

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年11月2日(02.11.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/210401 A1

(51) 国際特許分類:

A61B 5/107 (2006.01) A61K 45/00 (2006.01)
A61B 5/00 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61B 8/13 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61B 10/00 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/015121

(22) 国際出願日: 2023年4月14日(14.04.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2022-075221 2022年4月28日(28.04.2022) JP

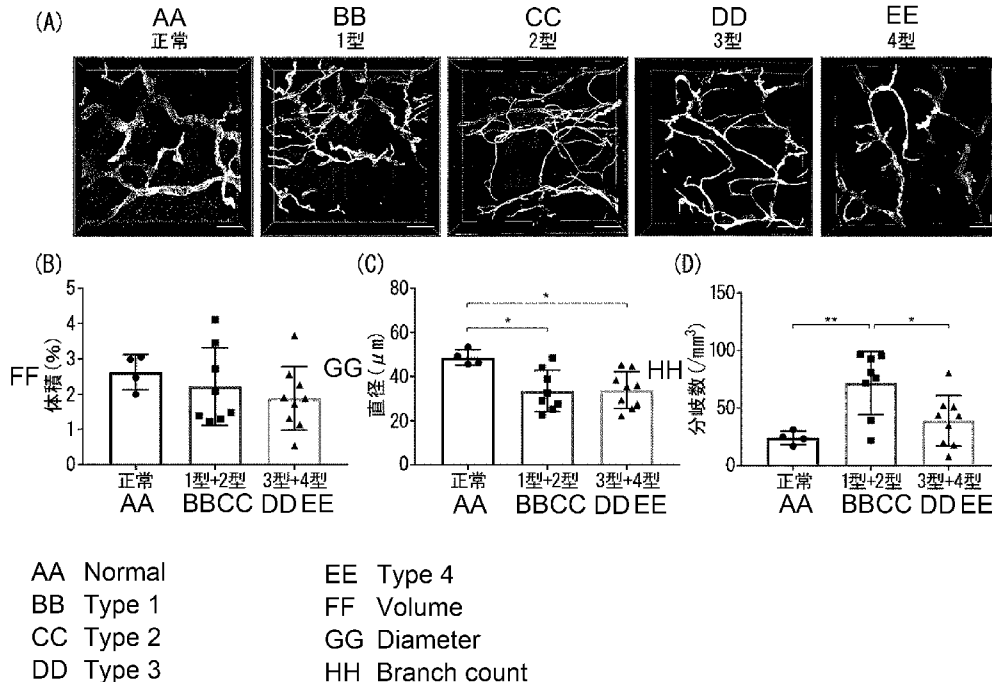
(71) 出願人: 株式会社 資生堂 (SHISEIDO COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒1040061 東京都中央区銀座7-5-5 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 染井 菜緒 (SOMEI, Nao); 〒1040061 東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内 Tokyo (JP). ガントゥムル エンフトール (GANTUMUR, Enkhtuul); 〒1040061 東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内 Tokyo (JP). 井上 恭子 (INOUE, Kyoko); 〒1040061 東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内 Tokyo (JP). 加治屋 健太郎 (KAJIYA, Kentaro); 〒1040061 東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内 Tokyo (JP). 三川 信之 (MITSUKAWA, Nobuyuki); 〒2600856 千葉県千葉市中央区亥

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING CONDITION OF SKIN ON BASIS OF LYMPH VESSELS IN SKIN

(54) 発明の名称: 皮膚のリンパ管に基づき肌状態を決定する方法

図1



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to elucidate the relationship between lymph vessels in the skin and lymphedema as well as the relationship between lymph vessels in the skin and the skin, and to provide thereby a method for evaluating lymphedema and the condition of the skin. Parameters relating to the structure and/or morphology of lymph vessels in the skin were discovered to be related to lymphedema of the skin and to the condition of the skin, and there is provided a method for evaluating the condition of the skin on the basis of the structure and/or morphology

鼻一丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学
大学院医学研究院内 Chiba (JP). 秋田 新介
(AKITA, Shinsuke); 〒2600856 千葉県千葉市中
央区亥鼻一丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉
大学 医学部附属病院内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 青 木 篤, 外 (AOKI, Atsushi et al.);
〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目 2 3
番 1 号 虎ノ門ヒルズ森タワー 青和特
許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

of lymph vessels in the skin.

(57) 要約: 皮膚のリンパ管とリンパ浮腫との関係、さらには皮膚のリンパ管と皮膚との関係を解明するこ
とを目的とし、それによりリンパ浮腫、さらには肌状態の評価方法を提供することを目的とする。皮膚
のリンパ管の構造及び/又は形態に関するパラメータが、皮膚のリンパ浮腫さらには肌状態と関係するこ
とを見出し、皮膚のリンパ管の構造及び/又は形態に基づき肌状態を評価する方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：皮膚のリンパ管に基づき肌状態を決定する方法

技術分野

[0001] 本発明は、皮膚のリンパ管の構造及び/又は形態と肌状態との関連を利用した肌状態の決定方法、皮膚のリンパ管構造を予測する方法、及び肌状態改善薬のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 生体には血管系及びリンパ系からなる循環系が張り巡らされている。血管は体温の維持や、全身の組織に対する栄養や酸素の供給を担っている一方で、リンパ管は免疫細胞の輸送、過剰な組織液や異物の回収を担っている。リンパ系は、抹消部位に存在する毛細リンパ管と、毛細リンパ管が集合して形成する集合リンパ管、及び体内のところどころに存在するリンパ節から構成されている。集合リンパ管は、最終的に胸管又は右リンパ本幹にまとめられ、静脈に繋がっている。毛細リンパ管は、先端が閉じられた盲端であり、単層扁平上皮細胞から構成される。毛細リンパ管は、毛細血管と比較して、内皮細胞間の接合が緩く、細胞間隙が大きく、血管では回収できない大きなタンパク質や異物なども回収することができる。リンパ管の機能が何らかの理由で阻害されて、組織液が抹消組織において溜まることで、むくみや浮腫が生じる。

[0003] リンパ浮腫は、局所におけるリンパ液の増大及び/又は回収不良に起因してむくみが生じる疾患である。組織に滲出したリンパ液はリンパ管に回収されるが、回収されずに四肢にたまることで、むくみが生じる。リンパ浮腫の原因はさまざまであるが、癌の手術や放射線治療後に生じることが多い。リンパ浮腫が生じると、その外観が悪化するとともに、運動機能が障害される。また、リンパ液の流れが悪いことに起因して、傷口に生じた炎症が四肢全体に広がり、蜂窩織炎を生じうる。またリンパ浮腫を生じた患部において、ケラチノサイトの異常増殖、真皮コラーゲンの凝縮が生じることが報告され

ている（非特許文献1：Emerg Infect Dis. 2004 Nov; 10(11): 1938-1946）。

- [0004] 癌手術後に発症するリンパ浮腫は患者のQOLを著しく下げる一方、その詳細な生理的な知見は少なく、その治療法としては、マッサージによるリンパドレナージや、弾性包袋、着衣等による圧迫や、運動などが挙げられる。また、閉経後の女性においてリンパ循環が減少することが報告されており、むくみの原因の一つとなっている（非特許文献2：Surg Radiol Anat 13 (3):221-226. doi:10.1007/BF01627990）。そしてエストロゲンの投与により、むくみやリンパ浮腫を改善又は予防することが報告されている（特許文献1：特開2013-071913号）

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特開2013-071913号公報
特許文献2：国際公開第2019/097958号
特許文献3：国際公開第2018/030520号

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Emerg Infect Dis. 2004 Nov; 10(11): 1938-1946
非特許文献2：Surg Radiol Anat 13 (3):221-226. doi:10.1007/BF01627990
非特許文献3：Sci Rep. 2016 Feb 19;6:21122. doi: 10.1038/srep21122
非特許文献4：F1000Res. 2018; 7: 1813. doi: 10.12688/f1000research.16743.2

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、リンパ浮腫を引き起こす皮膚のリンパ管の特性を明らかにすることで、皮膚のリンパ管とリンパ浮腫との関係、さらには皮膚のリンパ管と皮膚との関係を解明することを目的とし、それによりリンパ浮腫、さらには肌状態の評価方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、リンパ浮腫の患者における皮膚のリンパ管の構造及び形態に着目し、リンパ浮腫患者から摘出した皮膚のリンパ管の構造を3次元的に可視化し解析を行ったところ、リンパ浮腫の重症度（1型～4型）に応じて、皮膚のリンパ管の構造及び形態が変化し、それによりリンパ管の性質が変化するという点を見出した。また、年齢の異なる健常人においても皮膚のリンパ管構造を3次元的に可視化し解析したところ、加齢に伴いリンパ管の形態が変化することを見出した。

そこで本発明は以下に関する：

[1] 皮膚のリンパ管の構造及び/又は形態に関するパラメータに基づき、肌状態を決定する方法、又は美容処置を決定もしくは提供する方法。

[2] 前記皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータが、リンパ管の体積、分岐数及び直径からなる群から選ばれる少なくとも1により決定される、項目1に記載の方法。

[3] 前記皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータが、リンパ管の直径である場合に、リンパ管直径の変化により、肌状態が悪化していると決定する、項目2に記載の方法。

[4] 前記皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータが、さらにリンパ管の分岐数も考慮し、肌状態が悪化していると決定する、項目3に記載の方法。

[5] 前記皮膚のリンパ管の形態が、光干渉断層装置又は光超音波イメージングにより測定される、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

[6] 前記皮膚のリンパ管の構造に関するパラメータが、皮膚のリンパ管におけるVE-カドヘリンの発現量により決定される、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

[7] 皮膚のリンパ管における前記VE-カドヘリンの発現の増加により、肌状態が悪化していると決定する、項目6に記載の方法。

[8] 皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータを指標とした、肌状態改善薬のスクリーニング方法。

- [9] 候補薬剤を皮膚に添加する工程、
添加後の皮膚のリンパ管の形態を撮影する工程、
撮影された画像に基づき皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータを計算する工程、
候補薬剤添加前又は対照薬剤添加群の皮膚における皮膚のリンパ管形態に関するパラメータと比較する工程、そして
パラメータの変化に基づき、候補薬剤を肌状態改善薬として選択する工程、
を含む項目 8 に記載のスクリーニング方法。
- [1 0] 前記皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータが、リンパ管の体積、分岐数及び直径からなる群から選ばれる少なくとも 1 により決定される、項目 9 に記載の方法。
- [1 1] 前記皮膚が、リンパ管構造を含む培養皮膚である、項目 9 又は 1 0 に記載の方法。
- [1 2] リンパ管内皮細胞の V E - カドヘリン発現量を指標とした、肌状態改善薬のスクリーニング方法。
- [1 3] 候補薬剤を皮膚に添加する工程、
添加後の皮膚のリンパ管内皮細胞における V E - カドヘリン発現を測定する工程、
候補薬剤添加前又は対照薬剤添加群の皮膚のリンパ管内皮細胞における V E - カドヘリン発現と比較する工程、そして
V E - カドヘリン発現量の変化に基づき、候補薬剤を肌状態改善薬として選択する工程、
を含む、項目 1 2 に記載のスクリーニング方法。
- [1 4] 前記皮膚が、リンパ管構造を含む培養皮膚である、項目 1 3 に記載の方法。
- [1 5] 候補薬剤を含む培地中でリンパ管内皮細胞を培養する工程
培養後のリンパ管内皮細胞における V E - カドヘリン発現を測定する工程

、

対照におけるV Eーカドヘリン発現量と比較する工程、

V Eーカドヘリン発現変化に基づき、候補薬剤を肌状態改善薬として選択する工程

を含む、項目12に記載のスクリーニング方法。

[16] 皮膚のリンパ管の直径の増大剤を含む、肌状態改善用薬剤。

発明の効果

[0009] 本発明によると、皮膚のリンパ管の構造及び/又は形態に基づいて肌状態、特にリンパ浮腫を決定することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1Aは、正常皮膚（正常）とリンパ浮腫患者の皮膚（1型～4型）において、リンパ管を撮影した3次元画像を示す。図1Bは、リンパ管の3次元画像からリンパ管の体積を計測した結果を示す。図1Cは、リンパ管の3次元画像からリンパ管の直径を計測した結果を示す。図1Dはリンパ管の3次元画像からリンパ管の分岐数を計測した結果を示す。

[図2]図2は、正常皮膚（正常）と、リンパ浮腫患者の皮膚（2型、4型）において、V Eーカドヘリンを蛍光染色して撮影した結果を示す。

[図3]図3Aは、20代の頬皮膚と60代の頬皮膚において、リンパ管を撮影した3次元画像を示す。図3Bは、若年層（26～45歳）と中高年層（46歳～67歳）のリンパ管の3次元画像からリンパ管の体積を計測した結果を示す。図3Cは、若年層（26～45歳）と中高年層（46歳～67歳）のリンパ管の3次元画像からリンパ管の直径を計測した結果を示す。図3Dは若年層（26～45歳）と中高年層（46歳～67歳）のリンパ管の3次元画像からリンパ管の分岐数を計測した結果を示す。

[図4]図4は、正常皮膚（正常）とリンパ浮腫患者の皮膚（1型+2型、3型+4型）において、R-CHP／ヘキスト染色をして得た染色写真において、R-CHPの強度を測定して比較した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、皮膚のリンパ管の構造及び/又は形態に関するパラメータに基づき、肌状態を決定する方法に関する。

[0012] 皮膚のリンパ管は、皮膚に対し既知の観察手法を行うことで観察することができる。リンパ管を観察する手法としては、シンチグラフィー、インドシアニンググリーン蛍光造影法（ICG）、余剰皮膚染色、光干渉断層法及び光超音波イメージングが挙げられる。皮膚の真皮に存在する微細なリンパ管を特に毛細リンパ管といい、これらの手法により観察することができる。

[0013] シンチグラフィーは、リンパ浮腫診断法として確立しており生体におけるリンパ液及びその流れを可視化することができるものの、造影剤としてアイソトープを使用する点で患者への負担が大きかった。ICG造影法についても、リンパ浮腫診断法として確立されており、インドシアニンググリーンを皮下に注射することで、リンパ液及びその流れを可視化することができる。リンパ液を標識するこれらの手法は、比較的大きな集合リンパ管を可視化することが可能であり、リンパ管の輸送能を決定することができるものの、組織中にリンパ液が滲出していることから、組織抹消部における毛細リンパ管についてはバックグラウンドが高くなるという課題がある。一方、余剰皮膚を染色して蛍光顕微鏡を用いて観察することで、より小さい構造の皮膚に存在する毛細リンパ管の3次元構造を構築することが可能になった。皮膚の染色は、リンパ管特異的に発現するタンパク質を標的とすることができる。このようなタンパク質としては、ポドプラニンなどが挙げられる。一例として、皮膚試料について、抗ポドプラニン抗体を一次抗体として用い、蛍光標識二次抗体を用いることで、リンパ管特異的に蛍光標識することができる。透明化試薬を用いて透明化することで、ライトシート顕微鏡による観察が可能になる（特許文献3：国際公開第2018/030520号）。

[0014] 光干渉断層法（OCT）は、コヒーレンスな近赤外広帯域光を利用して、測定対象の垂直断層を後方散乱強度分布として画像化する手法であり、皮膚の微細構造の3次元画像を取得することができる（非特許文献3：Sci Rep. 2016 Feb 19;6:21122. doi: 10.1038/srep21122）。光超音波イメージングは

、レーザーから照射されたパルス光を吸収した組織が発する超音波を超音波センサにより受信し、受信した信号を並列信号処理することでリアルタイムに3次元画像を取得することができる（非特許文献4：F1000Res. 2018; 7: 1813. doi: 10.12688/f1000research.16743.2）

[0015] リンパ管観察手法により可視化され、3次元構築された真皮のリンパ管、特に毛細リンパ管について、体積、直径及び分岐数により解析することができる。リンパ管の体積は、単位体積に占める真皮のリンパ管の割合に関する。リンパ管の直径は、真皮のリンパ管の全長に渡って直径を計算し、その平均直径として表すことができる。リンパ管の分岐数は、単位体積に含まれる分岐数として表すことができる。体積、直径及び分岐数は、3次元構築されたリンパ管について、コンピュータ処理により適宜決定することができる。一例として、Imaris 3D/4D画像解析ソフトウェア（Zeiss）を用いることで、3次元構築されたリンパ管の体積、直径及び分岐数を決定することができる。

[0016] 皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータは、リンパ管の体積、直径、及び分岐数からなる群から選ばれる少なくとも1により決定されうる。体積、直径、及び分岐数をそれぞれそのまま形態に関するパラメータとしてもよい。さらに、体積、分岐数及び直径のうちの少なくとも2つのパラメータを組み合わせて、新たなパラメータを導いてもよい。

[0017] リンパ浮腫が悪化するに伴い、皮膚のリンパ管の直径および体積が減少する（図1A、B、C）。したがって、皮膚のリンパ管の直径と、リンパ浮腫の重症度とを関連付けることができる。また、早期のリンパ浮腫（1型および2型）では分岐数が増大し、次いで進行リンパ浮腫（3型および4型）ではリンパ管が縮退するとともに分岐数が減少する（図1A、D）。したがって、皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータ、例えば体積、直径又は分岐数の変化をリンパ浮腫の重症度と関連付けることができ、さらにはリンパ管の形態に関するパラメータについてリンパ浮腫の重症度と関連付けた閾値を設定することもできる。一例として、直径の閾値について、例えば40 μm

又は $35\text{ }\mu\text{m}$ を設定することができ、斯かる閾値よりも低い場合にリンパ浮腫であると決定することができる。一例として、体積の閾値について、例えば 2.5% 又は 2.0% を設定することができ、斯かる閾値よりも低い場合にリンパ浮腫であると決定することができる。さらに、皮膚のリンパ管の分岐数をさらに考慮に入れてリンパ浮腫を決定することもできる。一例として、皮膚のリンパ管の直径及び/又は体積が減少した一方、皮膚のリンパ管の分岐数が増大している場合、皮膚のリンパ管はより分岐数の多い細い状態となっていることを示しており、早期のリンパ浮腫であることを決定することができる。一方、皮膚のリンパ管の直径及び/又は体積が減少し、さらに皮膚のリンパ管の分岐数が減少した場合には、リンパ管が縮退したことを示しており、リンパ浮腫及び肌状態の更なる悪化、すなわち進行リンパ浮腫を判定することができる。

[0018] リンパ浮腫と肌状態との関係も知られており、リンパ浮腫により角層を含む表皮の厚さが増大することが知られている（非特許文献1）。また、リンパ浮腫の悪化により、真皮においてコラーゲン産生が増大し、かつ変性する（図4）。そうすると、リンパ浮腫の悪化は肌状態の悪化とも関連する。これにより、リンパ浮腫の重症度を判定することにより、肌状態を決定することもできる。したがって、皮膚のリンパ管の構造及び/又は形態に関するパラメータに基づき、肌状態を決定することができる。より具体的に、皮膚のリンパ管の体積、直径又は分岐数の変化を肌状態の悪化と関連付けることができる。体積及び/又は直径が減少した場合に、肌状態が悪化していると決定することができる。さらに、皮膚のリンパ管の分岐数をさらに考慮に入れて肌状態を決定することもできる。

[0019] 皮膚のリンパ管の形態は、年齢に応じても変化する（図3A）。加齢に伴いリンパ管の体積は減少する傾向が見られる（図3B）。また、若年層では、皮膚のリンパ管の直径は大きく、かつ分岐数は少ない一方、中高年層ではリンパ管の直径は小さくなり、分岐数が多くなる（図3C及びD）。加齢により肌状態は悪化することから、正常皮膚でもリンパ管形態は肌状態と関連

することが示されている。したがって、皮膚のリンパ管の形態は、リンパ浮腫という病的状態の悪化度の指標となるのみではなく、正常皮膚の悪化の指標となる。一例として、直径の閾値について、例えば $35\text{ }\mu\text{m}$ 又は $30\text{ }\mu\text{m}$ を設定することができ、斯かる閾値よりも低い場合に肌状態が悪化していると決定することができる。体積の閾値について、適宜設定することができ、一例として、 2.5% 、又は 2.0% を使用することができる。斯かる閾値よりも低い場合に肌状態が悪化していると決定することができる。さらに、皮膚のリンパ管の分岐数をさらに考慮に入れて肌状態を決定することもできる。一例として、皮膚のリンパ管の直径及び/又は体積が減少した一方、皮膚のリンパ管の分岐数が増大している場合、皮膚のリンパ管はより分岐数の多い細い状態となっていることを示しており、肌状態の悪化を決定することができる。肌状態の決定は、美容目的で行われる。リンパ管が細く、体積が少なくなり、及び/又は分岐数が増大していることが判定された場合に、リンパ管の健康状態を維持するための美容処置を提供することができる。かかる美容処置としては、皮膚のマッサージや、肌状態改善剤などの適切な化粧料の提示などが行われうる。したがって、本発明の別の態様では、皮膚のリンパ管の構造及び/又は形態に関するパラメータに基づき美容処置を決定又は提供する方法にも関する。提供される肌状態改善剤は、本発明におけるスクリーニング方法によりスクリーニングされた肌状態改善剤が好ましい。

[0020] 皮膚のリンパ管の構造に関するパラメータとして、皮膚のリンパ管におけるVE-カドヘリンの発現が挙げられる。リンパ浮腫が悪化するに伴い、皮膚のリンパ管におけるVE-カドヘリンの発現量が増大する(図2)。したがって、皮膚のリンパ管におけるVE-カドヘリンの発現量と、リンパ浮腫の重症度とを関連付けることができる。VE-カドヘリンの発現量は、皮膚試料を染色して、抗VE-カドヘリン抗体と蛍光標識二次抗体を用いた蛍光顕微鏡を用いて観察することができる。VE-カドヘリンはリンパ管と血管の両方に存在するため、リンパ管と血管とを区別するために、さらにリンパ管特異的に発現するポドプラニンと共染色してもよいし、管の構造から血管とり

ンパ管とを識別してもよい。さらに別の態様では、皮膚試料からリンパ管を単離し、単離されたリンパ管についてタンパク質量又はmRNA量を計測することにより行われてもよい。タンパク質量又はmRNA量は、常法に基づいて測定することができるが、一例としてウエスタンブロッティング又は定量的PCRなどが行われうる。リンパ浮腫が悪化するほど、皮膚のリンパ管におけるVE-カドヘリンの発現量が高まることが示された。これにより、皮膚のリンパ管におけるVE-カドヘリンの発現量と、リンパ浮腫の重症度を関連付けることができ、VE-カドヘリンの発現量が増加するほど、リンパ浮腫は悪化する。リンパ浮腫とリンパ管の構造との関連が示されているので、リンパ管の形態に関するパラメータと同様に、リンパ管の構造に関するパラメータも、リンパ浮腫という病的状態の悪化度の指標となるのみではなく、正常皮膚の悪化の指標となる。

[0021] VEカドヘリンは、カドヘリン5又はCD144とも呼ばれる分子量約140kDaのタンパク質であり、カドヘリンスーパーファミリーに属するタンパク質である。VE-カドヘリンは、内皮細胞に特異的であり、リンパ管内皮細胞及び血管内皮細胞において発現し、細胞膜に存在する（特許文献2：国際公開第2019/097958号）。VE-カドヘリン分子は、血管内皮やリンパ管内皮の透過性に関与することが知られている。理論に限定されることを意図するものではないが、VEカドヘリンの発現が増加することで、リンパ管内皮細胞同士の接着性が高まり、リンパ液の回収が阻害されうる。

[0022] 本発明の別の態様では、皮膚のリンパ管の構造及び/又は形態に基づくパラメータと、肌状態との関連から、肌状態から皮膚のリンパ管構造を予測する方法に関していてもよい。表皮状態及び/又は真皮コラーゲンの変性に基づく肌状態を決定することにより、皮膚のリンパ管構造を予測し、それによりむくみや浮腫の進行を予測することができる。

[0023] 本発明の別の態様では、本発明は皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータを指標とした肌状態改善薬のスクリーニング方法にも関する。より具体的には本発明のスクリーニング方法は以下の工程：

候補薬剤を皮膚に添加する工程、
添加後の皮膚のリンパ管の形態を撮影する工程、
撮影された画像に基づきリンパ管の形態に関するパラメータを計算する工程、
候補薬剤添加前又は対照薬剤添加群の皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータと比較する工程、そして
パラメータの変化に基づき、候補薬剤を肌状態改善薬として選択する工程、
を含む。この方法を行うことにより、候補薬剤を肌状態改善剤としてスクリーニングすることができる。皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータは、リンパ管の体積、分岐数及び／又は直径を使用することができる。リンパ管の形態に関するパラメータの変化が生じる期間にわたり、繰り返し候補薬剤を皮膚に添加する工程を行ってもよい。対照薬剤添加群は、候補薬剤が添加されない点でのみ異なってもよい。本発明のスクリーニング方法において用いられる皮膚は、リンパ管構造を含む培養皮膚、余剰皮膚の培養組織であってもよいし、動物の皮膚であってもよく、ヒトの生体の皮膚であってもよい

[0024] 本発明のさらに別の態様では、本発明は、皮膚のリンパ管細胞のVEーカドヘリン発現に基づく、肌状態改善薬のスクリーニング方法にも関する。より具体的には本発明のスクリーニング方法は以下：

候補薬剤を皮膚に添加する工程、
添加後の皮膚のリンパ管細胞におけるVEーカドヘリン発現を測定する工程、
候補薬剤添加前又は対照薬剤添加群の皮膚のリンパ管におけるVEーカドヘリン発現と比較する工程、そして
VEーカドヘリン発現変化に基づき、候補薬剤を肌状態改善薬として選択する工程、
を含む。この方法を行うことにより、皮膚のリンパ管において、VEーカ

ドヘリン発現を抑制可能な候補薬剤を肌状態改善剤としてスクリーニングすることができる。対照薬剤添加群は、候補薬剤が添加されない点でのみ異なっている点でもよい。本発明のスクリーニング方法において用いられる皮膚は、リンパ管構造を含む培養皮膚、余剰皮膚の培養組織であってもよいし、動物の皮膚であってもよい。

[0025] さらに別の態様では、リンパ管細胞の培養物に対してスクリーニング方法が行われてもよい。

具体的には、以下の：

候補薬剤を含む培地中でリンパ管細胞を培養する工程、

培養後のリンパ管細胞におけるV Eーカドヘリン発現を測定する工程、

対照におけるV Eーカドヘリン発現量と比較する工程、及び

V Eーカドヘリン発現変化に基づき、候補薬剤を肌状態改善薬として選択する工程

を含む。リンパ管細胞は、リンパ管細胞単独で培養されてもよいし、他の細胞と合わせて培養されてもよく、対照は、候補薬剤が添加されない点でのみ異なっている群であるか、又は候補薬剤添加前の群であってもよい。例えば皮膚培養物として培養されてもよい。リンパ管細胞においてV Eーカドヘリン発現を抑制可能な候補薬剤を肌状態改善剤としてスクリーニングすることができる。リンパ管細胞は、特にリンパ管内皮細胞である。

[0026] スクリーニング方法に使用される候補薬剤は、任意のライブラリーに含まれる薬剤を用いることができる。一例として、公知の化粧品素材ライブラリー、医薬品ライブラリーが用いられてもよい。これらのライブラリーは化合物ライブラリーであってもよいし、エキスライブラリーであってもよい。

[0027] 本発明において肌状態改善剤とは、肌の一般的性状、特にリンパ浮腫又はむくみに関する肌状態を改善することができる薬剤をいう。肌状態改善剤は、化粧料、医薬品、又は医薬部外品に配合されてもよいし、食品、例えばサプリメントなどの栄養補助食品に配合されてもよい。理論に限定されることを意図するものではないが、V Eーカドヘリンの発現や皮膚のリンパ管の機

能を改善することで、肌状態、特にむくみ又はリンパ浮腫を改善することができる。したがって、肌状態改善剤は、むくみ又はリンパ浮腫の治療、予防又は改善剤ともいうことができ、またリンパ管の直径及び/又は体積の増大剤ともいうことができる。肌状態改善剤は、経皮、経粘膜、経口、皮下、筋中など任意の投与経路で投与することができるが、皮膚直下のリンパ管に作用させる観点から、経皮投与が好ましい。

[0028] 本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書に取り込まれる。

[0029] 以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことができる。

実施例

[0030] 実施例 1：リンパ浮腫患者由来の皮膚試料におけるリンパ管の解析

リンパシンチグラフィを用いてリンパ浮腫の重症度(1型～4型)を判定された下肢リンパ浮腫患者の手術余剰皮膚及び正常の下肢皮膚試料を千葉大学医学部附属病院より提供を受けた。余剰皮膚を実験に使用することについては各患者からインフォームドコンセントを取得した。

[0031] 下肢の余剰皮膚組織に熱処理(60℃, 1分)を加えて、表皮を剥離し、4%パラホルムアルデヒド(PFA)/生理食塩水(PBS)にて一晩固定した。PFA固定済皮膚組織に対し、2%Triton-X100/PBSで膜透過処理を1晩行い、次いで5%ロバ血清/PBSで一晩ブロッキングした。その後、一次抗体として抗ポドプラニン抗体(Dako Cytomation, #M3619)/5%ロバ血清/PBSで3日間インキュベートした後、PBSで洗浄し、2次抗体としてAlexa647標識抗マウス(H+L)抗体(Invitrogen)/5%ロバ血清/PBSで一晩インキュベートした。免疫染色した皮膚組織を、透明化試薬:Rapid

ear 1.52 (SunJin Lab Co.) に浸漬し透明化した。こうして得られた試料を、LSM880 (ZEISS) を使用して蛍光顕微鏡観察を行い、皮膚のリンパ管について3次元画像を取得した (図1A)。3次元画像から、リンパ管の体積、直径及び分岐数について、Imaris 3D/4D画像解析ソフトウェア (Zeiss) を用いて決定した (図1B～図1D)。リンパ浮腫が悪化するに伴い、皮膚のリンパ管の直径および体積が減少した (図1A、B、C)。早期のリンパ浮腫 (1型および2型) では分岐数が増大し、次いで進行リンパ浮腫 (3型および4型) では分岐数が減少した

[0032] 下肢の余剰皮膚組織に熱処理 (60℃, 1分) を加えて、表皮を剥離し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) /生理食塩水 (PBS) にて一晩固定した。PFA固定済皮膚組織に対し、CUBIC-L (wako) を使用して一週間37℃で脱脂した後、5%ロバ血清/PBSで一晩ブロッキングした。その後、一次抗体として抗VE-カドヘリン抗体 (Cell signaling, #2500) /5%ロバ血清/PBSで3日間インキュベートした後、洗浄し、2次抗体としてAlexa568標識抗ウサギ (H+L) 抗体 (Invitrogen) /5%ロバ血清/PBSで一晩インキュベートした。免疫染色した皮膚組織は、透明化試薬に浸漬することにより透明化した。透明化試薬は、CUBIC-R+ (wako) を使用した。こうして得られた試料を、LSM880 (ZEISS) を使用して蛍光顕微鏡観察を行った (図2)。リンパ浮腫が悪化するに伴い、皮膚のリンパ管におけるVEカドヘリンの発現量が増大した。

[0033] 実施例2：健常人におけるリンパ管の加齢変化

20代～60代女性の頬余剰皮膚をObio, LLC. より入手した。頬の余剰皮膚組織に熱処理 (60℃, 1分) を加えて、表皮を剥離し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) /生理食塩水 (PBS) にて一晩固定した。PFA固定済皮膚組織に対し、2%Triton-X100/PBSで膜透過処理を1晩行い、次いで5%ロバ血清/PBSで一晩ブロッキングし

た。その後、一次抗体として抗ポドプラニン抗体 (D a k o C y t o m a t i o n, # M 3 6 1 9) / 5 % ロバ血清 / P B S で 3 日間インキュベートした後、P B S で洗浄し、2 次抗体として A l e x a 6 4 7 標識抗マウス (H + L) 抗体 (I n v i t r o g e n) / 5 % ロバ血清 / P B S で一晩インキュベートした。免疫染色した皮膚組織を、透明化試薬 : R a p i c l e a r 1. 5 2 (S u n J i n L a b C o.) に浸漬し透明化した。こうして得られた試料を、L S M 8 8 0 (Z E I S S) を使用して蛍光顕微鏡観察を行い、皮膚のリンパ管について 3 次元画像を取得した (図 3 A)。3 次元画像から、リンパ管の直径及び分岐数について、I m a r i s 3 D / 4 D 画像解析ソフトウェア (Z E I S S) を用いて決定した (図 3 B 及び図 3 C)。皮膚のリンパ管の形態は、年齢に応じて変化した (図 3 A)。加齢に伴いリンパ管の体積は減少する傾向が見られた (図 3 B)。また、若年層では、リンパ管の直径は大きく、かつ分岐数は少ない一方、中高年層ではリンパ管の直径は小さくなり、分岐数が多くなった (図 3 C 及び D)。

[0034] 実施例 3 : リンパ浮腫患者由来の皮膚試料におけるコラーゲンの変性

リンパシンチグラフィを用いてリンパ浮腫の重症度 (1 型 ~ 4 型) を判定された下肢リンパ浮腫患者の手術余剰皮膚、及び対照として、正常の下肢皮膚試料を千葉大学医学部附属病院より提供を受けた。余剰皮膚を実験に使用することについては各患者からインフォームドコンセントを取得した。

[0035] 皮膚試料を凍結し、50 μ m の厚さの凍結切片を取得した。凍結切片を R - C H P (3 H e l i x I n c.) をプロトコルに従い用いて変性コラーゲンを染色した。染色画像について画像解析ソフト F i j i を使用して変性コラーゲンを定量した (図 4)。リンパ浮腫の悪化により、真皮において変性コラーゲン産生が増大した。

請求の範囲

- [請求項1] 皮膚のリンパ管の構造及び/又は形態に関するパラメータに基づき、肌状態を決定する方法。
- [請求項2] 前記皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータが、リンパ管の体積、分岐数及び直径からなる群から選ばれる少なくとも1により決定される、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータが、リンパ管の直径である場合に、リンパ管直径の変化により、肌状態が悪化していると決定する、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータが、さらにリンパ管の分岐数も考慮し、肌状態が悪化していると決定する、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記皮膚のリンパ管の形態が、光干渉断層装置又は光超音波イメージングにより測定される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 前記皮膚のリンパ管の構造に関するパラメータが、皮膚のリンパ管におけるVEーカドヘリンの発現量により決定される、請求項1に記載の方法。
- [請求項7] 皮膚のリンパ管における前記VEーカドヘリンの発現の増加により、肌状態が悪化していると決定する、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータを指標とした、肌状態改善薬のスクリーニング方法。
- [請求項9] 候補薬剤を皮膚に添加する工程、
添加後の皮膚のリンパ管の形態を撮影する工程、
撮影された画像に基づき皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータを計算する工程、
候補薬剤添加前又は対照薬剤添加群の皮膚における皮膚のリンパ管形態に関するパラメータと比較する工程、そして

パラメータの変化に基づき、候補薬剤を肌状態改善薬として選択する工程、

を含む請求項 8 に記載のスクリーニング方法。

[請求項10] 前記皮膚のリンパ管の形態に関するパラメータが、リンパ管の分岐数及び直径からなる群から選ばれる少なくとも 1 により決定される、請求項 9 に記載の方法。

[請求項11] 前記皮膚が、リンパ管構造を含む培養皮膚である、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

[請求項12] リンパ管内皮細胞の V E -カドヘリン発現量を指標とした、肌状態改善薬のスクリーニング方法。

[請求項13] 候補薬剤を皮膚に添加する工程、
添加後の皮膚のリンパ管内皮細胞における V E -カドヘリン発現を測定する工程、

候補薬剤添加前又は対照薬剤添加群の皮膚のリンパ管内皮細胞における V E -カドヘリン発現と比較する工程、そして

V E -カドヘリン発現量の変化に基づき、候補薬剤を肌状態改善薬として選択する工程、

を含む、請求項 1 2 に記載のスクリーニング方法。

[請求項14] 前記皮膚が、リンパ管構造を含む培養皮膚である、請求項 1 3 に記載の方法。

[請求項15] 候補薬剤を含む培地中でリンパ管内皮細胞を培養する工程
培養後のリンパ管内皮細胞における V E -カドヘリン発現を測定する工程、

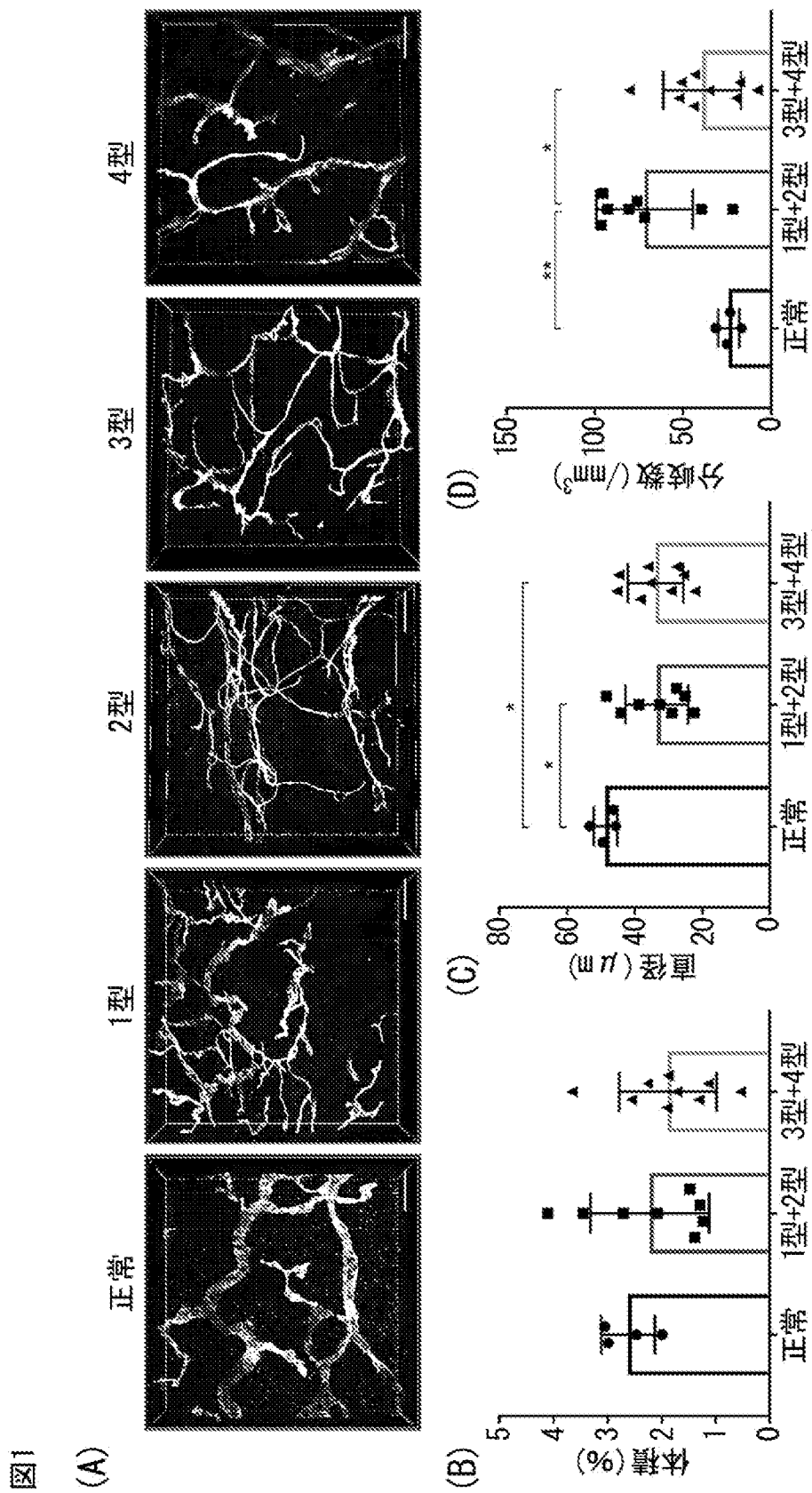
対照における V E -カドヘリン発現量と比較する工程、

V E -カドヘリン発現変化に基づき、候補薬剤を肌状態改善薬として選択する工程

を含む、請求項 1 2 に記載のスクリーニング方法。

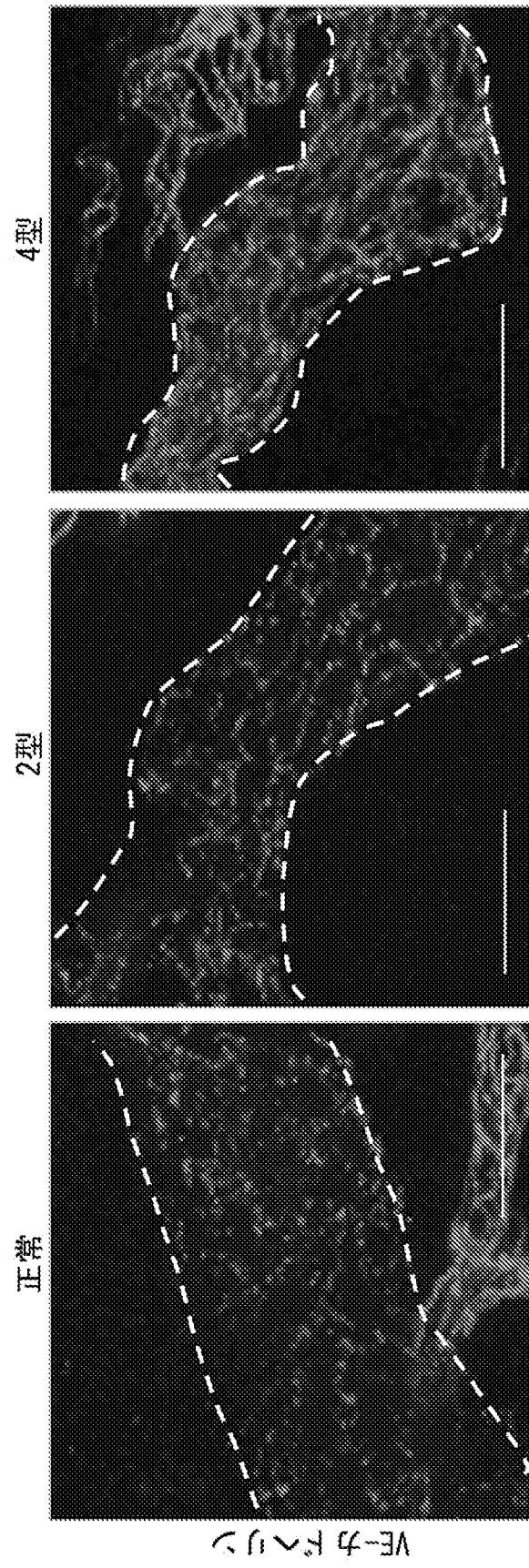
[請求項16] 皮膚のリンパ管の直径の増大剤を含む、肌状態改善用薬剤。

[図1]

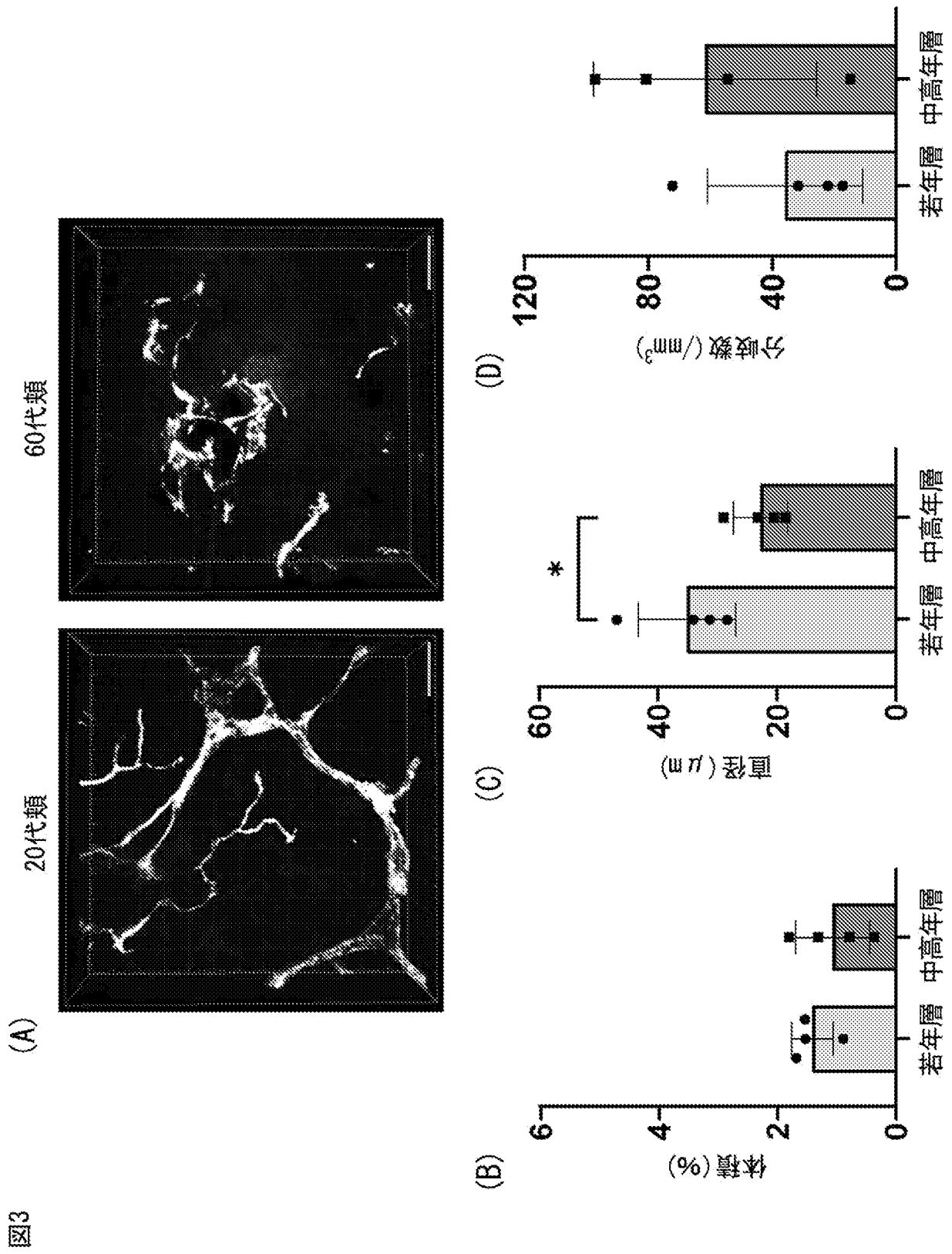


[図2]

図2

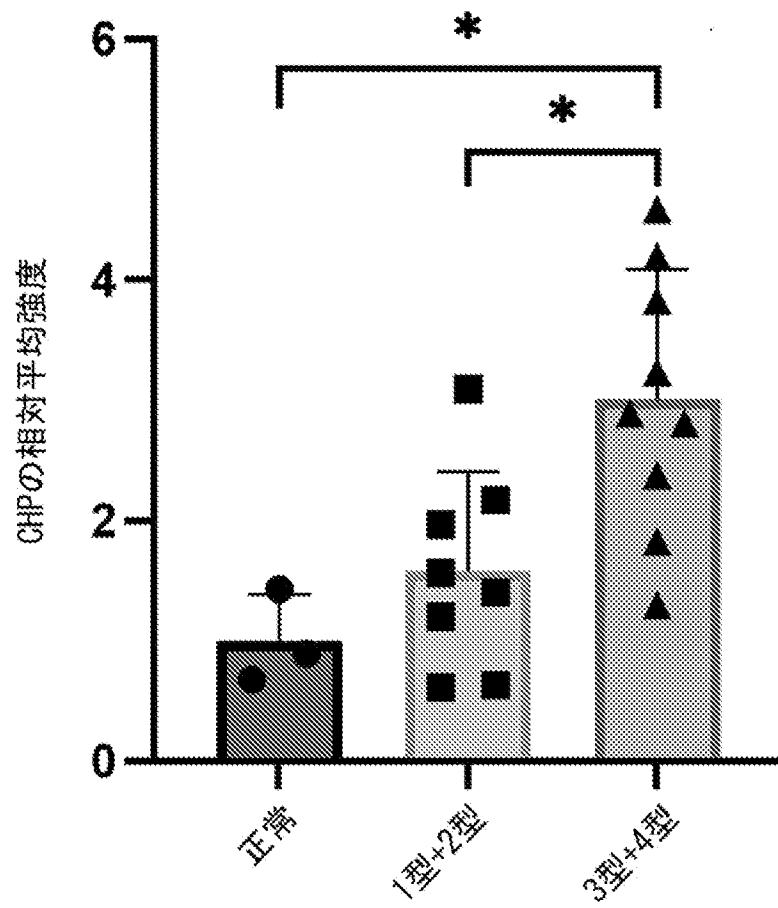


[図3]



[図4]

図4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/015121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61B 5/107(2006.01)i; **A61B 5/00**(2006.01)i; **A61B 8/13**(2006.01)i; **A61B 10/00**(2006.01)i; **A61K 45/00**(2006.01)i;
A61P 17/00(2006.01)i; **G01N 33/50**(2006.01)i; **G01N 33/68**(2006.01)i
 FI: A61B5/107 800; A61B5/00 M; A61B8/13; A61B10/00 E; A61K45/00; A61P17/00; G01N33/50 Q; G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61B5/107; A61B5/00; A61B8/13; A61B10/00; A61K45/00; A61P17/00; G01N33/50; G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/0051644 A1 (TABIBIAZAR, Raymond) 28 February 2008 (2008-02-28) abstract, paragraphs [0021], [0042], [0048], [0113], [0136]-[0138], [0149]-[0194], [0207]-[0210]	1-3, 8-11, 16
Y	abstract, paragraphs [0021], [0042], [0048], [0113], [0136]-[0138], [0149]-[0194], [0207]-[0210]	4-7, 12-15
Y	JP 2022-500020 A (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA) 04 January 2022 (2022-01-04) paragraphs [0110], [0119]-[0124], [0157], [0160], [0183]-[0184]	4, 6-7, 12-15
Y	JP 2019-63049 A (SHISEIDO CO LTD) 25 April 2019 (2019-04-25) paragraphs [0018]-[0022]	5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 May 2023

Date of mailing of the international search report

13 June 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/015121

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	新たな着眼点により美容食品に応用も ルイボスエキスにリンパ管内皮細胞の接着機能向上を確認 皮膚の弾力性向上や肌荒れ改善に寄与, POLA ORBIS HOLDINGS NEWS RELEASE, ポーラ・オルビスホールディングス コーポレートコミュニケーション室, 24 August 2015, http://www.pola-rm.co.jp/pdf/release_20150824.pdf p. 1, non-official translation (Also applied to beauty foods with a new point of view. Confirmed that rooibos extract improves the adhesion function of lymphatic endothelial cells. Contributes to enhancing skin elasticity and improving rough skin. POLA ORBIS HOLDINGS INC., Corporate Communication Office.)	6-7, 12-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/015121

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2008/0051644	A1	28 February 2008	(Family: none)	
JP	2022-500020	A	04 January 2022	US 2022/0112558 A1 paragraphs [0134], [0143]- [0148], [0182], [0185], [0229]- [0235] KR 10-2021-0057088 A CN 112996542 A WO 2020/051580 A1	
JP	2019-63049	A	25 April 2019	US 2020/0237293 A1 paragraphs [0035]-[0040] WO 2019/064764 A1 KR 10-2020-0061321 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61B 5/107(2006.01)i; A61B 5/00(2006.01)i; A61B 8/13(2006.01)i; A61B 10/00(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i FI: A61B5/107 800; A61B5/00 M; A61B8/13; A61B10/00 E; A61K45/00; A61P17/00; G01N33/50 Q; G01N33/68		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61B5/107; A61B5/00; A61B8/13; A61B10/00; A61K45/00; A61P17/00; G01N33/50; G01N33/68 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	US 2008/0051644 A1 (TABIBIAZAR, Raymond) 28.02.2008 (2008-02-28) [要約]、段落 [0021]、[0042]、[0048]、[0113]、 [0136] - [0138]、[0149] - [0194]、[0207] - [0210]	1-3, 8-11, 16
Y	[要約]、段落 [0021]、[0042]、[0048]、[0113]、 [0136] - [0138]、[0149] - [0194]、[0207] - [0210]	4-7, 12-15
Y	JP 2022-500020 A (ザ・チルドレンズ・ホスピタル・オブ・フィラデルフィア) 04.01.2022 (2022-01-04) 段落 [0110]、[0119] - [0124]、[0157]、[016 0]、[0183] - [0184]	4, 6-7, 12-15
Y	JP 2019-63049 A (株式会社 資生堂) 25.04.2019 (2019-04-25) 段落 [0018] - [0022]	5
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 26.05.2023		国際調査報告の発送日 13.06.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 遠藤 直恵 2Q 3701 電話番号 03-3581-1101 内線 3292

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	新たな着眼点により美容食品に応用も ルイボスエキスにリンパ管内皮細胞の接着機能向上を確認 皮膚の弾力性向上や肌荒れ改善に寄与, POLA ORBIS HOLDINGS NEWS RELEASE, ポーラ・オルビスホールディングス コーポレートコミュニケーション室, 2015.08.24, http://www.pola-rm.co.jp/pdf/release_20150824.pdf 第1頁	6-7, 12-15

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/015121

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
US	2008/0051644	A1	28.02.2008	(ファミリーなし)	
JP	2022-500020	A	04.01.2022	US 2022/0112558 A1	
				段落 [0134]、[0143] - [0148]、	
				[0182]、[0185]、[0229] - [0235]	
				KR 10-2021-0057088 A	
				CN 112996542 A	
				WO 2020/051580 A1	
JP	2019-63049	A	25.04.2019	US 2020/0237293 A1	
				段落 [0035] - [0040]	
				WO 2019/064764 A1	
				KR 10-2020-0061321 A	