



(21)申請案號：106137067

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 27 日

(51)Int. Cl. : *A61N5/10 (2006.01)* *G01N23/04 (2006.01)*
A61B6/00 (2006.01) *A61K51/00 (2006.01)*
G03B42/02 (2006.01) *G01T1/161 (2006.01)*

(30)優先權：2016/10/28 日本 2016-212330

(71)申請人：日商資生堂股份有限公司 (日本) SHISEIDO COMPANY, LTD. (JP)
日本

(72)發明人：江連智暢 EZURE, TOMONOBU (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：5 共 18 頁

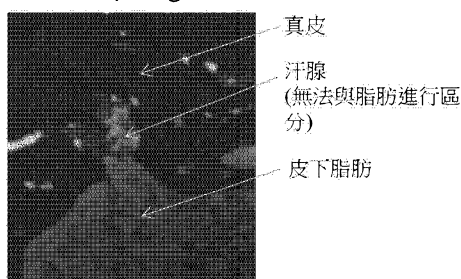
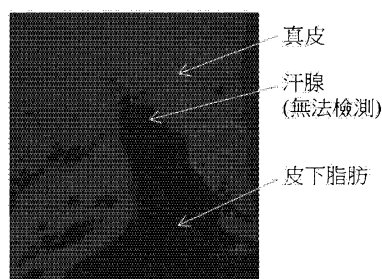
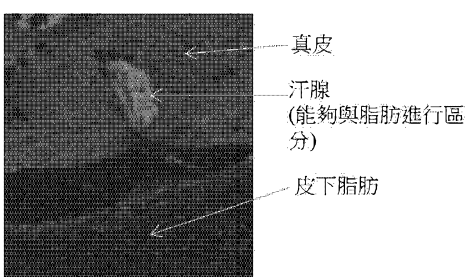
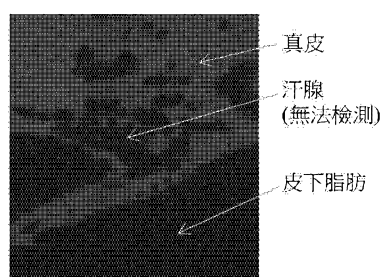
(54)名稱

用於 X 射線攝影之試料製備方法

(57)摘要

本發明之課題在於提供一種使用 X 射線微 CT 之皮膚組織之觀察方法。本發明藉由使用丙酮作為預處理溶液，並使用含碘溶液作為染色液進行染色，能夠識別皮膚組織中之汗腺、皮脂腺、毛囊等附屬器官。

指定代表圖：

(1)
PFA+1/2Lugol(2)
PFA+磷鉬酸(3)
丙酮+1/2Lugol(4)
丙酮+磷鉬酸

【圖1】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於X射線攝影之試料製備方法

【技術領域】

本發明係關於對皮膚試料之X射線圖像攝影法之技術領域。

【先前技術】

X射線之透過性較高，且透過性根據物質不同而有所不同。因此，利用X射線之透過性之差異而用於醫療領域或非破壞性內部檢查領域。業界開發了利用電腦對X射線攝影進行處理而獲取三維圖像之技術，稱為電腦斷層攝影(CT)。若不考慮放射線曝射之影響，CT可使解像度極高，可獲取顯微鏡等級或其以上之微細結構之三維圖像。此種CT被稱為X射線微CT，雖然並不適用於生物體，但適於更細緻地觀察所獲取之組織內部之三維結構。

自開發X射線微CT以來，能夠進行單離組織、樹脂成形品、小型電子零件等各種物質之剖面圖像之獲取及解析。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[非專利文獻1]Journal of Cell Science (2016), vol. 129, pp, 2483-2492

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

本發明者等人嘗試使用X射線微CT對人體皮膚組織試料進行皮膚三維結構之解析，結果能夠識別表皮層、真皮層、及皮下脂肪層等較大結構

之差異，但另一方面無法識別皮膚結構所包含之附屬器官等結構。

[解決問題之技術手段]

因此，本發明者等人對X射線微CT裝置之設定、組織試料之製備進行了努力研究。本發明者等人藉由丙酮對皮膚組織試料進行預處理並利用含碘溶液進行染色而供於X射線微CT裝置，結果意外地能夠識別作為皮膚所包含之微小器官之附屬器官，從而完成了本發明。

具體而言，本發明係關於一種利用X射線圖像攝影法之皮膚試料之觀察方法。本發明之觀察法之特徵在於包括以下步驟：

使皮膚試料與含丙酮溶液進行接觸；

使皮膚試料與含碘溶液進行接觸；及

藉由X射線電腦斷層攝影裝置對皮膚試料獲取三維圖像。

於另一態樣中，本發明亦係關於一種用於X射線圖像攝影之皮膚試料之製備方法。本發明之製備方法之特徵在於包括以下步驟：

使皮膚試料與含丙酮溶液進行接觸；及

使皮膚試料與含碘溶液進行接觸。

本發明之又一態樣亦係關於一種藉由使用本發明之觀察方法對汗腺最下部之深度進行測定而實現的皮膚空腔化之檢測方法。

[發明之效果]

藉由對利用本發明之皮膚試料之製備方法所製備之皮膚試料進行觀察，能夠觀察作為皮膚所包含之微細組織之附屬器官之結構。又，藉由對作為一種附屬器官之汗腺之深度進行測定，亦可檢測皮膚空腔化。

【圖式簡單說明】

圖1表示使用(1)PFA-含碘溶液(Lugol)、(2)PFA-磷鎢酸、(3)丙酮-含

碘溶液(Lugol)、及(4)丙酮-磷鎢酸作為預處理溶液-染色液之組合進行處理並利用X射線微CT所獲取之三維圖像。

圖2係於利用丙酮-含碘溶液之組合進行處理並利用X射線微CT所獲取之三維圖像中表示器官(毛髮(hair)、立毛肌(hair muscle, arrector pili)、汗腺(sweat gland)、及皮脂腺(sebaceous gland))以及組織(表皮(epidermis)、真皮層(dermal layer))之圖。

圖3之圖3A表示正常(normal)皮膚及嚴重鬆弛(severe sagging)之皮膚之外觀照片、及利用超音波所得之內部圖像。正常皮膚中，真皮層(dermal layer)與皮下脂肪(fat)之邊界平坦，另一方面，於嚴重鬆弛之皮膚中，發現嚴重之真皮缺損(severe defect)。圖3B係表示真皮空腔之大小(defect severity)與皮膚彈性(skin firmness)之關係之圖表。真皮空腔越大(Large)，則皮膚之彈性越低，真皮空腔越小，則皮膚之彈性越高(High)。相關計數係藉由皮爾遜相關係數(Pearson's correlation coefficient)表示。

圖4之圖4A表示利用X射線微CT所獲取之包含汗腺(sweat gland)之部分之三維圖像。於汗腺之下側發現空腔(cavity)。圖4B表示汗腺(sweat gland)、毛囊(hair follicle)、及皮脂腺(sebaceous gland)之組織切片染色照片。汗腺中存在空腔(cavitation)，另一方面，毛囊或皮脂腺中不存在空腔(no cavitation)。圖4C係表示汗腺與真皮空腔之局部共存(co-localized)比率(ratio)之圖表。未局部共存(none)之情形為約10%左右。有意義差係藉由司徒頓t字檢測(Student's t-test)求出。

圖5表示30多歲之年輕(young)皮膚及60多歲之年老(old)皮膚中之汗腺(sweat gland)部分之三維圖像。於年老皮膚中，汗腺向上方朝表皮

(epidermis)側收縮(shrink upward)。

【實施方式】

本發明係關於利用X射線圖像攝影法之皮膚試料之觀察方法。該觀察法之特徵在於包括以下步驟：

使皮膚試料與含丙酮溶液進行接觸；

使皮膚試料與含碘溶液進行接觸；及

藉由X射線電腦斷層攝影裝置對皮膚試料獲取三維圖像。

X射線圖像攝影方法可選擇任意之輸出及解像度。就觀察三維結構之方面而言，較佳為斷層照片(CT圖像)。又，就觀察附屬器官等微小器官之觀點而言，較佳為具有0.1 μm 以下之解析度之被稱為所謂之X射線微CT的攝影法。就觀察更小之組織之觀點而言，X射線微CT之解析度較佳為0.1 μm 以下，進而較佳為0.01 μm 以下，進而較佳為0.05 μm 以下。解析度之下限並無特別限定，受X射線CT裝置之能力之影響，例如為0.0001 μm 以上、或0.001 μm 以上。

所謂皮膚試料係指自皮膚獲取之試料。皮膚試料只要以包含欲觀察之區域之形態獲取即可。皮膚試料只要包含表皮、真皮、及皮下組織之任一種以上即可。可使用皮膚切片，亦可使用三維培養皮膚模型。皮膚試料之獲取來源之動物種類並無限定，例如為人、豬、牛、小鼠、大鼠、兔、馬等。尤佳為人體皮膚，具有與人體皮膚接近之結構之豬之皮膚作為觀察資料亦較佳。

表皮係存在於皮膚最外層之皮膚組織。表皮主要包含角質層、顆粒層、有棘層、及基底層。存在於基底層之基底細胞分裂並向外層移動。於該移動過程中產生脫核而扁平化並向角質層分化，最終剝落。表皮中除角

質形成細胞外，存在黑色素細胞、蘭格漢式細胞、梅克爾細胞等。於表皮與真皮之邊界存在基底膜，且基底膜隆起而呈乳頭結構。真皮包含乳頭層、乳頭下層、網狀層。汗腺或皮脂腺等分泌腺或毛髮器官陷入表皮以至真皮而存在。作為分泌腺，存在外分泌腺、頂漿分泌腺、皮脂腺、毛脂腺。作為毛髮器官，存在毛囊、毛髮、及立毛肌。分泌腺中之頂漿分泌腺、毛脂腺係附屬於毛髮器官。根據先前之X射線微CT，難以識別該等毛髮器官或分泌腺，但於藉由本發明之試料製備方法製備試料並利用觀察方法進行觀察之情形時，能夠識別該等附屬器官。

所獲取之皮膚試料可於獲取後藉由冷藏或冷凍進行保存，亦可於獲取後立即與含丙酮溶液進行接觸。含丙酮溶液只要為包含丙酮之溶液，則可為任意溶液。丙酮之含量較佳為50%以上，進而較佳為80%以上，最佳為100%丙酮。

與含丙酮溶液之接觸時間可根據皮膚試料之大小而任意選擇。若為例如5 mm厚度之皮膚切片，則可接觸6小時以上，較佳為12小時以上，進而較佳為24小時以上。接觸時間之上限並無特別限定，就實驗簡化之觀點而言為48小時以內，更佳為24小時以內。與含丙酮溶液之接觸步驟可於任意溫度下進行，例如可於室溫或冷藏下進行。就處理生物體試料之觀點而言，較佳為於冷藏下例如4℃下進行。

於本發明中，所謂含碘溶液只要含有碘或碘化物，則可為任意溶液。碘對X射線之吸收率較高，故而認為能夠根據碘之沈積度藉由X射線攝影進行組織之識別。因此，含碘溶液亦可稱為染色液。碘化物可用於促進碘之溶解。作為本發明之含碘溶液可包含之碘化物，可列舉碘化氫、碘化鈉、碘化鉀、四碘化碳等任意碘化物。亦可為碘與碘化鉀之混合溶液，

例如亦可為盧戈耳(Lugol)試劑。含碘溶液中之碘化物及碘之濃度可使用合計為0.1~10%之濃度，進而較佳為使用1~5%之濃度。作為碘化物與碘之混合比，可於1：10~10：1之間任意選擇。作為混合比，更佳為1：5~5：1，進而較佳為1：2~2：1。關於盧戈耳試劑，使用碘化鉀與碘之合計量為3.75%之試劑，且其存在比為2：1。

與含碘溶液之接觸時間可根據皮膚試料之大小而任意選擇。若為例如5 mm之厚度之皮膚切片，則可接觸12小時以上，較佳為24小時以上，進而較佳為48小時以上。接觸時間之上限並無特別限定，就實驗簡化之觀點而言為96小時以內，更佳為48小時以內。與含丙酮溶液之接觸步驟可於任意溫度下進行，例如可於室溫或冷藏下進行。就處理生物體試料之觀點而言，較佳為於冷藏下例如4℃下進行。

於本發明中，可於各步驟之前或之後，為了沖洗各步驟中所使用之溶液而進行洗淨步驟。洗淨步驟可藉由利用任意溶液替換1~複數次而進行。作為所使用之溶液，就處理生物體試料之觀點而言，可使用磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate Buffered Saline, PBS)，亦可使用下一步驟中所使用之溶液。

於與含碘溶液之接觸步驟之後，為了獲取三維圖像而藉由X射線電腦斷層攝影裝置進行攝影。攝影可藉由於任意X射線CT裝置中適當選擇輸出而進行。作為所使用之輸出，就提高解析度之觀點而言，較佳為10 kV以上，更佳為可於25 kV以上進行攝影。較佳為100 kV以下，更佳為於50 kV以下進行攝影。作為一例，可於Comscan Techno公司之 μ CT裝置(D200RSS270)中將輸出設定為50 kV及X射線管電流200 μ A而進行觀察。

於使用本發明之方法藉由X射線微CT使皮膚試料可視化時，發現存在距皮膚表面之長度縮短之汗腺。將此種汗腺稱為萎縮之汗腺。汗腺之中，外分泌腺尤為萎縮。主要於高齡者之皮膚中大量觀察到萎縮之汗腺。可知汗腺之最深部通常存在於真皮與皮下組織之邊界，萎縮之汗腺向皮膚表層側移動萎縮之量，且該移動之區域與皮下組織換位(圖3及4)。將皮下組織如此向真皮側隆起而形成之洞稱為真皮空腔。真皮空腔之大小為具有約 $10\text{ }\mu\text{m}\sim 1000\text{ }\mu\text{m}$ 之直徑之大致球狀，但其形狀並不固定。真皮空腔內被皮下脂肪組織所填充，故而亦可簡稱為真皮洞。認為由於真皮層中所包含之細胞成分或間質成分並不包含於真皮空腔內，故而喪失了皮膚彈力，產生鬆弛，導致皮膚之老化(PCT/JP2015/072140)。

因此，可藉由判定汗腺是否萎縮而測定皮膚之鬆弛。可基於皮膚表面至汗腺最下部之深度確定汗腺之萎縮。又，可由不存在汗腺且皮下脂肪組織不隆起之區域中之皮膚表面至皮下脂肪組織之距離(L_1)、及存在汗腺之區域之至汗腺最深部(或皮下組織)之距離(L_2)求出萎縮度。例如，亦可以下式：

[數1]

$$\text{汗腺萎縮度} = (L_1 - L_2) / L_1$$

表示。隨著深度增加，萎縮度會降低，皮膚之空腔變少。另一方面，隨著深度降低，萎縮度會增加，皮膚之空腔變大。

因此，藉由使用本發明之觀察方法測定汗腺之萎縮度，能夠進行皮膚空腔化之檢測。

本說明書中所提及之所有文獻係以引用之形式將其整體併入至本說明書。

以下所說明之本發明之實施例之目的僅在於例示，並不限定本發明之技術範圍。本發明之技術範圍僅由申請專利範圍之記載進行限定。於不脫離本發明之趣旨之條件下，可進行本發明之變更例如本發明之構成要件之追加、刪除及替換。

[實施例]

實施例1：

利用4%之PFA或丙酮對皮膚檢體進行預處理後，浸漬於盧戈耳或磷鎢酸並利用PBS進行洗淨，其後利用CT進行攝影。

自接受過整形外科手術之17名女性受驗者及20名男性受驗者獲取剩餘皮膚並切成5 mm厚作為皮膚試料。利用PBS進行洗淨後，將皮膚試料放入丙酮中，並於4℃下培養24小時，藉此進行預處理。作為比較，使用4%之PFA水溶液代替預處理溶液之丙酮。培養後，利用PBS將皮膚試料洗淨。其次，將皮膚試料放入稀釋盧戈耳試劑而成之含碘溶液(2.5%碘化鉀及1.25%碘水溶液)中，並於4℃下培養24小時。作為比較，使用含磷鎢酸溶液代替含碘溶液。含磷鎢酸溶液係將6.7%磷鎢酸水溶液作為儲備溶液，對儲備溶液1.5 ml添加1.5 ml之水及100%乙醇7 ml而製作染色液，並對試料進行染色。利用PBS將染色後之皮膚試料洗淨，並藉由 μ CT(D200RSS270；Comscan Techno)進行測定。將關於預處理溶液-染色液之組合：(1)PFA-含碘溶液(Lugol)、(2)PFA-磷鎢酸、(3)含丙酮-碘溶液(Lugol)、及(4)丙酮-磷鎢酸之X射線微CT之獲取圖像示於圖1。

示出使用(3)含丙酮-碘溶液作為預處理-染色液而獲取之三維圖像(圖2)。圖2中顯示了器官(毛髮(hair)、立毛肌(hair muscle, arrector pili)、汗腺(sweat gland)、及皮脂腺(sebaceous gland))以及組織(表皮

(epidermis)、真皮層(dermal layer))。

實施例2：

對2名30多歲之同齡女性之皮膚外觀拍照，且利用超音波造影裝置對皮膚之內部獲取圖像。1名之皮膚外觀正常，但另1名之皮膚外觀具有皮膚之鬆弛。將皮膚外觀及超音波圖像示於圖3A。即便為相同年齡之對象，於存在皮膚之鬆弛之對象之皮膚中，於超音波圖像中發現脂肪組織向真皮部分之隆起(以下，稱為真皮空腔)，與此相對，於不存在鬆弛之正常對象之皮膚中，未發現此種空腔。其次，改變受驗者而對皮膚中之真皮空腔之大小與該部分之堅硬度之關係進行計測。皮膚彈性(skin firmness)係藉由使用皮膚彈性測試儀(Cutometer)測定Ur/Uf值而確定。將結果示於圖3B。

本發明者等人為了探究真皮空腔之原因而對實施例1中所獲得之三維圖像進行解析，結果發現於存在真皮空腔之部位存在汗腺(圖4A)。為了研究汗腺與真皮空腔之關聯，於組織切片染色圖像中對汗腺(sweat gland)、皮脂腺(Sebaceous gland)、及毛囊(Hair follicle)進行觀察，結果發現於汗腺中異常地存在真皮空腔(圖4B)。對汗腺與真皮空腔之局部共存率進行計算(圖4C)。

其次，利用三維圖像及組織切片染色圖像之兩者對30多歲之皮膚中之汗腺、及60多歲之皮膚中之汗腺進行比較，結果發現於60多歲之皮膚中，汗腺之位置變淺，可知隨著年齡而萎縮(圖5)。而且可知於汗腺萎縮之區域中，脂肪組織以真皮空腔之形式隆起。

求出30多歲及60多歲之皮膚中之汗腺之深度。深度係以皮膚表面至汗腺之最深部之距離表示。又，以皮膚表面至空腔最上部之距離之形式表示真皮空腔化之嚴重度。因此，對汗腺深度與年齡、汗腺深度與真皮空腔

化之嚴重度之關聯進行研究。將結果示於下表。

[表1]

	汗腺深度	
	R	P值
年齡	0.699	< 0.001
真皮空腔嚴重度	0.854	< 0.001



201817458

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於X射線攝影之試料製備方法

【中文】

本發明之課題在於提供一種使用X射線微CT之皮膚組織之觀察方法。本發明藉由使用丙酮作為預處理溶液，並使用含碘溶液作為染色液進行染色，能夠識別皮膚組織中之汗腺、皮脂腺、毛囊等附屬器官。

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種觀察方法，其係利用X射線圖像攝影法之皮膚試料之觀察方法，且包括以下步驟：

使皮膚試料與含丙酮溶液進行接觸；

使皮膚試料與含碘溶液進行接觸；及

利用X射線電腦斷層攝影裝置對皮膚試料獲取三維圖像。

【第2項】

如請求項1之觀察方法，其中上述觀察方法能夠實現皮膚試料中之附屬器官之觀察。

【第3項】

如請求項2之觀察方法，其中上述附屬器官選自由皮脂腺、汗腺、毛髮器官所組成之群。

【第4項】

如請求項1或2之觀察方法，其中含碘溶液包含碘化鉀及碘之至少一者。

【第5項】

一種製備方法，其係用於X射線圖像攝影之皮膚試料之製備方法，且包括以下步驟：

使皮膚試料與含丙酮溶液進行接觸；及

使皮膚試料與含碘溶液進行接觸。

【第6項】

如請求項5之製備方法，其中含碘溶液包含碘化鉀及碘之至少一者。

【第7項】

一種皮膚空腔化之檢測方法，其係藉由使用如請求項1至4中任一項之觀察方法對附屬器官之深度進行測定而實現。

