

發明專利說明書 200529792

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：P3138225

※ 申請日期：P3-12-10

※IPC 分類：

A61B 1/00,
G01N 21/64

一、發明名稱：(中文/英文)

評估皮膚及個體之整體健康的方法

METHOD OF ASSESSING SKIN AND OVERALL HEALTH OF AN
INDIVIDUAL

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商壯生和壯生消費者公司

JOHNSON & JOHNSON CONSUMER COMPANIES, INC.

代表人：(中文/英文)

柯安德/COLBY, ANDREA L.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國新澤西州史齊爾門區格蘭德路

GRANDVIEW ROAD, SKILLMAN, NJ08558-9418 U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國/U.S.A.

三、發明人：(共 4 人)

姓名：(中文/英文)

1. 史喬斯/STAMATAS, GEORGIOS N.

2. 克尼福/KOLLIAS, NIKIFOROS

3. 尼傑塔/NIKOLOVSKI, JANETA

4. 威卡爾/WIEGAND, BENJAMIN CARL

國籍：(中文/英文)

1.~4.均為為美國/U.S.A.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國；西元 2003 年 12 月 12 日；10/735,188

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種使用螢光來評估皮膚與個體(individual)之整體健康的方法。

【先前技術】

人類以及老鼠皮膚之天然螢光(native fluorescence)已顯現出會隨著年紀與 UV 暴露而以一種可預期之方式變化。見 Brancalion 等人於 J. Invest. Dermatol. 1999 年 113(6)：977-982；Kollias 等人於 J. Invest. Dermatol. 1998 年 111(5)：776-780；Leffell 等人於 Arch Dermatol. 1988 年 124(10)：1514-1518；Na 等人於 J. Invest. Dermatol. 2001 年 116(4)：536-540；以及 Tian 等人於 J. Invest. Dermatol. 2001 年 116(6)：840-845。因此，螢光光譜已證明為研究皮膚因年齡引起的老化(aging)以及因日曬引起的老化(photoaging)之客觀(objective)量化(quantitative)方法。

已藉由活體內(*in vivo*)螢光光譜檢測出之主要(major)螢光帶(band)包括：a)分配至色胺酸(tryptophan)之帶(最大在 295 nm 激發、345 nm 放射)，b)分配至胃蛋白(pepsin)可消化之膠原(collagen)絡接(cross-links)之帶(最大在 335 nm 激發、390 nm 放射)，c)分配至膠原蛋白酶(collagenase)可消化之膠原(collagen)絡接之帶(最大在 370 nm 激發、460 nm 放射)以及 d)由於彈性蛋白(elastin)與膠原絡接而為最可能之帶(最大在 390 至 420 nm 寬帶激發、500 nm 放射)。見 Gillies 等人於 J. Invest. Dermatol. 2000 年 115(4)：704-707。第二級(secondary)螢光帶已被辨識出為與膠原過氧化(peroxidation)(Odetti 等人於 Lab Invest. 1994 年 70(1)：61-67)或彈性蛋白(Leffell 等人於 Arch Dermatol. 1988 年 124(10)：1514-1518)有關：二者分別為在 356 nm 激發、420 nm 放射以及在 390 nm 激發、460 nm 放射。

吾人已發現，當上皮細胞的增生(epidermal proliferation)增加時，分

配至色胺酸一部分(moiety)在原處(*in situ*)測量之螢光訊號會增加。見 Kollias 等人於 *J. Invest. Dermatol.* 1998 年 111(5) : 776-780 及 Zhang 等人於 *Lasers Surg. Med.* 1997 年 20(3) : 319-331。此已經藉由在例如撕除膠帶之機械性侵害後，誘發表皮修復而驗證之。見 Brancalion 等人於 *J. Invest. Dermatol.* 1999 年 113(6) : 977-982。此外，人體表皮內由果酸誘發(α -hydroxy-acid-induced)之細胞代換之增加，會使該 295 nm 激發帶以依劑量而定之方式增加。見 Doukas 等人於 *Photochem. Photobiol.* 2001 年 74(1) : 96-102。SKH 無毛老鼠的螢光(其肇因於色胺酸一部分)隨著年紀而降低，暗示表皮細胞代換速度之降低與年紀相關。見 Kollias 等人於 *J. Invest. Dermatol.* 1998 年 111(5) : 776-780。

蛋白質的非酵素(non-enzymatic)糖化(glycosilation)會隨著老化而自然發生(見 Monnier 等人於 *Clin Endocrinol Metab.* 1982 年 11(2) : 431-452 ; Njoroge 等人於 *J. Biol. Chem.* 1988 年 263(22) : 10646-10652 ; Sell 等人於 *J. Biol. Chem.* 1989 年 246(36) : 21597-21602 ; 以及 Shaklai 等人於 *J. Biol. Chem.* 1984 年 259(6) : 3812-3817)，造成蛋白質吸收與螢光(梅納反應 Maillard reaction)之增加。這種葡萄糖-蛋白質複合體(adduct)再排列及脫水(dehydrate)，以形成棕色與螢光之色素，其可形成造成被降低之蛋白質溶解度與被改變之機械性質的絡結。此種絡結在例如彈性蛋白與膠原的長時性(long-lived)蛋白中係為顯性的。在膠原中螢光絡結的累積已在糖尿病中用作受觀察之加速老化速度的標記物。見 Monnier 等人於 *Clin. Endocrinol. Metab* 1982 年 11(2) : 431-452。SKH 老鼠的可消化胃蛋白絡接螢光之最大量值隨著根據時間之老化而增加，然而可消化膠原分解膠原絡接及與彈性蛋白相關之螢光的最大量值的增加則不太大。見 Kollias 等人於 *J. Invest. Dermatol.* 1998 年 111(5) : 776-780。類似的趨勢已在老鼠活體外(*ex vivo*)(Odetti 等人於 *Lab Invest.* 1994 年 70(1) : 61-67)、人體臀部皮膚活體內(Na 等人於 *J. Invest. Dermatol.* 2001 年 116(4) : 536-540)、及在病人進行血管手術時，

由皮膚取出之人體真皮活體外(Odetti 等人於 Metabolism 1992 年 41(6)：655-658)觀察到。

發明人已驚訝地發現，皮膚之天然自發螢光係為評估皮膚健康與老化(例如隨時間之老化與因日曬引起的老化)對皮膚健康之影響的工具。

【發明內容】

在一方面，本發明之特徵為一種判定一皮膚區域之皮膚健康的方法，其係藉由(i)將該皮膚區域暴露於一第一暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第一螢光放射，其中該第一暴露輻射包含主要從約 290 nm 至約 300 nm 的波長；(ii)測量該具有從約 320 至約 350 的波長之第一螢光放射之強度；(iii)將該皮膚區域暴露於一第二暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第二螢光放射，其中該第二暴露輻射包含主要從約 330 nm 至約 420 nm 的波長；(iv)測量該具有從約 380 至約 470 的波長之第二螢光放射之強度；(v)計算在步驟(ii)測量到的強度與在步驟(iv)測量到的強度之比率；以及(vi)將該比率與一控制比率做比較。

在另一方面，本發明之特徵為一種判定對一主體(subject)的皮膚之治療效果的方法，其係藉由(i)將一第一皮膚區域暴露於一第一暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第一螢光放射，其中該第一暴露輻射包含主要從約 290 nm 至約 300 nm 的波長，且其中該第一皮膚區域係暴露於該混合物；(ii)測量該具有從約 320 至約 350 的波長之第一螢光放射之強度；(iii)將該第一皮膚區域暴露於一第二暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第二螢光放射，其中該第二暴露輻射包含主要從約 330 nm 至約 420 nm 的波長；(iv)測量該具有從約 380 至約 470 的波長之第二螢光放射之強度；(v)計算在步驟(ii)測量到的強度與在步驟(iv)測量到的強度之比率；(vi)對一第二皮膚區域重複步驟(i)至(v)，其中該二皮膚區域不暴露於該混合物；以及(vii)將該第一皮膚區域之比率與該第二皮膚區域之比率做比較。

在第三方面，本發明係關於評估一個體之整體健康的方法，包括為複數個健康個體產生一標準曲線，其係藉由 I)將每一健康個體之一皮膚區域暴露於一第一暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第一螢光放射，其中該第一暴露輻射包含主要從約 290 nm 至約 300 nm 的波長；II)測量該具有從約 320 nm 至約 350 nm 的波長之第一螢光放射之強度；III)將該皮膚區域暴露於一第二暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第二螢光放射，其中該第二暴露輻射包含主要從約 330 nm 至約 420 nm 的波長；IV)測量該具有從約 380 nm 至約 470 nm 的波長之第二螢光放射之強度；V)計算在步驟(II)測量到的強度與在步驟(IV)測量到的強度之比率；繪出個體的年紀相對於步驟 V 的比率之一標準曲線；對一個體執行步驟 II 與 IV 之測量；計算該個體步驟 V 之比率；以及將所討論之該個體在步驟 V 之比率與該標準曲線作比較，以判定該個體之整體健康。

或者，依據年紀之平均螢光值可藉由依循上述相同步驟而判定之。接著，一個體(其整體健康係在討論中)之螢光值可與該年紀之平均螢光值做比較。若該個體的螢光值低於該依據年紀之平均螢光值，則代表可能有例如糖尿病的健康問題。

【實施方式】

吾人相信熟悉此技藝者應可根據此處描述之內容而使用本發明至其極限。下述之特定實施例僅為闡示用，對本揭露之其他部分並無任何限制性。

除非另外定義，此處所用之所有技術性與科學性用詞均為具有本發明所屬技藝中之一般知識者所理解的意義。另外，此處所提到的所有出版物、專利申請案、專利及其他參考物皆併入供參考。除非另外有指出，否則一百分比(%)代表重量百分比(亦即，%(W/W))。

暴露輻射

在一實施例中，皮膚區域暴露於至少二種暴露輻射下(例如，來自如氙氣弧燈(xenon arc lamps)或水銀燈(mercury lamps)之 UV 輻射源)。在一實施例中，該第一暴露輻射包含主要從約 290 nm 至約 300 nm 的波長，且該第二暴露輻射包含主要從約 330 nm 至約 420 nm 的波長。

“主要”意為該暴露輻射之至少一半的波長。在一進一步的實施例中，該第一暴露輻射包含主要為約 295 nm 的波長，且該第二暴露輻射包含主要從約 390 nm 至約 410 nm 的波長。

將該暴露輻射導向皮膚，以放射一螢光放射，並測量此等放射(例如，一特定波長或波長範圍)之強度。在一實施例中，本方法包括測量該具有從約 330 nm 至約 350 nm 的波長(例如約 340 nm)之第一螢光放射之強度，及測量該具有從約 380 nm 至約 470 nm 的波長(例如約 440 nm)之第二螢光放射之強度。

可以計算以上測量出的二強度的比率，並將其與一控制比率作比較。“控制比率”意為一已經建立之標準比率(例如，先前從同一皮膚區域獲得，或從例如一尚未暴露於 UV 輻射之另一皮膚區域(如腋下或臀部)獲得)。因此，本方法可以判定該主體的皮膚健康。吾人已發現，暴露的皮膚區域與受保護的皮膚區域之該比率值的差異，一般係隨著年紀而下降。據信該差異係為皮膚藉由自我修復而對外部刺激反應之能力的指示。因此，據信將暴露區域與未暴露區域相比，較高的比率代表能夠自我再生的健康皮膚。更進一步，據信將暴露區域與未暴露區域相比，較高的比率亦代表能夠皮膚的年輕度(youthfulness)。

在一實施例中，本方法用來判定對一主體皮膚治療的影響。此等治療包括但不限於化妝品與藥學治療(例如局部的(topical)、非口服的(parenteral)、或口服的(oral))、雷射治療、或磨損(abrasive)治療(例如水晶磨皮霜(microderm abrasion))。在一實施例中，該治療為一局部混合物，例如包含如類維生素 A(retinoid)(例如維生素 A 酸(retinol acid)或維

生素 A 的(retinol))之一抗老化劑的局部乳液(lotion)或乳霜(cream)。

申請人已發現到，當肇因於色胺酸一部分之螢光單純的隨著年紀而降低時，分配至胃蛋白與可消化膠原分解膠原絡接之螢光帶、以及肇因於彈性蛋白絡接之螢光帶則會增加。吾人驚訝地發現這些趨勢與地理區域及季節性影響無關。在對陽光為受保護的區域亦發現類似趨勢。根據肇因於色胺酸一部分之螢光強度(以 295 nm 激發為中心)與分配至膠原和彈性蛋白絡接之螢光強度(以 390 nm 激發為中心)之比率，亦發現一與皮膚老化強烈關聯的標記。已發現此標記隨著年紀老化而降低，而日曬引起的老化則加速該降低的速度。亦已發現一般化的色胺酸能夠用來監控抗老化治療的效果。

螢光測量

可例如使用一附接於一螢光分光計(spectrofluorimeter)(例如 SkinSkan(JY Horiba, Edison, NJ))之光纖探測器(fiber optic probe)來實施活體內螢光光譜分析。此方法需要：a)一 UV 輻射源(例如氬氣弧燈或水銀燈)，b)一選擇該輻射波長的方法(例如單色器(monochromator)、稜鏡(prism)或光柵(grating))，c)一遞送該輻射至組織(tissue)(例如纖維束(fiber bundle))的方法，d)一從該組織(例如纖維束)收集放射的輻射的方法，e)一選擇該放射的輻射波長的方法(例如單色器、稜鏡或光柵)，以及 f)一檢測該放射的輻射的方法(例如光電倍增管(photomultiplier)、一單一光電二極體(photodiode)、一光電二極體陣列、或一電荷耦合 CCD 陣列)。見例如 Stamatias GN 等人於 J Invest Dermatol 2002 年 118(2)：295-302。

藉由放置光纖探測器而與探討中之皮膚部位接觸來實施測量。在每一組測量前，儀器為激發與放射在 250 nm 至 650 nm 區間作光譜測定(calibration)。螢光分光計之半階解析度(chromatic resolution)為 +/- 1 nm。

取得激發光譜為測量活體內皮膚螢光之較佳方法。選擇取得放射光譜的原因是基發光譜與吸收光譜類似，且帶通常比在放射取得內要窄，以上二原因有利於在複雜的光譜中辨識出個別的螢光團 (fluorophore)。用於本研究之激發光譜係如下：a) 具有在 340 nm 放射組之從 240 nm 掃描至 320 nm 的激發(色胺酸激發在 295 nm 最大)，b) 具有在 390 nm 放射組之從 240 nm 掃描至 380 nm 的激發(可消化胃蛋白膠原絡接激發在 335 nm 最大)，c) 具有在 420 nm 放射組之從 240 nm 掃描至 410 nm 的激發(可消化膠原分解膠原絡接激發在 360 nm 最大)，d) 具有在 500 nm 放射組之從 260 nm 掃描至 490 nm 的激發(彈性蛋白絡接—鎖鏈素與異鎖鏈素—激發在 390 nm 最大)。

為能考慮皮膚天然色素形成(其會減弱被檢測螢光訊號)中的各種變化，螢光強度係在對應波長處以同一皮膚位置之擴散反射訊號標準化。見例如 Stamatias GN 等人於 *J Invest Dermatol* 2002 年 118(2)：295-302。一擴散反射光譜可藉由將激發與放射單色器同步化以選擇相同的波長、掃描從 240 nm 至 500 nm 之範圍而得到。對於波長大於 315 nm 者，修正尤其必要。在此波長區測量到的螢光從真皮發出(Gillies 等人 2000 年，Kollias 等人 1998 年)，意味著激發光必須行經整個表皮，其於該處被表皮黑色素與蛋白質減弱。接著，放射光必須再次行經整個表皮到達收集纖維。這意味激發與放射強度均遭損害。另一方面，對於位在表皮的螢光團，亦即，激發波長小於 315 nm 的訊號(見 Gillies 等人於 *J. Invest. Dermatol.* 2000 年 115(4)：704-707)而言，這種減弱影響則不太嚴重。更進一步，光源的強度低於 300 nm，而藉由該擴散反射訊號的螢光標準化放大此等雜訊。這個問題只在色胺酸帶(295 nm 激發)發生。為克服此問題，色胺酸螢光訊號可被標準化至另一螢光帶，而非至該於 295 nm 的擴散反射值。由於已發現 390 nm 可改變老化至最慢速，故使用將色胺酸帶標準化至 390 nm 激發帶。其他之帶亦可用於標準化。又，若該輻射源強度足以在約 295 nm 以該擴散反射信號標

準化之，可以使用於此之波長。

臨床研究

為了研究老化對人類臉部皮膚之天然螢光的影響，需要 255 位健康個體的臉頰區域的光譜，他們的年紀從 15 歲至 75 歲、來自亞洲太平洋地區五個不同地理位置：a) 中國廣州，b) 中國哈爾濱，c) 中國上海，d) 日本仙台，以及 e) 菲律賓馬尼拉。為了辨識潛在的季節性影響，在二個位置(哈爾濱與上海)對相同個體在夏天與冬天測量其臉部螢光。所有主體的皮膚種類皆為 II-IV。

為了探究所觀察到的臉部皮膚螢光之改變係因為隨時間年紀之老化或是因為暴露於陽光(日曬引起的老化)，故執行第二組測量。測量 45 位年紀從 22 歲至 63 歲之健康主體的上內臂(“未暴露部位”)以及臉頰區域之皮膚螢光。所有主體的皮膚種類皆為 II-IV。此研究是在十月份於 New Jersey 的 Skillman 進行。

在第三組的實驗中，研究維生素 A 對脸部皮膚的影響。對 20 位年紀從 50 歲至 70 歲之高加索血統健康個體每天施加包含 0.15% 維生素 A 之乳霜處方，包含一寬帶光譜 SPF 15 遮光劑(sunscreen)於脸部之一側，而一匹配之 SPF 15 賦形體(vehicle)對照物(control)(無維生素 A)於脸部之另一側。主動(active)及佐藥(vehicle)均隨機性地分配給每一主體脸部的每一側。本研究之參與者及探究者對於該分配規定(code)均並無所悉。此研究是在二月份於 Arizona 的 Tucson 開始進行。螢光激發光譜係於基線、三個月與六個月時，從臉頰以及未受治療、對陽光為受保護控制的上內臂取得。糖尿病患者被排除在外，因為該情況可能影響螢光測量。

資料分析

使用最小平方差演算法(least square error algorithm)計算此資料之

線性回歸。配適度(goodness of fit)以相關係數(R^2)表示。使用學生的配對資料分佈 t-test 計算出統計之顯著性(significance)。

結果

已發現皮膚螢光之強度係隨著年紀而改變。如圖 1 所示，一系列的激發光譜係從二個分別為 30 歲與 60 歲、皮膚種類皆為 II 的個體的臉頰區域取得。一般而言，歸因於色胺酸一部分(295 nm)的螢光激發帶隨著年紀降低，而膠原與彈性蛋白絡接(335 nm、360 nm 與 390 nm)則增加。

從中國上海之 108 位個體得到的對 295 nm、335 nm、360 nm 與 390 nm 激發帶之螢光強度的年紀分佈係分別顯示於圖 2a、2b、2c 與 2d。此資料已經與線性回歸配適，且顯示在平均 \pm 一標準偏差之間的區間。很明顯的，在 295 nm 激發帶，此資料分佈的標準偏差值為較年輕者較高。對其他所有帶則發現相反結果。此 295 nm 激發帶為唯一隨著年紀而降低(以-0.002 單位/年)之帶。所有歸因於膠原與彈性蛋白絡接之帶增加，代表細胞外間質(extracellular matrix)絡接係隨著年紀而累積。從這些帶中，390 nm 帶顯示隨年紀增加最慢者(0.005 單位/年)。相關係數(R^2)最佳者為 390 nm 帶(0.61)，接著是 360 nm(0.55)、335 nm(0.41)及 295 nm(0.32)。

吾人觀察到相同的趨勢與地理區域、皮膚種類或季節性測量無關。該資料之最佳線性配適的斜度代表螢光強度的改變速度，其顯示於表 I。皮膚螢光帶的改變速度(單位/年)與標準化色胺酸螢光(I_{295nm}/I_{390nm})。所有的測量係於臉部(臉頰)上執行。從最佳線性配適的斜度計算出這些改變速度。這些值在螢光帶係以螢光單位/每年、在標準化色胺酸螢光係以比率單位/每年表示之。PDCXL = 胃蛋白可消化之膠原絡接，CDCXL = 膠原蛋白酶可消化之膠原絡接，NTF = 標準化色胺酸螢光。

表 I

地理區域	季節	n	色胺酸	PDCXL	CDCXL	彈性蛋白	NTF 比率
			295 nm	335 nm	360 nm	390 nm	295nm/390nm
中國廣州	夏	108	-0.0021	0.010	0.013	0.0053	-0.103
中國哈爾濱	夏	106	-0.0007	0.012	0.015	0.0062	-0.074
中國哈爾濱	冬	64	-0.0025	0.014	0.016	0.0047	-0.091
中國上海	夏	100	-0.0017	0.012	0.018	0.0060	-0.119
中國上海	冬	100	-0.0024	0.012	0.013	0.0053	-0.135
日本仙台	夏	108	-0.0019	0.010	0.016	0.0047	-0.128
菲律賓 馬尼拉	夏	100	-0.0003	0.002	0.010	0.0060	-0.038
美國 Skillman NJ	秋	45	-0.0773	0.008	0.006	0.0063	-0.088

色胺酸帶螢光強度在所有進行此研究的地理區域、且與季節無關均隨年紀降低，而其他三帶的強度則增加。更進一步，斜度值在不確定的限制內相當靠近。

將 295 nm 帶螢光強度值對其他三帶標準化而造成一螢光標記，其相當獨立於皮膚色素形成之外。更進一步，由於 295 nm 帶之強度降低，而歸因於絡接之帶之強度增加，上述之比率造成對年紀較強之依賴性。造成最強年紀依賴的比率為 295 nm 帶之螢光強度對 390 nm 帶之螢光強度。中國上海的標準化色胺酸螢光(I_{295nm}/I_{390nm})之年紀分佈係顯示於圖 3。此資料的所有特性已經與線性回歸配適，且提供在平均 \pm 一標準偏差之間的區間。此資料分佈的標準偏差值為較年輕者較高，然而變異係數(平均/標準偏差)與年紀並沒有重要關聯。除了馬尼拉($R^2 = 0.15$)之外，所有地方的相關係數皆為 0.4 至 0.5。

選擇臉頰區域係因為其在一生中被預期會接收會造成累積性皮膚傷害的陽光 UV 輻射。為了探究暴露於陽光(因日曬引起的老化)會影響所觀察到之標準化色胺酸螢光隨著年紀的降低，對 45 位志願者進行上內臂(相當未暴露部位)以及臉頰(暴露於陽光)的測量。結果顯示於圖 4a 及 4b。根據圖 3 顯示之資料，從臉頰取得之螢光比率($I_{295\text{nm}}/I_{390\text{nm}}$)隨著年紀降低(圖 4a)。該降低速度(0.087 單位/年)與表 I 所示之其他區域的值相近。對陽光為受保護的部位之標準化色胺酸螢光亦隨著年紀降低(圖 4b)，但是速度慢多了(0.010 單位/年)。

使用在活體內之皮膚螢光測量以繼續以維生素 A 局部治療之抗老化效果。以包含 0.15% 維生素 A 或賦形體處方對臉頰部位治療之結果係顯示於圖 5a、5b 及 5c。二群組均顯現在 295 nm 帶螢光之降低(圖 5a)，但臉頰接收維生素 A 之治療降低的速度明顯較小(主動治療群組之 -0.01 單位/月對安慰劑治療群組之 -0.04 單位/月)。390 nm 帶在本研究期間並未顯著改變，但是在主動與安慰劑治療群組二者均有明顯的微幅增加之趨勢(圖 5b)。對 390 nm 激發帶之色胺酸螢光帶標準化(圖 5c)顯示在維生素 A 治療群組於 295 nm 帶之降低最可能是因為該主體在研究期間色素形成之增加(注意本研究係在二月至七月間進行)。賦形體治療群組之標準化色胺酸螢光值的改變速度為 -0.062 ± 0.029 比率單位/每月。相較於賦形體治療部位，接收維生素 A 治療的部位在 295 nm 帶之強度降低係被顯著減弱($p < 0.01$)。對維生素 A 治療的部位，標準化色胺素螢光值維持垂直恆定，與接收賦形體治療部位之相對值顯著不同($p < 0.05$)。

本研究在時間為 0、3 及 6 個月時由個體上內臂(未治療)得到的測量顯示，其標準化色胺酸螢光值係為降低，雖然相較於根據圖 4b 顯示之資料之安慰劑治療皮膚，其降低為慢的多。以螢光測量的維生素 A 治療的抗老化結果，與在該治療區域皺紋之顯現降低之肉眼觀察結果符合。僅以賦形體乳霜治療並沒有皺紋顯現之效果。

在一分開的研究中，建立一健康個體的臉部皮膚螢光(標準化色胺酸螢光或“NTF”)之與年紀相關的曲線。

徵召 9 位健康及 13 位 II 型糖尿病患(自我宣告)、年紀在 45 歲至 60 歲之志願者參加螢光測量研究。對糖尿病人口測試，其 HbA1c 值分佈於 5.7 至 8.1。對所有志願者從臂之腹面(ventral arm)取得螢光光譜。

螢光之取得係由對在具有 50 nm 之常數 Stokes 位移之 250 至 600 nm 範圍之激發與放射波長之同步掃描所組成，並以螢光分光計 (SkinSkan(JY Horiba, Edison, NJ))實施。此掃描提供資訊給色胺酸螢光(激發 295 nm, 放射 345 nm)以及膠原與彈性蛋白絡接相關之螢光，其包括色胺酸螢光被標準化之帶(激發 390 nm, 放射 440 nm)。

在對照物群組測量之標準化色胺酸螢光值(平均 \pm 一標準偏差 = 2.94 \pm 1.94)係高於糖尿病群組(平均 \pm 一標準偏差 = 0.85 \pm 0.45)。糖尿病群組之低 NTF 數字相較於對照健康群組，對表皮修護之能力的降低。

糖尿病患皮膚的降低之 NTF 值可能與糖尿病患皮膚之較差的傷口癒合及修護能力有關。將該資料(表 2)與先前所繪之資料比較。根據從先前研究收集而來之“暴露”區域的 NTF 值，其顯示對照物群組落入年紀匹配(age-mated)之“健康”曲線內，而糖尿病患則有較低的值。

以圖示參加者之 NTF 值與 HbA1c 值的關聯。一確定的趨勢為，較高的 HbA1c 值與較高的 NTF 值相關。由於這兩個參數為糖尿病的指標，而並不必然有原因-影響(cause-effect)之關聯，所以這種關聯性不必非常強。

如表 3 所示，糖尿病患之 NTF 值與年紀匹配對照物群組之平均 NTF 值的差異，與糖尿病患之 HbA1c 值略有關聯。因此 NTF 值為糖尿病之級數(progression)的指示。

表 2

	年紀	n	NTF 值
對照物*	16.6 +/- 1.9	19	7.5548 +/- 3.7455
對照物*	36.1 +/- 2.4	20	4.4387 +/- 2.0563
對照物*	57.8 +/- 1.8	20	2.4180 +/- 1.4281
對照物*	69.2 +/- 3.0	22	2.0012 +/- 1.3322
對照物**	48.1 +/- 6.4	9	2.9455 +/- 1.9440
糖尿病**	51.5 +/- 3.6	13	0.8481 +/- 0.4467

* 臉頰；** 前臂

表 3

HbA1c (5)	與對照物之 NTF 差異
5.7	1.7681
6.2	2.3265
6.2	2.1470
6.4	2.2231
6.5	1.5200
6.8	2.2914
7.2	2.5223
7.3	2.1321
7.5	1.8445
7.7	2.6253
8.1	2.4168

此資料指出，一個體之整體健康可藉由產生健康個體之標準曲線以及將一個體(其健康係在討論中)之比率與在該曲線之比率做比較。如上面所指出，落於該標準曲線下面的比率則代表該個體有例如糖尿病之健康問題。

應理解本發明雖已由詳細描述說明之，但前述之描述僅為闡示之用，並非用來限制本發明之範圍。本發明之範圍係由隨附之申請專利範圍界定。其他之態樣、優點與修正均在本申請專利範圍內。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示兩個年紀分別為 30 歲(虛線)及 60 歲(實線)的個體之激發光譜。

圖 2a 顯示在 295 nm 激發帶之螢光強度的年紀分佈。

圖 2b 顯示在 335 nm 激發帶之螢光強度的年紀分佈。

圖 2c 顯示在 360 nm 激發帶之螢光強度的年紀分佈。

圖 2d 顯示在 390 nm 激發帶之螢光強度的年紀分佈。

圖 3 顯示在 295 nm 激發帶之螢光強度相對 390 nm 激發帶之螢光強度標準化的年紀分佈。

圖 4a 顯示對陽光為暴露的皮膚區域之標準化螢光強度的年齡分佈。

圖 4b 顯示對陽光為受保護的皮膚區域之標準化螢光強度的年齡分佈。

圖 5a 顯示在 295 nm 激發之螢光強度在以維生素 A(retinal)(主動)及安慰劑(placebo)治療之皮膚隨時間之變化。

圖 5b 顯示在 390 nm 激發之螢光強度在以維生素 A(retinal)(主動)及安慰劑(placebo)治療之皮膚隨時間之變化。

圖 5c 顯示標準化螢光強度在以維生素 A(retinal)(主動)及安慰劑(placebo)治療之皮膚隨時間之變化。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種判定一皮膚區域之皮膚健康與一個體之整體健康的方法，其係藉由將該皮膚區域暴露於一第一暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第一螢光放射，測量該第一螢光放射之強度，將該皮膚區域暴露於一第二暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第二螢光放射，測量該第二螢光放射之強度，計算這些強度之比率，並將該比率與一控制比率做比較。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to a method of determining skin health of an area of skin and overall health of an individual by exposing the area of skin to a first exposure radiation to induce the area of skin to emit a first fluorescent emission, measuring the intensity of the first fluorescent emission, exposing the area of skin to a second exposure radiation to induce the area of skin to emit a second fluorescent emission, measuring the intensity of the second fluorescent emission, calculating a ratio of these intensities, and comparing the ratio to a control ratio.

十、申請專利範圍：

1. 一種判定一皮膚區域之皮膚健康的方法，該方法包括以下步驟：
 - (i) 將該皮膚區域暴露於一第一暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第一螢光放射，其中該第一暴露輻射包含主要從約 290 nm 至約 300 nm 的波長；
 - (ii) 測量該具有從約 320 nm 至約 350 nm 的波長之第一螢光放射之強度；
 - (iii) 將該皮膚區域暴露於一第二暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第二螢光放射，其中該第二暴露輻射包含主要從約 330 nm 至約 420 nm 的波長；
 - (iv) 測量該具有從約 380 nm 至約 470 nm 的波長之第二螢光放射之強度；
 - (v) 計算在步驟(ii)測量到的強度與在步驟(iv)測量到的強度之比率；以及
 - (vi) 將該比率與一控制比率做比較。
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該第一暴露輻射包含主要為約 295 nm 的波長。
3. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該步驟(ii)包含測量具有約 340 nm 的波長之該第一螢光放射的強度。
4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中第二暴露輻射包含主要從約 390 nm 至約 410 nm 的波長。
5. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中第二暴露輻射包含主要從約 390 nm 至約 410 nm 的波長。
6. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其中第二暴露輻射包含主要從約 390 nm 至約 410 nm 的波長。
7. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該步驟(iv)包含測量具

- 有約 440 nm 的波長之該第二螢光放射的強度。
8. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該步驟(iv)包含測量具有約 440 nm 的波長之該第二螢光放射的強度。
 9. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該步驟(iv)包含測量具有約 440 nm 的波長之該第二螢光放射的強度。
 10. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該控制比率為藉由對該主體之一第二皮膚區域重複步驟(i)至(v)而計算出的比率。
 11. 一種判定對一主體的皮膚之治療效果的方法，該方法包括以下步驟：
 - (i) 將一第一皮膚區域暴露於一第一暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第一螢光放射，其中該第一暴露輻射包含主要從約 290 nm 至約 300 nm 的波長，且其中該第一皮膚區域係暴露於該治療；
 - (ii) 測量該具有從約 320 nm 至約 350 nm 的波長之第一螢光放射之強度；
 - (iii) 將該第一皮膚區域暴露於一第二暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第二螢光放射，其中該第二暴露輻射包含主要從約 330 nm 至約 420 nm 的波長；
 - (iv) 測量該具有從約 380 nm 至約 470 nm 的波長之第二螢光放射之強度；
 - (v) 計算在步驟(ii)測量到的強度與在步驟(iv)測量到的強度之比率；
 - (vi) 對一第二皮膚區域重複步驟(i)至(v)，其中該二皮膚區域不暴露於該治療；以及
 - (vii) 將該第一皮膚區域之比率與該第二皮膚區域之比率做比較。
 12. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該第一暴露輻射包含主要為約 295 nm 的波長。

13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該步驟(ii)包含測量具有約 340 nm 的波長之該第一螢光放射的強度。
14. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中第二暴露輻射包含主要從約 390 nm 至約 410 nm 的波長。
15. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中第二暴露輻射包含主要從約 390 nm 至約 410 nm 的波長。
16. 如申請專利範圍第 13 項之方法，其中第二暴露輻射包含主要從約 390 nm 至約 410 nm 的波長。
17. 如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該步驟(iv)包含測量具有約 440 nm 的波長之該第二螢光放射的強度。
18. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該步驟(iv)包含測量具有約 440 nm 的波長之該第二螢光放射的強度。
19. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該步驟(iv)包含測量具有約 440 nm 的波長之該第二螢光放射的強度。
20. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該第一皮膚區域與該第二皮膚區域為相同皮膚區域，且其中對該第二皮膚區域之比率的計算係在該治療之前發生。
21. 一種評估一個體之整體健康的方法，包括：
為複數個健康個體產生一標準曲線，其係藉由 I)將每一健康個體之一皮膚區域暴露於一第一暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第一螢光放射，其中該第一暴露輻射包含主要從約 290 nm 至約 300 nm 的波長；II)測量該具有從約 320 nm 至約 350 nm 的波長之第一螢光放射之強度；III)將該皮膚區域暴露於一第二暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第二螢光放射，其中該第二暴露輻射包含主要從約 330 nm 至約 420 nm 的波長；IV)測量該具有從約 380 nm 至約 470 nm 的波長之第二螢光放射之強度；V)計算在步驟(II)測量到的強度與在步驟(IV)測量到的強度之比率；繪出個體

的年紀相對於步驟 V 的比率之一標準曲線；

對一個體執行步驟 II 與 IV 之測量；

計算該個體步驟 V 之比率；以及

將所討論之該個體在步驟 V 之比率與該標準曲線作比較，以判定該個體之整體健康。

22. 一種評估一個體之整體健康的方法，包括：

為複數個健康個體產生一平均螢光值，其係藉由 I)將每一健康個體之一皮膚區域暴露於一第一暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第一螢光放射，其中該第一暴露輻射包含主要從約 290 nm 至約 300 nm 的波長；II)測量該具有從約 320 nm 至約 350 nm 的波長之第一螢光放射之強度；III)將該皮膚區域暴露於一第二暴露輻射下，以誘發該皮膚區域發出一第二螢光放射，其中該第二暴露輻射包含主要從約 330 nm 至約 420 nm 的波長；IV)測量該具有從約 380 nm 至約 470 nm 的波長之第二螢光放射之強度；V)計算依據年紀之平均螢光值；

一個體(其整體健康係在討論中)之螢光值可與該年紀之平均螢光值做比較。若該個體的螢光值低於該依據年紀之平均螢光值，則代表可能有例如糖尿病的健康問題。；繪出個體的年紀相對於步驟 V 的比率之一標準曲線；

對一其健康係在討論中之個體執行步驟 II 與 IV 之測量；以及

將其健康係在討論中之該個體之螢光值與該依據年紀之平均螢光值作比較，以判定該個體之整體健康。

圖 1

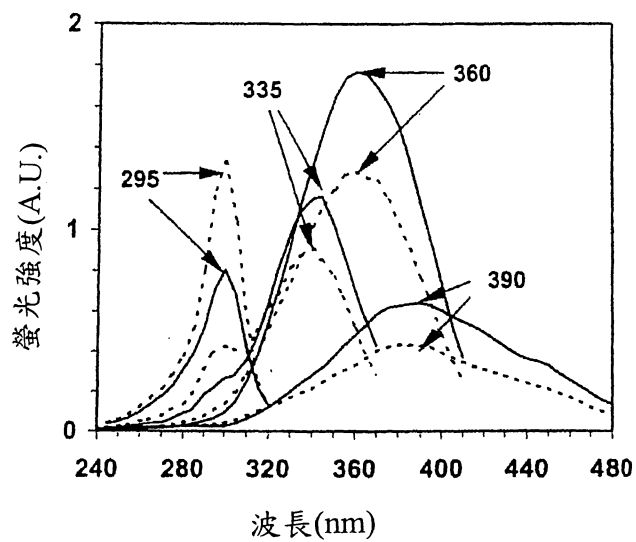


圖 2a

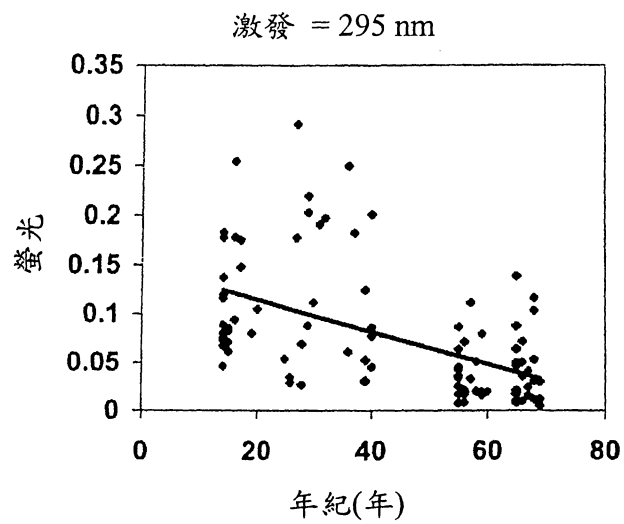


圖 2b

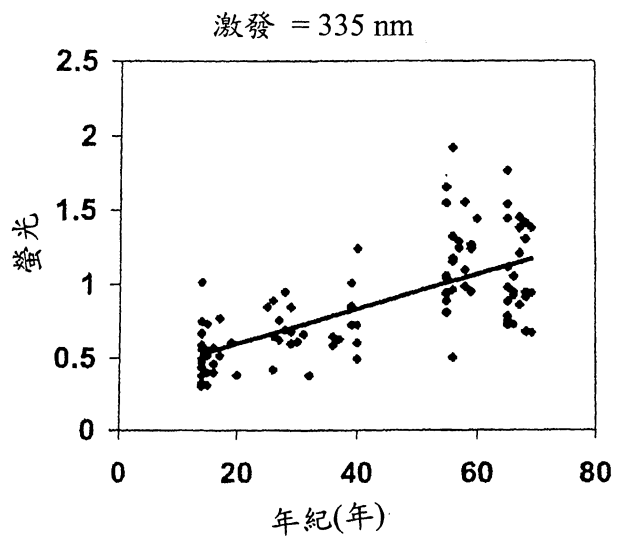


圖 2c

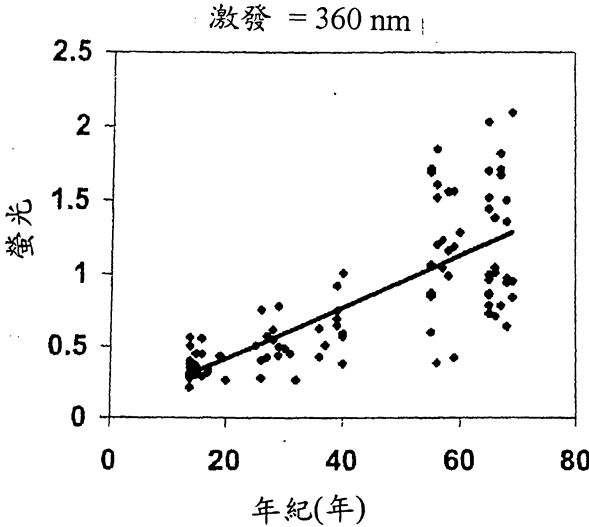


圖 2d

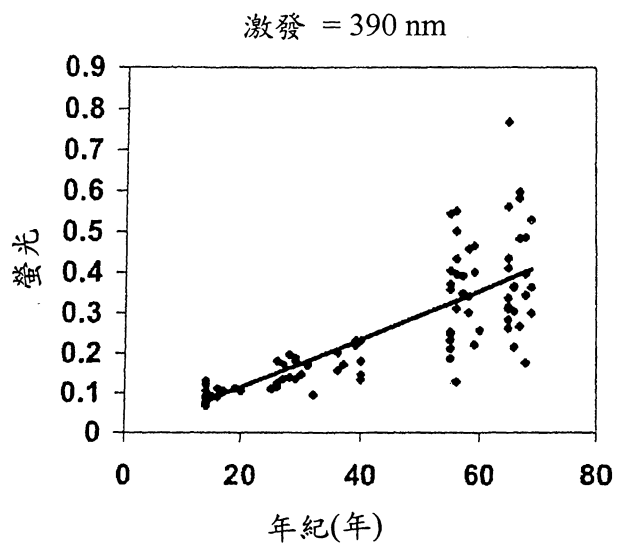


圖 3

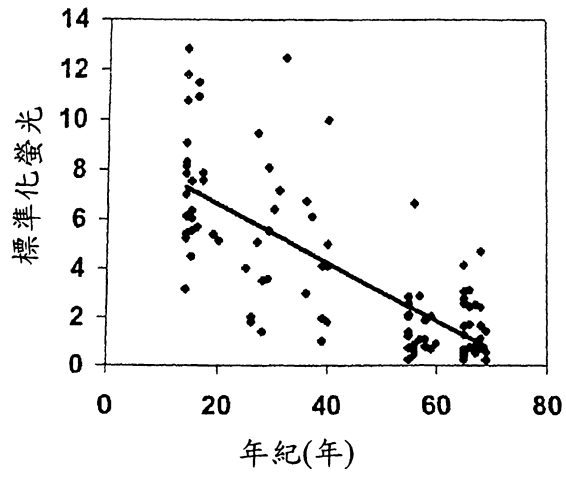


圖 4a

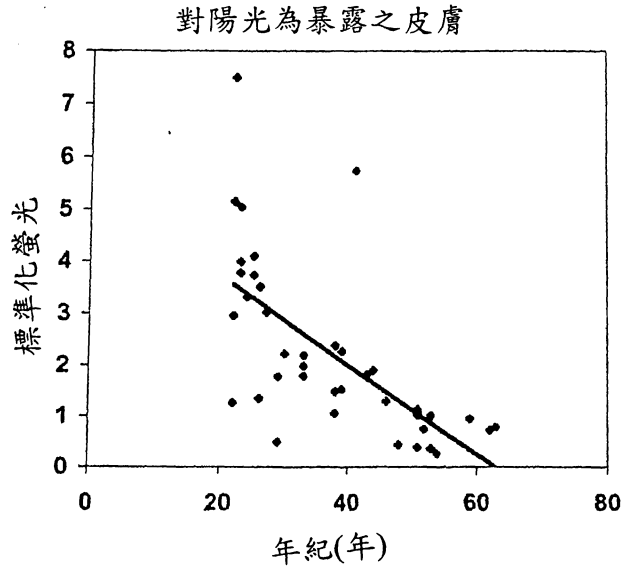


圖 4b

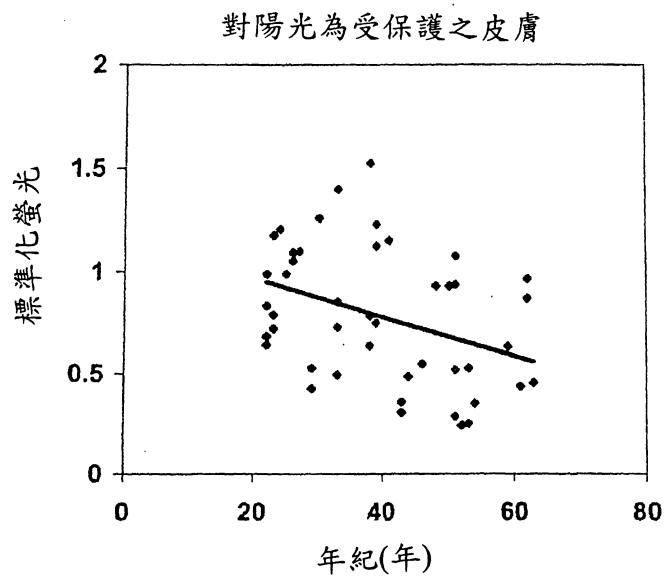


圖 5a

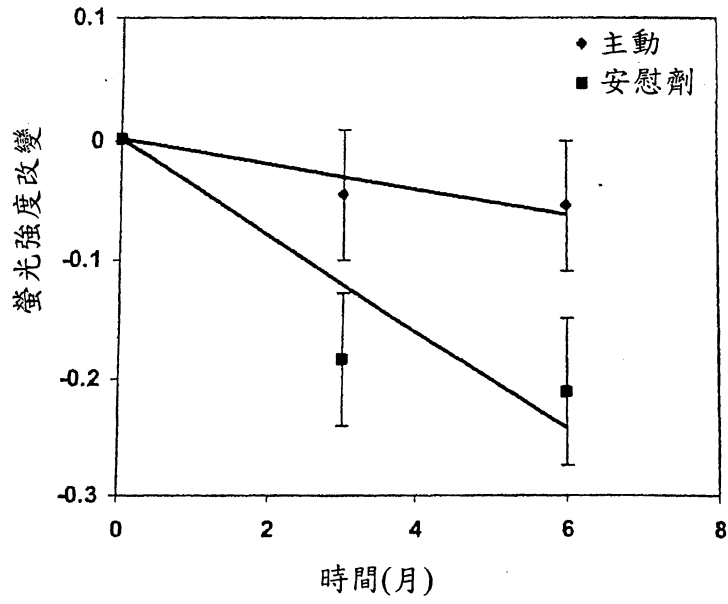


圖 5b

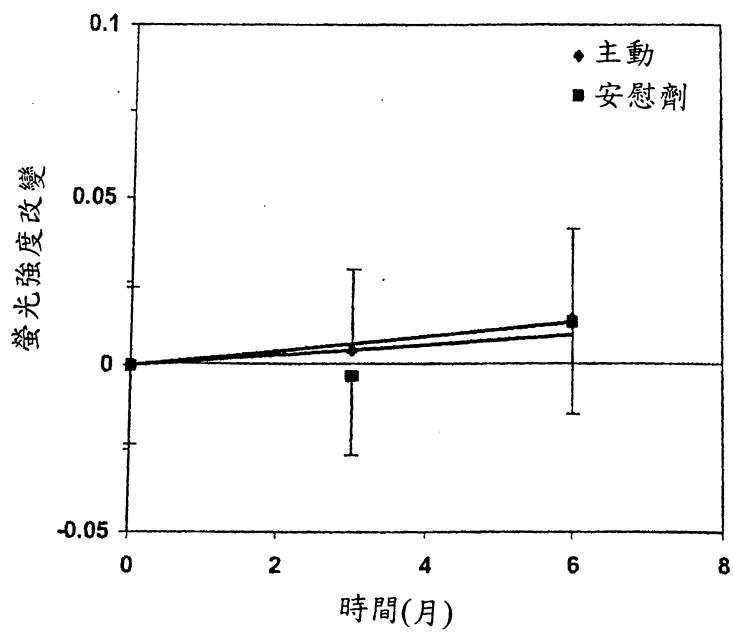
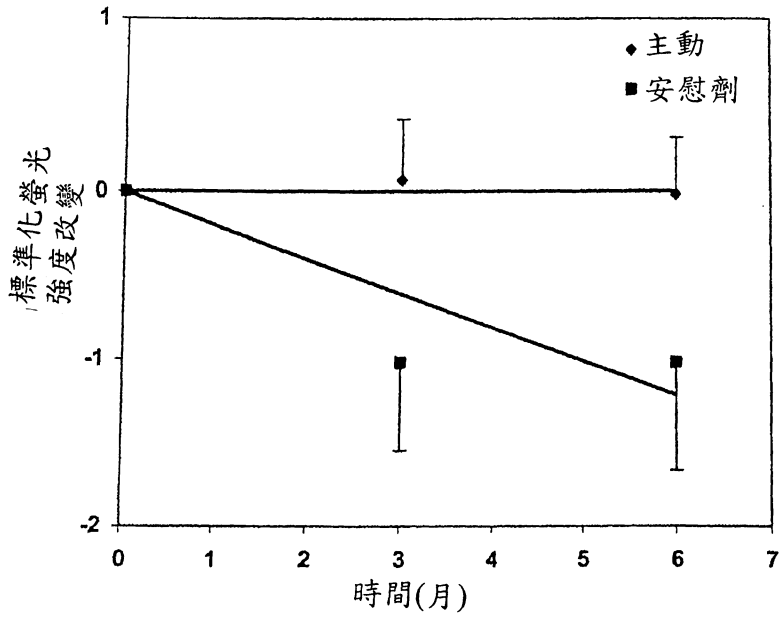


圖 5c



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(3)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：