



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I580964 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：101105615

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 21 日

(51)Int. Cl. : G01N33/50 (2006.01)

(30)優先權：2011/02/25 日本

2011-040355

2012/01/24 日本

2012-012033

(71)申請人：芳珂股份有限公司 (日本) FANCL CORPORATION (JP)

日本

(72)發明人：石渡潮路 ISHIWATARI, SHIOJI (JP)；大石奈帆子 OISHI, NAOKO (JP)；安田知永 YASUDA, CHIE (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

JP 4469762B2

JEANMAIRE C, "What is the Most Suitable Strategy for Stress Proteins in Cosmetics?", 網路文獻: <http://www.skin-care-forum.basf.com/en/articles/skin/p/what-is-the-most-suitable-strategy-for-stress-proteins-in-cosmetics-/2004/04/13?id=c08eec7d-ec73-49a8-8d4e-2532ed55677c&mode=Detail>, 2004/04

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：3 項 圖式數：7 共 31 頁

(54)名稱

皮膚的壓力蓄積度的評價方法

METHOD FOR EVALUATING STRESS ACCUMULATION DEGREE OF SKIN

(57)摘要

本發明之課題係提供一種新穎的評價方法，其不會對使用者造成負擔，而可評價肌膚的壓力蓄積度，並且可簡便而確實地評價是否為敏感性肌膚。因此，本發明係藉由膠帶剝離法等而以非侵入式方式採取皮膚角質層，並藉由測定其中所含有的 HSP27 表現量而評價壓力蓄積度。

An objective of this invention is to provide a novel evaluating method for evaluating stress accumulation degree of skin and simply and reliably evaluating whether it is sensitive skin, without causing any burden to users. According to this invention, a stratum corneum of skin is non-invasively harvested by a tape stripping method, and the expressing amount of HSP27 contained therein is measured, thereby evaluating stress accumulation degree of skin.

公 告 本**發明專利說明書**

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101105615

※申請日：101.2.21

※IPC 分類：G01N 33/50
(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

皮膚的壓力蓄積度的評價方法

METHOD FOR EVALUATING STRESS ACCUMULATION DEGREE OF
SKIN

二、中文發明摘要：

本發明之課題係提供一種新穎的評價方法，其不會對使用者造成負擔，而可評價肌膚的壓力蓄積度，並且可簡便而確實地評價是否為敏感性肌膚。因此，本發明係藉由膠帶剝離法等而以非侵入式方式採取皮膚角質層，並藉由測定其中所含有的 HSP27 表現量而評價壓力蓄積度。

三、英文發明摘要：

An objective of this invention is to provide a novel evaluating method for evaluating stress accumulation degree of skin and simply and reliably evaluating whether it is sensitive skin, without causing any burden to users. According to this invention, a stratum corneum of skin is non-invasively harvested by a tape stripping method, and the expressing amount of HSP27 contained therein is measured, thereby evaluating stress accumulation degree of skin.

四、指定代表圖：本案無指定代表圖。

(一)本案指定代表圖為：第()圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

由於本案圖式為顯示實驗數據之圖表，不足以代表本案發明。故本案無指定代表圖。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

本案無化學式。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於人類皮膚的壓力蓄積度之評價方法，以及敏感性肌膚之評價方法。

【先前技術】

人類的皮膚時常與外界接觸，並受到各種刺激。該刺激的具代表性之例子係如紫外線。紫外線係即使在未於外觀上對肌膚造成太大變化之情形下，仍會誘發皮膚細胞之DNA斷裂或膠原蛋白之改質等，而成為皮膚老化的原因。紫外線係經常持續對肌膚造成壓力(stress)。此外，對女性而言，洗臉或化妝等日常行為亦會對皮膚造成刺激，該等刺激會作為潛在壓力而蓄積於肌膚。而且，對於該等刺激(壓力)之抵抗性若會因某種原因減少，即定義為敏感性肌膚。此種皮膚之外部刺激的蓄積度於本案中係稱為皮膚的壓力蓄積度。另一方面，敏感性肌膚係指雖無明顯的皮膚病變，但容易引起不利、有害的反應之肌膚。而且，關於此種敏感性肌膚的原因，據稱為壓力的蓄積若達到一定程度，即提升肌膚的感受性。此外，敏感性肌膚對外部刺激的抵抗性係較健康肌膚低，可說是容易發生皮膚問題的肌膚。近年來，意識到敏感性肌膚的女性有增加的傾向，於化妝品等方面亦期望有刺激較少者。

在化妝品的販售現場，係由美容專家進行問診，評價肌膚壓力的蓄積狀況和是否為敏感性肌膚，而選擇對肌膚造成的壓力(刺激)少之化妝品。然而，近年來由於通訊販

售等化妝品專家不在場的販售方法係逐漸普及，因此，期望判定肌膚的壓力狀態，且即使並非專家亦可對敏感性肌膚的程度進行簡便地評價。此者若為可行，則即使不依靠美容專家問診，亦可評價使用者肌膚的壓力狀態和是否為敏感性肌膚，並可自行選擇適當的化妝品。此外，可簡單地選擇較適合使用者的肌膚之化妝品或化學煥膚(chemical peeling)劑，藉此，避免皮膚的炎症等肌膚問題或副作用，而可更為提高化妝品之護膚作用或化學煥膚之施行等的有益性。因此，正尋求不依靠問診而仍能評價皮膚之外部刺激暴露過程(肌膚壓力的蓄積度)，並且客觀地判別是否為敏感性肌膚之方法。

在專利文獻 1 中係揭示於皮膚塗佈化妝料後，將剝離出的皮膚角質層回收並進行觀察，以評價皮膚的敏感性之方法。然而，該方法需對對每種化妝品全都進行檢查，此外，無法評價使用者的肌膚壓力蓄積度。

專利文獻 2 中係揭示於皮膚塗佈類辣椒素(capsinoid)等刺激性物質，以評價是否為敏感性肌膚之方法。然而，使用類辣椒素等刺激性強之物質的試驗方法，對被驗者而言係為不佳。

專利文獻 3 係揭示測定臉部角質層之鈣衛蛋白(calprotectin)存在量，評價是否為敏感性肌膚之方法。

非專利文獻 1、2 則記載，因熱休克蛋白(heat shock protein，亦即 HSP)27 會對於屬於界面活性劑之月桂基硫酸鈉(SDS)所引起的皮膚刺激產生反應，而於皮膚增加。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[專利文獻 1] 日本特開平 10-295648 號公報

[專利文獻 2] 日本特開 2005-296007 號公報

[專利文獻 3] 日本專利第 4469762 號公報

[非專利文獻]

[非專利文獻 1] Ingeborg L.A.Boxman, et al.,
Experimental Dermatology, 2002, 11, 509-517.

[非專利文獻 2] Ingeborg L.A.Boxman, et al.,
British Journal of Dermatology, 2002, 146, 777-785.

【發明內容】

(發明欲解決之課題)

如上所述，正期望有評價肌膚壓力蓄積度，並客觀地評價是否為敏感性肌膚之方法。該評價方法期望為並非以外科方式取出皮膚而對皮膚造成刺激等對使用者造成負擔之方法。本發明之課題係提供一種使用生化指標之新穎評價方法，該方法不會對使用者造成負擔，而可評價肌膚的壓力蓄積度，並且可簡便而確實地評價是否為敏感性肌膚。

(解決課題之手段)

本發明為以下構成。

- (1) 一種人類皮膚的壓力蓄積度之評價方法，其係將皮膚角質層之熱休克蛋白 (HSP)27 表現量 (expression level)、與預先或同時測定之正常人類皮膚的 HSP27 表現量進行對比。

(2) 一種敏感性肌膚之評價方法，其係將皮膚角質層之 HSP27 表現量、與預先或同時測定之正常人類皮膚的 HSP27 表現量進行對比。

(3) 如(1)或(2)所述之評價方法，其具備下述步驟：

採取步驟，係採取皮膚角質層；

測定步驟，係測定前述採取步驟所採取之角質層細胞的 HSP27 表現量；以及

比較步驟，係將前述測定步驟所測定之 HSP27 表現量與健康肌膚的皮膚角質層之 HSP27 表現量進行比較。

(4) 如(1)或(2)所述之評價方法，其具備下述步驟：

採取步驟，係採取被驗者之評價對象部位的角質層；

測定步驟，係測定前述採取步驟所採取之角質層的 HSP27 表現量；以及

比較步驟，係將前述測定步驟所測定之 HSP27 表現量與具有健康肌膚者之前述評價對象部位之角質層的 HSP27 表現量進行比較。

(5) 一種人類皮膚的壓力蓄積度之評價方法，其係將皮膚角質層之 HSP27 表現量、與預先或同時測定之標本群組皮膚的 HSP27 表現量之分布進行相對比較。

(6) 一種敏感性肌膚之評價方法，其係將皮膚角質層之 HSP27 表現量、與預先或同時測定之標本群組皮膚的 HSP27 表現量之分布進行相對比較。

(7) 如(5)或(6)所述之評價方法，其具備下述步驟：

採取步驟，係採取被驗者之評價對象部位的角質層；

測定步驟，係測定前述採取步驟所採取之角質層的 HSP27 表現量；以及

比較步驟，係將前述測定步驟所測定之 HSP27 表現量與標本群組之前述評價對象部位之角質層的 HSP27 表現量之分布進行比較。

(8)如(3)、(4)及(7)中任一項所述之評價方法，其中，採取皮膚角質層之步驟係藉由膠帶剝離(tape stripping)法而進行者。

(發明之效果)

依據本發明之評價方法，可藉由測定角質層之 HSP27 表現量而評價肌膚壓力蓄積度。此外，以該 HSP27 存在量作為指標，可簡便地評價肌膚是否為敏感性肌膚。另外，由於本發明之評價方法係以膠帶剝離法等簡便的操作方法來採取評價試料，故對被驗者之負擔為少，任何人皆可簡單地進行評價。此外，因為係生化試驗方法，由任何人進行測定皆會得到相同的結果，故不需如以往般藉由與專家面談的方式進行諮詢。

【實施方式】

以下詳細說明本發明。

本發明之評價方法之特徵係以皮膚角質層的 HSP27 存在量作為指標。

HSP27 係已知作為熱休克蛋白質家族之一員而為分子

量 27KD 之蛋白質，並且具有作為分子伴護蛋白(molecular chaperon)之功能。已知會隨著免疫壓力，而增加在皮膚之基因表現。

本發明中之敏感性肌膚係指雖無明顯的皮膚病變，但容易引起不利、有害的反應之肌膚。此外，其對於外部刺激的抵抗性係較健康肌膚低，可說是容易發生皮膚問題的肌膚。另一方面，健康肌膚係指不會表現如上述之敏感性肌膚的性質而為健康的正常肌膚。在敏感性肌膚中，已知會有使經皮水分蒸散量(TEWL; transepidermal water loss)提高且使高頻傳導度(角質層水分量)降低等之傾向。此外，敏感性肌膚會有發生斑疹或肌膚粗糙之情形。

角質層係位於皮膚最上層之組織，具有從來自體外之異物或刺激而保護皮膚之功能。

本發明之評價對象部位，只要是可取得角質層之部分，即可包含任意部位，主要部位可列舉如顏面、頸部、上臂部。可依照以往的方法，而得到取自該等部位之皮膚之角質層。然而，如前所述，由於以外科方式取出皮膚等方法係會對使用者造成負擔，故以膠帶剝離、刮擦等簡便地得到角質層之方法為較佳。

如此所準備之各試料之 HSP27 表現量，係可藉由以往已知的方法進行測定。例如，可依據與對於 HSP27 之抗體的反應，使用酵素免疫分析法(enzyme immunoassay)、放射免疫分析法(radioimmunoassay)、西方墨點法(western blotting method)等方法。

從各試料中，將 HSP27 經由各種本身即為已知的生化方法，例如凍結解凍法(freezing and thawing method)、超音波震碎法、均質法等而調製可溶性區分(soluble fraction)。萃取後，迅速地進行測定。

由於蓄積有壓力的肌膚或敏感性肌膚，其角質層之 HSP27 表現量係明顯較健康肌膚高，故以角質層之 HSP27 表現量多寡作為指標，即可簡便地評價壓力蓄積度或肌膚是否為敏感性肌膚。本發明所使用之角質層，可使用膠帶剝離等藉由角質膠帶而僅採取角質層的表層部分之簡單方法來進行採取。此外，本發明可在不對皮膚賦予紫外線或化學物質等刺激下，測定 HSP27 的表現量。因此，可在不對使用者造成負擔下，評價使用者的肌膚是否為敏感性肌膚。特別是可簡單地選擇較適合使用者的肌膚之化妝品或化學煥膚劑，藉此，可避免皮膚的炎症等肌膚問題或副作用，而可更為發揮化妝品之護膚作用或有益性。

本發明之評價方法係由下述步驟所構成：採取步驟，係採取角質層；測定步驟，係測定前述採取步驟所採取之角質層的 HSP27 表現量；以及比較步驟，係將前述測定步驟所測定之 HSP27 表現量與健康肌膚的角質層之 HSP27 表現量進行比較。或者是，本發明之評價方法係由下述步驟所構成：採取步驟，係採取角質層；測定步驟，係測定前述採取步驟所採取之角質層的 HSP27 表現量；以及比較步驟，係將前述測定步驟所測定之 HSP27 表現量與標本群組之角質層之 HSP27 表現量的分布進行比較。以下說明此評

價方法。

首先，將如上述所測定之 HSP27 表現量與健康肌膚的角質層之 HSP27 表現量進行比較。此外，亦可測定被驗者之某評價對象部位的角質層之 HSP27 表現量，將所測定之 HSP27 表現量與具有健康肌膚者之同一評價對象部位的角質層之 HSP27 表現量進行比較。具有健康肌膚者之角質層的 HSP27 表現量，係藉由使用來自複數名具有健康肌膚者之數據的平均值，而可進行更為客觀的評價。

或者是，亦可測定被驗者之某評價對象部位的角質層之 HSP27 表現量，將所測定之 HSP27 表現量與標本群組之同一評價對象部位之角質層 HSP27 表現量的分布進行比較。藉由使用標本群組之 HSP27 表現量的分布，而可進行更為客觀的評價。

如此比較後之結果，當所測定之 HSP27 表現量顯著地大於健康肌膚的 HSP27 表現量時，或是相較於標本群組之 HSP27 表現量之分布而判斷 HSP27 表現量為大時，即評價是壓力之蓄積為大，並且可評價為屬於敏感性肌膚之可能性高。該健康肌膚的試料可從測定 HSP27 者採取，亦可從與測定 HSP27 者為不同者採取。此外，該標本群組較佳係以統計上有效的規模來隨機抽出，但亦較佳係因應目的而依例如性別、年齡之差別來抽出標本群組。

此外，當被驗者之某評價對象部位的角質層之 HSP27 表現量顯著地大於具有健康肌膚者之同一評價對象部位的角質層之 HSP27 表現量時，或是相較於標本群組之同一評

價對象部位的角質層之 HSP27 表現量之分布而判斷 HSP27 表現量為大時，亦評價是壓力的蓄積為大。此外，當此數值顯著為高時，則評價為具有敏感性肌膚。

亦即，當評價是壓力蓄積為高時，可依據所測定之 HSP27 表現量之程度，而評價壓力蓄積度之程度。當所測定之 HSP27 表現量係相較於健康肌膚之 HSP27 表現量、或標本群組的表現量之分布而被判斷為顯著多時，該肌膚係強烈表現出敏感性肌膚的性質，並且其對外界刺激的抵抗性係相較於健康肌膚或標本群組之平均而為顯著低，非常容易發生皮膚問題之可能性為高。此外，當所測定之 HSP27 表現量僅相較於健康肌膚之 HSP27 表現量而僅為少量增加時，或是所測定之 HSP27 表現量係相較於標本群組之 HSP27 表現量之分布而被判斷為略大於平均值時，該肌膚可被評價為：雖然壓力的蓄積大於標本群組之平均值，但仍未達到所謂對外界刺激之抵抗性低而會發生皮膚問題的敏感性肌膚。

以下，針對具體之實施例進行說明，但本發明並不限定於下述實施例。

[實施例 1]

(實驗 1) 紫外線照射所致之皮膚壓力蓄積度之試驗

(1) 紫外線所致之壓力負荷

以 10 名健康的男性作為被驗者而實施試驗。

使用 Multiple Solar Ultraviolet Simulator Model 601 (solar light 公司製) 作為紫外線照射裝置，光源係使用

150W 氙燈。調整照射強度而使被驗者背部皮膚會出現誘發色素沉積之紅斑，並照射紫外線(UVB)170 秒。又，藉由比較紫外線照射部位與非照射部位，確認紫外線所致之壓力蓄積。在人工紫外線照射前及照射後第 5 日、第 11 日、第 17 日，藉由膠帶剝離法(角質層檢驗片(horny layer checker)：Asahibiomed 製)而採取皮膚角質層試樣。

(2)皮膚角質層中的蛋白質之萃取方法

在均質化用管中採取 0.1%SDS/PBS(-)200ul，於其中裝入上述經膠帶剝離之角質層檢驗片，使用均質用研棒(pestle)刮擦黏著面，而從膠帶由角質層中萃取出蛋白質。

(3)皮膚角質層蛋白之定量

藉由 DC Protein Assay Kit(Bio-Rad 製)，對角質層萃取液中所含之蛋白量進行定量。

(4)以西方墨點法進行 HSP27 之定量

使用 XP PANTERA Gel(5-20%之梯度膠：DRC 公司製)，藉由 SDS-PAGE 而將 1.5 μ g 的角質層蛋白質分離後，將蛋白質轉印到 PVDF 膜，以 StartingBlock Blocking Buffer(Thermo Scientific 公司製)進行阻斷(blocking)。將一級抗體(HSP27 Polyclonal Antibody：Stressgen 公司製造)稀釋 1000 倍，將二級抗體(Goat anti-mouse IgG：invitrogen 公司製造)稀釋 10000 倍並使其反應後，使用 ECLplus(BD Bioscience 公司製造)，以 LAS-4000mini(富士軟片公司製造)進行檢測。以 Science Lab 2004 Multi Gauge(富士軟片公司製造)將所得之譜帶(band)的發光強

度進行數值化。依據預先以基因重組之 HSP27 蛋白質作為標準品所作成之標準曲線，讀取發光信號的強度作為 HSP27 的蛋白質量，而進行評價。

(5)結果

經賦予紫外線所致之刺激(壓力)的被驗者的角質層 HSP27 量測定結果係示於表 1、第 1 圖。確認到紫外線係歷經長時間而使壓力蓄積於皮膚。

[表 1]

UV 照射後之 HSP27 之變化量

照射後之日數	UV(-)	UV(+)
0 日	0.02±0.00	—
5 日	0.03±0.03	0.02±0.02
11 日	0.05±0.04	0.11±0.12
17 日	0.05±0.05	0.16±0.24

ng/μg 蛋白質

因紫外線照射而於皮膚產生紅斑，HSP27 係隨日數增加。此係評價為持續刺激而結果蓄積壓力者。

[實施例 2]

(實驗 2)十二基硫酸鈉(SDS)所致之低刺激之壓力蓄積試驗

為了確認已知會使皮膚的 HSP27 增加之界面活性劑 SDS 的刺激是否會作為壓力而蓄積，故以健康肌膚的男女 8 名作為對象，進行以下試驗。

(1)壓力之負荷

於 2 日內，1 日 4 次、每隔 1 小時以 10% SDS 水溶液洗淨左前臂內側部，而作成肌膚粗糙(壓力狀態)。又，僅以水洗淨同一人的右前臂，以作為對照。此外，在確認左前臂之水分蒸散量係較處理前更為上昇後，開始進行以下之測定。

(2) 試料之採取與水分蒸散量之測定

在肌膚粗糙處理後(第 0 日)、隔日、第 3 日、第 5 日、第 7 日、第 14 日測定水分蒸散量，並且藉由膠帶剝離法採取角質層試樣。又，若於第 14 日時，水分蒸散量之測定值仍未回復至肌膚粗糙處理前之測定值時，則將測定延長至第 21 日、第 28 日。

又，水分蒸散量之測定係以 Courage & Khazaka 公司製 Tewameter 進行測定。角質層係藉由角質層檢驗片(Asahibiomed 製)採取。

(3) 皮膚角質層中的蛋白質之萃取方法

以與實驗 1 相同之操作，在均質化用管中採取 0.1% SDS/PBS(-)200ul，於其中裝入上述經膠帶剝離之角質層檢驗片，使用均質用研棒刮擦黏著面，而從膠帶由角質層中萃取出蛋白質。

(4) 皮膚角質層蛋白之定量

藉由 DC Protein Assay Kit(Bio-Rad 製)，對角質層萃取液中所含之蛋白量進行定量。

(5) 以西方墨點法進行 HSP27 之定量

使用 XP PANTERA Gel(5-20%之梯度膠：DRC 公司製)，

藉由 SDS-PAGE 而將 $1.5\mu\text{g}$ 的角質層蛋白質分離後，將蛋白質轉印到 PVDF 膜，以 StartingBlock Blocking Buffer (Thermo Scientific 公司製) 進行阻斷。將一級抗體 (HSP27 Polyclonal Antibody: Stressgen 公司製) 稀釋 1000 倍，將二級抗體 (Goat anti-mouse IgG: invitrogen 公司製造) 稀釋 10000 倍並使其反應後，使用 ECLplus (BD Bioscience 公司製造)，以 LAS-4000mini (富士軟片公司製造) 進行檢測。以 Science Lab 2004 Multi Gauge (富士軟片公司製造) 將所得之譜帶的發光強度進行數值化。依據預先以基因重組之 HSP27 蛋白質作為標準品而作成的標準曲線，讀取發光信號的強度作為 HSP27 的蛋白質量，而進行評價。

(6) 結果

經賦予由 SDS 洗淨所致之刺激(壓力)的被驗者之角質層、以及對照之 HSP27 量之測定結果係示於表 2、第 2 圖。此外，一併表示水分蒸散量之變化。

[表 2]

SDS 刺激所致之變化

處理後日數	HSP27(水處理) ng/ μ g 蛋白質	HSP27(SDS 處理) ng/ μ g 蛋白質	水分蒸散量(SDS 處理) g/m ² ·hr
0	0.06 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.11	5.45 $\pm$ 1.79
1	0.05 $\pm$ 0.08	0.13 $\pm$ 0.32	13.95 $\pm$ 1.81
3	0.05 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.12	11.56 $\pm$ 1.21
7	0.03 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.35	8.26 $\pm$ 1.47
14	0.05 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 1.19	7.06 $\pm$ 2.19
21	0.05 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.11	6.26 $\pm$ 1.61
27	0.03 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.03	6.00 $\pm$ 1.30

由 SDS 洗淨所致之皮膚水分的蒸散，係於第 1 日到達峰值並緩慢地回復，但 HSP27 則增加至第 14 日為止。此係評價為皮膚壓力蓄積者。

(實驗 3)異位性皮膚炎患者的壓力蓄積度之評價

異位性皮膚炎患者的皮膚常持續受到來自外界的刺激，皮膚經常處於壓力狀態。測定處於此種狀態之患者之皮膚壓力蓄積度。

(1)皮膚角質層之採取方法

對診斷為異位性皮膚炎之 4 名女性患者之呈現皮膚炎的頸部皮膚，使用角質檢驗片(2.5cm $\times$ 2.5cm:Asahibiomed 製)，進行膠帶剝離，採取角質層。另外，亦對未呈現皮膚炎症狀之上臂部皮膚以相同操作進行取樣。

以相同操作，亦對 3 名健康女性之頸部皮膚、上臂部

皮膚進行取樣，以作為對照。

(2) 皮膚角質層中的蛋白質之萃取方法

在均質化用管中採取 1% SDS/PBS(-) 200 μ l，於其中裝入上述經膠帶剝離之角質層檢驗片，以均質用研棒刮擦黏著面，而從膠帶上的角質層萃取出蛋白質。

(3) 皮膚角質層蛋白之定量

藉由 DC Protein Assay Kit (Bio-Rad 製)，對角質層萃取液中所含之蛋白量進行定量。

(4) 以西方墨點法進行 HSP27 之定量

使用 XP PANTERA Gel (5-20% 之梯度膠：DRC 公司製)，藉由 SDS-PAGE 而將 1.5 μ g 的角質層蛋白質分離後，將蛋白質轉印到 PVDF 膜，以 StartingBlock Blocking Buffer (Thermo Scientific 公司製) 進行阻斷。將一級抗體 (Hsp27 Polyclonal Antibody：Stressgen 公司製) 稀釋 1000 倍，將二級抗體 (Goat anti-mouse IgG：invitrogen 公司製造) 稀釋 10000 倍並使其反應後，使用 ECLplus (BD Bioscience 公司製造)，以 LAS-4000mini (富士軟片公司製造) 進行檢測。以 Science Lab 2004 Multi Gauge (富士軟片公司製造) 將所得之譜帶的發光強度進行數值化。將發光信號的強度作為 HSP27 之相對量而進行評價。

(5) 結果

異位性皮膚炎患者以及健康者之皮膚角質層之 HSP27 量測定結果係示於表 3、第 3 圖。

[表 3]

測定部位	HSP27 發光強度
健康者臂部	841417±290490
健康者頸部	861255±517352
異位性皮膚炎患者(AD)臂部(非皮膚炎部位)	12175507±13096705
異位性皮膚炎患者(AD)頸部(皮膚炎部位)	27209365±2850449

如表 3、第 3 圖所揭明，健康者之 HSP27 幾乎不存在於角質層中，但從異位性皮膚炎患者之患部皮膚則檢測出高濃度的 HSP27。此外，從異位性皮膚炎患者的正常皮膚中檢測出的 HSP27 雖未達呈現皮膚炎的部位之程度，但相較於健康者而為較高濃度。由以上結果，可知經常受到壓力的異位性皮膚炎患者之皮膚係蓄積有壓力。此外，可確認到並非異位性皮膚炎之患部之皮膚的 HSP27 亦相對為高。由以上結果，可確認到測定 HSP27 作為敏感性肌膚的指標係屬有用。

[實施例 3]

(實驗 3-2)測定常受到來自外界的壓力之顏面部與較未受到壓力之前臂部或臀部皮膚的 HSP27，評價蓄積於皮膚之壓力的程度。

試驗方法

(1)試料之採取

藉由膠帶剝離法，從 8 名健康女性之臉頰、顎下、前臂、臀部採取角質層試樣。1 部位係採取 4 片。

(2) 皮膚角質層中的蛋白質之萃取方法

在均質化用管中裝入 0.5% chaps 緩衝液 400 μ l，於其中裝入上述經膠帶剝離之角質層檢驗片，藉由均質而從膠帶由角質層中萃取出蛋白質。從 1 部位所採取的 4 片試樣係一併以 1 管進行萃取，而作為 1 個試樣。

(3) 皮膚角質層蛋白之定量

藉由 DC Protein Assay Kit(Bio-Rad 製)，對角質層萃取液中所含之蛋白量進行定量。

(4) 以 ELISA 法進行 HSP27 之定量

以 Total human HSP27 DuoSet ELISA kit(R&D systems 製)測定角質層萃取液中所含之 HSP27 量。將結果作為每單位蛋白量之 HSP27 量，示於表 4、第 4 圖。

又，標示係以平均值 $\pm$ S.E. 表示。

[表 4]

皮膚部位之 HSP27 測定結果

部位	測定結果
臉頰	127.6 $\pm$ 30.6
顎下	63.85 $\pm$ 37.34
前臂	30.02 $\pm$ 10.44
臀部	9.92 $\pm$ 3.12

pg/ μ g 蛋白質

如表 4、第 4 圖之結果所揭明，HSP27 之測定結果係在日常壓力高之顏面部(臉頰)為特別高，露出較少的臀部則顯著為低。由以上結果可知，HSP27 係可作為評價皮膚之

日常壓力之指標。

[實施例 4]

(實驗 4)測定標本群組之角質層的 HSP27，作成直方圖(histogram)。

試驗方法

(1)試驗試料之採取

以隨機抽選之 445 名女性作為對象，藉由膠帶剝離法從臉頰採取角質層試樣。試樣係從 1 部位採取 1 片。

(2)皮膚角質層中的蛋白質之萃取方法

在均質化用管中裝入 RIPA 緩衝液 500ul，於其中裝入上述經膠帶剝離之角質層檢驗片，藉由均質而從膠帶由角質層中萃取出蛋白質(萃取液 A)。另外，將萃取後之角質層檢驗片移至別的均質化用管中，裝入含有 1%SDS 之 50mM Tris-HCL 緩衝液 500 μ l，藉由均質而從殘留於膠帶之角質層中萃取出蛋白質(萃取液 B)。萃取液 A 係用於 HSP27 之定量及角質層蛋白之定量，萃取液 B 係用於角質層蛋白之定量。

(3)皮膚角質層蛋白之定量

以 BCA protein assay(Pierce 製)對角質層萃取液中所含之蛋白量進行定量。

以萃取液 A 與萃取液 B 之蛋白質量的總計作為總蛋白質(total protein)量。

(4)以 ELISA 法進行 HSP27 之定量

以 Total human HSP27 DuoSet ELISA kit(R&D systems

製)測定角質層萃取液中所含之 HSP27 量。結果係對每單位蛋白質量之 HSP27 量進行解析。標本群組之 HSP27 表現量之頻率分布表係示於表 5，直方圖係示於第 5 圖。

[表 5]

標本群組之 HSP27 之頻率分布表

HSP27(pg/ μ g 總蛋白質)

數據區間	頻度	累積
0.4	0	0%
2.5	22	5%
5.0	64	19%
7.5	79	37%
10.0	51	49%
12.5	34	56%
15.0	27	62%
17.5	26	68%
20.0	25	74%
22.5	17	78%
25.0	19	82%
27.5	11	84%
30.0	15	88%
32.5	11	90%
35.0	11	93%
37.5	12	95%
40.0	4	96%
42.5	3	97%
45.0	0	97%
47.5	2	97%
50.0	3	98%
超過 50	9	100%

如表 5、第 5 圖所示，HSP27 之表現量係分布於從 0.4pg/ μ g 總蛋白質至超過 50pg/ μ g 總蛋白質之值為止的廣範圍。平均值為 15.0pg/ μ g 總蛋白質。相較於該頻率分布而將 HSP27 表現量判斷為大之基準係可自由地設定，例如，可將平均值 15.0pg/ μ g 總蛋白質 以上之值判斷為 HSP27 表現量大，並且，由於 10.0pg/ μ g 總蛋白質之累積頻率為約 50%，故亦可將超過 10.0pg/ μ g 總蛋白質之值判斷為 HSP27 表現量為大。無論如何，皆可判斷為若 HSP27 之表現量越大，則人類皮膚的壓力蓄積度越大。

又，實驗 4 之 HSP27 表現量為實驗 3 之臉頰部 HSP27 表現量的 1/10，此係因為在實驗 4 之蛋白質萃取方法中，是於萃取包含 HSP27 之蛋白質後，使用含有 1%SDS 之 50mM Tris-HCL 緩衝液以萃取角質層之蛋白質，而與實驗 3 相比，實驗 4 之總蛋白質之檢測量為增加之故。實驗 3、實驗 4 於 HSP27 萃取步驟並無差異，而 HSP27 之溶解性為高，故以該步驟即能充分地萃取。另一方面，藉由實驗 4 所追加以 SDS 萃取之方法，雖可萃取出蛋白質的幾乎全部量，但無法測定該萃取液中之 HSP27。由於實驗 3 與實驗 4 之萃取步驟為相異，故無法比較實驗 3 與實驗 4 之數據，但可進行實驗 3 之數據之間的比較、實驗 4 之數據之間的比較。

[實施例 5]

(實驗 5)關於人類皮膚的壓力蓄積度的問卷調查結果與 HSP27 量之對比

從實驗 4 之標本群組中隨機抽出 189 名，實施關於人類皮膚的壓力蓄積度之問卷調查，將其結果與 HSP27 表現量進行對比。

(1)肌膚的敏感性之問卷調查

讓被驗者選擇該名被驗者的肌膚是「非敏感」、「略為敏感」、「敏感」這 3 種類中之任一者。

對被驗者提示下述敏感性的 10 個要素，讓被驗者自行判斷係屬於非敏感(不敏感)、略為敏感、敏感之何者。

- 1 使用化妝品會泛紅或感到搔癢
- 2 高清涼感(涼爽性)的化妝品會與肌膚不合
- 3 含有乙醇的化妝品會與肌膚不合
- 4 含有香水或香料的化妝品會與肌膚不合
- 5 由於肌膚脆弱而慎選化妝品
- 6 會因按摩等物理性刺激而使肌膚的狀態變差
- 7 即使是在平常生活中，照到紫外線肌膚就容易泛紅、刺痛
- 8 出汗後會有搔癢感
- 9 化妝品或清潔劑會不合而造成泛紅或搔癢
- 10 有曾因化妝品造成的肌膚問題而就醫之經驗

預測選擇「敏感」者之人類皮膚的壓力蓄積度為高，選擇「非敏感」者之人類皮膚的壓力蓄積度為低。

(2)肌膚的敏感性之問卷調查結果與 HSP27 量的關係

肌膚的敏感性之問卷調查結果與 HSP27 量的關係係示於表 6、第 6 圖。

[表 6]

問卷調查之回答	HSP27 量平均值 (pg/ μ g 總蛋白質)	回答人數 (人)
非敏感	7.0	70
略為敏感	15.7	94
敏感	18.8	18

以 HSP27 量 $10.0\text{pg}/\mu\text{g}$ 總蛋白質作為基準，若判定為較基準值低者之人類皮膚的壓力蓄積度為低，較基準值高者之人類皮膚的壓力蓄積度為高，則有對應於被驗者之自我感覺之傾向。

(3) 室外活動經驗之問卷調查

讓被驗者針對室外活動經驗選擇「有」、「無」中之任一者。

室外活動係例示如運動或園藝。

預測針對室外活動經驗而回答為「有」者之人類皮膚的壓力蓄積度為高，回答為「無」者之人類皮膚的壓力蓄積度為低。

(4) 室外活動經驗之問卷調查結果與 HSP27 量之關係

室外活動經驗之問卷調查結果與 HSP27 量之關係係示於表 7、第 7 圖。

[表 7]

問卷調查之回答	HSP27 量平均值 (pg/ μ g 總蛋白質)	回答人數 (人)
無	8.4	103
有	16.7	79

以 HSP27 量 10 至 15pg/ μ g 總蛋白質之範圍作為基準，若判定為較基準值低者之人類皮膚的壓力蓄積度為低，較基準值高者之人類皮膚的壓力蓄積度為高，則有對應於被驗者之因室外紫外線所致之壓力蓄積度的傾向。

【圖式簡單說明】

第 1 圖係表示紫外線照射所致之壓力負荷之蓄積會反映於角質層之 HSP27 表現量增加的圖。

第 2 圖係表示 SDS 所致之低刺激之壓力負荷會反映於人類角質層之 HSP27 表現量增加的圖。

第 3 圖係對屬於敏感性肌膚之異位性皮膚炎患者的正常皮膚與炎症皮膚的角質層的 HSP27 存在量進行測定之圖。並且，此圖係確認異位性皮膚炎患者即使於正常皮膚亦蓄積有壓力之圖。

第 4 圖係表示藉由 ELISA 法測定健康者之各種部位皮膚中之 HSP27 之結果的圖。越是在日常中暴露於壓力下之部位，HSP27 之測定值為越高。

第 5 圖係標本群組之 HSP27 表現量的直方圖。

第 6 圖係肌膚敏感性之問卷調查結果與 HSP27 量的關

係。

第 7 圖係室外活動經驗之問卷調查結果與 HSP27 量的關係。

【主要元件符號說明】

無。

七、申請專利範圍：

1. 一種人類皮膚的壓力蓄積度之評價方法，其係測定以膠帶剝離法採取之皮膚角質層之熱休克蛋白(HSP)27 表現量，當顯示超過預先設定之基準值的值時，評價為有紫外線刺激作為壓力而蓄積於皮膚中；

其中，前述基準值係來自複數名具有健康肌膚者之數據的 HSP27 表現量的平均值或累積頻率為 50% 時之值。

2. 一種敏感性肌膚之評價方法，其係測定以膠帶剝離法採取之皮膚角質層之 HSP27 表現量，當顯示超過預先設定之基準值的值時，評價為敏感性肌膚；

其中，前述基準值係來自複數名具有健康肌膚者之數據的 HSP27 表現量的平均值或累積頻率為 50% 時之值。

3. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之評價方法，其具備下述步驟：

採取步驟，係以膠帶剝離法採取皮膚角質層；

測定步驟，係測定前述採取步驟所採取之角質層細胞的 HSP27 表現量；以及

比較步驟，係與預先設定之基準值進行比較。