

明 細 書

発明の名称：皮膚分析又は観察用検体の調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、皮膚分析又は観察用検体の調製方法に関する。より詳細には、皮膚常在菌及び／又は角層に存在する物質を分析、又は角層形状を観察するための検体調製方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、皮膚常在菌による皮膚への影響（有用性等）が注目を集めている。皮膚常在菌は皮膚上に存在する微生物のことであり、汗や皮脂等を栄養源としている。これらの皮膚常在菌は、皮膚上でバランスがとれていると病原菌やカビの増殖を抑える等の有用な働きをするが、ストレス等で異常増殖し、皮膚に悪影響を及ぼす場合もある。例えば、皮脂の分泌と毛穴詰まりが同時に起こることで、アクネ菌が異常増殖しニキビを引き起こす。したがって、皮膚上の常在菌、あるいはその栄養源となる皮脂等の角層に存在する物質を分析すること、或いは皮溝、皮丘、肌理、毛孔、皺といった採取角層両面の形状を客観的に把握することは、肌トラブルの原因追究や化粧品の開発にとって非常に重要である。また、皮膚常在菌が作り出す様々な代謝物（例えばグリセリン、遊離脂肪酸等）と常在菌を同時に採取することができれば、これらの菌の有用性のメカニズムを調べる上で非常に有用であると考えられる。

[0003] 従来、皮膚常在菌や角層の採取は、主としてスワブ法（非特許文献１）やテープストリッピング法（非特許文献２）が用いられている。スワブ法は、皮膚表面の常在菌や角層を、綿棒等を使って拭き取って捕捉し、その綿棒を溶媒で洗い流して検体を回収する方法であり、テープストリッピング法は、粘着剤が塗布されたテープを皮膚に貼付し、テープに付着した常在菌や角層を回収する方法である。

[0004] しかし、スワブ法は、採取する人により力のかけ方が異なる、拭い残しが

生じる可能性がある、綿棒に付着した菌をすべて洗い流せない等の問題があり、安定して菌の回収ができていないか定かではない。また、菌に限らず他の皮膚上の成分についても綿棒からの回収率が低い、角層まで十分に採取できない等、回収できる検体が限られていた。

[0005] テープストリッピング法は、一般的に、使用するテープ中の粘着剤成分が開示されておらず、テープによっては付着した菌を回収するためには有機溶剤を使用する必要があり、皮膚常在菌を生きたまま回収することは不可能であった。また、粘着剤によって検体を採取する生体あるいは回収する菌体に害を及ぼすことが考えられた。また、テープには支持体がついているため、曲線を有する箇所の菌や角層を採取しようとする隙間ができしまい回収率が下がる、テープの幅により回収できる範囲が限定される等の問題点があった。

また、テープストリッピング法では角層を回収することは可能であるが、複数ある層のうち表面の一層または数層しか回収ができないため、この方法でも角層中の成分を分析する場合に十分な量の検体を得られない可能性があった。

[0006] また、角質細胞の面積と体積を測定する方法として、ビニルピロリドン・酢酸ビニル共重合体を含む水溶性の固着剤を支持体に塗工した角質細胞採取用具を皮膚に貼付した後、固着剤から角質細胞を採取する方法が報告されている（特許文献1）。

しかしながら、斯かる方法は体積形状を損なわずに角質細胞を採取するものであり、角質細胞の分散にプロテアーゼや界面活性剤を用いることから、皮膚常在菌を生きたまま分析するための検体調製法とは云えず、また、支持体を用いることから、支持体に重合物が残り定量性が保たれない、湾曲した部位の検体採取には適さないという問題がある。

さらに、ビニルピロリドン・酢酸ビニル共重合体は水系溶媒への溶解度が低く、皮膚に塗布するためにはエタノール等の有機溶媒を使用するため、皮膚常在菌を生きたまま回収することは不可能であること、ビニル

ピロリドン・酢酸ビニル共重合体単独では粘度が低く、成膜性が悪いため、皮膚へ塗布するためにはヒドロキシプロピルメチルセルロース等の粘度を上昇させる成分を添加する必要がある、これらの成分が検体の分析を妨げる可能性があることも懸念されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特許第3868345号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Costello et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science, 326, 1694-1697, 2009.

非特許文献2：B.Lange-Asschenfeldt et al. Distribution of bacteria in the epidermal layers and hair follicles of the human skin. Skin Pharmacol. Physiol., 24, 305-311, 2011.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、皮膚常在菌及び／又は角層に存在するタンパク質、脂質等の物質を幅広く分析するため、又は角層形状を観察するための検体の調製方法を提供することに関する。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、上記課題に鑑み検討したところ、ポリビニルアルコール系重合体を含有する溶液を皮膚上に塗布して薄膜を形成させることにより、当該薄膜中の皮膚常在菌を生菌の状態で回収できると共に、角層に含まれる物質を効率良く回収でき、これを用いることにより、皮膚常在菌や角層に存在する種々の物質の分析が可能となること、また採取角層両面の形状を的確に観察できることを見出した。

[0011] すなわち、本発明は、以下の1)～12)に係るものである。

1) 皮膚常在菌及び／又は角層に存在する物質を分析、又は角層形状を観

察するための検体の調製方法であって、ポリビニルアルコール系重合体を含有する溶液を、薄膜が形成されるように皮膚上に塗布し、形成された薄膜を剥離回収することを特徴とする方法。

2) 皮膚常在菌が生菌を含む1)に記載の方法。

3) 角層に存在する物質が、タンパク質、アミノ酸、脂質、核酸、糖、ビタミン、ホルモン及びペプチドから選ばれる1種または2種以上を含む1)又は2)に記載の方法。

4) 角層形状を観察するための検体の調製方法であって、剥離回収された薄膜を、顕微鏡観察用支持体に固定化し、ポリビニルアルコール系重合体を溶解除去した後乾燥することを含む、1)に記載の方法。

5) 固定化が、顕微鏡観察用支持体に塗布された固定化剤に貼付するものである4)に記載の方法。

6) ポリビニルアルコール系重合体が、ケン化度が70～99モル%のポリビニルアルコール系重合体である1)～5)のいずれかに記載の方法。

7) ポリビニルアルコール系重合体が、重合度が50～3,000のポリビニルアルコール系重合体である1)～6)のいずれかに記載の方法。

8) ポリビニルアルコール系重合体が、粘度(4%水溶液、温度20℃)が4～60 mPa・sのポリビニルアルコール系重合体である1)～7)のいずれかに記載の方法。

9) ポリビニルアルコール系重合体を含有する溶液が、10～30質量%のポリビニルアルコール系重合体溶液である1)～8)のいずれかに記載の方法。

10) ポリビニルアルコール系重合体を含有する溶液を、皮膚上に塗布後、室温で20分以上放置する、1)～9)のいずれかに記載の方法。

11) 1)～10)のいずれかに記載の方法により調製された皮膚分析又は観察用検体。

12) 4)又は5)に記載の方法により調製された皮膚観察用検体を用いて、顕微鏡観察することを特徴とする角層形状の観察方法。

発明の効果

[0012] 本発明の方法によれば、身体の部位を問わず、低侵襲でかつ簡便に、皮膚常在菌を生菌の状態で回収でき、また角層に存在する物質を効率良く回収できる。また、皮溝、皮丘、肌理、毛孔、皺、採取角層の深度といった採取角層両面の状態を適格に観察できる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]前腕部採取角層の表裏の顕微鏡観察画像。

[図2]前額部採取角層の表裏の顕微鏡観察画像。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の皮膚分析又は観察用検体の調製方法は、皮膚常在菌又は角層に存在する物質を分析、又は角層形状を観察するための検体の調製方法であって、ポリビニルアルコール系重合体を含有する溶液を、薄膜が形成されるように皮膚に塗布し、形成された薄膜を剥離回収するものである。

[0015] 本発明の皮膚分析の対象の一つには皮膚常在菌が挙げられる。皮膚常在菌とは、ヒトの皮膚上に生育している細菌を意味するが、本発明において、その菌種は特に限定されるものではない。皮膚常在菌は、個人差、部位差、あるいは季節変動等があると考えられているが、嫌気性最優勢菌としてアクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) が、好気性菌として、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) やスタフィロコッカス・エピデルミディス (*Staphylococcus epidermidis*) が生息している。皮膚常在菌は、他の病原微生物からの生体防御と疾患発現に関連があるとされ、外傷、病気等による全身状態の不良、精神的ストレス、寒冷、乾燥、不適切な洗浄等によって皮膚常在菌のバランスが崩れると、スタフィロコッカス・アウレウス、アクネ菌等が過剰増殖し、様々な皮膚症状が誘発され、疾患発現が起こることが知られている。また、スタフィロコッカス・エピデルミディス等の有用菌は皮脂を分解し、グリセリンと遊離脂肪酸を産生するため、保湿に効果的である他、皮膚を酸性に保ち、カビ等の増殖を抑制することが知られている。本発明においては、アクネ菌、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィ

ロコッカス・エピデルミディス等を含む皮膚常在菌を、生菌のまま回収することができる。

[0016] 本発明の皮膚分析の対象としては、さらに角層に存在する物質が挙げられる。角層に存在する物質とは、角層表面（皮膚表面）又は角層中に存在する物質を意味し、その由来や種類は特に限定されない。具体的には、ケラチン、フィラグリン等の角層構成成分の他、セラミド、コレステロール等の角層細胞間脂質構成成分、インターロイキン等のサイトカイン、ケモカイン、酵素等のタンパク質、皮膚常在菌の代謝産物、皮脂腺から分泌された皮脂、脂質、脂肪酸やホルモン等が包含される。

皮膚常在菌の代謝産物としては、例えば角層中に存在するタンパク質や脂質等の物質から、皮膚常在菌により分解・産生される様々な代謝産物が挙げられる。具体的には、皮脂から分解・産生されるトリグリセリド、ジグリセリド、脂肪酸、グリセリンが挙げられる。

また、角層（皮膚）表面に存在する物質には、アポクリン腺、エクリン腺から産生される汗や血漿の成分の他、アミノ酸、ペプチド等も含まれる。これらの成分の中でも特に、皮膚性状の指標となり、皮膚常在菌の分布に影響を受けやすいことからタンパク質、アミノ酸、脂質、核酸、糖、ビタミン、ホルモン、ペプチドの1種または2種以上を含むことが好ましい。

[0017] 本発明の方法においては、上記皮膚常在菌を回収すると共に、角層に存在する物質を回収することができる。また、皮膚常在菌を生菌、死菌を含め、皮膚上に存在するそのままの状態でも回収できるため、皮膚上のフローラを形成する菌種やその存在形態を解明することができる。

[0018] 本発明の皮膚観察の対象としては、例えば角層形状が挙げられる。

すなわち、本発明の皮膚観察用検体を用いて、顕微鏡観察することにより、角層表面の微細構造、例えば、皮溝の状態（幅、傾斜角、密度）、皮溝と皮溝によって囲まれる皮丘の状態（すなわち肌理）、毛穴の大きさ、皺、採取角層の深度を、皮膚の外側から見た状態で、観察することが可能である。

[0019] 本発明の皮膚分析又は観察用検体の調製においては、ポリビニルアルコー

ル（PVA）系重合体を含有する溶液（PVA系重合体溶液）を、薄膜が形成されるように皮膚に塗布される。

ここで、PVA系重合体は、 $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]$ を単位構造として持つ重合物質であり、一般的に、ポリビニルエステルのケン化により製造される。当該ポリビニルエステルとしては、ギ酸ビニル、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、酪酸ビニル、カプリン酸ビニル、ラウリル酸ビニル、パルミチン酸ビニル、ステアリン酸ビニル等が単独又は併用で用いられるが、酢酸ビニルが好適である。

また、本発明のPVA系重合体は、水酸基以外の官能基を有していてもよく、水酸基以外の官能基として例えば、アミノ基、チオール基、カルボキシ基、スルホン基、リン酸基、カルボキシレート基、スルホン酸イオン基、燐酸イオン基、アンモニウム基、ホスホニウム基、シリル基、シロキサン基、アルキル基、アリル基、フルオロアルキル基、アルコシキ基、カルボニル基、ハロゲン基等が例示できる。

[0020] 本発明のPVA系重合体のケン化度は、70～99モル%であるのが好ましく、75～95モル%であるのがより好ましく、86.5～89.0モル%であるのがさらに好ましい。ここで、PVA系重合体のケン化度は、ポリビニルエステルをケン化、すなわち加水分解して得られる水酸基のモルパーセント（モル%）であり、JIS K 6726に準拠した測定方法により測定される値である。

[0021] 本発明のPVA系重合体の重合度は、薄膜形成や分析又は観察対象物の回収効率の点から、50～3,000であるのが好ましく、500～2,500であるのがより好ましく、600～2,400であるのがさらに好ましい。PVA系重合体の重合度は、JIS K 6726に準拠して測定される。

一般に、重合度の違いは、一定濃度（通常は4%水溶液、20℃）における粘度で代用することができる。本発明のPVA系重合体の粘度は、好ましくは4～60 mPa・s、より好ましくは4.5～52 mPa・sである。

ここで、粘度は、4 %水溶液、温度20℃の条件下で、ヘプラー粘度計を用いて算出した値である。

[0022] また、本発明のPVA系重合体の平均分子量は、2,200～132,000であるのが好ましく、より好ましくは20,000～110,000である。

[0023] 本発明において使用可能なPVA系重合体の市販品としては、例えば、日本合成化学株式会社製の商品名「ゴーセノール」シリーズから、EG-40（粘度（4%，20℃）：40.0～46.0 mPa・s、ケン化度：86.5～89.0 mol %、重合度2400）、EG-25（粘度（4%，20℃）：20.5～24.5 mPa・s、ケン化度：86.5～89.0 mol %、重合度1800）、EG-05（粘度（4%，20℃）：4.8～5.8 mPa・s、ケン化度：86.5～89.0 mol %、重合度600）等の各種グレードが例示される。

[0024] 斯かるPVA系重合体は、単独で用いることも可能であるが、ケン化度若しくは重合度及び／又は粘度の異なるPVA系重合体を混合して用いてもよい。ケン化度若しくは重合度及び／又は粘度の異なるPVA系重合体を混合して用いることにより、粘度を変化させることができ、皮膚に対する密着度を変化させることができる。なお、薄膜形成の点から、重合度1,500以上のPVA系重合体を1種類以上配合することが好ましい。

[0025] PVA系重合体を含有する溶液（PVA系重合体溶液）中のPVA系重合体の含有量は、PVAの分子量、ケン化度により異なるが、塗布した溶液の液だれの防止や乾きやすさの点から、通常10～30質量%の濃度であり、好ましくは12～25質量%、より好ましくは15～25質量%、特に好ましくは15～22質量%である。

また、溶液の溶媒としては、水、リン酸バッファー、生理食塩水を用いることが好ましく、特に水が好ましい。当該溶液中には、皮膚常在菌や角層に存在する物質に影響しない範囲で、エタノールを含有することができる。この場合、エタノールの含有量は、好ましくは0～20質量%、より好ましく

は0～5質量%である。なお、皮膚常在菌の生菌を回収する必要がある場合にはエタノールを含有しない溶媒を使用することが好ましい。また、PVA系重合体溶液には、その後の分析に支障をきたす可能性があることから、固形物、タンパク質、アミノ酸、脂質等を含む添加物を用いないことが重要である。よって、PVA系重合体溶液はPVA重合体及び溶媒のみを含有する。

[0026] PVA系重合体溶液の皮膚への塗布は、皮膚表面で薄膜が形成されるように塗布すればよく、例えば、該溶液が皮膚表面に均一にかつ連続的に付着するように塗布される。塗布する方法は特に制限されないが、衛生的に保たれたスパチュラーを使用したり、チューブに入れたPVA系重合体溶液を直接塗布することが好ましい。

皮膚に塗布されたPVA系重合体溶液は、通常、室温で20～40分程度放置することにより乾燥し、薄膜を形成する。ここで、薄膜とは、厚さ0.03～0.5mm、好ましくは0.04～0.2mmである。

放置時間は、薄膜が形成されれば良いが、皮膚常在菌又は角層に存在する物質を十分に回収する点から、通常室温で、20分間以上、好ましくは20～40分間、より好ましくは20～35分間、放置するのが好ましい。

[0027] 形成された薄膜は、皮膚から剥離し、後の分析又は観察手段に応じて適宜処理される。すなわち、皮膚常在菌の分析や角層成分の分析用検体とする場合には、水、生理食塩水、PBS、リンゲル液等の水系溶媒に溶解する、或いはメタノール、エタノール、酢酸エチル、アセトン、クロロホルム、ジエチルエーテル等の有機溶媒に溶解し、検体を抽出することにより、テープストリッピングと同様の方法で分析に供することができる。特に、皮膚常在菌の生菌を分析するためには、水系溶媒、特に生理食塩水またはPBSに溶解することが好ましい。なお、検体の変性を防止するため、分析については室温以下で行うことが好ましい。

[0028] 上述のとおり、本発明により得られた剥離した薄膜中には、表皮に生息する皮膚常在菌が生きたまま回収され、また角層も複数の層を同時に回収する

ことができるため、角層中に存在する物質が効率よく回収される。したがって、剥離した薄膜は、皮膚常在菌を生菌として分析するための検体として、また、角層に存在する物質を分析するための検体として使用できる。例えば、本発明を使用して皮膚常在菌及び角層に存在する皮膚常在菌の代謝物、角層に存在する生体由来サイトカインといったタンパク質、リパーゼ、プロテアーゼのような酵素等を回収し、常在菌や代謝物、生体由来タンパク質の種類や量を特定して皮膚の状態との関連性を検証する場合、新規皮膚常在菌を単離してその性状を特定する場合、皮膚性状診断に利用する場合、化粧品や医薬品などの塗布前後の皮膚性状解析等に用いることができる。また、本発明は角層に存在する物質が効率よく回収することができるため、検体を含む溶解液を濃縮する必要がなく、効率的に分析を行うことができる。

[0029] 本発明により調製された検体を用いた各種分析は、目的に応じ適宜公知の手法を用いて行うことができる。例えば、本発明の検体を水系溶媒に溶解した溶液からDNAを抽出し、核酸増幅法を用いて目的とする皮膚常在菌の菌量を測定すること、次世代シーケンサーによる16Sメタゲノム解析法を用いて網羅的に皮膚常在菌を解析すること、GAM寒天培地等の培地に播種して生菌を測定すること、生菌と死菌の比率を測定すること、BCAプロテインアッセイ等によりタンパク質量を測定すること、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸を分析すること、CE-TOF MS等を用いて皮膚上イオン性代謝物を網羅的に解析すること、Milliplexなどのキットを用いて角層中のサイトカインを網羅的に解析すること、レーザーマイクロダイセクション法により、剥離した薄膜から一部を直接レーザーで切り出して回収することにより、皮膚上の特定の位置に存在する皮膚常在菌の遺伝子情報を得ること等が挙げられる。

[0030] また、形成された薄膜を、角層形状を観察するための検体として用いる場合は、剥離回収された薄膜は、表側から観察する場合は採取検体の角層側を顕微鏡観察用支持体に固定化され、ポリビニルアルコール系重合体を溶解除去した後乾燥し、顕微鏡観察用の検体とされる。また裏側を観察する場合は

採取検体のポリビニルアルコール側を顕微鏡観察用支持体に固定化し、乾燥後顕微鏡観察用の検体とされる。

ここで、顕微鏡観察用支持体としては、金属、シリコン基板、スライドガラス、ディッシュ、シャーレ等の支持体が挙げられ、スライドガラス、ディッシュ、シャーレ等の透明支持体が好ましく、より好ましくはスライドグラスである。

斯かる支持体への薄膜の固定化は、例えば支持体に塗布された固定化剤に薄膜を貼付することにより行うことができる。

[0031] 固定化剤としては、支持体へ接着し、且つ薄膜中の角層構造を固定化可能な非水溶性の化合物であればよく、さらに透明な化合物が好ましく、例えば、熱可塑性樹脂系（酢酸ビニル樹脂系、ポリビニルアセタール系、エチレン酢酸ビニル樹脂系、塩化ビニル樹脂系、アクリル樹脂系、ポリアミド系、セルロース系、 α -オレフィン系）、熱硬化性樹脂系（ユリア樹脂系、メラミン樹脂系、フェノール樹脂系、レゾルシノール樹脂系、エポキシ樹脂系、構造用アクリル樹脂系、ポリエステル系、ポリウレタン系、ポリアロマティック系）、エラストマー系（クロロプレングム系、ニトリルゴム系、スチレンブタジエンゴム系、ポリサルファイド系、ブチルゴム系、シリコーンゴム系、アクリルゴム系、変成シリコーンゴム系、ウレタンゴム系、シリル化ウレタン樹脂系、テレケリックポリアクリレート系）等の有機系接着剤が挙げられる。

[0032] 斯くして得られる顕微鏡観察用の検体を用いて、光学顕微鏡、電子顕微鏡等による観察を行うことにより、角層表面の微細構造の状態を皮膚の外側から見た状態で、観察することが可能である。

実施例

[0033] 実施例 1 検体の調製

2種類のポリビニルアルコールEG-40（粘度（4%，20℃）：40，0-46，0mPa・s、ケン化度：86，5-89，0mol%，重合度2400、日本合成化学（株）製）及びEG-25（粘度（4%，20℃

) : 20.5 – 24.5 mPa · s、ケン化度 : 86.5 – 89.0 mol %、重合度 1800 ; 日本合成化学 (株) 製) をそれぞれ 15 g ずつ、80 °C に加熱した水 100 g 中に添加した後、エタノールを 20 g 加え、混合して、PVA 溶液を調製した (20 質量%)。

調製した PVA 溶液 (400 μL) を左額の一部 (4 cm²) に塗布し、室温で 30 分程度乾燥後、形成された薄膜を剥離した。剥離した薄膜を 2 mL の PBS に浸し 4 °C で一晩静置した後、ボルテックスミキサーで攪拌し、本発明検体 1 を得た。なお、被験者 3 人に対して同様の操作を行った。

[0034] 比較例 1 (スワブ法)

綿棒で右額の一部 (4 cm²) を 25 往復した。当該綿棒の先を 1 mL の PBS に浸し 4 °C で一晩静置した後、ボルテックスミキサーで攪拌し比較検体 1 を得た。なお、被験者 3 人に対して同様の操作を行った。

[0035] 試験例 1 皮膚常在菌の検出

(1) *Propionibacterium acnes* (アクネ菌) の検出

以下に示す方法により、上記で得られた本発明検体 1 及び比較検体 1 中のアクネ菌量を調べた。

まず、本発明検体 1 に遠心処理 (15,000 rpm、10 分) を施し、得られた沈殿物に 1 mL の PBS を加えてボルテックスミキサーで攪拌し、同様の遠心処理を施し洗浄した。得られた沈殿物を 200 μL の PBS に分散させた。分散液 100 μL に 100 μL の PBS を添加し、さらに 250 μL の Lysis バッファー (200 mM Tris-HCl (pH9.0)、80 mM EDTA (pH9.0))、50 μL の 10% SDS 溶液を加えた。その後、凍結融解を 3 回繰り返し、100 °C で煮沸後、室温まで冷却した。500 μL の TE 飽和フェノール及び 300 mg のガラスビーズを添加し、組織・細胞破碎装置 (Fast Prep) を用いて 5.0 m/s で 30 秒間粉碎した。15,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、水層 400 μL を別のチューブに移した。そこに phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 400 μL を添加し、Fast Prep を用いて 4.0 m/s で 45 秒間振とうした。その後、15,000

0 rpmで5分間遠心し、250 μ Lの水層を回収した。得られた水層に25 μ Lの3 M酢酸ナトリウム (pH 5.4) と300 μ Lのイソプロパノールを加えて転倒混和し、−30℃で5分間静置した。15,000 rpmで5分間遠心分離後、上清を除去し、沈殿物に500 μ Lの70%エタノールを添加した。15,000 rpmで5分間遠心分離後、上清除去し、風乾した。得られた抽出DNAを50 μ Lの純水 (ミリQ水) に溶解した。PCR試薬はSYBR (登録商標) Premix Ex Taq (登録商標) II(Tli RNaseH Plus) (TaKaRa社製) を用いた。プライマーの配列は表1に示したとおりである。また、PCR条件は、95℃5分で1サイクル、95℃15秒及び60℃1分をセットで40サイクルとした。

比較検体1は遠心処理 (15,000 rpm、10分) を施し、得られた沈殿物を200 μ LのPBSに分散させた後、分散液100 μ Lを使用して本発明検体1と同様の方法でアクネ菌量を測定した。

[0036] [表1]

Target	プライマー名	配列	配列番号
P. acnes	Primer F	5'-GCGTGAGTGACGGTAATGGGA-3'	1
	Primer R	5'-TTCCGACGCGATCAACCA-3'	2

[0037] (2) 結果

結果を表2に示す。なお、結果は実施例1および試験例1の操作を別の日に合計3回行った平均の値である。3名の被験者をそれぞれA～Cとして示した。顔の左右では同程度の菌が存在しているということが知られている (文献: J. Clinical Microbiology, 48, 3575-3581, 2010)。よって、表2より、本発明検体1は、スワブ法により採取された比較検体1と同程度またはそれ以上のアクネ菌 (生菌と死菌を含めた総菌数) を回収できることが確認された。

[0038]

[表2]

	Log_{10} (菌数/ cm^2)	A	B	C
比較検体 1 (スワブ法)	average	2.16	3.93	4.44
本発明検体 1	average	2.20	4.70	4.80

[0039] 実施例 2 検体の調製

EG-40及びEG-25それぞれ2.625gを80℃に加熱した水24.75g中に添加し、PVA溶液(PVA17.5質量%)を調製した。

上記PVA溶液150 μL を左額(9 cm^2)と右額(9 cm^2)にそれぞれ塗布し、30分程度乾燥後、形成された薄膜を剥離した。剥離した薄膜をそれぞれ600 μL の生理食塩水に浸し室温で振盪機MICRO TUBE MIXER MT-400(TOMY製)を用いて1時間振盪し、本発明検体2を得た。

[0040] 試験例 2 皮膚常在菌の定量性

(1) アクネ菌の定量性

以下に示す方法により、上記で得られた本発明検体2中のアクネ菌量を調べた。

本発明検体2を200 μL 分取し、200 μL の生理食塩水を加え、15,000rpmで20分間遠心して上清を除去した。得られた沈殿に400 μL の生理食塩水を加え、同様の遠心操作を繰り返した。得られた沈殿物を200 μL のPBSに分散させた。分散液100 μL を用い、試験例1と同様の方法でDNAを抽出し、50 μL の純水(ミリQ水)に溶解させた。検体中のアクネ菌の菌数を試験例1と同様の方法(PCR)を用いて測定した。

[0041] (2) 結果

得られたアクネ菌は、左額では3.20(Log_{10} (菌数/ cm^2))、右額では3.14(Log_{10} (菌数/ cm^2))であり、左額と右額から得られた菌数がほぼ同等であることが確認された。上述のとおり、顔の左右では同程度の菌が存在しているということが知られていることから、本発明検体2では、皮膚常在菌(生

菌と死菌を含めた総菌数) が定量的に採取できる可能性が高いことが確認された。

[0042] 実施例3 検体の調製

実施例2と同様に調製したPVA溶液(PVA17.5%)150 μ Lを右頬の一部(9cm²)に塗布し、30分程度乾燥後、剥離した薄膜を600 μ Lの生理食塩水に浸し、30分間振盪して本発明検体3を得た。

[0043] 比較例2 (スワブ法)

綿棒で左頬の一部(9cm²)を25往復した。当該綿棒の先を1mLのPBSに浸し15分間振盪し、比較検体2を得た。

[0044] 試験例3 生菌の定量性

(1) 総生菌数の定量性

本発明検体3にさらに600 μ Lの生理食塩水を添加し、15,000rpmで10分間遠心し、上清から600 μ Lをとる操作を2回繰り返した後、上清を全て除去した。最後に600 μ Lで再度洗浄し(15,000rpm,10分)上清を除去した後、沈殿物を100 μ Lの生理食塩水に分散した。分散液を生理食塩水で100倍希釈したものを25 μ Lずつ、GAM寒天培地にまき、3日間37℃で培養した。なお、この方法により、非選択的に生菌を測定することができる。

比較検体2は、15,000rpmで10分間遠心して沈殿物を回収後、100 μ Lの生理食塩水に分散させた。分散液を本発明検体3と同様に生理食塩水で希釈した後、同様の操作を行った。

[0045] (2) 結果

本発明検体3では3.15(Log₁₀(菌数/cm²))、比較検体2では3.45(Log₁₀(菌数/cm²))の菌数が得られた。よって、本発明とスワブ法では皮膚常在菌(生菌)を同程度回収することができた。

[0046] 実施例4 検体の調製

実施例2と同様に調製したPVA溶液(PVA17.5%)150 μ Lを、左頬の一部(9cm²)に塗布し、30分程度乾燥後、剥離した薄膜を60

0 μ L の生理食塩水に浸し、30 分間振盪させ、本発明検体 4 を得た。

[0047] 試験例 4 脂肪酸分析

(1) 80 μ L の本発明検体 4 を生理食塩水で 5 倍に希釈し、メタノール 3.4 mL、8%塩酸メタノール溶液 600 μ L を添加し、100℃で 1 時間加熱後、ヘキサンを 800 μ L 用いて分液し、脂肪酸メチルエステルを抽出した。

[0048] (2) (1) で得られた検体を、Agilent 7890B GC システムを用い、InterCap (登録商標) WAX カラムを用い、ガスクロマトグラフィー解析を行った。標準としてミリスチン酸メチル、パルミチン酸メチル、Cis-9-ヘキサデセン酸メチル、ステアリン酸メチル、オレイン酸メチルを用いて検量線を作成し、各検体の濃度を測定した。

[0049] (3) 結果

その結果、表 3 に示すとおり、ミリスチン酸、パルミチン酸、Cis-9-ヘキサデセン酸、ステアリン酸、オレイン酸を回収することができた。表 3 の数値は本発明検体 4 に含まれる脂肪酸量をさす。なお、実際に脂肪酸の定量は行っていないが、比較検体 2 は水溶液が全く濁っておらず、綿棒から脂肪酸を回収することは難しいことが予想された。

[0050] [表3]

	(μ g/mL)
ミリスチン酸	52.35
パルミチン酸	188.14
Cis-9-ヘキサデセン酸	176.06
ステアリン酸	39.69
オレイン酸	148.35

[0051] 実施例 5 検体の調製

実施例 1 と同様に調製した PVA 溶液 (PVA 20%) 100 μ L を左額 (4 cm²) に塗布し、30 分程度乾燥後、形成された薄膜を剥離した。剥離した薄膜を 1 mL の PBS に浸し室温で 1 時間振盪し、本発明検体 5 を得た。

。

[0052] 比較例 3 (スワブ法)

綿棒で額中心の一部 (4 cm^2) を 25 往復し、綿棒の先を 1 mL の PBS に浸し 1 時間振盪し比較検体 3 を得た。

[0053] 試験例 5 タンパク質の分析

(1) 検体の前処理

本発明検体 5 を生理食塩水で一度遠心洗浄後 (15,000 rpm、20 分)、沈殿物を 100 μL の Lysis バッファー (20 mM HEPES (pH = 7.8)、350 mM NaCl、0.5 mM EDTA、0.1 mM EGTA、1 mM DTT、1 mM MgCl_2 、20% Glycerol、1% NP-40) に溶解させ、10 分ボルテックスミキサーで攪拌し、氷浴中 15 分間 4℃ で静置した。15,000 rpm で 20 分間遠心して上清を回収し、以下の測定に用いた。

また、比較検体 3 は、15,000 rpm で 20 分間遠心して沈殿物を 100 μL の Lysis バッファーに溶解させ、10 分ボルテックスミキサーで攪拌し、氷浴中 15 分間 4℃ で静置した。15,000 rpm で 20 分間遠心して上清を回収し、以下の測定に用いた。

(2) 総タンパク質量の測定

BCA protein assay を用い、BSA を基準として 562 nm の吸収波長から濃度を算出した。

(3) IL-8 量の測定

Human IL-8 ELISA キット (Thermo Scientific 社製) を用いて 450–550 nm の吸収波長から測定した。

[0054] (4) 結果

結果を表 4 に示す。

表 4 より、本発明検体 5 は、スワブ法による検体に比べて、回収される総タンパク質量及び IL-8 量が多く、タンパク質解析に優れていることが確認された。

[0055] [表4]

	本発明検体 5	比較検体 3
総タンパク質量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	4. 8 1	1. 5 7
IL-8 量 (pg/cm^2)	0. 4 1	0. 0 3

[0056] 実施例 6 検体の調製

実施例 2 に従い、17.5%のPVA溶液を作成した。得られたPVA溶液150 μL を額(9 cm^2 、3箇所)、PVA溶液50 μL を頬(3 cm^2 、12箇所)に対して塗布し、30分程度乾燥後、形成された薄膜を剥離した。額の3箇所から剥離した各薄膜、頬の12箇所から剥離した薄膜を4箇所ずつ纏めて、1.4 mLの生理食塩水、水及びメタノールにそれぞれ溶解しないしは溶出させ、室温で1時間振盪し、分析用検体(生理食塩水溶解検体、水溶解検体、メタノール溶出検体)を得た。

[0057] 試験例 6 CE-TOF MSによる角層中イオン性代謝物の網羅的解析

(1) Agilent 社製CE/(Q)TOF MSを用いて測定を行った。

カチオン及びアニオンの各モードの測定時における希釈倍率は、カチオンモードでは全ての検体を原液のまま、アニオンモードではメタノール溶出検体は原液、水溶解及び生理食塩水溶解検体では2倍希釈して行った。

[0058] (2) 結果

i) 検出物質数

検体中のイオン性代謝物の検出数を表5に示した。カチオン・アニオンモードでの検出数を併せて角層中におよそ50種類の物質の存在が確認された。なお、アニオンモードとカチオンモードでは同じ成分は含まれていないことを確認している。

[0059]

[表5]

	メタノール溶出検体	水溶解検体	生理食塩水溶解検体	計
アニオンモード	9	7	6	9
カチオンモード	3 7	4 2	3 8	4 4
計	4 6	4 9	4 4	5 3

[0060] 水溶解検体から検出された物質を下記表6に示した。角層中には乳酸、尿素、グリセリンが多く存在することは既に知られており (H. W. Spier et al., Zur analytischen und funktionellen Physiologie der Hautoberfläche, Der Hautarzt, 7, 55-60, 1956., E. H. Choi et al., Is Endogeneous glycerol a determinant of stratum corneum hydration in humans., J. Invest. Dermatol., 125, 288-293, 2005.)、本発明の検体においてもCE-TOF MSによりいずれも検出されていることが確認された。また、アミノ酸についても、タンパク質合成に必要な20種類のアミノ酸全てが検出されることが確認された。なお、 m/z は分子量を電荷で割った値、relative areaは検出物質の量を表す。

[0061] [表6-1]

モード	検出された化合物	m/z	検体を水で溶解した際の relative area
アニオン	Pyruvic acid	87.009	8.0E-4
	Lactic acid	89.025	1.6E-2
	5-Oxoproline	128.035	1.0E-3
	Threonic acid	135.029	1.2E-0.5
	Uric acid	167.021	2.5E-5
	Citric acid	191.019	1.1E-4
	Gluconic acid	195.051	1.3E-5

[0062]

[表6-2]

モード	検出された化合物	m/z	検体を水で溶解した際の relative area
カチオン	Urea	61.041	1.7E-2
	Ethanolamine	62.061	1.1E-4
	Glycine	76.039	3.4E-3
	Putrescine	89.109	2.2E-5
	Alanine	90.055	3.6E-3
	Glycerol	93.055	1.9E-2
	Choline	104.107	1.7E-4
	Serine	106.050	8.2E-3
	Diethanolamine	106.087	3.3E-5
	Histamine	112.087	6.1E-5
	Creatinine	114.066	3.5E-5
	3-Amino-2-piperidone	115.086	3.7E-4
	Proline	116.071	1.6E-3
	Valine	118.086	3.2E-3
	Threonine	120.065	2.5E-3
	Cysteine	122.027	1.8E-5
	Creatine	132.077	5.2E-5
	Isoleucine	132.101	2.7E-3
	Leucine	132.101	3.7E-3
	Asparagine	133.060	5.2E-4
	Ornithine	133.097	1.3E-3
	Aspartic acid	134.044	2.0E-3
	Urocanic acid	139.050	2.3E-3
	Methyl-4-imidazole_acetic acid	141.065	6.4E-4
	Stachydrine	144.101	3.1E-5
	Spermidine	146.165	5.6E-6
	Glutamine	147.076	1.3E-3
	Lysine	147.112	1.7E-3
	Glutamic acid	148.060	2.2E-3
	Methionine	150.058	1.9E-4
	Triethanolamine	150.112	1.4E-5
	Histidine	156.076	5.4E-3
	Carnitine	162.112	3.5E-5
	Phenylalanine	166.085	1.5E-3
	Arginine	175.118	4.2E-3
	Citrulline	176.102	3.6E-3
	Tyrosine	182.080	1.0E-3
	ADMA	203.149	2.0E-5
	Tryptophan	205.096	5.4E-4
	Cytidine	244.093	1.3E-5
	Inosine	269.087	1.2E-5
	His-Glu	285.118	1.6E-5

[0063] 実施例 7 検体の調製

実施例 2 に従い、17.5 質量%の PVA 溶液を調製した。前腕部、前額部の各々左の $3 \times 1 \text{ cm}^2$ 上に $50 \mu\text{L}$ の PVA 溶液を塗布し、20 分間乾燥

させ、形成された薄膜を剥離した。これを、シリル化ウレタン樹脂系接着剤（「超強力接着剤ウルトラ多用途S・U」（コニシ製））を塗布したスライドガラスに貼付し、2日間乾燥させた。次いで、当該スライドガラスを12時間ミリQ水中に静かに浸し、PVAを完全に溶解させた。静かに2回ミリQ水で洗浄し、完全に乾燥して顕微鏡観察用の検体を得た。

[0064] 試験例7 角層形状の観察

実施例7で得られた顕微鏡観察用検体を用いて、顕微鏡観察（光学顕微鏡及び電子顕微鏡）を行った。顕微鏡観察画像を図1～2に示す。

図1～2より、採取角層の表裏で肌理や毛包が反転していることが確認された。

産業上の利用可能性

[0065] 本発明の方法により調製された皮膚分析又は観察用検体によれば、皮膚常在菌叢と角層に存在する物質を総合的に解析することができ、これらに関連付けることが可能となる。また、有用菌や未知菌が生菌のまま単離が可能となる。また、回収できる総タンパク量が多いことから、タンパク質の解析がより容易になる。また、採取角層両面の微細構造の状態を皮膚の外側から見た状態でビジュアル化できる。結果、化粧品の開発や肌の診断技術の確立に役立てることができる。