム生合成を制御する可能性を示唆している。

本研究より、主要な必須脂肪酸である ALA 由来の中鎖水酸化脂肪酸（3, 6, 8-水酸化デカン酸）がメラノソームに存在し、類縁脂肪酸が毛球にあると推測された。これらの ALA 由来酸化代謝物はメラノソームの合成、輸送、維持などの制御において重要な役割を果たすのではないかと考えている。

1 - 8 . 結論

ヒト毛髪中の脂質の分布、構造、代謝物について研究し、中でも特徴的な脂質についてその役割を考察した。

GlcNAc を含む何らかのステリルグリコシド様脂質類 (SGL) の少なくとも一部は毛幹のキューティクルとコルテックスの界面に分布している。その豊富な水素結合の寄与でキューティクルとコルテックスの接着性を高める役割を果たしていると推測した。

必須脂肪酸 ALA の酸化代謝物と推測される中鎖の水酸化脂肪酸は遊離形または大きな脂質の構造の一部として毛球やメラノソームに存在する。ALA の酸化代謝物はメラノソーム結合脂質の一部として、メラノソームの生合成過程に関わっているのではないかと考えられる。

生体維持に不可欠な物質であるにも関わらず、必須脂肪酸のヒト体内動態は従来ほとんど未解明なままであった。しかし、本研究において脂質代謝の場として毛髪に焦点を当て、その体内動態のブラックボックスを部分的にでも開くに至ったと考える。

本研究は論文 "Distribution of Glycolipid and Unsaturated Fatty Acids in Human Hair" として学術誌 *Lipids* に掲載された (Takahashi T, Yoshida S (2014) 49:905-917)。本論文中的 Figure 8、10-13、15、16、19-21 は Springer Science and Business Media のご厚意により許可を得て転載したものである。

第2章 毛髪物性研究

加齢に伴う物性変化

2-1. 背景

毛髪は外的環境と常に接している。太陽光、水（雨、入浴、プール）はもとより、洗髪、ブラッシング、タオルドライ、ブローや寝具との摩擦など毎日の習慣的行動による刺激、更にはヘアカラーやパーマ、ヘアアイロンなどの過酷な化学処理、熱処理、物理的刺激に晒される機会がヒトの器官の中では群を抜いて多い。これらの刺激によって構造や成分の破壊・流出が生じ、その結果として実感されるダメージとしてはゴワつき、毛流れの乱れ、ツヤの低下、脱色、枝毛・切れ毛など枚挙に暇がない [58, 90-112]。

毛髪の組織の中でも特に、日常的な刺激を真っ先に受けるのは表層組織のキューティクルであり、徐々に摩耗していく。そのため、殆どの場合、根元部分と比較すると毛先部分のキューティクルの枚数は少なく、形状が乱れている。

筆者らは 2006 年にキューティクルの損傷が初めに発生する部位はキューティクル細胞間の CMC とエンドキューティクルの 2 箇所であり、それぞれの発生頻度が人種によって明確に異なる事を報告した [113]。20~40 代の日本人女性と Caucasian（アメリカ、ドイツ）女性の毛髪に負荷を与えると、前者は CMC、後者はエンドキューティクルがより壊れやすい傾向にあった。また、エンドキューティクルの硬度は日本人毛の方が高いという結果を得た。CMC とエンドキューティクルの相対的な強度バランスによってダメージタイプが決まる為、日本人毛では CMC の損壊が優先的に起きると考えた。

2 - 2 . 目的

年齢とともに髪質が変化することは広く実感されている。本研究ではキューティクルの刺激耐性、損傷挙動の年齢依存変化に注目し、それが毛髪の特徴に及ぼす影響の解明を目的とした。

2-3. 方法

[毛髪試料]

人種、性別による毛髪特性の差異の可能性を除くため、日本人女性の毛髪のみを使用した。10～70歳の121人の毛髪を頭皮から1mm以内の位置でカット、化学処理履歴の無い部分を用いた。毛髪提供者は研究の目的、試料及び実験データの取り扱い等について倫理基準に則った詳細な説明を受け、同意の上で提供を行った。年代の内訳は以下の通りである。

10代：21人、20代：17人、30代：24人、40代：24人、50代：23人、
60代以上：12人

毛髪はプレーンシャンプーで洗浄した後に用いた。

[プレーンシャンプー]

15 wt% Sodium polyoxyethylene lauryl ether sulfate/2 wt% *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-dodecanamide solution aq. をリン酸で pH 7 に調節して作製した。

[キューティクルのウェザリング刺激耐性評価]

本研究ではシャンプー、コンディショナー、ドライヤーの温風下で行うブローなど、化学処理や極端な高温による処理を伴わない比較的穏和なヘアケア習慣の繰り返しによる日常的な風化（作用）をウェザリングと定義した。刺激に対するキューティクルの耐性を評価する為に、ウェザリングのモデル処理を毛髪に施し、処理前後のキューティクルの面積

率を測定し、キューティクル残存率を求めた。

モデル処理時に試料をのせる台として大きな毛束（長さ 20 cm、約 10 g）を用意した。まず、試料毛髪の根元部分（5 mm 長）を切り取り、その部分を未処理の試料とした。残りの部分の毛先を束ねて台となる毛束の根元部分に重ね（試料毛髪と台の毛束の根元と毛先は逆になる）、プレーンシャンプー、プレーンコンディショナー（高級アルコール、カチオン活性剤、油剤を組み合わせで作製）、ドライヤー温風によるブローを 180 回施した。これは洗髪とブローを毎日行うヘアケア習慣を仮定した場合の 6 ヶ月間のウェザリングに相当する。但し、試料毛髪に対しては毛先から根元の方に向けて（逆毛方向に）処理を行ったので、実生活で受ける平均的な刺激よりも過酷なものとなった。

モデル処理後に試料毛髪の根元部分を 5 mm 切り取ってウェザリング処理試料とした。未処理試料とウェザリング処理試料とをエポキシ樹脂（Oken Epok 812 セット）に包埋し、マイクローム Ultracut N でカットして平滑な横断面を得た。断面をレーザ顕微鏡 VK-8700 で撮影し、画像解析ソフト Image-Pro Plus version 6.1（日本ローパー）を用いて長径、短径、キューティクル幅を測定した（Fig. 22）。なお、キューティクル幅は一断面につき 8 箇所以上測定を行い、平均値を求めた。各々の試料の毛髪横断面全体に対するキューティクル部分の面積率を以下の式で求めた。

$$\text{キューティクル面積率(\%)} = \{1 - (a - 2c)(b - 2c) / (a \times b)\} \times 100$$

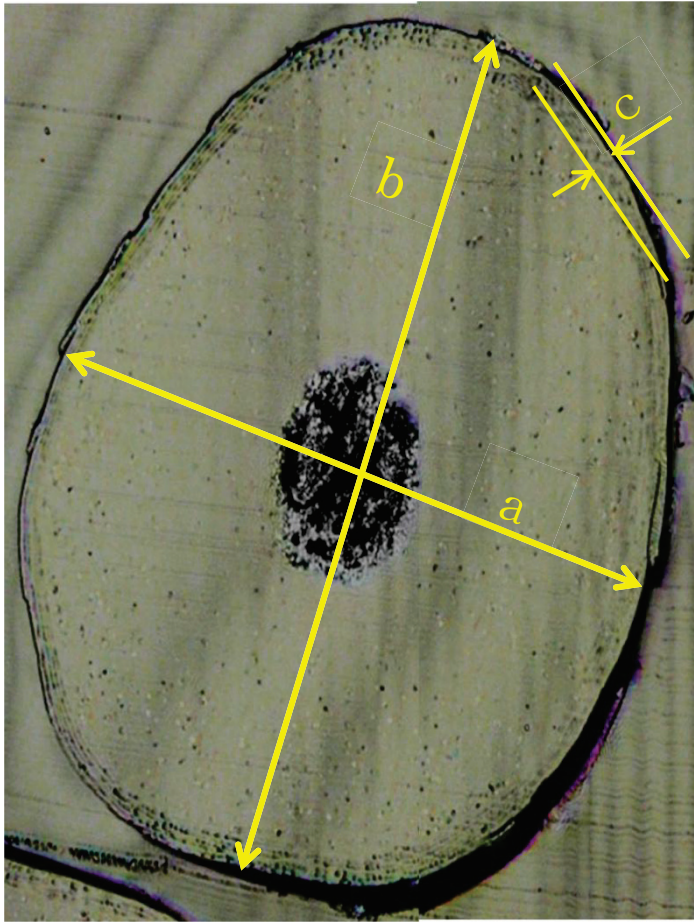
a : 短径 b : 長径 c : キューティクル幅

ウェザリング処理後のキューティクル残存率は以下の式で計算した。

$$\text{キューティクル残存率(\%)} = A_1 \div A_0 \times 100$$

A_0 と A_1 はそれぞれ処理前と後のキューティクル面積率

提供者 1 人につき 2 本ずつの毛髪を試料として使用し ($n = 121 \times 2$ 本)、2 本の平均値を測定結果とした。



a : minor axis
b : major axis
c : cuticle width

Percentage ratio of cuticle to whole hair



$$\{1 - (a - 2c)(b - 2c) / (a \times b)\} \times 100$$

Figure 22 毛髪横断面のレーザ顕微鏡画像

[キューティクルのダメージタイプの評価]

キューティクル間の CMC が開裂するタイプのダメージをキューティクルが激しく lift-up する事よりタイプ L (Fig. 23 (a), (b))、エンドキューティクル (endocuticle) が損壊するタイプのダメージをタイプ E (Fig. 23 (c), (d)) と名付けた。

延伸負荷によってキューティクルダメージを起こし、生じたダメージのタイプ L、E のレベルを以下の方法で測定した。

ダメージを起こし易くする為に、毛髪試料にプレーンシャンプー、プレーンコンディショナー、ドライヤー温風ブローを 10 回施した。根元部分の毛髪を 20 mm 切り取ってその両端 5 mm ずつをテープで挟み、テープ間の長さ 10 mm の試料を作製した。引張圧縮試験機 TG-500N にセットし、20°C、65% 相対湿度条件下、50%/min. の速度で 135% の長さになるまで延伸した。延伸状態を保ったまま、毛髪表面をレーザ顕微鏡 VK-8700 で撮影した (Fig. 24)。リフトアップしたキューティクル部分 (Fig. 24 中の  で囲んだ部分) の面積と露出したエンドキューティクル (Fig. 24 中の  で囲んだ部分) の面積とを画像解析プログラム Image-Pro Plus version 6.1 で測定した。画像全体の面積に対する各々のダメージの面積率を計算して各々のダメージレベルとした。

ここでは 3 ヶ月以上化学処理をしていない被験者の毛髪を用いた ($n = 42$)。

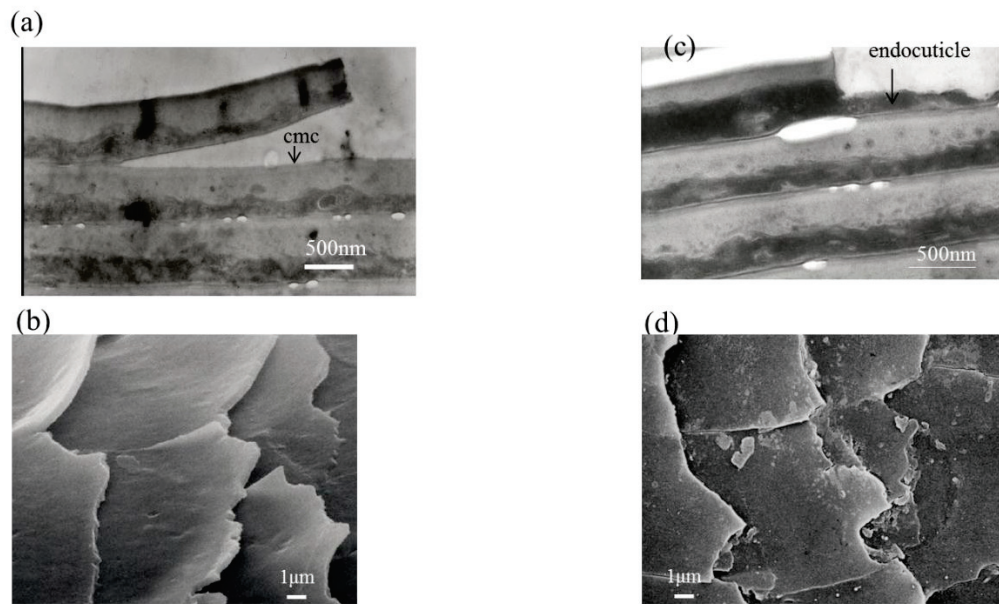


Figure 23 Typical damage types of hair cuticle.

- (a) TEM image of the longitudinal section and (b) SEM image of the surface of damaged hair in the manner of damage type L. The cmc between cuticle cells are split and cuticle cells are lift up.
- (c) TEM image of the longitudinal section and (d) SEM image of the surface of damaged hair in the manner of type E. Endocuticle is broken and crumbled pieces are seen on the surface of cuticle.

Hair samples are stained with uranyl acetate and lead citrate aqueous solutions prior to TEM observation.

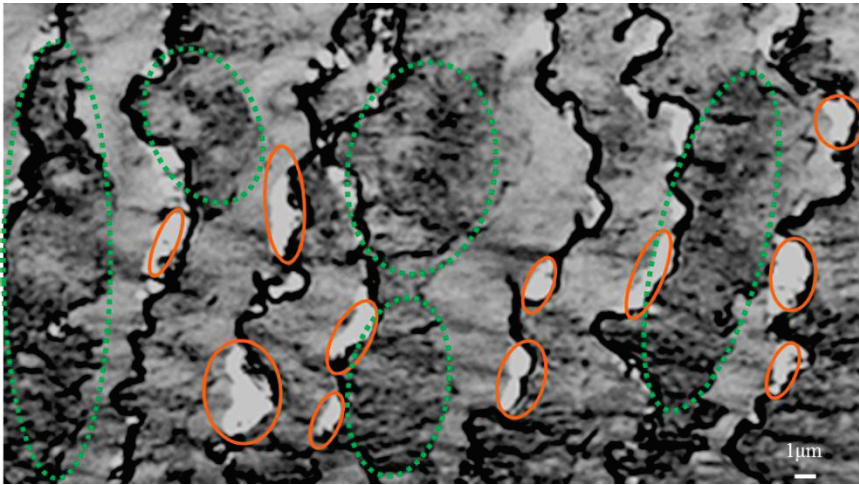


Figure 24 Image of damaged hair obtained with a profile microscope.

Type L damage: White area enclosed by a solid orange line.

Type E damage: Gray rough area enclosed by a dotted green line.

[脂肪酸 18-メチルエイコサン酸 (18-MEA) 定量]

毛髪表面に存在する脂肪酸 18-MEA の量変化をダメージの指標として、日常生活でウェザリングを受けた毛髪の表面状態の変化を評価した。

毛髪の根元と根元から 50 mm の箇所の脂肪酸 18-MEA を ToF-SIMS を用いて定量した [70-72]。根元から 50 mm の箇所は約 5 ヶ月分の日常的なダメージが蓄積した箇所と見なせる。ここでは 6 ヶ月以上化学処理履歴が無い提供者 ($n = 22$) の毛髪を用いた。

測定機器は ToF-SIMS IV instrument、一次イオンビームは 25 keV、 Bi_3^{2+} とした。高解像モードでデータを取り込み、イメージングは high-lateral モードで行った。一次イオンビームを $50 \times 50 \mu\text{m}$ の範囲に走査して画像データを記録した。

個体差が大きいため、各々の毛髪の根元から 50 mm の位置の測定値 (C_5) を根元部分の測定値 (C_0) で割った値を 18-MEA 相対濃度として表した。

[統計解析]

全ての相関解析は Excel プログラム (Microsoft) を用いて行った。

2-4. 結果

[ウェザリング刺激に対するキューティクルの耐性]

ウェザリングモデル処理前後のキューティクル面積率を毛髪提供者の年齢に対してプロットした (Fig. 25)。未処理毛のキューティクル面積率 (グラフ中の○) は 10 歳から 70 歳までほぼ一定の値を示した ($14.4 \pm 1.7\%$)。しかし処理後の毛髪では加齢とともに面積率 (グラフ中の●) の低下が進み、明らかな年齢依存性が見られた。20 歳以下ではウェザリング後のキューティクル残存率は $80.8 \pm 19.2\%$ であったが、60 歳以上では $53.9 \pm 9.7\%$ とほぼ半分にまで激減した。

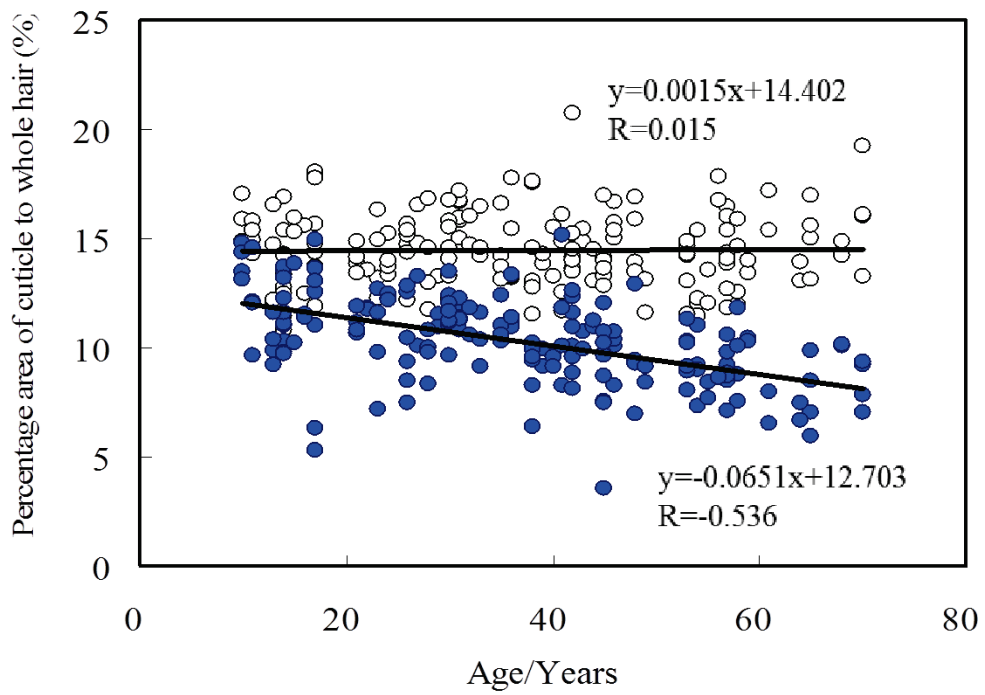


Figure 25 Area of hair cross section occupied by cuticle for whole hair before (empty circle) and after (blue circle) a simulated grooming process as a function of age (years).

[キューティクルダメージのタイプ]

延伸負荷で生じたタイプ L、E ダメージのレベルを Figure 26 に示した。10 代から 40 代まではタイプ L のダメージが優勢で、特に 30 代以下ではタイプ E は殆ど見られなかった。タイプ L は加齢とともに増加し、40 代で最高値を示したが、その後減少していった。40 代以降はタイプ E が加齢とともに増加し、60 代以降でタイプ L を凌駕した。

負荷を受けた場合に優先的に起こるダメージタイプは加齢とともにタイプ L から E へとシフトし、その転換期が 40 代という事が見出された。

なお、若年層では値のバラつきが小さいのに対して、タイプ L は 40 代、そしてタイプ E は 50 代以降において個体差がきわめて大きかった。

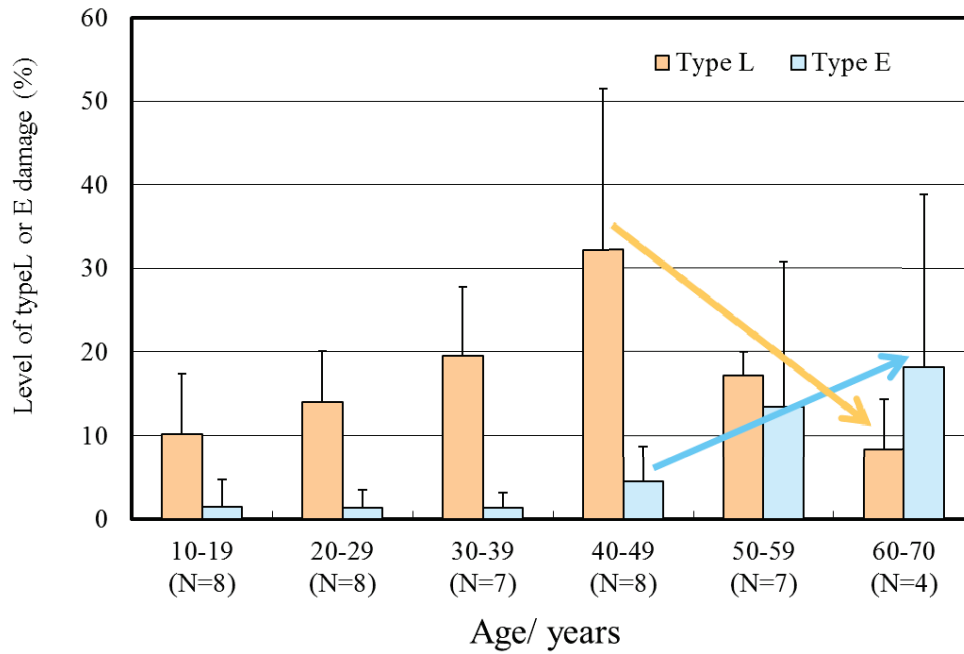


Figure 26 Level of type L and type E damage caused by extension stress, as a function of age.

[キューティクルのウェザリング刺激耐性とダメージタイプ]

ウェザリング刺激に対するキューティクルの耐性（残存率）とキューティクルダメージのタイプとの関係を調べるため、個々の毛髪提供者について、タイプ L と E のダメージレベルに対して、ウェザリングモデル処理後の残存キューティクル率をプロットした（Fig. 27）。キューティクル残存率とタイプ L ダメージのレベルとには有意の相関が見られなかった（Fig. 27 (a)）。一方、タイプ E ダメージには負の相関が見られ（Fig. 27 (b)）、タイプ E を起こし易い傾向のある提供者の毛髪は日常の刺激によってキューティクルが失われ易いという事がわかった。

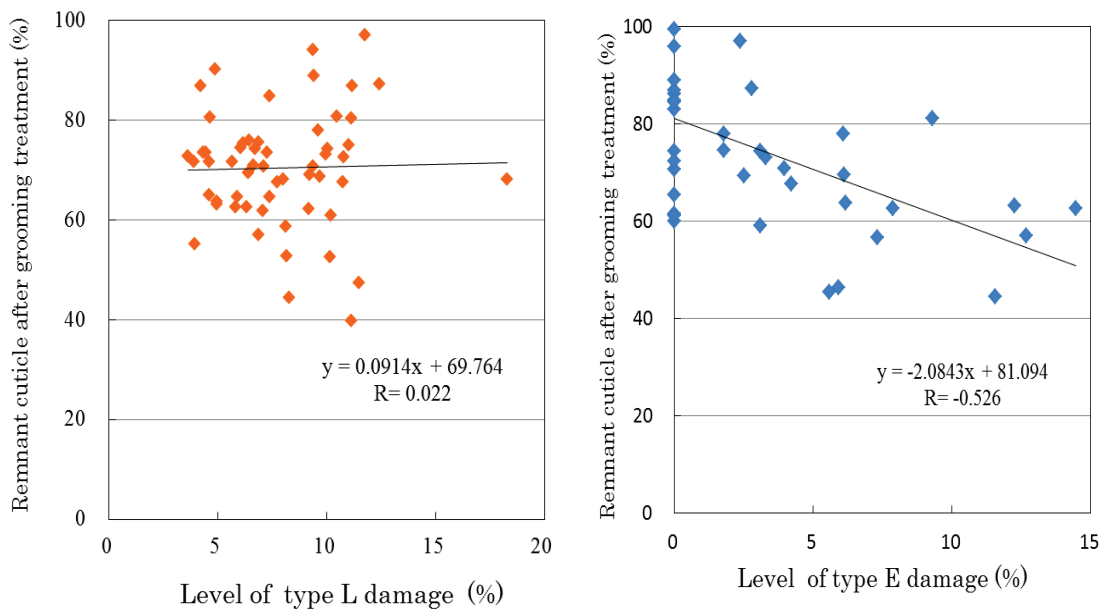


Figure 27 Levels of type L (a) and type E (b) damage caused by extension stress versus remnant cuticle after grooming treatment.

[実生活のウェザリングによる 18-MEA の減少]

健全部分（根元）に対するウェザリング部分（根元から 50 mm）の 18-MEA 相対濃度（ C_5/C_0 ）を 40 歳未満（ $n = 10$ ）と 40 歳以上（ $n = 12$ ）とにわけて示した（それぞれ Fig. 28 (a), (b)）。全ての試料において相対濃度は 1 未満であり、実生活で受けるウェザリングの過程において 18-MEA が減少した事が示された。40 歳未満では、相対濃度（ C_5/C_0 ）と年齢との相関は見られなかった（40 歳未満の平均値： 0.77 ± 0.11 ）。対照的に、40 歳以上の層では負の相関が見られ、加齢に伴って 18-MEA が失われ易くなる事が見出された（50 歳以上の平均値： 0.63 ± 0.09 ）。

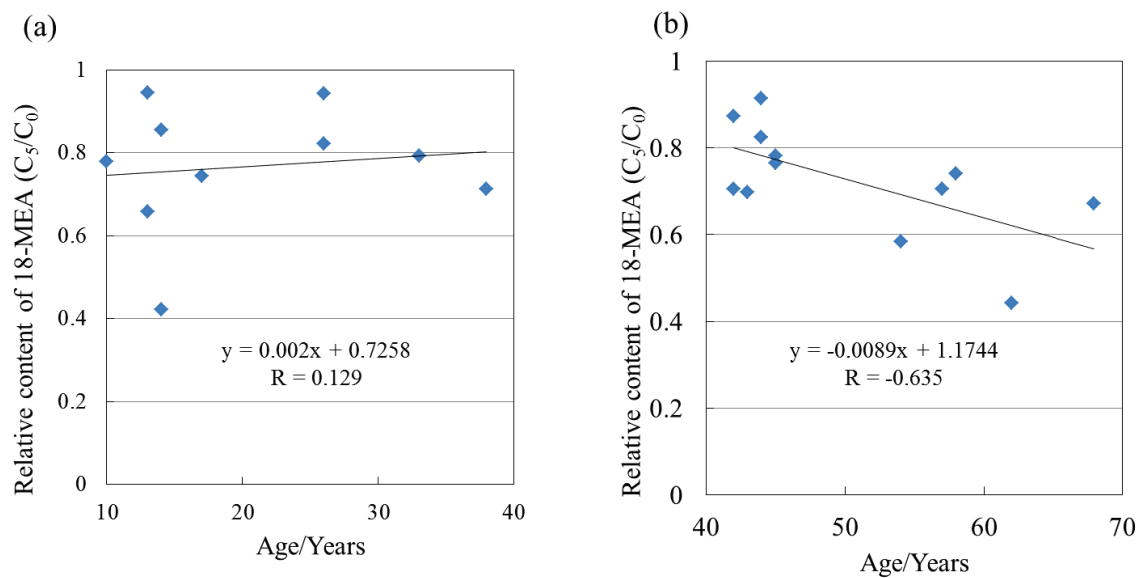


Figure 28 Relative content of 18-MEA as ratio of levels of point 5 to point 0.

(a) Young ages ($n = 10$, 10-38 years old)

(b) Elder ages ($n = 12$, 42-68 years old)

2-5. 考察

洗髪やブローなど比較的穏和な日常習慣のストレスに対するキューティクルの耐性には明らかな年齢依存性変化が見られた。新生部分のキューティクル面積率は幅広い年代においてほぼ一定の値を示したが、ウェザリング処理によるキューティクルの減少は年齢とともに加速した (Fig. 25)。この事より、数十年間にわたって毛母細胞では一定のサイズのキューティクルが産生されるが、その構成成分は加齢とともに脆化してわずかな刺激によってさえも毛髪から剥落し易くなっていくと考えられる。

ダメージタイプにもやはり明らかな年齢依存性変化が見られた (Fig. 26)。40代を境にタイプ L のダメージが減少し、その代わりにタイプ E が増えていく事より、キューティクル組織の微細構造の強度が加齢に伴って変化する事がわかった。どちらのタイプのキューティクルダメージが優先的に起こるのかは、CMC とエンドキューティクルとの相対強度、即ちキューティクル間の接着性とキューティクル細胞の堅牢性の大小によって決まると考えられる。筆者らの以前の研究により、堅牢なエンドキューティクルをもつ毛髪ではタイプ E よりもタイプ L のダメージが優先的に起きる事が見出された [113]。微細構造の集合体であるキューティクルが刺激を受けた場合、最も弱い部分が最初に損壊する。キューティクル細胞の微細構造の内、ジスルフィド結合を形成するシスチンの少ないエンドキューティクルが最も脆い。そしてキューティクル細胞間の CMC の強度はおそらくエンドキューティクルと同レベルなので、損壊する部分がこの 2 つの構造のいずれかになるのだろう。即ち個々の

毛髪において、エンドキューティクルが CMC よりも強い場合は CMC がストレスを吸収して開裂する（タイプ L）。対照的に、エンドキューティクルが CMC よりも脆い場合は、エンドキューティクルがストレスを吸収して壊れる（タイプ E）。本研究の結果より、40 代までの年代ではエンドキューティクルが CMC よりも相対的に堅牢なのでタイプ E が殆ど起こらず L が優先的に起こるが、その後加齢とともにエンドキューティクルが脆くなり、ついには CMC と強度が逆転してストレスを吸収するのでタイプ E のダメージが増えていくと考えられる。

タイプ E が起き易い提供者の毛髪はストレス処理後のキューティクル残存率が低い傾向が見られたが、一方、タイプ L のレベルと残存率には相関が見られなかった（Fig. 27）。よって、日常的な刺激によるキューティクルの剥落はキューティクル間の接着性（CMC の強度）よりもキューティクル細胞自体の堅牢性（エンドキューティクルの強度）に、より左右されると考えられる。

筆者らが先に行った人種間毛髪比較研究において、20～40 代の日本人女性と Caucasian 女性の毛髪に負荷を与えると、前者はタイプ L、後者はタイプ E のダメージが優先して起こる事が見出された。両者にウェザリングモデル処理を施したところ、タイプ L ダメージの起こり易い日本人毛の方がむしろ Caucasian 毛よりもキューティクルが速く失われるという結果を得た [113]。その研究においては、ウェザリングモデル処理の工程に洗髪とブローに加えて化学処理（過酸化水素によるブリーチ）を含めていたので、化学処理に対する感受性の差がキューティクルの減少に影響して今回と異なる傾向を見せたのかもしれない。

健康な毛髪表面には脂肪酸 18-MEA が存在して表面を疎水的に保ち、

感触、毛流れ、ツヤなどを良好に保つ働きをしている。若年層に多いタイプ L のダメージでキューティクルが捲れ上がって剥離した場合は、その下層のキューティクルが毛髪表面に現れるので毛髪表面の性質は保たれる。しかし加齢層に多いタイプ E のダメージが起きた場合には、キューティクルが壊れて内部のエンドキューティクルが表面に露出する。その結果、18-MEA が減少して毛髪表面が親水性に変化し、感触や見た目が損なわれてしまう。

実際の日常生活でウェザリングを受けた毛髪の 18-MEA 測定を行った結果、全ての年代で 18-MEA が健全な根元部分よりも減少する事が見出された (Fig. 28)。40 歳未満では減少率と年齢との相関は見られなかったが 40 歳以上では負の相関が見られ、実生活の刺激によってもやはり、延伸負荷によるモデル刺激を受けた場合と同様に加齢とともに毛髪表面のキューティクルが壊れて内部が露出し易くなっていく事が判明した。18-MEA はブリーチなどの化学処理で大きく減少すると報告されているが、今回の研究で、加齢により穏和な刺激によってさえも容易に減少していく事がわかった。

40 代前後の年齢で毛髪特性が変化する事はこれまでに数多く報告されている [57, 114-119]。例えば、日本人女性の毛髪は 40 歳頃までは加齢とともに太くなっていくが、その後は逆に加齢に伴って細くなっていく。毛髪の曲げ弾性は 40 歳以下ではほぼ一定だが、それ以上の年代では低くなっていく。これは径や生毛密度の低下に加え、更に何らかの内的因子の変化によると考えられている。ツヤは 40 代で低下し始める。頭皮の血流と毛髪直径は、30 歳以下と 50 歳以上の年代では正相関を示すが、30~40 代の範囲ではデータのバラつきが大きくて相関性が見

られず、この年代において何らかの生理学的な変化が起こっているのではないかと推察されている。更に、40代前後では脂質、アミノ酸、ミネラルなど構成成分の変化が起こるといふ研究結果も数多く報告されている。

本研究において、キューティクル微細構造の強度も他の種々の特性と同じく40代で変化し、それによって毛髪表面に分布する脂肪酸が減少する事が判明した。40代以降ではダメージレベルの個体差が非常に大きく、加齢層の特徴をはっきり示す毛髪から、若年層と同様の挙動を示す毛髪まで多様であった。前述した頭皮の血流と毛髪直径の関係同様、毛髪組織の生合成の停滞及び復活がこの年代で頻繁に起こっている事が、このバラツキの大きさの理由かもしれない。

2 - 6 . 結論

日本人女性のキューティクルには明らかな年齢依存性の変化がある事を見出した。キューティクルが負荷を受けると最初に壊れるのは若年ではキューティクル間の CMC だが、加齢層ではエンドキューティクルへとシフトし、その転換期は 40 代である。エンドキューティクルが壊れやすい毛髪ほどウェザリングによるキューティクルの減少が速いという傾向より、キューティクル間の接着よりもキューティクル細胞自体の脆化がキューティクル剥落に繋がると考えられる。

実生活で受けたウェザリングによる毛髪表面の 18-MEA 減少もまた、40 代以降で年齢とともに進んでいた。

本研究は論文 "Age-dependent changes in damage processes of hair cuticle" として学術誌 *Journal of Cosmetic Dermatology* に掲載された (Takahashi T, Mamada A, Breakspear S, Itou T, Tanji N (2015) 14:2-8)。

第3章 今後の展望

必須脂肪酸の代謝については乳児と成人で大きく異なることが知られている。よって、本研究で見出された脂肪酸代謝産物について広い年代を対象として研究を進める事でより一層、理解を深められると考える。

また、キューティクル-コルテックス界面に存在する脂質がキューティクル接着に寄与する可能性が示唆された。加齢とともにキューティクルが剥離し易くなる現象を考えると、この脂質の量や構造の変化が加齢に伴って起きているのかもしれないと推測される。今後の研究課題として取組み、脂質とキューティクル微細構造の物性の関連を明らかにし、更には加齢に抗する刺激耐性向上技術に研究を繋げていきたいと考える。

参考文献

- 1) Bloor WR (1925) Biochemistry of the fats. *Chemical Reviews* 2:243-248
- 2) 厚生労働省 (平成 26 年 3 月) 1-3 脂質. 「日本人の食事摂取基準 (2015 年版)」策定検討会報告書
- 3) 菊川清見 (2001) 油脂・脂質とは何か. *オレオサイエンス* 1:75-82
- 4) 日本油化学会編 (2012) 油脂・脂質・界面活性剤データブック 丸善出版
- 5) 佐藤清隆, 上野聡 (2011) 脂質の機能性と構造・物性 丸善出版
- 6) 日本化学会編 (1992) 脂質の化学と生化学 (季刊 化学総説, No.16) 学会出版センター
- 7) 農林水産省 "脂肪酸"
<http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/trans_fat/t_kihon/fatty_acid.html> (参照 2014-08-22).
- 8) Smeden JV et al (2014) The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1841:295-313
- 9) Sinclair AJ, Li D (2001) The significance of alpha-linolenic acid for humans. *Journal of Oleo Science* 50:373-379
- 10) Brenna JT et al (2009) α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 80:85-91
- 11) Carnielli VP et al (2007) Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm newborns fed formula with long-chain polyunsaturated fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition* 86:1323-1330
- 12) Lin YH, Salem N (2007) Whole body distribution of deuterated linolenic and α -linolenic acids and their metabolites in the rat. *The Journal of Lipid Research* 48:2709-2724

- 13) Friesen RW, Innis SM (2009) Dietary arachidonic acid to EPA and DHA balance is increased among Canadian pregnant women with low fish intake. *The Journal of Nutrition* 139:2344-2350
- 14) Bjerve KS et al (1987) Alpha-linolenic acid deficiency in man: effect of essential fatty acids on fatty acid composition. *Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research* 17B:862-865
- 15) Lin YH et al (2010) Compartmental analyses of $^2\text{H}_5$ - α -linolenic acid and ^{13}C -U-eicosapentanoic acid toward synthesis of plasma labeled 22:6n-3 in newborn term infants. *The American Journal of Clinical Nutrition* 92:284-293
- 16) C. R. ロビンス (2006) 「毛髪科学」 (山口真主訳) フレグランスジャーナル社
- 17) 花王株式会社 (2014) 「繊維応用技術研究会編 技術シリーズ3 ヘアケアってなに？」 繊維社
- 18) 新井幸三 (2014) 「繊維応用技術研究会編 技術シリーズ2 ケラチン繊維の力学的性質を制御する階層構造の科学」 繊維社
- 19) 花王株式会社 "髪と地肌の構造となりたち" 花王株式会社ヘアケアサイト <http://www.kao.com/jp/haircare/structure_01.html> (参照 2015-1-8)
- 20) 清水宏 (2011) あたらしい皮膚科学：第2版 中山書店
- 21) Rogers GE (2004) Hair follicle differentiation and regulation. *The International Journal of Developmental Biology* 48:163-170
- 22) Loussouarn G (2001) African hair growth parameters. *British Journal of Dermatology* 145:294-297
- 23) Berthiaume MD, Riccio DA, Merrifield JH (1994) Silicone-based products for damaged hair in various ethnic groups. *Drug & Cosmetic Industry* 155:24-26, 28, 30, 32, 87
- 24) Hayashi S, Okumura T, Ishida A (1976) "Preliminary study on racial difference in scalp hair". In: Kobori T, Montagna W (ed) *Biology and Disease of the Hair*. University of Tokyo Press 555-561

- 25) Franbourg A et al (2003) Current research on ethnic hair. *Journal of the American Academy of Dermatology* 48:S115-119
- 26) Syed AN, Ventura TN, Syed MN (2013) Hair ethnicity and ellipticity: a preliminary study. *Cosmetics & Toiletries* 128:250, 252-259
- 27) Das BM (1974) A study of cross sections of head hair from some Caucasoid and mongoloid populations of Assam, India. *Zeitschrift fur Morphologie und Anthropologie* 65:324-328
- 28) Rogers GE (1959) Electron microscope studies of hair and wool. *Annals of the New York Academy of Sciences* 83:378-399
- 29) Swift JA, Bews B (1974) The chemistry of human hair cuticle-I: A new method for the physical isolation of cuticle. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 25:13-22
- 30) Das BM (1971) Medullary structure of head hair in some caucasoid and mongoloid populations of Assam, India. *Zeitschrift fur Morphologie und Anthropologie* 63:102-109.
- 31) 佐藤直紀 (2006) 美しい髪 of 機構と毛髪 of 構造. *表面科学* 27: 480-484
- 32) Naito S et al (1992) Histochemical observation of the cell membrane complex of hair. *Sen-I Gakkaishi* 48:420-426
- 33) Swift JA (1999) Human hair cuticle: Biologically conspired to the owner's advantage. *Journal of Cosmetic Science* 50:23-47
- 34) Rogers G, Koike, K (2009) Laser capture microscopy in a study of expression of structural proteins in the cuticle cells of human hair. *Experimental Dermatology* 18:541-547
- 35) Swift JA, Bews B (1974) The chemistry of human hair cuticle- II : The isolation and amino acid analysis of the cell membranes and A-layer. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 25:355-366
- 36) Robbins C (2009) The cell membrane complex: Three related but different cellular cohesion components of mammalian hair fibers. *Journal of Cosmetic Science* 60:437-465

- 37) Jones LN, Rivett DE (1997) The role of 18-methyleicosanoic acid in the structure and formation of mammalian hair fibres. *Micron* 28:469-485
- 38) Smith JR, Swift JA (2005) Maple syrup urine disease hair reveals the importance of 18-methyleicosanoic acid in cuticular delamination. *Micron* 36:261-266
- 39) Natarajan U, Robbins C (2010) The thickness of 18-MEA on an ultra-high-sulfur protein surface by molecular modeling. *Journal of Cosmetic Science* 61:467-477
- 40) Breakspear S, Smith JR, Luengo G (2005) Effect of the covalently linked fatty acid 18-MEA on the nanotribology of hair's outermost surface. *Journal of Structural Biology* 149:235-242
- 41) Ando H et al (2011) Involvement of pigment globules containing multiple melanosomes in the transfer of melanosomes from melanocytes to keratinocytes. *Cellular Logistics* 1:12-20
- 42) Godfrey S, Staite W, Marsh J (2013) Metals in female scalp hair globally and its impact on perceived hair health. *International Journal of Cosmetic Science* 35:264-271
- 43) Masukawa Y, Tsujimura H (2007) Highly sensitive determination of diverse ceramides in human hair using reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Lipids* 42:275-290
- 44) Lee YS et al (2009) Simultaneous HPLC analysis of ceramide and dihydroceramide in human hairs. *Archives of Pharmacal Research* 32:1795-1801
- 45) Candi E, Schmidt R, Melino G (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6:328-340
- 46) Haftek M et al (2011) Compartmentalization of the human stratum corneum by persistent tight junction-like structures. *Experimental Dermatology* 20:617-621

- 47) Destailats F, Guitard M, Cruz-Hernandez C (2011) Identification of $\Delta 6$ -monounsaturated fatty acids in human hair and nail samples by gas-chromatography-mass-spectrometry using ionic-liquid coated capillary column. *Journal of Chromatography A* 1218:9384-9389
- 48) Yadav S et al (2009) Comparative thermodynamic and spectroscopic properties of water interaction with human stratum corneum. *Skin Research and Technology* 15:172-179
- 49) Lee WS (2011) Integral hair lipid in human hair follicle. *Journal of Dermatological Science* 64:153-158
- 50) Masukawa Y, Narita H, Imokawa G (2005) Characterization of the lipid composition at the proximal root regions of human hair. *Journal of Cosmetic Science* 56:1-16
- 51) Masukawa Y et al (2005) A novel method for visualizing hair lipids at the cell membrane complex: Argon sputter etching/scanning electron microscopy. *Journal of Cosmetic Science* 56:297-309
- 52) Masukawa Y, Tsujimura H, Imokawa G (2005) A systematic method for the sensitive and specific determination of hair lipids in combination with chromatography. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 823: 131-142
- 53) Coderch L et al (1995) Chromatographic characterization of internal polar lipids from wool. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72:715-720
- 54) Kishi K, Iseki S (1977) Immunochemical studies on blood group A substance from human hair. *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 80:191-195
- 55) Kimura A et al (2005) Blood group A glycosphingolipid accumulation in the hair of patients with α -N-acetylgalactosaminidase deficiency. *Life Sciences* 76: 1817-1824
- 56) Adley MA, Assaf HA, Hussein M (2005) Expression of CD1d in human scalp skin and hair follicles: hair cycle related alterations. *Journal of Clinical Pathology* 58:1278-1282

- 57) Yoshida S, Koike K (2011) Chapter one - lipid and membrane dynamics in biological tissues - infrared spectroscopic studies. In: Aleš I (ed) *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* (13). Academic Press, New York
- 58) Ji JH et al (2013) The ethnic differences of the damage of hair and integral hair lipid after ultra violet radiation. *Annals of Dermatology* 25:54-60
- 59) Cruz CF et al (2013) Keratins and lipids in ethnic hair. *International Journal of Cosmetic Science* 35:244-249
- 60) Lyman DJ, Murray-Wijelath J (2005) Fourier transform infrared attenuated total reflection analysis of human hair: comparison of hair from breast cancer patients with hair from healthy subjects. *Applied Spectroscopy* 59:26-32
- 61) Lyman DJ, Fay SG (2014) The effect of breast cancer on the Fourier transform infrared attenuated total reflection spectra of human hair. *ecancer* 8:405
- 62) Mogos T et al (1994) The hair levels of unsaturated fatty acids (oleic, linoleic, and linolenic) indicators of the lipid metabolic balance. *Romanian Journal of Internal Medicine* 32:159-163
- 63) Fu Z, Sinclair AJ (2000) Novel pathway of metabolism of α -linolenic acid in the guinea pig. *Pediatric Research* 47:414-417
- 64) Yoshida S et al (2008) Analysis of human oral mucosa ex vivo for fatty acid compositions using Fourier-transform infrared spectroscopy. *Lipids* 43:361-372
- 65) Luthria DL, Sprecher H (1993) 2-Alkenyl-4,4-dimethyloxazolines as derivatives for the structural elucidation of isomeric unsaturated fatty acids. *Lipids* 28:561-564
- 66) Yoshida S et al (2009) Metabolism of fatty acids and lipid hydroperoxides in human body monitoring with Fourier transform infrared spectroscopy. *Lipids in Health and Disease* 8:28
- 67) Xu S et al (2005) The DMAP-catalyzed acetylation of alcohols-a

- mechanistic study (DMAP = 4-(dimethylamino) pyridine). *Chemistry* 11:4751-4757
- 68) Zahn H, Hilterhaus S, Strüßmann A (1986) Bleaching and permanent waving aspects of hair research. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 37:159-175
- 69) Takahashi T, Nakamura K (2004) A study of the photolightening mechanism of blond hair with visible and ultraviolet light. *Journal of Cosmetic Science* 55:291-305
- 70) Habe T et al (2011) ToF-SIMS characterization of the lipid layer on the hair surface. I: the damage caused by chemical treatments and UV radiation. *Surface and Interface Analysis* 43:410-412
- 71) Okamoto M et al (2012) Investigation of the damage on the outermost hair surface using ToF-SIMS and XPS. *Surface and Interface Analysis* 44:736-739
- 72) Okamoto M et al (2011) ToF-SIMS characterization of the lipid layer on the hair surface. II: Effect of the 18-MEA lipid layer on surface hydrophobicity. *Surface and Interface Analysis* 43: 298-301
- 73) Wood JM et al (2009) Senile hair graying: H₂O₂-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair. *The FASEB Journal* 23:2065-2075
- 74) Sakai K, Yoshida S (1994) Quantitative and non-destructive analyses of fatty acid esters and cholesterol in brain tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 7:163-167
- 75) Grille S et al (2010) The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Progress in Lipid Research* 49:262-288
- 76) Hara A, Taketomi T (1982) Isolation and determination of cholesterol glucuronide in human liver. *Lipids* 17:515-518
- 77) Muhiudeen IA et al (1984) Characterization of human liver 3-O-β-D-glucopyranuronosyl-cholesterol by mass spectrometry and

- nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of Lipid Research* 25:1117-1123
- 78) Kunimoto S et al (2002) Steryl glucoside is a lipid mediator in stress-responsive signal transduction. *Cell Structure and Function* 27:157-162
- 79) Hojo H, Noguchi S (1983) Method of modifying animal fiber goods by stripping off scales. United States Patent No. 4396388
- 80) Cao J, Wijaya R, Leroy F (2006) Unzipping the cuticle of the human hair shaft to obtain micron/nano keratin filaments. *Biopolymers* 83: 614-618
- 81) Derry DM (1972) Studies on the fate of dietary linoleic acid in the neonatal rat. *Journal of Nutrition* 102:109-116
- 82) Bazan NG, Scott BL (1990) Dietary omega-3 fatty acids and accumulation of docosahexaenoic acid in rod photoreceptor cells of the retina and at synapses. *Upsala journal of medical sciences Supplement* 48:97-107
- 83) Sprecher H, Chen Q (1999) Polyunsaturated fatty acid biosynthesis: a microsomal-peroxisomal process. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60:317-321
- 84) Brenna JT (2002) Efficiency of conversion of α -linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5:127-132
- 85) Leyton J, Drury PJ, Crawford MA (1987) Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *British Journal of Nutrition* 57:383-393
- 86) Baer AN, Green FA (1993) Fatty acid oxygenase activity of human hair roots. *Journal of Lipid Research* 34:1505-1514
- 87) Mlakar N, Spiteller G (1994) Reinvestigation of lipid peroxidation of linolenic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* 1214:209-220
- 88) Ando H et al (2004) Fatty acids regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase: a new aspect of

- ubiquitin-proteasome function. *The Journal of Biological Chemistry* 279:15427-15433
- 89) Fujita H et al (2011) Inhibitory effects of 16-hydroxy-9-oxo-10 *E*,12 *E*,14 *E*-octadecatrienoic acid (Corchorifatty acid B) isolated from *Melissa officinalis* Linné on melanogenesis. *Experimental Dermatology* 20:420-424
- 90) Tate ML, Kamath YK, Ruetsch SB (1993) Quantification and prevention of hair damage. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 44:347-371
- 91) Ruetsch SB, Kamath YK (2004) Effects of thermal treatments with a curling iron on hair fiber. *Journal of Cosmetic Science* 55:13-27
- 92) Millington KR, Maurdev G (2004) The generation of superoxide and hydrogen peroxide by exposure of fluorescent whitening agents to UVA radiation and its relevance to the rapid photoyellowing of whitened wool. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 165:177-185
- 93) Nogueira ACS, Nakano AK, Joekes I (2004) Impairment of hair mechanical properties by sun exposure and bleaching treatments. *Journal of Cosmetic Science* 55:533-537
- 94) Ruetsch SB, Kamath YK (2004) Change in surface chemistry of the cuticle of human hair by chemical and photochemical oxidation. *IFSCC Magazine* 7:299-307
- 95) Zalfen AM, Wortmann G, Wortmann F-J (2005) Electrophoretical method for assessing the damage induced by hair bleaching. *SOFW Journal* 131:40-44
- 96) Robbins C (2006) Hair breakage during combing. II. Impact loading and hair breakage. *Journal of Cosmetic Science* 57:245-257
- 97) Kamath YK, Ruetsch SB (2006) Photodegradation of hair of different ethnicity after 1 year of exposure to natural weathering in Arizona. *IFSCC Magazine* 9:325-333
- 98) Kuzuhara A (2007) Analysis of structural changes in permanent

- waved human hair using Raman spectroscopy. *Biopolymers* 85: 274-283
- 99) Ramaprasad KR et al (2007) Combing damage to hair cuticle structure. *IFSCC Magazine* 10:127-134
- 100) Cheng SY et al (2007) Analysis of keratin fibre damages. *Text Asia* 38/39:60-64
- 101) Kamath Y, Robbins C (2007) Hair breakage during combing. IV. Brushing and combing hair. *Journal of Cosmetic Science* 58:629-636
- 102) Jeon S-Y, Pi LQ, Lee W-S (2008) Comparison of hair shaft damage after UVA and UVB irradiation. *Journal of Cosmetic Science* 59: 151-156
- 103) Wortmann F-J et al (2008) Effects of reduction on the denaturation kinetics of human hair. *Biopolymers* 89:600-605
- 104) Seshadri IP, Bhushan B (2008) In situ tensile deformation characterization of human hair with atomic force microscopy. *Acta Materialia* 56:774-781
- 105) Hessefort YZ, Holland BT, Cloud RW (2008) True porosity measurement of hair: A new way to study hair damage mechanisms. *Journal of Cosmetic Science* 59:303-315
- 106) Zur Wiesche ES et al (2008) Specific repair of aging hair keratin. *IFSCC Magazine* 11:317-320
- 107) Tomita Y, Ishikawa M, Takigami S (2008) Effects of permanent waving and bleaching treatments on damage of human hair. *Transactions of the Materials Research Society of Japan* 33: 865-868
- 108) Kamath Y et al (2010) Effect of grooming practices on physical characteristics of hair. *SOFW Journal* 136:32,34-36,38-39
- 109) Evans TA, Park K (2010) A statistical analysis of hair breakage. II. Repeated grooming experiments. *Journal of Cosmetic Science* 61: 439-455
- 110) Pierard-Franchimont C, Pierard GE (2012) Hair weathering and

- hair capacitance mapping: a pilot study. *Journal of Cosmetic Dermatology* 11:179-182
- 111) Nawa T et al (2013) Alkaline peroxide treatment induces acquired unruly hair by apparently affecting distinct macrofibrils. *Journal of Cosmetic Science* 64:261-271
- 112) Zuel-Fakkar MN et al (2013) Ultrastructure study of hair damage after ultraviolet irradiation. *Journal of Cosmetic Dermatology* 12: 254-260
- 113) Takahashi T et al (2006) Morphology and properties of Asian and Caucasian hair. *Journal of Cosmetic Science* 57:327-338
- 114) Mamada A, Nakamura K (2007) A study of the volume and bounce decrease in hair with aging using bending elasticity measurements. *Journal of Cosmetic Science* 58:485-494
- 115) Kim SN et al (2013) Characteristic features of ageing in Korean women's hair and scalp. *British Journal of Dermatology* 168: 1215-1223
- 116) Robbins C et al (2012) What women want - quantifying the perception of hair amount: an analysis of hair diameter and density changes with age in caucasian women. *British Journal of Dermatology* 167:324-332
- 117) Birch MP, Messenger JF, Messenger AG (2001) Hair density, hair diameter and the prevalence of female patten hair loss. *British Journal of Dermatology* 144:297-304
- 118) Nagase S et al (2009) Changes in structure and geometric properties of human hair by aging. *Journal of Cosmetic Science* 60: 637-648
- 119) Wills J et al (2004) Free internal lipids in hair from pre- and post-menopausal women. *IFSCC Magazine* 7:293-297

謝辞

本論文は、筆者が岐阜大学 創薬医療情報研究科（創薬科学専攻）の博士課程在籍中並びに花王株式会社東京研究所在職中に行った研究成果からなるものです。

研究の遂行及び論文の作成にあたり、終始懇切丁寧なご指導を賜りました岐阜大学工学部 吉田敏教授に心より感謝いたします。角化した組織である毛髪を、必須脂肪酸の代謝という重要な生理学的反応の場として捉えるという視点に蒙を啓かれました。

また、本論文をご精読頂きご助言を賜りました岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 森田洋子教授、丹羽雅之教授、宇野文二教授に深謝致します。

脂質分析において、岐阜大学工学部 林俊佑さん、五十川みのりさん、日下聡美さんはじめ吉田教授研究室の多くの学部生、院生の皆様から多大なご協力を頂きました。また、花王 解析科学研究所の岡本昌幸さん、石川和高さんはじめ多くの方々に大変お世話になりました。極微量の試料を元に詳細な解析研究が可能となりましたのは皆様のおかげです。厚くお礼申し上げます。

物性研究においては花王株式会社ヘアケア研究所の多くの方々に多大なるご協力、ご助言を頂きました。特に、毛髪に加齢変化研究は儘田明さんのお力があったからこそ達成できたものでした。心より感謝いたします。また、実験の遂行にあたり竹内（野村）みどりさんの確実で精妙な実験技能に大いに助けて頂きました。厚くお礼申し上げます。

本研究を私に勧め、機会を与えて下さった花王株式会社の松尾貴史さん、

小池謙造さんに感謝いたします。会社勤務と学生との両立が不安で逡巡していた私が踏み切る気になったのはお二人の激励のおかげです。小池さんには研究の進捗や博士論文執筆についても貴重なアドバイスを頂き、助けて頂きました。

それでもまだ残っていた私の迷いを「面白そう」の一言であっさりと断ってくれた両親に感謝します。実際とても面白い研究ができました。

本研究は今後の研究の範囲を拡げてくれるものとなりました。皆様、本当に有難うございました。

研究業績目録

1. 論文

学位論文関係

- 〈1〉 Takahashi T, Yoshida S (2014) Distribution of Glycolipid and Unsaturated Fatty Acids in Human Hair. *Lipids* 49:905-917 (IF=2.353)
- 〈2〉 Takahashi T, Mamada A, Breakspear S, Itou T, Tanji N (2015) Age-dependent changes in damage processes of hair cuticle. *Journal of Cosmetic Dermatology* 14:2-8 (IF=1.0)

その他

- 〈3〉 Kunieda T, Takahashi T, Hirobe M (1983) Highly stereoselective photodimerization of 1,3-dimethylthymine in liquid crystalline media. *Tetrahedron Letters* 24:5107-5108 (IF=2.391)
- 〈4〉 Arai K, Sasaki N, Naito S, Takahashi T (1989) Crosslinking structure of keratin.I. Determination of the number of crosslinks in hair and wool keratins from mechanical properties of the swollen fiber. *Journal of Applied Polymer Science* 38:1159-1172 (IF=1.40)
- 〈5〉 Arai K, Sakamoto M, Naito S, Takahashi T (1989) Crosslinking structure of keratin.II. Intermolecular and intramolecular crosslinks in potassium-cyanide-treated wool fibers. *Journal of Applied Polymer Science* 38:29-44 (IF=1.40)
- 〈6〉 Naito S, Takahashi T, Hattori M, Arai K (1992) Histochemical observation of the cell membrane complex of hair. *Sen-I Gakkaishi* 48:420-426 (IF=0.164)

- 〈7〉 高橋俊江 (2002) 光による毛髪メラニンの分解挙動. フレグランスジャーナル 8月号:49-54
- 〈8〉 Takahashi T, Nakamura K (2004) A study of the photolightening mechanism of blond hair with visible and ultraviolet light. *Journal of Cosmetic Science* 55:291-305 (IF=0.40 2004 年)
- 〈9〉 Takahashi T, Nakamura K (2005) A study of the photolightening mechanism of red hair with visible and ultraviolet light: Comparison with blond hair. *Journal of Cosmetic Science* 56:47-56 (IF=0.29 2005 年)
- 〈10〉 Takahashi T, Hayashi R, Okamoto M, Inoue S (2006) Morphology and properties of Asian and Caucasian hair. *Journal of Cosmetic Science* 57:327-338 (IF=0.25 2006 年)
- 〈11〉 高橋俊江、林留美、岡本昌幸、井上滋登 (2007) Asian hair と Caucasian hair のキューティクル形状および損傷機構研究. フレグランスジャーナル 4月号:52-57
- 〈12〉 Akazaki S, Takahashi T, Nakano Y, Nishida T, Mori H, Takaoka A, Aoki H, Chen H, Kunisada T, Koike K (2014) Three-dimensional analysis of melanosomes isolated from B16 melanoma cells by using ultra high voltage electron microscopy. *Microscopy Research* 2:1-8 (IF=0.67)

IF に年度記載の無い場合は、最新の値を示している。

2. 学会発表

学位論文関係

- 〈1〉 高橋俊江、林俊佑、吉田敏. ヒト毛髪中不飽和脂肪酸の分布～ α リノレン酸はどこへ行ったか?. 日本脂質栄養学会 第23回大会 (2014.8.29-30 東京)
- 〈2〉 Takahashi T, Mamada A, Breakspear S, Okamoto M, Inoue S, Tsujimura H, Masukawa Y. Morphology and Properties of Chinese, Thai, Japanese and Caucasian Hair and their Changes with Aging. 25th the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress. (2008.10.6-9 Barcelona, Spain)

その他

- 〈3〉 高橋俊江、内藤幸雄、新井幸三、小池茂一. 毛髪ケラチンの橋かけ密度の定量化. 繊維学会昭和62年度年次大会研究発表会 (1987.6.12 東京)
- 〈4〉 Takahashi T, Nakamura K. A Study on the Photo-lightening Mechanism of Hair with Visible and UV Light. DWI 13th International Hair-Science Symposium (2003.9.10-12 Potsdam, Germany)
- 〈5〉 Takahashi T, Hayashi R. Morphology and Properties of Asian and Caucasian Hair. 11th International Wool Research Conference (2005.9.5-9 Leeds, UK)
- 〈6〉 Takahashi T, Hayashi R, Okamoto M, Inoue S. Morphology and Properties of Asian and Caucasian Hair. 24th the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress (2006.10.16-19 大阪)
- 〈7〉 Inoue S, Okamoto M, Takahashi T, Hayashi R, Itou T. AFM and TOF-SIMS investigations of nano-mechanical properties of hair fiber with cosmetic treatment. 24th the International Federation

of Societies of Cosmetic Chemists Congress (2006.10.16-19 大阪)

- 〈8〉 Takahashi T, Breakspear S, Mamada A, Okamoto M, Inoue S, Tsujimura H, Masukawa Y. Morphology and Properties of Asian hairs -Chinese, Thai and Japanese Hair-. the 9th Scientific Conference of the Asian Societies of Cosmetic Scientists (2009.3.2-4 横浜)
- 〈9〉 Takahashi T, Kizawa K, Suzuki R. Association of S100A3 and its citrullination with hair cuticle damage. 27th the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress (2012.11.15-18, Johannesburg, Republic of South Africa)
- 〈10〉 小池謙造、中野裕司郎、高橋俊江、赤崎秀一. 単離メラノソームの微細立体構造に関する研究. 色素細胞学会大会 (2012.11.24-25 滋賀)
- 〈11〉 高橋俊江、木澤謙司、鈴木良輔. 毛髪タンパク S100A3 及びそのシトルリン化とキューティクルダメージ. 日本化粧品技術者会 IFSCC2012 ヨハネスブルグ大会・国内報告会 (2012.11.29 東京)

3. 講演

- 〈1〉 東洋人毛と欧米人毛の構造及び特性比較. 日本化粧品技術者会 第57回研究討論会. (2005.11.25 東京)
- 〈2〉 Study on morphology and properties of hair. 繊維応用技術研究会. (2012.3.8 大阪)

4. 著書

小池謙造、杉野久実、伊藤隆司、高橋俊江. 繊維応用技術研究会編 技術シリーズ3 ヘアケアってなに? -美しい髪・健康な髪へのアプローチ-

5. 特許

毛髪洗淨料/微粒子分散/微粒子による光沢、色調付与/紫外線防御/光脱色など 約 20 件