

초고압전자현미경을 이용한 미라 모발 멜라닌과립의 구조 관찰

장병수*

한서대학교 피부미용향장화학과

Observation of the Structure of Melanin Granule in Mummy's Hair Shaft Using High-Voltage Electron Microscopy

Byung-Soo Chang*

Department of Cosmetology, Hanseo University

요약 본 연구는 미라 모발에 존재하는 멜라닌과립의 보존 상태와 모양을 규명하기 위해서 1250kV의 초고압전자현미경(high voltage electron microscope: HVEM)을 사용하여 3차 구조를 분석하였다. 미라 모발에서 피질에 분포하고 있는 멜라닌과립은 큐티클층에 인접한 바깥쪽 피질에 집중적으로 분포하고 있다. 이들 부위에는 다량의 멜라닌과립들이 무리를 지어 존재하고 있어서 현대인의 정상 모발에 있는 멜라닌과립의 분포양상과 뚜렷한 차이점을 나타내었다. 초고압전자현미경으로 ± 60 도의 범위에서 1도 간격으로 촬영한 결과 멜라닌과립은 길쭉한 타원형의 형태로 크기가 다양하게 관찰되었다. 과립의 크기는 단축 직경이 0.3- 0.6 μm 이고, 장축 직경은 0.5-1 μm 로 측정되었다. 결론적으로 초고압전자현미경은 일반 투과전자현미경보다 높은 해상도와 투과력을 가져서 두꺼운 절편의 생물 시료 구조분석에 용이하다.

• 주제어 : 모발, 미라, 멜라닌과립, 초고압전자현미경, 투과전자현미경

Abstract Three-dimensional melanin granules of mummy's hair analyzed using high voltage electron microscopy at 1250kV. The melanin granules in the cortex of mummy's hair located in close proximity to the outer of cortex in the adjacent place of the cuticles. A lot of melanin granule performed in this area. It is a distinguished difference from modern human. While it rotated up to 60 degree counter-clockwise and taken a photo per one degree using high voltage electron microscopy. The melanin granule displayed with long elliptical and variable at the size. The size of granule is measured from 0.3~0.6 μm in minimum diameter and 0.5~1 μm in maximum diameter. Conclusionally, high voltage electron microscope has higher resolution and penetration power than conventional transmission electron microscope that could be load biological thick specimen.

• Key Words : Hair, Melanin granule, Mummy, HVEM, TEM

1. 서론

2000년대 초반부터 최근까지 조선시대의 무덤에서 발

견된 미라(mummy)들에 관한 연구가 진행되어 오고 있다. 남한지역에서 발견된 미라는 복식 등 매장품의 조사

*Corresponding Author : 장병수(bschang@hanseo.ac.kr)

Received June 22, 2017

Accepted August 20, 2017

Revised August 2, 2017

Published August 28, 2017

와 미라의 생존 시 신분상태 등에 관하여 조사가 된 다음 문중에 의해서 이장되거나 화장질차를 밟아 왔으며 이중 일부 미라에 대한 임상학적, 신체 조직학적 연구가 진행되어 왔다[1,2,3]. 이후 국내에서 미라의 신체 조직학적 연구와 사망당시의 사망원인에 대한 임상학적, 방사선학적 조사 연구 등이 보고되어 왔다[2,4,5].

특히 미라 모발에 관한 연구는 2002년 경기도 파주에서 발견된 파평윤씨 모자 미라[6]와 2004년 발견된 "학봉장군" 미라 모발의 보존상태와 외부형태 및 미세구조에 관한 연구[7]가 보고되어 왔다. 2002년 경기도 파주에서 발견된 파평윤씨 모자 미라는 고려대학교 박물관에서 생존 당시의 매장문화와 미라의 사인에 대한 임상적 소견, 출토 당시의 토양 및 목재관의 특성, 복식 등에 관한 연구를 진행하여 보고하였다[8].

2004년 5월 대전시 목달동에서 600년 전에 사망한 조선시대 미라가 발견되었다. 미라는 은진 송씨 문중으로 세종 때 무관을 지냈으며 현재 "학봉장군"으로 명명되어 대전시 계룡산 자연사박물관에 보존되어 있다.

Chang 등[9]은 한국의 대전에서 발견된 15세기 미라 모발에 관한 연구에서 "학봉장군" 미라 모발은 전혀 손상된 부위 없이 완벽한 상태로 존재하였으며 이와 같은 결과는 요즘 현대인에서도 쉽게 찾아볼 수 없다고 보고하였다. 모발이 완벽하게 존재한 이유는 모발표면에 미세한 무기물질들이 피복되어 있는데 그 원인으로 조선시대의 매장문화에서 시신을 오동나무관에 입관한 다음 매장할 때 생석회를 덮음으로서 시간이 경과함에 따라 관내부는 밀폐되면서 진공상태가 되어 나타난다[10].

본 연구는 이미 완벽한 상태로 보존되어 있는 "학봉장군" 미라 모발의 2차원적 구조 연구에 이어 한국기초과학지원연구원에 설치되어 있는 국내 유일의 초고압전자현미경(high voltage electron microscope)을 이용하여 미라 모발의 주요 색소인 멜라닌과립의 3차원적 구조를 확인하고 멜라닌과립의 분포위치와 과립의 형태적 특성을 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험 재료

실험당시 고려대학교 의과대학 해부학교실에 안치된 "학봉장군" 미라 모발을 실험가위를 이용하여 미라 두피 1cm 떨어진 부위에서 잘라내었으며 채취한 모발의 길이

는 약 10-15cm 이었다.

2.2 실험 방법

2.2.1 투과전자현미경 관찰

채취한 미라 모발을 5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.4)로 1시간 동안 전고정하고, 인산완충용액(4°C, 0.4M phosphate buffer, pH 7.4)으로 15분씩 2회 세척한 다음, 1% OsO₄ (4°C, 0.4M phosphate buffer, pH 7.4)로 1시간 후 고정하였다. 고정이 끝난 미라 모발시료는 동일 완충용액으로 2회씩 세척한 후, 에탄올 농도 상승 순으로 탈수하였다. 탈수가 끝난 미라 모발은 propylene oxide로 치환하여 Epon-Araldite 혼합액에 포매한 다음, 60°C vacuum drying oven(Yamato, DPF-31, Japan)에서 36시간 동안 중합반응 시켰다. 포매된 미라 모발은 초박절편기(Ultramicrotome, LKB-2088)로 준초박절편(semi-thin section)을 제작한 다음, 1% toluidine blue(1% borax)로 hot plate(60°C) 상에서 2분간 염색하였다. 염색이 끝난 절편을 증류수로 충분히 세척한 다음 광학현미경(Olympus CH30, Japan)으로 관찰하였다. 이어서 미라 모발의 미세구조를 관찰하기 위해 초박절편(ultra-thin section)을 제작하여 copper grid에 부착시킨 다음, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(H-7500, Hitachi, Japan)으로 100kV에서 관찰하였다.

2.2.2 초고압전자현미경 관찰

채취한 미라 모발을 통상적인 방법으로 에폭시수지(epoxy resin) 불력을 제작하여 1μm 두께로 절편 제작하였다. 절편을 formvar 막이 입혀진 grid 위에 올려놓고 4% uranyl acetate와 lead citrate로 각각 10분씩 염색하였다. 염색이 끝난 재료는 관찰부위의 기준점을 잡기 위해서 30nm의 gold particle(BB International, UK, EM. GMHL 30)로 1시간 동안 표식한 다음, 한국기초과학연구원에 설치된 초고압전자현미경(JEM-ARM 1300S, Japan)으로 1250kV에서 2,000배의 배율로 관찰하였다. 관찰상은 CCD camera(Gatan Co. SP100W, 1600X, 1200 pixel, 12bit)를 이용하여 +60도에서 -60도 까지 1도 간격으로 촬영하였다. 멜라닌과립의 단층구조는 IMOD software(version 3.3.10)[11]를 이용하여 정렬 한 후 3차 구조를 재구성하기 위해서 electron tomography를 실시하였다.

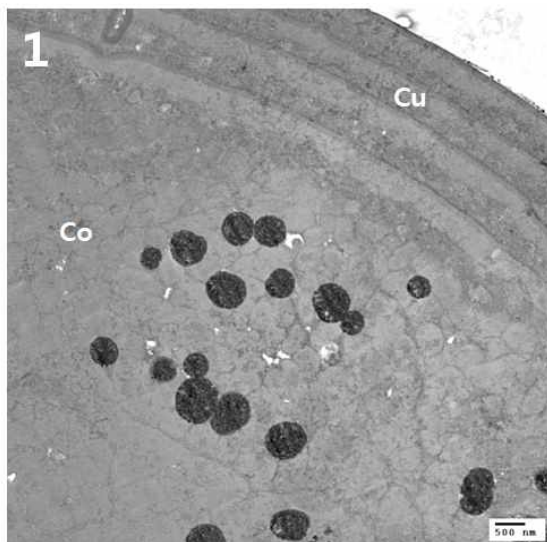
3. 결과 및 고찰

투과전자현미경 관찰을 위한 초박절편(ultrathin section)의 연속절편과 초고압전자현미경 관찰을 위한 1 μm 두께의 연속 후박절편을 연구한 후 3-D electron tomography를 실시하였다.

“학봉장군”미라 모발의 횡단면을 투과전자현미경으로 관찰한 결과 모발에는 큐티클층(cuticle layer)과 피질(cortex)이 잘 보존되어 있다. 큐티클층은 직경이 3 μm -4 μm 로 측정되었고 3개의 각화된 큐티클세포(cuticular cell)가 길고 납작하게 신장되어 피질을 둘러싸고 있으며 이들 세포의 직경은 약 600nm로 관찰되었다[Fig. 1].

큐티클층에 둘러싸인 피질은 다수의 피질세포(cortical cell)들이 조밀하게 밀착되어 존재하고 이들 세포막은 각각의 피질세포를 잘 경계 지어 뚜렷하게 관찰되었다[Fig. 1]. 피질세포는 거대원섬유(macrofibril)와 멜라닌과립(melanin granule)들로 채워져 있고, 멜라닌과립은 주로 큐티클층에 인접한 부위에 다량 분포하고 있다[Fig. 1].

Lee & Chang[6]은 2002년 파주에서 발견된 파평윤씨 미라 모발에서 멜라닌과립은 큐티클층에 가까운 외피질(exocuticle)에 집중적으로 분포하고 있다고 보고하였다. 400년 된 미라[6]와 본 연구에 사용된 600년 된 미라 모발에서 완벽하게 보존된 멜라닌과립들은 큐티클층에 인접한 외피질부위에서 다량 존재하는 것을 확인할 수 있다.

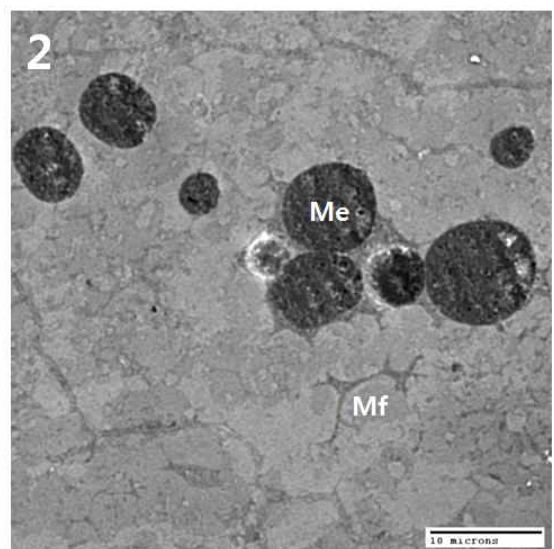


[Fig. 1] Transmission electron micrograph of the mummy's hair cortex(Co). Melanin granules are aggregated in the cortex which is adjacent to the cuticle layer(Cu).

멜라닌과립은 모발 색을 결정지어 주고 태양광선으로부터 두피를 보호하는 기능을 가지고 있다[12,13]. 특히 현대인에 있어서 모발의 멜라닌과립은 헤어 스타일링(hair styling)의 변화에 중요역할을 한다[14,15,16]. 예를 들어 갈색모발(brown hair)을 특정색조나 밝은 색으로 변화 시키기 위해서는 멜라닌과립의 발색단기(chromophore group)를 파괴시켜 완전 탈색, 또는 부분 탈색을 유도함으로써 일어나게 된다[17,18,19]. 현대인에 있어서 다양한 헤어 스타일링은 개인의 이미지 변화에 결정적 역할을 한다[20,21].

고배율의 투과전자현미경 관찰에서 멜라닌과립은 직경이 0.3 μm 에서부터 0.8 μm 까지 크기가 다양하게 관찰되는데[Fig. 2], 이와 같은 결과는 투과전자현미경 관찰을 하기 위해서 모발시료를 약 60nm 두께의 초박절편(ultrathin section)을 만들어서 관찰하였을 때 멜라닌과립의 절단면에 따라 직경의 차이가 다르게 나타나기 때문이다. 즉, 멜라닌 과립의 절단위치 및 절단방향에 따라 크기는 다르게 관찰된다.

투과전자현미경은 세포나 조직성분의 2차원적 미세 구조분석으로 이들 멜라닌과립의 3차원적인 형태와 미세 구조적 특성을 관찰하는 데는 한계가 있다.



[Fig. 2] High magnification transmission electron micrograph of melanin granules(Me) in the cortex of mummy's hair. Mf: macrofibril.

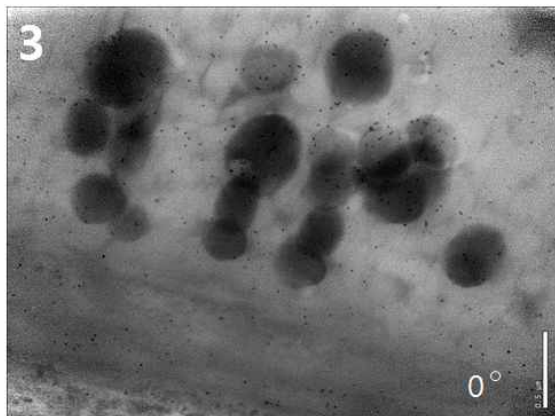
전자현미경은 사용되는 가속전압(accelerator voltage)에 따라 분류되는데 국내 대부분의 대학과 연구소에 설치되어 있는 일반적인 전자현미경은 25kV에서 125kV 정

도의 전압을 사용하고 있다. 전자현미경이 설치되어 있는 대부분의 실험실에서 생물시료 관찰을 위한 투과전자현미경의 가속전압은 70-100kV를 사용하고 있다[22].

초고압전자현미경은 1000kV 이상의 높은 가속전압을 사용하여 고도의 분해능과 투과력을 얻을 수 있는 장비로서 두께가 1 μ m 이상의 에폭시 수지 블럭(epoxy resin block) 절편 시료의 관찰과 이를 통한 3차원적 구조를 재현하여 원하는 정보의 비교와 분석이 가능한 장비이다 [23].

본 연구에서 높은 해상력과 우수한 투과력 및 3차원적 정보 추출이 용이한 초고압전자현미경을 사용한 멜라닌 과립의 관찰조건을 보면 초고압전자현미경상에서 일정한 각도로 tilting(0°, ±10°, ±20°, ±30°, ±40°, ±50°)을 실시하여 멜라닌과립의 구조적 특성을 확인할 수 있다 [Figs. 3, 4]. 멜라닌과립은 길쭉한 타원형으로 크기는 단축 직경이 0.3- 0.6 μ m이고, 장축 직경은 0.5-1 μ m로 측정되었다[Fig. 3].

또한 이들 과립들은 일정한 방향, 즉 모발의 장축을 따라 일정한 모양으로 배열되어 있지 않고 일부는 모발의 단축을 따라 존재하고 있는 것을 확인하였다. 그리고 이들 멜라닌과립은 한정된 막에 둘러싸여 있는지는 확인되지 않았다[Figs. 3, 4].



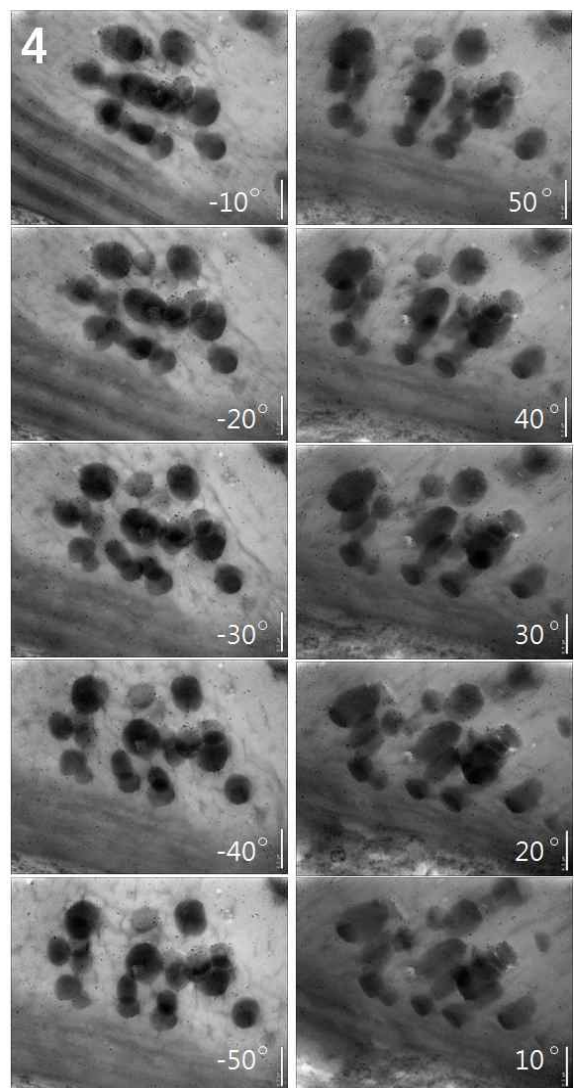
[Fig. 3] 3-D reconstruction of melanin granules with 0 degree image using HVEM.

Kim 등[24]이 보고한 바와 같이 투과전자현미경 관찰이 가능한 절편시료의 두께는 50-100nm의 얇은 절편을 사용하기 때문에 한 개의 그리드(grid)에 얹힌 몇 장의 절편에서 멜라닌과립의 3차원적 정보를 얻는 데는 많은 시간이 걸리고 불편함이 있다. 그러나 초고압전자현미경

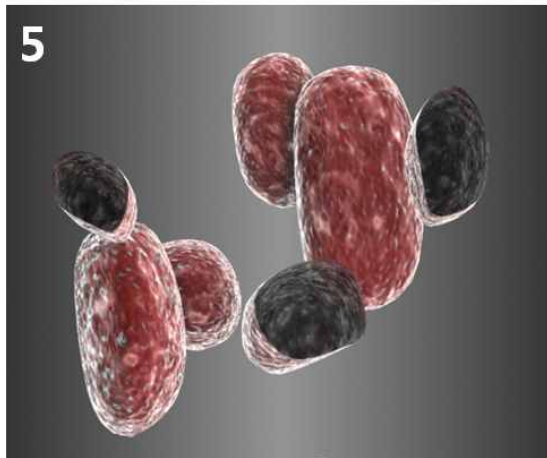
을 이용한 멜라닌과립의 3차원적 구조는 명확하게 확인할 수 있다.

본 연구에서 멜라닌과립은 길쭉한 타원형 또는 쌀알 모양으로 큐티클층에 인접한 부위에 여러 개가 집단적으로 관찰되었으며 멜라닌과립의 수를 셀 수 있었다[Fig. 5].

Tilting image와 3-D 입체구조의 재구현에서 멜라닌과립은 큐티클층에 인접한 피질부위에 집중되어 있고 과립의 표면은 매끄럽지 않고 거친 것으로 확인되었다 [Fig. 5].



[Fig. 4] Tilted images of the melanin granules using HVEM showing different structure in varying degrees.



[Fig. 4] 3-D reconstruction image of the melanin granules.

3. 결론

본 연구는 투과전자현미경과 초고압전자현미경을 이용하여 “학봉장군” 미라 모발에 존재하는 멜라닌과립의 3차원적 입체구조를 분석하였다. 투과전자현미경과 초고압전자현미경 관찰에서 멜라닌과립은 큐티클층에 인접한 피질 부위에 다량으로 밀집되어 존재하고 있다. 멜라닌과립의 구조에 대하여 일차적으로 수집된 2차원적 이미지에 3차원적 영상이미지를 재구성할 수 있는 IMOD를 사용하고 tilting 이미지를 이용하여 멜라닌과립의 3-D 입체구조를 재구성하였다. 멜라닌과립의 3-D 입체구조 이미지에서 멜라닌과립 표면은 거친 모양으로 넓은 표면적을 가지고 있다. 또한 멜라닌과립은 길이 방향이 모발의 정단부위 방향으로 일정하게 배열되어 있지 않고 일부는 가로로 위치하고 있는 것을 확인하였다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 논문은 한국기초과학지원연구원에 설치된 초고압 투과전자현미경 장비 사용으로 연구되었음

REFERENCES

- [1] Y. S. Kim, I. S. Lee, G. U. Jung, M. J. Kim, C. S. Oh, D. S. Yoo, W. J. Lee, E. Lee, S. C. Cha, D. H. Shin, "Radiological Diagnosis of Congenital Diaphragmatic Hernia in 17th Century Korean Mummy". *PLoS One*, Vol. 9, No. 7, DOI: 10.1371/journal.pone.0099779, 2014.
- [2] D. H. Shin, Y. H. Choi, K. J. Shin, G. R. Han, M. Youn, C. Y. Kim, S. H. Han, J. C. SEO, S. S. Park, Y. J. Cho, B. S. Chang, "Radiological analysis on a mummy from a medieval tomb in Korea". *Annals of Anatomy*. Vol. 185, No. 4, pp: 377-382, 2003.
- [3] D. H. Shin, M. Youn, B. S. Chang, "Histological analysis on the medieval mummy in Korea". *Forensic Science International*, Vol, 137, No. 26, pp. 172-182, 2003,
- [4] D. H. Shin, C. S. Oh, S. J. Lee, E.,J, Lee, M, Seo, "Ectopic paragonimiasis from 400-year-old female mummy of Korea" *Journal of Archaeological Science*, Vol. 39, No. 4, pp. 1103-1110. 2012.
- [5] I. S. Lee, M. J. Kim, D. S. Yoo, Y. S. Lee, D. H. Shin, "Three-dimensional reconstruction of medieval child mummy in Yangju, Korea, using multi-detector computed tomography" *Annals of Anatomy*, Vol. 189, No. 6, pp. 558-568, 2007.
- [6] G. Y. Lee, B. S. Chang, "Studies on the preservative condition and the ultrastructure of hair of newly found sixteenth century mummy in Paju". *Korean Journal of Electron Microscopy* Vol. 35, No. 4, pp. 211-218, 2005.
- [7] B. S. Chang, C. S. Uhm, C. H. Park, H. K. Kim, G. Y. Lee, H. H. Cho, Y. H. Chung, D. H. Shin, "Ultramicroscopic study on the hair of newly found 15th century mummy in Daejeon, Korea". *Annals of Anatomy*, Vol. 188, No. 5, pp. 5439-45, 2006.
- [8] Korea university museum. "Papyeong Yun Ssi Mira Jonghap Yeongu Nonmun Jip". Korea university museum: Seoul Korea. pp. 205-230, 2003. (Korean)
- [9] B. S. Chang, C. S. Uhm, C. H. Park, H. K. Kim, G. Y. Le, H. H. Cho, M. J. Kim, Y. H. Chung, K. W. Song, D. S. Lim, D. H. Shin, "Preserved skin structure of a recently found fifteenth-century mummy in Daejeon, Korea". *Journal of Anatomy*, Vol. 209, No. 5, pp. 671-680, 2006.
- [10] B, S, Chang, "Analysis on the preservation of scalp

- collected from full-term baby mummy of medieval Joseon Dynasty". *Applied Microscopy*, Vol. 38, No. 2, pp.135-140, 2008.
- [11] J. R. Kremer, D. N. Mastronarde, J. R. McIntosh, "Computer visualization of the three-dimensional image data using IMOD". *Journal of Structural Biology*, Vol. 116, No. 1, pp. 71-76, 1996.
- [12] J. Y. Lee, B. S. Chang, "Morphogenic types of cuticles and melanin granules in the anagen phase of hair cuticles". *Scientific Research and Essays*, Vol. 8, No. 20, pp. 807-814, 2013.
- [13] K. S. Kim, B. S. Chang, "Keratinization of the cuticle layer of hair follicles during the anagen phase". *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol. 13, No. 1, pp. 43-47, 2017.
- [14] G. Y. Lee, B. S. Chang, "General characteristics on the fine structure of scalp hair -I. Ultrastructure of hair shaft-", *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol. 6, No. 3, pp. 265-271, 2010.
- [15] B. S. Chang, "Study on the ultrastructural characteristics of human hair medulla". *Journal of the Korea Convergence Society*, Vol 8, No. 7, pp. 123-129, 2017.
- [16] J. S. Lee, J. A. Nor, B. S. Chang, "Ultrastructural characteristics on the cuticle layer according to different thickness of hairs". *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol. 11, No. 1, pp. 81-87, 2015.
- [17] K. H. Lee, G. Y. Lee, M. S. Kim, G. E. Kim, Y. K. Kim, B. S. Chang, "Morphological study of the bleaching agent and bleaching hair". *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol. 2, No. 3, pp. 79-89, 2006.
- [18] G. Y. Lee, B. S. Chang, "Ultrastructural changes of hair cuticle layer treated with permanent dye". *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol.7, No. 3, pp. 267-271, 2011.
- [19] J. A. Rho, T. B. Choi, B. S. Chang, "Ultrastructural analysis on the straight permed hair". *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol. 6, No. 1, pp.41-47, 2010.
- [20] G. Y. Lee, B. S. Chang, "Electron microscopic studies on the morphological differences of ethnic hair. *Korean Journal of Electron Microscopy* Vol. 38, No. 3, pp. 265-273, 2008.
- [21] S. Y. Kang, K. A. Lee, "A study of convergence management types based on self perception of scalp and hair among college students majoring in cosmetology". *Journal of the Korea Convergence Society*, Vol 8, No. 2, pp. 235-241, 2017.
- [22] H. W. Kim, J. W. Kim, I. M. Rhyu, "The high-voltage electron microscopy in biomedical research. *Korean Journal of Anatomy*, Vol. 42, No. 2, pp. 73-81, 2009.
- [23] J. W. Kim, S. J. Lee, I. M. Rhyu, "Construction of anaglypic stereo pair image using adobe photoshop program". *Korean Journal of Electron microscopy*, Vol. 36, No. 3, pp. 143-146, 2007.
- [24] H. W. Kim, S. T. Hong, S.H. Oh, C. H. Park, H. Kim, I. J. Rhyu, "Whole mount preparation of primary cultured neuron for HVEM observation". *Applied Microscopy*, Vol. 41, No.1, pp. 69-73. 2011.

저자소개

장 병 수(Byung-Soo Chang)

[정회원]



- 1984년 2월 : 단국대학교 생물학과(이학사)
- 1986년 2월 : 단국대학교 대학원 생물학과(이학석사)
- 1992년 2월 : 단국대학교 대학원 생물학과(이학박사)

• 1993년 3월 ~ 2004년 2월 : 동남보건대학교 임상병리학과 부교수

• 2004년 3월 ~ 현재 : 한서대학교 피부미용향장화학학과 교수

<관심분야> : 모발분석, 피부분석, 화장품 성분분석