

青色光照射の尋常性痤瘡への治療効果と
発生する活性酸素種の研究

なかやま えいこ
中山 瑛子

(救急医学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度

青色光照射の尋常性痤瘡への治療効果と発生する活性酸素種の研究

目次

第1章 緒言	頁
1.1 はじめに	1
1.2 尋常性痤瘡に対する青色光治療	2
1.3 本研究の意義と目的	3
第2章 青色光照射の尋常性痤瘡への治療効果とその安全性、治療メカニズムについての検討	
2.1 背景と目的	3
2.2 方法	6
2.2.1 青色光の照射	6
2.2.2 尋常性痤瘡モデルの作製	6
2.2.3 尋常性痤瘡膿瘍腔内に生じた囊腫壁の厚さの計測	7
2.2.4 炎症性サイトカイン量の計測	8
2.2.5 Cleaved caspase-3 免疫染色によるアポトーシスの評価	9
2.2.6 ATP 可視化マウスによる皮膚 ATP 量の観察	10
2.2.7 ホタルルシフェラーゼ発光法による皮膚組織中 ATP 量の計測	11
2.2.8 青色光の前方透過率の計測	12

2.2.9 統計分析	13
2.3 結果	13
2.3.1 尋常性痤瘡の破裂	13
2.3.2 尋常性痤瘡膿瘍腔内に生じた囊腫壁の厚さの計測	14
2.3.3 炎症性サイトカイン量の計測	14
2.3.4 Cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞数の計測	15
2.3.5 ATP 可視化マウスによる青色光照射前後の皮膚 ATP 量の比較	15
2.3.6 ATP 可視化マウスによる皮膚 ATP 量の経時的観察	15
2.3.7 ホタルルシフェラーゼ発光法による皮膚 ATP 量の計測	15
2.3.8 青色光の前方透過率	16
2.4 考察	16
2.4.1 尋常性痤瘡への青色光照射の治療効果について	16
2.4.2 青色光の 5 日間連日照射の安全性について	18
2.4.3 青色光の組織深達度について	19
2.5 小括	20

第3章 マウス線維芽細胞に対する青色光の照射によって生じる活性酸素種の計測

3.1 背景と目的	21
-----------	----

3.2	方法	22
3.2.1	青色光の照射	22
3.2.2	細胞培養	22
3.2.3	活性酸素種・活性窒素種の計測	23
3.2.4	Superoxide dismutase 活性の計測	24
3.2.5	細胞生存率の計測	25
3.2.6	統計分析	25
3.3	結果	26
3.3.1	活性酸素種・活性窒素種の計測	26
3.3.2	Superoxide dismutase 活性の計測	27
3.3.3	細胞生存率の計測	27
3.4	考察	27
3.5	小括	29
第4章	総括	30
第5章	結論	32

謝辞	33
略語一覧	34
付記	36
引用文献	37
図表	44

第1章 緒言

1.1 はじめに

尋常性痤瘡の有病率は世界人口において 9.38 %と推定されている(1)。青年期の約 80%が罹患し、後遺症として陥凹や色素沈着を残すこともあり、大きな心理的苦痛の原因となる(2, 3)。尋常性痤瘡の発生メカニズムは完全には解明されていないが、角化異常や、アンドロゲンホルモン分泌による皮脂分泌の増加、*Cutibacterium acnes* (*C.acnes*) の増殖および炎症が主な原因とされている(4)。尋常性痤瘡の評価方法については、病変の数や生活の質による重症度分類や、形態に着目した分類などこれまで 25 種類以上存在し、国際的に統一された方法はない(5, 6)。しかし、一般的に尋常性痤瘡の形態においては表 1 に示すような分類が使用されることが多い(7, 8)。

本邦における尋常性痤瘡に対する治療は、殺菌作用と弱い角質剥離作用を持つ過酸化ベンゾイルや、表皮角化細胞の分化を抑制するアダパレンの外用、抗菌薬の内服・外用が一般的である(8)。しかし、高度の炎症を伴った病変にはこれらの効果は限定的である上、過酸化ベンゾイルやアダパレン外用剤は皮膚刺激感が強く、乾燥落屑の副作用がある。加えて、アダパレン外用剤は、妊娠中・授乳中には使用できない(8-10)。また、尋常性痤瘡に対する抗菌外用剤として頻繁に使用されているクリンダマイシンには、本邦の *C. acnes* 株の 50 %以上が耐性を持つと報告されている(11)。さらに、経口抗生物質は菌の耐性化を防ぐ目的で、3 ヶ月以内の内服が推奨されており、長期使用がで

きない(12)。そのため、低侵襲かつ有効で、長期使用可能な、抗菌薬に頼らない新たな治療法の確立が求められている。

1.2 尋常性痤瘡に対する青色光治療

皮膚に対する光治療においては、母斑や血管病変に対するレーザー治療や、尋常性乾癬に対する紫外線療法、光線力学的療法（Photodynamic Therapy：PDT）など様々なものが存在する(13, 14)。その中でも、400～500 nm の青紫～青色光照射は、尋常性痤瘡や尋常性乾癬、湿疹などに効果があるとされている(15-17)。

青色光による尋常性痤瘡治療の作用メカニズムとして現在考えられているのは、*C.acnes*の代謝によって生成されるプロトポルフィリンIXやコプロポルフィリンIIIが、青色光照射によって一重項状態に励起されてから基底状態に戻る際に、種々の活性酸素種（Reactive Oxygen Species：ROS）を発生させ細菌を破壊する、というものである(18-20)。ポルフィリンは光の吸収ピークの1つを波長408 nm周辺に持つため(19) (図1)、多くの研究者はその周辺波長の青色光を用いてその有効性を報告している。

一方、青色光を皮膚に照射するとROSが発生し、酸化ストレスを与えることがわかっている(21-23)。つまり、青色光の過剰な照射は、正常組織に老化や癌化等の悪影響を及ぼす可能性がある。しかし、現状では至適な照射プロトコル（照射する波長・密度・時間・頻度・期間など）が定まっておらず、機器メーカーや施術者、患者本人の裁量で、

経験的な治療が行われているといっても過言ではない。よって、低侵襲かつ効果的な青色光治療を行うためには、適切な照射プロトコルの究明が喫緊の課題となっている。

1.3 本研究の意義と目的

光照射療法は、患部に光を照射するだけの低侵襲治療であり(24)、他の既存療法との併用も容易である。したがって、青色光の尋常性座瘡への適切な照射プロトコルが確立されることは、疾患に悩む患者にとって福音となる。

そこで、安全で効率的な治療プロトコル作成の基盤づくりを目的として、青色光の照射をどのような条件で行うのが適しているのかを明らかにするために、動物実験によって尋常性座瘡に対する青色光治療の効果を評価し、さらにその安全性について研究した。また、青色光によって起きる細胞応答や、発生する ROS を計測するための細胞実験を行った。

第2章 青色光照射の尋常性座瘡への治療効果とその安全性、治療メカニズムについての検討

2.1 背景と目的

尋常性座瘡は患者数が多いため商業的にも高い注目を集めており、照射デバイスの開発が盛んである(25)。既に広く市販されている家庭用デバイスは、多くの場合1日1～2回、合計20～60分、4～5週間照射する(24, 26)。しかし、その照射方法については、1箇所にとどまって照射することが指示されていたり、絶えず動かすように指示され

ていたり様々である。一方、クリニック用デバイスの照射については週に2～3回、6～12週間、顔全体に行われることが多い(24)。また、照射密度 (mW/cm^2) に関しては、家庭用デバイスで3～30 mW/cm^2 、クリニック用デバイスでは40～150 mW/cm^2 で行われている(27)。つまり、その照射プロトコルについては非常にバリエーションに富んでいる。そのため、既に複数のランダム化比較試験で、尋常性痤瘡に対する青色光治療の有効性が示されているにも関わらず(28, 29)、システマティックレビューやメタアナリシスが行われると各研究の観察期間の短さや、照射プロトコル・評価方法の不統一さによって、その有効性に関する評価は限定的なものになってしまう(24, 30)。また、過去に報告された臨床研究をみると、どの研究においても、十分な効果が得られない患者が存在している(31)。その結果、青色光治療は、エビデンス不足として尋常性痤瘡治療ガイドライン等で未だ推奨が得られていない(5, 8)。

以上を踏まえ、青色光照射による尋常性痤瘡治療の普及とその安全使用には、照射方法について、根拠ある詳細な検討が必要だと考えた。それには動物モデルを用いて、治療対象を均一化し、ヒトでは困難な組織のサンプル採取による評価が有効であると考えた。また、*C. acnes*の複製サイクルは4～5時間であるため、その増殖速度を考えると(32-34)、現在クリニックで行われている週に2～3回の照射頻度では不十分であり、毎日の照射が必要だと考えた。

まず、青色光の適切な照射方法を検討するために、複数の照射条件（照射密度・照射

時間)を試し、尋常性痤瘡の破裂の有無についての観察や、病理組織学的評価、炎症性サイトカイン量の計測を行った。

次に、本研究で設定した照射条件の安全性評価を目的として、アポトーシスを検出する cleaved caspase-3 免疫染色を行った。

また、細胞内 ATP 量は、ミトコンドリア機能や細胞代謝活性と関連するため、安全性の指標となる(35)。我々のグループは、細胞内の ATP 量を可視化できる遺伝子組み換えマウスを所有しているため、このマウスを用いて、青色光照射によって皮膚 ATP 量がどのように変化するのか観察した。また、これまで組織の ATP 量の計測において多くの報告があるホタルルシフェラーゼ発光法を用いて、前述のマウスを使用して得られた実験結果と矛盾がないか検証した。

また、青色光の組織深達長は、1 mm 以下と、赤色光や近赤外光と比較すると浅いことが知られている(36)。本研究で作製した尋常性痤瘡モデルにおける膿瘍は、上端が皮膚表面から 500 μ m、下端は 1500 μ m の深さであるため、青色光はこの膿瘍深部においてはかなり減衰していると考えられた。しかし、「2.3 結果」で後述するように、青色光はこの尋常性痤瘡モデルの炎症を抑制した。そこで、青色光の尋常性痤瘡への深達度の検証が、治療メカニズムの解明と、至適照射プロトコルの探究に役立つと考え、青色光の尋常性痤瘡への透過率について計測した。

2.2 方法

すべての動物実験は、ARRIVE ガイドラインを遵守し、防衛医科大学校の関連指針および規則に従って実施された。研究プロトコルは防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を受け実施した（承認番号 19010、20020）。

2.2.1 青色光の照射

全ての実験に、波長 415 nm の Light Emitting Diode (LED) (M415L; ソーラボジャパン、東京、日本) を使用した。マウスへの照射は、コリメートレンズアダプター (SM1P25-A; ソーラボジャパン) を介して行い、照射領域は一辺が 15mm の正方形とした。

2.2.2 尋常性痤瘡モデルの作製

10 週齢の雌の Hos:HR-1 マウス (HR-1; 株式会社 SLC、日本、浜松市) を使用した。すべての実験はケタミン/キシラジン (80 mg/kg - 10 mg/kg) の腹腔内投与による全身麻酔下で行った。

HR-1 マウスを用いた尋常性痤瘡モデルマウスは、Jang らの報告(37)に従って作製した。*C. acnes* は NBRC107605 株 (独立行政法人製品評価技術基盤機構、東京、日本) を使用した。対数増殖期の *C. acnes* を Gifu Anaerobic Medium (GAM) Broth (ニッスイ、東京、日本) を用いて、37°C の嫌気条件下で培養した。*C. acnes* を 3,000 rpm、

5 分間の遠心分離後、GAM Broth で 3 回洗浄し、同培地中に 10^8 colony forming units (CFU) /mL の濃度になるように調整した。この *C. acnes* 懸濁液 50 μ L を 30 ゲージ針を用いて HR-1 マウスの皮膚背部に皮下注射した。なお、調整した懸濁液は、寒天培地 GAM Ager (ニッスイ) を用いて、後日コロニーカウントにより菌数を確認した。*C.acnes* を接種してから 5 日後には、皮膚表面が直径約 8 mm 隆起し、約 5 mm の膿瘍を有する、表 1 によると囊腫と分類される尋常性痤瘡モデルが形成された (図 2)。なお、経過中、潰瘍形成や排膿を認めたものを「破裂」と判断した。また、ヘアレスマウスの皮膚は約 500 μ m で、ヒト頬部の 1 mm と比較し薄い(38, 39)。そのため *C. acnes* は皮下に接種してヒトの真皮内に存在する皮脂腺の深度、つまり尋常性痤瘡の発生部位と合わせた。

2.2.3 尋常性痤瘡膿瘍腔内に生じた囊腫壁の厚さの計測

C. acnes 注射後、直ちに以下の条件で青色光を 1 日 1 回を 5 日間、連日照射した。照射条件は、(1) コントロール (照射なし)、(2) 100 mW/cm², 20 分, 120 J、(3) 100 mW/cm², 10 分, 60 J、(4) 30 mW/cm², 20 分, 36 J、(5) 30 mW/cm², 10 分, 18 J とした。すべての実験群は、1 群あたり 5 匹のマウスで構成され、最終照射日 (5 日目) にサンプルを採取する群を 5 日目採取群、その 72 時間後 (8 日目) に採取する群を 8 日目採取群とした (図 3)。周囲の皮膚を含む尋常性痤瘡組織を採取し、標準プロトコル

に従ってヘマトキシリン・エオジン染色を行った。また、マクロファージ検出を目的として一次抗体に Anti-F4/80 抗体 (SP115 ; abcam、Cambridge、United Kingdom) を使用した免疫染色、好中球の検出を目的として、一次抗体に Anti-Ly6G 抗体 (EPR22909-135 ; abcam) を使用した免疫染色を標準プロトコルに従って行った。

顕微鏡 (BZ-900 ; キーエンス、大阪、日本) と画像統合ソフトウェア (BZ-2 Analyzer ; キーエンス) を使用して、尋常性座瘡膿瘍腔に発生した壁様組織 (囊腫壁) の最も厚い部分の長さを計測した。

2.2.4 炎症性サイトカイン量の計測

炎症性サイトカイン量の計測は、Wang らの報告(40)を参考に行った。*C. acnes* を注射した後に、2.2.3 囊腫壁の厚さの計測と同じ照射条件で、青色光を 1 日 1 回 5 日間連日照射し、5 日目と 8 日目に尋常性座瘡を中心とした組織を 8 mm 生検トレパン (貝印、東京、日本) を用いて採取した。対照群として、正常な皮膚に同様の照射条件で 5 日間連日青色光を照射し、5 日目に組織を採取した。すべての実験群は、1 群あたり 5 匹のマウスで構成した。採取した組織に非変性緩衝液 Lysis Buffer 17 (R&D systems、MN、USA) を溶解バッファーとして加え、組織ホモジナイザー (Bullet Blender Storm 24 ; Next Advance, Inc、NY、USA) で 5 分間処理した。得られた懸濁液を 10,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離して上清を得た。上清中のインターロイキン (Interleukin : IL) -1 β 、IL-6、マクロファージ炎症性タンパク質 (Macrophage inflammatory protein : MIP)

-2、および腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor : TNF) - α の濃度を、Mouse Quantikine ELISA Kit (R&D systems) を用いて、製造者の示す手順に従って計測した。各サンプル中の総タンパク質濃度 (mg/mL) を TaKaRa BCA protein assay kit (TaKaRa Bio、滋賀、日本) を用いて計測し、炎症性サイトカイン濃度 (ng/mL もしくは pg/mL) を総タンパク質濃度で正規化した。

2.2.5 Cleaved caspase-3 免疫染色によるアポトーシスの評価

HR-1 マウスに *C. acnes* を接種した後に青色光を照射し、2.2.3 囊腫壁の厚さの計測と同じ照射条件で青色光を 1 日 1 回 5 日間連日照射し、5 日目に周囲の皮膚を含む膿瘍組織を採取した。すべての実験群は、1 群あたり 5 匹のマウスで構成した。対照群として、マウス背部の正常な皮膚に同じ照射条件で青色光を 5 日間連日照射し、5 日目に組織を採取した。Cleaved caspase-3 免疫染色は、1 次抗体として Cleaved caspase-3 抗体 (Cell Signaling, MA, USA) を使用し、標準プロトコルに従って行った。各標本は顕微鏡 (BZ-9000) と画像統合ソフトウェア (BZ-2 Analyzer) を使用して評価した。青色光を照射した皮膚 (表皮および真皮) の中央から水平方向 8 mm における cleaved caspase-3 染色陽性細胞数を計測し、計測した面積 (mm²) で除した。

2.2.6 ATP 可視化マウスによる皮膚 ATP 量の観察

遺伝子組み換えマウス「GO-ATeam マウス」(京都大学 山本正道 博士より供与)

は、C57BL/6 マウス（日本エスエルシー株式会社、日本、浜松）に GO-ATeam タンパク質とよばれる蛍光共鳴エネルギー移動（Fluorescence Resonance Energy Transfer：FRET）バイオセンサーを発現させており、細胞内の ATP 量をイメージングすることができる。FRET は、2 つの蛍光物質の間で距離と相対角度に応じて励起エネルギーが移動する物理現象で、タンパク質の構造変化やタンパク質間の相互作用を計測する方法として利用されている。図 4 に示すように、GO-ATeam タンパクは、Green Fluorescent Protein（GFP）の変異体 cp173-mEGFP（EGFP）（488/509=励起/発光波長）と Orange Fluorescent Protein（OFP）のバリエーションである mKusabira Orange kappa（mKO κ ）（548/555=励起/発光波長）を枯草菌 F₀F₁-ATP 合成酵素の ϵ サブユニットで連結している(41)。ATP 存在下では mKO κ の蛍光が観察され、ATP 量が減少すると EGFP の蛍光が観察される。

各マウスの腹部は実験の前日に剃毛した。IVIS Lumina XR in vivo imaging system（PerkinElmer Inc.、MA、USA）に付属する麻酔装置を用いて、2 %濃度のイソフルラン（MSD Animal Health、NJ、USA）でマウスに全身麻酔をかけ、仰臥位で腹部に青色光を照射した。

青色光照射前後の FRET 比の比較においては、マウスは 1 群あたり 5 匹の 4 群に分け、(1) 100 mW/cm², 20 分, 120 J、(2) 100 mW/cm², 10 分, 60 J、(3) 30 mW/cm², 20 分, 36 J、(4) 30 mW/cm², 10 分, 18 J の照射を行い、照射前後の蛍光画像を IVIS

Lumina XR イメージングシステムを用いて取得した。

28 日間の経時的観察においては、(1) 100 mW/cm², 20 分, 120 J、(2) 100 mW/cm², 10 分, 60 J、(3) 100 mW/cm², 3 分, 18 J、(4) 30 mW/cm², 20 分, 36 J、(5) 30 mW/cm², 10 分, 18 J、(6) 30 mW/cm², 3 分, 5.4 J の照射を行った。照射直前、照射直後、照射後 1 日目、7 日目、14 日目、21 日目および 28 日目に蛍光画像を取得した。

全ての蛍光画像は Living Image ソフトウェア (PerkinElmer Inc.) を使用して照射部位の蛍光輝度を求め、それを元に FRET 比を解析した。FRET 比は以下のように算出した。

FRET 比 = (mKO κ 蛍光輝度 / EGFP 蛍光輝度)

mKO κ 蛍光画像は 480/570=Excitation/Emission フィルター、EGFP 蛍光画像は 480/520=Excitation/Emission フィルターを用いて取得した。

2.2.7 ホタルルシフェラーゼ発光法による皮膚組織中 ATP 量の計測

C57BL/6 マウス (日本エスエルシー株式会社) を用いて実験を行った。腹部は、実験の前日に剃毛した。マウスを 2 %イソフルランを用いて麻酔し、仰臥位で腹部に青色光を照射した。マウスは 1 群あたり 5 匹の 2 群に分け、100 mW/cm² または 30 mW/cm² の照射密度でそれぞれ 20 分間照射した。なお、同じマウス腹部の左右反対側を無照射サンプルとした (コントロール群)。青色光照射終了後、直ちに皮膚組織 (5×5 mm) を採取し、生理食塩水で洗浄後、0.1% Triton X-100 (MP Biomedicals, CA, USA)

を含むリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS) (14190144 ; Thermo Fisher Scientific) 内で、剪刀を用いて細切した。その混濁液を 15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した後、上清を回収した。ATP 量の計測には、Tissue ATP assay Kit (TOYO B-Net、東京、日本) を使用した。製造元の示す手順に従ってサンプルを処理し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax iD5 ; モレキュラーデバイスジャパン、東京、日本) を用いて発光量を解析した。TaKaRa BCA protein assay kit を用いて各試料の総タンパク質濃度 (mg/mL) を計測し、ATP 濃度 (nmol/mL) を総タンパク質濃度で正規化した。ATP 量は nmol/mg protein で表した。

2.2.8 青色光の前方透過率の計測

光を皮膚に照射すると、反射や散乱、吸収などが起き、一部のみが前方に進む(36)。今回は前方位置における光強度を計測したため、前方透過率の計測とした。計測方法は、Kampa らの報告(42)を参考に行った (図 5 a)。

HR-1 マウスの背部に *C. acnes* を接種後、5 日目に尋常性痤瘡膿瘍内容物と尋常性痤瘡皮膚を採取した。尋常性痤瘡膿瘍内容物を、10、20、50 μm の厚さで石英セル (Type20C ; Starna Scientific Ltd, Essex, United Kingdom) で挟み、光を照射した (図 5 b)。また、尋常性痤瘡皮膚サンプルをスライドガラスに載せ、①正常皮膚全層、②尋常性痤瘡全層、③尋常性痤瘡膿瘍を除去した皮膚、に光を照射した (図 5 c)。

組織を透過した光を、フォトダイオードセンサー (PD300 ; Ophir Optonics、

Jerusalem, Israel) に接続したパワーメーター (Nova II ; Ophir Optonics) で計測した。青色光を石英セルのみに照射して透過したパワー (mW) を前方透過率 100 %とし、尋常性座瘡膿瘍内容物を挟んで透過したパワーの割合 (%)、すなわち前方透過率を算出した。また同様に、スライドガラスのみに照射して透過したパワーを 100 %とし、皮膚サンプルを透過した前方透過率を算出した。青色光の照射密度は 30 mW/cm² および 100 mW/cm² とした。

2.2.9 統計分析

統計解析は、JMP Pro 15 ソフトウェア (SAS Institute Japan、東京、日本) を用いて行った。複数群間の比較 (囊腫壁の厚さ・炎症性サイトカイン量・cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞数・FRET 比による皮膚 ATP 量の比較) については、Kruskal-Wallis 検定、Dunnett の多重比較検定を用いてデータを分析した。2 群の比較 (ホタルルシフェラーゼ発光による ATP 量・前方透過率の各照射密度間の比較) には両側 t 検定を用いた。P 値<0.05 を統計的に有意とした。

2.3 結果

2.3.1 尋常性座瘡の破裂

5 日目採取群においては、全ての尋常性座瘡において破裂は認められなかったが、8 日目採取群では、コントロール(無照射)群、100 mW/cm², 10 分照射群、30 mW/cm²,

10 分照射群において、いずれも 5 匹中 3 匹の膿瘍が破裂した（表 2, 図 2, 図 6）。

2.3.2 尋常性座瘡膿瘍腔内に生じた囊腫壁の厚さの計測

尋常性座瘡膿瘍の周囲には菌塊を取り囲むような組織（囊腫壁）が発生した（図 6）。

これについて好中球及びマクロファージの局在を免疫染色により観察したところ、
100 mW/cm², 20 分照射群などの囊腫壁が肥厚したものについては、特に表皮側において、壁内側に好中球、外側にマクロファージの浸潤が見られた（図 7 a）。しかし無照射群の囊腫壁には、マクロファージはほとんど存在しなかった。破裂したサンプルにおいては、表皮側の囊腫壁が菲薄化し、好中球が皮下筋を穿破して皮下脂肪層・皮膚へと浸潤していた（図 7 b）。

100 mW/cm², 20 分を連日照射した 5 日目の囊腫壁の厚さを計測すると、無照射群に比べ有意に増加した（図 8 a）。しかし、囊腫壁の厚さは、最終照射から 72 時間後の 8 日目採取群において、5 日目採取群と比較して全ての照射条件で減少した（図 8 b）。

2.3.3 炎症性サイトカイン量の計測

背部に尋常性座瘡を作製したマウスに 100 mW/cm², 20 分の青色光を 5 日間連日照射し、5 日目にサンプル採取した群（5 日目採取群）の IL-1 β 、MIP-2、TNF- α のサイトカイン量は無照射群と比較して有意に抑制された（図 9 中央）。しかし、最終照射

から 72 時間後の 8 日目採取群では、IL-1 β 、MIP-2、TNF- α のサイトカイン量は全ての照射条件で 5 日目採取群と比較して増加する傾向がみられた（図 9 右）。

2.3.4 Cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞数の計測

すべての照射条件において、表皮・真皮層における単位面積当たりの Cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞数の有意な増加は観察されなかった（図 10,11）。なお、陽性細胞のほとんどが真皮層に存在していた。

2.3.5 ATP 可視化マウスによる青色光照射前後の皮膚 ATP 量の比較

いずれの照射条件においても、青色光照射部位の FRET 比は照射前後で比較して有意に低下した（図 12,13）。

2.3.6 ATP 可視化マウスによる皮膚 ATP 量の経時的観察

青色光を照射した部位では、照射直後にすべての照射条件で FRET 比の低下がみられた（図 14）。特に 100 mW/cm² で 20 分照射した群では、照射前の FRET 比に回復するまで 28 日間を要した。

2.3.7 ホタルルシフェラーゼ発光法による皮膚 ATP 量の計測

青色光を照射した部位の皮膚 ATP 量をホタルルシフェラーゼ発光法で計測したとこ

ろ、100 mW/cm², 20 分間照射した皮膚の ATP 量は有意に減少した (図 15)。

2.3.8 青色光の前方透過率

石英セルに挟み込んだ尋常性痤瘡膿瘍内容物が厚くなるほど前方透過率は低下し、50 μ m の厚さで約 55 %透過した (図 16 a)。また、尋常性痤瘡皮膚全層において、青色光の前方透過率は 1 %未満であったが、膿瘍上までは、およそ 5 %透過していた (図 16 b)。いずれも照射密度による有意な差は見られなかった。

2.4 考察

2.4.1 尋常性痤瘡への青色光照射の治療効果について

尋常性痤瘡の炎症の程度は IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α などのサイトカイン量と相関することが知られている (43, 44)。なお、今回の実験において ELISA 法を用いて計測した MIP-2 は、ヒト IL-8 のホモログである。

尋常性痤瘡の菌塊を取り囲むように生じた囊腫壁において、特に肥厚しているものについては、内側は好中球、外側はマクロファージが浸潤していることが観察された。なお、無照射群においてはマクロファージ層がほとんど見られず好中球が主に観察されたことから、マクロファージは主に、好中球による殺菌が済んだ箇所の後処理を行っていると考えられた。つまり、囊腫壁の肥厚は、好中球及びマクロファージによる

C.acnes の貪食後に生じた空隙部位の組織修復過程の進行を示していると考えられた。

今回の照射実験において、100 mW/cm², 20 分の照射条件で 5 日間照射したサンプルの IL-1 β 、MIP-2、TNF- α のサイトカイン量は、5 日目の最終照射直後は有意に抑制されていたが、72 時間の無照射期間後に増加した。また、同様に 100 mW/cm², 20 分照射 5 日目の囊腫壁の厚さを計測すると、一旦は有意に肥厚したが、72 時間の無照射期間後に菲薄化した。これは *C.acnes* の再増殖による炎症再燃を反映していると考えられる。つまり、本研究で用いたモデルのような囊腫性痤瘡では、クリニックで行われているような週 2~3 回の照射ではなく、連日の照射が必要であると考えられた。なお、過去の臨床研究では、このような囊腫性痤瘡においては、青色光治療のみでは治療できないとする報告もあるが(31)、本実験結果においては、100 mW/cm², 20 分の連日照射でそのような重症型も治療し得る可能性を示した。また、8 日目の検体採取時に、100 mW/cm², 10 分照射 (60 J) 群では 5 匹中 3 匹の尋常性痤瘡が破裂したのにも関わらず、より低いフルエンス (J) で照射した 30 mW/cm², 20 分照射 (36 J) 群においては破裂したものがいなかった。この結果については、照射密度 (mW/cm²) やフルエンス (J) よりも照射時間の方が、殺菌や炎症抑制により大きく作用する可能性を示唆している。波長 380~480 nm 光の殺菌能力については、黄色ブドウ球菌や緑膿菌の場合、照射密度と殺菌能力は相関しないという結果が報告されている(45)。

なお、青色光照射による脂腺活動の抑制も尋常性痤瘡治療のメカニズムの一つとし

て考えられているが(46)、本研究で用いた尋常性痤瘡マウスモデルでは脂腺の影響について検証できていない。

2.4.2 青色光の 5 日間連日照射の安全性について

青色光によって正常組織からも ROS が発生することが知られている(21)。青色光は、DNA や RNA の吸収スペクトルからは外れているものの、過剰な ROS は DNA 損傷の原因となる(47, 48)。また、アポトーシスを引き起こす要因は複数あるが、この DNA 損傷もその 1 つである(49)。そのため、今回の実験では、青色光照射によるアポトーシスを検出する目的で Cleaved caspase-3 免疫染色を行った。Cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞数の有意な増加は確認されなかったが、100 mW/cm² で照射したサンプルには高い数値を示したものも存在した。また、青色光の照射後に、皮膚 ATP 量の低下がみられた。

本実験でみられた皮膚における細胞内 ATP 量の低下は、青色光照射によって発生した ROS によるミトコンドリアの微細構造とリモデリング障害に起因する可能性(50)がある。また、ミトコンドリアに存在するシトクロム c オキシダーゼやシトクロム P450 の光の吸収ピークが 415 nm 周辺にあることから、これら分子の直接的な破壊によって ATP 合成能が阻害された可能性もある(50)。

細胞内 ATP 量低下は高度になると細胞壊死やアポトーシスにつながる。よって、青

色光の照射密度や照射時間、照射頻度などは過剰にならないよう配慮が必要と考える。

2.4.3 青色光の組織深達度について

青色光の前方透過率の計測により、本モデルの尋常性痤瘡膿瘍の表面には、照射した青色光の約 5 %が深達していることがわかった。これは、培養液中やシャーレ上の *C.acnes* に直接青色光を照射した報告を参考にすれば、殺菌するに十分な照射密度であると考えられる(32, 51)。しかし、青色光の透過率は、膿瘍内容物 50 μm の厚さで半減した。つまり、本モデルにおける青色光の膿瘍表面までの透過率と以深の減衰を考えると、1 mm 以上ある膿瘍の底部に存在するポルフィリンには励起されるほどの十分な青色光が到達しない可能性がある。そのため、この青色光治療のメカニズムには、ポルフィリンの励起による ROS の殺菌以外の作用も関与している可能性が示唆された。

例えば、青色光が到達している痤瘡周囲の組織から発生する ROS が、その発生場所において、*C.acnes* の増殖や炎症の進展を抑制している可能性が考えられる。また、青色光を細胞に照射すると、バイスタンダー効果が起きることが報告されている(52)。バイスタンダー効果とは、光が照射された細胞から、隣接する無照射細胞にエクソソーム等を介してシグナルが伝達され、生物学的変化をもたらす現象であり、主に放射線治療の分野で詳細に研究されている(53)。このバイスタンダー効果によって、直接青色光が

照射されていない深部の組織にも、生物学的な変化が起きた可能性がある。今後、青色光の尋常性座瘡への治療メカニズムの解明を進める際に、このような効果についても検証していく必要がある。

2.5 小括

1. 100 mW/cm², 20 分、30 mW/cm², 20 分の 5 日間連日青色光照射された尋常性座瘡マウスモデルでは、72 時間の無照射期間を置いても破裂がみられなかった。
2. 100 mW/cm², 20 分の 5 日間連日青色光照射されたモデルでは、囊腫性座瘡の膿瘍腔内に生じる囊腫壁の厚さが増加し、炎症性サイトカイン量は減少した。しかし、その後の 72 時間の無照射期間で囊腫壁は菲薄化し、炎症性サイトカイン量は増加した。
3. 青色光の照射による Cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞数の有意な増加は観察されなかった。
4. 青色光照射により皮膚 ATP 量は有意に低下した。100 mW/cm², 20 分の照射条件においては、ATP 量が元の状態に戻るのに 28 日間を要した。
5. 尋常性座瘡膿瘍の表層にまで深達した青色光は約 5 %であった。

第3章 マウス線維芽細胞に対する青色光の照射によって生じる活性酸素種の計測

3.1 背景と目的

青色光を細胞・組織に照射した際の、ROS や活性窒素種 (Reactive Nitrogen Species : RNS) の生成が報告されている (54, 55)。ROS とは、酸素分子に由来するさまざまな分子とフリーラジカル (不対電子を一つ持つ化学種) の総称である。ROS は、スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) やヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) などの酸素フリーラジカルと、過酸化水素 (H_2O_2)、次亜塩素酸 ($HClO$)、一重項酸素 (1O_2) などの非ラジカル酸化物から構成される (56)。RNS には、比較的反応性の低い一酸化窒素 ($NO\cdot$) と、その誘導体であるパーオキシナイトライト ($ONOO^-$) があり、いくつかの生体分子を損傷する強力な酸化剤である (57)。また、細胞には、ROS・RNS を無害化するためのさまざまな抗酸化システムが備わっている。例えば、スーパーオキシドジスムターゼ (Superoxide dismutase : SOD) は、 $O_2^{\cdot-}$ を O_2 および H_2O_2 に変換する金属酵素である (58)。

第2章の実験により、青色光は皮膚 ATP 量を低下させることがわかった。この理由については、青色光によって発生する ROS の影響などが考えられた。また、Cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞がみられたのは、ほとんどが真皮層においてであった。そのため、真皮層に多く存在している線維芽細胞を用いて、青色光照射によって発生する ROS の種類や量、それに続く SOD の発現等を検証した。

3.2 方法

3.2.1 青色光の照射

全ての実験には、青色光として、波長 405 nm の青色レーザー (RGB Lase LLC、CA、USA) にファイバーを取り付け使用した。暗所において組織培養用 96 well マイクロプレート (3860-096 ; AGC テクノグラス、静岡、日本) の底面から種々の照射密度で照射した。各 well の照射面積は 32.7 mm²であった。

3.2.2 細胞培養

皮下結合組織由来のマウス線維芽細胞 L929 (American Type Culture Collection、VA、USA) を使用した。全ての細胞実験において、96 well 組織培養用マイクロプレートを用いた。細胞は、10 % 牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) (Thermo Fisher Scientific、MA、USA) と、100 units/mL ペニシリン、0.25 μ g/mL アムホテリシン B、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを含む Antibiotic-Antimycotic (Thermo Fisher Scientific) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) を使用して 37°C、5 % CO₂ の環境下で培養した。ROS・RNS の計測、SOD 活性の計測においては、L929 細胞は、青色光照射の前日に、 4×10^4 細胞/well の密度で播種した。3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイ (細胞生存率の計測) においては、青色光照射の前日に 5×10^3 細胞/well の密度で播種した。

培地は、細胞を播種する際にフェノールレッドを含まないものに変更し、培地による青色光の吸収を抑えた。

3.2.3 活性酸素種・活性窒素種の計測

細胞内の ROS と RNS の発生は、5 種類の蛍光プローブを用いた蛍光輝度分析により計測した。これらのプローブの詳細を表 3 に示す。

各蛍光プローブは表 3 に示す時間・濃度（FBS・抗生物質・フェノールレッドを含まない DMEM で希釈）で、37°C の暗所において細胞とともにインキュベートし、細胞内に取り込ませた。インキュベーション終了後、細胞をカルシウムとマグネシウムを含まない PBS で 2 回洗浄し、細胞に取り込まれなかった蛍光プローブを除いた。その後、青色光照射を行う前に、培地はフェノールレッドを含まない FBS 添加 DMEM に変更した。

蛍光プローブを取り込んだ L929 細胞に波長 405 nm の青色光を各 well の底面から 100 mW/cm² または 30 mW/cm² で、60 または 180 秒間照射し、青色光照射前後の蛍光画像を蛍光顕微鏡（BZ-9000）で取得した。また、蛍光輝度を計測するために、照射後直ちに細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.25% トリプシン EDTA (Thermo Fisher Scientific) で処理して解離させ、フローサイトメトリー（BD FACSCanto™ II ; Becton Dickinson and Company、NJ、USA）で細胞個々の蛍光輝度を計測した。なお、蛍光顕微鏡画像

用に使用した細胞とフローサイトメトリー用に使用した細胞は、蛍光撮影による退色
を避けるため、それぞれ別に用意して計測した。フローサイトメトリーによる蛍光輝度
計測では、各細胞群について、 1×10^4 個以上の細胞を分析し、平均蛍光強度 (Mean
fluorescence intensity : MFI) を計測した。MFI 比は、青色光照射細胞の MFI (照射 MFI
とする) を同日の無照射細胞 (コントロール MFI とする) で除して、以下のように算
出した。

$$MFI \text{ 比} = (\text{照射 MFI}) / (\text{コントロール MFI})$$

3.2.4 Superoxide dismutase 活性の計測

細胞内 SOD 活性 (U/mL) の評価には、superoxide dismutase assay kit (Cayman
Chemicals Inc., MI, USA) を使用した。標準曲線は、キットに含まれる既知の外因性
SOD を用いて作製した。青色光を各 well の底面から 100 mW/cm^2 または 30 mW/cm^2
で、60 秒または 180 秒間照射した。37 °C 暗所で、30 分、60 分、120 分間インキュベ
ートした後、PBS で 1 回洗浄し、0.1% Triton X-100 含有 PBS で細胞を溶解させた。
その後、15,000 rpm、4 °C で 5 分間遠心分離した後、上清を回収した。製造元の示す手
順に従ってサンプルの SOD 活性を計測した。溶解細胞数の変動を補正するために、各
サンプル中の総タンパク質濃度を TaKaRa BCA protein assay kit を用いて計測し、SOD
活性 (U/mL) を総タンパク質濃度 (mg/mL) で正規化した。SOD 活性は U/mg protein

で表した。なお、青色光を照射していない細胞をコントロール群とした。

3.2.5 細胞生存率の計測

青色光照射後の細胞生存率の計測には MTT 細胞数測定キット（ナカライテスク株式会社、京都、日本）を使用した。96 well プレートに 5×10^3 細胞/well で細胞を播種した翌日、各 well の底面から青色光を 100 mW/cm^2 または 30 mW/cm^2 で、60 秒または 180 秒間照射した後、 37°C の暗所で 24 時間静置した。インキュベーション後、各 well に MTT 測定試薬 $10 \mu\text{L}$ を加え、4 時間後にマイクロプレートリーダー（SpectraMax iD5）で波長 450 nm における吸光度を計測した。なお、青色光を照射していない細胞をコントロール群とした。

3.2.6 統計分析

統計解析は、JMP Pro 15 ソフトウェアを用いて行った。MFI 比の計測では、各蛍光プローブにおいてそれぞれ 9 回の独立した実験を行い、結果は符号検定により分析した。SOD 活性計測では独立した 8 回の実験、細胞生存率計測では独立した 5 つの実験を行い、Kruskal-Wallis 検定、Dunnett の多重比較検定を用いて解析した。P 値 < 0.05 を統計的に有意であるとした。

3.3 結果

3.3.1 活性酸素種・活性窒素種の計測

ROS・RNS 検出蛍光プローブを取り込ませた L929 細胞に青色光を照射し、蛍光顕微鏡を用いて ROS・RNS の発生を観察した。 $\cdot\text{OH}$ と HClO を検出する OxiORANGE、 HClO を検出する HySOx 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ を検出する Dihydroethidium の蛍光強度は照射前に比べて増加した (図 17 a,b,c)。一方、 $\text{NO}\cdot$ を検出する Nitrixyte Red と ONOO^- を検出する NiSPY-3 の蛍光強度は変化しなかった (図 17 d,e)。

図 18 に、フローサイトメトリーで計測した照射前後の細胞蛍光輝度についてヒストグラムを示す。図 19 に、フローサイトメトリーで計測した MFI から算出した、各蛍光プローブの MFI 比を示す。OxiORANGE については、 100 mW/cm^2 , 180 秒および 60 秒、 30 mW/cm^2 , 180 秒の照射条件で MFI 比が有意に増加し、最大 MFI 比は 1.57 倍であった (図 19 a)。 HySOx では、すべての照射条件で MFI 比が有意に増加し (図 19 b) 最大 MFI 比は 2.25 倍、Dihydroethidium では、 100 mW/cm^2 , 180 秒および 60 秒の照射条件で有意に増加し、最大 MFI 比は 2.26 倍であった (図 19 c)。また、Nitrixyte Red については、 30 mW/cm^2 , 180 秒および 60 秒の照射条件で MFI 比が有意に増加し、最大 MFI 比は 1.19 倍であった (図 19 d)。NiSPY-3 については、 100 mW/cm^2 , 180 秒の照射条件で有意に増加し、最大 MFI 比は 1.10 倍であった (図 19 e)。

3.3.2 Superoxide dismutase 活性の計測

青色光を照射し、30 分、60 分、120 分後の SOD 活性の変化を計測した。100 mW/cm² 60 秒と 30 mW/cm² 60 秒の条件では、コントロール（無照射）群と比較し、照射 120 分後に有意な SOD 活性の上昇がみられた（図 20）。

3.3.3 細胞生存率の計測

青色光照射 24 時間後の細胞生存率を、MTT アッセイを行い評価した。100 mW/cm², 180 秒の照射群は、コントロール（無照射）群と比較して細胞生存率が有意に低下した（図 21）。

3.4 考察

青色光の照射フルエンス(J)に応じて細胞内に O₂^{-•} と HClO が生成し、100 mW/cm², 180 秒の青色光照射によって細胞生存率が低下した。今回の実験における蛍光プローブの組み合わせでは・OH 単体の同定はできなかったが、その生成経路を考えると、・OH も発生していると考えられた。また、100 mW/cm² 60 秒と 30 mW/cm² 60 秒の照射では SOD 活性の上昇がみられた。

青色光照射によって細胞内で ROS・RNS が発生する機序の詳細は明らかになっていないが、青色光照射によって励起されるオプシン、フラボタンパク質、ポルフィリンな

どの細胞内光受容体が関連していると考えられている(21)。

真核生物において ROS は、通常、主にミトコンドリアにおいて好気呼吸の副産物として生成される(59)。 $O_2^{\cdot-}$ はその中でも最も多く産生される ROS であり、SOD によって H_2O_2 に変換される。さらに、 H_2O_2 はフェントン反応やハーバー・ワイス反応によって $\cdot OH$ へ変換される(60)。また、 H_2O_2 はミエロペルオキシダーゼを介して塩化物陰イオンと反応して $HClO$ を生成する(61)。 $HClO$ は主に好中球で生成される強力な酸化剤であり、強い殺菌作用を持つ(61)。また、これまで青色光照射による皮膚組織からの $NO\cdot$ の生成が報告されているが(54, 62)、我々の細胞実験では、 $NO\cdot$ の発生はごくわずかであった。

過剰な ROS による酸化ストレス下では、ミトコンドリアの Ca^{2+} 過負荷が起こり、ミトコンドリア透過性遷移孔 (mitochondrial permeability transition pore : mPTP) の開孔が起こる。この ROS の刺激によって、さらに ROS が発生する現象は、ROS 誘発 ROS 放出 (ROS-induced ROS release : RIRR) と呼ばれている(56)。mPTP が開くと、ミトコンドリア膜電位が低下し ATP 量が低下する。ミトコンドリア膜の酸化還元電位の変化程度であればオートファジーやアポトーシスへとつながるが、完全に電位差が消失してしまうと壊死性細胞死へとつながる(63)。つまり、第2章でみられた皮膚 ATP 量の低下や、本章の細胞生存率の低下には、この mPTP 開孔に起因するミトコンドリア膜電位の低下が関係している可能性がある。

今回の実験でみられた、100 mW/cm², 60 秒、30 mW/cm², 60 秒の青色光照射から 120 分後の SOD 活性の上昇は、より多くの O₂⁻・生成に備えるための細胞応答によるものであると考えられる。また、100 mW/cm², 180 秒の青色光照射で SOD 活性の増加が見られなかったのは、生体に対する光照射においてよく言われている、二相性用量反応が関係している可能性がある(64)。これは、薬物や毒物に関する法則で、適正量であれば生体に有利な影響を及ぼすが、過剰量では抑制効果・毒性効果を示すというものである(65)。今回の実験においては、100 mW/cm², 180 秒の青色光照射は SOD が産生される前に細胞に過剰なダメージを与えたため、SOD が産生されことなく細胞生存率が低下したと考えられる。

SOD 活性の上昇は、炎症性疾患の治療や癌予防に有効であると言われている(66)。また、SOD の投与が尋常性痤瘡の炎症を抑制したという報告もある(67)。したがって、100 mW/cm², 60 秒、30 mW/cm², 60 秒の青色光照射後に観察されたような SOD 活性の上昇が、生体にとって有害でない ROS 発生量の範囲内で起こせるのであれば、炎症性疾患などの治療に有効に利用できる可能性がある。

3.5 小括

1. 青色光の照射により、HClO と O₂⁻・（および・OH）が発生した。
2. SOD 活性は、100 mW/cm² 60 秒と 30 mW/cm² 60 秒照射の 120 分後に上昇した。

3. 青色光の 100 mW/cm^2 , 180 秒の照射によって細胞生存率は低下した。

第4章 総括

青色光治療が有効とされる疾患の中でも、最も患者数が多い尋常性痤瘡に関する研究を行った。安全で効率的な青色光の照射プロトコル（照射密度・時間・頻度）作成の基盤づくりを目的として、ヘアレスマウスの背部に作製した囊腫性痤瘡モデルによる実験を行った。尋常性痤瘡の破裂の有無や、膿瘍腔内に生じた囊腫壁の厚さ、炎症性サイトカイン量の変動で治療効果や炎症の程度を評価した。結果、青色光の 100 mW/cm^2 , 20 分の 5 日間連日照射は、尋常性痤瘡の炎症を抑制した。しかし、72 時間の無照射期間後に炎症は再燃していた。そのため、青色光の照射頻度としては、クリニックで行われているような週に 2～3 回の照射よりも、患者本人によって行われるような連日の照射が適していると考えられた。

さらに、尋常性痤瘡の炎症抑制に有効であった 5 日間連日照射の安全性を確かめる目的で、アポトーシスを検出する Cleaved caspase-3 免疫染色を行った。今回設定したいずれの照射条件においても有意な Cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞の増加は見られなかったが、 100 mW/cm^2 で照射したサンプルには、真皮層において陽性細胞数が増加したものも存在した。また、青色光照射による細胞機能への影響を見る目的で、皮膚 ATP 量の変化を、FRET 型蛍光タンパク質；Go-ATeam を発現する遺伝子組み換えマウスを使用した方法とホタルルシフェラーゼ発光法によって計測した。その結果、青色

光の照射により皮膚 ATP 量は低下することがわかった。以上の結果より、青色光照射については、治療効果を得るための十分な照射密度や時間は必要であるが、組織障害を防止するためにも過剰にならないよう配慮が必要と考えられた。

青色光照射によって起こる皮膚 ATP 量低下には、組織から発生する ROS が関与している可能性が考えられた。そこで、青色光照射によって発生する ROS の種類や量の特定が、安全性に関する検討に役立つと考え、マウス線維芽細胞を用いた実験を行った。その結果、 HClO と $\text{O}_2^{\cdot-}$ （および $\cdot\text{OH}$ ）が照射フルエンス（J）に応じて発生し、 100 mW/cm^2 , 180 秒の照射で細胞生存率の低下が起きた。また、 100 mW/cm^2 , 60 秒と 30 mW/cm^2 , 60 秒の照射においては、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ を H_2O_2 と水に変換する SOD 活性が上昇した。これは、酸化ストレスに対する防御メカニズムが働いていると考えられた。

青色光照射は、尋常性痤瘡の治療に有効であると考えられる。しかし、照射部位における組織障害性が懸念されるため、青色光治療単独での効果を期待するよりも、酸化ストレスに配慮した照射プロトコルで、既存療法と併用するのが安全かつ合理的であると考えられる。青色光には殺菌作用が期待できるため、面皰溶解性のあるアダパレン等との併用が望ましい。なお、過酸化ベンゾイルやアダパレンは、青色光照射には安定性ではあるものの、日光暴露によって皮膚刺激性の増加が知られているため、塗布のタイミングと、有害事象の発生に注意する必要がある。

また、青色光による殺菌効果が期待されるのは、今回対象とした *C.acnes* だけではなく

く、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌や緑膿菌等も含まれる(68, 69)。本研究の手法や結果は、皮膚感染創等への青色光照射の適応や、組織障害性に関する研究などへ応用できる発展性を持つと考える。

第5章 結論

1. 5日間連日の 100 mW/cm^2 , 20 分の青色光照射は、囊腫性痤瘡の炎症抑制に有効であった。ただし、72 時間の無照射期間で炎症は再燃するため、青色光の照射は毎日行うことが必要である。
2. 青色光の照射により、皮膚 ATP 量の低下が起きた。
3. 青色光をマウス線維芽細胞に照射すると、複数種類の ROS が発生し、細胞生存率が低下した。
4. 青色光を用いた治療では、治療効果と酸化ストレスのバランスを考慮した治療プログラムを組む必要がある。

謝辞

本研究にあたり、研究立案、実験方法、学会発表、論文執筆等、多くのご指導を賜りました、防衛医科大学校病院形成外科 清澤智晴 教授・東隆一 教授、防衛医科大学校医用工学講座 石原美弥 教授・櫛引俊宏 准教授に心より感謝致します。

日々の実験において、あらゆる面でご協力頂きました医用工学講座 技術支援員 真弓芳稲さん、統計方法につきご指導いただきました数学講座 中村好宏 教授、免疫染色にご協力いただきました生理学講座 守本祐司 教授および技術支援員 三井由美さん、*Cutibacterium acnes* の培養についてご指導いただきました動物実験施設 富宿誠吾 講師に厚く御礼申し上げます。

また、様々な場面でご指導・ご支援・ご協力いただきました防衛医科大学校病院形成外科、防衛医科大学校医用工学講座、動物実験施設、共同利用研究施設関係諸氏に深く御礼申し上げます。

略語一覧

略語	英語	日本語
·OH	Hydroxyl radical	ヒドロキシラジカル
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments	動物実験：In Vivo 実験の報告
C.acnes	Cutibacterium acnes	キューティバクテリウム アクネス
CFU	colony forming units	コロニー形成単位
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium	ダルベッコ改変イーグル培地
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
GFP	Green Fluorescent Protein	緑色蛍光タンパク質
FBS	Fetal Bovine Serum	ウシ胎児血清
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer	磁気蛍光共鳴エネルギー移動
GAM	Gifu Anaerobic Medium	岐阜嫌気性培地
HClO	Hypochlorous acid	次亜塩素酸
IL	interleukin	インターロイキン
LED	Light Emitting Diode	発光ダイオード
MFI	Mean fluorescence intensity	平均蛍光輝度
MIP-2	macrophage inflammatory protein 2	マクロファージ炎症性タンパク質 2
mPTP	mitochondrial permeability transition pore	ミトコンドリア透過性遷移孔
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide	MTT
NO·	Nitric oxide	一酸化窒素
O ₂ ^{·-}	Superoxide	スーパーオキシド
OFP	Orange Fluorescent Protein	オレンジ色蛍光タンパク質
ONOO·	Peroxynitrite	パーオキシナイトライト
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
RIRR	ROS-induced ROS release	ROS 誘発 ROS 放出
RNS	reactive nitrogen species	活性窒素種

ROS	reactive oxygen species	活性酸素種
SOD	superoxide dismutase	スーパーオキシドジスムターゼ
TNF- α	tumor necrosis factor- α	腫瘍壊死因子 α

付記

本論文の一部は

第 30 回日本形成外科学会基礎学術集会（2021 年 10 月 7 ～ 8 日）一般演題

第 33 回日本レーザー治療学会総会・学術大会 シンポジウム「形成外科・皮膚科領域の LLLT
における今後の可能性」

で発表し、

原著論文として

Nakayama E, Kushibiki T, Mayumi Y, Azuma R, Ishihara M, Kiyosawa T. Blue Laser
Irradiation Decreases the ATP Level in Mouse Skin and Increases the Production of
Superoxide Anion and Hypochlorous Acid in Mouse Fibroblasts. *Biology (Basel)*. 2022;11(2).
と、

Nakayama E, Kushibiki T, Mayumi Y, Fushuku S, Nakamura T, Kiyosawa T, Ishihara M,
Azuma R. Optimal blue light irradiation conditions for the treatment of acne vulgaris in a
mouse model. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2023;239.
に掲載された。

また、

総説論文として

中山瑛子, 櫛引俊宏, 真弓芳稲, 土屋壮登, 東隆一, 清澤智晴, 石原美弥. 形成外科・皮膚科
領域の Photobiomodulation Therapy. *日本レーザー医学会誌*. 2021;41(4):370-84.
に掲載された。

引用文献

1. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, Aboyans V, Abraham J, Ackerman I, Aggarwal R, Ahn SY, Ali MK, AlMazroa MA, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Bahalim AN, Barker-Collo S, Barrero LH, Bartels DH, Basáñez M-G, Baxter A, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bernabé E, Bhalla K, Bhandari B, Bikbov B, Abdulhak AB, Birbeck G, Black JA, Blencowe H, Blore JD, Blyth F, Bolliger I, Bonaventure A, Boufous S, Bourne R, Boussinesq M, Braithwaite T, Brayne C, Bridgett L, Brooker S, Brooks P, Brugha TS, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Buckle G, Budke CM, Burch M, Burney P, Burstein R, Calabria B, Campbell B, Canter CE, Carabin H, Carapetis J, Carmona L, Cella C, Charlson F, Chen H, Cheng AT-A, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahiya M, Dahodwala N, Damsere-Derry J, Danaei G, Davis A, De Leo D, Degenhardt L, Dellavalle R, Delossantos A, Denenberg J, Derrett S, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dherani M, Diaz-Torne C, Dolk H, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Edmond K, Elbaz A, Ali SE, Erskine H, Erwin PJ, Espindola P, Ewoigbokhan SE, Farzadfar F, Feigin V, Felson DT, Ferrari A, Ferri CP, Fèvre EM, Finucane MM, Flaxman S, Flood L, Foreman K, Forouzanfar MH, Fowkes FGR, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabbe BJ, Gabriel SE, Gakidou E, Ganatra HA, Garcia B, Gaspari F, Gillum RF, Gmel G, Gosselin R, Grainger R, Groeger J, Guillemin F, Gunnell D, Gupta R, Haagsma J, Hagan H, Halasa YA, Hall W, Haring D, Haro JM, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Higashi H, Hill C, Hoen B, Hoffman H, Hotez PJ, Hoy D, Huang JJ, Ibeanusi SE, Jacobsen KH, James SL, Jarvis D, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Jonas JB, Karthikeyan G, Kassebaum N, Kawakami N, Keren A, Khoo J-P, King CH, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lalloo R, Laslett LL, Lathlean T, Leasher JL, Lee YY, Leigh J, Lim SS, Limb E, Lin JK, Lipnick M, Lipshultz SE, Liu W, Loane M, Ohno SL, Lyons R, Ma J, Mabweijano J, MacIntyre MF, Malekzadeh R, Mallinger L, Manivannan S, Marcenes W, March L, Margolis DJ, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGill N, McGrath J, Medina-Mora ME, Meltzer M, Memish ZA, Mensah GA, Merriman TR, Meyer A-C, Miglioli V, Miller M, Miller TR, Mitchell PB, Mocumbi AO, Moffitt TE, Mokdad AA, Monasta L, Montico M, Moradi-Lakeh M, Moran A, Morawska L, Mori R, Murdoch ME, Mwaniki MK, Naidoo K, Nair MN, Naldi L, Narayan KMV, Nelson PK, Nelson RG, Nevitt MC, Newton CR, Nolte S, Norman P, Norman R, O'Donnell M, O'Hanlon S, Olives C, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Page A, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Patten

SB, Pearce N, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Pesudovs K, Phillips D, Phillips MR, Pierce K, Pion S, Polanczyk GV, Polinder S, Pope CA, Popova S, Porrini E, Pourmalek F, Prince M, Pullan RL, Ramaiah KD, Ranganathan D, Razavi H, Regan M, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Richardson K, Rivara FP, Roberts T, Robinson C, De Leòn FR, Ronfani L, Room R, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Saha S, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Schwebel DC, Scott JG, Segui-Gomez M, Shahraz S, Shepard DS, Shin H, Shivakoti R, Silberberg D, Singh D, Singh GM, Singh JA, Singleton J, Sleet DA, Sliwa K, Smith E, Smith JL, Stapelberg NJC, Steer A, Steiner T, Stolk WA, Stovner LJ, Sudfeld C, Syed S, Tamburlini G, Tavakkoli M, Taylor HR, Taylor JA, Taylor WJ, Thomas B, Thomson WM, Thurston GD, Tleyjeh IM, Tonelli M, Towbin JA, Truelsen T, Tsilimbaris MK, Ubeda C, Undurraga EA, van der Werf MJ, van Os J, Vavilala MS, Venketasubramanian N, Wang M, Wang W, Watt K, Weatherall DJ, Weinstock MA, Weintraub R, Weisskopf MG, Weissman MM, White RA, Whiteford H, Wiersma ST, Wilkinson JD, Williams HC, Williams SRM, Witt E, Wolfe F, Woolf AD, Wulf S, Yeh P-H, Zaidi AKM, Zheng Z-J, Zonies D, Lopez AD, Murray CJL. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2012;380(9859):2163-96.

2. Tanghetti EA. The role of inflammation in the pathology of acne. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2013;6(9):27-35.
3. Samuels DV, Rosenthal R, Lin R, Chaudhari S, Natsuaki MN. Acne vulgaris and risk of depression and anxiety: A meta-analytic review. *J Am Acad Dermatol*. 2020;83(2):532-41.
4. Gebauer K. Acne in adolescents. *Aust Fam Physician*. 2017;46(12):892-5.
5. Zaenglein AL, Pathy AL, Schlosser BJ, Alikhan A, Baldwin HE, Berson DS, Bowe WP, Graber EM, Harper JC, Kang S, Keri JE, Leyden JJ, Reynolds RV, Silverberg NB, Stein Gold LF, Tollefson MM, Weiss JS, Dolan NC, Sagan AA, Stern M, Boyer KM, Bhushan R. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(5):945-73.e33.
6. Bhat YJ, Latief I, Hassan I. Update on etiopathogenesis and treatment of Acne. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2017;83(3):298-306.
7. Ramli R, Malik AS, Hani AF, Jamil A. Acne analysis, grading and computational assessment methods: an overview. *Skin Res Technol*. 2012;18(1):1-14.
8. 林 伸, 赤松 浩, 岩月 啓, 大森 遼, 上中 智, 黒川 一, 幸野 健, 小林 美, 谷岡 未, 古川 福, 古村 南, 山崎 修, 山崎 研, 山本 有, 宮地 良, 川島 眞. 尋常性痤瘡治療ガイドライン 2017. *日本皮膚科学会雑誌*. 2017;127(6):1261-302.
9. Chien AL, Qi J, Rainer B, Sachs DL, Helfrich YR. Treatment of Acne in Pregnancy. *J Am Board Fam Med*. 2016;29(2):254-62.
10. Leung AK, Barankin B, Lam JM, Leong KF, Hon KL. Dermatology: how to manage acne vulgaris. *Drugs Context*. 2021;10.

11. Aoki S, Nakase K, Hayashi N, Nakaminami H, Noguchi N. Increased prevalence of doxycycline low-susceptible *Cutibacterium acnes* isolated from acne patients in Japan caused by antimicrobial use and diversification of tetracycline resistance factors. *J Dermatol.* 2021;48(9):1365-71.
12. Walsh TR, Efthimiou J, Dréno B. Systematic review of antibiotic resistance in acne: an increasing topical and oral threat. *The Lancet Infectious Diseases.* 2016;16(3):e23-e33.
13. Branisteanu DE, Dirzu DS, Toader MP, Branisteanu DC, Nicolescu AC, Brihan I, Bogdanici CM, Branisteanu G, Dimitriu A, Anton N, Porumb EA. Phototherapy in dermatological maladies (Review). *Exp Ther Med.* 2022;23(4):259.
14. Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy-Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem.* 2021;9:691697.
15. Bonnans M, Fouque L, Pelletier M, Chabert R, Pinacolo S, Restellini L, Cucumel K. Blue light: Friend or foe ? *J Photochem Photobiol B.* 2020;212:112026.
16. Lesiak A, Bednarski IA, Narbutt J. Prospective 3-month study on the efficacy of UV-free blue light in mild psoriasis vulgaris treatment. *Postepy Dermatol Alergol.* 2021;38(3):446-9.
17. Keemss K, Pfaff SC, Born M, Liebmann J, Merk HF, von Felbert V. Prospective, Randomized Study on the Efficacy and Safety of Local UV-Free Blue Light Treatment of Eczema. *Dermatology.* 2016;232(4):496-502.
18. Lee SY, You CE, Park MY. Blue and red light combination LED phototherapy for acne vulgaris in patients with skin phototype IV. *Lasers Surg Med.* 2007;39(2):180-8.
19. Shu M, Kuo S, Wang Y, Jiang Y, Liu YT, Gallo RL, Huang CM. Porphyrin metabolisms in human skin commensal *Propionibacterium acnes* bacteria: potential application to monitor human radiation risk. *Curr Med Chem.* 2013;20(4):562-8.
20. Ashkenazi H, Malik Z, Harth Y, Nitzan Y. Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenic porphyrins after illumination with high intensity blue light. *FEMS immunology and medical microbiology.* 2003;35(1):17-24.
21. Serrage H, Heiskanen V, Palin WM, Cooper PR, Milward MR, Hadis M, Hamblin MR. Under the spotlight: mechanisms of photobiomodulation concentrating on blue and green light. *Photochem Photobiol Sci.* 2019;18(8):1877-909.
22. Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M. Blue laser irradiation generates intracellular reactive oxygen species in various types of cells. *Photomed Laser Surg.* 2013;31(3):95-104.
23. Nakayama E, Kushibiki T, Mayumi Y, Azuma R, Ishihara M, Kiyosawa T. Blue Laser Irradiation Decreases the ATP Level in Mouse Skin and Increases the Production of Superoxide Anion and Hypochlorous Acid in Mouse Fibroblasts. *Biology (Basel).* 2022;11(2).
24. Scott AM, Stehlik P, Clark J, Zhang D, Yang Z, Hoffmann T, Mar CD, Glasziou P. Blue-

Light Therapy for Acne Vulgaris: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Fam Med*. 2019;17(6):545-53.

25. Thiboutot D, Gollnick H, Bettoli V, Dréno B, Kang S, Leyden JJ, Shalita AR, Lozada VT, Berson D, Finlay A, Goh CL, Herane MI, Kaminsky A, Kubba R, Layton A, Miyachi Y, Perez M, Martin JP, Ramos ESM, See JA, Shear N, Wolf J, Jr. New insights into the management of acne: an update from the Global Alliance to Improve Outcomes in Acne group. *J Am Acad Dermatol*. 2009;60(5 Suppl):S1-50.

26. Hession MT, Markova A, Graber EM. A review of hand-held, home-use cosmetic laser and light devices. *Dermatol Surg*. 2015;41(3):307-20.

27. Diogo MLG, Campos TM, Fonseca ESR, Pavani C, Horliana A, Fernandes KPS, Bussadori SK, Fantin F, Leite DPV, Yamamoto ATA, Navarro RS, Motta LJ. Effect of Blue Light on Acne Vulgaris: A Systematic Review. *Sensors (Basel)*. 2021;21(20).

28. Papageorgiou P, Katsambas A, Chu A. Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris. *Br J Dermatol*. 2000;142(5):973-8.

29. Weinstabl A, Hoff-Lesch S, Merk HF, von Felbert V. Prospective randomized study on the efficacy of blue light in the treatment of psoriasis vulgaris. *Dermatology*. 2011;223(3):251-9.

30. Barbaric J, Abbott R, Posadzki P, Car M, Gunn LH, Layton AM, Majeed A, Car J. Light therapies for acne. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;9:CD007917.

31. Tzung TY, Wu KH, Huang ML. Blue light phototherapy in the treatment of acne. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2004;20(5):266-9.

32. Masson-Meyers DS, Bumah VV, Castel C, Castel D, Enwemeka CS. Pulsed 450 nm blue light significantly inactivates *Propionibacterium acnes* more than continuous wave blue light. *J Photochem Photobiol B*. 2020;202:111719.

33. Gannesen AV, Lesouhaitier O, Racine PJ, Barreau M, Netrusov AI, Plakunov VK, Feuilloy MGJ. Regulation of Monospecies and Mixed Biofilms Formation of Skin *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* by Human Natriuretic Peptides. *Front Microbiol*. 2018;9:2912.

34. Balgir PP, Dhiman SR, Kaur P. In silico prediction and qPCR validation of novel sRNAs in *Propionibacterium acnes* KPA171202. *J Genet Eng Biotechnol*. 2016;14(1):169-76.

35. Park C, Cha HJ, Hong SH, Kim GY, Kim S, Kim HS, Kim BW, Jeon YJ, Choi YH. Protective Effect of Phloroglucinol on Oxidative Stress-Induced DNA Damage and Apoptosis through Activation of the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in HaCaT Human Keratinocytes. *Mar Drugs*. 2019;17(4).

36. Ash C, Dubec M, Donne K, Bashford T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers Med Sci*. 2017;32(8):1909-18.

37. Jang YH, Lee KC, Lee SJ, Kim DW, Lee WJ. HR-1 Mice: A New Inflammatory Acne

Mouse Model. *Ann Dermatol*. 2015;27(3):257-64.

38. Jung EC, Maibach HI. Animal models for percutaneous absorption. *J Appl Toxicol*. 2015;35(1):1-10.

39. Ha RY, Nojima K, Adams WP, Jr., Brown SA. Analysis of facial skin thickness: defining the relative thickness index. *Plast Reconstr Surg*. 2005;115(6):1769-73.

40. Wang Y, Hata TR, Tong YL, Kao MS, Zouboulis CC, Gallo RL, Huang CM. The Anti-Inflammatory Activities of *Propionibacterium acnes* CAMP Factor-Targeted Acne Vaccines. *J Invest Dermatol*. 2018;138(11):2355-64.

41. Yamamoto S, Yamamoto M, Nakamura J, Mii A, Yamamoto S, Takahashi M, Kaneko K, Uchino E, Sato Y, Fukuma S, Imamura H, Matsuda M, Yanagita M. Spatiotemporal ATP Dynamics during AKI Predict Renal Prognosis. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(12):2855-69.

42. Kampa N, Jitpean S, Seesupa S, Hoisang S. Penetration depth study of 830 nm low-intensity laser therapy on living dog tissue. *Vet World*. 2020;13(7):1417-22.

43. Ji J, Zhang RH, Li HM, Guo Q, Zhang LL, Zhu J, Chen L. Correlations of SOX9 expression with serum IGF1 and inflammatory cytokines IL-1 α and IL-6 in skin lesions of patients with acne. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(9):2549-55.

44. Suvanprakorn P, Tongyen T, Prakhongcheep O, Laorathaphong P, Chanvorachote P. Establishment of an Anti-acne Vulgaris Evaluation Method Based on TLR2 and TLR4-mediated Interleukin-8 Production. *In Vivo*. 2019;33(6):1929-34.

45. Tomb RM, White TA, Coia JE, Anderson JG, MacGregor SJ, Maclean M. Review of the Comparative Susceptibility of Microbial Species to Photoinactivation Using 380-480 nm Violet-Blue Light. *Photochem Photobiol*. 2018;94(3):445-58.

46. Jung YR, Kim SJ, Sohn KC, Lee Y, Seo YJ, Lee YH, Whang KU, Kim CD, Lee JH, Im M. Regulation of lipid production by light-emitting diodes in human sebocytes. *Arch Dermatol Res*. 2015;307(3):265-73.

47. Guo C, Sun L, Chen X, Zhang D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. 2013;8(21):2003-14.

48. 山元 淳. (6-4) 光回復酵素による 2 光子 DNA 修復の分子メカニズム. *生物物理*. 2015;55(3):157-8.

49. Chen H, Wang J, Liu Z, Yang H, Zhu Y, Zhao M, Liu Y, Yan M. Mitochondrial DNA depletion causes decreased ROS production and resistance to apoptosis. *Int J Mol Med*. 2016;38(4):1039-46.

50. Guo KX, Huang C, Wang W, Zhang P, Li Y, Liu ZY, Wang MS. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction of retinal ganglion cells injury exposures in long-term blue light. *Int J Ophthalmol*. 2020;13(12):1854-63.

51. Boyd JM, Lewis KA, Mohammed N, Desai P, Purdy M, Li WH, Fourre T, Miksa D,

- Crane S, Southall M, Fassih A. Propionibacterium acnes susceptibility to low-level 449 nm blue light photobiomodulation. *Lasers Surg Med*. 2019;51(8):727-34.
52. Ishii M, Rohrer B. Bystander effects elicited by single-cell photo-oxidative blue-light stimulation in retinal pigment epithelium cell networks. *Cell Death Discov*. 2017;3:16071.
 53. Daguene E, Louati S, Wozny AS, Vial N, Gras M, Guy JB, Vallard A, Rodriguez-Lafrasse C, Magne N. Radiation-induced bystander and abscopal effects: important lessons from preclinical models. *Br J Cancer*. 2020;123(3):339-48.
 54. Barolet AC, Litvinov IV, Barolet D. Light-induced nitric oxide release in the skin beyond UVA and blue light: Red & near-infrared wavelengths. *Nitric Oxide*. 2021;117:16-25.
 55. Yoshida A, Yoshino F, Makita T, Maehata Y, Higashi K, Miyamoto C, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, Takahashi O, Lee MC. Reactive oxygen species production in mitochondria of human gingival fibroblast induced by blue light irradiation. *J Photochem Photobiol B*. 2013;129:1-5.
 56. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94(3):909-50.
 57. Adams L, Franco MC, Estevez AG. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015;240(6):711-7.
 58. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011;11(4):341-6.
 59. Wang YC, Lu YB, Huang XL, Lao YF, Zhang L, Yang J, Shi M, Ma HL, Pan YW, Zhang YN. Myeloperoxidase: a new target for the treatment of stroke? *Neural Regen Res*. 2022;17(8):1711-6.
 60. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1245049.
 61. Wang L, Bassiri M, Najafi R, Najafi K, Yang J, Khosrovi B, Hwong W, Barati E, Belisle B, Celeri C, Robson MC. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *J Burns Wounds*. 2007;6:e5-e.
 62. Oplander C, Deck A, Volkmar CM, Kirsch M, Liebmann J, Born M, van Abeelen F, van Faassen EE, Kroncke KD, Windolf J, Suschek CV. Mechanism and biological relevance of blue-light (420-453 nm)-induced nonenzymatic nitric oxide generation from photolabile nitric oxide derivatives in human skin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:1363-77.
 63. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:143-83.
 64. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response*. 2009;7(4):358-83.

65. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(2):516-33.
66. Robbins D, Zhao Y. Manganese superoxide dismutase in cancer prevention. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(10):1628-45.
67. Nguyen CT, Sah SK, Zouboulis CC, Kim TY. Inhibitory effects of superoxide dismutase 3 on *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation. *Sci Rep.* 2018;8(1):4024.
68. Bowman C, Bumah VV, Niesman IR, Cortez P, Enwemeka CS. Structural membrane changes induced by pulsed blue light on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Photochem Photobiol B.* 2021;216:112150.
69. Martegani E, Bolognese F, Trivellin N, Orlandi VT. Effect of blue light at 410 and 455 nm on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Photochem Photobiol B.* 2020;204:111790.
70. Sernicola A, Cama E, Pelizzo MG, Tessarolo E, Nicolli A, Viero G, Alaibac M. In vitro Assessment of Solar Filters for Erythropoietic Protoporphyria in the Action Spectrum of Protoporphyrin IX. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:796884.
71. Yamamoto M. Visualization of ATP dynamics during mouse exercise. *Japanese Journal of Physical Fitness and Sports Medicine.* 2019;68(4):245-9.

図表

表 1 尋常性痤瘡の形態による分類 引用文献(7, 8)を元に作成

名称	説明	サイズ	色	膿の有無
白色面皰	皮脂の毛包内貯留・毛孔は開大・ 非炎症性病変	微小	白色	無
黒色面皰	皮脂の毛包内貯留・毛孔は閉鎖・ 非炎症性病変	微小	黒色	無
丘疹	炎症性病変	< 5 mm	ピンク色	無
膿疱	炎症性病変	< 5 mm	周辺は紅色で 中心は黄色（膿）	有
結節	炎症性病変	5 - 10 mm	ピンク色、紅色	無
囊腫	炎症性病変	5 mm <	紅色	有

表 2 尋常性座瘡の破裂

照射条件	5 日目	8 日目
コントロール（無照射）	0	3
100 mW/cm ² , 20 min	0	0
100 mW/cm ² , 10 min	0	3
30 mW/cm ² , 20 min	0	0
30 mW/cm ² , 10 min	0	3

単位：匹

各照射条件における、5 日目および 8 日目に破裂していたマウスの数。
各群あたり 5 匹。

表 3 活性酸素種・活性窒素種の検出に使用した蛍光プローブの詳細

蛍光プローブ	励起波長 (nm) / 蛍光波 長 (nm)	検出可能 ROS・RNS	最終濃度	インキュベート 時間 (分)	供給元
OxiORANGE	543/577	$\cdot\text{OH}$ 、 HClO	$1\ \mu\text{M}$	20	五稜化薬、北海道、 日本
HySOx	555/575	HClO	$5\ \mu\text{M}$	30	五稜化薬
Dihydroethidium	518/606	$\text{O}_2^{\cdot-}$	$10\ \mu\text{M}$	30	Thermo Fisher Scientific
Nitrixyte Red	630/660	$\text{NO}\cdot$	$1\times$ ※	30	AAT Bioquest、 CA、USA
NiSPY-3	490/515	ONOO^-	$10\ \mu\text{M}$	30	五稜化薬

$\cdot\text{OH}$: ヒドロキシラジカル、 HClO : 次亜塩素酸、 $\text{O}_2^{\cdot-}$: スーパーオキシドアニオン、 $\text{NO}\cdot$:

一酸化窒素、 ONOO^- : パーオキシナイトライト

※ 市販されている原液を 500 倍に希釈した。

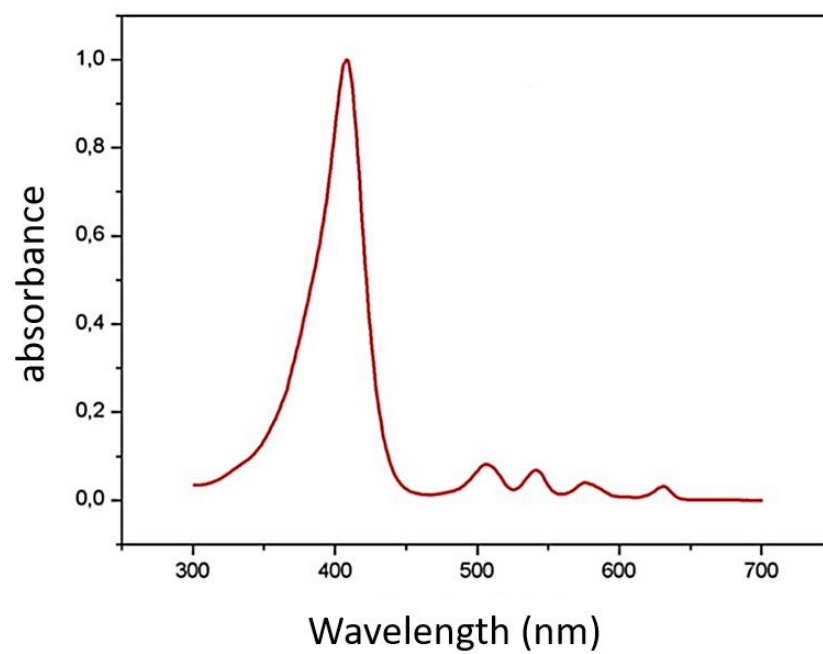


図1 プロトポルフィリン IX の吸収スペクトル 引用文献(70)より改変

波長 408 nm を中心に±約 50 nm の吸収スペクトルの最大ピークを持つ。

(a)



(b)



図2 マウス背部に作製した尋常性痤瘡

(a) 100 mW/cm^2 、20 分、1 日 1 回 5 日間連日照射

(b) 無照射

(左) 皮下注射直後 (中央) 5 日目 (右) 8 日目

スケールバー = 1 cm






day	1	2	3	4	5	6	7	8
処置	<i>C.acnes</i> の 接種							
治療	照射  415 nm LED	照射 	照射 	照射 	照射 			
5日目 採取群					検体採取			
8日目 採取群								検体採取

図3 尋常性痤瘡モデルに対する青色光照射プロトコル

Hos:HR-1 マウスの背部に、*Cutibacterium acnes* を皮下注射し、1 日 1 回 5 日間、連日青色光を照射した。照射条件は(a) コントロール；青色光照射なし、(b) 100 mW/cm², 20 分, 120 J、(c) 100 mW/cm², 10 分, 60 J、(d) 30 mW/cm², 20 分, 36 J、(e) 30 mW/cm², 10 分, 18 J とした。

5 日目に検体を採取する 5 日目採取群と、最終照射から 72 時間の無照射期間を置いてから検体を採取する 8 日目採取群に分けた。

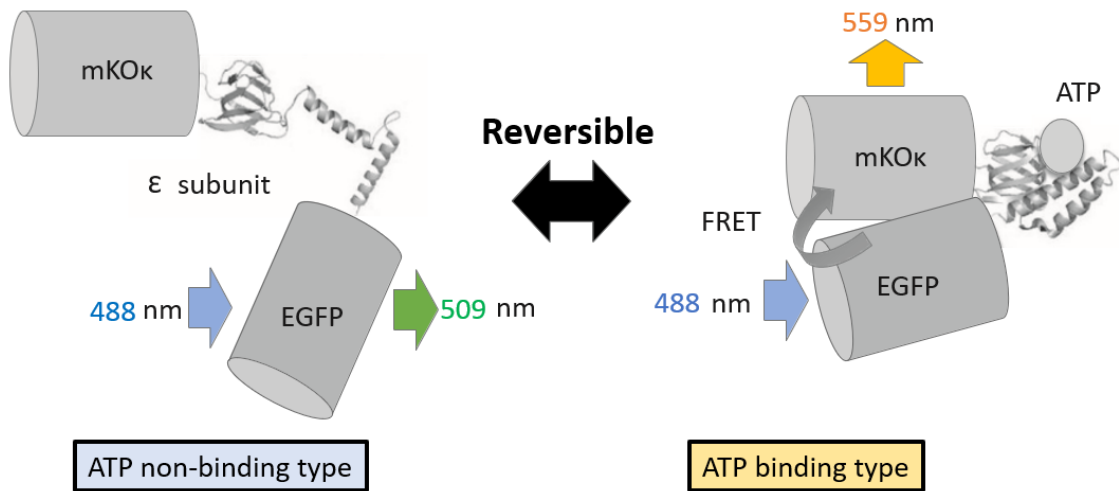


図4 GO-ATem：ATP 感受性 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 型蛍光

タンパク質の模式図 引用文献(71)より改変

Green Fluorescent Protein の変異体 cp173-mEGFP (EGFP) と Orange Fluorescent Protein のバリエントである mKusabira Orange kappa (mKO κ) が枯草菌 F_0F_1 -ATP 合成酵素の ϵ サブユニットで連結されている。ATP が結合しない状態 (左) では、 ϵ サブユニットが伸長して 2 つの蛍光タンパク質が分離し、FRET 効率が低くなる。ATP が結合すると (右)、 ϵ サブユニットは折れ曲がって 2 つの蛍光タンパク質を接近させ、FRET の効率が上がる。

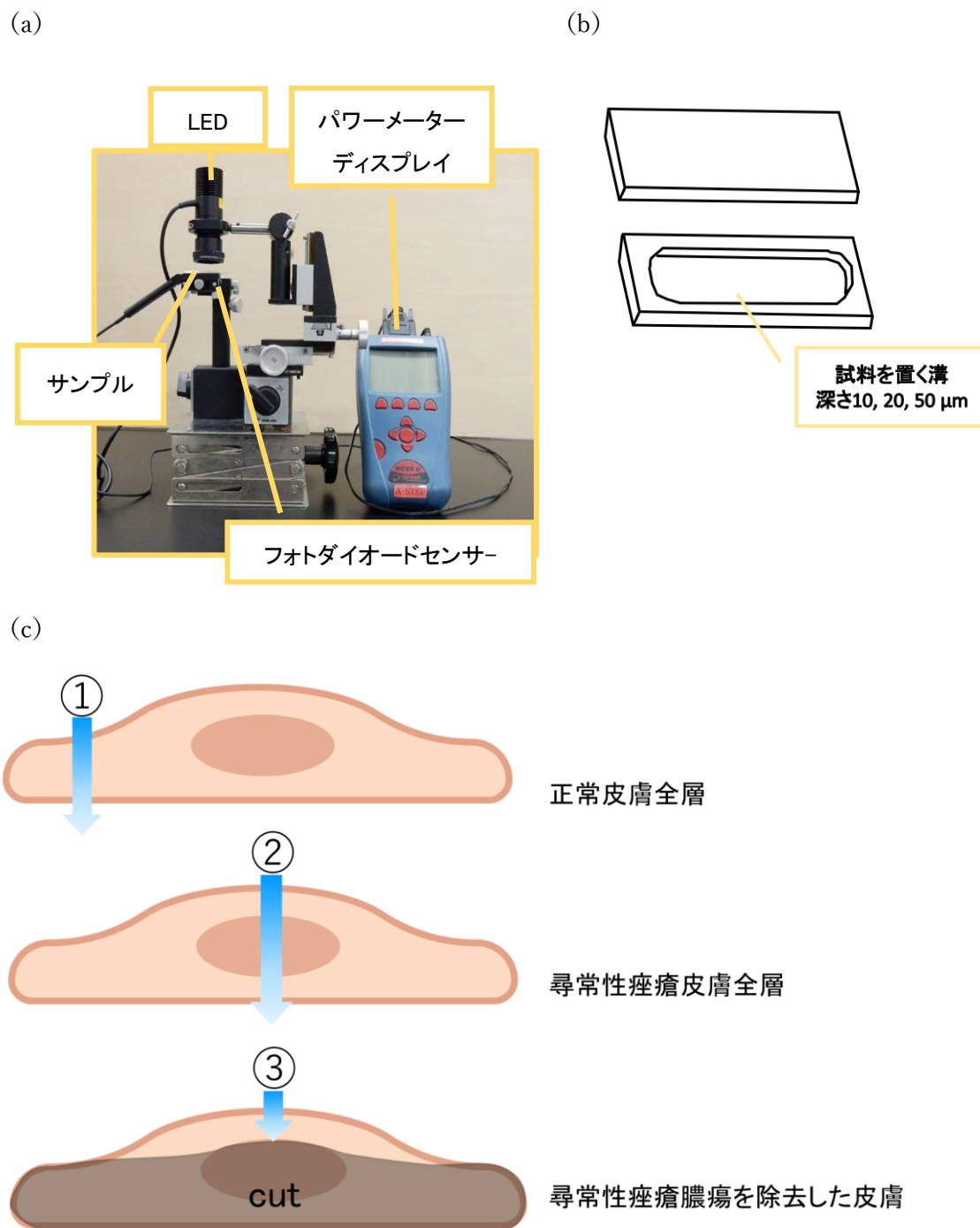
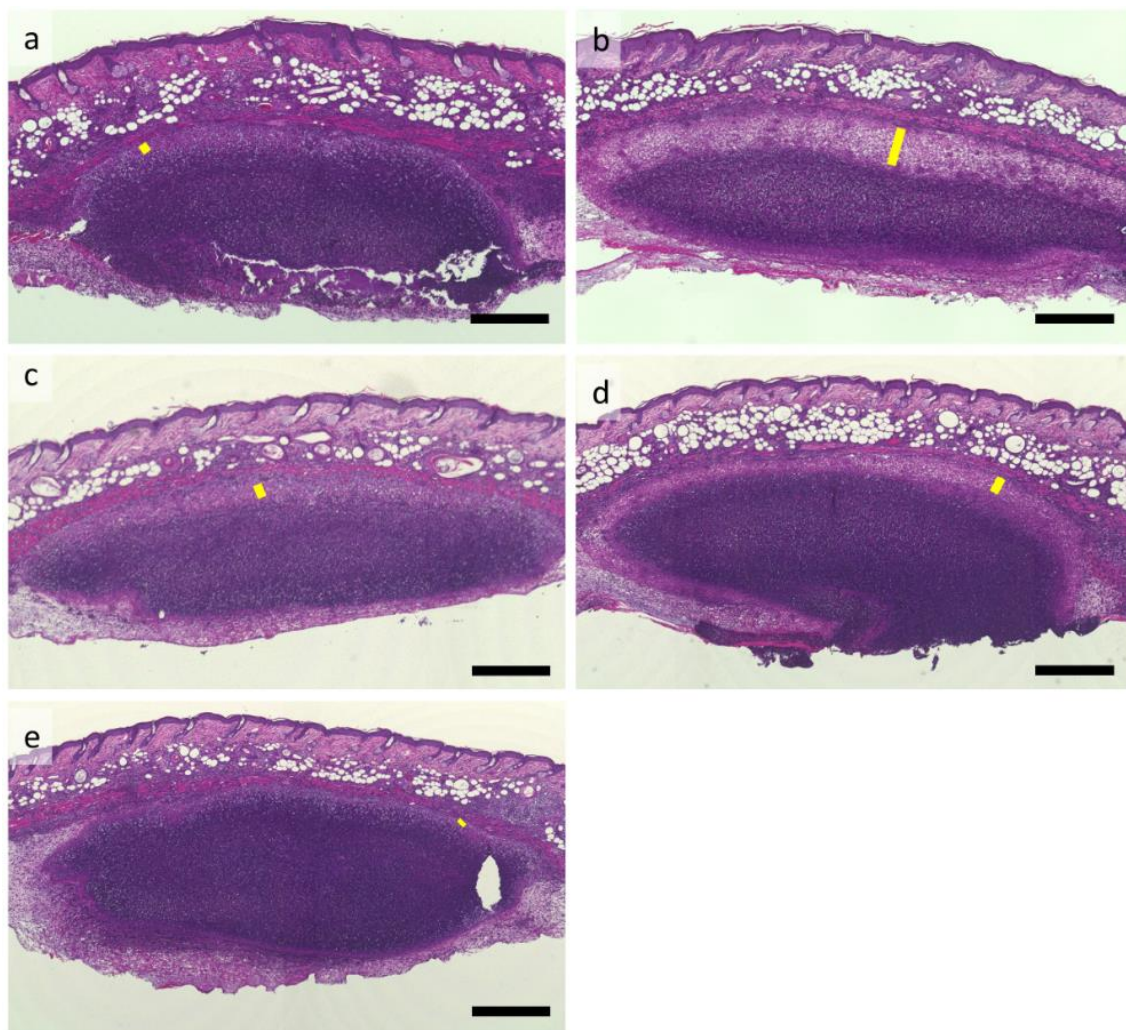


図5 尋常性痤瘡膿瘍内容物と尋常性痤瘡皮膚における前方透過率の計測方法

(a) 計測に使用した実験装置。(b) 石英セルの模式図。(c) 皮膚サンプルの計測箇所の模式図。①正常皮膚全層、②尋常性痤瘡皮膚全層、③尋常性痤瘡膿瘍を除去した皮膚を示す。

A 5 日目採取群



B 8日目採取群

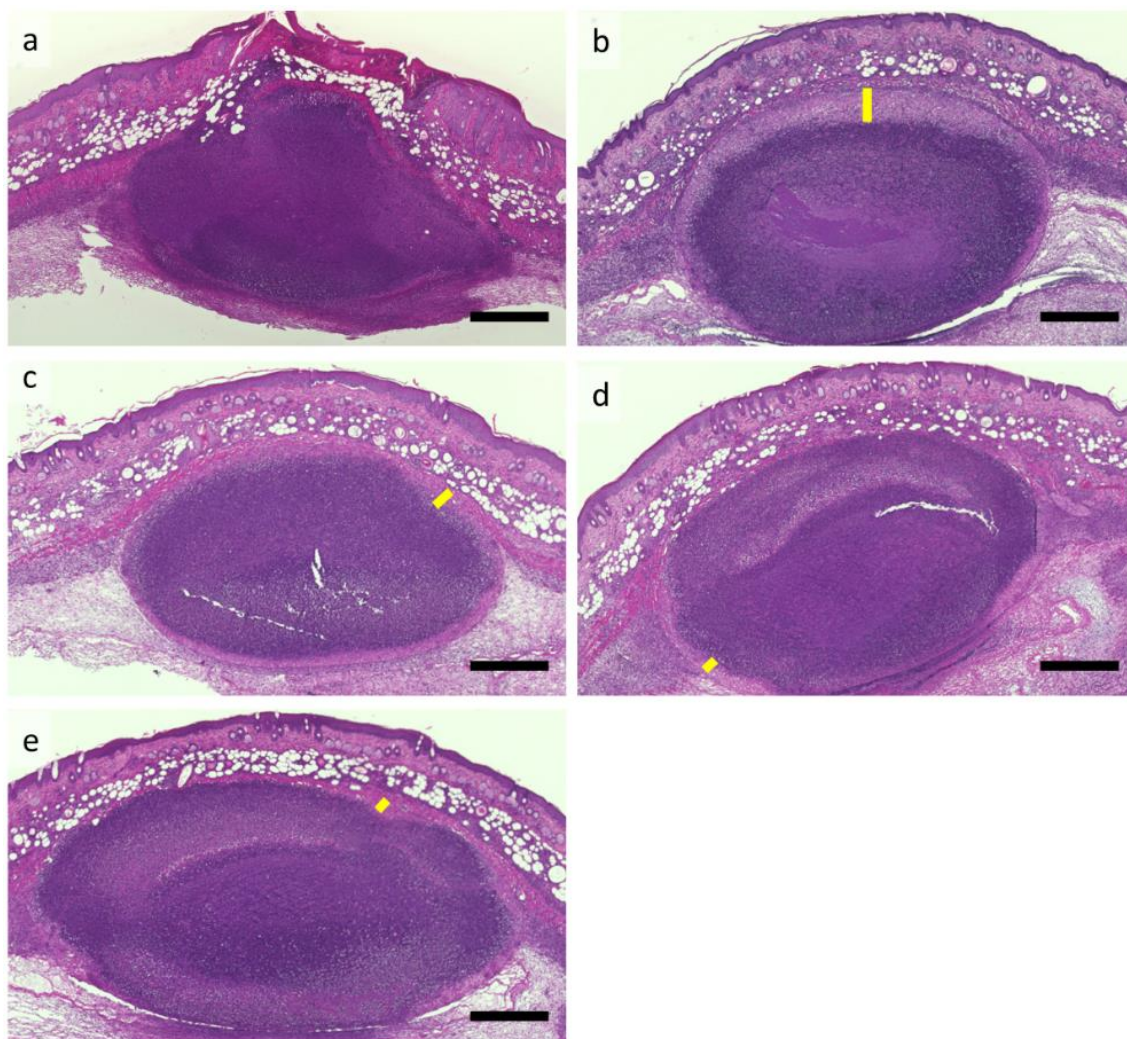


図6 マウス背部の尋常性座瘡 HE染色病理画像

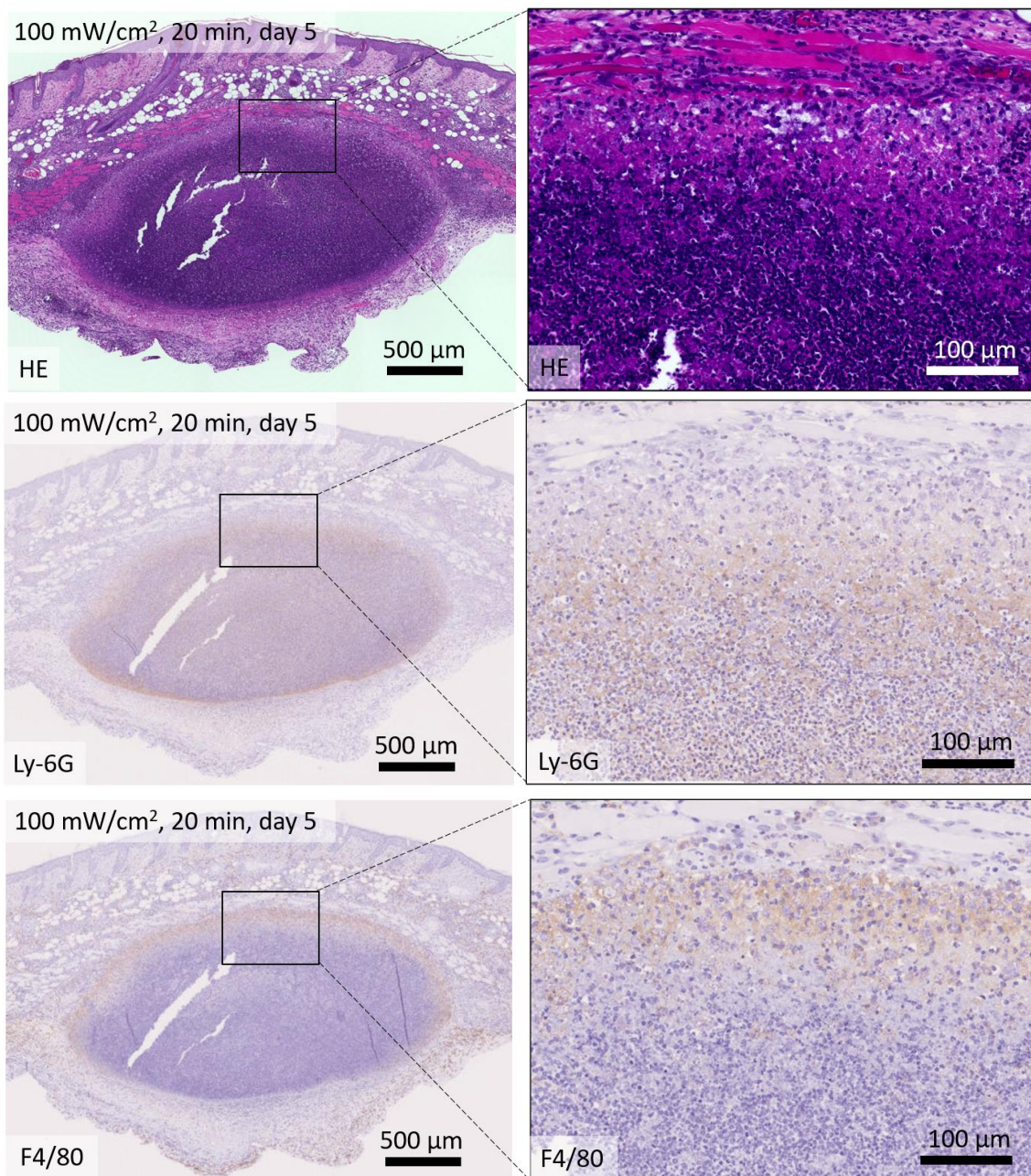
A 5日目採取群：青色光5日間照射直後（5日目）。

B 8日目採取群：青色光を5日間照射し、最終照射から72時間後（8日目）に組織を採取した。

照射条件は以下の通りである。(a) コントロール；青色光照射なし、(b) 100 mW/cm^2 , 20分, 120 J、(c) 100 mW/cm^2 , 10分, 60 J、(d) 30 mW/cm^2 , 20分, 36 J、(e) 30 mW/cm^2 , 10分, 18 J

スケールバー＝ $500 \mu\text{m}$ 。黄色のバーは膿瘍腔に生じた囊腫壁の最も厚い部位を示す。

(a)



(b)

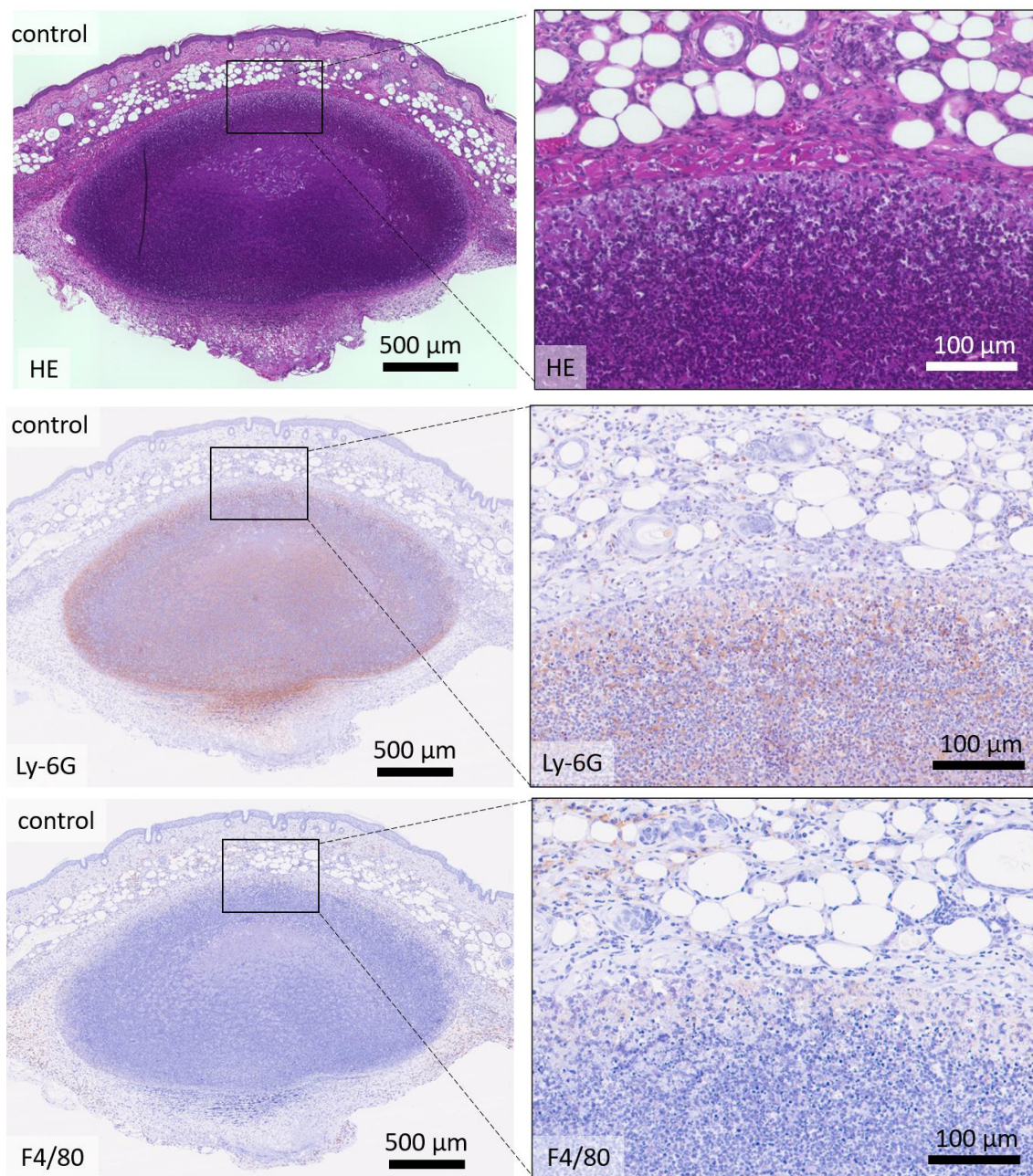
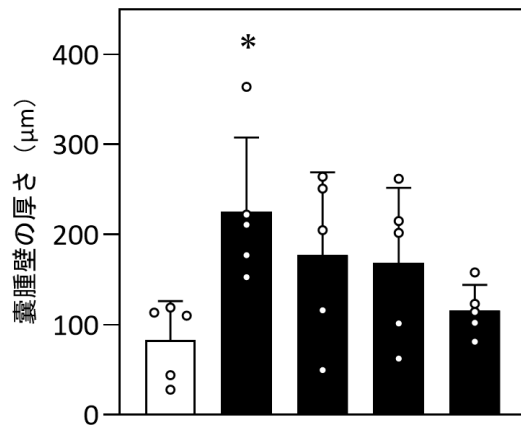


図7 マウス尋常性痤瘡に生じた囊腫壁の各種染色画像

(a) 100 mW/cm², 20 分, 120 J 連日照射 5 日目 (b) control 5 日目

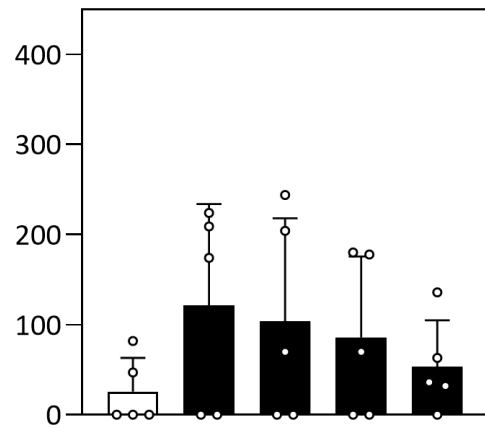
HE 染色、Ly-6G 抗体を用いた好中球の免疫染色、F4/80 抗体を用いたマクロファージの免疫染色。

(a)



照射密度 (mW/cm ²)	0	100	100	30	30
時間 (min)	0	20	10	20	10

(b)

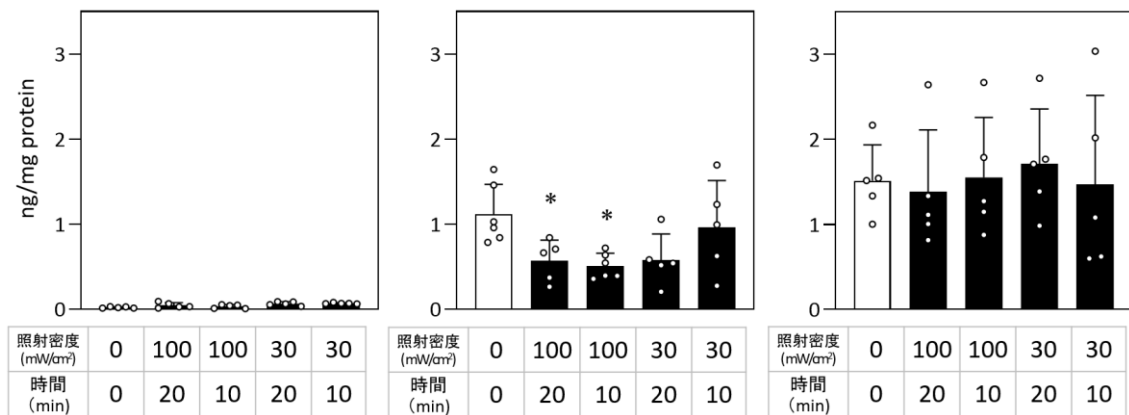


照射密度 (mW/cm ²)	0	100	100	30	30
時間 (min)	0	20	10	20	10

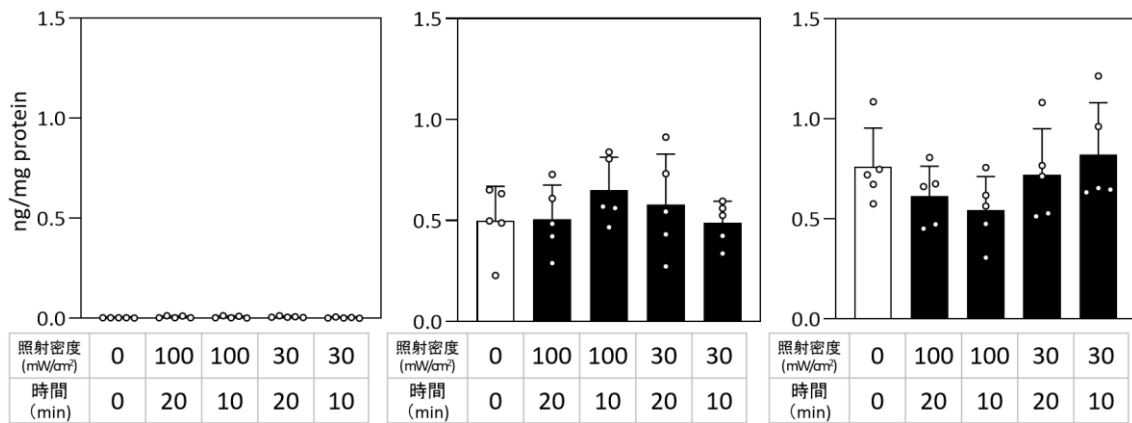
図 8 尋常性痤瘡膿瘍腔内に生じた囊腫壁の厚さの計測

(a) 5 日目採取群：5 日間照射直後の囊腫壁の厚さ (b) 8 日目採取群：5 日間照射し、72 時間の無照射期間後の囊腫壁の厚さ。各グラフの下に、それぞれの照射密度 (mW/cm²) と、照射時間 (min) を示す。5 つの独立した実験からの平均値±SD を示す。白丸は実際の計測値。*は、Dunnett の多重比較検定により、コントロール（無照射）群と比較した場合の有意差 (P < 0.05) を示す。

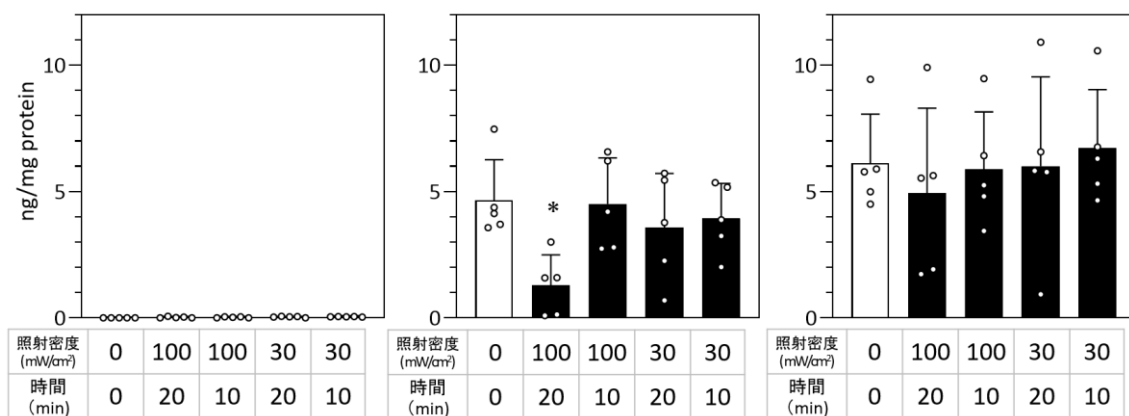
(a) IL-1 β



(b) IL-6



(c) MIP-2



(d) TNF- α

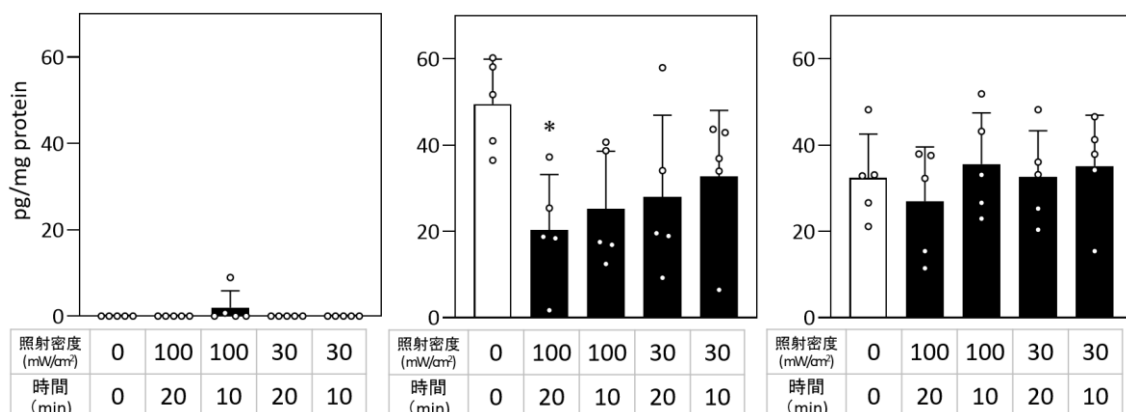


図9 炎症性サイトカイン量の計測

左：正常な皮膚に5日間連日照射した群。中央：マウスの背中に作製した尋常性痤瘡に5日間照射した群（5日目採取群）。右：マウスの背中に作製した尋常性痤瘡に5日間照射し72時間の無照射期間後に組織を採取した群（8日目採取群）。

各グラフの下に、それぞれの照射密度（mW/cm²）と、照射時間（min）を示す。1群あたり5匹、平均±SD。白丸は実際の計測値。*は、Dunnettの多重比較検定を用い、対照群に対して比較した場合の有意差（ $P < 0.05$ ）を示す。

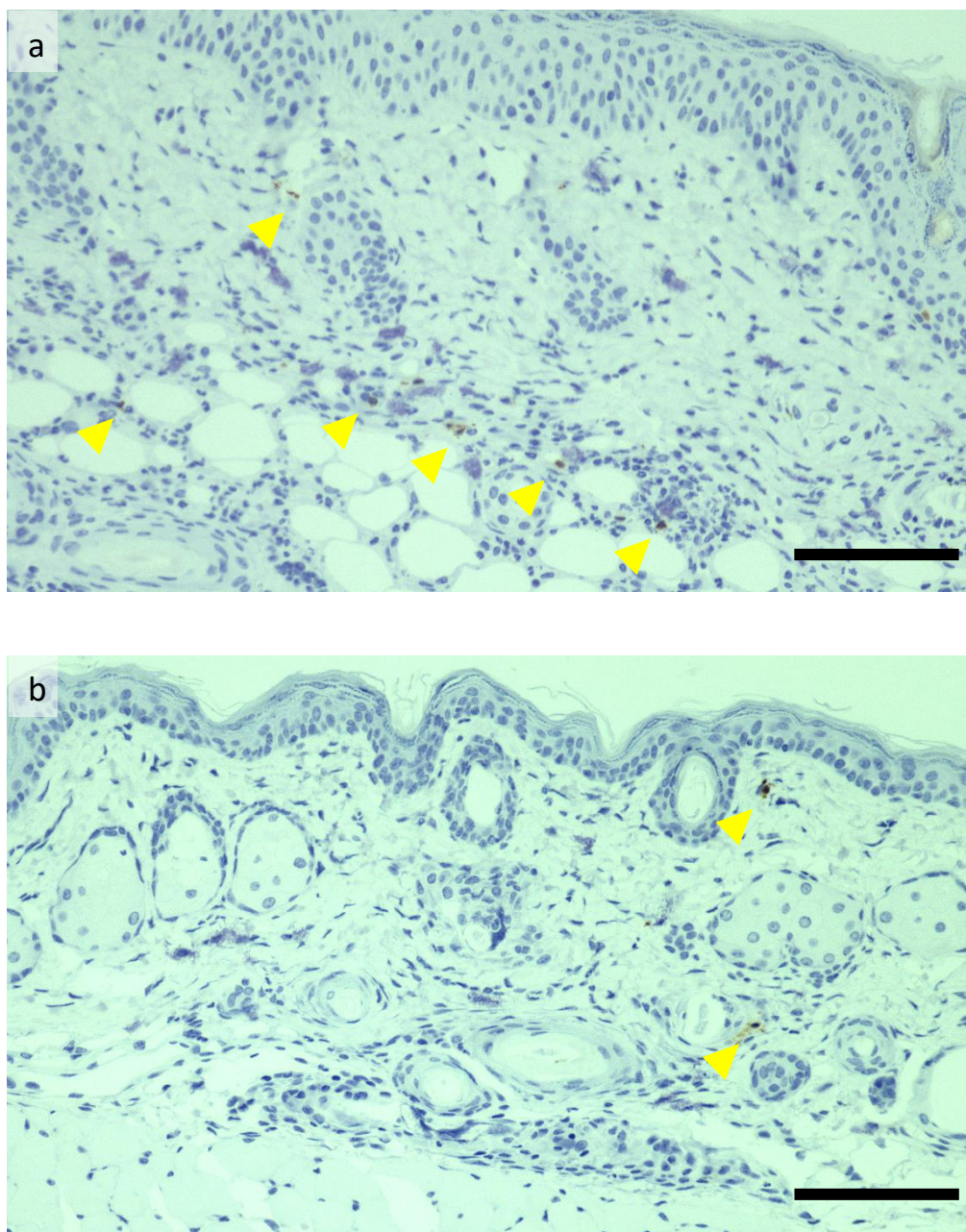


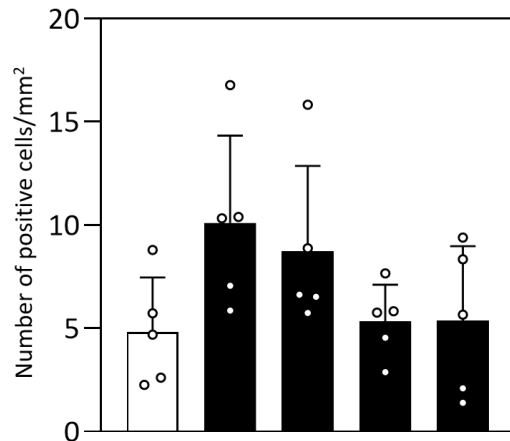
図 10 Cleaved caspase-3 免疫染色画像

(a) *Cutibacterium acnes* を皮下注射し、100 mW/cm², 20 分, 120 J を 5 日間照射した組織。

(b) 正常皮膚組織。黄色い矢印は、Cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞を示す。

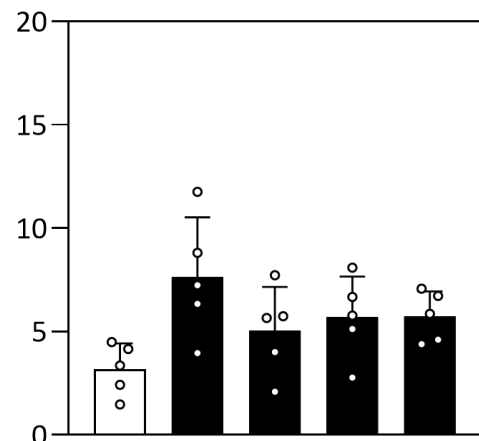
スケールバー = 100 μm

(a)



照射密度 (mW/cm ²)	0	100	100	30	30
時間 (min)	0	20	10	20	10

(b)

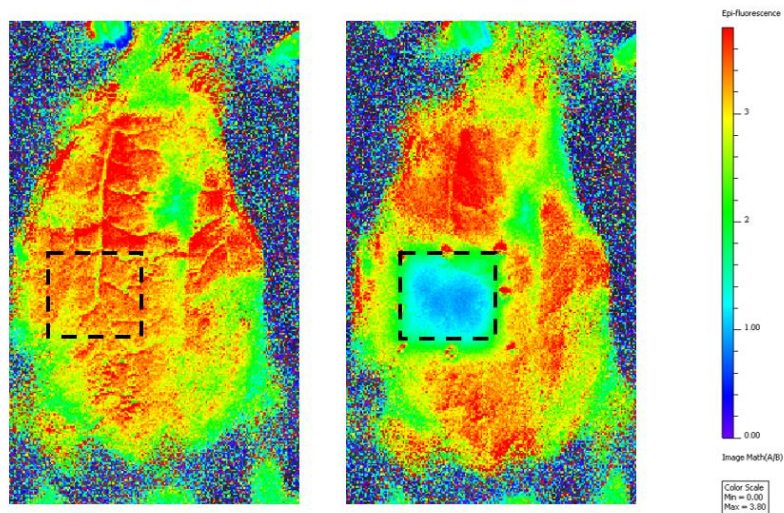


照射密度 (mW/cm ²)	0	100	100	30	30
時間 (min)	0	20	10	20	10

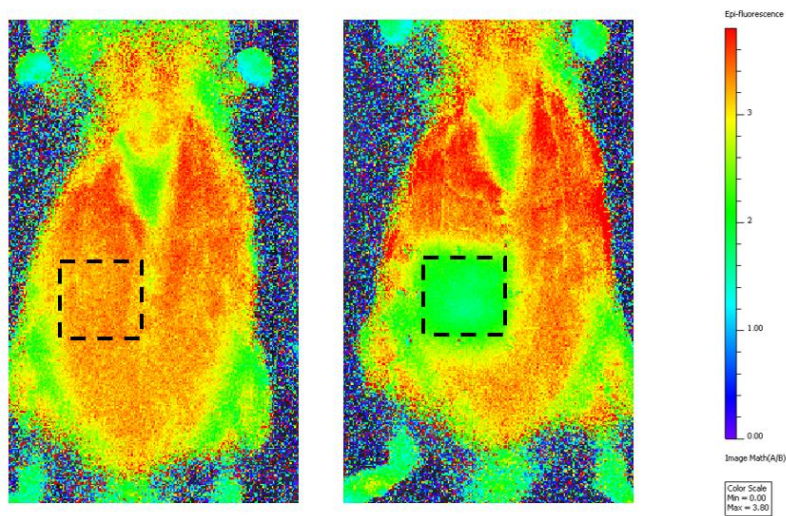
図 11 Cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞数

(a) *Cutibacterium. acnes* を注射した皮膚に青色光を 5 日間照射した後の Cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞数。(b) 正常皮膚に青色光を 5 日間照射した後の Cleaved caspase-3 免疫染色陽性細胞数。各グラフの下に、それぞれの照射密度 (mW/cm²) と、照射時間 (min) を示す。1 群あたり 5 匹、平均±SD。白丸は実際の計測値を示す。Dunnett の多重比較検定で解析したところ、全群で有意差はなかった。

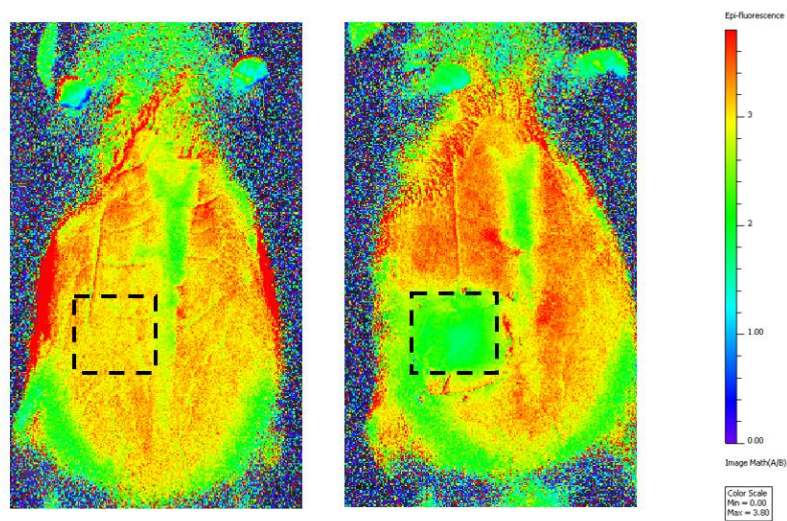
(a)



(b)



(c)



(d)

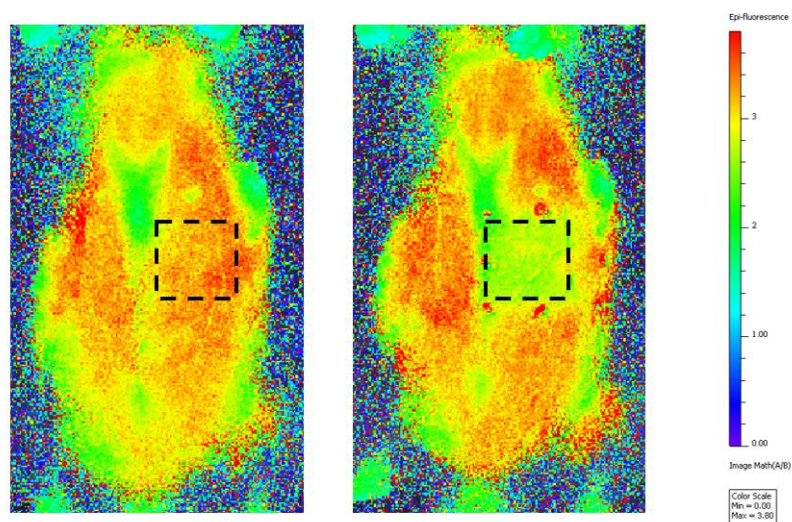


図 12 ATP 可視化マウスにおける青色光照射後の皮膚 ATP 量の変化

照射条件は (a) 100 mW/cm^2 , 20 分, 120 J、(b) 100 mW/cm^2 , 10 分, 60 J、(c) 30 mW/cm^2 , 20 分, 36 J、(d) 30 mW/cm^2 , 10 分, 18 J。左が照射前、右が照射後の画像。Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 比が高いことは、細胞内 ATP 量が高いことを示す。黒い点線で囲った部分は青色光を照射した領域を示す。

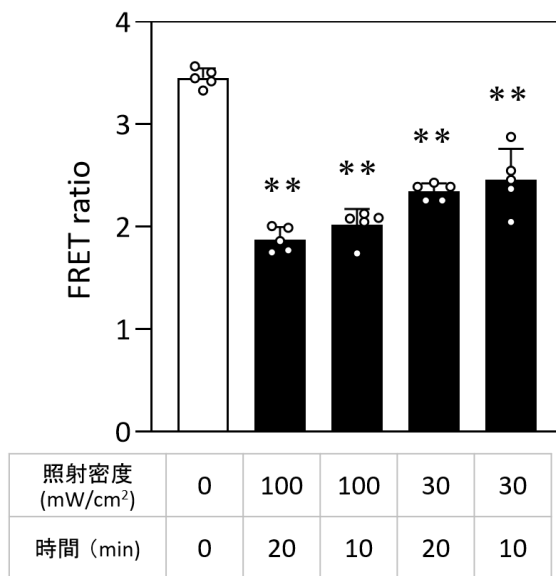
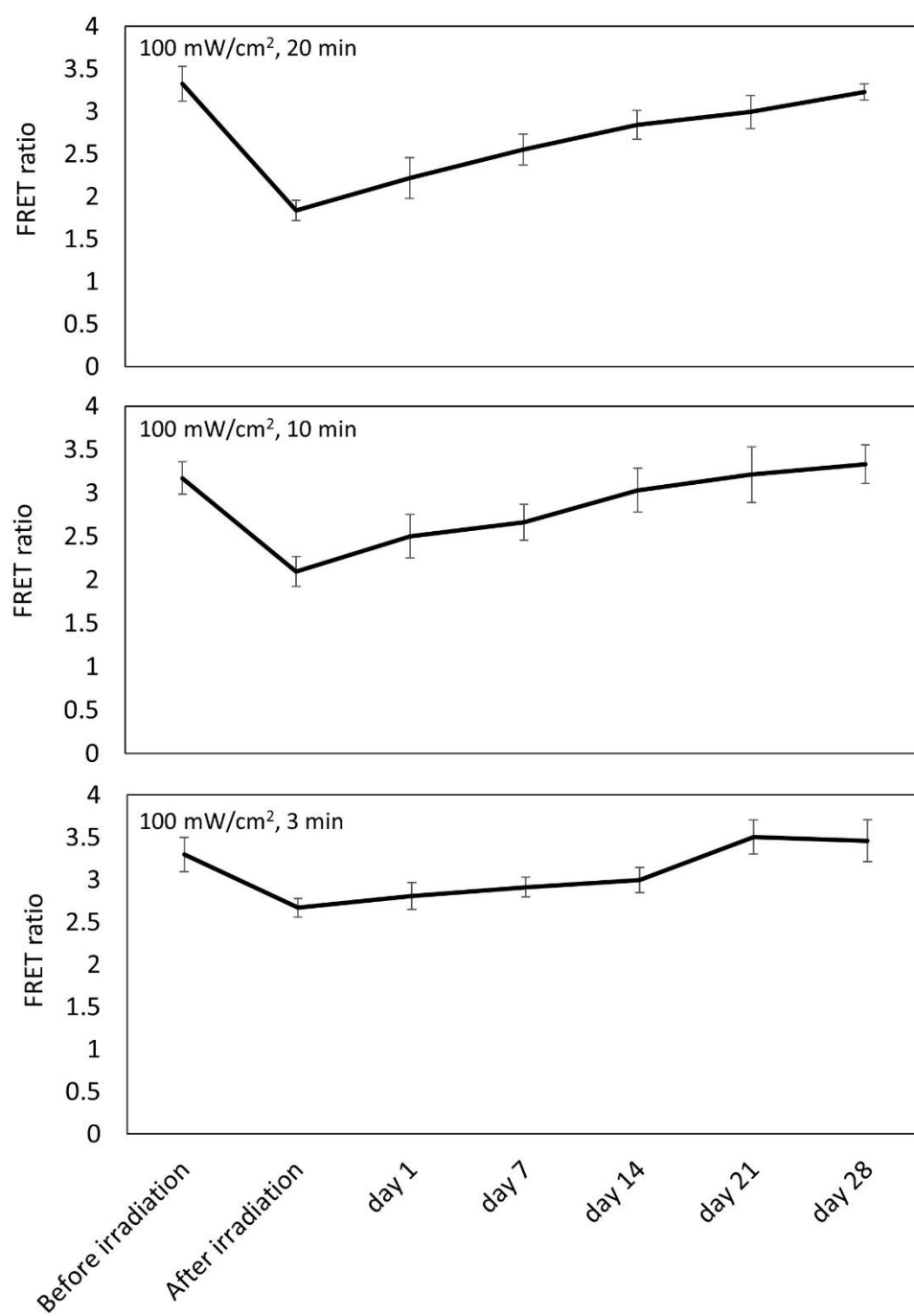


図 13 青色光を照射した前後の Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 比の比較

ATP 可視化マウスに青色光を照射した前後の FRET 比を計測した。各グラフの下に、それぞれの照射密度 (mW/cm²) と、照射時間 (min) を示す。1 群あたり 5 匹、平均±SD。白丸は実際の計測値。**は、Dunnett の多重比較検定を用い、対照群に対して比較した場合の有意差 (**P < 0.01) を示す。



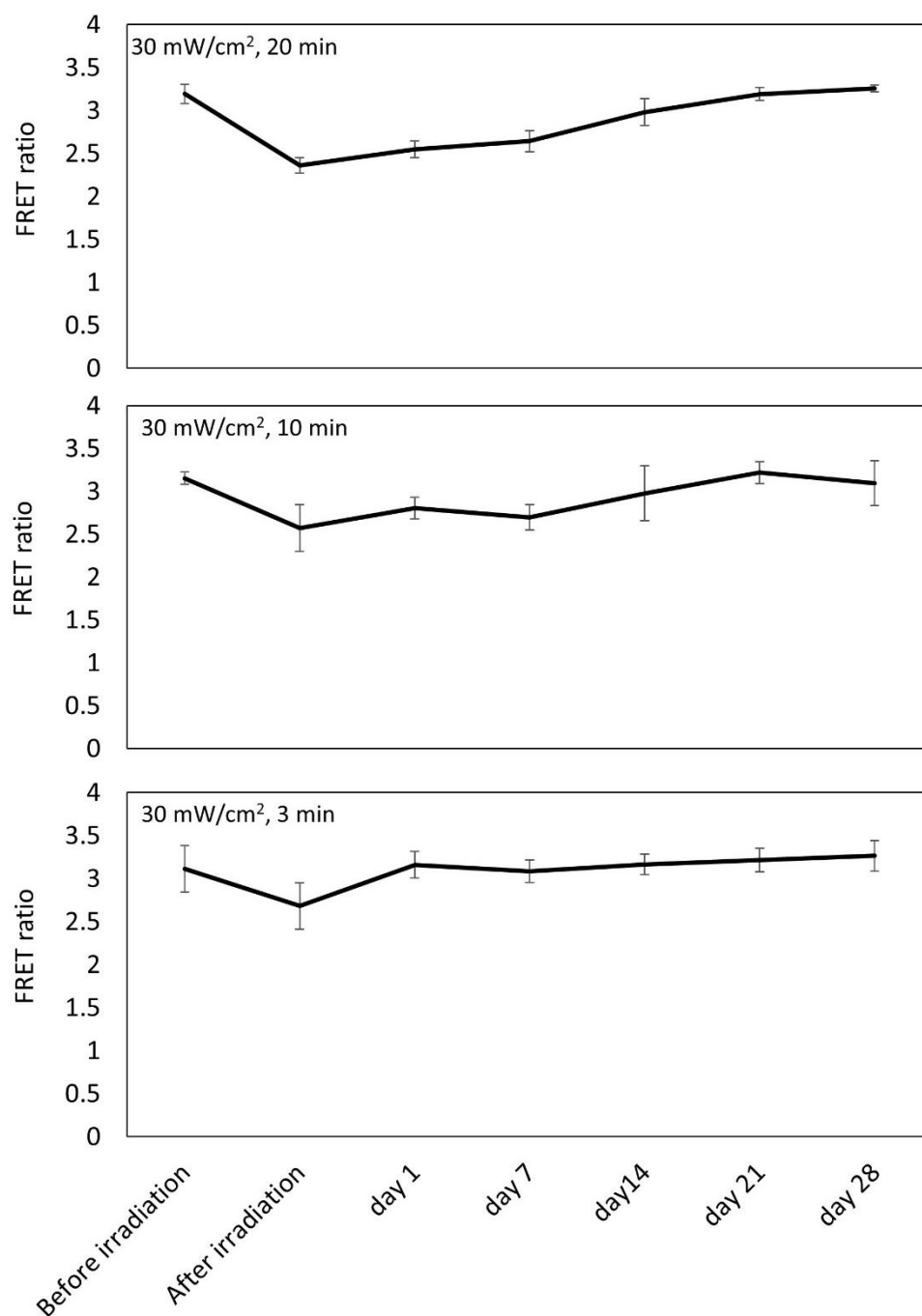
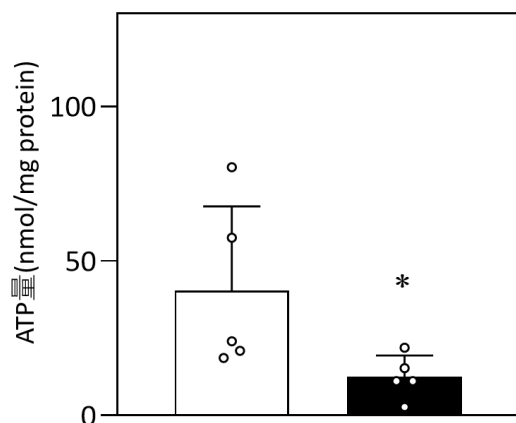


図 14 ATP 可視化マウスによる皮膚 ATP 量の経時的観察

ATP 可視化マウスに青色光を照射した際の Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 比の変化を経時的に観察した。照射条件は、各グラフの左上に示す。

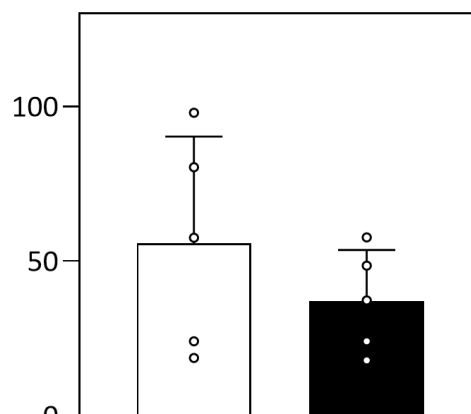
1 群あたり 3~5 匹、平均±SD。

(a)



照射密度 (mW/cm ²)	0	100
時間 (min)	0	20

(b)

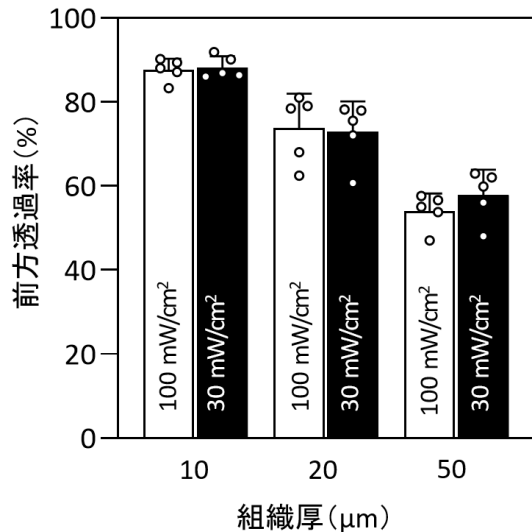


照射密度 (mW/cm ²)	0	30
時間 (min)	0	20

図 15 青色光照射後のマウス皮膚中の ATP 量

照射条件は (a) 100 mW/cm², 20 分, 120 J、(b) 30 mW/cm², 20 分, 36 J。ホタルルシフェラーゼ発光アッセイを使用して計測した、青色光照射後のマウス皮膚組織中の ATP 量。各グラフの下に、それぞれの照射密度 (mW/cm²) と、照射時間 (min) を示す。1 群あたり 5 匹、平均±SD。白丸は実際の計測値。*は、両側 t 検定を用いて比較した場合の有意差 (P < 0.05) を示す。

(a)



(b)

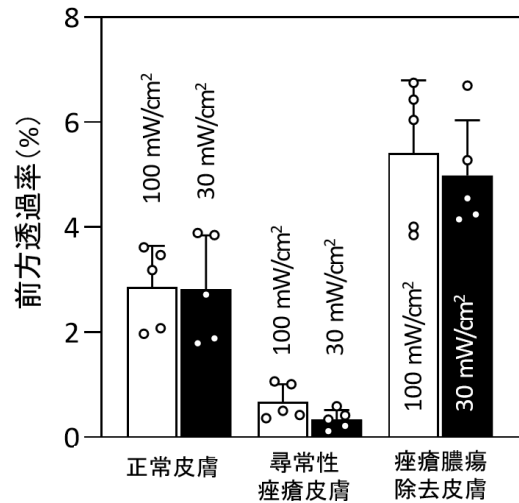
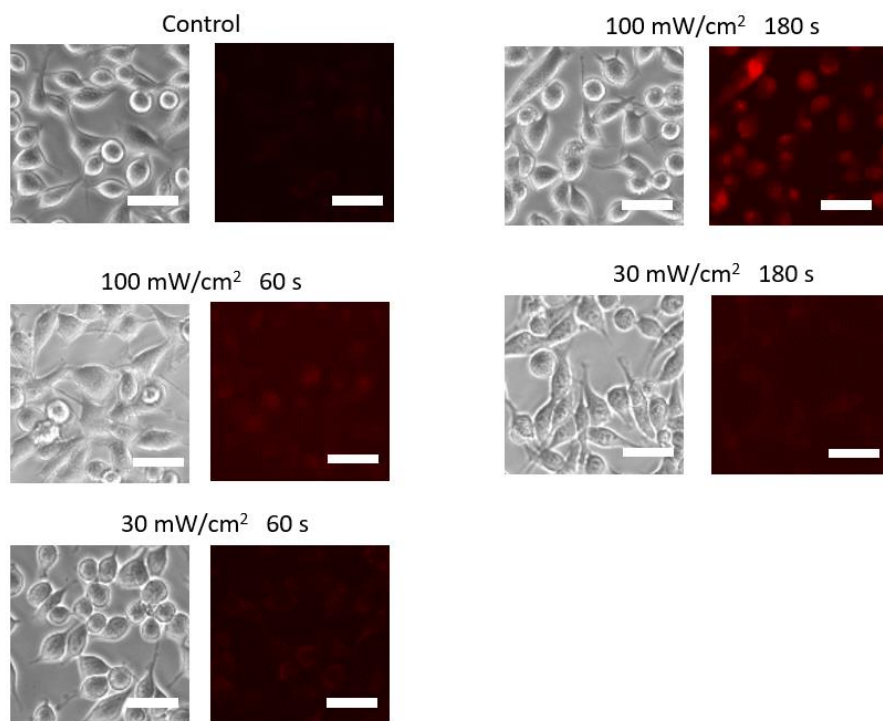


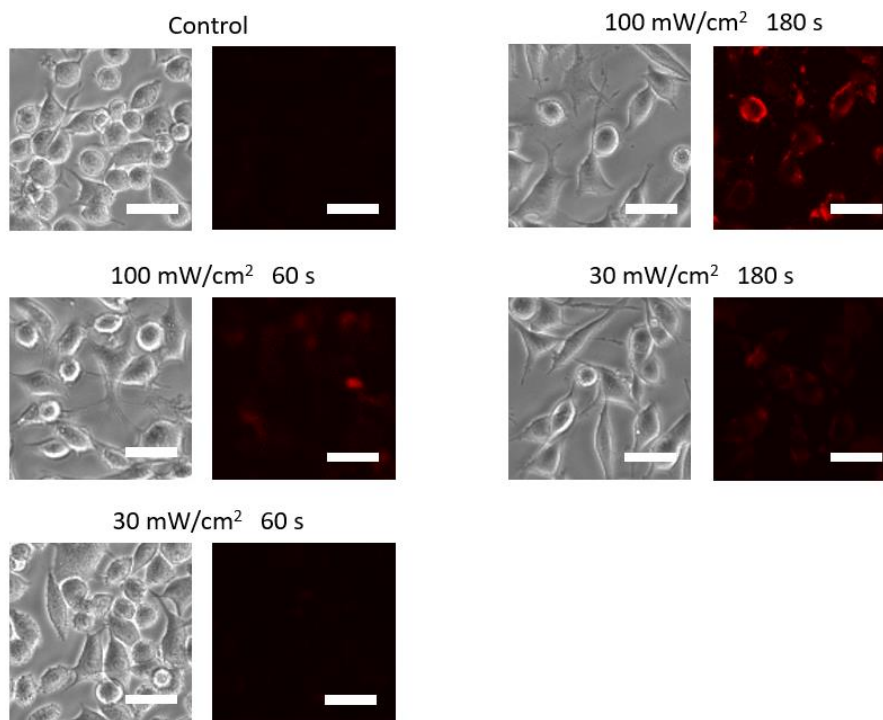
図 16 パワーメーターで計測した尋常性痤瘡膿瘍内容物とマウス皮膚における青色光の前方透過率

(a) 石英セルのみの透過率を 100%とした場合の尋常性痤瘡膿瘍内容物の透過率。石英セルに挟んだ組織厚は、10 μ m、20 μ m、50 μ m と設定した。照射密度は 100 mW/cm² または 30 mW/cm² とし、各棒グラフ上に記載した。(b) 正常皮膚、尋常性痤瘡皮膚、尋常性痤瘡膿瘍を除去した皮膚、における青色光の前方透過率。照射密度は 100 mW/cm² または 30 mW/cm² とし、各棒グラフ上に記載した。棒グラフは 5 つの独立した実験からの平均値 \pm SD。白丸は実際の計測値を示す。両側 t 検定により、各組織厚と各皮膚サンプルにおいて、照射密度間による透過率を比較したところ、有意差なし。

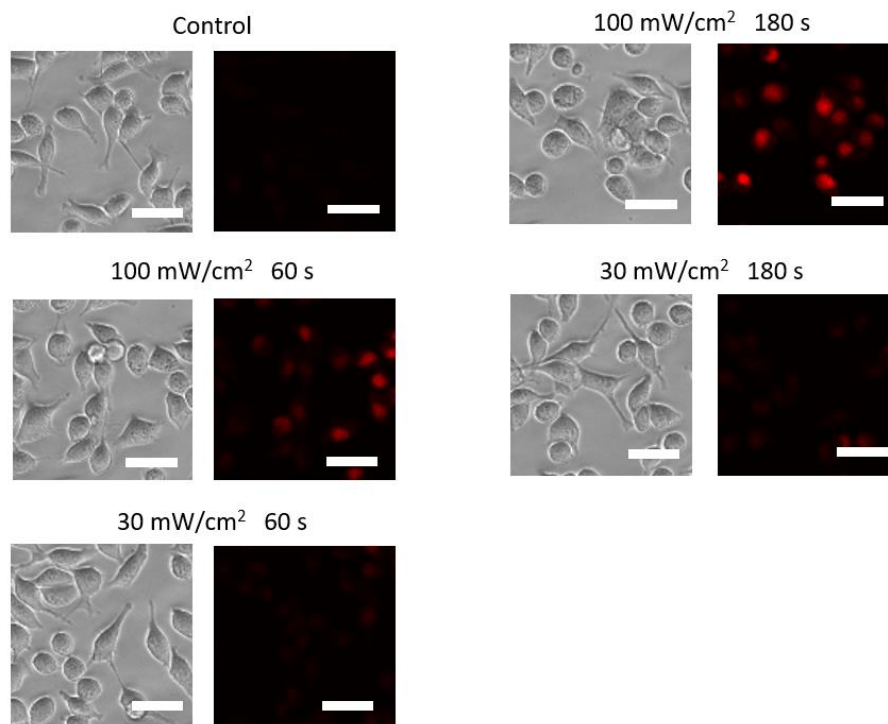
(a) OxiORANGE



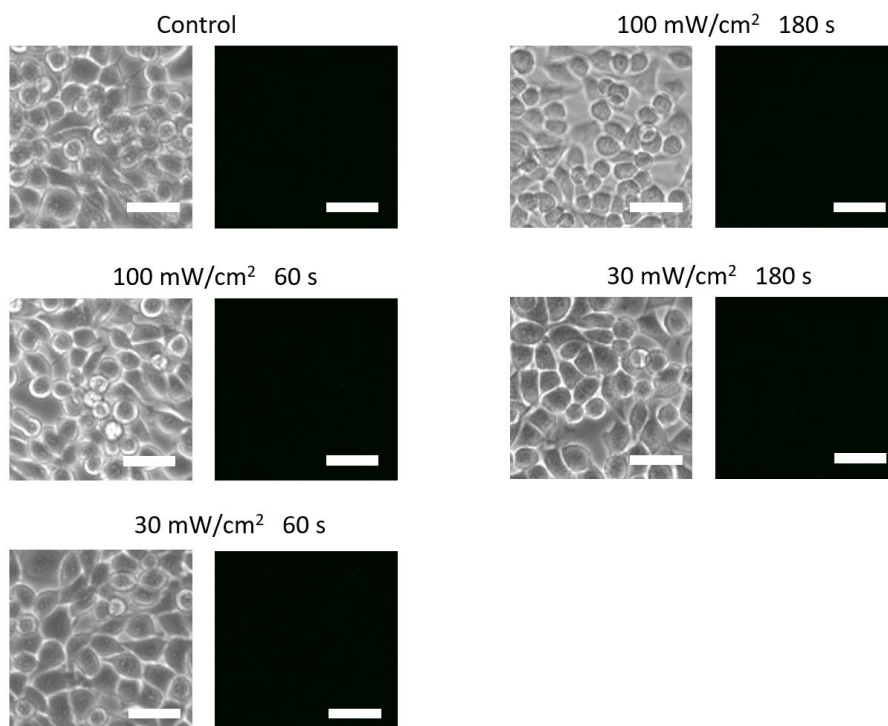
(b) HySOx



(c) Dihydroethidium



(d) Nitrixyte Red



(e) NiSPY-3

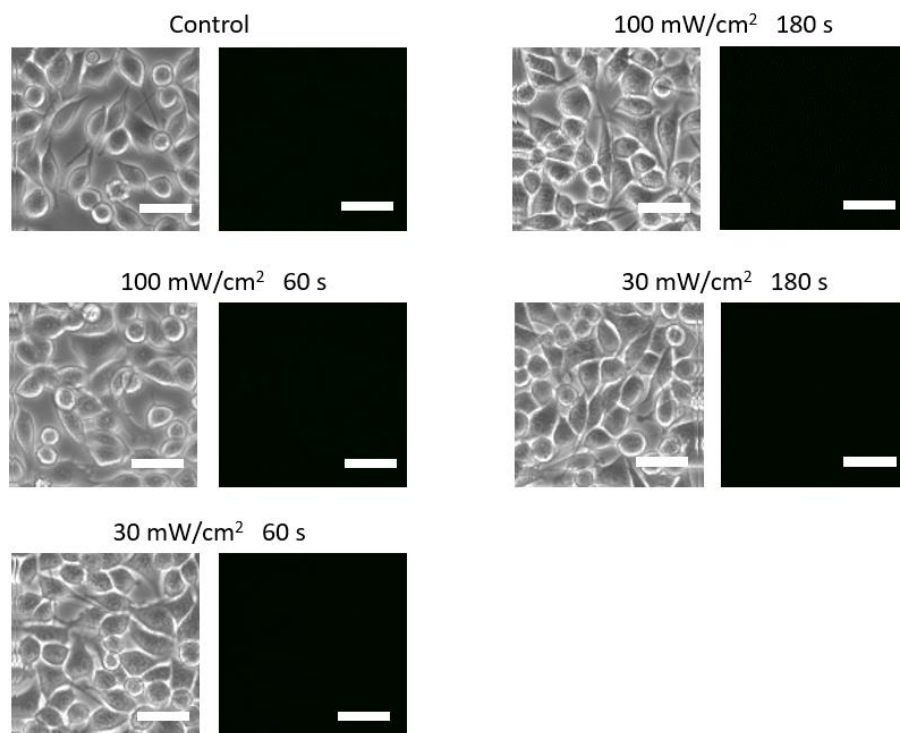
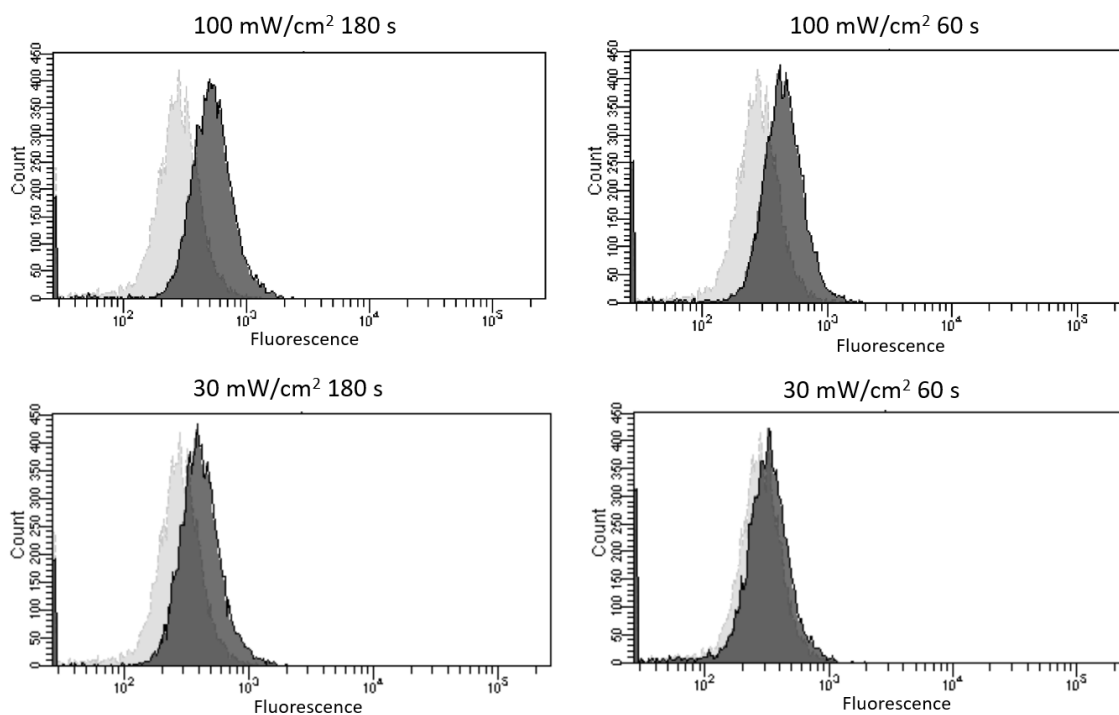


図 17 青色光照射による活性酸素種・活性窒素種の発生

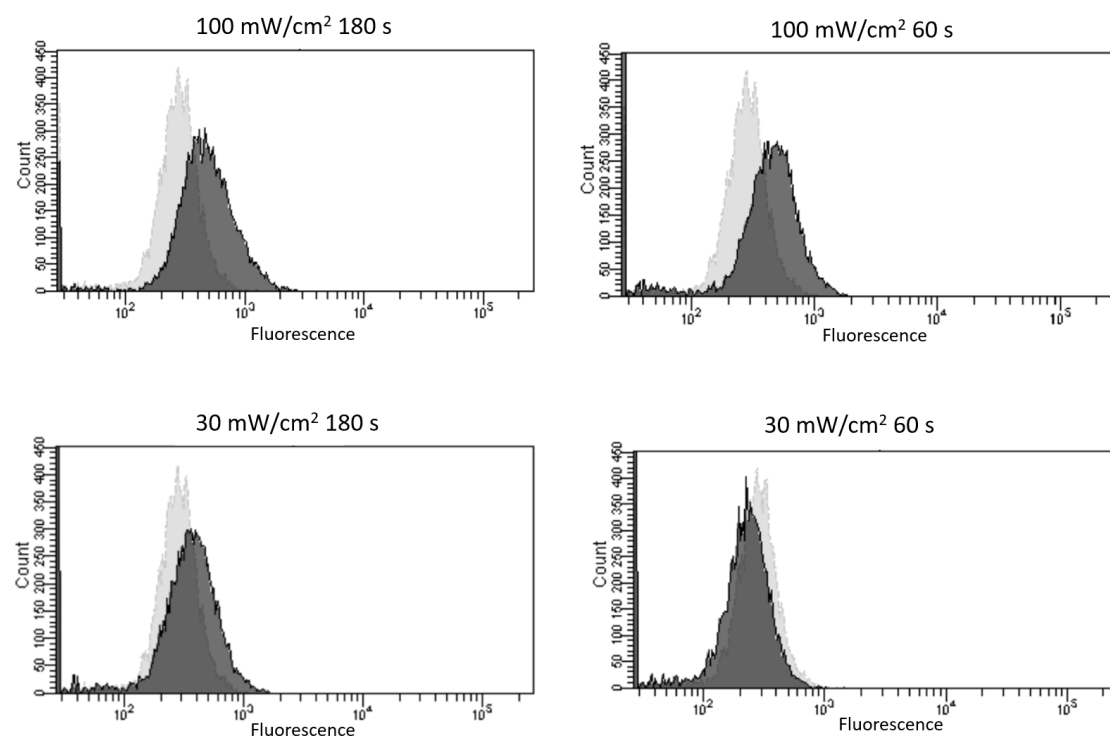
5 種類の蛍光プローブを L929 マウス線維芽細胞に取り込ませ、青色光を照射し、蛍光顕微鏡で活性酸素種と活性窒素種の発生を観察した。照射条件は各写真上に示した通り（コントロール；照射なし）。

スケールバー＝ 30 μ m

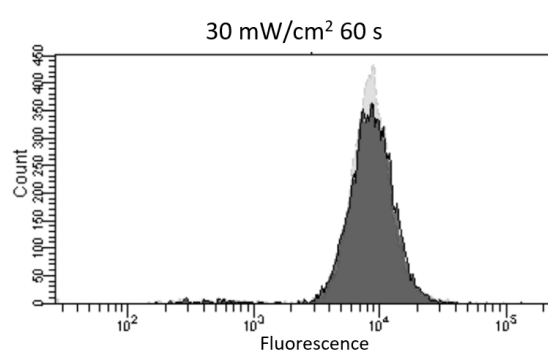
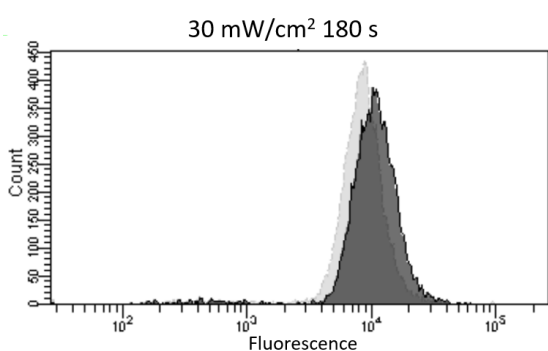
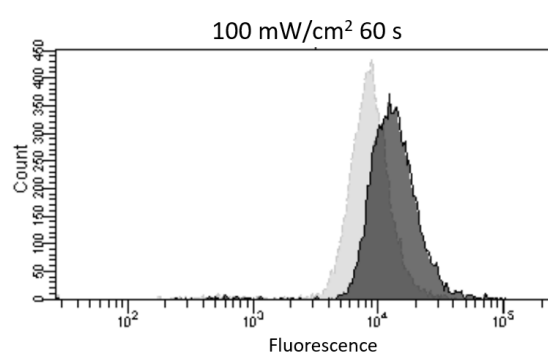
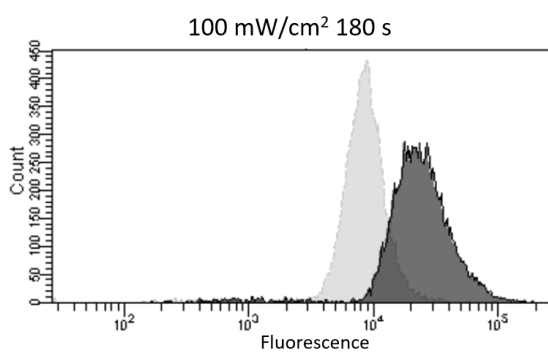
(a) OxiORANGE



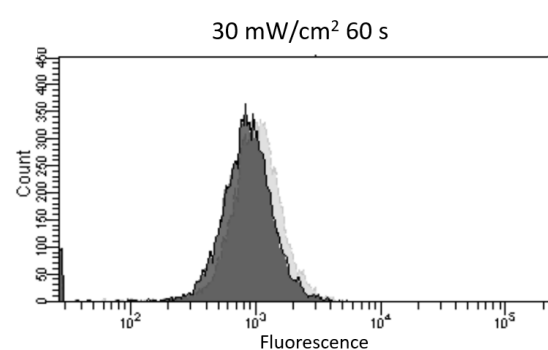
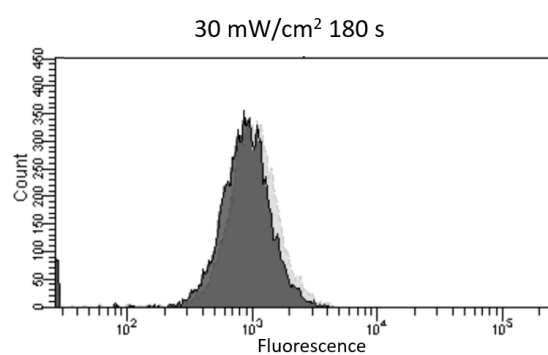
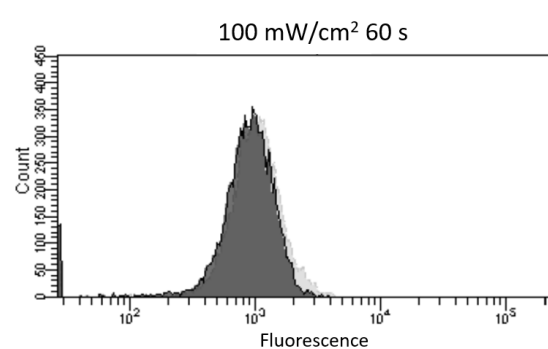
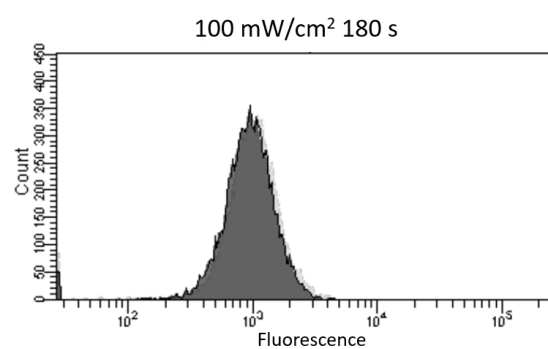
(b) HySOx



(c) Dihydroethidium



(d) Nitrixyte Red



(e) NiSPY-3

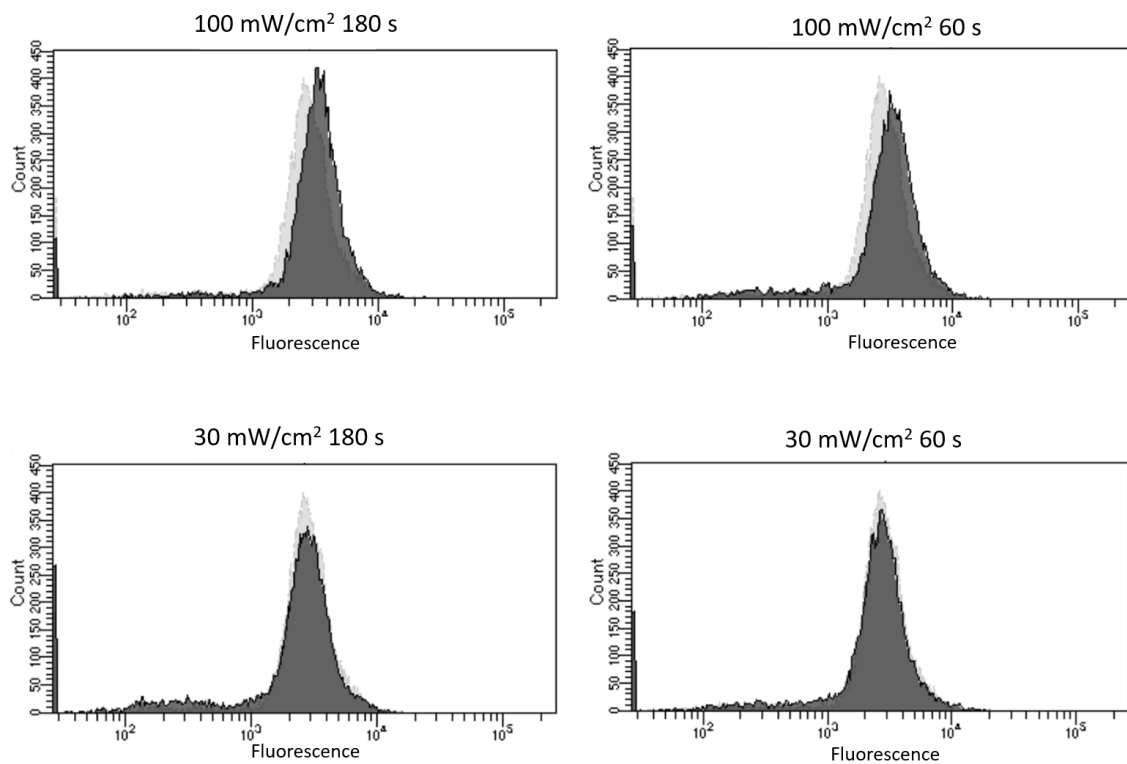
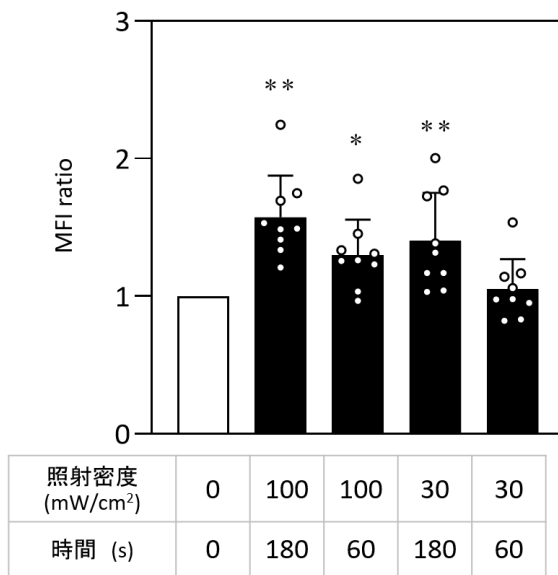


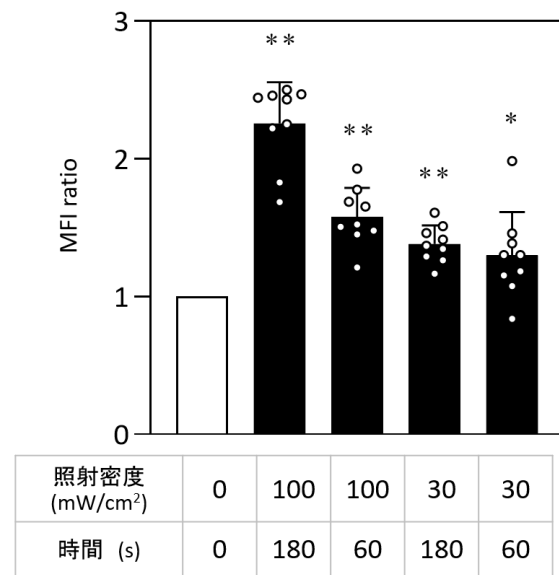
図 18 青色光照射後の細胞蛍光輝度変化（ヒストグラム）

5 種類の蛍光プローブを L929 マウス線維芽細胞に取り込ませて青色光を照射し、フローサイトメトリーで蛍光輝度を計測した。薄いグレーがコントロール（無照射）群、濃いグレーが照射群を示す。

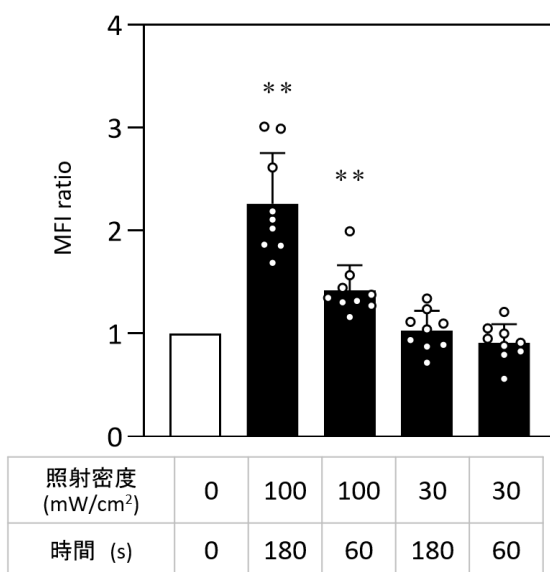
(a) OxiORANGE



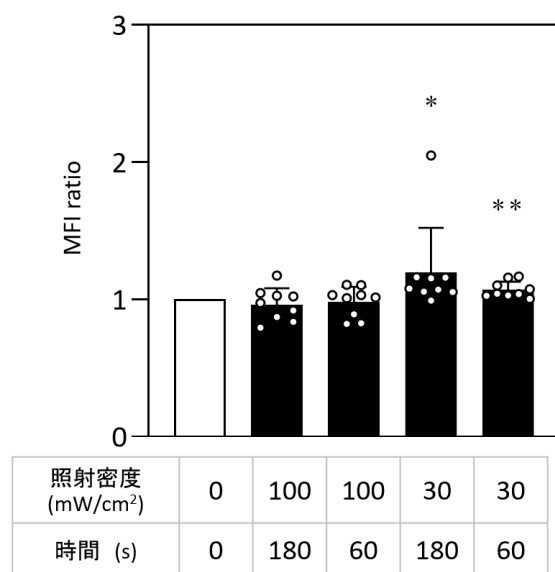
(b) HySOx



(c) Dihydroethidium



(d) Nitrixyte Red



(e) NiSPY-3

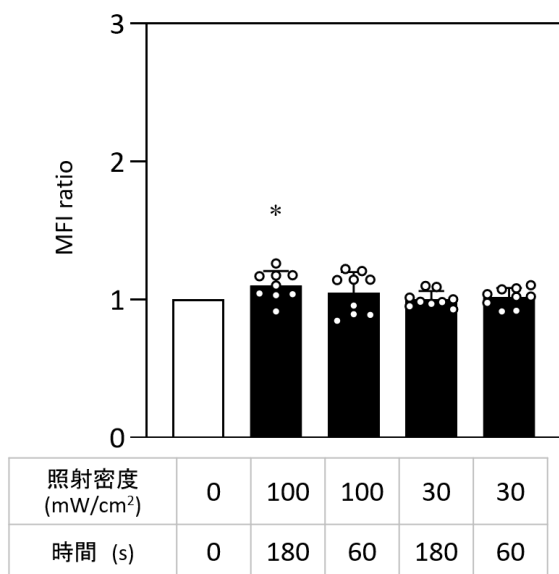


図 19 青色光照射後の平均蛍光輝度 (Mean fluorescence intensity ; MFI) 比

各グラフの下に、それぞれの照射密度 (mW/cm²) と、照射時間 (s) を示す。MFI 比は、照射細胞の MFI を無照射細胞の MFI で割って算出した。9 つの独立した実験からの平均 ±SD を示す。白丸は実際の計測値。*は、符号検定を用い、対照群に対して比較した場合の有意差 (*P < 0.05, **P < 0.01) を示す。

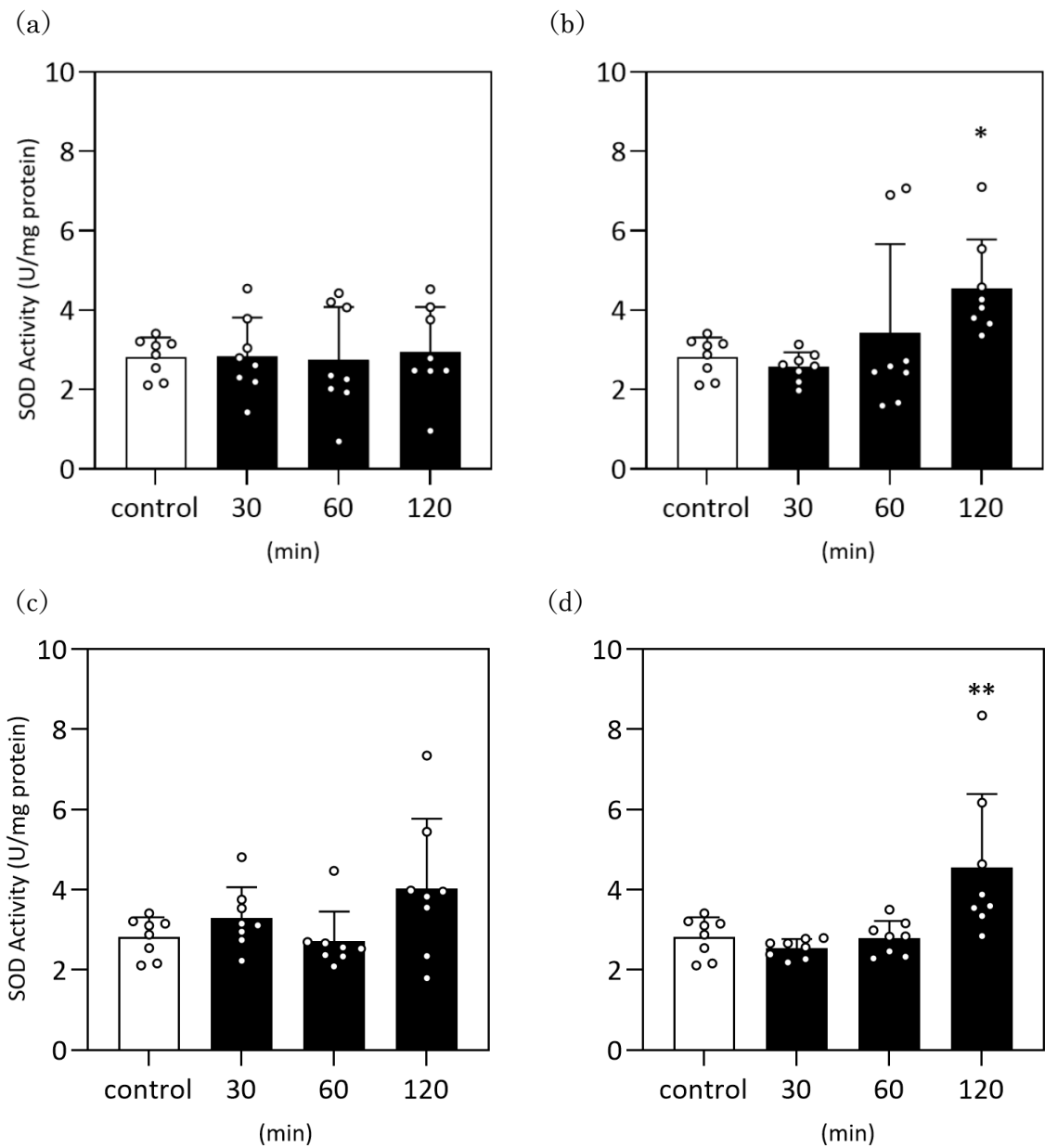


図 20 青色光照射後のスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase : SOD) 活性

照射条件は (a) 100 mW/cm², 180 秒, 18 J、(b) 100 mW/cm², 60 秒, 6 J、(c) 30 mW/cm², 180 秒, 5.4 J、(d) 30 mW/cm², 60 秒, 1.8 J。L929 マウス線維芽細胞に青色光を照射し、無照射(コントロール)、照射 30 分後、60 分後、120 分後に計測した SOD 活性(U/mg protein)。

8 つの独立した実験からの平均±SD を示す。白丸は実際の計測値。*は、Dunnett の多重比較検定を用い、対照群に対して比較した場合の有意差 (*P < 0.05, **P < 0.01) を示す。

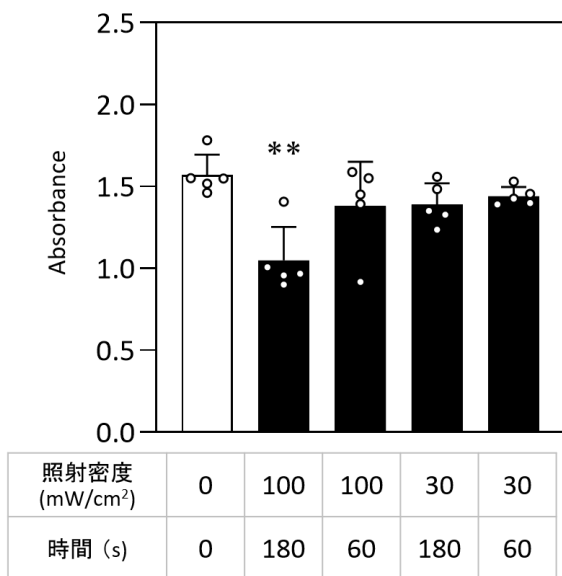


図 21 青色光照射後の細胞生存率

各グラフの下に、それぞれの照射密度 (mW/cm²) と、照射時間 (s) を示す。5 つの独立した実験からの、平均±SD を示す。白丸は実際の計測値、**は、Dunnett の多重比較検定を用い、対照群に対して比較した場合の有意差 ($P < 0.01$) を示す。