

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-63216

(P2018-63216A)

(43) 公開日 平成30年4月19日(2018.4.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	Q 2 GO 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2016-202590 (P2016-202590)
 (22) 出願日 平成28年10月14日 (2016.10.14)

(71) 出願人 593106918
 株式会社ファンケル
 神奈川県横浜市中区山下町89番地1
 (74) 代理人 100122954
 弁理士 長谷部 善太郎
 (74) 代理人 100162396
 弁理士 山田 泰之
 (74) 代理人 100194803
 弁理士 中村 理弘
 (74) 代理人 100202430
 弁理士 太田 千香子
 (72) 発明者 東ヶ▲崎▼ 健
 神奈川県横浜市戸塚区上品濃12番13号
 株式会社ファンケル 総合研究所内

最終頁に続く

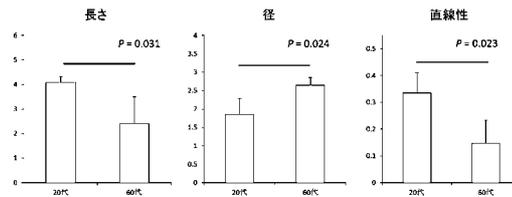
(54) 【発明の名称】 皮膚内部構造評価方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】皮膚内部の線維構造の状態を正確に把握し、皮膚内部構造を正しく評価すること。

【解決手段】皮膚組織透明化と免疫蛍光染色法を組み合わせることにより得られる皮膚内部構造の三次元画像を画像解析し、皮膚組織内のフィブリリン構造を数値化することを特徴とする皮膚内部構造評価方法。フィブリリン構造の長さ、径、直線性のいずれか1以上を数値化することを特徴とする皮膚内部構造評価方法。数値化された値を、皮膚線維の老化度の指標とすることを特徴とする皮膚内部構造評価方法。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

皮膚組織透明化と免疫蛍光染色法を組み合わせることにより得られる皮膚内部構造の三次元画像を画像解析し、皮膚組織内のフィブリリン構造を数値化することを特徴とする皮膚内部構造評価方法。

【請求項 2】

前記フィブリリン構造の長さ、径、直線性のいずれか 1 以上を数値化することを特徴とする請求項 1 に記載の皮膚内部構造評価方法。

【請求項 3】

前記数値化された値を、皮膚線維の老化度の指標とすることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の皮膚内部構造評価方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、皮膚内部構造の評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

皮膚内部の線維構造は、皮膚弾力性に大きく関わっている。皮膚内部の線維構造を評価する方法として、*in vivo* 共焦点レーザー顕微鏡で評価する方法、免疫染色した皮膚組織の切片を光学顕微鏡で評価する方法、電子顕微鏡で評価する方法が用いられている。しかし、これらの手法では、皮膚内部の線維構造を三次元的かつタンパク特異的に評価することは困難である。

20

【0003】

特許文献 1 には、組織を透明化し、蛍光標識し、蛍光顕微鏡などで観察する方法が記載されている。特許文献 1 には、皮膚、皮下組織を対象臓器とすることは記載されているが、観察した結果を解析・評価する手法については何ら開示されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】国際公開第 2014/115206 号

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、皮膚内部の線維構造の状態を正確に把握し、皮膚内部構造を正しく評価することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、蛍光標識し、透明化した皮膚組織により皮膚内部の線維構造を三次元的かつタンパク特異的に観察することができ、フィブリリン構造により皮膚内部構造を正確に評価できることを見出してなされたものである。

40

【0007】

本発明は、具体的には次の事項を要旨とする。

1. 皮膚組織透明化と免疫蛍光染色法を組み合わせることにより得られる皮膚内部構造の三次元画像を画像解析し、皮膚組織内のフィブリリン構造を数値化することを特徴とする皮膚内部構造評価方法。

2. 前記フィブリリン構造の長さ、径、直線性のいずれか 1 以上を数値化することを特徴とする 1. に記載の皮膚内部構造評価方法。

3. 前記数値化された値を、皮膚線維の老化度の指標とすることを特徴とする 1. または 2. に記載の皮膚内部構造評価方法。

50

【発明の効果】

【0008】

本発明の皮膚内部構造評価方法は、皮膚組織透明化と免疫蛍光染色法を組み合わせることにより、皮膚内部の線維構造を三次元的かつタンパク特異的に観察することができる。皮膚真皮内部の線維構造としては、膠原線維、弾性線維が知られ、膠原線維は、I型コラーゲンを主成分とし、弾性線維は、骨格線維としてのマイクロフィブリル、フィブリリン、均質物質としてエラスチンから構成され、さらに細胞外基質として、フィブロネクチンなどの糖タンパクやプロテオグリカンの主成分とする基質が存在する。これらの中で、フィブリリン構造を画像処理、数値化して得られる変数により、皮膚内部構造を正しく評価することができる。フィブリリン構造は、長さ、径、直線性について、年齢による差異が認められるため、フィブリリン構造を老化度、肌年齢の指標とすることができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】20代女性から採取した検体の皮膚内部構造の三次元画像。

【図2】60代女性から採取した検体の皮膚内部構造の三次元画像。

【図3】フィブリリン構造の解析結果。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、皮膚組織透明化と免疫蛍光染色法を組み合わせることにより得られる皮膚内部構造の三次元画像を画像解析し、皮膚組織内のフィブリリン構造を数値化し、この数値に基づいて皮膚内部構造を評価する方法に関する。

20

【0011】

皮膚組織は、表面から順に表皮、真皮、皮下組織により構成される。真皮は、柔軟性と弾性に富んだ組織であり、場所によって異なるが1~2mmの厚さを有する。真皮は、主に細胞と細胞外マトリックス(線維と基質)とから構成される。細胞外マトリックスの主成分は膠原線維であり、その他に弾性線維、フィブロネクチンなどの糖タンパクやプロテオグリカンを主成分とする基質等が含まれる。

【0012】

フィブリリンは、弾性繊維の骨格を形成するタンパク質であり、弾性繊維の構造を形成する。

30

本発明の皮膚内部構造評価方法は、フィブリリン構造を数値化して得られる変数により、皮膚内部構造を評価することを特徴とする。

【0013】

<タンパク特異的蛍光染色>

皮膚組織内部の線維構造を特異的に可視化する手法として、皮膚弾力性線維を構成するタンパク質であるフィブリリンを抗原特異的に結合する1次抗体および1次抗体と結合し蛍光ラベル化された2次抗体を用い、抗原抗体反応による免疫蛍光染色法を用いる。

【0014】

<皮膚組織の透明化>

通常、皮膚組織は、メラニンや血液中の赤色色素を代表とする色素や脂質による吸光や組織表面および内部での散乱が発生するため、光が深部まで透過せず、皮膚内部構造の三次元的蛍光画像を取得することは困難である。そこで、光を皮膚深部まで透過させるため、透明化試薬を用いて、これらの生体色素の脱色、脂質の除去、および屈折率の均一化を行うことにより光の透過性を向上させ、皮膚組織内部の線維構造の三次元画像を取得する。

40

【0015】

<蛍光染色された組織の評価方法>

皮膚内部の三次元画像について、画像解析ソフトウェアを用いて、2値化及び細線化処理を行い、フィブリリン構造の長さ、径、直線性を数値化し、得られた変数により皮膚内部構造を評価する。

50

【実施例】

【0016】

< 検体 >

20代女性3名(23、24、28歳)、60代女性3名(61、61、64歳)の腹部皮膚を採取し、検体とした。

検体のサイズは表皮面積がタテ約10mm、ヨコ約10mmで、厚さは約1mmである。

【0017】

< 真皮内の蛍光染色 >

エラスチン抗体、フィブリリン-1抗体を含む水溶液に検体を浸漬して、タンパク特異的に標識した後、Alexa488、594(Thermo Fisher Scientific社)を2次抗体として蛍光標識した。さらに各種細胞の位置を認識するため、蛍光プローブDAPI(Thermo Fisher Scientific社)を用いて、細胞核の染色を行った。

【0018】

< 皮膚組織の透明化 >

組織抗体染色した後、Rapidclear 1.49(SunJin Lab社)に検体を約30分間浸漬して組織透明化を行った。

【0019】

< 画像取得 >

線維構造を構成するタンパク質を蛍光染色し、皮膚組織の透明化した検体を超解像型共焦点レーザー顕微鏡LSM-700(ZEISS社製)で観察して、三次元画像を取得した。観察方向は皮膚側面を対物レンズに垂直となるよう設置し、組織側面から、深さ70μm深部まで撮像した。なお、撮像部位を統一するため、画像取得の範囲はタテ300μm、ヨコ300μmとし、表皮の上部に約20μmの空白の画像取得領域を設けた。すなわち、表皮から真皮方向に向けて約280μmの範囲が画像取得の範囲に含まれるようにした。

励起光は、405、488、594nmのレーザー光を用い、それぞれ425~475nm、500~530nm、605~645nmの蛍光を検出した。励起光405nm、検出光425~475nmで細胞核が検出できる。励起光488nm、検出光500~530nmでエラスチンが検出できる。励起光594nm、検出光605~645nmでフィブリリン-1が検出できる。励起光594nm、検出光605~645nmでフィブリリン-1を検出した23歳女性、64歳女性の皮膚内部構造の三次元画像を、それぞれ図1、2に示す。

【0020】

< 画像解析 >

得られた画像に対し、画像解析ソフトウェアImaris(ZEISS社製)を用いて2値化及び細線化処理を行い以下の解析変数を数値化した。

長さ

定義：1画像内における細線化した線維の長さの総和

径

定義：1画像内における線維の半径の平均値

直線性

定義：線維始点と線維末端との間の直線距離/細線化した線維の長さ

【0021】

< 解析結果 >

フィブリリン構造の長さ、径、直線性に年代差が認められた。結果を図3に示す。20代の皮膚組織のフィブリリン構造は、60代と比べて、長く、細く、直線性が高かった。一方、フィブリリン構造の分岐の角度、体積、表面積、数、分岐の数についても画像解析ソフトウェアを用いて数値化したところ、これらについては、年代差は認められなかった

10

20

30

40

50

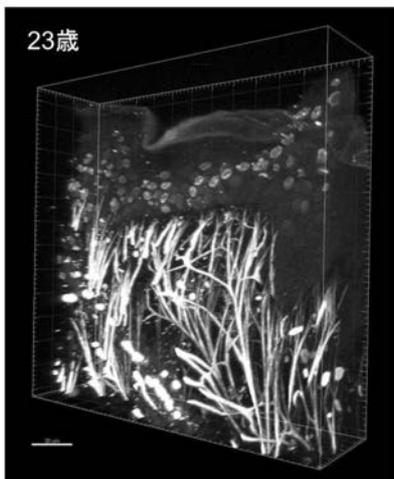
。

【 0 0 2 2 】

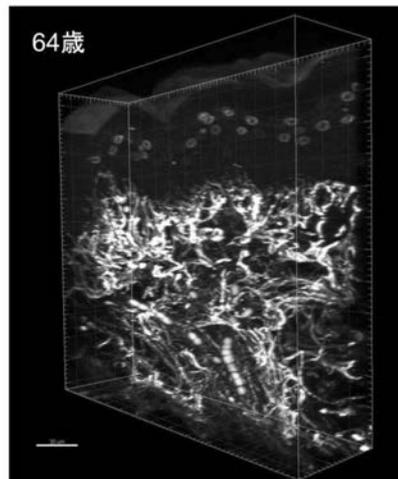
<まとめ>

フィブリリン構造の長さ、径、直線性は、年齢による差異が認められ、これらの値が皮膚内部構造の評価に有用であることが確かめられた。フィブリリン構造の長さ、径、直線性を数値化して得られた値は、肌年齢、老化度等の指標とすることができる。また、皮膚内部構造を正確に評価することにより、個人ごとに適したスキンケアを提供することができる。

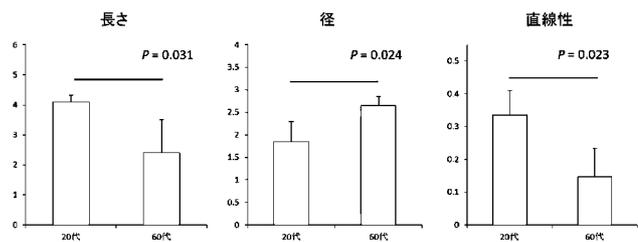
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(72)発明者 大石 奈帆子

神奈川県横浜市戸塚区上品濃 1 2 番 1 3 号 株式会社ファンケル 総合研究所内

Fターム(参考) 2G045 CB09 FA16 FB03 JA01

专利名称(译)	皮肤内部构造评估方法		
公开(公告)号	JP2018063216A	公开(公告)日	2018-04-19
申请号	JP2016202590	申请日	2016-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社芳珂		
申请(专利权)人(译)	有限公司FANCL		
[标]发明人	大石奈帆子		
发明人	東ヶ▲崎▼ 健 大石 奈帆子		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/50.Q G01N33/48.P G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/CB09 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/JA01		
代理人(译)	山田泰行 中村MakotoHiroshi 千贺子大田		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：准确地掌握皮肤内部纤维结构的状态并正确评估皮肤的内部结构。图像分析由结合皮肤组织的透明性和免疫荧光染色，皮肤内部结构的评价，其特征在于，原纤蛋白量化结构在皮肤组织中获得的皮肤内部结构的三维图像方法。一种评估皮肤内部结构的方法，其特征在于，纤维状结构的长度，直径和直线度中的一个或多个被数字化。数字化的值被用作皮肤纤维老化程度的指标。

