

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第6部門第1区分
 【発行日】平成21年4月9日(2009.4.9)

【公開番号】特開2007-263655(P2007-263655A)
 【公開日】平成19年10月11日(2007.10.11)
 【年通号数】公開・登録公報2007-039
 【出願番号】特願2006-87376(P2006-87376)
 【国際特許分類】

G 0 1 N 33/50 (2006.01)
 A 6 1 B 5/00 (2006.01)
 G 0 1 N 33/48 (2006.01)
 G 0 1 N 33/483 (2006.01)
 G 0 1 N 1/04 (2006.01)
 G 0 1 N 1/28 (2006.01)
 G 0 1 N 1/30 (2006.01)
 A 6 1 B 5/107 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/50 Q
 A 6 1 B 5/00 M
 G 0 1 N 33/48 P
 G 0 1 N 33/483 C
 G 0 1 N 1/04 G
 G 0 1 N 1/04 V
 G 0 1 N 1/28 F
 G 0 1 N 1/30
 A 6 1 B 5/10 3 0 0 Q

【手続補正書】

【提出日】平成21年2月19日(2009.2.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

皮膚の柔軟性の鑑別方法であって、皮膚より採取した角層細胞をコンゴレッド色素で染色し、該色素で染色した角層細胞における シート型のケラチンを偏光顕微鏡で観察し、その存在割合が高いほど皮膚柔軟性が低いと判定することを特徴とする鑑別方法。

【請求項2】

染色方法がダイレクトファーストスカーレット染色であることを特徴とする、請求項1に記載の皮膚の鑑別方法。

【請求項3】

標準的な角層細胞を37℃、湿度100%の条件で72時間保存する処置を施した比較サンプルとの比較において、シート型ケラチンの存在割合を推定することを特徴とする、請求項1又は2に記載の皮膚の鑑別方法。

【請求項4】

次に示す工程に従って行われることを特徴とする、請求項1～3の何れか1項に記載の皮膚の鑑別方法。

(工程 1) 粘着テープを用いて、皮膚より角層細胞を採取する。

(工程 2) 前記粘着テープの粘着剤は有機溶剤により軟化・溶解させ、遠心分離によって得た角層細胞ペレットからパラフィン薄切片又は凍結切片を作成する。或いは、粘着テープに付いた前記角層細胞を直接パラフィン薄切片又は凍結切片を作成する。

(工程 3) 工程 2 で得られた切片より、切片厚 5 μ m の角層細胞標本を調製する。

(工程 4) 前記角層細胞標本をコンゴレッドの染色液中において 20 分間放置して染色を行う。

(工程 5) 染色された角層細胞標本を 100% エタノールで洗浄風乾後、バルサムに封入して偏光顕微鏡下で観察を行い、シート型ケラチンの存在割合を推定する。

(工程 6) シート型ケラチンの存在量が多いほど、皮膚柔軟性が低いと判定する。

【請求項 5】

予め、皮膚より採取した角層細胞を紫外線を光源として顕微鏡下観察し、蛍光の度合いより、1) 蛍光強度の強いものと、2) 蛍光強度の弱いものの 2 種に分別し、蛍光強度の強いもののみを対象とすることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 何れか 1 項に記載の皮膚の鑑別方法。

【請求項 6】

化粧料の選択の為であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の皮膚の鑑別方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0002】

化粧料を選択する上で、その適用されるべき肌の特性を知ることが非常に重要なことである。これは、肌状態の違いにより、同じ化粧料を使用しても、好ましい効果をもたらすことも存するし、却って好ましからざる効果をもたらすことも存するためである。即ち、肌の手入れにおいて、適切な化粧料を選択することは効果と安全性を確保する上で重要なテーマであると言える。この様な状況を反映して、種々の肌の鑑別法と化粧料の選択法が考案されている。中でも、容易に採取できて、肌状態を適切に反映し、且つ、肌情報を多く有している角層細胞を用いる方法は、近年重点的に研究が重ねられている。かかる角層細胞に関する技術としては、主として、形状、面積、核を有するか否か、どの程度のメラニン顆粒を有するか等、角層細胞の形状或いは病理学的特徴に関するものが主流を占めている。又、形状に加えて比較的マクロな肌の凹凸の状態などを補助因子として加えているものが開示されている(例えば、特許文献 1、特許文献 2、特許文献 3、特許文献 4、特許文献 5、特許文献 6、特許文献 7 を参照)。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0003】

しかしながら、その一方、角層細胞の形状や病理学的特徴は大差なくとも、肌の状態には大きな差が存するような例も散見されており、角層細胞の形状或いは病理学的特徴以外に、肌の状態に対する因子が存することが推察されている。特に、皮膚の柔軟性などのような皮膚形態を組織学的手段によって、鑑別する手段は存しておらず、専ら弾力などの皮膚の物理学的変形特性による鑑別に依存しているのが現状である。この様な柔軟性などの皮膚形態は、人の外観印象形成に大きな影響を与えるため、柔軟性喪失を適切に鑑別し、予防する手段の開発が望まれていた。かかる皮膚柔軟性低下の予防策としては、例えば、エラストラーゼ阻害剤を利用する方法(例えば、特許文献 8 を参照)、ヒアルロニダーゼ阻

害剤を利用する方法（例えば、特許文献9を参照）、アスコルビン酸グルコシドを利用する方法（例えば、特許文献10を参照）等が開示されており、これらを有効に活用するためには、柔軟性の低下を初期段階に鑑別する手段の開発が必要であると言える。このため、皮膚より採取した角層細胞に紫外線を照射し、その角層細胞の蛍光強度を指標に皮膚を鑑別する方法が開示されている（例えば、特許文献11、特許文献12を参照）。この技術により、角層細胞の化学構造を光学的情報から推定し、皮膚の鑑別確度の向上が為されたが、角層細胞において、化学構造的な大きな変化がなくとも、わずかながら蛍光が存することから、かかる蛍光がノイズとなる場合が存し、定量性に課題も存した。かような方法においては、定量性を高め、より低コストで簡便な鑑別方法が望まれていた。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

(1) 皮膚の柔軟性の鑑別方法であって、皮膚より採取した角層細胞をコンゴレッド色素で染色し、該色素で染色した角層細胞におけるシート型のケラチンを偏光顕微鏡で観察し、その存在割合が高いほど皮膚柔軟性が低いと判定することを特徴とする鑑別方法。

(2) 染色方法がダイレクトファーストスカーレット染色であることを特徴とする、(1)に記載の皮膚の鑑別方法。

(3) 標準的な角層細胞を37℃、湿度100%の条件で72時間保存する処置を施した比較サンプルとの比較において、シート型ケラチンの存在割合を推定することを特徴とする、(1)又は(2)に記載の皮膚の鑑別方法。

(4) 次に示す工程に従って行われることを特徴とする、(1)～(3)の何れかに記載の皮膚の鑑別方法。

(工程1) 粘着テープを用いて、皮膚より角層細胞を採取する。

(工程2) 前記粘着テープの粘着剤は有機溶剤により軟化・溶解させ、遠心分離によって得た角層細胞ペレットからパラフィン薄切片又は凍結切片を作成する。或いは、粘着テープに付いた前記角層細胞を直接パラフィン薄切片又は凍結切片を作成する。

(工程3) 工程2で得られた切片より、切片厚5μmの角層細胞標本を調製する。

(工程4) 前記角層細胞標本をコンゴレッドの染色液中において20分間放置して染色を行う。

(工程5) 染色された角層細胞標本を100%エタノールで洗浄風乾後、バルサムに封入して偏光顕微鏡下で観察を行い、シート型ケラチンの存在割合を推定する。

(工程6) シート型ケラチンの存在量が多いほど、皮膚柔軟性が低いと判定する。

(5) 予め、皮膚より採取した角層細胞を紫外線を光源として顕微鏡下観察し、蛍光の度合いより、1) 蛍光強度の強いものと、2) 蛍光強度の弱いものの2種に分別し、蛍光強度の強いもののみを対象とすることを特徴とする、(1)～(4)何れかに記載の皮膚の鑑別方法。

(6) 化粧料の選択の為であることを特徴とする、(1)～(5)何れかに記載の皮膚の鑑別方法。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

前記皮膚角層細胞の採取、処理及び皮膚の鑑別の工程は、以下のように行うことが好ましい。

(工程1) 粘着テープを用いて、皮膚より角層細胞を採取する。

(工程2) 前記粘着テープの粘着剤は有機溶剤により軟化・溶解させ、遠心分離によって得た角層細胞ペレットからパラフィン薄切片又は凍結切片を作成する。或いは、粘着テープに付いた前記角層細胞を直接パラフィン薄切片又は凍結切片を作成する。

(工程3) 工程2で得られた切片より、切片厚1~10 μ m、好ましくは5 μ mの角層細胞標本を調製する。

(工程4) 前記角層細胞標本をコンゴレッド(ダイレクトファーストスカーレット)の染色液中において10~60分、好ましくは20分間放置して染色を行う。

(工程5) 染色された角層細胞標本を90~100%の、好ましくは100%のエタノールで洗浄風乾後、パルサムに封入して偏光顕微鏡下で観察を行い、シート型ケラチンの存在割合を推定する。

(工程6) シート型ケラチンの存在量が多いほど、皮膚柔軟性が低いと判定する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

前記コンゴレッド色素(染料)による染色において、シート型のタンパク質(例えば、ケラチン、アミロイド)の染色に有効な成分はダイレクトファーストスカーレット(Direct Fast Scarlet)であり、コンゴレッド色素より抽出精製され試薬として市販されているものを用いて染色することが好ましい。ダイレクトファーストスカーレット染色液は、定法によって作成し用いることができる。例えば、染色液として、蒸留水100~30ml、好ましくは50mlを40~60℃、好ましくは50℃に加熱し、ダイレクトファーストスカーレット0.1~1g、好ましくは0.5g及び塩化ナトリウム2~10g、好ましくは5gを溶解し、この液20~60ml、好ましくは40mlに純アルコール1~30ml、好ましくは10mlを混合して調製することができる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

前記シートとは、タンパク質の構造の一つである。タンパク質の鎖は-NH-X-CO-NH-X-CO-NH-という構造が繰り返され、このH(水素)とO(酸素)は水素結合で引き合い、タンパク質の構造を決める大きな要因である。例えば、あるアミノ酸のOとその3つ先のHが順番に水素結合し、タンパク質の鎖が螺旋型を描いたものはヘリックスと呼ばれる。又、アミノ酸の鎖が一直線に長く伸びた形で、何本か水素結合で引き合っただけになり平面的に並んだものはシートと呼ばれる。このようにタンパク質は、一定の形に折り畳まれることによって立体構造を為し、柔軟性や流動性を保持しつつその機能を発揮する。かかる特性は、物理学的な特性にとどまることなく、見た目、個人の自覚的認識の柔らかさにも及んでいることを本発明者らは見出している。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

皮膚角層細胞であるケラチンがシート型で存するかの確認は、例えば、標準的な角層細胞を35~40℃、好ましくは37℃、湿度90~100%、好ましくは100%の条件で48~96時間、好ましくは72時間保存する処置、又は、オートクレーブ110~

130、好ましくは121で、10～30分、好ましくは20分間処置を施した後、市販の蛍光顕微鏡システム（例えば、オリンパス社製）を用いて蛍光強度を測定することによって為される。則ち、かような湿熱処置によってヘリックスからシートへのケラチンの構造転移が促進され、シート型ケラチンの増加に伴って角層細胞の蛍光強度が顕著に増加する所以である（図1参照）。また、この湿熱処置後、コンゴレッド染色した角層細胞を偏光顕微鏡で観察することによって、シート型構造を示す偏光の増加を検出できる（図2参照）。蛍光を用いた方法では、角層細胞の表層（コーニファイドエンベロープ）と角層細胞の内部（ケラチン）の両方からの積算された蛍光を観察しているのに対し、本発明の偏光は角層細胞の断面を観察しており、角層細胞内部であるシート型ケラチンを直接観察できる点において格段に定量性が優れている。また、かような湿熱処置の程度や種々の蛍光強度の基準となるサンプルを予め設定しておき、それらと偏光の程度との関係を利用することで、後述するようなシート型ケラチンの存在割合を推定することも本発明の範囲に属するものである。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

前記シート型のケラチンの存在割合を推定するには、偏光顕微鏡による角層細胞の偏光の強弱判定を肉眼にて3～5段階で定量化を行う（図3参照）。前述した湿熱処置の程度や種々の偏光強度の基準となるサンプルを予め設定しておき、かような偏光の強弱を示す角層細胞の基準図（図3参照）との相関関係を利用することで、シート型ケラチンの存在割合を推定することができる。則ち、角層細胞における偏光の強弱より、角層細胞を構成するケラチンにおいて、シートのものが多いか、ヘリックスのものが多いかを推定することができる訳である。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

前記皮膚柔軟性とは、皮膚の柔らかさ又は硬くない程度を示す。かかる程度は、物理学的変形可能性によって表現される、「物理学的な柔らかさ」とどまらず、「見た目の柔らかさ」或いは「自覚としての柔らかさ」をも包含する言葉である。前記見た目の柔らかさは、物理学的特性によってのみ表されるものではないため、その指標が存しないのが現状である。従来物理学的変形を指標とする、皮膚柔軟性の計測機器としては、CUTOMETER SEM575（Courage+KhaZaKa社製）、ピーナストロン（株式会社アクシム社製）等が例示できる。CUTOMETER SEM575では皮膚を吸引し、吸引力に対する皮膚の伸びを指標として皮膚柔軟性を計測できる。また、ピーナストロンでは触覚センサーを皮膚に押し込み、皮膚の周波数変化量を指標として皮膚柔軟性を計測できる。これらの計測機器を用いて、個人差、加齢変化、部位差、及び全身性強皮症の皮膚硬化度等に関する皮膚柔軟性の報告がなされている。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

角層細胞における、シート型構造と偏光との関係を確認するために、粘着テープを使

用してテープストリップによって、31名の女性被験者(20~49才)の頬部より角層細胞を各々2回分採取し、粘着テープの粘着剤を溶解させ、遠心分離によって得た角層細胞ペレットからパラフィン薄切片を作成し、角層細胞標本を調製した。角層細胞標本の一方に対して37℃、湿度100%の条件で72時間の湿熱処置を施した後、オリンパス社製の蛍光顕微鏡システム(カメラDP-50、顕微鏡BX-60、メタルハライド光源)を用いて暗室にて角層細胞の蛍光を観察した。さらに、コンゴレッド染色液中において20分間放置して染色を行い、100%エタノールで洗浄風乾後、バルサムに封入してオリンパス社製のシステム偏光顕微鏡(BX51-P)で観察を行った。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

23才の女性の頬部角層細胞について、図1に湿熱処置の前(左図)及び後(右図)の蛍光画像を、図2に、湿熱処置の前(左図)及び後(右図)の偏光画像を示す。これらの結果のように、湿熱処置によって明らかに蛍光及び偏光の増加が認められた。このような変化は今回のすべての被験者の角層細胞において認められ、ヘリックスからシートへのケラチンの構造転移が促進され、シート型構造を示す蛍光及び偏光によるものと推察される。かように、コンゴレッド色素によって染色された角層細胞は、偏光顕微鏡によってシート型ケラチンについて鑑別できることが分かる。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

本発明の皮膚の鑑別法及び角層細胞への紫外線照射による蛍光強度を指標とした皮膚の鑑別方法(特許文献12を参照)を用い、42名の女性被験者(20~55才)の肌の特徴(柔軟性)を調べて化粧料の選択を行った。即ち、右頬部角層細胞の偏光の強弱の程度を示す図3の基準に従って、パネラーを柔軟性が少ない群(A1群)、柔軟性がやや少ない群(A2群)、柔軟性が十分に存する群(A3群)の3群に分類し、次に、左頬部角層細胞の蛍光強度に従って、同様に柔軟性が少ない群(B1群)、柔軟性がやや少ない群(B2群)、柔軟性が十分に存する群(B3群)の3群に、42名を再分類を行った。A1及びB1群には、処方1に示す柔軟性の喪失抑制作用及び柔軟性回復作用に優れる化粧水を、A2及びB2群には処方2に示す、柔軟性喪失抑制作用を有する化粧水を、A3及びB3群には通常の保湿化粧水を渡し、今まで使用していた化粧水に代えて、左右半顔の別々にて、4週間連日使用してもらった。使用終了後に、アンケートを実施し、普段使用している化粧水と、試験に使用した化粧水とではどちらの方が肌を柔軟にしたかを回答してもらった。結果を表2に示す。