

超狭帯域 LED 光源の開発とその皮膚医学応用[†]

小笠原 正弘* 平尾 孝**, *** 藤田 静雄****

Development of Narrow Band LED Sources and Their Application to Dermatology

by

Masahiro OGASAWARA*, Takashi HIRAO**** and Shizuo FUJITA****

Key words:

Narrow-band LED (NB-LED), Laser diode (LD), Light source, Band-pass filter, Hair growth, m-RNA, Human dermal papilla cells, Wound healing

1 緒 言

半導体材料は、多くの場合応用の出口をターゲットに研究開発が進んできた。光通信に必要な 1.3~1.5 μm 帯のレーザダイオード(Laser Diode; LD)をターゲットとした InGaAsP 系混晶半導体の開発、超高周波数帯域の信号処理をターゲットとした高移動度トランジスタ(High Electron Mobility Transistor; HEMT)をターゲットとした AlGaAs 系半導体ヘテロ構造の開発、青色発光ダイオード(Light Emitting Diode; LED)をターゲットとした GaN 系半導体の開発、などがその代表的な例である。いわば時代の進歩とともに新しいターゲットが生まれ、それに向けた新しい半導体材料の研究開発が繰り返され、新しいデバイスを生み、これが材料科学の進展に大きな寄与をなしてきたといえる。

本稿では、医療の観点で材料科学の研究者に目指していただきたいターゲットを紹介したい。具体的には多様な波長領域で超狭帯域の LED 光源である。このような光は細胞を刺激してある種の RNA の変化、蛋白質の分泌を促すことが実験的に明らかになっている。この現象は、医療や生化学の広い分野で今後波及効果をもたらすのではないかと考えられ、材料科学と医学のマッチングでこれに向かってゆくことが出来れば幸いと考えている。

2 光の医学応用

光療法が一科学として知られるようになったのは、デンマークの N. R. Finsen が真性皮膚結核の紫外線療法で 1903 年にノーベル医学生理学賞を授与されてからである。また 1958 年には、イギリスの R. J. Cremer が新生児黄疸に対して光線治療が有益なことを見出した¹⁾。その後 LD, LED を中心とする発光デバイスの進展とともに、それら

の医学、特に皮膚科領域への医学応用が実用化され、研究も活発化している。

これまでの研究で、低レベルレーザ照射が毛成長を促進する事が報告されており^{2,3)}、2007 年には米国 FDA により赤色レーザによる育毛器が認可されている。しかしレーザ光は単色光で直進性が高く大面積照射には適しておらず、体表への照射においてより安全で照射面積の広い照射手段が求められる。一方 LED による光治療は、その安全性から美容皮膚科学の領域でも注目され応用が活発化してきている。LED は 400~800nm の可視光線から紫外線や近赤外線などの広い波長領域を各種化合物半導体の組み合わせから発光させ得る。しかし LED は LD と異なり偏光や位相がランダムであり、スペクトル分布も広い。

このような背景の下で、本稿の筆頭著者である小笠原は、LD 光と同様なエネルギー密度と波長効果を持ち、非侵襲的で安全かつ大面積照射を可能ならしめる光源として超狭帯域 LED 照射装置を開発してきた。これにより皮膚科領域などの医学応用に適用できる可能性に着目し、男性型脱毛症に対して超狭帯域光を照射し有効な臨床結果を報告した⁴⁾。さらに、赤緑青三色の高輝度 LED を平行光にして、さらにバンドパスフィルタを用い、半値幅約 10nm の超狭帯域スペクトルを持つ超狭帯域 LED 照射技術及び装置を毛髪再生及び創傷治療に適用すべく、大阪大学との共同研究を行い、臨床実験と細胞を対象とした生化学的実験の両方でその効果が実証されてきた⁵⁻⁷⁾。以下、これら一連の研究結果を解説し、材料科学分野の多くの研究者のご協力をいただきながら、さらに将来における波及効果につなげて行きたい。

[†] 原稿受理 平成26年3月18日 Received Mar. 18, 2014 ©2015 The Society of Materials Science, Japan

* ミニオンベルクリニック 〒532-0011 大阪市淀川区西中島
Mignon Belle Clinic, Yodogawa-ku, Osaka 532-0011.

** 高知工科大学 〒782-0003 香美市土佐山田町宮ノ口
Kochi Univ. Tech., Kami 782-0003.

*** 京都大学 工学研究科 光・電子理工学教育研究センター 〒615-8520 京都市西京区京都大学桂
Photonics and Electronics Science and Engineering Center, Kyoto Univ., Nishikyo-ku, Kyoto 615-8520

**** 正 会 員 京都大学 工学研究科 光・電子理工学教育研究センター 〒615-8520 京都市西京区京都大学桂
Photonics and Electronics Science and Engineering Center, Kyoto Univ., Nishikyo-ku, Kyoto 615-8520.

3 超狭帯域 LED 光源

光源には、市販の高輝度 LED を用いた。赤色として AlGaAs 系ダブルヘテロ接合構造、緑色として GaP 系ホモ接合、青色として InGaN 系量子井戸構造をそれぞれ持つ、高輝度 LED を用いている。

本研究では LED 光から、光学多層薄膜によるバンドパスフィルタを用いて超狭帯域 LED 光源を作製した。本光源の構造は、上述のバンドパスフィルタの性能を最大限活かすために、チップタイプの LED の前方に設置した光学レンズで LED 光の指向角範囲を一定値以下に狭めてからバンドパスフィルタに入射させ、さらに射出後の光照射範囲を再び拡大するために球面両凹レンズを取り付けている。

上記の構造を持ち、赤緑青 3 色のいずれか、もしくはいずれかを組み合わせた光を照射し、医学応用可能な装置を開発した (Mignon belle LT-1 Crystalline)。1 回の治療・施術時間を患者が受忍できる 20 分照射とし、また光源から照射箇所までの距離が 10 cm となるようにした。LED の強度は、臨床および動物実験の結果から 20 分間の照射で効果が見られるよう調整した。照射波長および 20 分間の照射量は、青: 456 ± 5 nm, 0.3 J/cm^2 , 緑: 518 ± 4 nm, 0.2 J/cm^2 , 赤: 638 ± 5 nm, 0.6 J/cm^2 である。

4 超狭帯域 LED 光源の医学応用

4・1 狭帯域光照射の発毛育毛効果⁴⁾

狭帯域のスペクトルを持つ光の照射が生体細胞の活性化に強い影響を与えることを確認するために、頭皮の脱毛を認める 29 才から 59 才(平均 48.2 才)の男性モニター 10 名を対象に、赤緑青の狭帯域光の発毛育毛効果について検討した。赤緑青 3 色の高輝度 LED を平行光とし、さらにバンドパスフィルタと拡散レンズを用い、半値幅 10nm の狭帯域スペクトルをもつ光を照射で得る装置を開発した。光量の関係から赤の光源ユニットは 3 個、緑と青は 4 個とし、これら 11 個の光源ユニットを光軸をやや中央よりにして平面状に配列した。照射の回数は週 1~3 回で、期間は 3~8 ヶ月であった。脱毛により頭皮の見える領域の 25%以上の低下を有効、50%以上の低下を著効、90%以上の低下を治療とした。モニターは頭皮に対し育毛剤の使用や、毛穴の詰まりを取り除く等の特別な処置は一切せず、日常生活は普段通りとした。

この結果、10 名すべてに毛髪の増加を認め、有効率 100%, 著効 70%, 治療 30%であった。

4・2 超狭帯域赤色 LED の毛乳頭細胞に及ぼす影響^{5),6)}

育毛の起源は頭皮の表面から 3~5mm の深さにある毛母細胞にあり、これが細胞分裂を繰り返して髪を作る。また毛母細胞の先端にある毛乳頭が神経伝達物質や栄養を受け取り、毛母細胞の活動を促す。したがって、発毛のためには毛母細胞を刺激し、活性化させることが必要である。青色光の皮膚中への深達度は 0.5 mm 程度で、毛乳頭には達しない。一方赤色光は毛乳頭に達する十分の深

達度を持つことから、発毛に寄与しているのは赤色光であると考えられる。

この考えに基づき、細胞への狭帯域赤色 LED 光の照射効果に関して、分子生物学的メカニズムに対する検討を行った。照射量は in vivo で 1.0 J/cm^2 , in vitro で 1.5 J/cm^2 とした。7 週齢の雌 BL-6 マウスの背部を剃毛し、次の日 (day1) に 638 nm の超狭帯域赤色 LED 1.0 J/cm^2 の照射を始め、週に 3 回照射を続けた。又コントロール群には LED 照射以外には麻酔など毎回同じ処置を加えた。

Day1, 11, 18, 22, 27 に撮影した写真から毛成長面積の割合を計算した。写真の例を Fig. 1 に、計算の結果を Fig. 2 に示す。これから超狭帯域赤色 LED で day18, 22 において有意に毛成長が促進されていることが明らかにされた。

次に細胞レベルで LED 照射の効果を調べるため、まず正常ヒト毛乳頭細胞を培養用培地(10%FCS-DMEM)を用いて、37°C, CO₂濃度 5%のもとで、35mm 径の培養皿で subconfluency (培養皿の半分程度に増殖した状態) になる

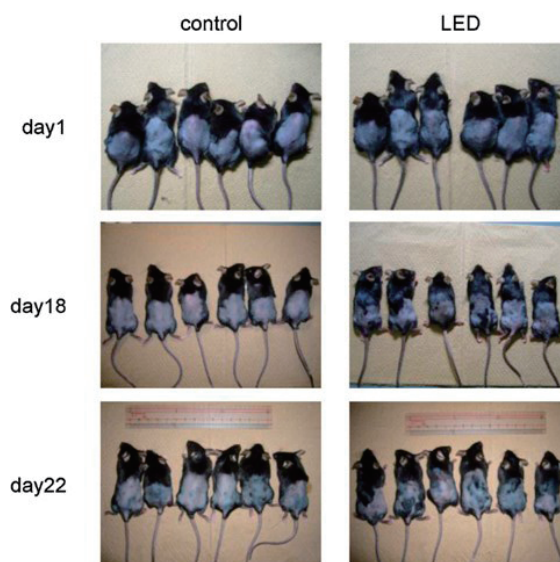


Fig.1 Results of In vivo hair regrowth study. Photographs of the hair regrowth areas of 7-week-old female mice, whose dorsal hair was shaved off on the first day and subjected to either 638 nm narrow-band LED irradiation or not⁵⁾.

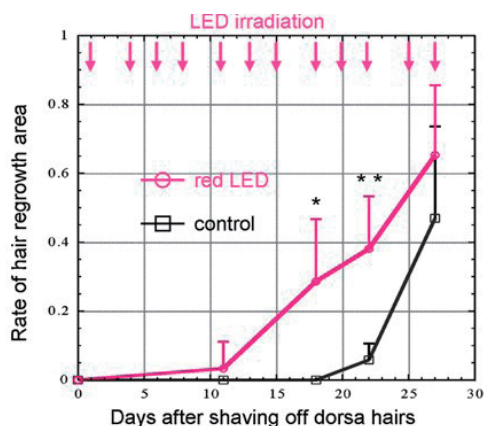


Fig.2 Variation of the hair regrowth area calculated from the photographs as shown in Fig.1⁵⁾.

まで培養し、その後培地をフェノールレッド不含 DMEM に置き換えたものを準備した。この培養皿の底面より 10cm の位置より狭帯域 LED を 20 分間照射し、照射直後、4 時間後、8 時間後、24 時間後に RNA を抽出し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: RT-PCR) 法を用いて細胞増殖因子、炎症性サイトカインなどの mRNA を半定量的に測定した。LED からの照射量は 1.5 J/cm^2 である。

Fig. 3 に RT-PCR 法による測定結果を示す。測定の対象としたのは、毛成長に影響を及ぼすことが知られている細胞増殖因子 FGF-2, HGF, IGF-1, KGF, Leptin, VEGF-A, TGF- β 1, 炎症性サイトカイン IL-1a, IL-6, IL-8, TNF- α である。ハウスキーピング遺伝子 (細胞の生存・維持に関わり、どの細胞でも常に一定量発現している遺伝子) のひとつである GAPDH を強度の参照とした。その結果、超狭帯域赤色 LED 照射によって HGF, Leptin, VEGF-A の mRNA は増加し、TNF- α mRNA は減少している事が分かった。これらサイトカインの毛成長に対する役割を Table 1 に示す。このように、サイトカインの mRNA 発現量が変化し、蛋白レベルの詳細な解析が必要であるが、狭帯域 LED の照射により細胞から分泌されるサイトカインレベルが上昇し、毛成長を促進される可能性が分子生物学に示唆された。

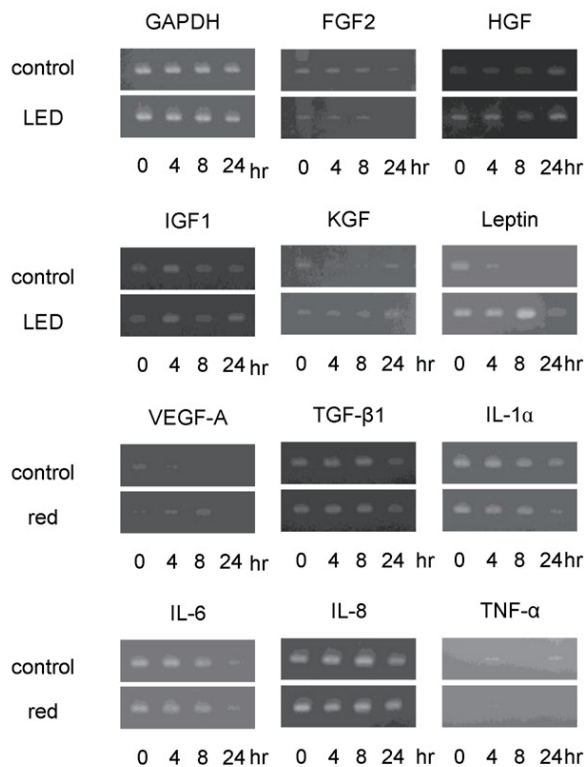


Fig.3 mRNA expression levels of growth factors (FGF-2, HGF, IGF-1, KGF, Leptin, TGF- β 1 and VEGF-A), and inflammatory cytokines (IL-1-a, IL-6, IL-8 and TNF-a) by semi-quantitative RT-PCR. GAPDH was used as a loading control⁵⁾.

Table 1 Role of various cytokines for hair growth.

HGF (Hepatocyte Growth Factor)	成長期誘導・維持
IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1)	器官形成, 成長期維持
Leptin	成長期誘導
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	毛包の血管新生を促進
TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)	成長期抑制・退行期誘導

更にこれら mRNA レベルの変化が蛋白質レベルでもおきているかどうかを調べるため、培養ヒト乳頭細胞に超狭帯域赤色 LED 1.0 J/cm^2 の照射を連続 3 日間行い、照射 24 時間後培養上清を回収して、Fig. 3 に示した実験で mRNA の変化があった HGF, Leptin, VEGF-A, TNF- α の因子について、酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA) により培養上清中の濃度の変化を調べた。結果を Fig. 4 に示す。HGF, Leptin, VEGF-A の濃度は超狭帯域赤色 LED 照射により有意に上昇し、TNF- α については有意な変化がなかったことが分かる。

以上の結果から、超狭帯域赤色 LED 照射は Fig. 5 にモデル的に示したように、毛乳頭細胞からの HGF, Leptin, VEGF-A の分泌を刺激し、毛成長を促進することが分子生物学レベルで検証された。

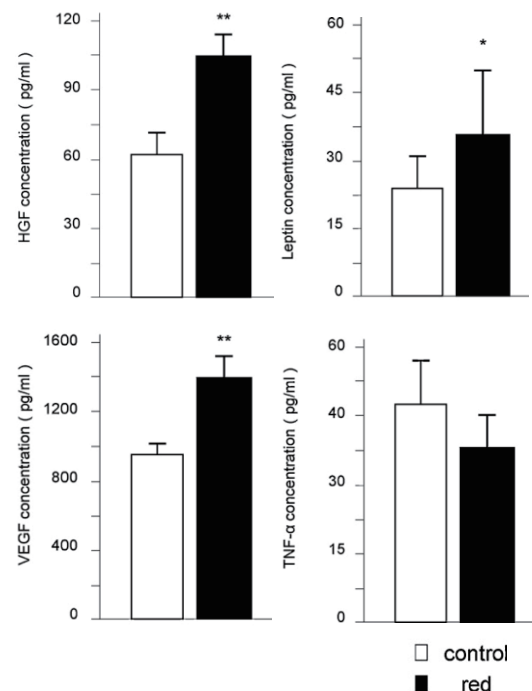


Fig.4 Variations of protein levels of growth factors and cytokines whose expression of mRNA levels were modified according to the RT-PCR performed as mentioned in Fig.3. We utilized human ELISA kits for each factor (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. Data are means $\pm$ S.D. of 4 independent experiments. * $p < 0.03$, ** $p < 0.0003$ as compared with the control group⁵⁾.

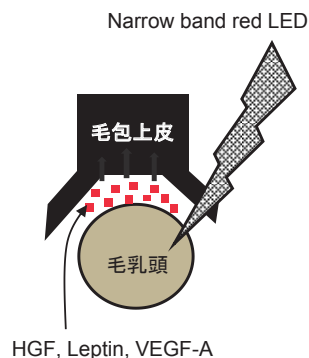


Fig.5 A model of hair growth under narrow-band red LED irradiation.

4・3 超狭帯域緑色 LED による創傷治癒⁷⁾

緑色 LED 光は、皮膚への深達度が赤色 LED 光に対して小さい。そのため皮膚の表面近くの細胞に効果を持ちうる。先に示した方法と同じ RT-PCR 法を用いて、mRNA 解析と ELISA 法により蛋白質レベル解析を行い、超狭帯域緑色 LED 照射により創傷治癒が加速されることを分子メカニズムレベルで解析した、医学的内容に立ち入るため詳細はここでは省略するが、文献 6)をご参照いただきたい。

5 超狭帯域 LED 光の特徴に関する定性的考察

以上、超狭帯域 LED の医学応用について述べたが、なぜ超狭帯域光が効果的なのか、広帯域光ではダメなのか、という点には触れなかった。これは非常に重要な命題で、これまでは実験の制限上明確な実証には至っていないが、今後、照射光の帯域幅を変化させつつ生化学的な実験を行ってゆく予定である。しかし、次の 2 つの理由から、超狭帯域光が効果的であると現時点で考えている。

一つは、臨床および実験に用いた光強度が、自然界における光強度に比べて低いということである。AM1.5 太陽光のもとで赤色領域における半値幅 10nm の光強度は約 1.3 mW/cm²であるから、1 時間外出することで 4.7 J/cm²もの照射量を受けることになる。これは臨床に用いた照射量に比べると多い。つまり、ヒトが自然界で浴びている量よりも少ない光を「あえて狭帯域のみ選択して」浴びることで効果が得られているのである。逆に言えば、広帯域の光で効果があるのなら、自然界の光を浴びるだけで十分で、「わざわざ狭帯域の光を浴びる」ことなく効果が見えるはずである。

もう一つは、発毛育毛の効果が赤色レーザー照射で見出された¹⁾²⁾ということである。もちろん広帯域の赤色 LED 光源で効果がないとは言えないが、レーザー照射での効果は一般によく知られている。

それではなぜ超狭帯域光なのか、という定性的な考察を試みたい。LED にせよ LD にせよ、半導体材料が用いられ、電子と正孔の再結合により発光しているという点では相違がない。しかし、光特性において発光波長幅が大きく異なっているということの他、以下の点に大きな

違いがある。LD はその構造、発振原理から波長、位相がそろったコヒーレント光であり、偏光特性を持っている。偏光はレーザー光に特有に現れる性質である。これに対し LED は振動面、位相振幅がランダムな偏光特性を持たない。光であるため偏光子を回転しつつ検出器で出力を計測しても自然光の完全な対称性から出力は変化しない。ここで自然光の完全な対称性のやぶれを作ることが出来れば、検出器出力に変化が出てくる可能性がある。即ち一定方向に光強度を分布させる事が出来る。発光スペクトル分布の超狭帯域化技術は対称性のやぶれを実現し、細胞中の化学反応を促進させている可能性がある。

他の可能性として、光と細胞との相互作用における共振効果の存在である。共振効果によって光が細胞に特定の mRNA の変化や蛋白質の分泌を促すメカニズムがあれば、超狭帯域光の意義は容易に想像できる。

いずれにせよ、超狭帯域光の効果は現時点では推測の域を得ず、光と細胞との相互作用モデルの詳細な構築が必要不可欠である。

6 今後の展望

これまで LED の研究開発は、未到達の波長領域での発光や高効率化、高出力化を念頭に行われてきた感がある。医学応用を目指す超狭帯域 LED といった観点での研究開発は筆者らが知る限り例を見ない。これはいうまでもなく、そのような重要な応用分野があることが明確にされていなかったことに起因すると思われる。しかし今回報告したことを一般的に言えば、光と細胞の相互作用により何らかの影響が細胞に生じるといえる。今回の内容は発毛育毛や創傷治癒への効果であるが、その他にも細胞の培養や分化の過程に光が効果を持つことが考えられる。実際、青色 LED 光がガン細胞の増殖を抑えるという実験結果の報告がある⁸⁾。このような応用において、光源が超狭帯域光である必然性はケースバイケースであるかもしれないが、顕著な効果を与える波長、スペクトル、強度等の情報を、半導体を中心とする材料科学の研究者と医学、生化学の研究者が共用して、今後の「光医科学」という学術の創成にもつながってゆくのではないかと考えている。

LED 光は、特定の波長が植物生育に効果を持つといった初期の実験⁹⁾から、植物工場といった省エネルギーで管理された農業現場の進展に寄与している。医学への応用は LED 光の応用をさらに広く推し進めるものである。

LED の超狭帯域化のためには、半導体の発光層において band filling の効果が生じないことが重要である。そのためには発光再結合寿命が十分小さいことが必要である。しかし、640 nm 近傍で半値幅として求められる 10 nm は熱エネルギーにして 30 meV と室温近傍の値に相当する、したがって、発光層として AlGaAs を用いる限り、この要求は現実的にはほぼ限界の値と言える。そこで一つの解決策は AlGaAs よりバンドギャップの大きい半導体で等電子トラップ(iso-electronic traps)からの発光を利用するこ

とが考えられる。別の方向から興味深いのは、大阪大学で研究されている希土類添加LED¹⁰⁾である。これは、GaN中に添加されたユーロピウム(Eu)等の希土類を発光されるという原理によるもので、希土類からの発光はきわめて狭帯域であり、かつデバイス構造のゆらぎに対しても発光波長が変化しない。まだ発光強度の点で今回の応用にはやや不足しているが、今後の進展により克服可能と思われる。またその他にも、LEDの構造、新しい材料、発光の原理等で、このような超狭帯域LEDの開発という観点で材料科学研究が進むことに大いに望み、期待するものである。

7 結 言

半導体を用いたLEDを光源とし、バンドパスフィルタを用いて超狭帯域光を得る技術を開発した。この光源をヒトの毛髪再生に応用し、有効な臨床結果を得ることができた。また超狭帯域LED照射が人の毛乳頭細胞を刺激し、mRNAの発現や蛋白生成が生じる事が分子生物学的に示された。更に皮膚深達度が高い超狭帯域赤色LED光照射が毛成長に有効であることがマウスの実験や、又培養ヒト毛乳頭細胞を用いた実験から分子メカニズムモデルが示された。逆に皮膚深達度が浅い超狭帯域緑色LED光照射は、創傷治癒に有効であった。このように、LEDを光源とした超狭帯域光は、更に上述の研究を深化させるとともに、新たな光医学融合分野を発展させ新産業を開拓していくものと期待している。このような医学的なneedsを多くの材料研究者が受け止めていただき、新しい光源開発への協力体制が取れればと望むところである。

本解説の基礎となる研究成果は、大阪大学大学院医学系研究科皮膚・毛髪再生医学寄附講座教授板見智教授のグループとの共同研究によるものである。ここに深く感謝申し上げる次第である。

参 考 文 献

- 1) R. J. Cremer, P. W. Perryman and D. H. Richards, "Influence of light on the hyperbilirubinemia of infants", *Lancet*, Vol.1, pp.1094-1097 (1958).
- 2) E. Mester, B. Szende and P. Gartner, "The effect of Laser beams on the growth of hair in mice", *Radiobiol Radiother (Berl)*, Vol.9, pp.621-626 (1968).
- 3) M. R. Avram and N. E. Rogers, "The use of low level light for hair growth, part I", *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, Vol. 11, pp.110-117 (2009).
- 4) M. Ogasawara, "Kashikou ryouiki no kyoutaiiki-hikarishousha no hatsumou-ikumou kouka ni tsuite no kentou", *Aesthetic Dermatology*, Vol.17, p.216 (2007).
- 5) T. Fushimi, S. Iuni, M. Ogasawara, T. Nakajima, K. Hosokawa and S. Itami, "Narrow band red LED light promotes mouse hair growth through paracrine factors from dermal papilla", *Journal of Dermatological Science*, Vol.64, pp.237-248 (2011).
- 6) S. Inui, "Akairo light emitting diode (LED) no mou-seichou sokushin sayou no kanousei to sono mekhanism kaiseki", *The Journal of Japan Hair Science Association*, Vol.45, No.1, pp.9-12 (2013).
- 7) T. Fushimi, S. Inui, T. Nakajima, M. Ogasawara, K. Hosokawa and S. Itami, "Green light emitting diodes accelerate wound healing: Characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo", *Wound Repair and Regeneration*, Vol.20, pp.226-235 (2012).
- 8) H. Tanaka, T. Takahashi, K. Okamoto, M. Tokuda, F. Yamaguchi and Y. Hirata, "Suppression of cancer cell proliferation by high-intensity blue LED light", *Physica Status Solidi (c)*, 8, pp.359-361 (2011).
- 9) K. Okamoto and T. Yanagi, "Plant growth and its sensing using red, green and blue high-brightness light-emitting diodes.", *Oyo Buturi*, Vol.68, pp.156-160 (1999).
- 10) A. Nishikawa, T. Kawasaki, N. Furukawa, Y. Terai and Y. Fujiwara, "Room-temperature red emission from a p-type/europium-doped/n-type gallium nitride light-emitting diode under current injection", *Applied Physics Express*, Vol.2, 071004(1-3) (2009).