



# B16 メラノーマにおける メラニン産生に及ぼす緑色 LED 光の影響

横田友美<sup>1)</sup>／東平正志<sup>1)</sup>／山中一範<sup>1)</sup>／松田明子<sup>2)</sup>

## ● 概要

**目的:** 緑色 LED 光によるメラニン産生に及ぼす影響について検討し、メラニン産生抑制に効果的な照射条件を見出すことを目的とした。

**方法:** マウス黒色腫細胞株 B16 メラノーマ細胞に緑色 LED 光を照射し、細胞生存率およびメラニン生成率を測定することで、メラニン産生抑制に対する効果を評価した。

**結果:** 385 nm の UV-LED 光源を用いて B16 メラノーマ細胞に照射したところ、メラニン量は増加した。また、B16 メラノーマに 505 および 525 nm の緑色 LED 光を照射したところ、メラニン産生量は減少した。さらにこの傾向は 505 nm の緑色 LED 光の方が顕著であり、本実験条件下においては出力が高いほどより減少することがわかった。

## I. はじめに

皮膚組織は身体最大の臓器であり、微生物や化学物質などの外的因子の侵入から身体を守る役割を担っている。さらに、外界との境界にある皮膚、特に顔面などの皮膚は常に紫外線に曝されており、皮膚組織中の生体色素の一つであるメラニンが、その光化学的特性により皮膚を紫外線による傷害から守っている。

メラニンは皮膚が紫外線に曝されることで生成されるフェノール類化合物が高分子化した色素の総称で、黒色のユーメラニンと黄色のフェオメラニンの2種類が存在する。メラニンの産生は、表皮の基底層付近に存在するメラノサイトの細胞内小器官であるメラノソームで行われる<sup>1)</sup>。メラニンは皮膚を紫外線から防御する働きがあるが、メラニン産生が異常に亢進することで皮膚への色素沈着がしばしばシミや肝斑となって美容上の問題を引き起こす。したがって、効果的にメラニン産生を抑制することは皮

膚の色素沈着を制御する上で重要である<sup>2)</sup>。これまでその方法について多くの研究がなされており、美容医療上だけでなく、一般家庭でも化粧品・医薬品、サプリメント、家庭用美顔器などで対応するものが発売されている。

一方、可視光線は生体侵襲性が小さく、医療分野や美容皮膚分野では生体に対する可視光線の影響についてさまざまな研究がされている<sup>3)</sup>。特に青色、赤色については皮膚の修復、老化防止などの効果が報告されている<sup>4)5)</sup>。しかしメラニン産生に及ぼす可視光線の影響に関する研究はほとんどない。本研究では新たなメラニン産生抑制法として主に緑色の可視光線がメラニン産生に及ぼす影響を、B16 メラノーマ細胞を用いて検討した。

## II. 実 験

緑色 LED 光のメラニン産生抑制への影響の有無に関して確認するため、2つの実験を実施した。実験①として、B16 メラノーマ細胞単体でのメラニン

1) ヤーマン株式会社／Tomomi YOKOTA, Higashihira MASASHI, Kazunori YAMANAKA; YA-MAN LTD.

2) SENSHIN CLINIC／Matsuda AKIKO; SENSHIN CLINIC

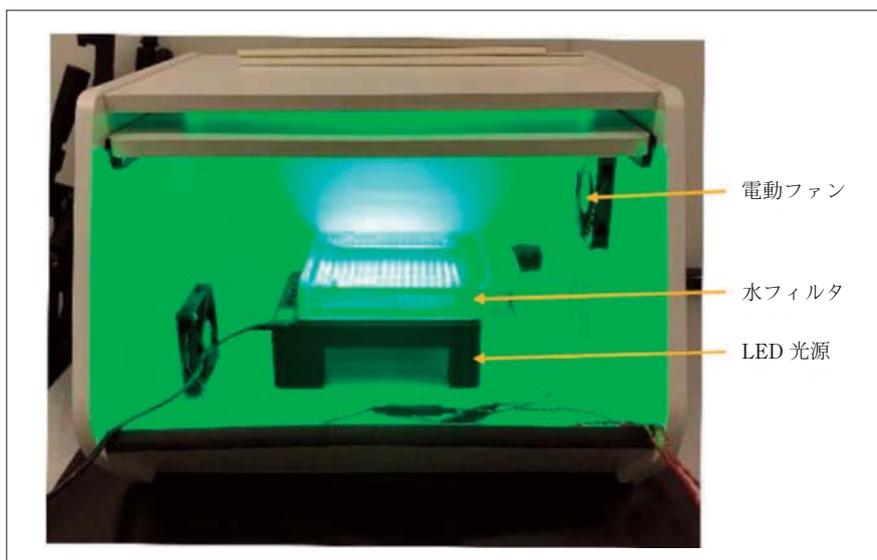


図1 LED光照射装置

産生能，メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) の添加の有無によるメラニン産生能への影響を検討したのち，緑色 LED 光を照射して B16 メラノーマ細胞の細胞生存率とメラニン産生能を評価した。実験②として，緑色 LED 光の出力を複数設定し，メラニン産生抑制効果のある照射出力を評価した。なお，実験①および②は，それぞれ桐蔭横浜大学および株式会社きれいテストラボにて実施された。

## II.1 実験①

### II.1.1 方法

#### II.1.1.1 供試細胞

B16 メラノーマ 4A5 は，文部科学省 / 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して，理研 BRC から提供されたものを用いた。本実験①の内容につき，以降に示す細胞はこれを指すものとする。

#### II.1.1.2 LED 光照射装置

図1に LED 光照射装置を示す。40 × 40 × 30 cm の容器を用いて暗所を設けた。容器の中央にヤマーン株式会社から提供された波長 505 および 525 nm の緑色 LED (ウシオ電機製) を搭載した照射装置を設置した。また，波長 385 nm の UV-LED (ウシオ電機製) を搭載した照射装置も同じ容器内に設置して利用した。

#### II.1.1.3 細胞培養および継代

表1に示す試薬を用いて細胞培養を行った。非

表1 細胞培養用試薬

DMEM 培地 (Gibcol 1885-084)
ウシ胎児血清 FBS [Sigma 173012 (Lot.BCCC3916)]
ペニシリン/ストレプトマイシン (P/S) (Gibcol 5140-122)
トリプシン/EDTA (Gibco 10010-23)
トリパンプルー溶液 (Wako 207-17081)

動化した FBS を 50 mL と P/S を 5 mL とを添加した 500 mL の DMEM 培地，ならびに PBS (-) を，事前に 37°C の温浴で温めた。培養容器内の古い培地を取り除き，PBS (-) を細胞に直接当たらないように添加し，細胞表面を良く洗浄した。この作業を 2 回繰り返した。トリプシン/EDTA を細胞に当たらないように添加し，3 分間，37°C でインキュベーションした。顕微鏡下で細胞が剥がれ，球状に浮遊していることを確認し，剥がれていない細胞がある場合は，培養フラスコ底面をタッピングして剥がした。培地を添加してトリプシンの作用を阻害し，15 mL の遠沈管に移し，1000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を取り除き，細胞ペレットをタッピングし，PBS (-) を添加して細胞を十分に分散させ，同様に 1000 rpm で 5 分間遠心分離した。この操作を 2 回繰り返した。遠心分離中に，分注した細胞懸濁液をトリパンプルー染色し，血球計算盤を用いて全細胞数および死細胞数を測定し，細胞生存率を算出した。遠心分離後，上清を取り除き，所定の濃度になるように培地を添加し，細胞懸

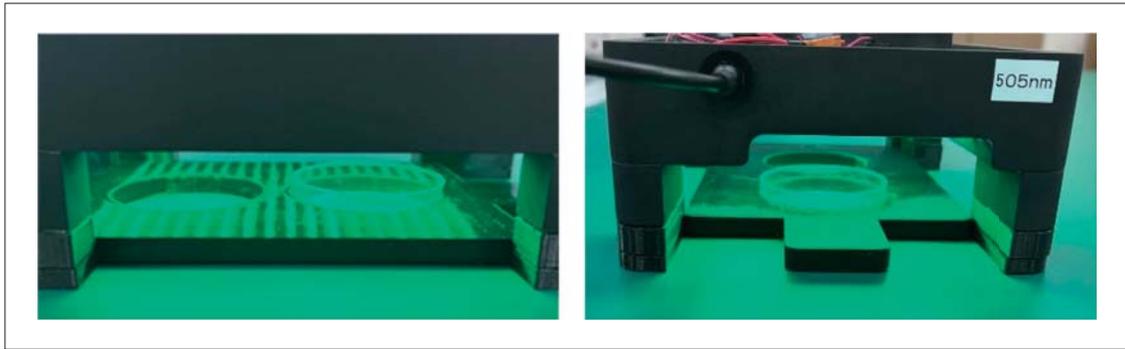


図2 LED光照射装置

表2 LED光照射条件

条件	LED	照射出力 (mW/cm <sup>2</sup> )	照射時間 (min)
1	未処理 (クリーンベンチ内3分静置)	0.5	
2	505 nm	1.0	3
3	505 nm	4.0	3
4	505 nm	7.0	3
5	505 nm	11.5	3
6	505 nm	0.5	3

濁液を得た。所定量の培地を分注した新しい培養容器に細胞懸濁液を添加した。添加後、容器をゆすって、細胞を均一にし、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

#### II.1.1.4 緑色LED光および紫外線光照射

6穴のウェルプレートに、DMEM培地で調製した $1 \times 10^4$  および  $2 \times 10^4$  Cells/mLの細胞懸濁液2 mLを分注し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で3日間培養した。培養後、培地を抜き取り、100 nMの $\alpha$ -MSHを含むフェノールレッド不含DMEM培地2 mLを添加後、505および525 nmの緑色LED光を所定時間照射した。照射は、1日1回、都合3日間行い、1日間培養した。培養後、細胞をPBS(-) 1 mLで洗浄し、10 wt%ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む2 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液0.5 mL添加し、メラニンおよび細胞を溶解した。溶解後、細胞溶解液をガラス製ネジ付き試験管に分注した。別に、緑色LED光に代わり、385 nmのUV-LED光を1、3および5分間照射して3日間培養した系列も作製した。なお、細胞初期濃度や $\alpha$ -MSH濃度はプレテストにより決定した。

#### II.1.1.5 メラニン濃度の定量

10 wt% DMSOを含む2 mol/L水酸化ナトリウム水溶液で調製したメラニン (MP Biomedicals社製)

標準溶液を用いて405 nmの吸光度を測定し、検量線を作成した。測定には0.1 mL用マイクロセルホルダを備えた紫外可視分光光度計 (V-550, 日本分光社製) を利用し、光路幅4 mmのプラスチックセルを用いた。また、対照には10 wt% DMSO含有2 mol/L水酸化ナトリウム水溶液を用いた。同様に、細胞溶解液の吸光度を測定し、検量線を用いてメラニン濃度を定量した。

#### II.1.1.6 細胞タンパク濃度の定量

細胞溶解液中の細胞に由来するタンパク濃度 (細胞タンパク濃度) は、Bio-Rad社製のRCDCプロテインアッセイキットIIを用いた。また、標準物質としてウシ血清アルブミンフラクションV (Rockland Immunochemicals社製) を用いて検量線を作成し、対照には蒸留水を用いた。

#### II.1.1.7 細胞生存数の測定

培養後、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 溶液 (同仁化学社製, CK04) を0.2 mL (培地の1/10量) 添加し、2時間培養後、蒸留水で10倍に希釈して、450 nmの吸光度を測定して細胞生存数を算出した。

## II.2 実験②

### II.2.1 方法

#### II.2.1.1 供試細胞

B16メラノーマ4A5は、理研BRCから提供され

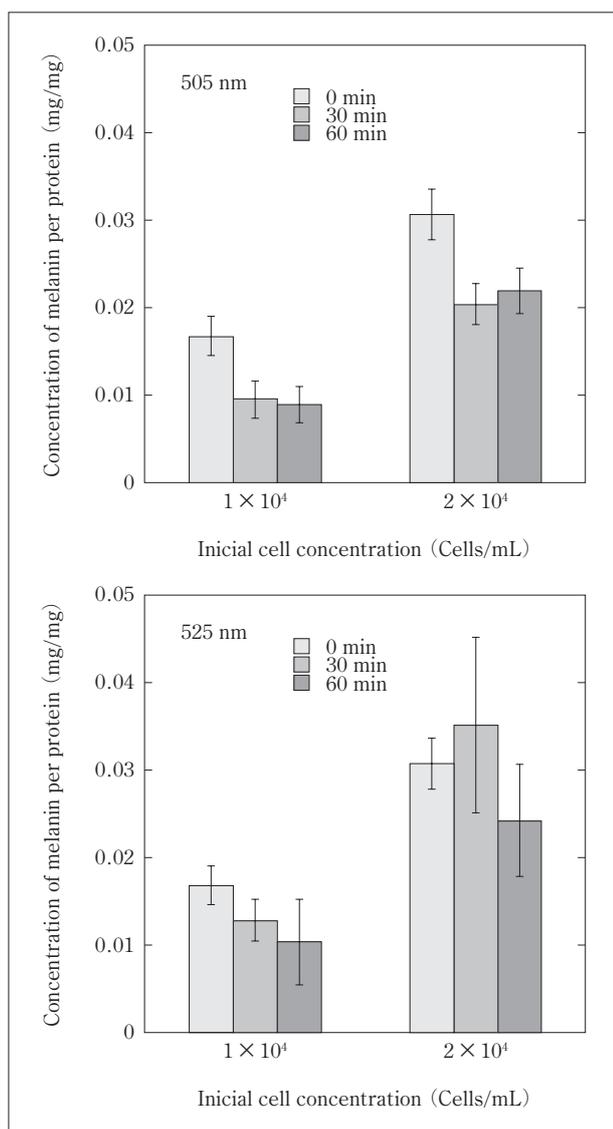


図3 緑色LED光照射に伴うメラニン産生量

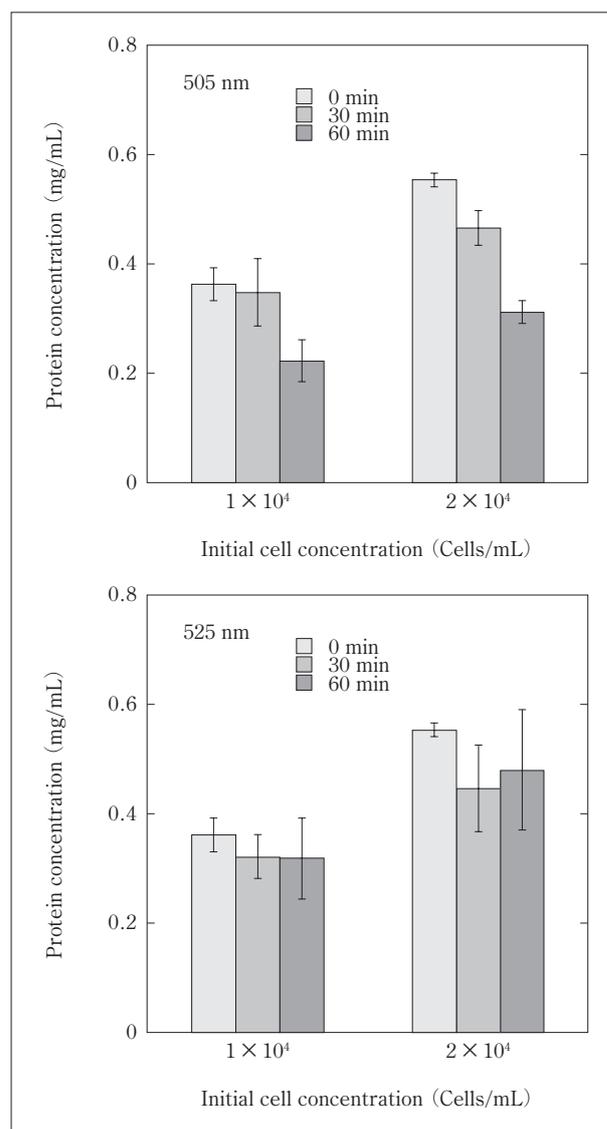


図4 緑色LED光照射に伴う細胞タンパク量

表3 505および525 nmLED光の照射エネルギー(400~700 nm)

LED	照射エネルギー (J/cm <sup>2</sup> )	照射時間 (min)
505 nm	22.6	28.3
	45.2	56.6
525 nm	22.3	30
	44.6	60

たものを用いた。本実験②の内容につき、以降に示す細胞という言葉はこれを指すものとする。

II.2.1.3~5に記載のとおり細胞と細胞培養を行い、培地は以下のものを使用した。

10.0% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Cat No. SH30071.03, Hyclone, UK) および 1.0% (v/v)

抗真菌剤 (Antibiotic-Antimycotic 100X, Cat No. 15240-062, Invitrogen, USA) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Cat No.10566-016, Gibco, USA) を用いた。100 nM  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH, Cat No. M4135, Sigma-Aldrich, USA) および 100  $\mu$ M テオフィリン (Cat No. T1633, Sigma-Aldrich, USA) を含む 10% FBS 含有 DMEM を調製したもの。

#### II.2.1.2 LED光照射装置

図2にLED光照射装置を示す。ヤーマン株式会社から提供された波長505 nmの緑色LED(ウシオ電機製)を搭載した照射装置を使用した。表2に照射条件を示す。

### II.2.1.3 細胞培養および継代

60 mm dish (Cat No. 353002, Falcon, USA) に  $3.0 \times 10^5$  cells/dish の密度で細胞を播種し, CO<sub>2</sub> インキュベータ内 (CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 37°C) で 24 時間培養した。

### II.2.1.4 緑色 LED 光照射

培地を除去し, Phosphate buffer saline [PBS (-), Cat No. 198601, Nissui, Japan] で洗浄後, 8 mL のハンクス平衡塩溶液 (+) [HBSS (+), Cat No. 084-08965, Wako, Japan] に交換後, 照射条件に従って照射機器を適用した。さらに HBSS (+) を除去し, 3 mL の試験培地に交換して 72 時間培養した。

### II.2.1.5 メラニン濃度, 細胞タンパク濃度, 細胞生存率の定量

培養後に PBS で洗浄後, alamarBlue (Cat No. DAL1100, Invitrogen, USA) を無血清 DMEM にて 10 倍希釈した alamarBlue 溶液を細胞に 2 mL 処理し, CO<sub>2</sub> インキュベータにて 37°C, 2 時間培養した。alamarBlue 溶液を回収して 96 穴プレート (Cat No. 9017, costar, USA) に 200  $\mu$ L 入れ, マイクロプレートリーダー (SPARK<sup>®</sup> 10M, TECAN, Switzerland) を用い 570 nm および 600 nm の吸光度 (OD570, OD600) を測定した。ブランクとして alamarBlue 溶液を用いた。60 mmdish から alamarBlue 溶液を除去し, PBS (-) で洗浄後にメラニンを可溶化するため, 10% DMSO を含有する 1M 水酸化ナトリウム水溶液を 1 mL 加え, 85°C 下で 10 分間インキュベートした。メラニン溶解液を 96 穴プレートに 100  $\mu$ L 入れ, マイクロプレートリーダーを用い 405 nm の吸光度 (OD405) を測定した。対照の OD570-600 を 100% として, LED 光照射適用群の細胞生存率を算出した。また, 対照の OD405 を 100% として, メラニン生成率を算出した。さらに, 対照, LED 光照射適用群の OD405 と alamarBlue にて測定した OD570-600 で除した値を細胞あたりのメラニン生成率として算出した。有意差検定は対照と LED 光照射適用群を対応のない t 検定で有意差検定を実施した。検定はいずれも両側で有意水準を 5% 未満とした。

## III. 結 果

まず実験①の結果について述べる。

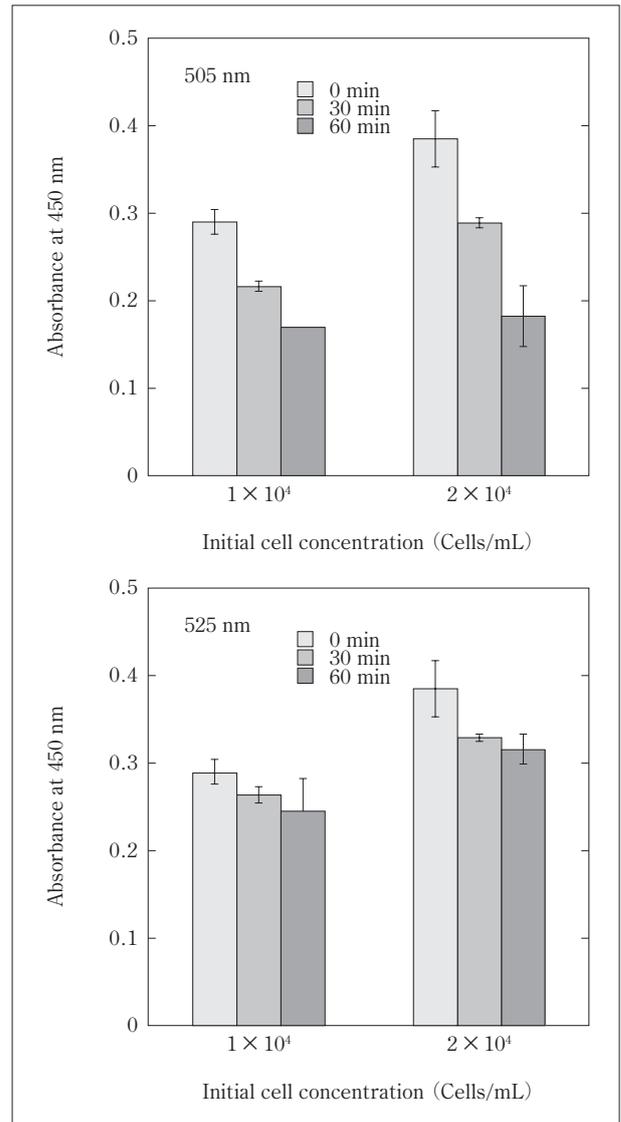


図5 緑色 LED 光照射に伴う細胞生存数

## III.1 実験 ①

### III.1.1 緑色 LED 光照射によるメラニン産生量 および細胞タンパク量

505 および 525 nm の緑色 LED 光の照射時間を 30 および 60 分間照射した際の細胞タンパク量あたりのメラニン量 (メラニン濃度を細胞タンパク濃度で除した値) を図 3 に示す。525 nm と 505 nm は照射エネルギー量が等しくなるように 505 nm の照射時間を表 3 のように制御した。いずれの LED 光においてもメラニン産生量は LED 光の照射時間の増加に伴い明らかに低下した。また, その傾向は 525 nm より 505 nm の LED 光の方が顕著であった。図 4 は, LED 光照射後の細胞タンパク量の変化を示す (n = 3)。LED 光照射に伴い細胞タンパク量は

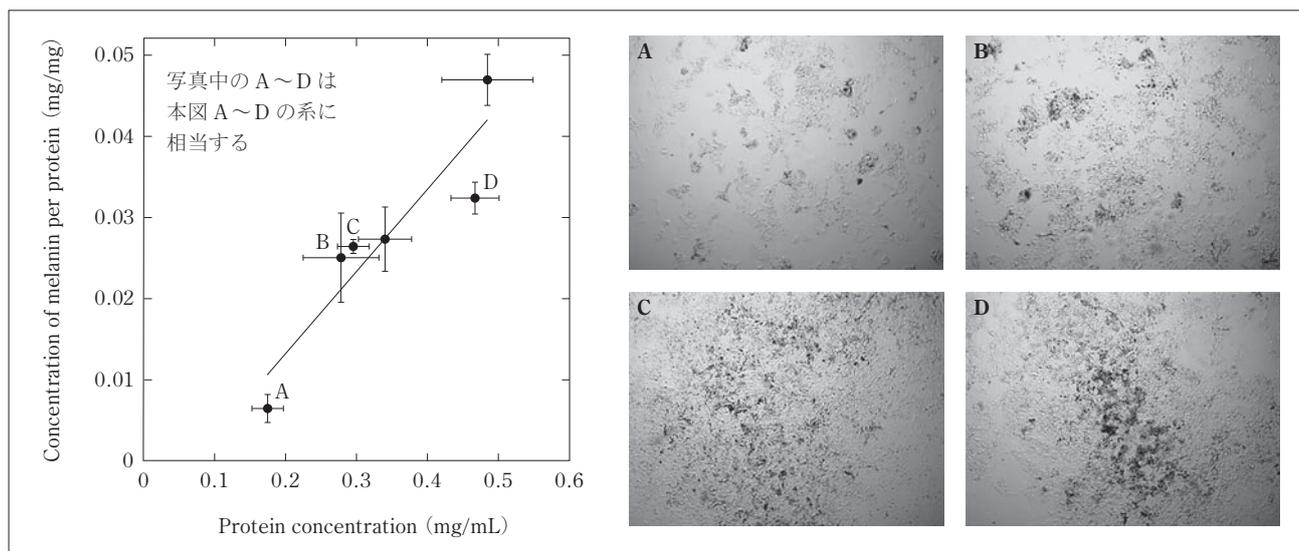


図6 LED光照射の細胞タンパク量と細胞タンパク量あたりのメラニン産生量との相関（左）とメラニン産生状態の顕微鏡観察（右）（倍率：2倍）

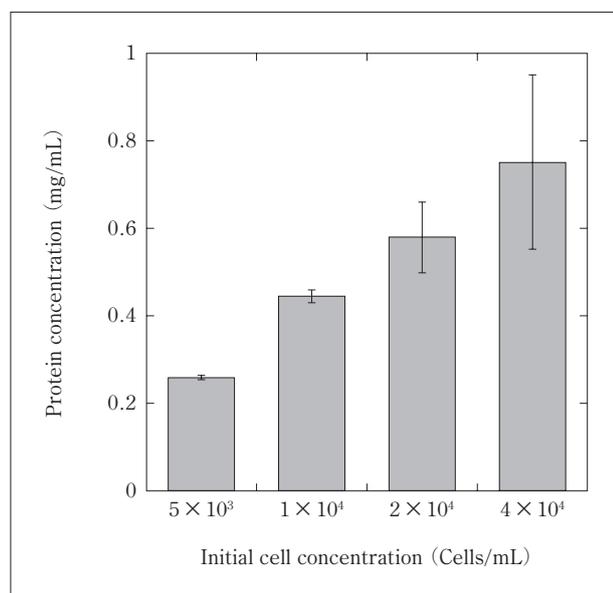


図7 細胞タンパク量に対する細胞初期濃度の影響

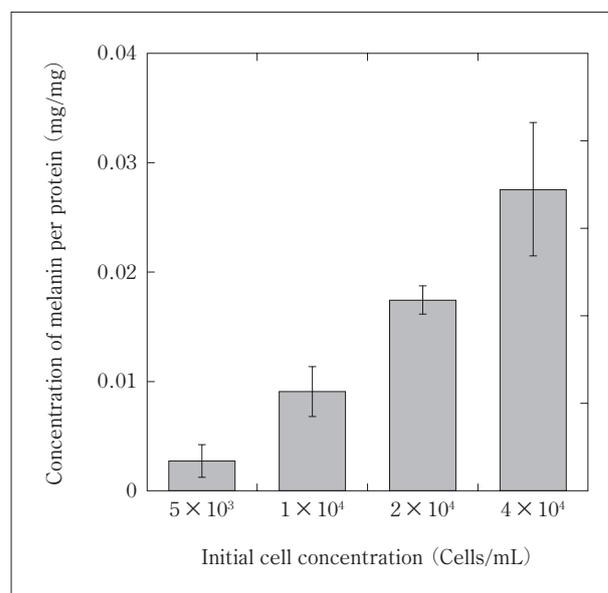


図8 細胞タンパク量あたりのメラニン量に対する細胞初期濃度の影響

減少し、その傾向は505 nmのLED光照射にて顕著であった。細胞タンパク量の減少は、LED光照射によって、細胞死あるいは細胞増殖抑制が生じたためと考えられる。CCK-8を用いた、LED光照射時の細胞生存数の変化を図5に示す。縦軸は450 nmの吸光度を示し、吸光度が大きいほど細胞生存数が多いことを意味する。いずれのLED光照射においても細胞生存数はLED光の照射時間の増加に伴い減少した。さらに、細胞生存数の減少は、505 nmのLED光の方が顕著であった。これらの結

果は、図4に示す細胞タンパク量の結果と一致する。したがって、緑色LED光照射に伴い、細胞生存数は減少すると共に、産生される細胞タンパク量あたりのメラニン量も減少することがわかった。

### III.1.2 細胞濃度とメラニン産生量との相関

細胞濃度と細胞タンパク量あたりのメラニン産生量との相関について検証した（図6）。図7に細胞タンパク量、図8に細胞タンパク質あたりのメラニン産生量、図9にその顕微鏡観察結果を示す。細胞タンパク量あたりのメラニン産生量が細胞初期

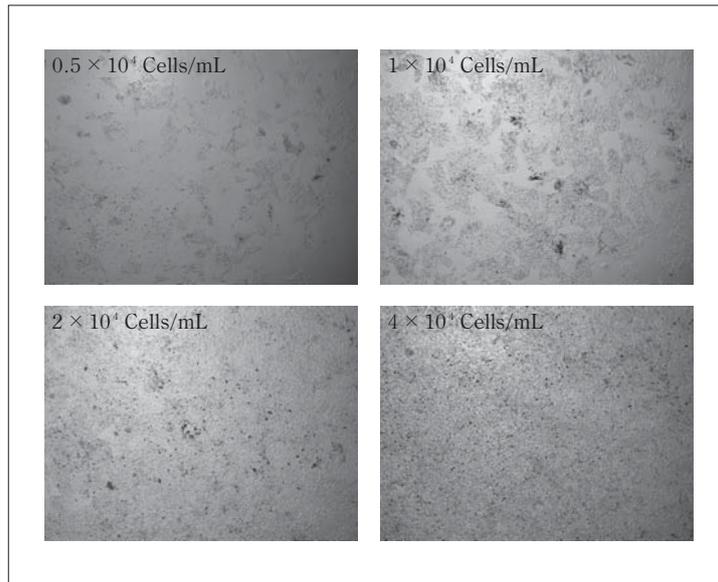


図9 細胞初期濃度に対するメラニン産生状態 (倍率: 2倍)

濃度の増加に伴い増加する傾向が観察された。細胞数 (細胞濃度) の増加に伴いメラニン産生が促進していることが示唆された。これによりLED光照射によってB16メラノーマの壊死あるいは増殖抑制によって細胞数が減少し、細胞濃度が低下したため、メラニン産生が抑制されたものと考えられる。

### III.1.3 紫外線照射による細胞生存率およびメラニン産生量

紫外線照射により、メラニン産生が促進することは明らかであるが、用いる細胞や照射条件などの検討も含め、385 nmのUV-LED光照射を行った培養における細胞タンパク量あたりのメラニン量と顕微鏡観察結果を図10、図11に示す。紫外線によって細胞タンパク量あたりのメラニン量は増加することが示された。同条件で測定した細胞タンパク量変化およびCCK-8による細胞生存数の変化を図12、図13に示す。これらの結果から、細胞タンパク量は385 nmのUV-LED光照射に伴い減少し、細胞生存数も減少することがわかった。この結果は、緑色LED光照射の場合とは異なる。すなわち、UV-LED光照射によって細胞生存数は減少するものの、B16メラノーマにおけるメラニン産生促進物質等の産生が亢進したため、メラニン産生量が増加したと考えられる。

次に実験②の結果について述べる。

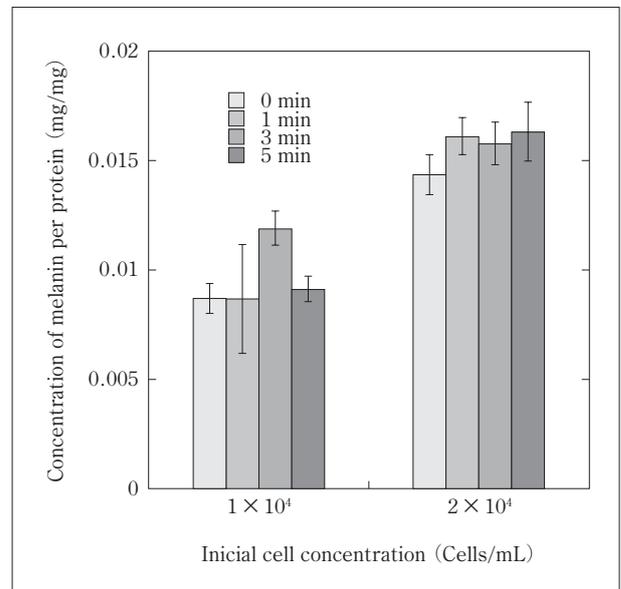


図10 UV-LED光照射に伴うメラニン産生量

## III.2 実験②

### III.2.1 緑色LED光照射によるメラニン産生量および細胞タンパク量

結果を表4に示しグラフにしたものを図14～図16に示す。B16メラノーマ細胞に緑色LED光(505 nm)を照射した際に、いずれの出力においてもメラニン生成率は対照と比較して有意に低い値を示し、メラニン生成抑制を認めた。なかでも最も出力の高い $11.5 \text{ mw/cm}^2$ 適用においては、細胞あたりのメラニン生成率についても対照と比較して有意に

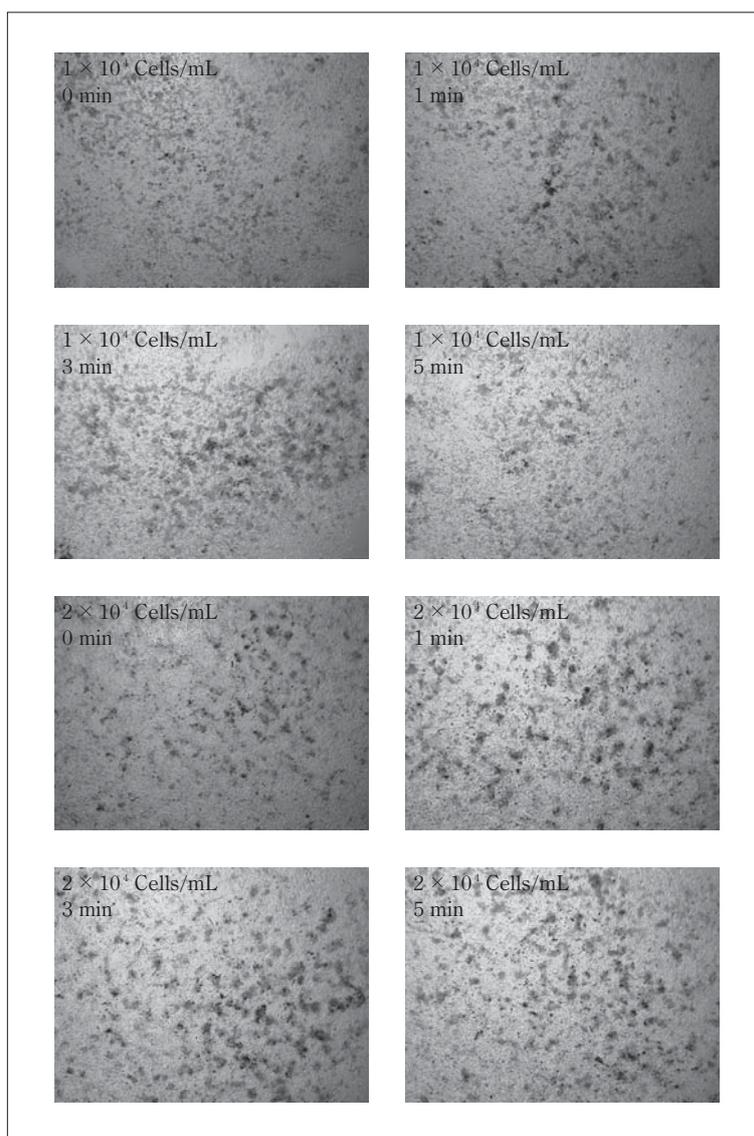


図 11 UV-LED 光照射に伴うメラニン産生状態 (倍率 : 2 倍)

低い値を示し、本条件の中では最も出力の高いものがよりメラニン生成能の抑制傾向がみられた。

#### IV. 考 察

本試験では緑色 LED の有用性を探るために B16 メラノーマ細胞におけるメラニン産生に及ぼす可視光線緑色 LED 光および紫外線 UV-LED 光の影響について検討した。

実験①では B16 メラノーマ細胞に 505 および 525 nm の緑色 LED 光を照射したところ、メラノーマ細胞の細胞数が減少し、メラニン産生量も減少した。さらに、この傾向は 505 nm の緑色 LED 光の方が顕著であった。385 nm の UV-LED 光では細胞生存数は減少するがメラニン産生は促進した。

実験②では 505 nm の緑色 LED 光の出力を変えてメラニン産生量を測定したところ、細胞生存率は減少しなかったが、メラニン産生量は減少した。

これにより本実験条件下において、細胞あたりのメラニン産生量との明確な関係性は明らかにならなかったが、505 nm の緑色 LED 光の照射により B16 メラノーマ細胞におけるメラニン産生が抑制されることが示された。

メラニンとはフェノール類物質の酵素的酸化によって形成される高分子化合物の色素で、主にヒトではフェオメラニンとユーメラニンが存在する。黄色のフェオメラニンと黒色のユーメラニンが混ざり合い、肉眼的に観察される色素として認識される<sup>6)</sup>。本来は、紫外線から肌を守るための肌の反応

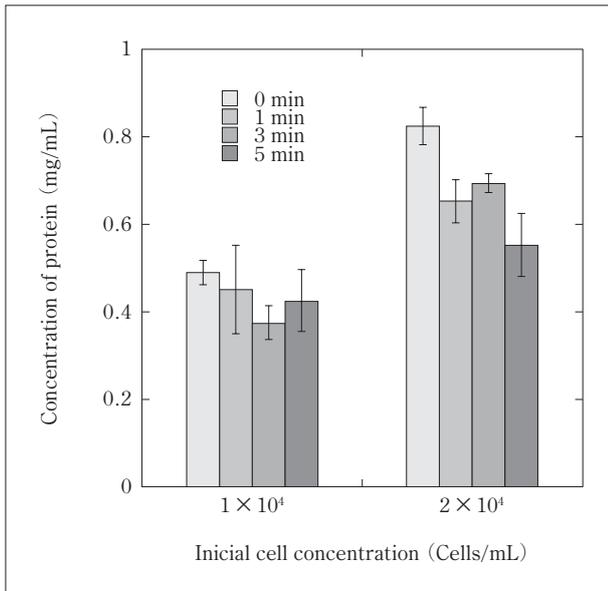


図 12 UV-LED 光照射に伴う細胞タンパク量

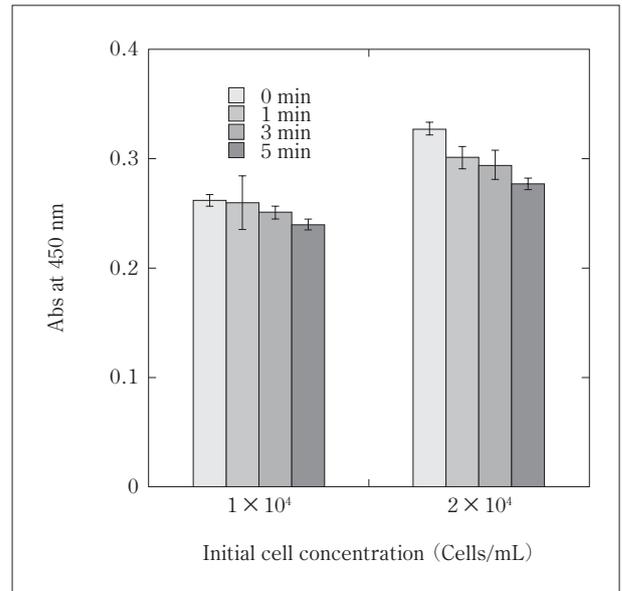


図 13 UV-LED 光照射に伴う細胞生存数

表 4 細胞生存率, メラニン生成率, 細胞あたりのメラニン生成率

条件	細胞生存率 (%)			メラニン生成率 (%)			細胞あたりのメラニン生成率 (%)		
	mean	s.d.	<i>P</i>	mean	s.d.	<i>P</i>	mean	s.d.	<i>P</i>
ブランク	—	—	—	—	—	—	—	—	—
対照	100.0	1.8	1.000	100.0	1.9	1.000	100.0	1.9	1.000
505 nm 0.5 mw/cm <sup>2</sup>	99.3	1.4	0.479	97.1	2.5	0.048	97.8	3.0	0.157
505 nm 1.0 mw/cm <sup>2</sup>	97.8	1.3	0.040	97.8	1.8	0.069	100.0	2.1	0.987
505 nm 4.0 mw/cm <sup>2</sup>	96.8	1.0	0.004	97.2	2.3	0.042	100.4	2.9	0.758
505 nm 7.0 mw/cm <sup>2</sup>	97.8	2.0	0.069	98.5	3.2	0.332	100.7	3.1	0.643
505 nm 11.5 mw/cm <sup>2</sup>	95.7	0.9	0.000	91.6	2.3	0.000	95.8	2.7	0.010

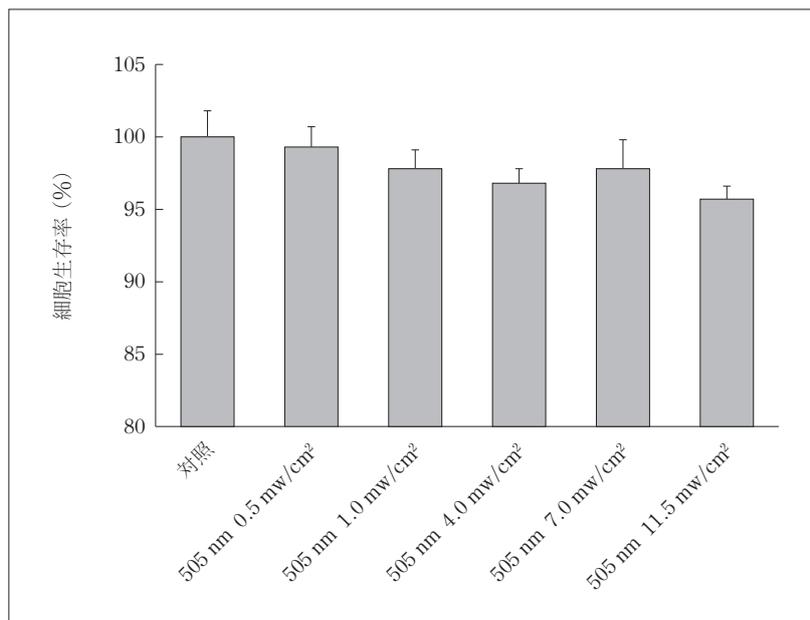


図 14 細胞生存率

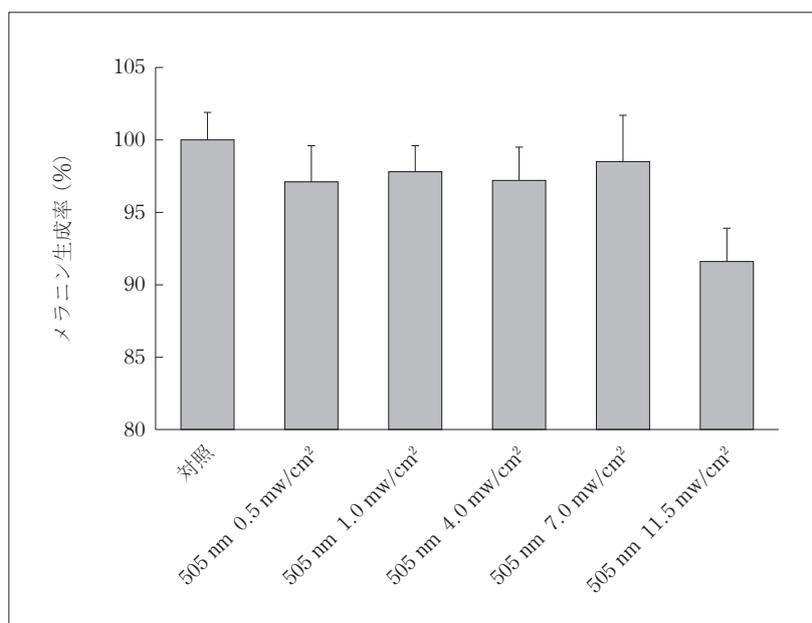


図 15 メラニン生成率

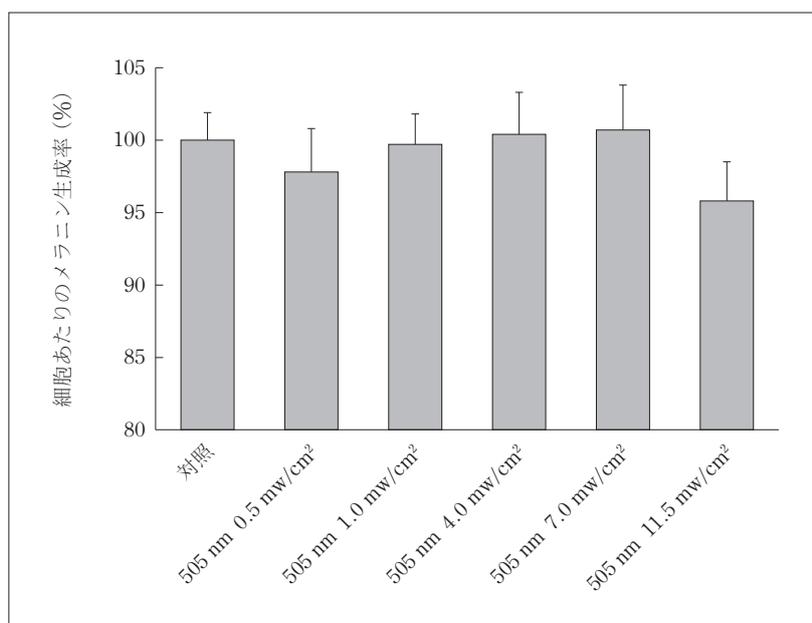


図 16 細胞あたりのメラニン生成率

であるが、メラニンの生成はシミ、そばかすなどの色素沈着につながり、白く美しい肌を好む日本人の価値観に反し、美容上の課題となっている。

メラニンの産生は、表皮の基底フェノール層付近に存在するメラノサイトの細胞内小器官であるメラノソームで行われる (図 17)。メラノソーム内では、出発物質 L-チロシンが銅含有酵素であるチロシナーゼによって酸化されて L-ドーパとなり、ドーパキノンへと代謝される。さらに、ドーパキノンが

酸化されインドール化合物に変化し、それらが互いに結合することで黒色のユーメラニンが合成される。また、システインが共存すると、ドーパキンはシステインと結合して 5-S-システニルドーパに変化し、これが重合して黄色のフェオメラニンが合成される<sup>2)</sup> (図 18)。

紫外線照射時にはケラチノサイトからメラニン産生を促進する様々なサイトカインやホルモンが分泌され、その中でも幹細胞因子 SCF (Stem cell

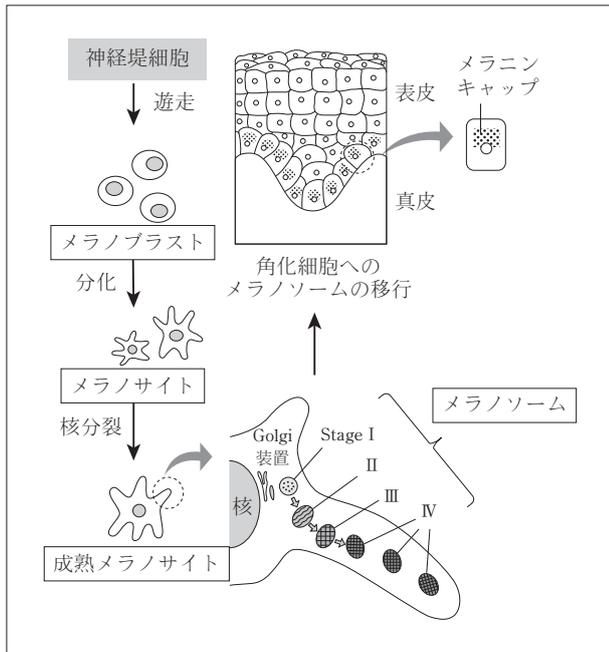


図 17 メラニンの形成過程<sup>1)</sup>

factor)<sup>7)</sup>,  $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone  $\alpha$ -MSH)<sup>8)</sup>, エンドセリン (endothelin)<sup>9)</sup>, プロスタグランジン (prostaglandin) は重要な役割を果たす<sup>10)</sup>。これらは、メラノサイトの増殖やそのアポトーシスの抑制、メラノサイトの樹状突起の伸長促進などに働き、メラニン産生を促進する。

なかでもメラノサイト刺激ホルモンである  $\alpha$ -MSH はメラノサイトのメラノコルチン1受容体 (melanocortin 1 receptor) を介しメラノサイトの増殖やメラニン生成を亢進することが知られている<sup>11)12)</sup>。本試験ではプレ試験としてメラニン生成に欠かせない  $\alpha$ -MSH の有効量を確認し、100 nm 濃度が適していると結果を得た。これは既存試験における結果にも一致し<sup>11)</sup>、本試験での緑色 LED 光のメラニン生成抑制を検討した試験における  $\alpha$ -MSH 濃度が適していたことも示唆している。

メラニンの生成を抑制するために使用される美白有効成分の作用機序ではアルブチンやコウジ酸などのメラニンの生成を促進するチロシナーゼを抑制する作用や、サリチル酸や AMP2Na に代表されるターンオーバーを活性化して色素を放出する作用などがある<sup>2)</sup>。IPL (インテンスパルスライト) によるシミ抑制の作用機序は光線照射により表皮ケラチノサイトの破壊、基底細胞からの表皮ターンオー

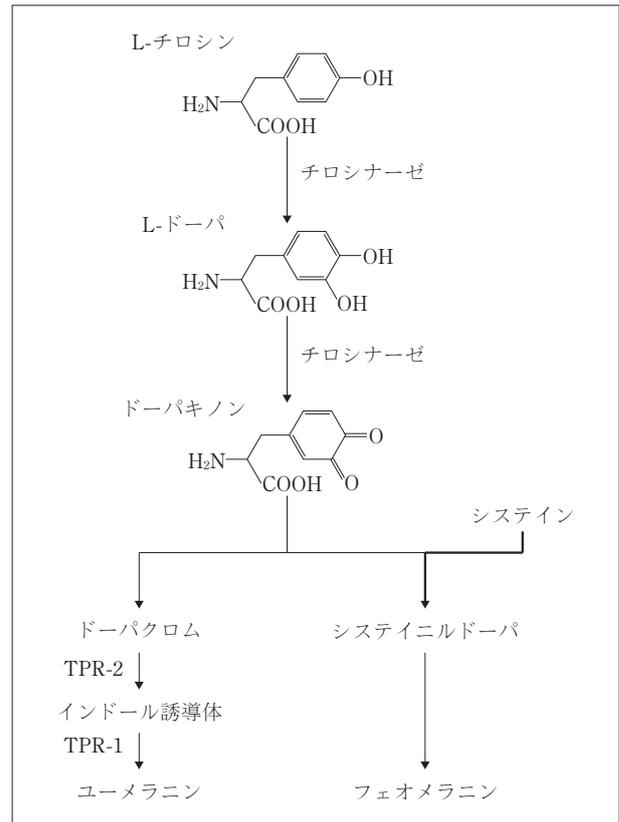


図 18 メラニンの生合成<sup>1)</sup>

バーの亢進、メラノソームの上方へのトランスファーが高まりメラニンが排出されやすくなるなどが報告されている<sup>2)13)</sup>。すなわち、シミ抑制に対して非侵襲的、非切除的方法であると期待されている<sup>14)15)</sup>。また、他方、LED 照射におけるシミ抑制も UVR (ultraviolet rays) 照射と比較して、DNA 損傷や細胞アポトーシスの増加などを伴わずにメラニンの生成を刺激できるという報告<sup>16)</sup>がある。これは、UVR を照射すると一重項酸素を生成し、生体分子に酸化的損傷を引き起こすため、DNA 損傷や細胞アポトーシスが生じそれが原因となってメラニンの色素沈着が起こるが、赤、青、緑などの LED を照射したときは DNA 損傷や細胞アポトーシスの増加を伴わず皮膚保護のためのメラニン産生に寄与するため、色素沈着を抑制するという点である。また、DNA 損傷や細胞アポトーシスの増加を伴わないという点は、実験②にて照射の出力に比例して細胞生存率が減少しなかったことでも確認できた。しかし実験①では UVR 照射時より少ないものの細胞生存率が減少していることから、緑色 LED は酸化的損傷を完全に防御するものではなく、あくまで

も抑制するものであることを示唆している。

また細胞死だけではメラニン産生量の減少は説明できないため、緑色LEDの照射によりメラニンの産生を抑制するなんらかの機序が働いていることが推察される。詳細にはいまだ解明されていないが、IPLによる表皮ケラチノサイトの破壊、表皮ターンオーバーの亢進、メラノソームの上方へのトランスファーの促進などがLED照射においても起こっていることが推察される<sup>15)</sup>。

LEDの波長の違いについては、LEDは青色(450 nm)から赤色(700 nm)までの波長の違いで人皮膚細胞における影響が異なることが多く報告<sup>15)</sup>されている。赤色(633 nm)では日光角化症患者の方への光線力学療法や、紫斑紅斑の治療にも用いられ<sup>17)</sup>ている。黄色(590 nm)では光老化皮膚色素沈着、紅斑、しわの改善に用いられ<sup>18)19)</sup>、また青色(470 nm)ではマウスB16メラノーマ細胞において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いう報告<sup>4)</sup>がある。また、モルモットの背にUVB光と青色LED光を照射した際に青色LED光がメラニンの生成を抑制するという報告<sup>5)</sup>や、青色光(450 nm)がB16F10メラノーマ細胞の増殖を阻害し、S期細胞の割合を減少させるという報告<sup>20)</sup>もある。

同様に本試験で用いた緑色LED光についても、緑色LED光(532 nm)がB16F10メラノーマ細胞の細胞生存率を30%引き起こし、平均腫瘍サイズ(TAS)を20%減少させ、メラノーマの増殖を防ぐことが報告<sup>21)</sup>されている。このようにLEDの光の色(波長)においても作用機序が異なり、今回同じ緑色LED光であっても試験①で505 nmと525 nmで比較したところ、505 nmでより効果があるという結果が得られた。いままであまり緑色LED光におけるメラニン産生抑制は研究されてこなかったが、本試験において505～525 nmの緑色LED光にもメラニン産生抑制がみられたことは今後肌の光老化対策における光治療の幅を広げたといえるだろう。しかし細胞あたりのメラニン生成率と照射出力や波長との明確な相関性は今回の試験では認められなかったことから、今後さらなる照射出力や波長の違いによるメラニン生成抑制能への影響を検討することが課題として残された。

## V. 総 括

B16メラノーマ細胞に505および525 nmの緑色LED光を照射したところ、照射に伴いメラニン産生量が減少した。385 nmのUV-LED光を照射するとメラニン産生量が増加していることから、紫外線により増加するメラニン産生量は緑色LED光(とくに505 nm)の可視光線を照射することによりメラニン産生量を抑制することが示された。

## 参 考 文 献

- 1) 清水 宏: あたらしい皮膚科学 第3版. pp. 10-12, 中山書店, 東京, 2018.
- 2) 田中 浩: 美白製品とその作用. 日本化粧品学会誌 2019; **43**: 39-43.
- 3) 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. *Aesthetic Dermatology* 2009; **19**: 39-44.
- 4) 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 guinea-pigs. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2004; **20**: 86-92.
- 5) Ohara M, Kawashima Y, Katoh O, et al: Blue light inhibits the growth of B16 melanoma cells. *Jpn J Cancer Res* 2002; **93**: 551-558.
- 6) 伊藤祥輔, 柴原茂樹, 錦織千佳子 監修: 色素細胞 第2版—基礎から臨床へ—. 第11章, 慶應義塾大学出版会, 東京, 2015.
- 7) Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M: Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes. Cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase c-kit receptor. *J Biol Chem* 2000; **275**: 33321-8.
- 8) Kadokaro AL, Kavanagh R, Kanto H, et al:  $\alpha$ -Melanocortin and Endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. *Cancer Res* 2005; **65**: 4292-9.
- 9) Imokawa G, Miyagishi M, Yada Y: Endothelin-1 as a new melanogen: Coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. *J Invest Dermatol* 1995; **105**: 32-7.
- 10) 赤坂英二郎, 中野 創, 神 可代, 他: 紫外線防御機構におけるメラノサイト, ケラチノサイトのエンドセリン-1/幹細胞因子を介した相互作用. 弘前医学 2011; **62**: 138-43.
- 11) Abdel-Malek Z, Swope VB, Suzuki I, et al: Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A 1995; **92**: 1789-93.
- 12) Suzuki I, Cone RD, Im S, et al: Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 1996; **137**: 1627-33.
  - 13) 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* 2006; **126**: 2281-6.
  - 14) Sadick NS, Weiss R, Kilmer S, et al: Photorejuvenation with intense pulsed light: results of a multi-center study. *J Drugs Dermatol* 2004; **3**: 41-9.
  - 15) 森脇真一, 小谷麻由美, 櫛原維華, 他: 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. *Aesthetic Dermatology* 2010; **20**: 288-94.
  - 16) Moreiras H, O'Connor C, Bell M, et al: Visible light and human skin pigmentation: The importance of skin phototype. *Exp Dermatol* 2021; **30**: 1324-31.
  - 17) Trelles MA, Allones I: Red Light-emitting diode (LED) therapy accelerates wound healing post-blepharoplasty and periocular laser ablative resurfacing. *J Cosmet Laser Ther* 2006; **8**: 39-42.
  - 18) 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* 2005; **36**: 85-91.
  - 19) Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, et al: Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg* 2005; **31**(9 Pt 2): 1199-205.
  - 20) Sparsa A, Faucher K, Sol V, et al: Blue Light is Phototoxic for B16F10 Murine Melanoma and Bovine Endothelial Cell Lines by Direct Cytocidal Effect. *Anticancer Res* 2010; **30**: 143-147.
  - 21) Haussmann PB, Pavani C, Marcolongo-Pereira C, et al: Melanin photosensitization by green light reduces melanoma tumor size. *J Photochem Photobiol* 2022; **9**:100092.
-