



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201117111 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：098137923

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 11 月 09 日

(51)Int. Cl. : **G06K9/78 (2006.01)**

(71)申請人：國立中山大學(中華民國) NATIONAL SUN YAT-SEN UNIVERSITY (TW)

高雄市鼓山區蓮海路 70 號

(72)發明人：溫志宏 WEN, ZHI HONG (TW)；吳柏賢 WU, PO SHIEN (TW)；劉文生 LIU, WEN SHENG (TW)；張富信 CHANG, FU HSIN (TW)；陳琮歲 CHEN, TSUNG WEI (TW)

(74)代理人：高玉駿；楊祺雄

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：10 共 48 頁

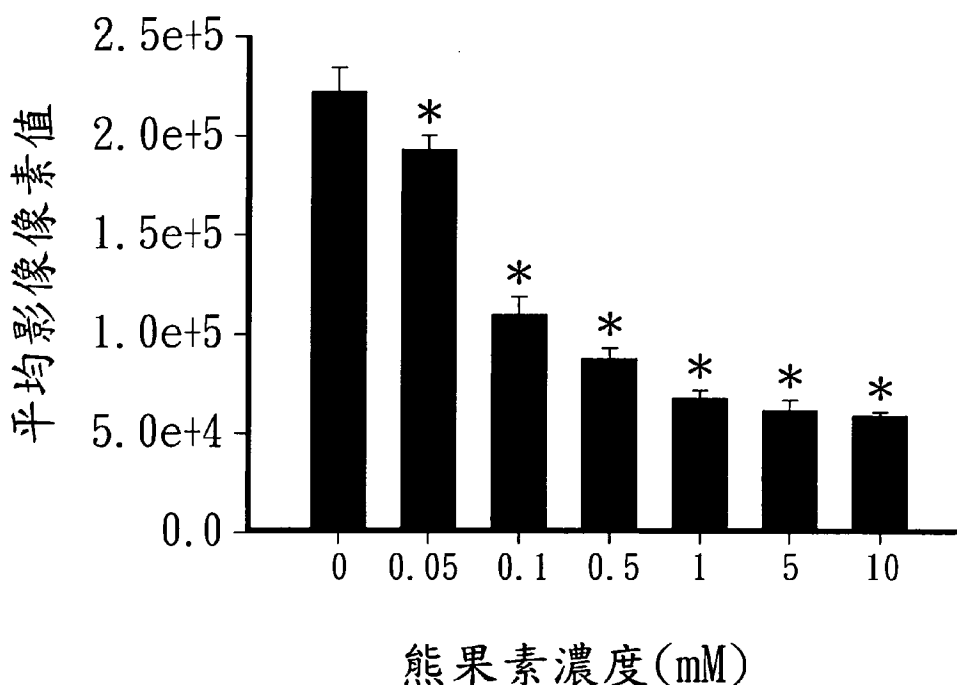
(54)名稱

用於篩選一作為一皮膚美白劑之候選物的魚體影像分析系統及其應用

FISH BODY IMAGE ANALYSIS SYSTEM FOR USE IN THE SCREENING OF A CANDIDATE AS A SKIN WHITENING AGENT AND APPLICATIONS OF THE SAME

(57)摘要

本發明揭示一種用於篩選一作為一皮膚美白劑之候選物的魚體影像分析系統，其包含有一第一族群的斑馬魚、一第二族群的斑馬魚、一影像擷取裝置以及一影像分析軟體。該魚體影像分析系統可被用來篩選一皮膚美白劑。



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於一種用於篩選一作為一皮膚美白劑 (skin whitening agent) 之候選物 (candidate) 的魚體影像分析系統 (fish body image analysis system)，其包含有一第一族群的斑馬魚、一第二族群的斑馬魚、一影像擷取裝置 (image capture device) 以及一影像分析軟體 (image analysis software)。該魚體影像分析系統可被用來篩選一皮膚美白劑。

### 【先前技術】

環境因素 [ 諸如太陽紫外光射線 (solar ultraviolet rays) ] 或生理因素 [ 諸如疲勞 (fatigue) 或壓力 (stress) ] 會誘發在皮膚的黑色素細胞 (melanocytes) 內的黑色素 (melanin) 的生物合成 (biosynthesis) [ 亦即，黑色素生成 (melanogenesis) ]，進而使得大量的黑色素被累積於皮膚上。為了追求淨白無瑕的膚色，大多數人會藉由使用一些皮膚美白劑 (skin whitening agents) [ 例如，熊果素 (arbutin)、N-苯基硫脲 (N-phenylthiourea, PTU) 以及麴酸 (kojic acid) 等 ] 來淡化或去除累積於皮膚上的黑色素。人類對於皮膚美白劑的需求與日俱增，現今醫藥界以及化妝品工業的研究人員不斷地研發出具有更佳美白效用的皮膚美白劑來滿足廣大的市場需求。因此，如何以更精確且客觀的系統或方法來篩選一皮膚美白劑，即成為相關研究人員之一重要的研究方向。

目前相關研究人員在進行皮膚美白劑的研發時，大多

會使用下列的分析方法來進行美白效用的評估，包括：(1) 活體外細胞模型(*in vitro* cell model)[例如，B16 黑色素瘤細胞(B16 melanoma cell)以及鼠 Melan-a 黑色素細胞(murine Melan-a melanocyte)等]的分析方法；以及(2)活體內動物模型(*in vivo* animal model)[例如，猶加敦迷你豬(Yucatan miniature swine)以及天竺鼠(guinea pig)等]的分析方法(H. Ando *et al.* (1998), *Archives of Dermatological Research*, 290:375-381; J.H. Kim *et al.* (2008), *Journal of Investigative Dermatology*, 128:1227-1235)。

基於研發成本以及時間的考量，活體外細胞模型的分析方法是最常被使用的。然而，皮膚美白劑主要是供施用於人體，因此，一藉由活體外細胞模型的分析方法而被篩選出的皮膚美白劑通常會被要求要以活體內動物模型的分析方法來作進一步的效用評估。

啮齒類動物(rodent animals)[諸如，小鼠(mouse)、大鼠(rat)以及天竺鼠(guinea pig)等]是最常被使用的活體內動物模型，但是，啮齒類動物具有下列難以克服的缺點而致使在研發成本以及時間上的花費較高：(1)需要較大的飼養空間，並且需要精準地控制該飼養空間的環境條件；(2)在進行測試前，需要先將測試位址(testing site)的皮膚的毛髮除去，接著以紫外光(ultraviolet)來誘發該測試位址的皮膚的黑色素生成，並且需要使用複雜的實驗操作程序來觀察黑色素沉澱的情形；(3)在進行測試時，需要對受測試的啮齒類動物投予大量的皮膚美白劑；(4)個體間差異(inter-

individual difference)較大，容易造成實驗誤差(experimental error)；以及(5)齧齒類動物皮膚的黑色素變化情形觀察不易，難以將所獲得的實驗結果數值化並與對照組進行統計分析。

為了克服上述的缺點，本領域中的相關研究人員皆致力於發展更適合供用於篩選一皮膚美白劑之候選物的活體內動物模型。

斑馬魚[英文名：zebrafish；拉丁學名：*Danio rerio* (Hamilton, 1822)]是一種小型的熱帶魚類(tropical fish)[成體(adults)大約長 1 英吋(inch)]。斑馬魚可以產生光學透明的胚胎(optical transparent embryos)，並且這些胚胎可以在母體外快速地發育。在受精的第 6 天之後，斑馬魚的一個複雜的循環系統(circulatory system)以及與多數哺乳動物器官對應的部分已經被發育出來。傳統上，斑馬魚主要地被用作為一種在脊椎動物(vertebrates)的分子遺傳學(molecular genetics)以及發育生物學(developmental biology)的領域中的模型生物(model organism)。

斑馬魚的體表具有黑色素(melanin pigment)而無需使用複雜的實驗操作程序來誘發黑色素生成以及觀察黑色素沉澱的情形。此外，斑馬魚具有價格便宜、所需要的飼養空間小、容易飼養、需要投予的皮膚美白劑的數量較低以及基因組 DNA (genomic DNA)已經被完整地解碼等優點。因此，近年來藉由使用斑馬魚作為活體內動物模型來篩選一皮膚美白劑的方法開始受到重視。

在 T.Y. Choi *et al.* (2007), *Pigment Cell & Melanoma Research*, 20:120-127 中，T.Y. Choi 等人揭示一種以斑馬魚作為活體內動物模型來篩選以及評估黑色素生成調節化合物(melanogenic regulatory compounds)的方法，該方法包含下列步驟：(1)首先，將所收集到之同時期的斑馬魚胚胎(synchronized zebrafish embryos)置於含有 200  $\mu$ L 胚胎培養基(embryo medium)的 96-井培養盤(96-well plate)中，繼而在該等胚胎受精後的第 9 小時之時加入配於 0.1% DMSO 的待測化合物並予以培育歷時 63 小時，並且使用不會干擾發育過程的 0.2 mM PTU 來產生作為標準正對照組(standard positive control)的透明斑馬魚；(2)胚胎以鑷子(forcepe)而被去除絨毛膜(dechorionated)，接而以三卡因甲烷磺酸鹽溶液(tricaine methanesulfonate solution)予以麻醉並且以 3% 甲基纖維素(methyl cellulose)而被固定於單凹載玻片(depression slide)上；以及(3)使用 MZ16 立體顯微鏡(stereomicroscope)來進行拍照並以視觀的方式來分析照片中斑馬魚胚胎的黑色素變化，而待測化合物在斑馬魚的色素生成上的效用被任意評分(arbitrary scored)如下：無(none)或輕度(mild)，<10%；中度(moderate)，10%至 49%；以及重度(profound)，>50%。

在 J.H. Kim *et al.* (2008)(同上述)中，J.H. Kim 等人分別使用以鼠 Melan-a 黑色素細胞(murine Melan-a melanocyte)作為活體外細胞模型的分析方法、以棕色天竺鼠(brown guinea pig)作為活體內動物模型的分析方法以及

T.Y. Choi 等人所揭示的以斑馬魚作為活體內動物模型的分析方法(T.Y. Choi *et al.* (2007), 同上述)來評估 haginin A 的美白效用。藉由上述的 3 種分析方法所得到的實驗結果皆顯示：haginin A 對於黑色素生成具有抑制效用。

雖然 T.Y. Choi 等人所揭示的以斑馬魚作為活體內動物模型的分析方法(T.Y. Choi *et al.* (2007), 同上述)確實可以被用來篩選一皮膚美白劑之候選物，但是以視觀的方式來分析照片中斑馬魚胚胎的黑色素變化情形無法精確且客觀地呈現出該候選物的美白效用，更無法將所獲得的實驗結果數值化並與對照組進行統計分析，進而瞭解實驗結果是否具有統計學顯著性(statistical significance)。

近年來，在癌症藥物(cancer drug)的開發、癌細胞的特定細胞的形態分析以及癌細胞的蛋白質體分析(proteomic analysis)等的相關研究中，影像分析軟體(image analysis software)(例如，Scion 或 Image J 等)已被廣泛地應用於分析受測試細胞的形態、大小以及所表現的蛋白質的數量等。

就申請人所知，迄今尚無任何文獻或專利前案曾經揭示影像分析軟體可以被用來分析斑馬魚的魚體黑色素的變化情形。

經研究，申請人意外地發現：經一皮膚美白劑處理的斑馬魚的魚體黑色素變化可以藉由使用一影像分析軟體而被數值化(numerated)，而藉此所得到的數據可供用於更精確且客觀地評估該皮膚美白劑的美白效用。

### 【發明內容】

發明概要

於是，在第一個方面，本發明提供一種用於篩選一作為一皮膚美白劑之候選物的魚體影像分析系統(fish body image analysis system)，其包含有：

一第一族群的斑馬魚，該第一族群的斑馬魚是在一適當的培養條件下被培育出；

一第二族群的斑馬魚，該第二族群的斑馬魚是在與該第一族群的斑馬魚相同的培養條件下被培育出，並且在培育的過程中該第二族群的斑馬魚允許要被投藥以一候選物；

一影像擷取裝置，它被用來對在該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚的魚體體表上具有黑色素的位址進行影像擷取，藉此而分別得到一第一族群斑馬魚魚體影像以及一第二族群斑馬魚魚體影像；以及

一影像分析軟體，它被用來對該第一族群斑馬魚魚體影像以及該第二族群斑馬魚魚體影像進行分析，俾以分別得到一第一平均影像像素值以及一第二平均影像像素值，其中若該第二平均影像像素值是低於該第一平均影像像素值，並且該第二平均影像像素值與該第一平均影像像素值之間的差異具有一為  $p < 0.05$  的統計學顯著性，該候選物被認為是一皮膚美白劑。

在第二個方面，本發明提供一種用於篩選一作為一皮膚美白劑之候選物的方法，其包含有：

提供一第一族群的斑馬魚，該第一族群的斑馬魚是在

一適當的培養條件下被培育出；

提供一第二族群的斑馬魚，該第二族群的斑馬魚是在與該第一族群的斑馬魚相同的培養條件下被培育出，並且在培育的過程中該第二族群的斑馬魚有被投藥以一候選物；

使用一影像擷取裝置來對在該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚的魚體體表上具有黑色素的位址進行影像擷取，藉此而分別得到一第一族群斑馬魚魚體影像以及一第二族群斑馬魚魚體影像；以及

使用一影像分析軟體來對該第一族群斑馬魚魚體影像以及該第二族群斑馬魚魚體影像進行分析，俾以分別得到一第一平均影像像素值以及一第二平均影像像素值，其中若該第二平均影像像素值是低於該第一平均影像像素值，並且該第二平均影像像素值與該第一平均影像像素值之間的差異具有一為  $p < 0.05$  的統計學顯著性，該候選物被認為是一皮膚美白劑。

本發明的上述以及其它目的、特徵與優點，在參照以下的詳細說明與較佳實施例和隨文檢附的圖式後，將變得明顯。

#### 發明的詳細說明

為了這本說明書之目的，將被清楚地瞭解的是：文字“包含有 (comprising)”意指“包含但不限於”，以及文字“包括 (comprises)”具有一對應的意義。

要被瞭解的是：若有任何一件前案刊物在此被引述，

該前案刊物不構成一個下述承認：在台灣或任何其他國家之中，該前案刊物形成本技藝中的常見一般知識之一部分。

除非另外有所定義，在本文中所使用的所有技術性與科學術語具有熟悉本發明所屬技藝的人士所共同瞭解的意義。

現今用於篩選一作為一皮膚美白劑之候選物的活體內動物模型大多是以嚙齒類動物為主。但是，使用嚙齒類動物來進行研究時會有動物飼養不易、個體間差異較大、實驗操作程序複雜、需投予大量的候選物以及黑色素變化情形觀察不易等難以克服的缺點，進而致使在研發成本以及時間上產生較高的花費。

為了克服上述的缺點，一種以斑馬魚作為活體內動物模型來篩選以及評估黑色素生成調節化合物(melanogenic regulatory compounds)的方法被研發出，然而該方法僅以視觀的方式來分析照片中斑馬魚胚胎的黑色素變化情形，無法精確且客觀地呈現出該黑色素生成調節化合物的美白效用。

因此，申請人嘗試藉由使用一影像分析軟體來將經一皮膚美白劑處理的斑馬魚的魚體黑色素變化數值化，而經由實驗結果發現到：所得到的數據可供用於更精確且客觀地評估該皮膚美白劑的美白效用。

於是，本發明提供一種用於篩選一作為一皮膚美白劑之候選物的魚體影像分析系統，其包含有：

一 第一族群的斑馬魚，該第一族群的斑馬魚是在一適當的培養條件下被培育出；

一 第二族群的斑馬魚，該第二族群的斑馬魚是在與該第一族群的斑馬魚相同的培養條件下被培育出，並且在培育的過程中該第二族群的斑馬魚允許要被投藥以一候選物；

一 影像擷取裝置，它被用來對在該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚的魚體體表上具有黑色素的位址進行影像擷取，藉此而分別得到一第一族群斑馬魚魚體影像以及一第二族群斑馬魚魚體影像；以及

一 影像分析軟體，它被用來對該第一族群斑馬魚魚體影像以及該第二族群斑馬魚魚體影像進行分析，俾以分別得到一第一平均影像像素值以及一第二平均影像像素值，其中若該第二平均影像像素值是低於該第一平均影像像素值，並且該第二平均影像像素值與該第一平均影像像素值之間的差異具有一為  $p < 0.05$  的統計學顯著性，該候選物被認為是一皮膚美白劑。

如本文中所述的，術語“美白(whitening)”、“膚色淡化”、“淨白”、“增白”、“退黑”、“驅黑”以及“淡化黑色素”可被交換地使用。

在本發明的一個較佳具體例中，該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚是在溫度被控制在  $28.5^{\circ}\text{C}$  以及光暗週期被設定為 14 小時光照/10 小時黑暗的培養條件下被培育出。

依據本發明，該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚可以是斑馬魚的幼魚(larvae)或成魚(adults)。在本發明的一個較佳具體例中，該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚是斑馬魚的幼魚。較佳地，該等斑馬魚的幼魚是藉由將斑馬魚的受精卵培育歷時 57 小時而被得到。

依據本發明，該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚可以是來自於同一親代或者不同親代。

依據本發明的影像擷取裝置是一配備有數位相機(digital camera)的光學顯微鏡。該光學顯微鏡的實例包含，但不限於：立體顯微鏡(stereomicroscope)、螢光立體顯微鏡(fluorescence stereomicroscope)、巨視顯微鏡(macroscope)、正立光學顯微鏡(upright optical microscope)、倒立光學顯微鏡(inverted optical microscope)、螢光顯微鏡(fluorescence microscope)、正立螢光顯微鏡(upright fluorescence microscope)、倒立螢光顯微鏡(inverted fluorescence microscope)、解剖螢光顯微鏡(dissecting fluorescence microscope)、正立顯微鏡(upright microscope)、倒立顯微鏡(inverted microscope)、偏光顯微鏡(polarizing microscope)、解剖顯微鏡(dissecting microscope)以及生物顯微鏡(biomicroscope)。可瞭解到的是，該影像擷取裝置的操作條件會進一步隨著所使用的其他週邊儀器設備等因素而被變動，俾以達致最佳的影像擷取效果。而有關這些操作條件的選擇是落在熟習此項技術人士的專業素養與例行技術範疇內。

較佳地，該光學顯微鏡是一立體顯微鏡。適用於本發明的立體顯微鏡包含，但不限於：Z16 APO 立體顯微鏡 (Leica, Heerbrugg, Switzerland)、K500 立體顯微鏡 (Motic Instruments Inc., BC, Canada)、M250 A 立體顯微鏡 (Leica, Heerbrugg, Switzerland) 以及 MZ6 立體顯微鏡 (Leica, Heerbrugg, Switzerland)。

在本發明的一個較佳具體例中，該影像擷取裝置是一配備有 SPOT idea 數位相機 (digital camera) (Diagnostic instruments Inc., U.S.A.) 的 Z16 APO 立體顯微鏡。在本發明的另一個較佳具體例中，該影像擷取裝置是一配備有 MOTICAM 1000 數位相機 (Motic Instruments Inc., BC, Canada) 的 K500 立體顯微鏡。

依據本發明，適用於本發明的影像分析軟體包含，但不限於：Scion 影像分析軟體 (Scion Corporation, U.S.A.)、Image J 影像分析軟體 (Image J 1.40g, National Institute of Health, Bethesda, MD, U.S.A.)、LAS 影像分析軟體 (Leica)、IM1000 影像分析軟體 (Leica)、QWIN 影像分析軟體 (Leica)、AxioVision 影像分析軟體 (Zeiss)、Image-Pro Plus 影像分析軟體 (Media Cybernetics)、Metamorph 影像分析軟體 (Molecular Devices)、Olysia m3 影像分析軟體 (Olympus)、NIS-Elements AR 影像分析軟體 (Nikon)、NIS-Elements BR 影像分析軟體 (Nikon)、MetaVue 影像分析軟體 (Molecular Devices)、Universal Imaging Utility 影像分析軟體 (Binary Research International Inc.)、Optimas 影像分析軟體 (Meyer

Instruments Inc.)以及 Imatest Master 影像分析軟體(Imatest)。  
可瞭解到的是，該影像分析軟體的操作條件會進一步隨著所使用的其他週邊儀器設備等因素而被變動，俾以達致最佳的影像分析結果。而有關這些操作條件的選擇是落在熟習此項技術人士的專業素養與例行技術範疇內。

在本發明的一個較佳具體例中，該影像分析軟體是 Scion 影像分析軟體。較佳地，該 Scion 影像分析軟體的操作條件被設定為：上指標值(upper index value)為 254，以及下指標值(lower index value)為 150。

在本發明的另一個較佳具體例中，該影像分析軟體是 Image J 影像分析軟體。較佳地，該 Image J 影像分析軟體的操作條件被設定為：上閾值(upper threshold value)為 85，以及下閾值(lower threshold value)為 0。在依據本發明的魚體影像分析系統中，各種不同的影像擷取裝置可以搭配以各種不同的影像分析軟體來組合使用，這是熟習此藝者可以根據本身的專業素養來決定的。

依據本發明，該候選物可以是一純質的化合物，例如，熊果素(arbutin)、N-苯基硫脲(N-phenylthiourea, PTU)、麴酸(kojic acid)、1-苯基-2-硫脲(1-phenyl-2-thiourea)、亞麻油酸(linoleic acid)、 $\alpha$ -亞麻油酸( $\alpha$ -linoleic acid)、苯二酚(hydroquinone)、抗壞血酸(ascorbic acid)、壬二酸(azelaic acid)、植酸(phytic acid)或 hagin A 等。

依據本發明，該候選物亦可以是一得自於一天然植物物種的組成物，例如，短梗胡枝子(*Lespedeza cyrtobotrya*)

的萃取物或羅漢松屬物種(*Podocarpus sp.*)的萃取物等。

申請人發現：本發明的魚體影像分析系統不會因為來自於同一親代或不同親代的斑馬魚幼魚的個體間差異、不同的影像擷取裝置以及不同的影像分析軟體或其不同的操作參數設定等因素而影響該候選物的美白效用分析結果。因此，依據本發明的魚體影像分析系統被預期在篩選皮膚美白劑上具有極佳的應用潛力。

於是，本發明亦提供一種用於篩選一作為一皮膚美白劑之候選物的方法，其包含有：

提供一第一族群的斑馬魚，該第一族群的斑馬魚是在一適當的培養條件下被培育出；

提供一第二族群的斑馬魚，該第二族群的斑馬魚是在與該第一族群的斑馬魚相同的培養條件下被培育出，並且在培育的過程中該第二族群的斑馬魚有被投藥以一候選物；

使用一影像擷取裝置來對在該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚的魚體體表上具有黑色素的位址進行影像擷取，藉此而分別得到一第一族群斑馬魚魚體影像以及一第二族群斑馬魚魚體影像；以及

使用一影像分析軟體來對該第一族群斑馬魚魚體影像以及該第二族群斑馬魚魚體影像進行分析，俾以分別得到一第一平均影像像素值以及一第二平均影像像素值，其中若該第二平均影像像素值是低於該第一平均影像像素值，並且該第二平均影像像素值與該第一平均影像像素值

之間的差異具有一為  $p < 0.05$  的統計學顯著性，該候選物被認為是一皮膚美白劑。

依據本發明的方法不需藉由複雜的實驗操作程序來誘發斑馬魚魚體的黑色素生成以及觀察黑色素沉澱的情形，並且可以精確且客觀地評估一皮膚美白劑的候選物的美白效用。因此，該方法可供產業界有效地篩選出具有美白效用的皮膚美白劑。

### 【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

本發明將就下面的實施例來做進一步說明，但應瞭解的是，該等實施例僅是供例示說明用，而不應被解釋為本發明的實施上的限制。

實施例

A、實驗材料：

1. 下面實施例中所使用的漢克氏緩衝液(Hank's buffer)具有下面表 1 所示的配方。

表 1. 漢克氏緩衝液的配方

成分	濃度(mg/mL)
KCl	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.42
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24
NaCl	8
NaHCO <sub>3</sub>	0.175
CaCl <sub>2</sub>	0.72
MgSO <sub>4</sub>	1.23
餘量為去離子水(deionized water)	

2. 斑馬魚胚胎(zebrafish embryos)的製備：

在下面實施例中被用來作為種魚(parent fish)的 AB 品系斑馬魚(魚齡為 4 個月大)是購自於邨港生技公司。雄魚以及雌魚分別被飼養於一個水缸(water tank)[水溫被控制在 28.5 °C，光暗週期(light-dark cycle)被設定為 14 小時光照/10 小時黑暗]中，並且飼料被充分地供給。

有關斑馬魚胚胎的製備是參考 M. Westerfield (2007), *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio Rerio)*, 5th edit. University of Oregon Press, Eugene, OR 當中所述的方法來進行，並略作修改。首先，將上述所得到的 1 隻雌魚與 2 隻雄魚置於一個具有壓克力格網(acrylic grid)的繁殖缸(breeding tank)[水溫被控制在 28.5 °C，光暗週期(light-dark cycle)被設定為 14 小時光照/10 小時黑暗]中並使其進入第 1 個光暗週期。之後，在進入第 2 個光暗週期的光照之時，該雌魚與該等雄魚會分別產生卵子與精子並開始進行受精(fertilization)，藉此所得到的受精卵被定義為來自同一親代(parental generation)的受精卵。在經過 1 小時之後，以滴管(dropper)將受精卵從繁殖缸中移出並置於一含有漢克氏緩衝液的培養皿(petri dish)中。接著，將該培養皿置於一培養箱(incubator)(溫度被控制在 28.5 °C，光暗週期被設定為 14 小時光照/10 小時黑暗)(RI-80, FIRSTEK, Taiwan)中進行培育歷時 9 小時，而使得受精卵可以發育成為胚胎。之後，以 Z16 APO 立體顯微鏡(stereomicroscope)(Leica, Heerbrugg, Switzerland)來觀察各個胚胎的發育情形，未受精以及發育遲緩的胚胎會被移除

，而發育良好的胚胎則被拿來進行下面的實驗。

B、一般實驗方法與設備：

1. 統計分析：

在下面的實施例中，採用一種針對 Windows 的 Sigma Stat 統計軟體(2.03 版本)來進行統計分析。實驗數據是以平均值±SEM 來表示。所有的數據是藉由單因子變異數分析(one-way analysis of variance)(ANOVA)繼之以鄧肯氏法(Duncan's method)來作分析，俾以評估各組之間的差異性。若所得到的統計比對結果是  $p < 0.05$ ，代表有統計學顯著性(statistical significance)。

2. 影像擷取裝置(image capture devices)：

(1) Z16 APO 立體顯微鏡 (stereomicroscope)(Leica, Heerbrugg, Switzerland)，它配備有 SPOT idea 數位相機 (Diagnostic instruments Inc., U.S.A.)以及 SPOT 軟體(4.6 版本)(Diagnostic instruments Inc., U.S.A.)。

(2) K500 立體顯微鏡(Motic Instruments Inc., BC, Canada)，它配備有 MOTICAM 1000 數位相機(Motic Instruments Inc., BC, Canada)以及 Motic 軟體(Motic Image Plus 2.0)。

3. 影像分析軟體(image analysis software)：

(1) Scion 影像分析軟體(Scion Corporation, U.S.A.)，它的各項操作參數被顯示於下面表 2 中。

表 2. Scion 影像分析軟體的操作參數設定

操作參數	設定值
上指標值 (upper index value)	254
下指標值 (lower index value)	150

(2) Image J 影像分析軟體(Image J 1.40g, National Institute of Health, Bethesda, MD, U.S.A.)，它的各項操作參數被顯示於下面表 3 中。

表 3. Image J 影像分析軟體的操作參數設定

操作參數	設定值
上閾值 (upper threshold value)	85
下閾值 (lower threshold value)	0

### 實施例 1. 來自於同一親代的斑馬魚幼魚的魚體影像分析

為了探討來自於同一親代的斑馬魚幼魚的個體間差異(inter-individual difference)是否會影響魚體影像分析的結果，下面的實驗被進行。

#### 實驗方法：

#### A、斑馬魚幼魚(zebrafish larvae)的製備：

對 96 井培養盤(96-well plate)的各井予以加入 200  $\mu$ L 的漢克氏緩衝液，繼而將上面“A、實驗材料”的第 2 項「斑馬魚胚胎的製備」當中所得到的斑馬魚胚胎隨機地分成 6 組(亦即 A 至 F 組，每組 n=3)並分別加入至各井中。接著，將該 96-井培養盤置於一培養箱(溫度被控制在 28.5 $^{\circ}$ C，光

暗週期被設定為 14 小時光照/10 小時黑暗)中進行培育歷時 48 小時，藉此而得到由該等胚胎發育而成的幼魚。

B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取：

使用具有一濃度為 168 ppm 的三卡因甲烷磺酸鹽溶液 (tricaine methanesulfonate solution)(MS-222)來麻醉上面 A 項中所得到的幼魚，接而以含有 1% 甲基纖維素 (methyl cellulose)(Sigma, Cat. No. M0512)的單凹載玻片 (depression slide)(Micro Scientific Laboratories, Inc., USA, Cat. No. MM-104SC)予以固定。之後，使用 Z16 APO 立體顯微鏡，並於一為 25X 的放大倍率與一為 3.372 毫秒的曝光時間下針對魚體體表上具有黑色素的位址來進行觀察以及魚體影像的擷取。

C、斑馬魚幼魚的魚體影像分析：

使用 Scion 影像分析軟體來對上面 B 項中所擷取到的魚體影像進行分析並計算出平均影像像素值 (average image pixel value)。之後，依照上面“B、一般實驗方法與設備”的第 1 項「統計分析」當中所述的方法來分析所得到的實驗數據。

結果：

圖 1 顯示對 6 組來自於同一親代的斑馬魚幼魚進行魚體影像擷取以及分析後所得到的結果。從圖 1 可見，各組的平均影像像素值是極為相近而無統計學上的差異存在。這個實驗結果顯示：來自於同一親代的斑馬魚幼魚的個體間差異不會影響魚體影像分析的結果。

## 實施例 2. 來自於不同親代的斑馬魚幼魚的魚體影像分析

為了探討來自於不同親代的斑馬魚幼魚的個體間差異是否會影響魚體影像分析的結果，下面的實驗被進行。

### 實驗方法：

#### A、斑馬魚幼魚的製備：

分別取 4 隻雌魚以及 8 隻雄魚並依照上面“A、實驗材料”的第 2 項「斑馬魚胚胎的製備」當中所述的方法來製備出 4 組來自於不同親代的斑馬魚胚胎(亦即，A 至 D 組，每組  $n=6$ )。

對 96 井培養盤的各井予以加入 200  $\mu\text{L}$  的漢克氏緩衝液，繼而將上述所得到的各組的胚胎分別加入至各井中。接著，將該 96-井培養盤置於一培養箱(溫度被控制在  $28.5^{\circ}\text{C}$ ，光暗週期被設定為 14 小時光照/10 小時黑暗)中進行培育歷時 48 小時，藉此而得到由該等胚胎發育而成的幼魚。

#### B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取：

將上面 A 項中所得到的幼魚依照實施例 1 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”當中所述的方法來進行魚體影像的擷取。

#### C、斑馬魚幼魚的魚體影像分析：

將上面 B 項中所擷取到的魚體影像依照實施例 1 的“C、斑馬魚幼魚的魚體影像分析”當中所述的方法來進行魚體影像的分析。

### 結果：

圖 2 顯示對 4 組來自於不同親代的斑馬魚幼魚進行魚

體影像擷取以及分析後所得到的結果。從圖 2 可見，各組的平均影像像素值是極為相近而無統計學上的差異存在。這個實驗結果顯示：來自於不同親代的斑馬魚幼魚的個體間差異不會影響魚體影像分析的結果。

### 實施例 3. 不同的影像擷取裝置對於斑馬魚幼魚的魚體影像分析的影響

於本實驗中，為了探討不同的影像擷取裝置是否會影響來自於同一親代的斑馬魚幼魚的魚體影像分析的結果，Z16 APO 立體顯微鏡以及 K500 立體顯微鏡分別被用來進行魚體影像的擷取，並且使用 Scion 影像分析軟體來進行影像分析。

#### 實驗方法：

##### A、斑馬魚幼魚的製備：

對 96 井培養盤的各井予以加入 200  $\mu\text{L}$  的漢克氏緩衝液，繼而將上面“A、實驗材料”的第 2 項「斑馬魚胚胎的製備」當中所得到的 4 個來自於同一親代的斑馬魚胚胎分別加入至各井中。接著，將該 96-井培養盤置於一培養箱(溫度被控制在 28.5 $^{\circ}\text{C}$ ，光暗週期被設定為 14 小時光照/10 小時黑暗)中進行培育歷時 48 小時，藉此而得到由該等胚胎發育而成的幼魚(亦即，幼魚 1 至 4)。

##### B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取：

使用具有一濃度為 168 ppm 的三卡因甲烷磺酸鹽溶液(tricaine methanesulfonate solution)(MS-222)來麻醉上面 A 項中所得到的幼魚，接而以含有 1% 甲基纖維素(methyl

cellulose)(Sigma M0512) 的單凹載玻片 (depression slide)(Micro Scientific Laboratories, Inc., USA, Cat. No. MM-104SC)予以固定。之後，使用 Z16 APO 立體顯微鏡，並於一為 25X 的放大倍率與一為 3.372 毫秒的曝光時間下針對魚體體表上具有黑色素的位址來進行觀察以及魚體影像的擷取。

接著，該等固定有被麻醉之幼魚的單凹載玻片被轉移至 K500 立體顯微鏡中，並於一為 2X 的放大倍率與一為 400.3 毫秒的曝光時間下針對魚體體表上具有黑色素的位址來進行觀察以及魚體影像的擷取。

#### C、斑馬魚幼魚的魚體影像分析：

將上面 B 項中藉由使用 Z16 APO 立體顯微鏡以及 K500 立體顯微鏡所擷取到的魚體影像分別依照實施例 1 的“C、斑馬魚幼魚的魚體影像分析”當中所述的方法來進行魚體影像的分析並且計算出影像像素值。

#### 結果：

圖 3A 與圖 3B 分別顯示將擷取自 Z16 APO 立體顯微鏡以及 K500 立體顯微鏡的斑馬魚幼魚的魚體影像藉由使用 Scion 影像分析軟體來進行分析後所得到的結果。從圖 3A 與圖 3B 可見，擷取自 Z16 APO 立體顯微鏡的魚體影像進行影像分析後所得到的影像像素值相較於擷取自 K500 立體顯微鏡的魚體影像所具者並沒有顯著的差異。這個實驗結果顯示：不同的影像擷取裝置不會影響斑馬魚幼魚的魚體影像分析的結果。

#### 實施例 4. Scion 影像分析軟體的下指標值對於斑馬魚幼魚的魚體影像分析的影響

於本實驗中，為了進一步探討 Scion 影像分析軟體的下指標值的設定是否會影響來自於同一親代以及不同親代的斑馬魚幼魚的魚體影像分析的結果，Z16 APO 立體顯微鏡被用來進行魚體影像的擷取，並且將 Scion 影像分析軟體的下指標值分別設定在 120、150 以及 180 來進行影像分析。

##### 實驗方法：

在實施例 1 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”以及實施例 2 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”當中所得到的魚體影像被拿來作進一步的魚體影像分析，而有關魚體影像分析大體上是參照實施例 1 的“C、斑馬魚幼魚的魚體影像分析”當中所述的方法來進行，不同之處在於：將 Scion 影像分析軟體的下指標值分別設定在 120、150 以及 180 的操作條件下來進行分析。

##### 結果：

圖 4A 至圖 4C 分別顯示將實施例 1 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”當中所得到的魚體影像分別藉由使用下指標值被設定在 120、150 以及 180 的 Scion 影像分析軟體來進行分析後所得到的結果。從圖 4A 至圖 4C 可見，當使用 Scion 影像分析軟體來對來自於同一親代的斑馬魚幼魚的魚體影像進行分析時，在下指標值分別被設定在 120、150 以及 180 的操作條件下所得到平均影像像素值是極為相近而無統計學上的差異存在。

圖 5A 至圖 5C 分別顯示將實施例 2 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”當中所得到的魚體影像分別藉由使用下指標值被設定在 120、150 以及 180 的 Scion 影像分析軟體來進行分析後所得到的結果。從圖 5A 至圖 5C 可見，當使用 Scion 影像分析軟體來對來自於不同親代的斑馬於幼魚的魚體影像進行分析時，在下指標值分別被設定在 120、150 以及 180 的操作條件下所得到的平均影像像素值是極為相近而無統計學上的差異存在。

這個實驗結果顯示：Scion 影像分析軟體的下指標值的設定不會影響斑馬魚幼魚的魚體影像分析的結果。

#### 實施例 5. 不同的影像分析軟體對於斑馬魚幼魚的魚體影像分析的影響

於本實驗中，為了探討不同的影像分析軟體是否會影響來自於同一親代以及不同親代的斑馬魚幼魚的魚體影像分析的結果，Z16 APO 立體顯微鏡被用來進行魚體影像的擷取，並且使用 Image J 影像分析軟體來進行影像分析。

#### 實驗方法：

使用 Image J 影像分析軟體來對實施例 1 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”以及實施例 2 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”當中所得到的魚體影像進行分析並且計算出平均影像像素值。之後，依照上面“B、一般實驗方法與設備”的第 1 項「統計分析」當中所述的方法來分析所得到的實驗數據。

#### 結果：

圖 6A 與圖 6B 分別顯示將實施例 1 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”以及實施例 2 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”當中所得到的魚體影像藉由使用 Image J 影像分析軟體來進行分析後所得到的結果。從圖 6A 可見，各組的平均影像像素值極為相近而無統計學上的差異存在，此外，與實施例 1 當中所測得的平均影像像素值(參見圖 1)相較亦無呈現出顯著的差異。從圖 6B 可見，各組的平均影像像素值極為相近而無統計學上的差異存在，此外，與實施例 2 當中所測得的平均影像像素值(參見圖 2)相較亦無呈現出顯著的差異。這個實驗結果顯示：不同的影像分析軟體不會影響斑馬魚幼魚的魚體影像分析的結果。

以上結果證實：本發明的魚體影像分析系統不會受到來自於同一親代或不同親代的斑馬魚幼魚的個體間差異、不同的影像擷取裝置，以及不同的影像分析軟體或其不同的操作參數設定的影響，而可以穩定地呈現斑馬魚幼魚的魚體影像分析的結果。因此，申請人認為：本發明的魚體影像分析系統可被用來篩選一皮膚美白劑。

**實施例 6. 利用本發明的魚體影像分析系統來評估皮膚美白劑(skin whitening agents)的美白效用**

為瞭解本發明的魚體影像分析系統在評估皮膚美白劑的美白效用上是否具有潛力，申請人使用 3 種皮膚美白劑[包括，熊果素(arbutin)、N-苯基硫脲(N-phenylthiourea, PTU)以及麴酸(kojic acid)]來進行下面的實驗。

**實驗方法：**

A、以不同種類與濃度的皮膚美白劑來處理斑馬魚胚胎：

首先，將熊果素(Sigma, Cat. No. A4256)、N-苯基硫脲(Sigma, Cat. No. P7629)以及麴酸(Sigma, Cat. No. K3125)分別溶於配於漢克氏緩衝液的 2% DMSO 中以配製出具有濃度分別為 0.1、0.2、1、2、10、20 mM 的熊果素溶液、濃度分別為 0.002、0.02、0.2、0.4、1、2 mM 的 N-苯基硫脲溶液以及濃度分別為 0.2、1、2、20、40、100 mM 的麴酸溶液。接著，對 96 井培養盤的各井予以加入 100  $\mu$ L 的漢克氏緩衝液，然後依據下面表 4 中所示的操作條件，將上面“A、實驗材料”的第 2 項「斑馬魚胚胎的製備」當中所得到的斑馬魚胚胎分別加入至各井中，繼而分別對各組加入 100  $\mu$ L 的上面所配製出的不同濃度的熊果素溶液、N-苯基硫脲溶液以及麴酸溶液，而使得各組的熊果素、N-苯基硫脲以及麴酸分別具有如表 4 中所示的最終濃度。之後，將該 96-井培養盤置於一培養箱(溫度被控制在 28.5 $^{\circ}$ C、光暗週期被設定為 14 小時光照/10 小時黑暗)中進行培育歷時 48 小時，藉此而得到由該等胚胎發育而成的幼魚。另外，未經任何皮膚美白劑處理的幼魚被用來作為對照組(control)。

表 4. 皮膚美白劑的種類與最終濃度

皮膚美白劑		測試的幼魚 數目(隻)
種類	最終濃度(mM)	
熊果素	0	6
熊果素	0.05	7
熊果素	0.1	6
熊果素	0.5	7
熊果素	1	11
熊果素	5	8
熊果素	10	5
N-苯基硫脲	0	19
N-苯基硫脲	0.001	24
N-苯基硫脲	0.01	25
N-苯基硫脲	0.1	21
N-苯基硫脲	0.2	21
N-苯基硫脲	0.5	20
N-苯基硫脲	1	21
麴酸	0	19
麴酸	0.1	9
麴酸	0.5	6
麴酸	1	8
麴酸	10	24
麴酸	20	25
麴酸	50	15

## B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取：

將上面 A 項中所得到的幼魚依照實施例 1 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”當中所述的方法來進行魚體影像的擷取。

## C、斑馬魚幼魚的魚體影像分析：

將上面 B 項中所得到的魚體影像依照實施例 1 的“C、斑馬魚幼魚的魚體影像分析”當中所述的方法來進行魚體影像的分析。

結果：

圖 7 至圖 9 分別顯示以本發明的魚體影像分析系統來對經不同濃度的熊果素溶液、N-苯基硫脲溶液以及麴酸溶液處理的斑馬魚幼魚進行魚體影像擷取以及分析後所得到的結果。從圖 7 至圖 9 可見，無論是以熊果素溶液、N-苯基硫脲溶液或者麴酸溶液來處理斑馬魚幼魚，所測得的魚體影像的平均影像像素值皆會隨著所使用的皮膚美白劑之濃度的增加而有顯著的降低。這個實驗結果顯示：本發明的魚體影像分析系統可供用於評估不同的皮膚美白劑在淡化黑色素上的效用。

為了進一步確認相同的影像擷取裝置搭配不同的影像分析軟體亦可得到相同的分析結果，使用 Image J 影像分析軟體來對在上面 B 項中所得到的經不同濃度的熊果素溶液處理的斑馬魚幼魚的魚體影像進行分析並且計算出平均影像像素值。所得到的實驗結果被顯示在圖 10 中。

從圖 10 可見，將經不同濃度的熊果素溶液處理的斑馬魚幼魚的魚體影像以 Image J 影像分析軟體來進行分析後所得到的平均影像像素值相較於以 Scion 影像分析軟體來進行分析後所具者(亦即在上面 C 項中所得到的影像分析的結果)並沒有顯著的差異。這個實驗結果顯示：本發明的魚體影像分析系統可藉由將不同的影像擷取裝置搭配以不同的影像分析軟體而被達成。

於本說明書中被引述之所有專利和文獻以其整體被併入本案作為參考資料。若有所衝突時，本案詳細說明(包含

界定在內)將佔上風。

雖然本發明已參考上述特定的具體例被描述，明顯地在不背離本發明之範圍和精神之下可作出很多的修改和變化。因此意欲的是，本發明僅受如隨文檢附之申請專利範圍所示者之限制。

### 【圖式簡單說明】

圖 1 顯示對 6 組來自於同一親代的斑馬魚幼魚進行魚體影像擷取以及分析後所得到的結果(數據是以平均值 $\pm$ SEM 來表示)；

圖 2 顯示對 4 組來自於不同親代的斑馬魚幼魚進行魚體影像擷取以及分析後所得到的結果(數據是以平均值 $\pm$ SEM 來表示)；

圖 3A 與圖 3B 分別顯示將擷取自 Z16 APO 立體顯微鏡以及 K500 立體顯微鏡的斑馬魚幼魚的魚體影像藉由使用 Scion 影像分析軟體來進行分析後所得到的結果；

圖 4A 至圖 4C 分別顯示將本案實施例 1 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”當中所得到的魚體影像分別藉由使用下指標值被設定在 120、150 以及 180 的 Scion 影像分析軟體來進行分析後所得到的結果(數據是以平均值 $\pm$ SEM 來表示)；

圖 5A 至圖 5C 分別顯示將本案實施例 2 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”當中所得到的魚體影像分別藉由使用下指標值被設定在 120、150 以及 180 的 Scion 影像分析軟體來進行分析後所得到的結果(數據是以平均值 $\pm$ SEM 來表

示)；

圖 6A 與圖 6B 分別顯示將本案實施例 1 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”以及實施例 2 的“B、斑馬魚幼魚的魚體影像擷取”當中所得到的魚體影像藉由使用 Image J 影像分析軟體來進行分析後所得到的結果(數據是以平均值±SEM 來表示)；

圖 7 顯示以本發明的魚體影像分析系統來對經不同濃度的熊果素溶液處理的斑馬魚幼魚進行魚體影像擷取以及分析後所得到的結果(數據是以平均值±SEM 來表示)，其中未經任何皮膚美白劑處理的幼魚被用來作為對照組，以及“\*”表示當實驗組與對照組比較， $p < 0.05$ ；

圖 8 顯示以本發明的魚體影像分析系統來對經不同濃度的 N-苯基硫脲溶液處理的斑馬魚幼魚進行魚體影像擷取以及分析後所得到的結果(數據是以平均值±SEM 來表示)，其中未經任何皮膚美白劑處理的幼魚被用來作為對照組，以及“\*”表示當實驗組與對照組比較， $p < 0.05$ ；

圖 9 顯示以本發明的魚體影像分析系統來對經不同濃度的麴酸溶液處理的斑馬魚幼魚進行魚體影像擷取以及分析後所得到的結果(數據是以平均值±SEM 來表示)，其中未經任何皮膚美白劑處理的幼魚被用來作為對照組，以及“\*”表示當實驗組與對照組比較， $p < 0.05$ ；以及

圖 10 顯示將經不同濃度的熊果素溶液處理的斑馬魚幼魚的魚體影像藉由使用 Image J 影像分析軟體來進行分析後所得到的結果(數據是以平均值±SEM 來表示)，其中未經熊

果素溶液處理的幼魚被用來作為對照組，以及“\*”表示當實驗組與對照組比較， $p < 0.05$ 。

**【主要元件符號說明】**

(無)

# 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： 98117923

※申請日： 98.11.9

※IPC 分類： G06K 9/78 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

用於篩選一作為一皮膚美白劑之候選物的魚體影像分析系統及其應用

FISH BODY IMAGE ANALYSIS SYSTEM FOR USE IN THE SCREENING OF A CANDIDATE AS A SKIN WHITENING AGENT AND APPLICATIONS OF THE SAME

## 二、中文發明摘要：

本發明揭示一種用於篩選一作為一皮膚美白劑之候選物的魚體影像分析系統，其包含有一第一族群的斑馬魚、一第二族群的斑馬魚、一影像擷取裝置以及一影像分析軟體。該魚體影像分析系統可被用來篩選一皮膚美白劑。

## 三、英文發明摘要：

Disclosed herein is a fish body image analysis system for use in the screening of a candidate as a skin whitening agent, comprising a first population of zebrafish, a second population of zebrafish, an image capture device, and an image analysis software. The fish body image analysis system can be used to screen a skin whitening agent.

## 七、申請專利範圍：

1. 一種用於篩選一作為一皮膚美白劑之候選物的魚體影像分析系統，其包含有：

一第一族群的斑馬魚，該第一族群的斑馬魚是在一適當的培養條件下被培育出；

一第二族群的斑馬魚，該第二族群的斑馬魚是在與該第一族群的斑馬魚相同的培養條件下被培育出，並且在培育的過程中該第二族群的斑馬魚允許要被投藥以一候選物；

一影像擷取裝置，它被用來對在該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚的魚體體表上具有黑色素的位址進行影像擷取，藉此而分別得到一第一族群斑馬魚魚體影像以及一第二族群斑馬魚魚體影像；以及

一影像分析軟體，它被用來對該第一族群斑馬魚魚體影像以及該第二族群斑馬魚魚體影像進行分析，俾以分別得到一第一平均影像像素值以及一第二平均影像像素值，

其中若該第二平均影像像素值是低於該第一平均影像像素值，並且該第二平均影像像素值與該第一平均影像像素值之間的差異具有一為  $p < 0.05$  的統計學顯著性，該候選物被認為是一皮膚美白劑。

2. 如申請專利範圍第 1 項的魚體影像分析系統，其中該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚是斑馬魚的幼魚。

3. 如申請專利範圍第 1 項的魚體影像分析系統，其中該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚是來自於同一親代。
4. 如申請專利範圍第 1 項的魚體影像分析系統，其中該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚是來自於不同親代。
5. 如申請專利範圍第 1 項的魚體影像分析系統，其中該影像擷取裝置是一配備有數位相機的光學顯微鏡。
6. 如申請專利範圍第 5 項的魚體影像分析系統，其中該光學顯微鏡是選自於由下列所構成的群組：立體顯微鏡、螢光立體顯微鏡、巨視顯微鏡、正立光學顯微鏡、倒立光學顯微鏡、螢光顯微鏡、正立螢光顯微鏡、倒立螢光顯微鏡、解剖螢光顯微鏡、正立顯微鏡、倒立顯微鏡、偏光顯微鏡、解剖顯微鏡以及生物顯微鏡。
7. 如申請專利範圍第 1 項的魚體影像分析系統，其中該影像分析軟體是選自於由下列所構成的群組：Scion 影像分析軟體、Image J 影像分析軟體、LAS 影像分析軟體、IM1000 影像分析軟體、QWIN 影像分析軟體、AxioVision 影像分析軟體、Image-Pro Plus 影像分析軟體、Metamorph 影像分析軟體、Olysia m3 影像分析軟體、NIS-Elements AR 影像分析軟體、NIS-Elements BR 影像分析軟體、MetaVue 影像分析軟體、Universal Imaging Utility 影像分析軟體、Optimas 影像分析軟體以及 Imatest Master 影像分析軟體。

8. 如申請專利範圍第 1 項的魚體影像分析系統，其中該候選物是一純質的化合物。
9. 如申請專利範圍第 1 項的魚體影像分析系統，其中該候選物是一組成物。
10. 一種用於篩選一作為一皮膚美白劑之候選物的方法，其包含有：

提供一第一族群的斑馬魚，該第一族群的斑馬魚是在一適當的培養條件下被培育出；

提供一第二族群的斑馬魚，該第二族群的斑馬魚是在與該第一族群的斑馬魚相同的培養條件下被培育出，並且在培育的過程中該第二族群的斑馬魚有被投藥以一候選物；

使用一影像擷取裝置來對在該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚的魚體體表上具有黑色素的位址進行影像擷取，藉此而分別得到一第一族群斑馬魚魚體影像以及一第二族群斑馬魚魚體影像；以及

使用一影像分析軟體來對該第一族群斑馬魚魚體影像以及該第二族群斑馬魚魚體影像進行分析，俾以分別得到一第一平均影像像素值以及一第二平均影像像素值，

其中若該第二平均影像像素值是低於該第一平均影像像素值，並且該第二平均影像像素值與該第一平均影像像素值之間的差異具有一為  $p < 0.05$  的統計學顯著性，該候選物被認為是一皮膚美白劑。

11. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚是斑馬魚的幼魚。
12. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚是來自於同一親代。
13. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該第一族群的斑馬魚以及該第二族群的斑馬魚是來自於不同親代。
14. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該影像擷取裝置是一配備有數位相機的光學顯微鏡。
15. 如申請專利範圍第 14 項的方法，其中該光學顯微鏡是選自於由下列所構成的群組：立體顯微鏡、螢光立體顯微鏡、巨視顯微鏡、正立光學顯微鏡、倒立光學顯微鏡、螢光顯微鏡、正立螢光顯微鏡、倒立螢光顯微鏡、解剖螢光顯微鏡、正立顯微鏡、倒立顯微鏡、偏光顯微鏡、解剖顯微鏡以及生物顯微鏡。
16. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該影像分析軟體是選自於由下列所構成的群組：Scion 影像分析軟體、Image J 影像分析軟體、LAS 影像分析軟體、IM1000 影像分析軟體、QWIN 影像分析軟體、AxioVision 影像分析軟體、Image-Pro Plus 影像分析軟體、Metamorph 影像分析軟體、Olysia m3 影像分析軟體、NIS-Elements AR 影像分析軟體、NIS-Elements BR 影像分析軟體、MetaVue 影像分析軟體、Universal Imaging Utility 影像分析軟體、Optimas 影像分析軟體以及 Imatest Master 影像分析軟體。

17. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該候選物是一純質的化合物。
18. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該候選物是一組成物。

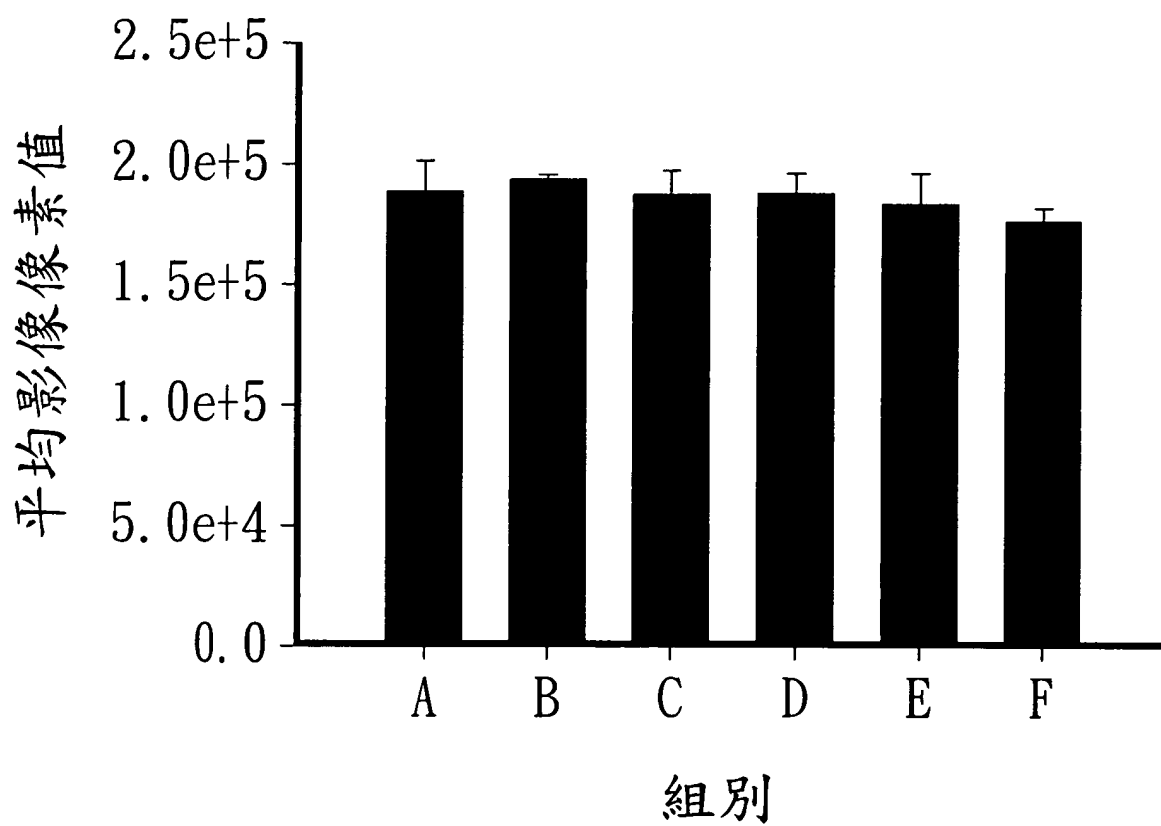


圖 1

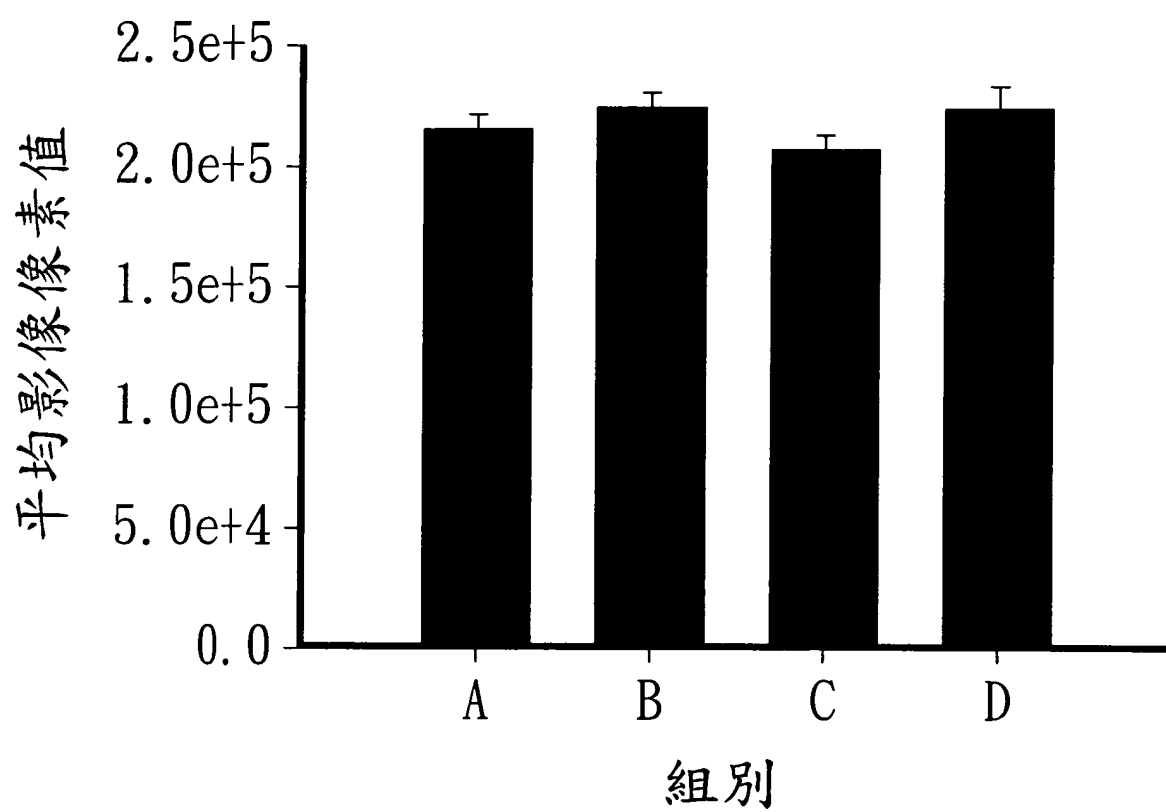


圖 2

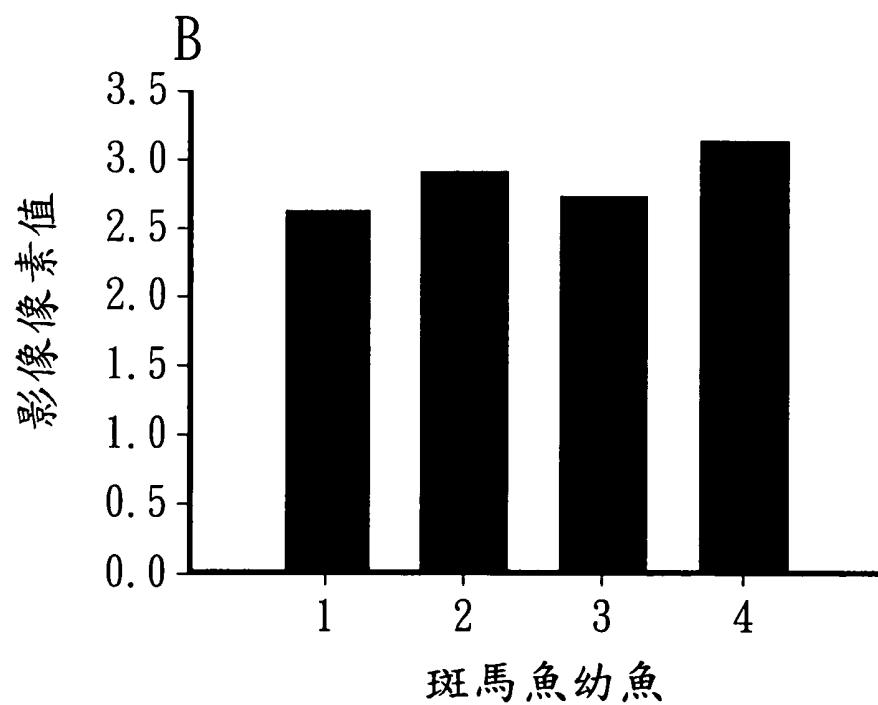
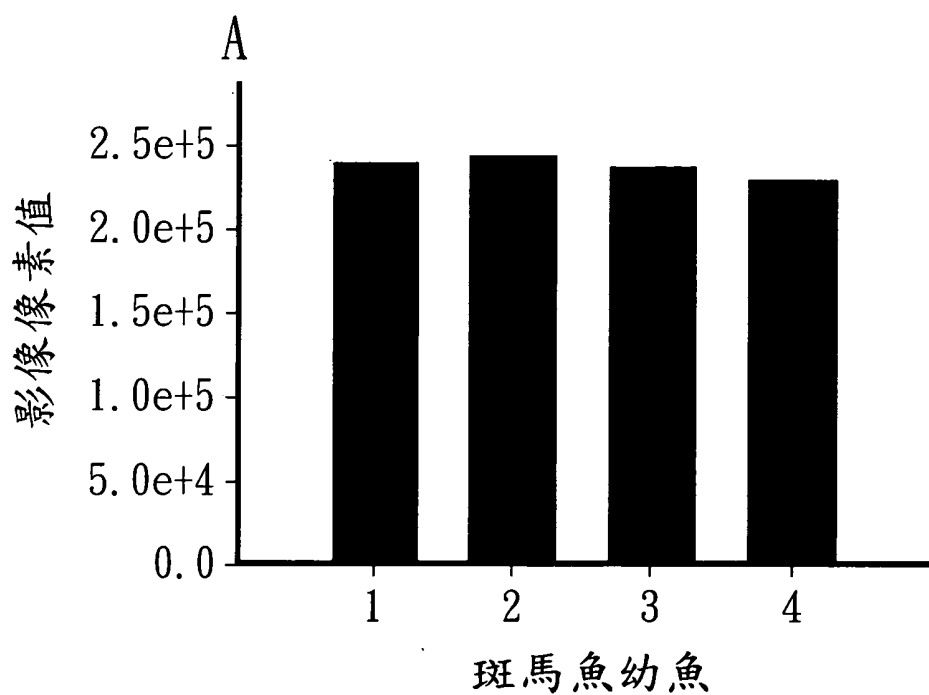


圖 3

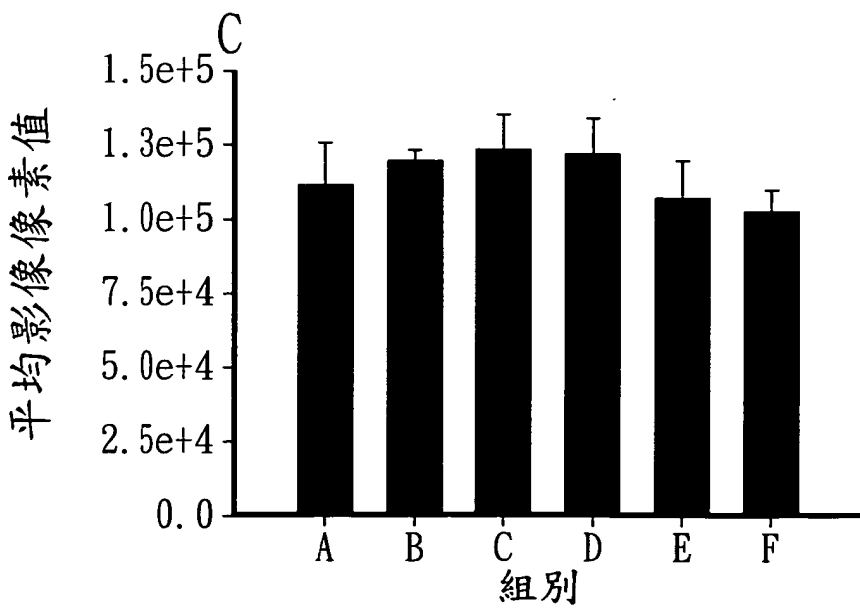
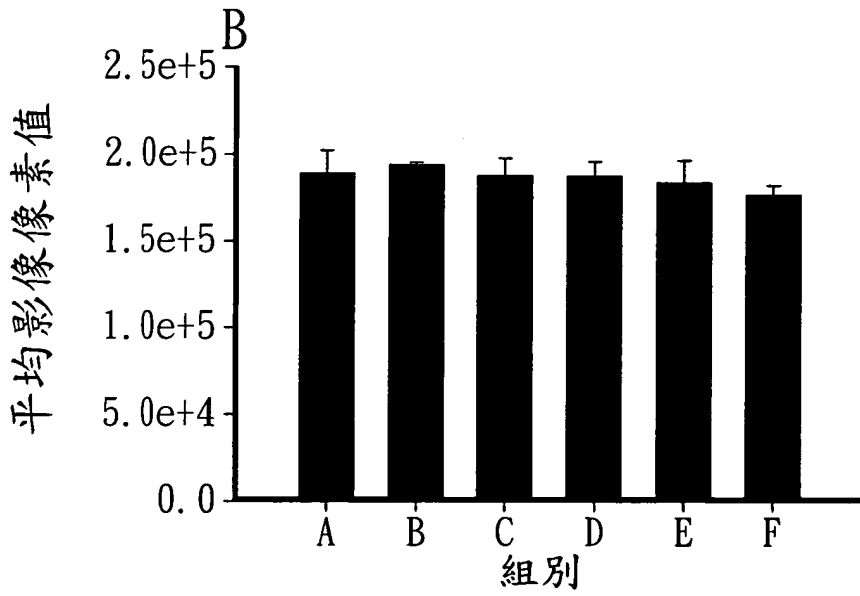
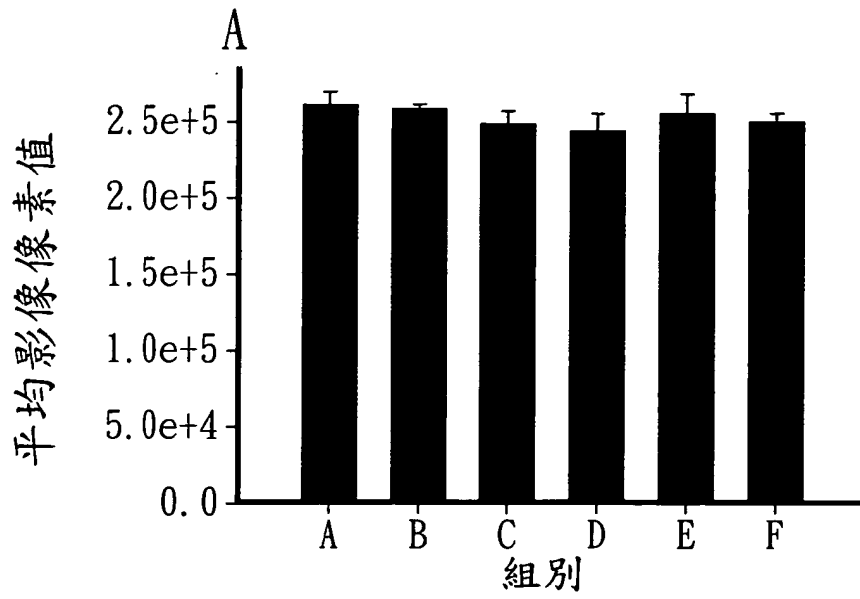


圖 4

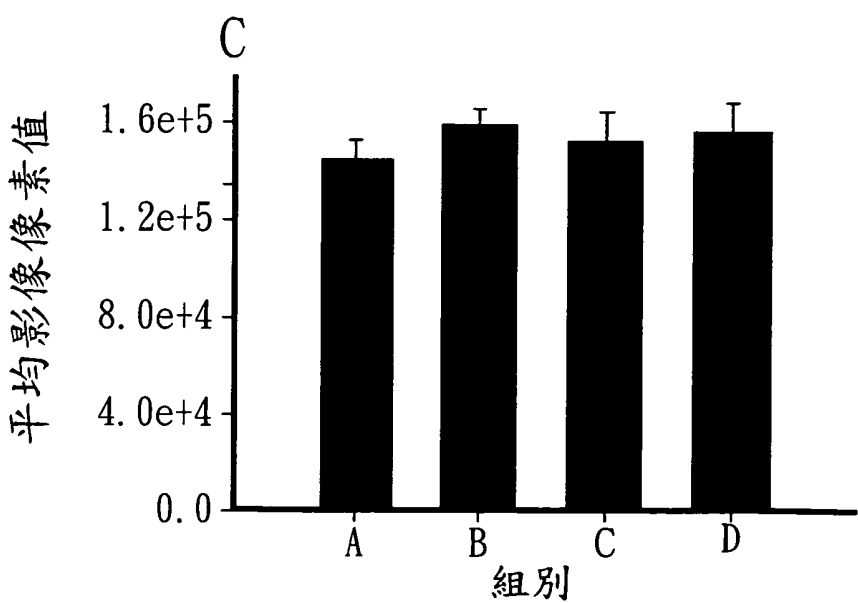
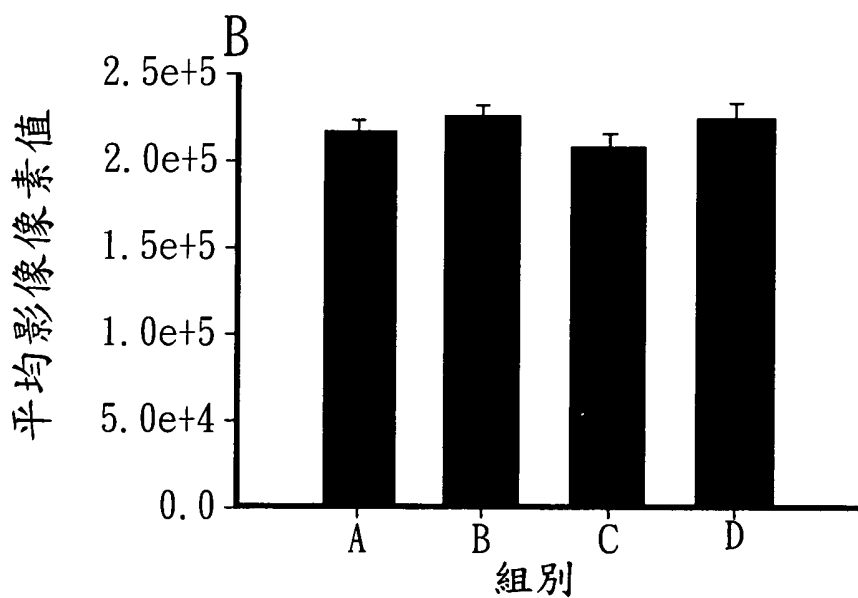
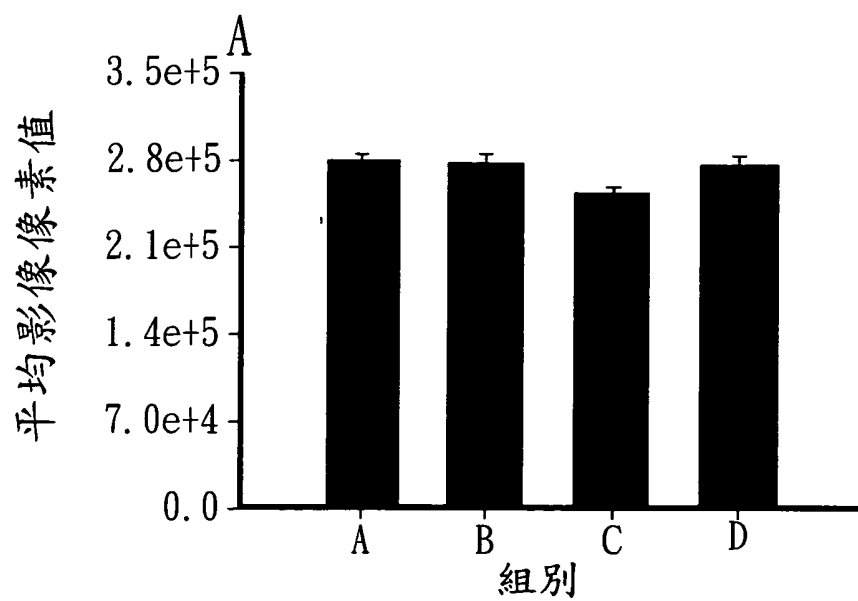


圖 5

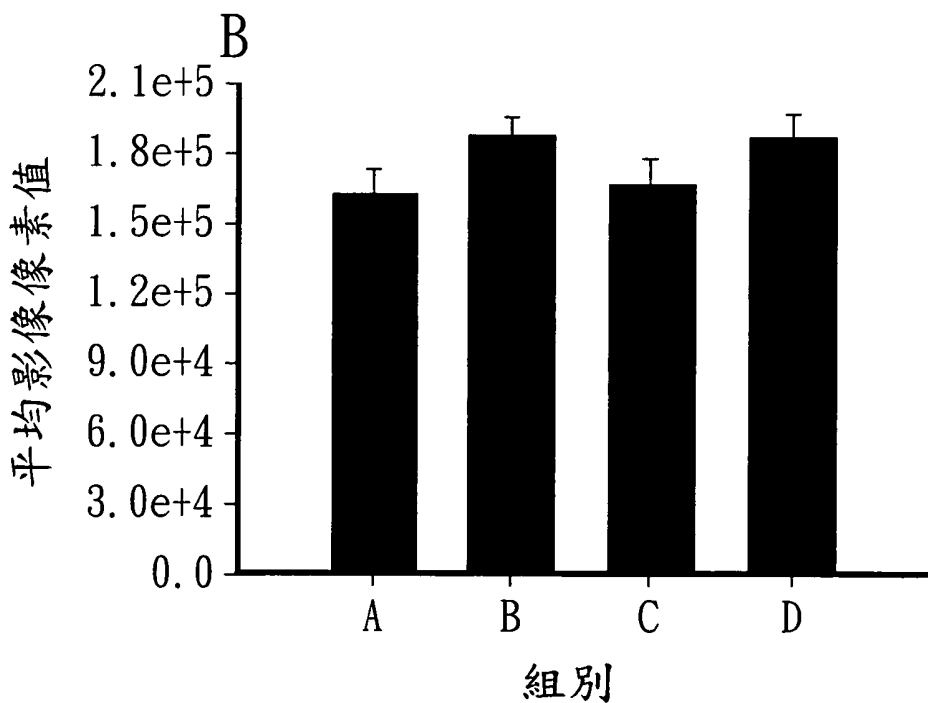
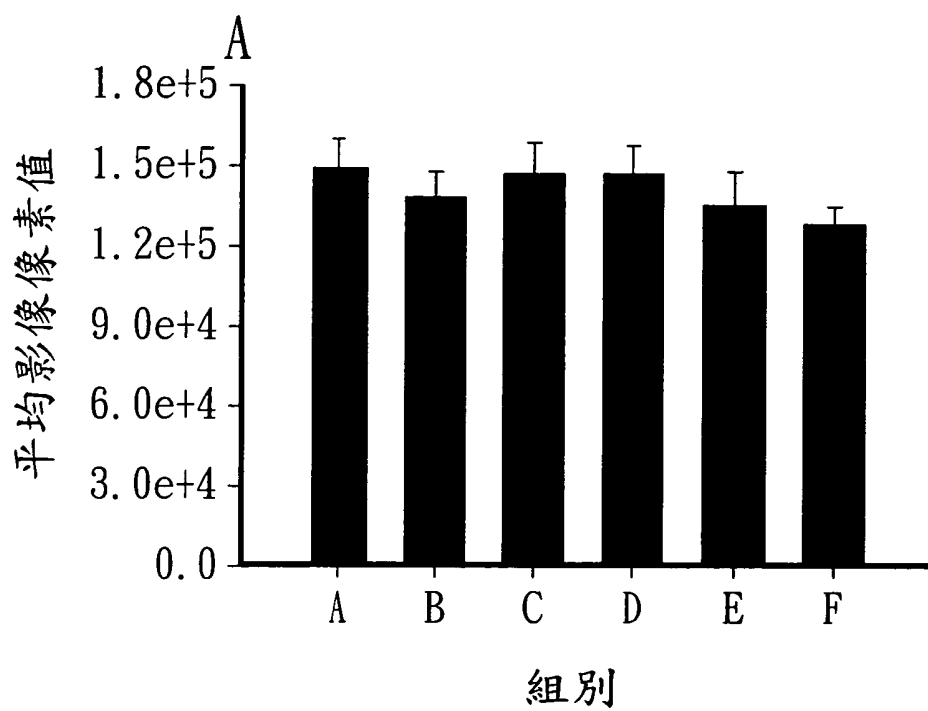


圖 6

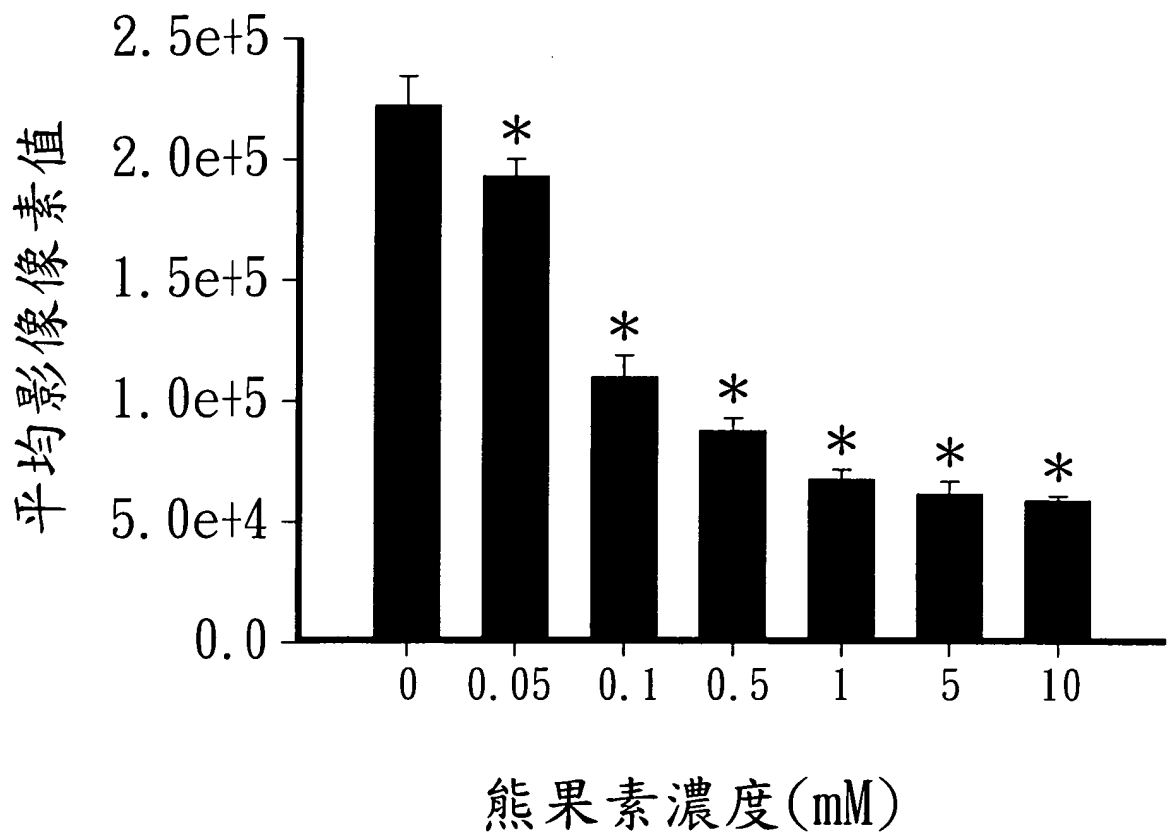


圖 7

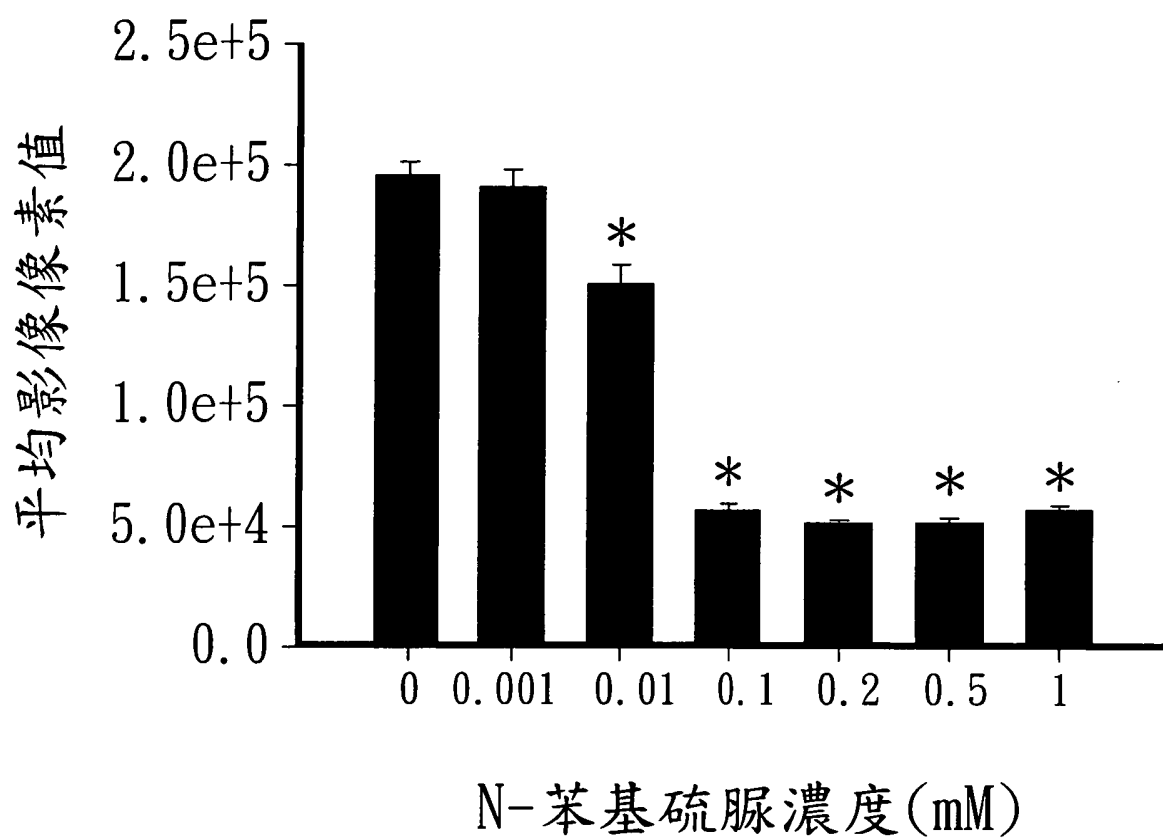


圖 8

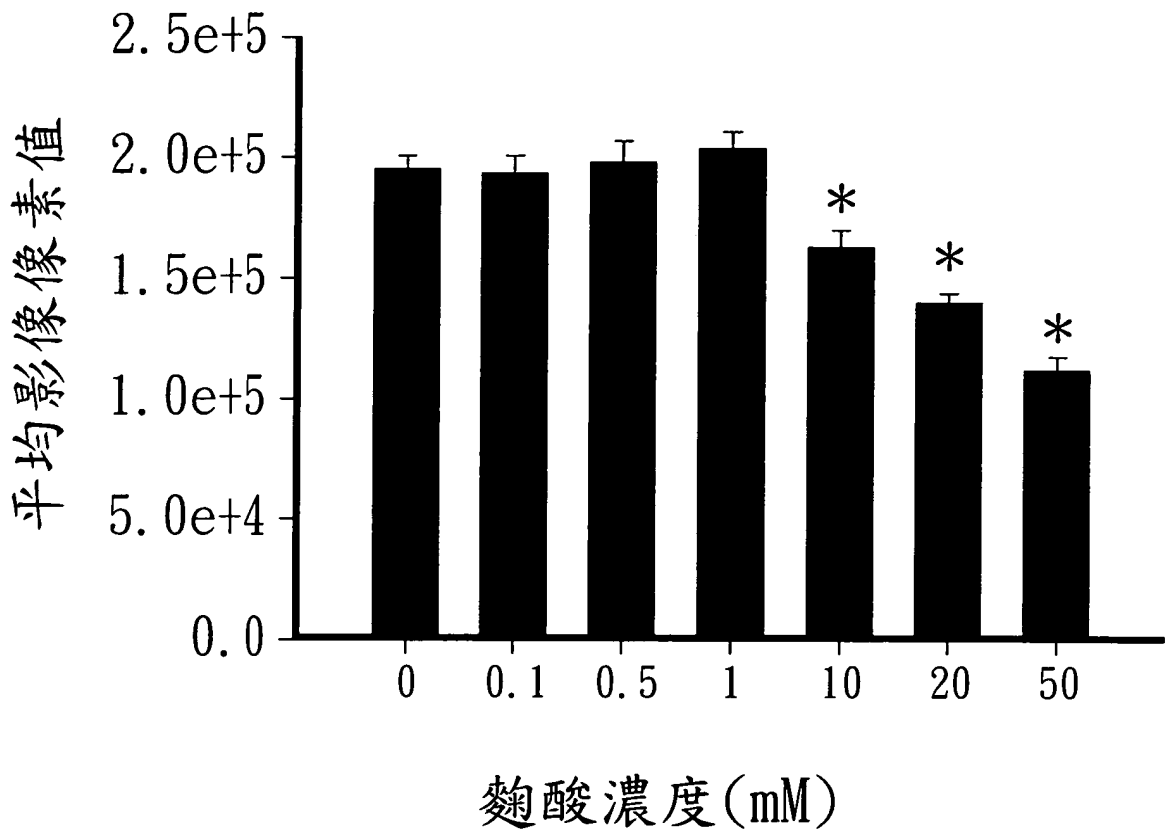


圖 9

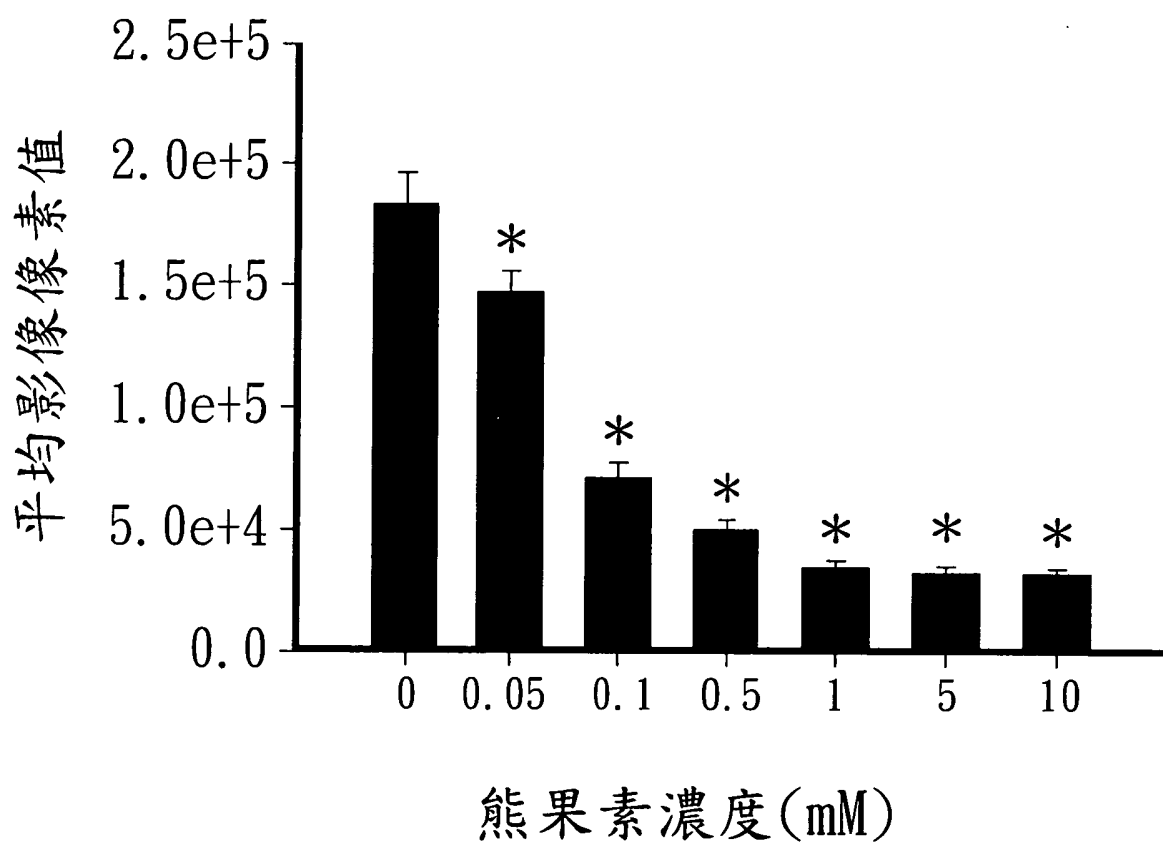


圖 10

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖( 7 )。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)