

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4203342号
(P4203342)

(45) 発行日 平成20年12月24日(2008.12.24)

(24) 登録日 平成20年10月17日(2008.10.17)

(51) Int.Cl.

A61B 5/107 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

F 1

A 6 1 B 5/10 300 Q
G O 1 N 33/50 Q

請求項の数 3 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2003-88091 (P2003-88091)
 (22) 出願日 平成15年3月27日 (2003.3.27)
 (65) 公開番号 特開2004-105700 (P2004-105700A)
 (43) 公開日 平成16年4月8日 (2004.4.8)
 審査請求日 平成17年12月26日 (2005.12.26)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-213593 (P2002-213593)
 (32) 優先日 平成14年7月23日 (2002.7.23)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000113470
 ポーラ化成工業株式会社
 静岡県静岡市駿河区弥生町6番48号
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口嘉之
 (74) 代理人 100090516
 弁理士 松倉秀実
 (74) 代理人 100089244
 弁理士 遠山勉
 (72) 発明者 横瀬暢夫
 神奈川県横浜市神奈川区高島台27番地1
 ポーラ化成工業株式会社 横浜研究所内
 (72) 発明者 平井義和
 神奈川県横浜市神奈川区高島台27番地1
 ポーラ化成工業株式会社 横浜研究所内
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】角層細胞の完成度の鑑別法及び角層細胞の完成度を指標とする皮膚状態の鑑別法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

皮膚から採取された角層細胞の面積と厚さを計測し、該面積の平方根を厚さで除して得られた偏平指数が大きいほど角層細胞の完成度が高いと鑑別することを特徴とする、角層細胞の完成度の鑑別法(医療行為を除く)。

【請求項2】

前記角層細胞の面積が、角層細胞の投影面積であることを特徴とする、請求項1に記載の角層細胞の完成度の鑑別法。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の角層細胞の完成度の鑑別法によって鑑別された角層細胞の完成度が高いほど、皮膚の状態が良いと鑑別することを特徴とする、皮膚の状態の鑑別法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、角層細胞の完成度の鑑別法及び該角層細胞の完成度を指標とする皮膚の状態の鑑別法に関する。

【0002】

角層細胞の面積が、皮膚の状態と密接に関連することは古くから知られており、これを利用して肌分析が行われている。この様な場合、角層細胞の採取は粘着テープなどで皮膚より採取し、これをスライドグラス上に固定した後、有機溶剤で粘着剤を溶解させ、染色

10

20

、観察する方法が採られている。この方法によれば、角層細胞はスライドグラス上に固定する際に個々の細胞に分かれ、正確に面積を計測することができる。しかしながら、この様な面積、正確には投影面積のみを指標にすると、例外的な事象が散見することが知られている。即ち、角層細胞の投影面積が充分大きいにも関わらず、T E W L（経皮的水分散逸量）が高く、皮膚の状態が悪い状態の人がある存在することである。これより、面積だけでは表されない肌状態の指標が存在することが想定される（例えば、特許文献1～3）。

【0003】

一方、角層細胞体積も肌状態と関連しているであろうことは既に指摘されている（例えば特許文献4）。即ち、アトピー性皮膚炎に代表される極めて肌状態の悪い人に於いては、角層細胞の投影面積以上に体積が増大する。しかしながら、角層細胞の厚さ、取り分け、角層細胞面積に対する相対的な厚さと皮膚の状態の関係は未だ知られていない。従って、角層細胞の厚さ、とりわけ、角層細胞に対する相対的な厚さより角層細胞の完成度を鑑別し、該完成度を指標に皮膚の状態を鑑別することは全く行われていない。

【0004】

【特許文献1】

特開2000-125854号公報

【特許文献2】

特開平11-309118号公報

【特許文献3】

特開平06-82443号公報

【特許文献4】

特開2001-108674号公報

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、この様な状況下為されたものであり、より的確に皮膚の状態を鑑別する手段を提供することを課題とする。

【0006】

【課題の解決手段】

本発明者らは、この様な状況に鑑みて、より的確に皮膚の状態を鑑別する手段を求め、鋭意研究努力を重ねた結果、角層細胞面積に対する相対的な厚さより角層細胞の完成度を鑑別し、該完成度を指標に皮膚の状態を鑑別することにより、より正確な皮膚の状態の鑑別が為しうることを見出し、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。

(1) 皮膚から採取された角層細胞の面積と厚さを計測し、該面積の平方根を厚さで除して得られた偏平指数が大きいほど角質細胞の完成度が高いと鑑別することを特徴とする、角層細胞の完成度の鑑別法（医療行為を除く）。

(2) 前記角層細胞の面積が、角層細胞の投影面積であることを特徴とする、(1)に記載の角層細胞の完成度の鑑別法。

(3) (1)又は(2)に記載の角層細胞の完成度の鑑別法によって鑑別された角質細胞の完成度が高いほど、皮膚の状態が良いと鑑別することを特徴とする、皮膚の状態の鑑別法。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の角層細胞の完成度の鑑別法は、皮膚から採取された角層細胞の面積と厚さを計測し、該面積の平方根を厚さで除して得られた偏平指数が大きいほど角層細胞の完成度が高いと鑑別することを特徴とする。即ち、角層細胞は真皮側より表皮側へターンオーバーしながら上がってくる細胞である。本発明者らは、そのターンオーバーの機能を調査するべく、その表皮側への上がってくる過程の角層細胞の形状の変化を追ったところ、角層を形成するようになってからも角層細胞は上がるに従って形状を偏平に変化させてゆくことを見出した。又、同時に多数の個体の角層細胞の形状を計測すると、角層細胞の体積は、

10

20

40

50

個体差が極めて大きいことがわかった。即ち、これまで、皮膚の状態の鑑別は、表皮に於ける角層細胞の面積、実際には投影面積の大きさを指標に、「充分に偏平になって投影面積が大きくなつた角層細胞を有する皮膚ほど良い状態である」と言う指標のもとに行って いた。しかしながら、基礎となる角層細胞の体積そのものに個体による大きな揺らぎが存在する以上、偏平な形状の代替値としての投影面積では、その直線回帰性は損なわれてしまう。直線回帰性を高め、より確実な皮膚状態の鑑別を行うためには、投影面積だけではなく厚さも関連づけた相対値を指標とすることが必要となる。かかる厚さは角層細胞を個々の細胞にほぐして、原子間力顕微鏡により観察することにより計測できる。ほぐれた角層細胞を得るためにには、次のような操作を行えばよい。

【0008】

10

1. 角層細胞採取のための用具

角層細胞採取の為の用具は、水溶性乃至は水親和性の固着剤を、支持体上に塗工したもの を用いる。本発明で言う、水溶性の固着剤とは水と混合し一様な溶状を呈するか、水分と 馴染んで膨潤する高分子化合物であつて、少量具体的には自重量の2倍程度の水分との混 合に於いては、粘着質のゲル状の性状を呈するものを総称する。この様な水溶性乃至は水 親和性の固着剤としては、酢酸ビニル、ビニルピロリドン、ビニルアルコール、ビニルエ テルなどの重合体乃至は共重合体が好ましく例示でき、これらは架橋構造を有していて も良い。中でも、架橋構造を有するポリ酢酸ビニル、ポリビニルピロリドン、ポリビニル アルコール、ポリビニルエーテル、ビニルピロリドン・酢酸ビニル共重合体、或いは、ヒ ドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリアクリル酸及び / 又はその塩並びにポリメタクリル酸及び / 又はその塩から選択されるものがより好ま しく例示できる。これらは唯一種でも用いることができるし、二種以上を組み合わせて用 いることもできる。特に好ましいものは、架橋構造を有するポリ酢酸ビニル、ポリビニル ピロリドン、ビニルピロリドン・酢酸ビニル共重合体などが特に好ましい。架橋構造を有 する共重合体では、水の親和性は存するものの、水溶性は示さず、水膨潤・軟化性を呈す る。又、支持体としては、形態維持性のあるものであれば特段の限定はなく使用でき、中 でも、形態維持性を有しつつも、適度の変形性を有する材料が好ましく例示できる。かかる 材料は、透明でも不透明でも構わないが、皮膚との密着性が観察できる点で、透明である ことが有利である。かかる支持体の好ましいものとしては、ポリエチレンテレフタレー ト(P E T)、ポリ塩化ビニル、ナイロン、アクリル樹脂などの板乃至はディスクが好ま しく例示できる。ディスクとは厚さ 0 . 1 ~ 1 mm の薄板を意味し、形態維持性と変形性とを有するので、本発明の支持体としては特に好ましい。支持体上に水溶性の固着剤を塗 工する方法であるが、これは常法に従つて行けば良く、例えば、水性担体で支持体を湿らせ、これに水溶性の固着剤の粉末を噴霧する方法、水溶性の固着剤の水溶液を噴霧乾燥さ せる方法或いは水溶性の固着剤の水溶液をドクターブレードなどで塗工し乾燥させる方法 、シリコーンなどで処理した剥離紙上に、前記高分子を延展し、これに支持体を貼付して 、高分子を支持体上に転写する方法等が好ましく例示できる。かかる塗工に際して、支持 体上を予め界面活性剤などで処理し、塗工厚をより均一化することもできる。この様な界 面活性剤としては、エーテル系の界面活性剤が好ましく、具体的にはトリトン X - 100 が好ましく例示できる。この様な形態は、細胞を採取後、水性担体中に分散させ回収する 際に、デスマゾームを介する接着を超音波などの処理をするだけで解除できるので、その 意味で好ましい。又、水膨潤性高分子の場合には、角層細胞をディスク上からガラス面へ と、採取時の状況を保存したままで転写出来るので好ましい。かかる塗工によって生じる 水溶性の固着剤の被膜の厚さは 0 . 1 ~ 10 ミルが好ましい。これは塗工膜の厚さが厚すぎると、塗工膜から細胞を回収する際の回収率が損なわれる場合があり、薄すぎると、皮膚から の細胞の採取効率が損なわれる場合があるからである。

【0009】

20

< 製造例 1 >

30

次に示す、手順に従つて、角層細胞採取用具を作成した。即ち、厚さ 0 . 2 mm の P E T のディスク (2 cm × 4 cm) 上に下記に示す粘性組成物を 20 ミルのドクターブレード

40

50

で塗工し、40°で乾燥させ、角層細胞採取用具1を得た。塗工厚は2.3ミルであった。

ビニルピロリドン・酢酸ビニル共重合体	10	重量部
ヒドロキシプロピルセルロース	5	重量部
ポリオキシエチレン(20)ベヘニルエーテル	1	重量部
水	85	重量部

【0010】

<製造例2>

シリコーンコーティングを施した剥離紙上に、水を含ませて膨潤させた架橋型ポリビニルアルコールのゲル塊を載せ、ポリテトラフルオロエチレンロールでロール掛けして延展し、乾燥させて剥離紙上に水膨潤高分子層を形成させた。これにPETの薄板を貼付して、高分子層をPET板上に転写させた。高分子層の厚さは50μmであった。

10

【0011】

2. 角層細胞の採取

上記の角層細胞の採取用具を用いて角層細胞を採取する。即ち、前記角層細胞採取用具の水溶性或いは水親和性の固着剤塗工面を、所望により、湿潤用の水性担体で湿らせ、膨潤させた後、角層細胞の採取部に貼付し、所望により、乾燥固化させ、剥離し、固着剤を分散用の水性担体で溶解させ、固着剤に固着された角層細胞を水性担体中に分散手段により分散させ、水性担体に分散された角層細胞の投影面積と体積、厚さを測定し、該投影面積の平方根を厚さで除した値を、偏平指数として、指標とすることを特徴とする。投影面積の平方根は、投影面積相当の平面を正方形に展開した場合の一辺の長さを表すもので、この値を用いると、単位が相殺されるので、角層細胞の厚さを指数化することが出来る。ここで、湿潤用の水性担体としては、固着剤を湿潤化でき、粘着性を付与できるものであれば特段の限定はされず、例えば、水、エタノール水溶液等が例示でき、これらの水性担体は等張に調整されていても良いし、pHを調整されていても良いが、手軽さから言えば水が特に好ましい。かかる水性担体の適用量は、被覆されている固着剤に対して、0.5～2重量倍量が好ましい。かくして固着剤が湿潤、粘性ゲル化した本発明の角層細胞採取用具は、角層細胞採取部位、例えば、露出部位であれば頬部、非露出部位であれば上腕内側部等の部位に、固着剤が乾燥固化するまで密着、貼付し、しかる後に剥離する。この剥離時に角層細胞が固着剤に固着した形態で採取できる。かくして採取した角層細胞は、分散用の水性担体に分散する。分散に際しては、角層細胞同士のデスマゾームを介しての接着を解除する必要がある。この様な解除手段としては、界面活性剤を用いる方法とプロテアーゼによる処理が挙げられる。界面活性剤としては、エーテル型の界面活性剤が好ましく、トリトンX-100が特に好ましく例示できる。かかる界面活性剤の好ましい処理濃度は0.05～0.5重量%である。又、プロテアーゼとしては、キモトリプシン、トリプシン、カテプシンD等が好ましく例示でき、処理濃度としては0.01～0.25重量%が好ましく例示できる。かかる分散手段は、前記の界面活性剤或いはプロテアーゼを分散用の水性担体に含有させ、物理的攪拌手段で攪拌することにより実現できる。攪拌に際しては、超音波による処理を行うことが好ましい。超音波処理の処理時間は3～8分が好ましい。超音波の処理時間が短すぎると、細胞が個々の細胞にほぐれない場合があり、長すぎると発生した熱エネルギーにより、角層細胞が変性する場合があるからである。又、分散用の水性担体としては、前記界面活性剤やプロテアーゼ以外に、塩化ナトリウムなどの等張剤や緩衝塩等の緩衝剤を含有することができる。好ましい形態は、界面活性剤乃至はプロテアーゼを含有するリン酸緩衝生理食塩水である。pHとしては6.5～7.5が好ましい。一方、水膨潤性の架橋型高分子を固着剤に使用した場合には、ガラス板などの試料保持体にディスクを貼付し、水などの水性担体中に1～48時間浸漬し、しかる後に、ディスクをゆっくり剥離することにより、試料保持体上に、角層細胞が皮膚上に存在する形態のまま転写することが出来る。この時の角層細胞同士の結合状況も皮膚生理学的特性を知る上で重要な情報となる。

20

【0012】

30

40

50

かくして得られた角層細胞を原子間力顕微鏡で観察し、形状を計測し、これより得られた面積、正確には投影面積の平方根を厚さで除した相対的な薄さ、言い換えれば、偏平指数を指標として、皮膚状態を鑑別することを本発明は特徴とする。これは、角層細胞がどれだけ偏平になっているかの方が、実際の厚さよりも完成度を反映した値だからである。この偏平指数が大きいほど、角層細胞は偏平になっており、完成度が高いと鑑別される。完成度の高い角層細胞が表皮に存在すれば、皮膚バリア機能も充分に有することになる。又、完成度の高い角層細胞が表皮から脱落すると、表皮には完成度の低い偏平度の少ない角層細胞が存在するため、皮膚バリア機能は低下し、経皮的水分散逸などの程度が高くなり、肌状態は悪くなる。角層細胞の標準的な正常値は、投影面積は $600 \sim 1000 \mu\text{m}^2$ 程度、角層細胞体積は $200 \sim 300 \mu\text{m}^3$ 程度、角層細胞の厚みは $0.1 \sim 0.3 \mu\text{m}$ 程度、角層細胞の偏平指数は $5000 \sim 12000$ 程度である。この値を指標とし、角層細胞の偏平指数を鑑別し、偏平指数が大きいほど皮膚の状態は良く、偏平指数が小さいほど皮膚の状態は悪いと鑑別するのが、本発明の皮膚の状態の鑑別法である。

【0013】

【実施例】

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、本発明がかかる実施例にのみ限定を受けないことは言うまでもない。

【0014】

<実施例1>

1~81歳の12名のパネラーの上腕内側部及び頸部より、製造例1の角層細胞採取用具を用い角層細胞を採取し、トリプシン0.1%含有リン酸緩衝生理食塩水(pH7)を分散用の水性担体とし、37℃2時間のインキュベーション条件でインキュベーションした後、超音波を5分間かけて処理し、これを $6000 \times g$ の遠心分離で処理し角層細胞を集めた。この角層細胞の形状を原子間力顕微鏡で観察、計測した。図1に平均厚み、図2に投影面積、図3に体積、図4に偏平指数を示す。尚、図4の縦軸の単位は $\times 1000$ である。これより、体積は個人によりその数値が大きく異なること、投影面積には年齢を反映する傾向があることがわかる。即ち、体積に個人差が大きいことから、角層細胞の鑑別値として投影面積を使用することは、バラツキを生む結果になることが推定される。従って、投影面積を指標に皮膚の状態を鑑別することには限度があることがわかる。又、本発明の皮膚の状態の鑑別法が従来法に比べてより正確に皮膚状態を鑑別できることもわかる。

【0015】

<実施例2>

55歳のパネラーの上腕内側部を、上記製造例1の角層細胞採取用具を用いて、繰り返し角層細胞採取を行い、表皮からの深度と角層細胞の形状との関係を調べた。図5に平均厚み、図6に投影面積、図7に表面積、図8に体積、図9に偏平指数を示す。偏平指数の縦軸の単位は $\times 1000$ である。採取回数が増え、深部の完成度の低い細胞になるに従って、厚みが相関的に増え、偏平指数が相関的に減少していることがわかる。厚みよりも偏平指数の方が、角層細胞の完成度と良く相関していることもわかる。投影面積、体積、表面積については、これらの値ほどの相関は見られない。

【0016】

<実施例3>

実施例1、2と同様に上記製造例2のディスクを用いて、同様に角層細胞を採取した。その状況を原子間力顕微鏡で観察した結果を、図10に示す。これより、この像より角層細胞の投影面積と厚みが実施例1、2と同様に測定でき、且つ、各細胞の結合状況も把握できることがわかる。

【0017】

【発明の効果】

本発明によれば、より的確に皮膚の状態を鑑別することができる。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

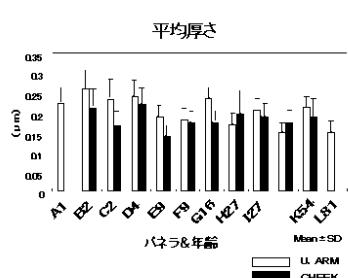
40

50

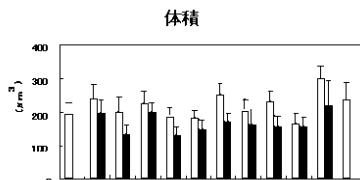
- 【図1】 実施例1の平均厚みを示す図である。
- 【図2】 実施例1の投影面積を示す図である。
- 【図3】 実施例1の体積を示す図である。
- 【図4】 実施例1の偏平指數を表す図である。
- 【図5】 実施例2の平均厚みを表す図である。
- 【図6】 実施例2の投影面積を表す図である。
- 【図7】 実施例2の表面積を表す図である。
- 【図8】 実施例2の体積を表す図である。
- 【図9】 実施例2の偏平指數を表す図である。
- 【図10】 実施例3の原子間顕微鏡の写真を示す図である。（図面代用写真）

10

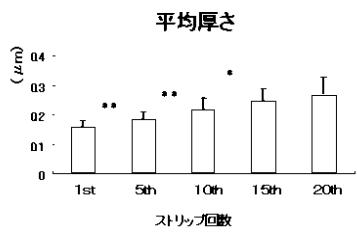
【図1】



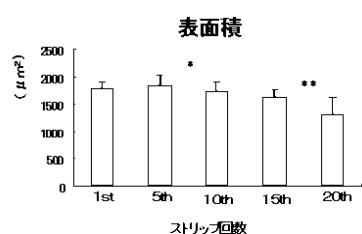
【図3】



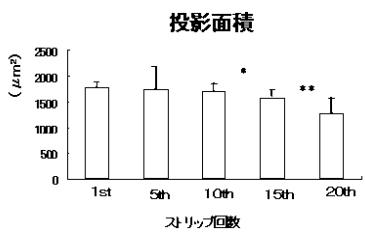
【図5】



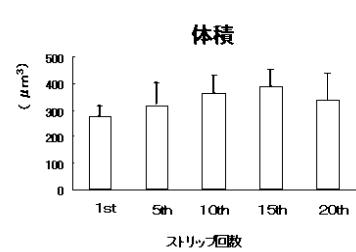
【図7】



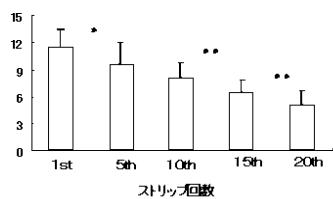
【図6】



【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

審査官 五閑 統一郎

(56)参考文献 特開2001-108674(JP,A)

特開平09-308619(JP,A)

特開平10-314268(JP,A)

特開2001-116745(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61B 5/10

G01N 33/48