



(21)申請案號：101105417 (22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 20 日

(51)Int. Cl. : G01N33/53 (2006.01)

(30)優先權：2011/02/25 日本 2011-040356

(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)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

Ghoreishi, M., et al., " Expression of 27 KD, 65 KD and 72/73 KD Heat Shock Protein in Atopic Dermatitis: Comparison with Those in Normal Skin and Contact Dermatitis", J. Dermatol., 2000, Vol.27, Issue 6, P.370-379.

Ghoreishi, H., et al., " JSID Abstracts: 114 Analysis of the Expression of Heat Shock Protein 72 and 27 in the Lesional Skin of Atopic Dermatitis", J. Dermatol. Sci., 1997, Vol.15, Issue 2, P. 121.

Boxman, I.L.A., et al., " Proteomic Analysis of Skin Irritation Reveals the Induction of HSP27 by Sodium Lauryl Sulphate in Human Skin", Br. J. Dermatol., 2002, Vol.146, Issue 5, P.777-785.

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：1 共 11 頁

(54)名稱

異位性皮膚炎的檢查方法

METHOD OF EXAMINING ATOPIC DERMATITIS

(57)摘要

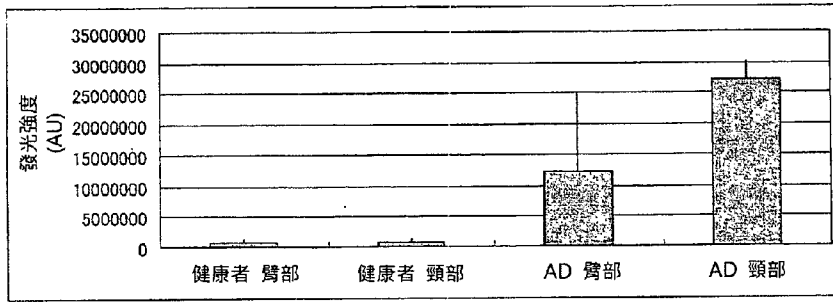
本發明的課題在於提供一種進行異位性皮膚炎檢查的方法，該方法不會對使用者造成負擔。通過利用膠帶剝離法等，非侵入性地採取皮膚角質層，並測定其中含有的 HSP27 的含量來診斷異位性皮膚炎。

An objective of this invention is to provide a method for examining atopic dermatitis without causing any burden to users.

According to this invention, a tratum corneum is non-invasively harvested by a tape stripping method, and the content amount of HSP27 contained therein is measured, thereby examining atopic dermatitis.

指定代表圖：

符號簡單說明：
該代表圖無元件符號
及其所代表之意義。



第1圖

發明專利說明書

公告本

(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：101105417

※申請日：101.2.20

GoIN
 ※IPC 分類：33/53 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

異位性皮膚炎的檢查方法

METHOD OF EXAMINING ATOPIC DERMATITIS

二、中文發明摘要：

本發明的課題在於提供一種進行異位性皮膚炎檢查的方法，該方法不會對使用者造成負擔。通過利用膠帶剝離法等，非侵入性地採取皮膚角質層，並測定其中含有的HSP27的含量來診斷異位性皮膚炎。

三、英文發明摘要：

An objective of this invention is to provide a method for examining atopic dermatitis without causing any burden to users.

According to this invention, a stratum corneum is non-invasively harvested by a tape stripping method, and the content amount of HSP27 contained therein is measured, thereby examining atopic dermatitis.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

100... A

該代表圖無元件符號及其所代表之意義。

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】

本發明涉及一種用於診斷異位性皮膚炎、判定其治療效果的檢查方法。

【先前技術】

異位性皮膚炎是一種表現為皮膚炎症或斑疹、濕疹的疾病。異位性皮膚炎一般被認為是由容易引起異位型支氣管哮喘過敏性鼻炎、皮膚炎蕁麻疹的過敏體質(異位性素質)，再加上各種刺激而產生的伴有瘙癢的慢性皮膚疾病。約 8 成患者是在 5 歲以前的幼兒時期發病。先前認為到了學齡兒童期就會自然治癒，然而近年來，一直持續到成年的病例、或成年後發病或復發的病例持續增加。其通常是一種難以治癒的疾病，並且在早期階段可能會被混同為其他皮膚炎的患者。

異位性皮膚炎(過敏性皮膚炎)的治療方法除了類固醇、抗組織胺劑以及其他藥物療法之外，還有照射 UVA(紫外線 A 波)的 PUVA 療法等。

由於異位性皮膚炎會反復惡化、緩解，因此，難以判定治療效果或判斷治療進展，期望能夠開發出一種新的診斷法。近年來，提出了一種著眼於異位性皮膚炎患者的皮膚中的各種基因表現的變化或各種免疫相關物質的變化從而進行異位性皮膚炎診斷的方法。例如，在專利文獻 1 中，提出一種測定人的角質層的介白素 1、介白素 1 的受體或拮抗劑的變化從而進行診斷的方法。在專利文獻 2 中，提

出一種測定臂板蛋白(Semaphorin)3A的基因表現從而進行診斷的方法，其中，臂板蛋白 3A 是抑制神經軸突的伸長的因子。在專利文獻 3 中，通過分析在異位性皮膚炎患者的皮膚中異常增加或異常減少的蛋白質，確定了 23 種蛋白質，提出了一種通過分析這些蛋白質的表現或基因變化，從而對異位性皮膚炎進行診斷的方法。目前各種診斷方法或檢查方法仍在探索中。

[現有技術文獻]

(專利文獻)

專利文獻 1：日本特開平 10-2213400 號公報

專利文獻 2：日本特開 2008-107275 號公報

專利文獻 3：國際公開第 2007/046463 號公報

【發明內容】

[發明所要解決的問題]

本發明的目的在於提供一種可以準確地對異位性皮膚炎的診斷或進展進行診斷的檢查方法。

[解決問題的技術手段]

本發明人著眼於熱休克蛋白中的一種熱休克蛋白 27 (HSP27)，測定健康者的皮膚及異位性皮膚炎患者的疾患處、非疾患處中的 HSP27 表現量，結果發現：與健康者相比，異位性皮膚炎患者的 HSP27 表現量較高，並且，在異位性皮膚炎患者未顯現異位症狀的部位中的 HSP27 表現量較少。基於這種認識，發現：測定皮膚樣本中的 HSP27，即可診斷異位性皮膚炎或診斷治療進展等，從而完成了本

發明。

也就是說，本發明為如下構成：

(1)一種異位性皮膚炎的檢查方法，其特徵在於：測定皮膚樣本中的熱休克蛋白 27，並與事先測定的正常皮膚樣本的熱休克蛋白 27 的測定值進行對比。

(2)如(1)所述的檢查方法，其中，皮膚樣本為皮膚角質層。

(3)如(1)或(2)所述的檢查方法，其中，皮膚樣本是利用剝離操作而從人類皮膚得到者。

(4)如(1)至(3)中任一項所述的檢查方法，其中，熱休克蛋白 27 的測定係採用西方墨點(western-blot)法。

[發明的效果]

利用本發明的檢查方法，能夠正確判定反復惡化、緩解的異位性皮膚炎的治療進展、治療效果等。並且，可以預測發病。而且，也很容易採取檢查對象的皮膚樣本，可以減少患者的負擔，簡便地進行檢查。

【實施方式】

已知 HSP 對細胞加熱產生反應而進行表現，並且已知這種表現是由於例如細菌感染或炎症、酒精、活性氧、重金屬、紫外線、饑餓及低氧狀態等對細胞的各種緊迫(stress)而衍生出。核內蛋白質熱休克轉錄因子(HSF)通過與 DNA 上的熱休克元素(HSE)結合，作為控制 HSP 表現的轉錄因子發揮作用，然而對於因熱緊迫而衍生 HSF 的詳細機制並不十分明確。在與異位性皮膚炎的關係中，已知 HSP60

或 HSP70、HSP90 等高分子 HSP 會發生變化，然而，卻完全不知低分子 HSP、即本發明的 HSP27 也會涉及其中，也沒有任何提示資料。

在本發明的檢查方法中，係測定皮膚樣本中的 HSP27 的基因量或蛋白質量。在此，皮膚樣本較佳為包含人類表皮的皮膚樣本，可以藉由活組織檢查(Biopsy)由人類皮膚上採取。通常係藉由在皮膚黏貼黏性膠帶，並將剝離黏性膠帶時附著在膠帶上的角質層作為樣本，是減少患者負擔的一種方法，這種方法稱為膠帶剝離法。

在將皮膚樣本中的 HSP27 作為遺傳樣本進行測定時，可以採用例如 RT-PCR 等方法。並且，可以藉由即時 RT-PCR 來進行 HSP27 基因的定量。作為 HSP27 蛋白質的測定手段，可以採用例如免疫染色等方法。可以使用市售品作為抗 HSP27 抗體及其標記體以用於測定。

當進行免疫染色時，例如可以藉由螢光免疫染色進行測定。HSP27 的定量例如可以藉由市售的測定裝置和軟體對螢光強度進行定量。

並且，在以本發明作為診斷用藥時，較佳為含有上述抗 HSP27 抗體及其標記體、第二抗體、標記第二抗體等。而且，也可以是組合了用於分析的緩衝液等的檢測套組 (Test kit)。

本發明人在測定健康者的皮膚中的 HSP27 時，發現所有健康者的皮膚的值均較低。另一方面，確認到與健康者相比，診斷為異位性皮膚炎患者的表現為皮膚炎的部位

皮膚中，HSP27 顯著增加。並確認到即使是同一患者，其未表現為皮膚炎部位的皮膚的 HSP27 雖然低於患部，但高於健康者。因此，藉由觀察皮膚、尤其是表皮的 HSP27 的變化量，即可診斷異位性皮膚炎的進展、治療效果及治療進展等。

[實施例]

以下，通過列舉實施例來詳細地說明本發明，然而，本發明並不限於該等實施例。

A. 方法

(1) 皮膚角質層採取方法

對診斷為異位性皮膚炎的 4 名女性患者之表現為皮膚炎的頸部皮膚，使用角質測試儀 (2.5cm × 2.5cm : Asahibiomed 公司製造)，進行 5 張膠帶剝離，採取角質層。並且，在未表現為皮膚炎症狀的上臂部皮膚上，亦同樣地進行取樣。

同樣地，從 3 名健康女性的頸部皮膚、上臂部皮膚上進行取樣，作為對照。

(2) 萃取皮膚角質層中蛋白質之方法

向均質化用管中採取 1% SDS/PBS(-)200ul，並向其中裝入進行了上述膠帶剝離的角質層測試儀，藉由使用均質用研棒摩擦黏著面，從膠帶的角質層中萃取出蛋白質。

(3) 皮膚角質層蛋白質的定量

利用 DC Protein Assay Kit(Bio-Rad 製造)，對角質層萃取液中所含的蛋白質量進行定量。

(4) 利用西方墨點法定量 HSP27

使用 XP PANTERA Gel(5 至 20% 梯度膠：DRC 公司製造) 藉由 SDS-PAGE 將 1.5 μ g 的角質層蛋白質分離，然後，將蛋白質轉錄到 PVDF 膜上，以 StartingBlock Blocking Buffer(Thermo Scientific 公司製造)進行了封閉。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，然後，使用 ECLplus(BD Bioscience 公司製造)，在 LAS-4000mini(富士膠片公司製造)中進行檢測。利用 Science Lab 2004 Multi Gauge(富士膠片公司製造)對所獲得的波段的發光強度進行了數字化。將發光信號的強度作為 HSP27 的相對量進行了評價。

B. 結果

將異位性皮膚炎患者(AD)以及健康者皮膚角質層的 HSP27 發光強度(AU)測定的結果顯示於表 1、第 1 圖。

[表 1]

	平均發光強度 ($\times 10^6$ AU)	S. D.
健康者(臂部)	0.84	0.29
健康者(頸部)	0.86	0.51
異位性患者的正常部位(臂部)	12	0.13
異位性患者頸部	27	2.8

根據第 1 圖可知，健康者的角質層中幾乎不存在 HSP27，而從異位性皮膚炎患者的患部皮膚中檢測出了 HSP27。並且，從異位性皮膚炎患者的正常皮膚中檢測出的 HSP27，少於表現為皮膚炎的部位，但與正常人相比濃度較高。根據以上的結果，確認了測定 HSP27 能夠實現對異位性皮膚炎的正確診斷，並成為治療效果的指標。並且，明瞭到藉由定期性地測定 HSP27，可以對未表現為皮膚炎但攜帶有過敏疾病的患者或幼兒的異位性皮膚炎的發病進行預測，從而能夠對先前僅限於對症療法的異位性皮膚炎進行預防性治療。

【圖式簡單說明】

第 1 圖是將異位性皮膚炎的症狀與人的皮膚中的 HSP27 的量對應表示的圖。表明 HSP27 隨著異位性皮膚炎的症狀惡化而增加。

【主要元件符號說明】

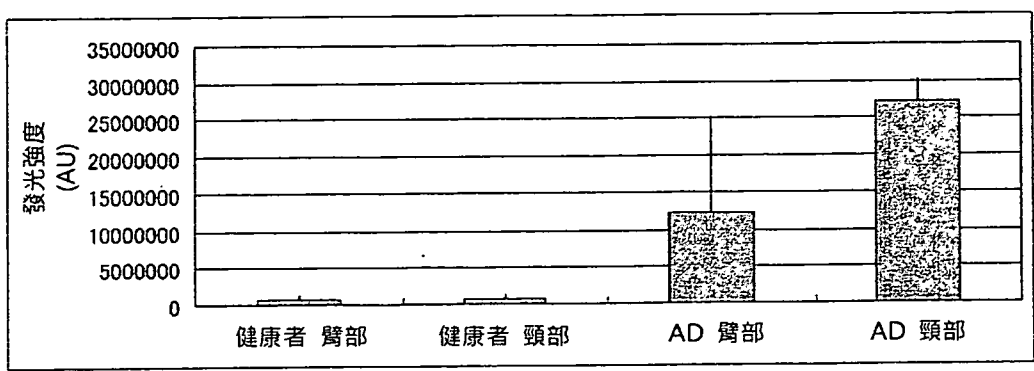
無。

七、申請專利範圍：

1. 一種異位性皮膚炎的檢查方法，其特徵在於：測定皮膚樣本中的熱休克蛋白 27，並與事先或同時測定的正常皮膚樣本的熱休克蛋白 27 的測定值進行對比，根據皮膚樣本中的熱休克蛋白 27 的測定值而得之表現量，比根據正常皮膚樣本中的熱休克蛋白 27 的測定值而得之表現量更高時，係判斷為異位性皮膚炎。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的檢查方法，其中，皮膚樣本為皮膚角質層。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述的檢查方法，其中，皮膚樣本是利用剝離操作而從人類皮膚得到者。
4. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述的檢查方法，其中，熱休克蛋白 27 的測定採用西方墨點法。

八、圖式：

公告本



第1圖