

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4896827号
(P4896827)

(45) 発行日 平成24年3月14日(2012.3.14)

(24) 登録日 平成24年1月6日(2012.1.6)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 V
GO 1 N 33/48 (2006.01) GO 1 N 33/48 P

請求項の数 4 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2007-168356 (P2007-168356)	(73) 特許権者	000113470
(22) 出願日	平成19年6月27日 (2007.6.27)		ポーラ化成工業株式会社
(65) 公開番号	特開2009-8460 (P2009-8460A)		静岡県静岡市駿河区弥生町6番48号
(43) 公開日	平成21年1月15日 (2009.1.15)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成22年5月24日 (2010.5.24)		弁理士 川口 嘉之
		(74) 代理人	100090516
			弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100126505
			弁理士 佐貫 伸一
		(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司
		(74) 代理人	100137338
			弁理士 辻田 朋子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 角層のAGEsの鑑別方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫組織染色法を用いて角層中におけるAGEsを検出することを特徴とするAGEsの定量方法。

【請求項2】

免疫組織染色された角層の拡大イメージ画像を画像処理して定量化することを特徴とする、請求項1に記載のAGEsの定量方法。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の定量法を用いてAGEsを定量し、AGEsの存在割合が多いほど紫外線被爆による角層のダメージ度合いが大であると判断することを特徴とする、紫外線による角層のダメージ度合いの鑑別方法。

10

【請求項4】

請求項1もしくは2に記載の定量方法、又は請求項3に記載の鑑別方法を用い、経時的な角層の変化を時系列的に捉えていくことを特徴とする、角層の変化のモニタリング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、角層の鑑別方法に関する。さらに詳しくは、免疫組織染色法を用い終末糖化産物(AGEs: advanced glycation endproducts)を検出することを特徴とする、角層の鑑別方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

タンパク質糖化反応(メイラード反応)は、アミノ酸、ペプチド、タンパク質のアミノ基と、ケトンやアルデヒド(特に還元糖)との非酵素的反応であり、前期段階と後期段階の2つの反応に分けられる。後期段階の反応は不可逆反応であり、前期段階で生成されたアマドリ化合物が、さらに転移や縮合などの複雑な反応過程を経て、後期糖化反応生成物(A G E s)と呼ばれる安定な物質を形成する反応である。前記A G E sとしては、例えば、カルボキシメチルリジン、ペントシジン、ピラリン、クロスリン等が知られているが、生体内には構造が明らかにされていない未知のA G E sが多種存在していると考えられている。

10

【0003】

近年、前記メイラード反応の生成物は、医学領域で注目されており、様々な病気、疾患、老化との関連性が発表されている。中でも、公知のA G E sは、タンパク質の機能を低下させるのみならず、細胞障害や炎症反応を誘発する事が知られており、さらに、A G E sの形成によって、タンパク質が凝集、不溶化して組織中に異常蓄積し、これにより組織を変性させているとも考えられている。また、糖尿病患者におけるヘモグロビンA1C(前期反応のアマドリ化合物)の上昇、糖尿病性腎症や慢性腎不全の腎臓や、動脈硬化病変部におけるA G E sの蓄積は、生体内におけるタンパク質糖化反応の代表的な例として知られ、A G E sへの関心がさらに高まっていた。

【0004】

かようなA G E sの測定には、その褐色変化や蛍光特性を利用した吸光光度計や蛍光分光光度計による比色定量法、生体組織を加水分解してH P L CやG C / M Sによる分析等が知られている(例えば、特許文献1、特許文献2、特許文献3)。また、簡便且つ特殊な分析機器を必要としない等の理由により、免疫学的検出方法、具体的には、免疫組織学的方法、酵素免疫学的測定方法等が、医学分野における研究や臨床診断で広く使われており、このため、糖化タンパク質やA G E sに特異的に反応する抗体が各種作製され利用されている(例えば、特許文献4、特許文献5、特許文献6、非特許文献1)。

20

【0005】

このような状況下において、肌の美しさにとって重要である表皮、特に角層中におけるA G E sの存在やその意味については全く明らかでなかった。これは比色定量法、H P L CやG C / M S等においてはA G E sの組織中の局在性を測定するのに適さず、また、特異的抗体による生体組織中のA G E s測定においては、表皮より下層を対象としており、表皮や角層中におけるA G E sの存在の有無やその局在性について全く知られていなかった。即ち、角層中におけるA G E sの存在やその意味を明らかにできる非侵襲的且つ客観的に測定する手段が切望されていた。

30

【0006】

【特許文献1】特開2001-099838号公報

【特許文献2】特開2001-059843号公報

【特許文献3】特開平07-098317号公報

【特許文献4】特開2004-323515号公報

【特許文献5】特開2006-312621号公報

【特許文献6】特開2001-021559号公報

【非特許文献1】Takeuchi, M., et al, 2000, Mol Med, 6:114-125

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明はこのような状況下で為されたものであり、角層の鑑別方法に関する。さらに詳細には、免疫組織染色法を用いた、角層中における、A G E s (A G E s : advanced glycation endproducts)の非侵襲的且つ定量的方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

40

50

【0008】

このような状況を鑑みて、本発明者らは、鋭意研究努力を重ねた結果、免疫組織染色された角層の拡大イメージ画像を画像処理してAGEsを定量し、角層を鑑別できることを見出し、発明を完成させるに至った。即ち、本発明は以下に示す技術に関するものである。

【0009】

(1) 免疫組織染色法を用いて角層中におけるAGEsを検出することを特徴とするAGEsの定量方法。

(2) 免疫組織染色された角層の拡大イメージ画像を画像処理して定量化することを特徴とする、(1)に記載のAGEsの定量方法。

(3) (1)又は(2)に記載の定量法を用いてAGEsを定量し、AGEsの存在割合が多いほど紫外線被曝による角層のダメージ度合いが大であると判断することを特徴とする、紫外線による角層のダメージ度合いの鑑別方法。

(4) (1)もしくは(2)、又は(3)に記載の鑑別方法を用い、経時的な角層の変化を時系列的に捉えていくことを特徴とする、角層の変化のモニタリング方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明によって、角層中におけるAGEsを非侵襲的且つ定量的に測定する方法を提供することができ、角層のダメージ度合の判定や経時的な角層の変化をモニタリングに貢献できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明は、免疫組織染色された角層の拡大イメージ画像を画像処理してAGEsを定量化することを特徴とする。

【0012】

皮膚は、身体の表面を覆い、外界との境界機能を果たす器官であり、表皮、真皮及び皮下組織より構成されている。表皮はさらに、角層、顆粒層、有棘層及び基底層より構成されている。最外層の角層は、様々な外部からの刺激を直接受けながら皮膚の防御機能を担い、また人の目に触れるところでありため、角層は皮膚生理学的にも美容上でも極めて重要な役割を果たしている。かような角層においてAGEsが存するならば、公知のAGEs知見より、タンパク質の機能を低下や、さらに、タンパク質の凝集や不溶化による組織中での異常蓄積や組織変性の可能性が考えられ、AGEsの存在の有無やそれによる角層機能の変化を知ることが重要である。

【0013】

角層中のAGEsは次のようにして検出できる。皮膚より市販の粘着テープ等を利用してテープストリッピングにより角層採取を行い、溶剤で半日処理して粘着テープ部分を除去する。得られた角層に対して免疫組織染色を行い、染色された角層標本を顕微鏡下で観察する。前記溶剤としては、有機溶媒、特にキシレンが好ましく例示できる。免疫組織染色の条件として、一次抗体(anti AGE monoclonal antibody(mouse) TransGenic KH001)、ヒ`オチン化2次抗体(Biotin-Rabbit Anti Mouse IgG conjugate ZYMED 81-6740)、ABC試薬(R.T.U VECTASTAIN Elite ABC REAGENT BECTOR PK-7100)、AEC基質(ENVISION kit/HRP(AEC) Dako K3464)が例示できる。

【0014】

前記染色された角層標本において、赤～赤橙色に染色された部分がAGEsである。顕微鏡で20～50倍に観察されたこの染色されたAGEsである拡大イメージ画像をデジタル式のマイクروسコープ等を利用して、コンピュータに取り込み、汎用的画像解析のソフトウェアを用いて、手動又は自動処理を行い、AGEsを定量化できる。デジタル式のマイクروسコープとしては、例えば、(株)モリテックスのコスメティック用マイクروسコープ、汎用的画像解析のソフトウェアとしては、例えば、三谷商事(株)のWinROOF(登録商標)が例示できる。画像処理は、一般的な手法によって行えばよく、例えば、A

10

20

30

40

50

G E s の拡大イメージ画像であるカラー画像をモノクロ濃淡画像に変換後、該モノクロ画像に必要に応じてフィルター処理後二値化処理を行い、統計処理によって A G E s の存在割合に相関する染色部総面積を算出すればよい。

【 0 0 1 5 】

前述のようにして画像処理によって得られた染色部総面積は A G E s の存在割合を示す。また、後述する実施例の如く、染色部総面積が紫外線暴露部位（量）や年齢との間に正の相関関係を有することが分かる。これより A G E s の存在割合が紫外線暴露や加齢によって高くなることが分かる。紫外線暴露や加齢によって、バリアー機能やドライスキンの増加等、角層のダメージ度合いが高いことはよく知られており、これより、A G E s の存在割合が多いほど、角層のダメージ度合いが大であると判断することができる。

10

【 0 0 1 6 】

かような非侵襲的な A G E s の定量方法を用いて、経時的な角層の変化を時系列的に捉えていくモニタリング方法は汎用性が非常に高い。例えば、抗老化化粧品や紫外線防御化粧品等を使用することによる 1 週～数ヶ月の時系列モニタリングを行い、A G E s の存在割合の変化によりその効果を判断することが例示できる。

【 0 0 1 7 】

以下に実施例を挙げて、本発明について更に詳細に説明を加えるが、本発明がこれら実施例にのみ限定されないのは言うまでもない。

【 実施例 1 】

【 0 0 1 8 】

角層中における A G E s の存在を検討した。健康人男性（30 才）の上腕内側部及び前腕外側部の角層を市販の粘着テープを利用してテープストリッピングにより角層採取を行い、キシレンで半日処理して粘着テープ部分を除去する。得られた角層に対して免疫組織染色（条件は段落番号 0 0 1 3 参照）を行い、染色された角層標本を顕微鏡下で観察した。ポジコンとして、同角層を 2 5 0 m M グルコース溶液に浸漬させ、3 7 条件下で 1 週間放置したものを用いた。結果を図 1 に示す。

20

【 0 0 1 9 】

図 1 の染色された A G E s のイメージ画像（× 4 0 ）は、左側が男性の角層、右側にポジコン、上段に上腕内側部、下段に前腕外側部を示している。角層にポジコンと同様に赤～赤橙色の A G E s が観察されることから、角層に A G E s が存することが分かる。

30

【 実施例 2 】

【 0 0 2 0 】

実施例 1 と同様の手法を用い、健康人男性 2 0 人（2 0 代～5 0 代、各年代 5 名ずつ）を対象に、上腕内側部及び前腕外側部の角層中における A G E s の存在割合を検討した。即ち、（株）モリテックスのコスメティック用マイクロスコープを用いて、A G E s の拡大イメージ画像をコンピュータに取り込んだ後、三谷商事（株）の W i n R O O F（登録商標）を用いてモノクロ濃淡画像に変換し、フィルター処理及び二値化処理を行って、A G E s の存在割合である染色部総面積を算出した。結果を図 2 及び図 3 に示す。

【 0 0 2 1 】

図 2 は上腕内側部における加齢に伴う角層中の A G E s の存在割合を示す 1 例で、加齢と共に A G E s が微増の傾向を示す。図 3 は、3 0 代の 5 名の男性の中の 2 名（A 及び B）の上腕内側部及び前腕外側部の A G E s の存在割合を示し、屋外活動の多い A は前腕外側部の A G E s の存在割合が非常に高いことを示す。上腕内側部及び前腕外側部において、年齢との相関分析を行った結果、上腕内側部において正の相関関係を確認したが（ $r = 0.501$ 、 $P < 0.05$ ）、前腕外側部では有意な相関関係を示さなかった。

40

【 0 0 2 2 】

これより、非露出部位である上腕内側部では年齢と共にゆるやかに角層中の A G E s の存在割合が増加することが分かる。一方、紫外線露出部位である前腕外側部においては、個人差が非常に大きく、生活スタイル（屋外活動）等により紫外線暴露されている人では A G E s の存在割合が非常に高いレベルにあることが分かる。紫外線暴露や加齢によって

50

、バリアー機能やドライスキンの増加等、角層のダメージ度合いが高いことはよく知られており、これより、A G E s の存在割合が多いほど、角層のダメージ度合いが大であると判断することができる。

【実施例 3】

【0023】

健全女性 2 名 (3 0 代) の顔面左右頬部を対象に、下記の紫外線防御化粧品 A (朝夕 2 回塗布) の 1 ヶ月間使用の有無による A G E s の存在割合への影響を検討した。方法は実施例 2 と同様にして、使用前と 1 ヶ月後の染色部総面積の比 (%) を算出した。紫外線防御化粧品 A を使用した部位の場合 2 名の平均で 9 2 % に対し、使用しない部位では 1 0 2 % であった。これより、紫外線防御化粧品 A の使用によって A G E s 存在割合を抑制する効果があることが分かる。

10

【0024】

紫外線防御化粧品 A (W / O 型乳液) は、以下に示す処方に従って作成した。即ち、イ、口の成分を 8 0 に加熱攪拌し、イに八の成分を加え、ディスパーで分散させて一様な状態とし、これに徐々に口を加えて乳化し、攪拌冷却して紫外線防御化粧品 A を得た。

【0025】

イ

ショ糖モノステアリン酸エステル	0 . 3	質量 %	
ソルビタンモノラウリン酸エステル	0 . 4	質量 %	
ジメチコン (5 m P a s c a l ・ 秒)	3 0	質量 %	20
シクロメチコン	5	質量 %	
セチルイソオクタネート	5	質量 %	
ポリエーテル変性シリコーン	2	質量 %	

口

1 , 3 - ブタンジオール	1 0	質量 %	
水酸化カリウム	0 . 4	質量 %	
クエン酸ナトリウム	1	質量 %	
硫酸マグネシウム	0 . 4	質量 %	
エスクレチン	0 . 1	質量 %	
フェノキシエタノール	0 . 5	質量 %	30
グリチルリチン酸ジカリウム 1 % 水溶液	5	質量 %	
水	3 3 . 4	質量 %	

八

「ベントン - 3 8 V 」	1 . 5	質量 %	
黄色酸化鉄焼結二酸化チタン	0 . 6	質量 %	
ステアリン酸アルミニウム被覆微粒子二酸化チタン (平均粒径 0 . 8 μ m)	1 . 6	質量 %	
ハイドロジェンメチルポリシロキサン被覆酸化亜鉛 (平均粒径 0 . 7 μ m)	2	質量 %	
タルク	0 . 8	質量 %	40

【産業上の利用可能性】

【0026】

本発明によって、角層中における A G E s を非侵襲的且つ定量的に測定する方法を提供することができる。その結果、肌状態に適した化粧料の選択、角層のダメージ度合のアドバイスや経時的な角層のモニタリング等、多くの顧客に満足を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【0027】

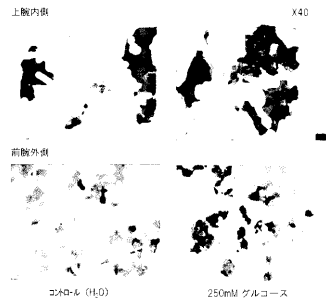
【図 1】角層中における A G E s の存在を示す図である。

【図 2】加齢に伴う角層中の A G E s の存在を示す図である。

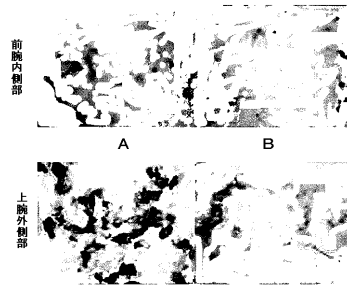
【図 3】露出と非露出部位による角層中の A G E s の存在を差異を示す図である。

50

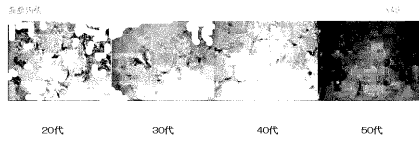
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(72)発明者 金丸 晶子

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560番地 ポーラ化成工業株式会社 戸塚研究所内

(72)発明者 多田 明弘

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560番地 ポーラ化成工業株式会社 戸塚研究所内

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特開2003-300961(JP,A)

特開2004-340935(JP,A)

特開2007-119373(JP,A)

特開2003-261432(JP,A)

特開2001-122758(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/53

专利名称(译)	一种区分角质层中AGEs的方法		
公开(公告)号	JP4896827B2	公开(公告)日	2012-03-14
申请号	JP2007168356	申请日	2007-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	宝丽化学工业有限公司		
申请(专利权)人(译)	波拉化工有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	波拉化工有限公司		
[标]发明人	金丸晶子 多田明弘		
发明人	金丸 晶子 多田 明弘		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/48.P G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/BB50 2G045/CB09 2G045/DA44 2G045/FA16 2G045/FA19 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB11 2G045/FB20 2G045/GC12 2G045/HA06 2G045/JA01		
代理人(译)	川口义行		
其他公开文献	JP2009008460A JP2009008460A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

亲切代码：在角质层中使用免疫组织化学染色方法的晚期糖基化终产物 (AGEs) 的侵入性和定量方法。 — AGEs通过免疫组织化学染色的角质层放大图像的图像处理来评估，并且随着AGEs的比例变大，角质层的损伤程度更大确定的。此外，通过捕获角质层中的时间序列变化来监测角质层的变化。 发明背景 无

