

原著

ヒト皮膚3次元モデルを用いた赤色，青色LED (Light emitting diode) の色素沈着抑制効果の検討

森脇真一*・小谷麻由美**・櫛原維華*

藤田晃人**・岡崎茂俊***

要旨：近年，LED (Light emitting diode) は光老化に対するアンチエイジングを目的とした光線治療の光線のひとつとして利用されはじめている。今回，われわれは赤色 (620~630 nm) LED および青色 (465~470 nm) LED のメラノサイトへの作用についてヒト皮膚3次元モデルを用いて検討した。ヒト皮膚3次元モデルに1~12日間，赤色および青色LEDを連続照射した。その結果，赤色および青色LED照射群は非照射群にくらべ，黒化を有意に抑制させた。また，その効果は赤色LEDよりも青色LEDのほうが顕著であった。

この結果は，青色もしくは赤色LEDを照射することにより，アンチエイジング，特に，シミの抑制効果が期待できることを示唆する。

Key Words：青色LED，赤色LED，色素沈着，ヒト皮膚3次元モデル，メラノサイト

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) 照射，RF (Radio Frequency) 治療，イオントフォーレーシス，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さまざまな手技，施術が美容皮膚科の領域で行われている。光線治療機器において，レーザーやIPLの照射は施術者の経験，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⁾。

赤色 (633 ± 3 nm) LEDは，すでに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利用されている²⁾。また，眼瞼美容整形手術後の眼瞼周囲に赤色LEDを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³⁾。そのほか，830 ± 5 nmのLEDとの組み合わせによる光老化皮膚の改善効果が報告されている⁴⁾。

黄色 (590 nm) LEDに関しては，光老化皮膚の若返り，色素沈着，紅斑，シワの減少⁵⁾と眼窩周囲組織のI型コラーゲン増加，MMP-1減少などの作用が知られている⁶⁾。

一方，青色 (415 nm) LEDの作用については，*P. acnes* (*Propionibacterium acnes*) が産生するポルフィリン (コプロポルフィリンⅢ) を光励起し，*P. acnes* を破壊することで尋常性痤瘡に有効であ

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

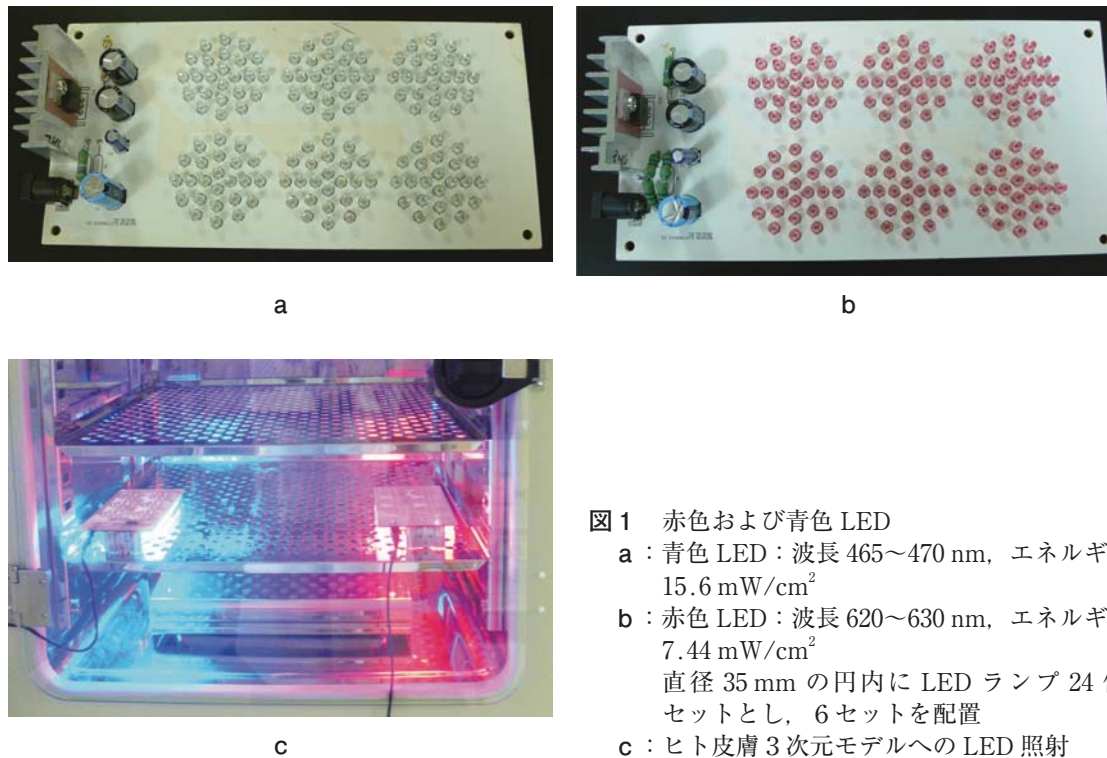


図1 赤色および青色 LED
 a : 青色 LED : 波長 465~470 nm, エネルギー密度 15.6 mW/cm²
 b : 赤色 LED : 波長 620~630 nm, エネルギー密度 7.44 mW/cm²
 直径 35 mm の円内に LED ランプ 24 個を 1 セットとし, 6 セットを配置
 c : ヒト皮膚 3 次元モデルへの LED 照射

ると考えられている^{1,7,8)}。

これまでわれわれは, ヒト皮膚由来培養線維芽細胞を用いて赤色 (620~630 nm) LED の照射により, 線維芽細胞の細胞増殖能の亢進とヒアルロン酸の産生増加を確認した⁹⁾。

今回われわれは, melanogenesis に着目し, 赤色 (620~630 nm) LED および紫外線領域を含まない青色 (465~470 nm) LED の照射により, 色素沈着の抑制効果があるかどうかをヒト皮膚 3 次元モデルを用いて検討した。

方 法

1. LED 仕様

赤色 LED は波長 620~630 nm, エネルギー密度 7.44 mW/cm² (Gentec 社, TPM-300 および PS310WB-V2 にて測定), 青色 LED は波長 465~470 nm, エネルギー密度 15.6 mW/cm² (Gentec 社, TPM-300 および PS310WB-V2 にて測定) の照射装置を作製して使用した。直径 35 mm の円内に赤色または青色 LED ランプ 24 個を 1 セットとし, 6 ウェルプレートに設置できるように 6 セットを配置した (図 1)。

2. LED 照射による黒化抑制能の検討

ヒトメラノサイトおよびケラチノサイトからなる多層化したヒト皮膚 3 次元モデル (Asian donor, MEL-300A, 倉敷紡績 (株)) を 6 ウェルプレート上にセットし, α MSH, β -FGF, hEGF, ハイドロコーチゾンを含むフェノールレッドフリー培地 (EPI-100LLMM-PRF 培地, 倉敷紡績 (株)) 5ml を各ウェルに添加し, 37°C, 5% CO₂ 下で培養した。

LED 照射群は 6 ウェルプレートの蓋をはずし, LED 基盤を 6 ウェルプレートにセット後, 培養 1 日目から 12 日目まで連続 (24 時間) 照射し, 37°C, 5% CO₂ 下で培養した。(図 1)。LED 照射群および非照射群ともに 2 日に 1 回培地を交換し, 5 日目, 10 日目, 12 日目にヒト皮膚 3 次元モデルを 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した (非照射群 10 日目および 12 日目は n=3, その他は n=2)。メラニンの黒化は, 肉眼比較, MEXAMETER[®] ((株) インテグラル) および色彩色差計 (CR-400, コニカミノルタセンシング (株)) で計測した。計測は, ヒト皮膚 3 次元モデル 1 個につき, 2 回行った。また, ヒト皮膚 3 次元モデルを切り出し, 包埋, 切片を作製後, HE およびフォンタナ・マッソ

ヒト皮膚3次元モデルを用いた赤色、青色LED (Light emitting diode) の色素沈着抑制効果の検討

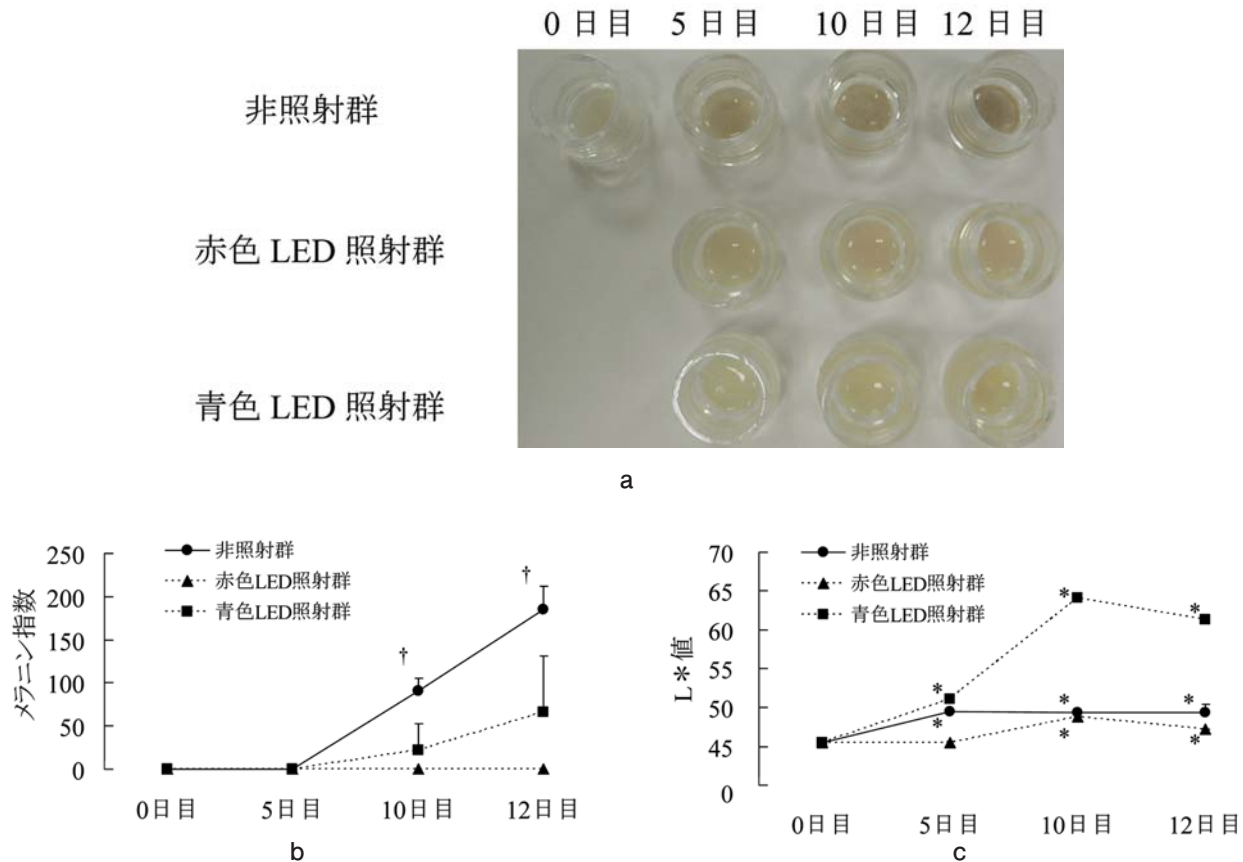


図2 LED照射による影響

a: 黒化比較

b: メラニン変化

† $p < 0.1$, 非照射群0日目と各時点での比較

c: 色調変化

* $p < 0.05$, 非照射群0日目と各時点での比較

ンで染色した。

測定値は、平均値と標準偏差で表した。有意差の検定は、分散分析およびポストホックテストにて行った。

結果

3次元培養皮膚の上方からの肉眼的観察において、非照射群は5日目より徐々に黒化し、10日目で明瞭に黒化した。赤色LED照射群では、照射12日目においてもわずかな黒化しか確認されなかった。青色LED照射群では、照射12日目においても黒化が認められなかった(図2)。

つぎにLED照射によるメラニン量の変化をMEXAMETER[®]で測定した(図2)ところ、非照射群では、0日目に比べ、10日目および12

目でメラニン指数の上昇傾向が認められた($p < 0.1$)。一方、青色LED照射群では、照射10日目および12日目でメラニン指数が上昇したが有意差は認められなかった。赤色LED照射群では、メラニン指数に変化がみられなかった。

LED照射による色調の変化を色彩色差計のL*値(明るさ)で測定した(図2)。非照射0日と比較したところ、すべての群でL*値が上昇した($p < 0.05$)。また、L*値は照射12日目において、非照射群にくらべて青色LED照射群間では上昇する傾向がみられた($p < 0.1$)。

ヒト皮膚3次元モデルのHE染色像による組織学的検討において、今回の赤色LEDおよび青色LEDの照射条件では皮膚の形態学的変化は少なくとも光顕像ではみられなかった(図3)。

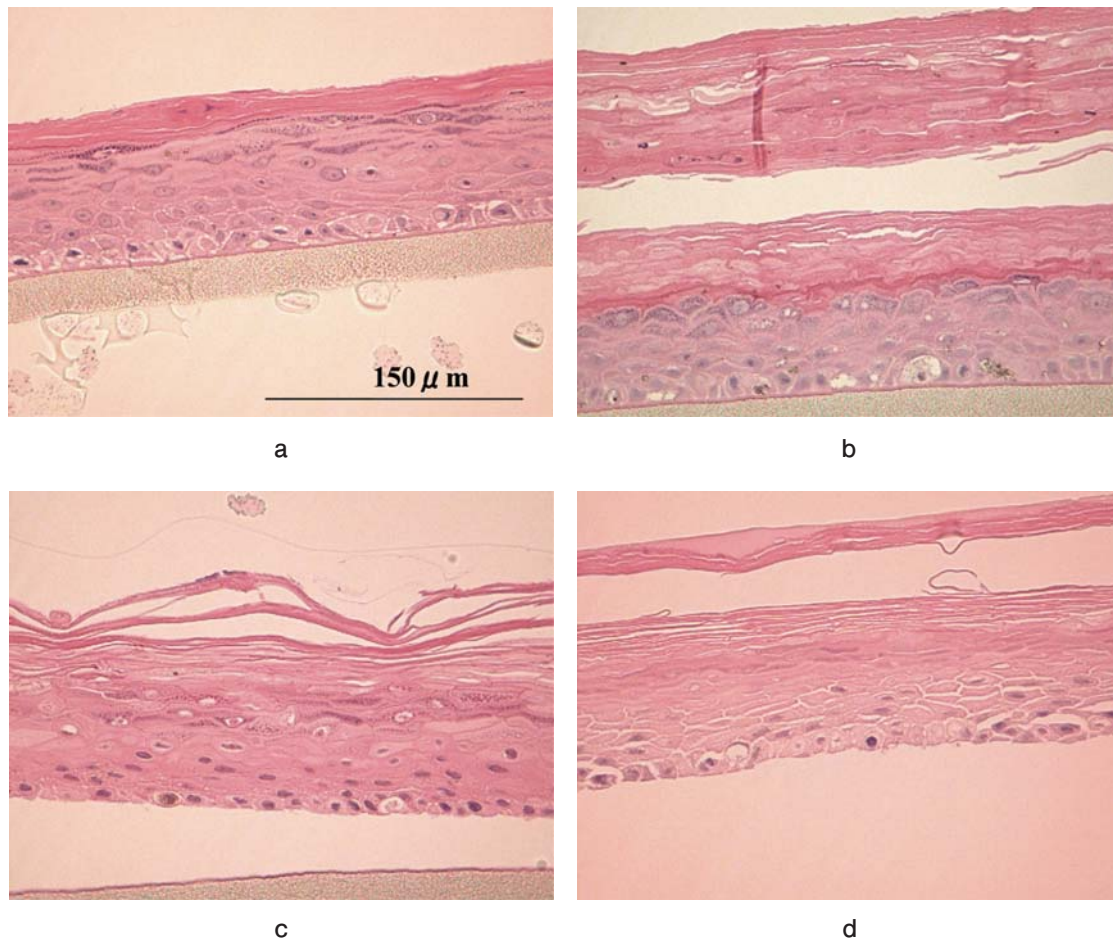


図3 HE染色像

- a : 非照射群 0 日目
- b : 非照射群 12 日目
- c : 赤色 LED 照射群 12 日目
- d : 青色 LED 照射群 12 日目

フォンタナ・マッソン染色による解析にて、赤色 LED および青色 LED 照射により、ヒト皮膚 3 次元モデルでのメラニン顆粒の著明な減少が確認できた (図 4)。

考 察

ヒトメラノサイトおよびケラチノサイトからなるヒト皮膚 3 次元モデルは、培養することで黒化することが知られており、美白剤の有効性評価などに用いられている¹⁰⁾。

今回用いたヒト皮膚 3 次元モデルにおいて観察された LED 照射による黒化の抑制および明度の上昇は、赤色 LED 照射群よりも青色 LED 照射群で著明であった。一方、メラニン指数を指標とす

れば、メラニン抑制効果は、赤色 LED 照射群で高い結果となった。MEXAMETER[®]は皮膚組織から反射した光を受光し、皮膚に吸収された光量を算出する。図 2 で青色 LED 照射群の組織が白く、光沢をもっていることが確認できる。本来、MEXAMETER[®]は、皮膚のメラニン量を測定するための機器であるため、白く光沢をもった培養皮膚を MEXAMETER[®]で測定すると反射光が強くなりメラニン量が高くなったように計測されるが、実際は白く光る培養皮膚をとらえての増加と考えられる。これは、皮膚から反射した光を受光し、皮膚に吸収された光量を算出する MEXAMETER[®]の特性と考えられる。

青色 LED の安全性について、成熟アカゲザル

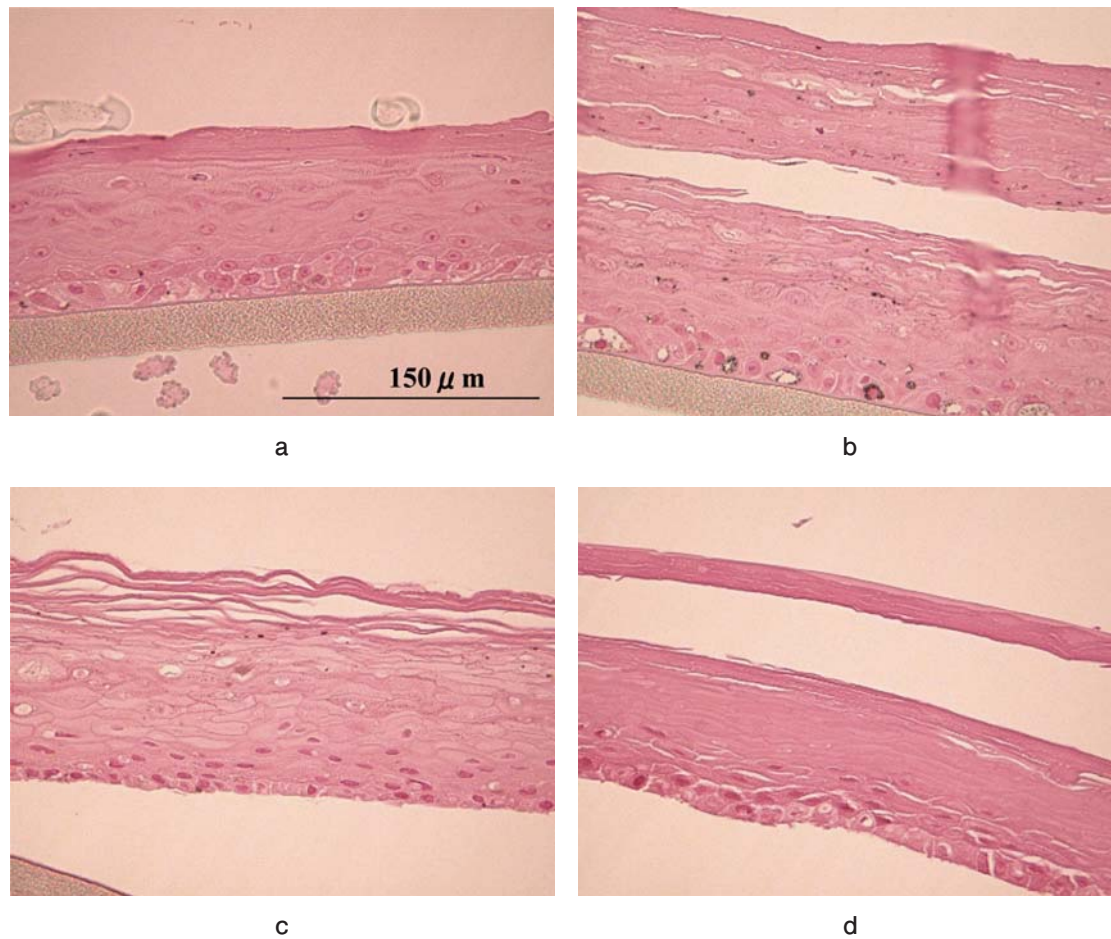


図4 フォンタナ・マッソン染色像
a : 非照射群 0 日目
b : 非照射群 12 日目
c : 赤色 LED 照射群 12 日目
d : 青色 LED 照射群 12 日目

の眼に青色 LED (460 nm) を照射することで網膜障害を生じるとの報告がある¹¹⁾。網膜の場合、網膜色素上皮細胞からのメラニンの消失と尖端絨毛の障害が認められたが、今回の赤色および青色 LED 照射により、顕微鏡下で観察した限りではヒト皮膚 3次元モデルを構成する表皮ケラチノサイトに形態学的な影響を与えることなく、表皮メラノサイトのメラニン顆粒が減少した。

今回の研究で観察された LED 照射によるメラニン顆粒減少の分子機構は不明である。光源として IPL, 材料として健康人皮膚を用いた研究から、IPL でのシミ抑制作用の機序として (1) 光線照射により核帽をもった表皮ケラチノサイトが破壊される、(2) 基底細胞からの表皮ターンオーバー

が亢進する、(3) メラノゾームの上方へのトランスファーが早まりメラニンが排泄されやすくなる、などが想定されている¹²⁾。LED でも類似の機序があることが推測されるが、今後さらなる医学的エビデンスを蓄積して詳細に検討していく必要がある。

一方、マウス B16 メラノーマ細胞において、青色 LED (470 nm, 5.7 mW/cm²) 照射で細胞分裂およびメラニン合成を抑制したが、メラニンの脱色を生じなかったとの報告がある^{13,14)}。青色 LED の波長、エネルギー密度および照射時間、細胞種などの条件が異なるが、青色 LED は melanogenesis に対してなんらかの影響を及ぼすことが示唆される。また、茶系モルモット背部に

UVB 照射のみ, または, UVB 照射および青色光照射による色素沈着の変化では, UVB 照射および青色光照射で黒化を抑制することが報告されているが¹⁴⁾, できてしまった色素沈着を抑制できるかは不明である。

今回の赤色および青色 LED 照射は, シミに対する抑制効果が期待でき, 特に, 青色 LED のほうがその効果が高いと思われる。ただ, 今回実験に用いた LED 照射装置のエネルギー密度は, 赤色が 7.44 mW/cm², 青色が 15.6 mW/cm²と青色 LED のほうが高かった点を考慮すると, 今回みられたメラノサイトのメラニン産生抑制作用は, 波長依存性が高いのか, エネルギー密度に依存するのかなど, まだまだ検討すべきことも多く残っている。さらに今後, ヒトでの臨床試験を行い, シミに対する各 LED の効果や安全性の評価を行うことも必要である。

利益相反: 本研究は大阪医科大学と株式会社ブルーム・クラシックとの共同研究である。研究に用いた光線機器, 研究資金は株式会社ブルーム・クラシックにより作製あるいは拠出されたものである。

文 献

- 川田 暁: LED, 光老化皮膚, 南山堂, 東京, 2005, pp.116-119.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, et al.: Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation, *Dermatol Surg*, **31**: 1199-1205, 2005.
- Kawada A, Aragane Y, Kameyama H, et al.: Acne phototherapy with a high-intensity, enhanced, narrow-band, blue light source: an open study and *in vitro* investigation, *J Dermatol Sci*, **30**: 129-135, 2002.
- 森脇真一, 櫛原維華: 美容皮膚科領域の新しい医療機器としての LED (発光ダイオード) の可能性, *Aesthet. Dermatol.*, **19**: 39-44, 2009.
- 森脇真一, 川又里美, 小谷麻由美, 他: 赤色 LED (Light emitting diode) の正常ヒト線維芽細胞に及ぼす影響, *Aesthet. Dermatol.*, **18**: 30-34, 2008.
- 芋川玄爾: 3次元培養皮膚モデルを用いたメラニン産生抑制評価法, 機能性化粧品素材開発のための実験法 - *in vitro*/細胞/組織培養 -, (株)シーエムシー出版, 東京, 2007, pp.239-240.
- 小出良平, 植田孝子, Dawson WW, 他: 青色発光ダイオード光による網膜障害, *日眼会誌*, **105**: 687-695, 2001.
- Yamashita T, Negishi K, Hariya T, et al.: Intense pulsed light therapy for superficial pigmented lesions evaluated by reflectance-mode confocal microscopy and optical coherence tomography, *J Invest Dermatol*, **126**: 2281-2286, 2006.
- Ohara M, Kawashima Y, Katoh O, et al.: Blue light inhibits the growth of B16 melanoma cells, *Jpn J Cancer Res*, **93**: 551-558, 2002.
- Ohara M, Kobayashi M, Fujiwara H, et al.: Blue light inhibits melanin synthesis in B16 melanoma 4A5 cells and skin pigmentation induced by ultraviolet B in guineapigs, *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **20**: 86-92, 2004.

ヒト皮膚 3次元モデルを用いた赤色, 青色 LED (Light emitting diode) の色素沈着抑制効果の検討

Effects of red and blue light emitting diodes (LED) on human 3-D skin-like tissue structure

Shinichi Moriwaki, M.D., Ph.D.^{*}, Mayumi Kotani, Ph.D.^{**}, Yuika Ichihara, M.D.^{*},
Akihito Fujita^{**} and Shigetoshi Okazaki, Ph.D.^{***}

^{*}*Department of Dermatology, Faculty of Medicine, 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 recently been utilized in phototherapy for photodamaged skin. Here, we examined the effect of red and blue LED (620-630 nm and 465-470 nm, respectively) on melanogenesis using human 3-D skin-like tissue structures that include melanocytes from healthy Asian donors. The human 3-D skin-like tissue structures were exposed to a red or blue LED light for 1-12 days. Both red and blue LED irradiation inhibited darkening of the culture tissue, but the effect of irradiation with blue LED was more prominent than that with red LED. Histologically, the culture did not show any damage after irradiation with either blue or red LED. These findings suggest that red and blue LED suppress melanogenesis, indicating possible treatment of age-related skin pigmentation changes using red and blue LED.

Key Words : blue light emitting diode (LED), human 3-D skin-like tissue structure, melanocyte, pigmentation, red light emitting diode (LED)