

治 験

赤色LED (Light emitting diode) の正常ヒト線維芽細胞
に及ぼす影響

森脇真一*・川又里美**・小谷麻由美**
藤田晃人**・平野 達***

要旨：近年、LEDは光老化に対するアンチエイジング治療や日光角化症に対する光線力学療法のための光線の一つとして利用されはじめている。今回、われわれは赤色LED (620~630 nm) の皮膚への作用を新生児および健常人男性皮膚由来培養線維芽細胞を用いて検討した。3系統の初代培養線維芽細胞に1日あたり10分間、5日間または6日間、赤色LEDを照射した。その結果、赤色LED照射群は非照射群にくらべ、細胞増殖能を有意に亢進させた。また、新生児由来の線維芽細胞において培養上清中のヒアルロン酸量は、LED照射群で有意に増加した。

この結果は、赤色LEDのアンチエイジングにおける臨床効果には、真皮線維芽細胞の活性化が深く関わっている可能性を示唆する。

Key Words：アンチエイジング、赤色LED、細胞増殖、ヒアルロン酸、ヒト線維芽細胞

はじめに

近年、皮膚の若返りを目的にシミやシワなどに対してレーザー、IPL (Intense pulsed light)、RF (Radio frequency)、イオントフォレーシス、ケミカルピーリング、コラーゲンやヒアルロン酸注入などが美容皮膚科の分野で注目されてきている。光線治療機器において、レーザーやIPLは施術者の経験、習熟度、患者の肌質などにより、火傷、色素沈着を生じることもあるため、自己発熱が少なく、冷却装置が不要でコンパクトな発光ダイオード (LED, Light emitting diode) が美容の分野に導入されはじめている。LEDは青色 (450 nm) から赤色 (700 nm) までの可視光域で元素の組み合わせにより、さまざまなピーク波長を発光させることができる¹⁾。

Babilasらは日光角化症患者に対してポルフィ

リン前駆体である5-aminolaevulinic acid (ALA) を用いた光線力学療法において、633 ± 3 nmのLEDを用いた²⁾。また、Weissらは590 nm LEDの照射により、光老化皮膚の若返り、色素沈着、紅斑、シワの減少³⁾と眼窩周囲組織のI型コラーゲン増加、MMP-1減少を認めた⁴⁾。Russellらは633 ± 3 nmと830 ± 5 nmのLEDの組み合わせにより光老化皮膚の改善を報告した⁵⁾。また、眼瞼美容整形手術後に633 nm ± 3 nmのLEDを眼瞼周囲に照射することにより、術後の浮腫、紅斑、紫斑、痛みの減少が認められている⁶⁾。

このように、LEDの美容皮膚科領域での臨床応用についてはいくつかの報告がある。特に、赤色LEDは波長 (610~750 nm) が長いため、皮膚に照射した場合には真皮の深層まで到達し、乾燥肌やシワに有効であることが推定されているが、その詳しい作用機序は明らかでない。

*大阪医科大学皮膚科 **株式会社ブルーム・クラシック ***浜松医科大学光量子医学研究センター
[連絡先] 森脇真一：大阪医科大学皮膚科 (〒569-8686 大阪府高槻市大学町2-7)



図1 赤色LED
波長620～630nm, 総出力0.42W, エネルギー密度10mW/cm²,
ヘッド径40mm, LEDランプ21個

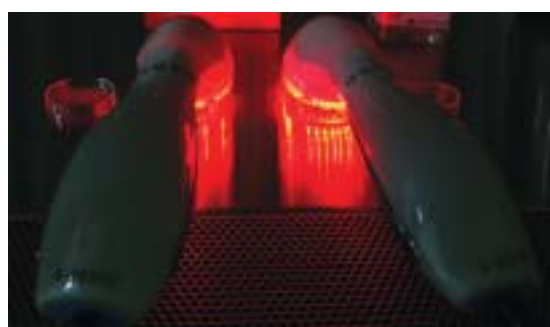


図2 培養ヒト線維芽細胞へのLED照射
35mmディッシュの細胞接着面15mm上より赤色LEDを照射

そこでわれわれは、正常ヒト皮膚由来線維芽細胞を用いて赤色LEDのアンチエイジング作用における医学的エビデンスを検討した。

方 法

1. LED仕様

赤色LEDは波長620～630nm, 総出力0.42W, エネルギー密度10mW/cm² (gentec社, TPM-310測定), ヘッド径40mm, LEDランプ21個がセットされているESTHE TWIN ILまたはProens IL ((株) エステツインまたは(株) ドクタープロエンス) を用いた (図1)。

2. LED照射による細胞増殖能の検討

ヒト新生児包皮由来線維芽細胞 (2F0-C25, 大日本住友製薬 (株) より購入), 30歳および33歳の健常人男性皮膚由来線維芽細胞 (N-30, N-33; 研究同意を得て樹立したものを使用) は10% Fetal Bovine Serum (FBS, インビトロジェン (株)) を含むDulbecco's Modified Eagle's

Medium (DMEM, シグマ アルドリッチ ジャパン (株)) を用いて37℃, 5%CO₂下で培養した。本研究ではすべての実験において継代数6以下の細胞を用いて行った。

2F0-C25 (3,000 cells/mL) は35mmディッシュに3mLずつ播種した (9,000 cells/dish)。LED照射群は培養1日目から6日目まで連日LEDを10分間照射した。培地を別途回収し, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, シグマ アルドリッチ ジャパン (株)) を0.7mLずつ添加し, 35mmディッシュの底面より15mmの位置からLEDを10分間照射した (図2)。LED照射後, HBSSを除去し, 回収した培地を再び戻した。非照射群は照射群と同様に培地を別途回収し, HBSSを0.7mLずつ添加し, 10分間放置後, 回収していた培地を再び戻した。両群ともに3日目に培地交換を行い, 2日目, 4日目, 7日目に細胞数をカウントした。また, 7日目の培地を回収し, ヒアルロン酸量測定用に-20℃で保存した。

N-30, N-33 (5,000 cells/mL) は35mmディッシュに3mLずつ播種した (15,000 cells/dish)。2F0-C25と同様の方法で, 培養1日目から5日目まで連日LEDを10分間照射した。LED照射群および非照射群ともに3日目に培地交換を行い, 3日目, 5日目, 6日目に細胞数をカウントした。また, 6日目の培地を回収し, ヒアルロン酸量測定用に-20℃で保存した。

2F0-C25, N-30およびN-33の培養上清中のヒアルロン酸量はELISA法により測定した (生化学工業 (株))。

赤色LED (Light emitting diode) の正常ヒト線維芽細胞に及ぼす影響

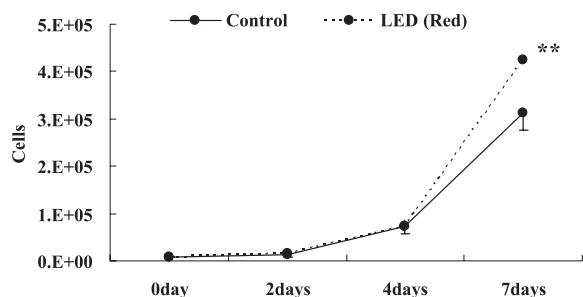


図3 ヒト新生児包皮由来線維芽細胞 (2F0-C25) による細胞増殖能

**p<0.01, 平均±SD (n=3)

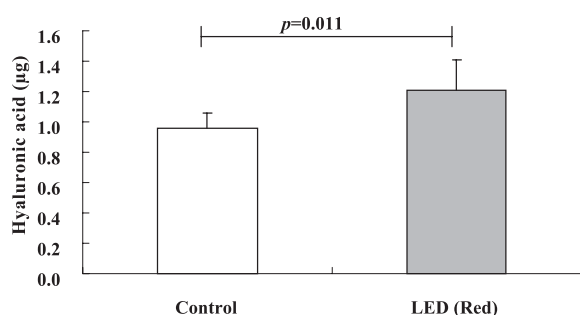


図5 培養7日目におけるヒト新生児包皮由来線維芽細胞 (2F0-C25) 培養上清中のヒアルロン酸量
平均±SD (n=3)

結 果

2F0-C25ではLED照射群および非照射群ともに培養2日目より徐々に細胞が増加し始めた。培養4日目では群間差は認められなかったが、培養7日目ではLED照射群で細胞増殖能が有意に亢進した (p=0.003, 図3)。

N-30では、両群ともに培養3日目より徐々に増殖し始めた。LED照射群は非照射群にくらべ、培養3日目より有意に細胞数が増加し (p=0.048), その所見は培養6日目まで継続した (p=0.033, 図4 (A))。

N-33では、両群ともに培養3日目より徐々に増殖し始め、LED照射群は非照射群にくらべ、培養3日目で有意に細胞数が増加した (p=0.003)。培養5日目では群間差はなかったが、培養6日目で再び細胞数の有意な増加が認められた (p=0.003, 図4 (B))。

培養上清中のヒアルロン酸量は2F0-C25においてLED照射群で増加した (p=0.011, 図5) が、

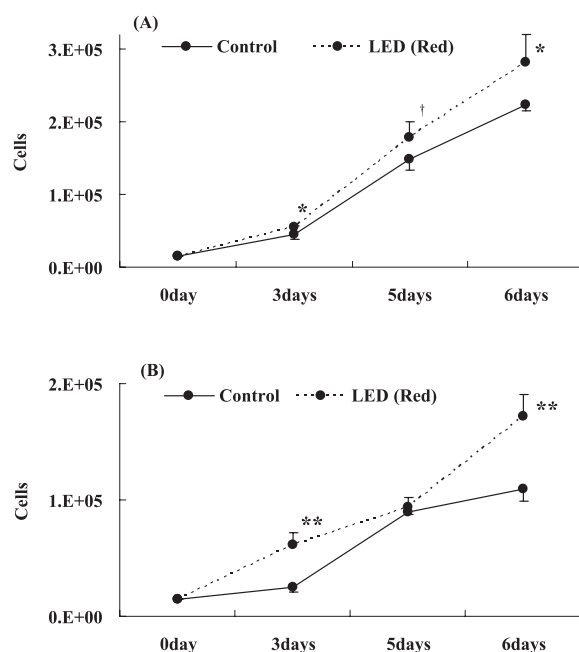


図4 ヒト皮膚由来線維芽細胞 (N-30, N-33) による細胞増殖能

(A) N-30 (B) N-33

†p<0.1, *p<0.05, **p<0.01, 平均±SD (n=3)

N-30およびN-33では非照射群とLED照射群の間で差は認められなかった (data not shown)。

考 察

今回用いたヒト新生児包皮由来線維芽細胞 (2F0-C25), 30歳および33歳の健常人男性皮膚由来線維芽細胞 (N-30, N-33) の3系統の細胞では、2F0-C25, N-30, N-33の順に細胞増殖能が高かった。最も安定した細胞増殖を示した2F0-C25では、LED照射群と非照射群で細胞増殖能および培養上清中のヒアルロン酸量に有意な差を生じた。また、N-30およびN-33についても2F0-C25にくらべ増殖スピードは遅いが、LED照射群で有意な細胞増殖を示した。今回用いたLEDはヘッド径40mmの周囲にLEDランプ21個を配置している。35mmディッシュの細胞接着面の15mm上よりLEDを照射したが、ヘッドの全面にLEDを配置していないため、35mmディッシュの中央部と周囲でエネルギー密度が不均一になる可能性も考えられる。しかしながら、赤色LED照射によ

り3系統すべての細胞で細胞増殖能の亢進を確認されたことは、620～630nmのLEDが線維芽細胞の活性化に関与していることを示唆する。

これまでLEDを培養細胞に照射してその生物作用を検討した報告は少なく、鶏胚線維芽細胞に赤色LED(660nm, 0.53J/cm²)を2分、緑色LED(570nm, 0.1J/cm²)を3分間照射し、さらに、24時間培養後の細胞増殖能はLED照射群で高く、赤色LEDよりも緑色LEDのほうが高いと報告されている⁷⁾。この報告はわれわれの試験と細胞の種類、赤色LEDの波長、エネルギー密度なども異なるが、赤色LEDには線維芽細胞の活性化を生じさせる可能性があることを支持するものである。

今回、赤色LEDにより正常ヒト線維芽細胞の細胞増殖能の亢進とヒアルロン酸の増加が確認されたことは、赤色LEDがアンチエイジング治療において有用な治療手段の一つになりうる可能性を示唆している。今後、赤色以外のLEDの皮膚への作用や、赤色を含めたLEDの紫外線によりダメージを生じた細胞への回復効果の検討などを行う予定である。

文 献

- 1) 天津朗典：LED, 光老化皮膚(川田 暁編)南山堂, 東京, 2005, p.116.
- 2) Babilas P, Kohl E, Maisch T, et al.: *In vitro* and *in vivo* comparison of two different light sources for topical photodynamic therapy, *Br J Dermatol*, **154**: 712-718, 2006.
- 3) Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, et al.: Clinical trial of a novel non-thermal LED array for reversal of photoaging: clinical, histologic, and surface profilometric results, *Lasers Surg Med*, **36**: 85-91, 2005.
- 4) Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, et al.: Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation, *Dermatol Surg*, **31**: 1199-1205, 2005.
- 5) Russell BA, Kellett N, Reilly LR: A study to determine the efficacy of combination LED light therapy (633 nm and 830 nm) in facial skin rejuvenation, *J Cosmet Laser Ther*, **7**: 196-200, 2005.
- 6) Trelles MA, Allones I: Red light-emitting diode (LED) therapy accelerates wound healing post-blepharoplasty and periocular laser ablative resurfacing, *J Cosmet Laser Ther*, **8**: 39-42, 2006.
- 7) Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, et al.: Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation, *Lasers Med Sci*, **18**: 95-99, 2003.

Effects of red light emitting diodes (LED) on human dermal fibroblasts

Shinichi Moriwaki, M.D., Ph.D.* , Satomi Kawamata **, Mayumi Kotani, Ph.D.** ,
Akihito Fujita ** and Toru Hirano ***

* *Department of Dermatology, Osaka Medical College, Osaka, Japan 569-8686*

** *Bloom Classic CO., LTD., Ehime, Japan 790-0062*

*** *Photon Medical Research Center, Hamamatsu University School of Medicine,
Hamamatsu, Japan 431-3192*

Abstract : Light emitting diodes (LED) have been recently introduced to photodynamic therapy for actinic keratosis and to therapy for photodamaged skin. Here, we examined the effect of red LED (620 – 630 nm) on primary cultured human fibroblasts from neonatal and normal donors. Cultured fibroblasts were exposed to a red LED light for 10 minutes per day for 5 days or 6 days. The red LED group showed a higher proliferation rate than the nonirradiated control group. The level of hyaluronic acid in the culture medium of neonatal fibroblasts in the red LED group was increased compared to that in the control group.

These findings suggest the activation of dermal fibroblasts by red LED, which may contribute to the effectiveness of red LED for aged skin.

Key Words : antiaging, red light emitting diode (LED), cell proliferation, hyaluronic acid, human fibroblast