

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4261296号
(P4261296)

(45) 発行日 平成21年4月30日(2009.4.30)

(24) 登録日 平成21年2月20日(2009.2.20)

(51) Int.Cl.		F I	
G O 1 N 21/35 (2006.01)		G O 1 N	21/35 Z
A 6 1 B 5/00 (2006.01)		A 6 1 B	5/00 M
A 6 1 B 5/107 (2006.01)		A 6 1 B	5/10 3 0 0 Q

請求項の数 5 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2003-316506 (P2003-316506)	(73) 特許権者	000113470
(22) 出願日	平成15年9月9日(2003.9.9)		ポーラ化成工業株式会社
(65) 公開番号	特開2005-83901 (P2005-83901A)		静岡県静岡市駿河区弥生町6番48号
(43) 公開日	平成17年3月31日(2005.3.31)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成18年5月30日(2006.5.30)		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	官前 裕太
			神奈川県横浜市戸塚区560番地 ポーラ
			化成工業株式会社 戸塚研究所内
		(72) 発明者	山川 弓香
			神奈川県横浜市戸塚区560番地 ポーラ
			化成工業株式会社 戸塚研究所内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲンの非侵襲的定量法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

皮膚真皮のコラーゲンの存在量を定量するための回帰式を得る方法であって、
人以外の動物の皮膚を脱脂処理した後、制御された量のコラーゲンを添加し、ホモジナイズすることにより作製されたコラーゲンの存在量の明らかな標準検体について、 5000 ~ 7000 cm^{-1} の波長領域の近赤外吸収スペクトルを計測し、
 計測した近赤外吸収スペクトルデータを、PLS分析又は主成分分析により解析し、
 コラーゲンの存在量と関係する因子を決定することを特徴とする、方法。

【請求項2】

前記近赤外吸収スペクトルが、フーリエ変換近赤外吸収スペクトルであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。 10

【請求項3】

前記近赤外吸収スペクトルデータを、SNV処理、二次微分、及び平均化処理することを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

被験動物の皮膚真皮のコラーゲンの存在量を定量する方法であって、
 請求項1 ~ 3の何れか一項に記載の方法により得られた回帰式に、
 被験動物の皮膚真皮の5000 ~ 7000 cm^{-1} の波長領域の近赤外吸収スペクトルデータを代入することを特徴とする、方法。

【請求項5】

被験動物が人であることを特徴とする、請求項4に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、コラーゲンの存在量の定量法に関し、更に詳細には、動物の皮膚の真皮コラーゲンの存在量の定量法に関する。

【背景技術】

【0002】

コラーゲンは、広く食品、飲料、化粧品などの皮膚外用剤に使用される原料であり、その定量は、コラーゲンがアミノ酸の連なった、天然の水溶性高分子と言う特質と、構成するアミノ酸組成などに様々なバリエーションが存する現状から、侵襲的な方法であっても、非常に困難であることが知られている。その一方、皮下に於ける真皮コラーゲン量は、加齢、光老化などにより大きく変わることが知られており、しわの発生可能性も真皮コラーゲン量を的確に測定できれば、かなり早期に検知することが可能であると推測されている。この様な老化モニタリングや、老化の予防措置実施の為にも、皮膚の真皮コラーゲンを測定することは意義深いことであり、該測定には、非侵襲的な方法が望まれている。生体関連のコラーゲンの測定技術としては、例えば、体液中のテロペプチドを定量して、生体組織でのコラーゲンの分解量を鑑別する方法（例えば、特許文献1、特許文献2を参照）、皮膚に近赤外線を照射し、それによって励起させて、コラーゲンを発光させ、その度合いより皮膚癌を鑑別する方法（例えば、特許文献3を参照）、皮膚に近赤外線を照射し、それによって皮膚温を上昇させ、その上昇の程度より、真皮コラーゲン量を定量する方法（例えば、特許文献4を参照）、600～800nmの光と、800～1000nmの2波長の光を照射し、その反射光の比より、真皮コラーゲン量を測定する方法（例えば、特許文献5を参照）などが既に知られているが、コラーゲンの存在状態と近似の環境下において、コラーゲンの存在量の明らかな標準検体を作成し、該標準サンプルの近赤外吸収スペクトルを計測し、計測した近赤外吸収スペクトルデータを統計的に解析し、回帰式を得、該回帰式を用い、コラーゲンの存在量を定量すべき検体より計測されて得た近赤外吸収スペクトルデータから算出する、真皮コラーゲンの存在量の定量法は未だ知られていないし、この様な測定法により、皮膚真皮コラーゲン量を、非侵襲的に、正確に測定できることも全く知られていない。

【0003】

【特許文献1】特開2000-55915号公報

【特許文献2】特開平10-260183号公報

【特許文献3】特表2001-501727号公報

【特許文献4】特表平11-503036号公報

【特許文献5】特表2003-501651号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、この様な状況下為されたものであり、非侵襲的なコラーゲンの存在量の定量法に関し、更に詳細には、しわの進度予測などに有用な皮膚真皮コラーゲンの存在量の定量に好適な、非侵襲的なコラーゲンの存在量の定量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】

【0005】

この様な状況に鑑みて、本発明者らは、非侵襲的なコラーゲンの存在量の定量法を求めて、鋭意研究努力を重ねた結果、人以外の動物の皮膚を脱脂処理した後、制御された量のコラーゲンを添加し、ホモジナイズすることにより作製されたコラーゲンの存在量の明らかな標準検体について、5000～7000 cm^{-1} の波長領域の近赤外吸収スペクトルを計測し、

計測した近赤外吸収スペクトルデータを、PLS分析又は主成分分析により解析し、

10

20

30

40

50

コラーゲンの存在量と関係する因子を決定することにより得られた回帰式に、

被験動物の皮膚真皮の $5000 \sim 7000 \text{ cm}^{-1}$ の波長領域の近赤外吸収スペクトルの測定値を代入する方法により、被験動物の皮膚真皮のコラーゲンの存在量が非侵襲的に定量出来ることを見出し、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) 皮膚真皮のコラーゲンの存在量を定量するための回帰式を得る方法であって、人以外の動物の皮膚を脱脂処理した後、制御された量のコラーゲンを添加し、ホモジナイズすることにより作製されたコラーゲンの存在量の明らかな標準検体について、 $5000 \sim 7000 \text{ cm}^{-1}$ の波長領域の近赤外吸収スペクトルを計測し、計測した近赤外吸収スペクトルデータを、PLS分析又は主成分分析により解析し、コラーゲンの存在量と関係する因子を決定することを特徴とする、方法。

10

(2) 前記近赤外吸収スペクトルが、フーリエ変換近赤外吸収スペクトルであることを特徴とする、(1)に記載の方法。

(3) 前記近赤外吸収スペクトルデータを、SNV処理、二次微分、及び平均化処理することを特徴とする、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 被験動物の皮膚真皮のコラーゲンの存在量を定量する方法であって、(1)～(3)の何れかに記載の方法により得られた回帰式に、被験動物の皮膚真皮の $5000 \sim 7000 \text{ cm}^{-1}$ の波長領域の近赤外吸収スペクトルデータを代入することを特徴とする、方法。

(5) 被験動物が人であることを特徴とする、(4)に記載の方法。

20

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、非侵襲的なコラーゲンの存在量の定量法を提供することが出来る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明のコラーゲンの存在量の定量法は、コラーゲンの存在量を定量する方法であって、コラーゲンの存在状態と近似の環境下において、コラーゲンの存在量の明らかな標準検体を作成し、該標準サンプルの近赤外吸収スペクトルを計測し、計測した近赤外吸収スペクトルデータを統計的に解析し、回帰式を得、該回帰式を用い、コラーゲンの存在量を定量すべき検体より計測されて得た近赤外吸収スペクトルデータから算出することを特徴する。かかる方法で定量される対象となるコラーゲンとしては、コラーゲンが一様に存在している対象であれば特段の限定はされず、例えば、皮膚など生体に存在するコラーゲン、飲料、錠剤、化粧品など人工的に製造されたコラーゲン含有組成物等が好ましく例示できる。特に好ましいものは、非侵襲的にコラーゲンを測定する必要の高い対象であり、生体に於ける皮膚のコラーゲンなどが特に好ましく例示できる。

30

【0008】

本発明の定量法に於ける、標準検体としては、測定試料と類似の環境にあるコラーゲンであって、その存在量が明確なものをを用いることが好ましい。また、かかるコラーゲンの存在量の明確な標準検体としては、コラーゲンの存在量の異なる数種類のものを用意することが好ましい。これは、コラーゲンの存在量と、近赤外吸収スペクトルの吸収ピークの強度の回帰を向上させるためである。かかる標準検体の数としては、10以上が好ましく、20以上が特に好ましい。また、再現性を見る意味で、ほぼ同一の存在量に調整した標準検体を複数用意することも好ましい。例えば、皮膚など生体に存在するコラーゲンであれば、同一乃至は別種の動物の皮膚などをエーテル等を用いて脱脂した後、濃度の異なる数種のコラーゲンなどを添加し、ホモジナイズすることで良く拡散させ、しかる後に、近赤外吸収スペクトルを計測し、コラーゲン濃度と吸収率より、回帰式を求める様な方法が例示でき、飲料、錠剤、化粧品など人工的に製造されたコラーゲン含有組成物の場合には、同様にコラーゲン含有量の異なる組成物を作成し、これの近赤外吸収スペクトルを計測し、回帰式を求めるような方法が好ましく例示できる

40

【0009】

50

この様な測定に使用される近赤外吸収スペクトルの波長領域としては、 $4000 \sim 10000 \text{ cm}^{-1}$ が好ましく例示でき、更に好ましくは $5000 \sim 7000 \text{ cm}^{-1}$ である。これは、この波長域に、コラーゲンの特異吸収が多く存するからである。又、近赤外吸収スペクトルとしては、ダイオードアレーでも、フーリエ変換吸収スペクトルでも構わないが、好ましいものはフーリエ変換吸収スペクトルである。これは、より精度高く回帰式が求められるからである。測定された近赤外吸収スペクトルは、好ましくはフーリエ変換された後、前記コラーゲン含有量とともに統計化学的分析にかけられ、その因果関係を数量化される。この数量関係と測定すべき検体のスペクトルとの対比より、測定すべき検体中のコラーゲンの存在量が算出される。

【0010】

前記多変量解析と別称されている統計化学的分析とは、分光データなどの化学的な特性と物性などの特性値との関係を計量学的な処理によって関係づけ、解析する手法であり、重回帰分析或いは主成分分析などが知られている。この内、重回帰分析としてはPLS分析が好適に例示できる。このPLS分析であるが、この分析法は特定の試料に於ける波長などの連続的な因子の変化に対して、吸光度などの変数の出現する分光スペクトルパターンと当該試料のある示性値との関係を分析する場合において、各示性値と因子ごとの変数の変化を分析する手技として確立されているものである。又、主成分分析は、同様な分析において、変動に寄与する第一主成分を分析し、しかる後この第一主成分軸に対して直交する第二主成分軸を分析し、この2つの主成分軸がつくる座標におけるパターン変化で物性を比較、推定する方法である。この様なPLS分析或いは主成分分析と言った、多変量解析は、市販されているソフトウェアを使用して行うことができる。この様な多変量解析用のソフトウェアとしては、例えば、GLサイエンス社より販売されている、ピロエット(PIROUETT)、サイバネットシステム社より販売されている、マツラボ(MATLAB)横川電気株式会社より販売されている、アンスクランブラーII(Unscrambler II)、セパノヴァ(SEPANOVA)社より販売されているシムカ(SIMCA)等のソフトウェアが例示できる。又、これらに加えてシムカ(SIMCA)と言われるアルゴリズムを加えることができる。かかるアルゴリズムは前記ソフトウェア中に組み込まれている場合が多く、主成分分析の表示に有用である。これらのソフトウェアを利用して、近赤外吸収スペクトルを解析し、その結果を本発明の定量法で用いる場合、大凡の処理ステップは次に示す手順による。この時、使用するフーリエ変換近赤外吸収スペクトルは測定して得られた原スペクトルでも良いし、前記原スペクトルをデータ加工したもので良い。データ加工の方法としては、例えば、一次微分値、二次微分値、三次微分値などの多次微分値や平滑化(Smoothing)、ノーマライズ(Normalize)、MSC(Multiplicative Scatter Correction)、SNV(Standard Normal Variate)、平均化(Mean-Center)、オートスケール(Autoscale)などが好ましく例示できる。

【0011】

PLS分析の場合

(1) 皮膚や製剤などの標準検体の分散型或いはダイオードアレイタイプの近赤外吸収スペクトル或いはそれらのフーリエ変換スペクトルやフーリエ変換スペクトルを所望により、二次微分等データ加工を行い、波長と近赤外吸収スペクトル乃至はその加工データとの行列を作成する。

(2) 前記行列と標準検体に含有されるコラーゲン量との行列を作成し、コラーゲンの存在量の動きに対して、動きの大きい近赤外吸収スペクトル乃至はその加工データを抽出し、その波長を特定する。

(3) 抽出した近赤外吸収スペクトル乃至はその加工データと示性値より検量線を作成する。同時に、コラーゲンの存在量ごとに検量線上へのプロットを作成しておく。

(4) 試験試料のフーリエ変換近赤外吸収スペクトルを測定し、所望により二次微分等のデータ加工する。

(5) (4)のデータより(2)で特定された波長のデータを抽出する。

(6) (5)で抽出されたデータを検量線上への写像を作成する。或いは、データを検量

10

20

30

40

50

線上へプロットする。

(7)(3)の示性値ごとのプロットと(5)の写像乃至はプロットとを比較し、測定試料のコラーゲン存在量を推測する。

尚、(2)以下の作業はコンピューターソフトウェアを利用することにより行うことができる。

【0012】

主成分分析の場合

(1)皮膚の分散型或いはダイオードアレイタイプの近赤外吸収スペクトル或いはそれらのフーリエ変換スペクトルやフーリエ変換スペクトルを所望により、二次微分等データ加工を行い、波長と近赤外吸収スペクトル乃至はその加工データとの行列を作成する。

10

(2)前記行列について主成分分析を行い、第一主成分軸を作成する。

(3)第一主成分と直交する第二主成分軸を作成する。

(4)第一主成分軸と第二主成分軸が作る平面上に(1)のスペクトルの第一主成分と第二主成分が作る点をプロットする。

(5)所望によりシムカなどのアルゴリズムを用いてグルーピングを行う。

(6)(1)と同様に試験試料の近赤外スペクトルを測定し、(4)と同様のプロットを行う。

(7)(4)のプロット乃至は(5)のグルーピングを指標に試験試料の鑑別を行う。

【実施例】

【0013】

20

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されないことは言うまでもない。

【0014】

<実施例1>

ヘアレスマウス皮膚を用いて、皮膚由来成分が共存する条件下においてコラーゲンの定量実験をin vitroにて行った。即ち、ホモジナイズしたヘアレスマウス皮膚にエーテルを加え脱脂し、これにコラーゲンの濃度を段階的に添加し、再度ホモジナイズした。これを凍結乾燥させ円柱状に成型した後、フーリエ変換型近赤外吸収スペクトルを計測した。コラーゲン添加濃度としては、0(無添加)、0.20、0.44、0.63wt%の4点を用いた。得られた吸収スペクトルを、SNV(Standard Normal Variate)、二次微分、平均化(Mean-Center)処理し、そのスペクトルとコラーゲン添加濃度をピロエットのPLS分析にかけ、PLSモデルを求めた。結果を表1に示す。これより、主因子数は2個の相関係数は0.967であり、SEVは0.062であり、処理した近赤外吸収スペクトルとコラーゲン添加濃度との間に良好な相関性があることがわかる。近赤外吸収スペクトルのフーリエ変換後のスペクトルを図1に、グラフ上に回帰状況を図示したものを図2に示す。これより、かかるPLSモデルを用いることにより、皮膚由来成分に妨害を受けることなく皮膚内のコラーゲンの存在量を定量出来ることが判る。

30

【0015】

【表1】

表1 PLSモデル結果表

	Variance	Percent	Cumulative	SEV	Press Val	r Val	SEC	Press Cal	r Cal
Factor1	0.000	37.955	37.955	0.116	0.430	0.874	0.107	0.343	0.901
Factor2	0.000	13.058	51.013	0.062	0.122	0.967	0.046	0.063	0.963
Factor3	0.000	3.483	54.496	0.063	0.128	0.964	0.033	0.030	0.992
Factor4	0.000	4.297	58.794	0.066	0.139	0.961	0.025	0.016	0.995
Factor5	0.000	3.172	61.965	0.066	0.140	0.961	0.017	0.008	0.998

40

【0016】

<実施例2>

実施例1で示した実験と同様に、ホモジナイズしたヘアレスマウス皮膚にエーテルを加え脱脂し、これにコラーゲンの濃度を既知量添加し、再度ホモジナイズした。これを凍結乾燥させ円柱状に成型した後、フーリエ変換型近赤外吸収スペクトルを計測した。得られた吸収スペクトルを、SNV(Standard Normal Variate)、二次微分、平均化(Mean-Center)処理し、そのスペクトルを実施例1で求めたPLSモデルに代入しコラーゲン予測値

50

を求めた。得られた予測値と実際に添加したコラーゲン値との相関性は、相関係数が0.989, SEPが0.451であり、回帰式 $y = 0.341x + 0.122$ で表されることがわかった。これより、実施例1で作製したPLSモデルは、皮膚由来成分に妨害を受けることなく皮膚内のコラーゲンの存在量を定量出来ることが判明した。

【0017】

<実施例3>

人のボランティアを用いて、顔の各部位の近赤外吸収スペクトルを計測し、これを実施例1のPLSモデルに代入して皮下のコラーゲンの存在量を定量した。この値は、シワの多い部位ではコラーゲンの存在量が少なく、シワの少ない部位では存在量が多く、妥当な測定結果であった。

【0018】

【表2】

表2 ボランティアでの定量結果

	SEV		var104002
Factor1	0.023859	口の周り(しわ部分)	0.25347wt%
Factor2	0.013223	ほほ部(しわの無い部分)	0.267722wt%

【産業上の利用可能性】

【0019】

本発明は、生体などの皮下に存在するコラーゲン量を非侵襲的に定量する方法に応用できる。

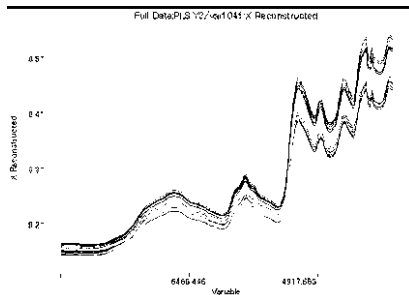
【図面の簡単な説明】

【0020】

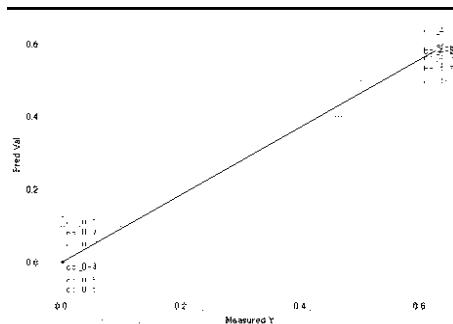
【図1】実施例1のフーリエ変換後のスペクトルを表す図である。

【図2】実施例1のPLS分析の結果を示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 土屋 順子

神奈川県横浜市戸塚区560番地 ポーラ化成工業株式会社 戸塚研究所内

(72)発明者 岸 真理絵

神奈川県横浜市戸塚区560番地 ポーラ化成工業株式会社 戸塚研究所内

審査官 遠藤 孝徳

(56)参考文献 特開平07-039551(JP,A)

Berg, H et al., Rapid method: Evaluation of rapid moisture, fat, protein and hydroxyproline determination in beef and pork using the infratec food and feed analyzer, Fleischwirtschaft (Germany, F.R.), 1991年, vol. 71(7), 787-789

D. J. Leffell et al., In vivo fluorescence of human skin. A potential marker of photoaging, Archives of Dermatology, 1988年10月, Vol. 124, No. 10, 1514-1518

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/00; 21/01; 21/17-21/61

A61B 5/00-5/22

JSTPlus(JDreamII)