

PHOTOMEDICINE AND PHOTOBIOLOGY

Vol.47 2026



The Japanese Society for Photomedicine and Photobiology

Photomedicine and Photobiology

Vol.47

2026

Chief Editor

Teruhiko Makino, M.D.
Dermatology (Toyama)

Editing Secretaries

Megumi Mizawa, M.D.
Dermatology (Toyama)

Former Editors

Nobuyuki Mizuno, M.D. Dermatology (1978-1990)
Muneo Ohkido, M.D. Dermatology (1991-1993)
Kunihiko Yoshikawa, M.D. Dermatology (1994-1997)
Masamitsu Ichihashi, M.D. Dermatology (1998-2002)
Itsuro Matsuo, M.D. Dermatology (2003-2004)
Takeshi Horio, M.D. Dermatology (2005-2006)
Katsumi Hanada, M.D. Dermatology (2007-2009)
Fujio Otsuka, M.D. Dermatology (2010-2012)
Chikako Nishigori, M.D. Dermatology (2013-2016)
Daisuke Tsuruta, M.D. Dermatology (2017-2025)

Editorial Board

Hiroyuki Okamoto, M.D. (Moriguchi) Dermatology	Takeshi Toda, Ph.D. (Suita) Radiation Biology
Hiroshi Fukumura, Ph.D. (Sendai) Organic Physical Chemistry	Akimichi Morita, M.D. (Nagoya) Geriatric and Environmental Dermatology
Daisuke Sawamura, M.D. (Hirosaki) Dermatology	Yoshiki Tokura, M.D. (Hamamatsu) Dermatology
Atsushi Ito, Ph.D. (Hiratsuka) Energy Resources	Shinichi Moriwaki, M.D. (Takatsuki) Dermatology
Tadamichi Shimizu, M.D. (Toyama) Dermatology	Chikako Nishigori, M.D. (Kobe) Dermatology
Akira Kawada, M.D. (Sayama) Dermatology	Nobuhisa Naoi, M.D. (Miyazaki) Ophthalmology
Hiroshi Sugiyama, Ph.D. (Kyoto) Chemical Biology	Yasuteru Urano, Ph.D. (Tokyo) Chemical Biology and Molecular Imaging
Shosuke Kawanishi, Ph.D. (Suzuka) Hygiene	Masahide Yasuda, Ph.D. (Miyazaki) Materials Chemistry
Tadashi Suzuki, Ph.D. (Sagamihara) Photochemistry	Akihiro Ohira, M.D. (Izui) Ophthalmology
Tetsuro Majima, Ph.D. (Ibaraki) Molecular Excitation Chemistry	

The Japanese Society for Photomedicine and Photobiology
Founded in 1978

*Office : Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Academic Assembly,
University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan*

CONTENTS

【Article】

Ultraviolet B exposure improves survival after myocardial infarction in mice 1

Taiji Mizoguchi^{1,2*}, Naoto Sasaki^{1,2}, Sayo Horibe¹, Ken-ichi Hirata^{2†}, Tomoya Yamashita^{2‡},
Yoshiyuki Rikitake¹

¹ Laboratory of Medical Pharmaceutics, Kobe Pharmaceutical University,
4-19-1, Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe, Japan

² Division of Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, Kobe University Graduate School of
Medicine,
7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Japan

* Present address: Preclinical Pharmacology, Verve Therapeutics Inc., a wholly owned subsidiary of Eli Lilly and
Company, Boston, Massachusetts, USA

† Present address: Department of Cardiology, Kakogawa Central City Hospital,
439 Honmachi, Kakogawa-cho, Kakogawa, Hyogo, Japan

‡ Present address: Division of Advanced Medical Science, Kobe University Graduate School of Science,
Technology and Innovation, Kobe, Japan

ロドプシン研究から光遺伝学的視覚再生へ:光受容分子ツール開発の進展 7

角田 聡

名古屋工業大学大学院工学研究科生命応用化学専攻

Chemical Probes for Capture and Labeling of Organic Sulfur Oxides: Focus on Fluorescent Molecules Responsive to Conjugation with Sulfenic and Sulfinic Acids 15

Hiroki Tanimoto* and Takenori Tomohiro

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

非視覚光受容による近視進行抑制経路の探索 21

栗原 俊英^{1,2*}

慶應義塾大学医学部¹光生物学研究室²眼科学教室

Monitoring of protonation in triplex-forming oligodeoxynucleotides by Raman spectroscopy 27

Runa Ishida, Rio Watanabe, Tatsuya Nishihara, Tadashi Suzuki, Ryo Takeuchi and Kazuhito Tanabe*

Department of Chemistry and Biological Science, College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University,
5-10-1 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-5258, Japan

222 nm Far-UVCの眼安全性:角膜障害とヒト曝露研究 32

杉原 一暢

島根大学医学部眼科学講座

Ultraviolet B exposure improves survival after myocardial infarction in mice

Taiji Mizoguchi^{1,2*}, Naoto Sasaki^{1,2}, Sayo Horibe¹, Ken-ichi Hirata^{2†}, Tomoya Yamashita^{2‡},
Yoshiyuki Rikitake¹

¹Laboratory of Medical Pharmaceutics, Kobe Pharmaceutical University,
4-19-1, Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe, Japan

²Division of Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine,
7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Japan

*Present address: Preclinical Pharmacology, Verve Therapeutics Inc., a wholly owned subsidiary of Eli Lilly and Company,
Boston, Massachusetts, USA

†Present address: Department of Cardiology, Kakogawa Central City Hospital,
439 Honmachi, Kakogawa-cho, Kakogawa, Hyogo, Japan

‡Present address: Division of Advanced Medical Science, Kobe University Graduate School of Science,
Technology and Innovation, Kobe, Japan

Address correspondence to:

Naoto Sasaki, MD, PhD. E-mail: n-sasaki@kobepharm-u.ac.jp
Laboratory of Medical Pharmaceutics, Kobe Pharmaceutical University,
4-19-1, Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe, 658-8558, Japan
Telephone number: +81-78-441-7579

Abstract

Excessive inflammatory responses lead to adverse cardiac remodeling after myocardial infarction (MI) which is induced by atherosclerosis. Ultraviolet B (UVB) irradiation to the skin is reported to prevent systemic immunoinflammatory diseases, including atherosclerotic diseases, in mice by regulating adaptive immune responses. We investigated the effect of broad-band UVB irradiation on survival and cardiac remodeling after MI and the underlying mechanisms. Wild-type mice were irradiated with broad-band UVB at 3 kJ/m² twice weekly for 2 weeks before MI induction and once after MI induction. Nonirradiated mice served as controls. MI was induced by ligating the anterior descending coronary artery. Compared with nonirradiated mice, UVB-irradiated mice displayed improved survival owing to a lower incidence of heart failure. Histological analysis revealed a reduction in the left ventricular area in the heart of UVB-irradiated mice, whereas the infarcted area was not altered. The proportion of anti-inflammatory Foxp3⁺ regulatory T cells was significantly increased in the skin-draining lymph nodes and blood of UVB-irradiated mice compared with nonirradiated mice. This increase was associated with markedly upregulated mRNA expression of Treg-specific transcription factor *Foxp3* and pro-resolving M2-type macrophage-related molecules, such as *Il10*, *Arg1*, and *Mrc1*, in the cardiac infarcted tissue. These findings indicate that UVB-expanded Tregs may migrate in injured lesions and promote myocardial healing by inducing pro-resolving macrophages and dampening inflammation. Our data suggest that broad-band UVB phototherapy may serve as an attractive strategy for preventing heart failure following MI.

Keywords: myocardial infarction, cardiac remodeling, ultraviolet B, immunology, inflammation

Introduction

Ischemic heart disease, including myocardial infarction (MI), occurs in patients with atherosclerosis and is a major cause of mortality in developed and developing countries. Reperfusion of occluded coronary artery by balloon catheter-facilitated vessel dilation or pharmacological thrombus lysis is a standard strategy for the treatment of acute MI. Despite state-of-the-art intensive treatment including the above intervention and conventional medical therapies, patients with MI show poor prognosis, which could be related to severe left ventricular dysfunction due to pathogenic cardiac remodeling.¹ Therefore, developing new therapeutic approaches to promote myocardial healing after MI is highly desirable.

The response to injury in MI involves an acute inflammatory response by recruitment of many inflammatory cells and the clearance of dead tissue in the initial phase, and the initial reparative response replacing the lost tissue in the later phase.² The innate and adaptive immune system has been shown to be important in cardiac response to MI.³ Firm evidence indicates that forkhead box P3 (Foxp3)-expressing regulatory T cells (Tregs), which are critical for controlling excessive immunoinflammatory responses, play an anti-atherogenic role by inhibiting effector CD4⁺ T cell and proinflammatory macrophage immune responses in mice.⁴ A previous study demonstrated that both CD4⁺Foxp3⁺ Tregs and effector CD4⁺ T cells are activated and the frequency

of Tregs in the heart-draining lymph nodes (LNs) is markedly increased after experimental MI, and that CD4⁺ T cell activation beneficially influences wound healing and survival.⁵ Interestingly, another recent report using mouse models of Treg activation or depletion by the same group demonstrated that CD4⁺Foxp3⁺ Tregs beneficially influence wound healing after MI by modulating macrophage function, indicating the augmentation of CD4⁺Foxp3⁺ Treg responses as a possible approach to improve healing after MI.⁶

Exposure to sunlight, including ultraviolet B (UVB), is essential for maintaining our health. UVB phototherapy is an established treatment for immunoinflammatory cutaneous diseases based on the anti-inflammatory actions of UVB.⁷ We previously reported that irradiation with various wavelengths of UVB, including broad-band UVB (a continuous spectrum from 280 to 320 nm with a peak at approximately 313 nm), 282-284 nm UVB (a narrow peak at approximately 282-284 nm), or 312 nm UVB (a narrow peak at approximately 312 nm), attenuates the development of atherosclerotic disease by augmenting anti-inflammatory Treg immune responses in hypercholesterolemic mice,⁸⁻¹⁰ providing new therapeutic approaches for this disease. However, the effect of UVB treatment on the survival or development of heart failure after atherosclerosis-related MI has not been investigated.

In this study, we investigated the effect of broad-band UVB irradiation on cardiac remodeling after MI and the underlying mechanisms using a mouse model of MI induced by coronary artery ligation, with a particular focus on pro-resolving immune responses.

Methods

Animals and experimental design

Male wild-type mice on a C57BL/6 background were obtained from Charles River Laboratories Japan. Mice were fed a normal chow (CLEA, Tokyo, Japan) and water ad libitum. The mice were irradiated with broad-band UVB at 3 kJ/m² twice weekly for 2 weeks before MI induction and once after MI induction. Nonirradiated mice served as controls. MI was induced by ligating the anterior descending coronary artery under anesthesia and mechanical ventilation using an artificial respirator (Model 687; HARVARD APPARATUS) as described previously.¹¹ The appearance of cyanosis of the anterior left ventricle confirmed the successful ligation of the anterior descending coronary artery. Death within 24 hours after MI induction was considered surgery-related death and excluded from the analysis of mortality and cause of death. All mice except the above mice underwent necropsy. Some mice showed blood clot accumulation in the thoracic cavity, indicating cardiac rupture. The other mice exhibited pulmonary congestion without blood clots in the thoracic cavity, and the cause of death was considered severe heart failure. Four weeks after MI induction, the surviving mice were euthanized under anesthesia, and cardiac tissues were harvested for histological analysis. The mice were

terminated earlier for some experiments. Exclusion criteria were severe body weight loss and serious burns and were set before the study. However, such symptoms were not found, and no mice were excluded. All animal experiments were approved by the institutional animal care committee.

UVB irradiation

TL 20W/12RS fluorescent lamps (Philips, Eindhoven, Holland) that emit broad-band UVB (a continuous spectrum from 275 to 390 nm, with a peak emission at 313 nm) were previously described⁸ and used in this study. The irradiance of the broad-band UVB was 6.6 J/m²/second at a distance of 40 cm, as measured by a Digital UV Intensity Meter UIT-250 (USHIO, Tokyo, Japan). The mice were placed 40 cm below the bank of lamps and were irradiated for the indicated weeks after shaving their backs in the animal facility. Nonirradiated mice were not subjected to these procedures. In our previous study using atherosclerosis-prone mice, broad-band UVB irradiation at 5 kJ/m² markedly augmented systemic Treg responses, whereas lower 2 kJ/m² UVB irradiation had a modest effect on Treg responses.⁸ Based on these results, we speculated that 3 kJ/m² would be an appropriate UVB dose for sufficiently augmenting Treg responses with less adverse effects and decided to use this dose in the present study.

Histological analysis of cardiac lesions

Cardiac tissues were perfused with saline, soaked in 7% EDTA for 10 minutes, and embedded in OCT compounds (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Tokyo, Japan). Cryosections (10 μ m thickness) were collected, and the fibrous area was delineated by Masson's trichrome staining on 4% paraformaldehyde-fixed sections. Stained sections were digitally captured using a microscope (BZ-8000; Keyence, Osaka, Japan), and the infarcted and left ventricular areas were calculated using ImageJ (National Institutes of Health). The percentage of the infarcted area was calculated as the length of stained endocardium per total endocardial length.

Flow cytometry

For flow cytometric analysis of lymphoid tissues, skin- and heart-draining LNs were isolated and stained with CD4 (clone RM4-5; BD Biosciences) and anti-Foxp3 (clone FJK-16s; eBioscience) in PBS containing 2% fetal calf serum after blocking Fc receptor with anti-CD16/CD32 (clone 2.4G2; BD Bioscience). Axillary and inguinal LNs or mediastinal LNs were used as skin-draining LNs or heart-draining LNs, respectively. Blood samples were drawn by cardiac puncture and stained as described above. Intracellular staining of Foxp3 was performed using a Foxp3 staining buffer set (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Flow cytometric analysis was performed using Attune Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies) with FlowJo

software (Tree Star).

Real-time reverse transcription PCR analysis

Total RNA was extracted from cardiac infarcted tissue using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific). A PrimeScript RT reagent Kit (Takara) was used for reverse transcription. Quantitative PCR was performed using a SYBER Premix Ex Taq (Takara) and a StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. The following primers were used: *Foxp3*, 5'-CTC ATG ATA GTG CCT GTG TCC TCA A-3' and 5'-AGG GCC AGC ATA GGT GCA AG-3'; *Il10*, 5'-GAC CAG CTG GAC AAC ATA CTG CTA A-3' and 5'-GAT AAG GCT TGG CAA CCC AAG TAA-3'; *Arg1*, 5'-GGG AAT CTG CAT GGG CAA C-3' and 5'-GCA AGC CAA TGT ACA CGA TGT C-3'; *Mrc1* (CD206), 5'-CAG GTG TGG GCT CAG GTA GT-3' and 5'-TGT GGT GAG CTG AAA GGT GA-3'; *Gapdh*, 5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3' and 5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3'. Amplification reactions were performed in duplicate, and fluorescence curves were analyzed using included software. The expression levels of the target genes were normalized so that the mean values in nonirradiated mice were set to 1. *Gapdh* was used as an endogenous control reference.

Statistical analysis

Normality was assessed using Shapiro-Wilk normality test. Mann-Whitney *U*-test, 2-tailed Student's *t*-test, or Welch's *t*-test was used to detect significant differences between 2 groups where appropriate. Kaplan-Meier survival curves were constructed and analyzed using log-

rank (Mantel-Cox) test. The mortality of MI was analyzed using chi-squared test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software Inc.) was used for statistical analysis.

Results and Discussion

The mice were irradiated with broad-band UVB at 3 kJ/m² twice weekly for 2 weeks before MI induction and once after MI induction. Nonirradiated mice served as controls. MI was induced by ligating the left coronary artery in male C57BL/6 wild-type mice. Notably, UVB-irradiated mice displayed improved survival compared with nonirradiated mice (survival rate: 67.3% in UVB-irradiated mice, 44.0% in nonirradiated mice) (Figure 1A). This improved survival in UVB-irradiated mice was due to a lower incidence of heart failure but not to left ventricular ruptures (Figure 1B). To determine the effect of UVB irradiation on cardiac remodeling after MI, we performed histological analysis of the infarcted heart collected 28 days after MI induction. No difference was found in the infarcted area in the heart between the 2 groups. Notably, the left ventricular area in the infarcted heart of UVB-irradiated mice was significantly smaller than that of nonirradiated mice (Figure 1C through 1E). These data indicate that UVB irradiation attenuates cardiac remodeling but does not affect myocardial necrosis after MI.

Next, we examined the mechanisms by which UVB irradiation attenuates cardiac remodeling, focusing on changes in anti-inflammatory Tregs and pro-resolving macrophages in lymphoid and cardiac tissues. Mice were treated with or without UVB, as described above. Four

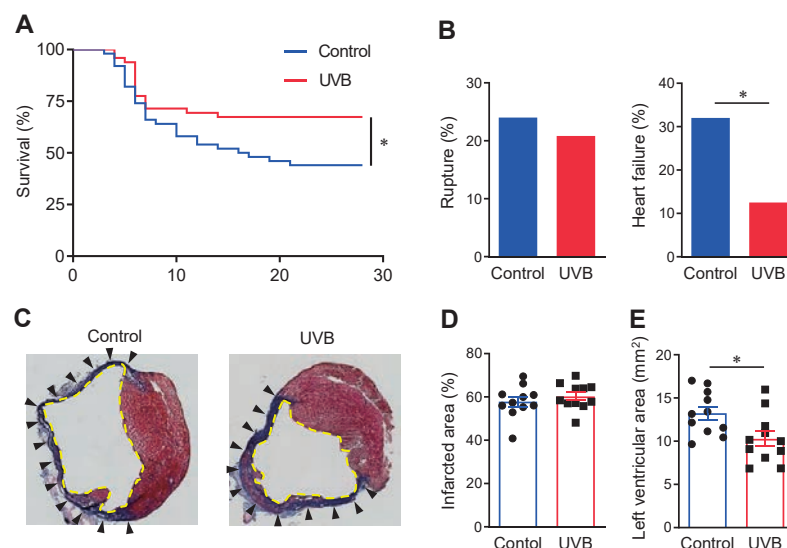


Fig. 1. UVB irradiation decreases mortality due to heart failure after myocardial infarction (MI).

A, Kaplan-Meier curve showing the survival rate in UVB-irradiated ($n=48$) or nonirradiated ($n=50$) mice with MI. **B**, The cause of death after MI. **C**, Representative photomicrographs of Masson's trichrome staining in cardiac tissues collected 28 days after MI induction. The left ventricular wall in the infarcted lesions is thin and indicated by arrowheads. Yellow dashed lines demarcate left ventricular area. **D** and **E**, Quantitative analyses of infarcted area (**D**) and left ventricular area (**E**) in cardiac tissues collected 28 days after MI induction. $n=11$ per group. Data points represent individual animals. Data are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$; log-rank (Mantel-Cox) test: **A**; chi-squared test: **B**; 2-tailed Student's *t*-test: **E**.

days after MI induction, we performed flow cytometric analysis of CD4⁺Foxp3⁺ Tregs in the skin- and heart-draining LNs and blood. In line with our previous report in atherosclerosis-prone mice,⁸ the frequency of CD4⁺Foxp3⁺ Tregs was significantly higher in the skin-draining LNs of UVB-irradiated mice than in those of nonirradiated mice (Figure 2A). However, there was no significant difference in their frequency in the heart-draining LNs between the 2 groups (Figure 2A). The frequency of CD4⁺Foxp3⁺ Tregs was also increased in the blood of UVB-irradiated mice, indicating the systemic expansion of Tregs (Figure 2A).

To evaluate the accumulation of Tregs in the infarcted heart, cardiac infarcted tissue was harvested 4 days after MI induction and the mRNA expression of the Treg-specific transcription factor *Foxp3* was analyzed by quantitative reverse transcription PCR. The mRNA expression of *Foxp3* was markedly upregulated in the infarcted heart of UVB-irradiated mice, indicating the augmented accumulation of expanded Tregs (Figure 2B). Given that CD4⁺Foxp3⁺ Tregs beneficially influence wound healing after MI by promoting the accumulation of pro-resolving M2-type macrophages in the infarcted heart,⁶ we investigated whether UVB irradiation modulates the macrophage phenotype in the infarcted heart. We harvested the cardiac infarcted tissue 7 days after MI induction and examined the mRNA expression of M2-type macrophage-related molecules by quantitative

reverse transcription PCR. Interestingly, the mRNA expression of M2-type macrophage-related molecules, such as *Il10*, *Arg1*, and *Mrc1* (CD206), was markedly upregulated in the infarcted heart of UVB-irradiated mice, indicating M2-type macrophage skewing (Figure 2C). These data indicate that UVB irradiation augments anti-inflammatory and pro-resolving immune responses, which may coordinately contribute to the resolution of inflammation and myocardial healing after MI.

It would be interesting to speculate about the mechanisms involved in the migration of UVB-expanded Tregs to the infarcted heart, focusing on the chemokine system. Various immune cells, including T cells, contribute substantially to cardiac remodeling after MI,³ where interactions between chemokine receptors and their ligands play an important role. We recently reported that C-C chemokine receptor 4 (CCR4), a highly specific receptor for two C-C chemokine ligands CCL17 and CCL22, is predominantly expressed on CD4⁺Foxp3⁺ Tregs and plays a critical role in controlling the early stage of atherosclerosis via Treg migration to the atherosclerotic aorta and Treg-dependent regulation of proinflammatory T cell responses in hypercholesterolemic mice.¹² Experimental studies reported that the CCL17/CCL22–CCR4 axes protect against inflammatory diseases, including inflammatory bowel disease¹³ and allergic airway inflammation,¹⁴ by mediating Treg migration in target tissues. CCL17 was reported to play a detrimental

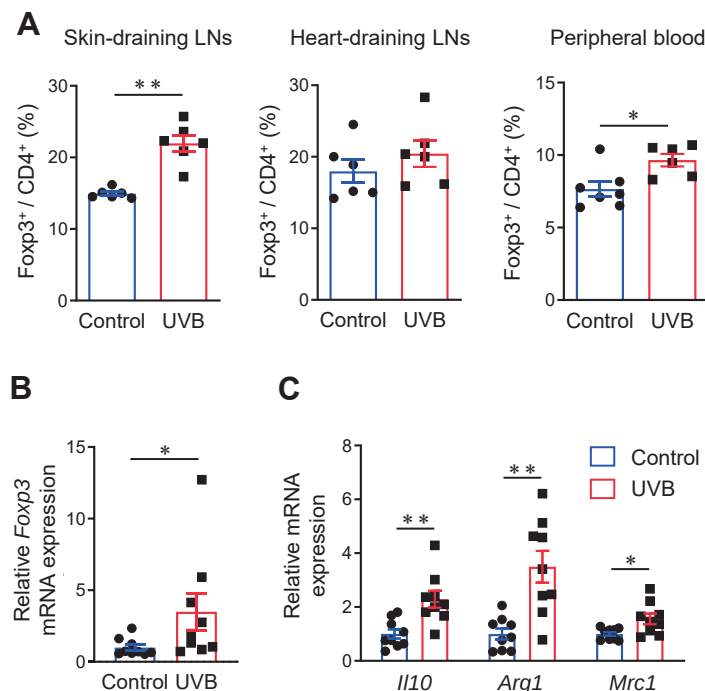


Fig. 2. UVB irradiation systemically expands Tregs and induces a pro-resolving macrophage phenotype in the infarcted heart.

A, The graphs represent the proportion of CD4⁺Foxp3⁺ Tregs in the skin- and heart-draining LNs and blood of UVB-irradiated or nonirradiated mice 4 days after the induction of myocardial infarction (MI). n=6 per group. **B**, mRNA expression of *Foxp3* in the cardiac infarcted tissue of UVB-irradiated or nonirradiated mice 4 days after the induction of MI. n=9 per group. **C**, mRNA expression of M2-type macrophage-related molecules (*Il10*, *Arg1*, and *Mrc1*) in the cardiac infarcted tissue of UVB-irradiated or nonirradiated mice 7 days after the induction of MI. n=9 per group. Data points represent individual animals. Data are expressed as the mean±s.e.m. **P*<0.05, ***P*<0.01; Mann-Whitney *U*-test; **B**; 2-tailed Student's *t*-test; **A** peripheral blood and **C** *Il10*; Welch's *t*-test; **A** skin-draining LNs and **C** *Arg1* and *Mrc1*.

role in inflammation resolution and myocardial healing after MI by impairing Treg homeostasis possibly via the inhibition of the CCL22–CCR4 axis,¹⁵ although the specific roles of the CCL17–CCR4 and CCL22–CCR4 axes in this process have not been fully elucidated. Interestingly, we recently reported that 284 nm wavelength of UVB irradiation upregulates CCR4 expression in Tregs in atherosclerosis-prone mice.⁹ CCL17 and CCL22 expression was upregulated in the injured myocardium in various mouse models of cardiac injury.¹⁵ Given these reports, we speculate that the CCL17/CCL22–CCR4 axes might be involved in UVB-dependent Treg expansion in the infarcted heart and subsequent cardiac remodeling prevention in our mouse MI model.

An experimental study in a MI mouse model showed a marked increase in the frequency of Tregs in the heart-draining LNs and cardiac infarcted tissue in the acute inflammation phase of MI,⁶ although no clinical study examined Treg frequency in infarcted heart, and most clinical reports show a decrease in the Treg frequency in the peripheral blood after MI.¹⁶ Treg counts in coronary thrombi were significantly increased compared with peripheral blood in patients with MI.¹⁷ These experimental and clinical data indicate that peripheral Tregs might decrease due to their accumulation in the heart-draining LNs and infarcted heart in the acute phase of MI. Our data on systemically increased Tregs following UVB irradiation may compensate for their decrease in the periphery and further augment the physiological response of Tregs after MI, which would be beneficial for the prevention of cardiac remodeling.

A previous experimental report showed that the expansion of Tregs by the administration of a superagonistic anti-CD28 monoclonal antibody improved cardiac wound healing and survival after MI without severe adverse effects, indicating the attractive anti-inflammatory approach for this disease.⁶ However, in humans, such antibody therapy may cause general immunosuppression and adverse immune responses. Moreover, the high cost will limit the clinical use of such drugs for a long time. Therefore, other strategies to mitigate inflammatory responses should be explored. Based on its potent anti-inflammatory and immunomodulatory effects, UVB-based phototherapy is clinically used for treating various cutaneous diseases, with few major adverse reactions, if excessive exposure is avoided. Several UVB wavelengths are well-validated and effective for treating cutaneous diseases.⁷ Our recent experimental studies identified a couple of UVB wavelengths effective for preventing atherosclerotic disease.^{8–10} Among them, 282–284 nm UVB seems to be the most effective UVB for augmenting Treg immune responses and preventing atherosclerosis in mice.⁹ Given these results, it would be interesting to determine whether this UVB wavelength effectively promotes cardiac wound healing after MI.

Atherosclerosis is a major cause of fatal coronary artery disease including MI, whose therapeutic and

preventive approaches are still insufficient. Chronic inflammation is responsible for the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular disease.¹⁸ Emerging clinical evidence suggests that anti-inflammatory therapies could be potentially attractive approaches for preventing cardiovascular diseases in patients with a history of ischemic heart disease,^{19–21} although the preventive effect of these therapies on heart failure has not been fully elucidated. Experimental evidence indicates that Tregs play an important role in controlling hypercholesterolemia-induced atherosclerosis⁴ and cardiac remodeling after MI⁶ through anti-inflammatory mechanisms. Given the protective effect of broad-band UVB on heart failure after MI and the development of atherosclerosis,⁸ this UVB therapy could be an attractive anti-inflammatory approach for preventing not only the occurrence of MI but also its fatal complications such as severe heart failure.

Conclusion

We demonstrated that broad-band UVB irradiation prevents cardiac remodeling and improves survival after MI by augmenting anti-inflammatory Treg immune responses and inducing pro-resolving macrophages. We elucidated the unrecognized role of broad-band UVB in promoting myocardial healing after MI. Our data suggest that broad-band UVB phototherapy may serve as an attractive strategy for preventing heart failure following MI.

Acknowledgments

We would like to thank Miyuki Kobara (Kyoto Pharmaceutical University) for technical advice on a mouse MI model and Krisnanda Aga (Kobe Pharmaceutical University) for critical reading of the article.

Sources of Funding

This work was supported by Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) KAKENHI Grant Numbers 17H07282 (to TM) and JP18K08088 (to NS) and research grants from Hyogo Science and Technology Association (to NS), Takeda Scientific Foundation (to NS), and Suzuken Memorial Foundation (to NS).

Disclosures

None.

References

1. Frantz S, Hundertmark MJ, Schulz-Menger J, Bengel FM, Bauersachs J. Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: pathophysiology, imaging, and novel therapies. *Eur Heart J*. 2022;43:2549–2561.
2. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2009;81:474–481.
3. Nian W, Huang Z, Fu C. Immune cells drive new immunomodulatory therapies for myocardial infarction: From basic to clinical translation. *Front*

- Immunol. 2023;14:1097295.
4. Tanaka T, Sasaki N, Rikitake Y. Recent Advances on the Role and Therapeutic Potential of Regulatory T Cells in Atherosclerosis. *J Clin Med*. 2021;10:5907.
 5. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, et al. Activation of CD4⁺ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2012;125:1652-1663.
 6. Weirather J, Hofmann UD, Beyersdorf N, et al. Foxp3⁺ CD4⁺ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res*. 2014;115:55-67.
 7. Morita A. Current developments in phototherapy for psoriasis. *J Dermatol*. 2018;45:287-292.
 8. Sasaki N, Yamashita T, Kasahara K, et al. UVB Exposure Prevents Atherosclerosis by Regulating Immunoinflammatory Responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:66-74.
 9. Tanaka T, Sasaki N, Krisnanda A, et al. Novel UV-B Phototherapy With a Light-Emitting Diode Device Prevents Atherosclerosis by Augmenting Regulatory T-Cell Responses in Mice. *J Am Heart Assoc*. 2024;13:e031639.
 10. Krisnanda A, Sasaki N, Ito K, et al. 312 nm UVB Phototherapy Limits Atherosclerosis by Regulating Immunoinflammatory Responses in Mice. *Kobe J Med Sci*. 2024;70:E130-E142.
 11. Kobara M, Noda K, Kitamura M, et al. Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res*. 2010;87:424-430.
 12. Tanaka T, Sasaki N, Krisnanda A, et al. C-C chemokine receptor 4 deficiency exacerbates early atherosclerosis in mice. *Elife*. 2024;13:RP101830.
 13. Yuan Q, Bromley SK, Means TK, et al. CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J Exp Med*. 2007;204:1327-1334.
 14. Faustino L, da Fonseca DM, Takenaka MC, et al. Regulatory T cells migrate to airways via CCR4 and attenuate the severity of airway allergic inflammation. *J Immunol*. 2013;190:2614-2621.
 15. Feng G, Bajpai G, Ma P, et al. CCL17 Aggravates Myocardial Injury by Suppressing Recruitment of Regulatory T Cells. *Circulation*. 2022;145:765-782.
 16. Foks AC, Lichtman AH, Kuiper J. Treating atherosclerosis with regulatory T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:280-287.
 17. Klingenberg R, Brokopp CE, Grives A, et al. Clonal restriction and predominance of regulatory T cells in coronary thrombi of patients with acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2015;36:1041-1048.
 18. Roy P, Orecchioni M, Ley K. How the immune system shapes atherosclerosis: roles of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2022;22:251-265.
 19. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017;377:1119-1131.
 20. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2019;381:2497-2505.
 21. Nidorf SM, Fiolet ATL, Mosterd A, et al. Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *N Engl J Med*. 2020;383:1838-1847.

ロドプシン研究から光遺伝学的視覚再生へ:光受容分子ツール開発の進展

角田 聡

名古屋工業大学大学院工学研究科生命応用化学専攻

要約

Optogenetic vision restoration is emerging as a promising strategy for treating retinal degenerative diseases in which photoreceptors are progressively lost while inner retinal neurons remain relatively preserved. By introducing light-sensitive proteins into surviving retinal neurons, such as bipolar or retinal ganglion cells, optogenetics aims to re-establish light responsiveness in degenerated retinas. Because this approach does not rely on correcting specific genetic mutations, it has attracted considerable attention as a potentially universal therapeutic strategy for diseases including retinitis pigmentosa and age-related macular degeneration.

A central challenge in this field is the development of molecular actuators capable of driving reliable visual responses under physiologically relevant light conditions. In particular, optogenetic tools for vision restoration must combine high light sensitivity, optimized spectral properties that minimize phototoxicity and improve tissue penetration, and stable photocurrent responses suitable for sustained neuronal activation. Recent advances in rhodopsin research have significantly expanded the repertoire of candidate molecules for such applications.

In this review, we discuss recent progress in optogenetic vision restoration from the perspective of rhodopsin biology and molecular tool development. We highlight how microbial opsins such as channelrhodopsins (ChRs) enable direct light-induced depolarization of retinal neurons, whereas animal opsins provide alternative strategies based on intracellular signal amplification. We further discuss how the remarkable molecular diversity of rhodopsins in nature provides a rich resource for discovering and engineering next-generation optogenetic tools.

Integrating rhodopsin biophysics with molecular engineering and translational vision science will be essential for developing optogenetic therapies capable of restoring visual function under ambient light conditions.

Key words: 1. ロドプシン 2. 光遺伝学 3. チャネルロドプシン 4. 網膜色素変性症 5. 視覚再生法

本文

ロドプシン研究の発展は、光受容の分子機構や視覚機能の理解にとどまらず、光遺伝学による神経活動制御、さらには視覚機能再生という新たな医療応用へと展開してきた。光遺伝学的視覚再生は、視細胞が失われた網膜において、残存する双極細胞や網膜神経節細胞に光感受性タンパク質であるロドプシンを導入し、失われた光入力を再構築する治療戦略である。この方法は原因遺伝子の多様性に依存せず適用可能である点で、網膜色素変性症や加齢黄斑変性症に対する有望な遺伝子治療法として注目されている。本総説では、ロドプシン研究を基盤として発展してきた光遺伝学的視覚再生研究を概観し、とくに視覚再生に適した光受容分子ツールの開発に焦点を当てる。微生物ロドプシンの一種であるチャネルロドプシン(channelrhodopsin; ChR)を用いた直接的な膜電位制御と、動物ロドプシンを用いたシグナル増幅型光受容という二つの分子戦略を整理するとともに、視覚再生に求められる長波長化、高光感度化、高発現性、安定な応答性といった分子特性について論じる。さらに、ロドプシンの多様性探索と分子工学的設計の融合が、環境光下で機能する次世代視覚再生ツールの創出に直結することを示したい。光受容分子の基礎研究は、今や単なる機能解明にとどまらず、失われた視覚を再び患者に届けるための分子基盤科学へと発展している。

1. ロドプシンと光受容の分子基盤

光は生物にとって最も基本的な環境情報の一つであり、ほぼすべての生物は何らかの形で光を受容する仕組みを進化させてきた。その中心にあるのがロドプシン(rhodopsin)と総称される光受容タンパク質群である。ロドプシンはレチナールを発色団として結合する7回膜貫通型タンパク質であり、光吸収に伴うレチナールの異性化を起点に構造変化を生じ、分子応答を誘導する(図1)。ロドプシンは大きく、微生物ロドプシン(type I rhodopsin)(図1A)と、動物ロドプシン(type II rhodopsin)(図1B)とに分類される。両者はともにレチナールを利用するが、アミノ酸配列、活性化機構、細胞内シグナル伝達様式は大きく異なる(1)。

動物ロドプシンはGタンパク質共役型受容体(GPCR)の一群であり、光受容によりGタンパク質を活性化し、細胞内シグナル伝達を誘導する。脊椎動物の視覚系では、網膜桿体視細胞のロドプシンと錐体視細胞の視物質がその代表である。光によって活性化されたロドプシンはトランスデュシンを活性化し、ホスホジエステラーゼを介してcGMPを減少させ、その結果CNGチャネル(環状ヌクレオチド依存性チャネル)が閉鎖し膜電位変化が生じる。このシグナル伝達系は高度な増幅機構を備えており、きわめて弱い光刺激にも応答可能である(2)。

一方、微生物ロドプシンは主としてイオンポンプ、イオンチャネル、あるいは酵素共役型受容体として機能する(1)。バクテリオロドプシンは光駆動型プロトンポ

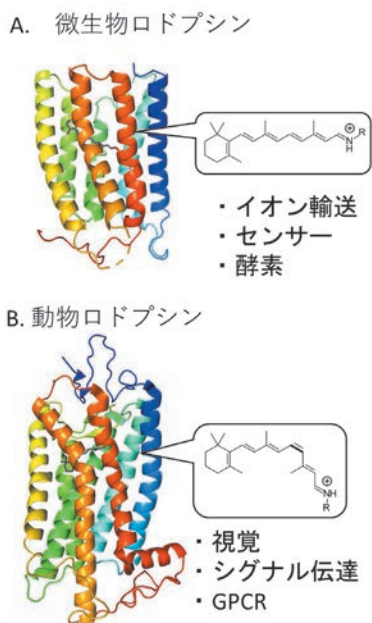


図1 微生物ロドプシンと動物ロドプシンの構造と機能
微生物ロドプシンと動物ロドプシンは分子内に発色団としてそれぞれ all-trans retinal レチナル (A)、11-cis retinal (B) を結合する。PDB code: 8y9l (A), 1u19(B)。

ンプ、ハロロドプシンは塩化物イオンポンプとして典型的である。さらに 2000 年代に入り、緑藻類からチャネルロドプシン (ChR) が発見されたことにより、微生物ロドプシン研究は生命科学全体に新たなインパクトを与えた (3, 4)。ChR は光照射によりイオンチャネルとして機能し、光エネルギーを直接膜電位変化へ変換できる。この性質は、神経細胞の活動という生命現象をミリ秒精度で光操作する光遺伝学の基盤となった (5)。このように、動物ロドプシン研究は視覚や GPCR シグナル伝達の理解を深化させ、微生物ロドプシン研究は膜タンパク質のエネルギー変換機構の理解を進めると同時に、光で細胞機能を制御する光遺伝学の分子ツールとして貢献している。今日では、両者の知見が融合することで、基礎研究のみならず遺伝子治療・再生医療への応用が現実のものとなりつつある。

チャネルロドプシン (ChR) の発見と光遺伝学の誕生

チャネルロドプシンは緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* から見いだされた光依存性陽イオンチャネルであり、2000 年代初頭に ChR1 および ChR2 が同定された (3, 4)。2005 年には、神経細胞に ChR2 を発現させることで、光刺激により活動電位を高精度に誘導できることが示され、光遺伝学という新しい研究領域が急速に拡大した (5)。光遺伝学は、従来の電気刺激や薬理学的操作と比べて高い時間分解能と細胞選択性を兼ね備え、神経回路解析に革命をもたらした。光遺伝学では、陽イオン透過型 ChR (cation channelrhodopsin; CCR) による神経興奮誘導に加え、アニオンチャネルロドプシン (anion channelrhodopsin; ACR) やカリウム選択的チャネルロドプシン (kalium channelrhodopsin; KCR) を用いた神経抑制も可能となった (6, 7, 8)。こうした分子群の登場により、神経活動の双方向制御が可

能となり、基礎神経科学に加えて、神経疾患研究、回路機能解明、行動制御へと応用領域は広がった。近年、特に注目されている医療応用が視覚再生である。視覚は本来、視細胞による光受容を起点として成立するが、視細胞が失われた網膜では光情報が神経回路へ伝達されなくなる (図 2)。そこで、残存する網膜神経細胞に ChR を導入し、失われた視細胞の機能を分子レベルで代替するという構想が生まれた (図 3)。これが optogenetic vision restoration、すなわち光遺伝学的視覚再生である (9)。

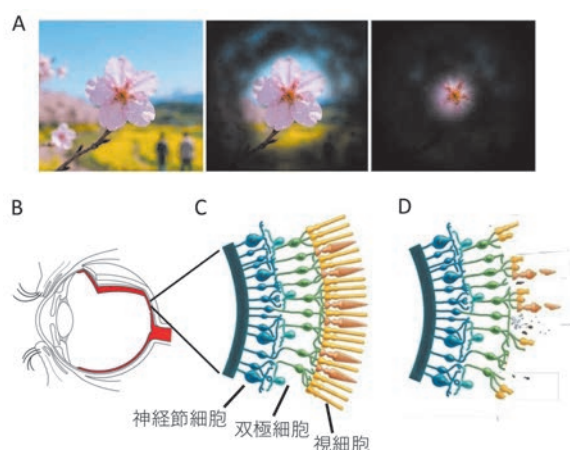


図2 網膜色素変性症における疾患の進行段階

- 網膜色素変性症は疾患の進行において、視野狭窄、中心視力低下が起こる。
- 眼球の模式図。赤で示した部分が網膜。
- 網膜光シグナル伝達に関与する細胞は、主に神経節細胞、双極細胞、視細胞の三層から構成される。光受容能を有する視細胞には桿体細胞 (黄色)、錐体細胞 (橙色) の 2 種の細胞が存在する。
- 網膜色素変性症では、疾患の進行とともに桿体細胞が失われ、やがて錐体細胞が減少することで視覚機能が失われる。

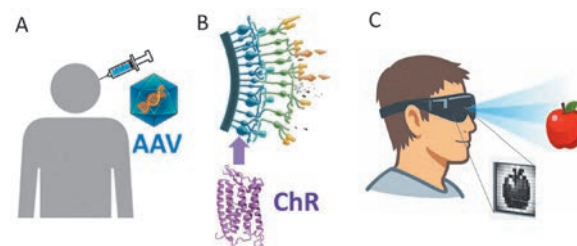


図3 光遺伝学による視覚再生遺伝子治療

- 患者網膜にチャネルロドプシン (ChR) 等の光受容体遺伝子を AAV (アデノ随伴ウイルス) により導入する。
- 患者網膜に残存する神経節細胞、または双極細胞に光受容体遺伝子が発現する。これにより、これら細胞が光受容能を有することで患者は光認識可能となる。
- 増幅ゴーグルを用いることで、環境光を増幅して患者網膜へ投射し、視機能が再生される。この増幅ゴーグルが必要な理由は、網膜に導入されたチャネルロドプシンの光感度が低いためである。

網膜色素変性症と加齢黄斑変性

光遺伝学的視覚再生が注目される背景には、治療選択肢が限られる網膜変性疾患の存在がある。代表例が網膜色素変性症 (retinitis pigmentosa; RP) である (10)。

RPは遺伝性網膜変性疾患の一つであり、通常は桿体視細胞から変性が始まり、続いて錐体視細胞も失われる(図2B-D)。初期には夜盲、ついで視野狭窄、進行例では中心視力低下に至る(図2A)。原因遺伝子はきわめて多様で、300種類以上が報告されており、個別遺伝子を標的とした治療のみで広く対応することは容易ではない。もう一つの重要な疾患が加齢黄斑変性(age-related macular degeneration; AMD)である(11)。AMDは高齢者の中心視力障害をもたらす主要疾患であり、黄斑部における視細胞および網膜色素上皮の障害を特徴とする。抗VEGF(血管内皮増殖因子)療法などの治療法はあるものの、進行例では視細胞の不可逆的喪失が生じるため、視機能を根本的に再建するには別の戦略が必要となる。

重要なのは、こうした疾患においても、視細胞消失後しばらくのあいだ双極細胞や網膜神経節細胞などの内網膜ニューロンが比較的残存する点である(図2D)。この残存神経回路を利用し、ロドプシンを導入して光受容機能を再構成するという発想が、光遺伝学的視覚再生の核心である(図3)。原因遺伝子に依存せず、視細胞脱落后にも適用可能である点で、この戦略は網膜変性疾患に対する普遍的治療基盤となる可能性を有している。

2. チャネルロドプシン(ChR)による視覚再生研究の歴史

光遺伝学的視覚再生の初期研究では、クラミドモナス由来ChR2が用いられた。2006年には、視細胞を欠損したマウスの網膜神経節細胞にChR2を発現させることで光応答が再建されることが示され、視細胞を介さずに網膜回路を再活性化できる可能性が初めて実証された(12)。その後、双極細胞、網膜神経節細胞など、標的細胞の違いによる応答特性の比較が進み、視覚誘発電位や行動レベルでの視機能回復が多数報告された(13, 14)。この分野の進展を支えたのは、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)による遺伝子導入技術である(15, 16)。AAVは比較的低免疫原性で、網膜において長期間安定した発現を実現できるため、視覚再生における遺伝子導入の主流手段となった。さらに、プロモーター設計や血清型選択によって、双極細胞指向性や神経節細胞指向性を高める工夫も発展した。

臨床応用で大きな節目となったのは、長波長応答性ChRであるChrimsonRを用いた研究である(17)。ChrimsonRを網膜神経節細胞に導入し、外部カメラと高輝度投影系を備えた光増幅ゴーグルと組み合わせることで、網膜色素変性症患者において物体認識に関わる視機能の部分回復が報告された(図3)。この成果は、光遺伝学がヒト完全失明例においても機能し得ることを示した点で画期的であり、視覚再生が概念実証から治療実装へと移行しつつあることを明確に示した。

一方で、初期のChR系ツールには、強い光を要すること、短波長光依存性ゆえの光毒性懸念、十分な膜発現や安定性の確保など、多くの課題が存在した。そのため、視覚再生の実用化に向けては、分子そのものの改良、すなわち長波長化、高光感度化、高発現化、応答安定化が大きな研究テーマとなってきた。

3. 視覚再生に向けたチャネルロドプシン(ChR)の多様化と分子設計

視覚再生におけるChR利用の本質的な利点は、光刺激を直接膜電位変化へ変換できる点にある。視細胞シグナル伝達を完全に再現するわけではないものの、適切な細胞に適切な分子を導入すれば、失われた網膜入力を代替し得る。しかし、研究ツールとして有用なChRが、そのまま治療ツールとして最適とは限らない。第一の課題は波長特性である。ChR2に代表される従来型ChRは青色光付近で活性化されるが、短波長光は組織透過性が低く、散乱・吸収を受けやすく、さらに網膜安全性の観点からも不利である。第二の課題は光感度である。多くのChRは十分な光電流を得るために比較的高い光を必要とし、自然環境光では応答が不十分となる場合がある。網膜は光に対して高感受性の組織であるため、高強度照射は光毒性や熱負荷の問題を伴う。第三に、哺乳類細胞における膜輸送性、発現安定性、不活性化の小ささ、時定数の最適化も重要である。視覚再生では、単に光で反応するだけでなく、弱い光で、長期に、安定して、しかも視覚情報として意味のある形で応答することが求められる。

このため現在の分子開発は、天然ロドプシンの多様性探索と、構造情報・電気生理・分光光学に基づく分子工学的改変を組み合わせ、視覚再生に最適な特性群を持つ分子を創出することが重要である。

4. 長波長光応答性ChR

長波長光応答性ChRの開発は、視覚再生分野における重要課題の一つである。長波長光は短波長光に比べて網膜組織内での散乱や吸収が少なく、相対的に光毒性リスクも低いため、治療応用に有利である。初期の代表例として、*Volvox carteri*由来のVChR1が挙げられる(18)。VChR1はChR2よりも赤色側である550 nm付近に吸収を持つが、哺乳類細胞での膜発現や輸送効率に課題があり、実用面には制約があった。これに対し、細胞における膜局在性や発現性を改善した改良型としてReaChRが開発され、より長波長光である590 nmでの効率的な活性化が可能となった(19)。ReaChRは深部組織刺激や網膜応用に適した分子として注目され、動物モデルにおいて視覚応答再建への有効性が示されている。

また、VChR1を基盤として開発されたmVChR1は、クラミドモナス由来ChR1とのキメラ設計により膜発現と波長応答域が改善された分子であり、網膜色素変性モデル動物での視覚誘発電位および行動応答回復が報告された(20)。さらにmVChR1の改良型であるComV1では、より低い光強度での作動が可能となり、環境光下での利用を見据えた性能向上が図られている(21)。チャネルのキネティクスや電流安定性を最適化した変異体も開発され、長波長化と高感度化の両立が追求されている。

長波長型ChRとしてもう一つ重要なのがChrimsonおよびChrimsonRである。これらは橙赤色光(590 nm)で効率よく活性化され、発現安定性や膜局在性にも優れる(22)。特にChrimsonRは、先述のヒト視覚再生の臨床研究に用いられたことで象徴的な存在となった(17)。このように長波長化は、安全性、組織透過性、臨床実

装性の観点から重要であるが、それだけでは十分ではない。視覚再生を次の段階へ進めるには、長波長応答性に加えて、弱光下でも確実に作動する高感度・高活性分子の開発が不可欠である。

5. 光感度・高活性 ChR の開発

視覚再生において、分子の高光感度化は長波長化と並ぶ中核課題である。患者が日常環境で視覚情報を得るためには、強い照明ではなく、環境光レベルで確実に網膜神経細胞を活性化できる分子が必要となる。この要請に対して、天然ロドプシン探索と分子工学的改良の両面から、光感度と光電流振幅に優れた ChR の開発が進んでいる。

ChRmine

ChRmine はメタゲノム探索から見いだされた高性能 ChR であり、非常に大きな光誘導電流と高い光感度を示す (23)。神経細胞へ導入すると、従来の緑藻由来の ChR 群と比較して弱い光でも強い脱分極を引き起こし得ることから、光遺伝学においても有望なツールである。さらに、分子構造解析の進展によって、広い細胞外イオンアクセス経路や特徴的なイオン透過経路が高コンダクタンスに寄与することが示唆されており、単なる高性能ツールにとどまらず、ChR の作動原理を理解するうえでも重要な分子である (24) (図 4)。実際、ChRmine 改変体である ChReef は、網膜色素変性症モデルマウス (rd1) の網膜神経節細胞への導入により高感度の視機能回復が示された (25)。

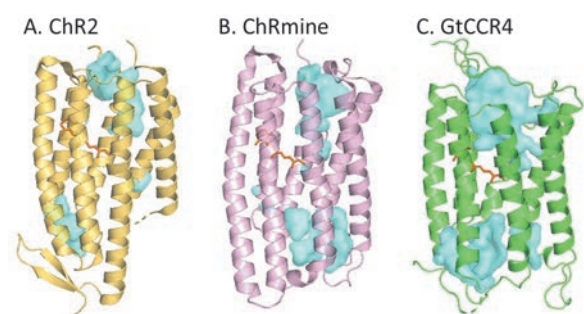


図 4 ChR 分子構造の比較

クラミドモナス由来 ChR2 (A)、メタゲノム探索から見いだされた ChRmine (B)、クリプト藻由来 GtCCR4 (C) の分子構造をそれぞれ示す。これらの分子構造はチャンネルが閉じた状態である。水色のメッシュ表示は分子内のキャビティで、イオン透過孔を形成すると推察される。ChRmine と GtCCR4 は、ChR2 に比べイオン透過孔が大きく、高いチャンネル活性（イオン透過性）に寄与することが示唆される。PDB code, ChR2: 6eid, ChRmine: 7w9w, GtCCR4: 8yel。

GtCCR4

同様に注目される天然高感度分子として、クリプト藻 *Guillardia theta* 由来 GtCCR4 が挙げられる (26)。GtCCR4 は、従来型 ChR2 と比較して著しく高い光感度を持ち、 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ レベルという低光強度でも活動電位を誘導可能である。しかも、時間分解能を大きく損なうことなく高感度を実現しており、視覚再生に必要な「弱光で反応しつつ動的情報も伝えられる」という条件に近い。分子構造解析および分光学的研究からは、

GtCCR4 に特徴的な大きなイオン透過経路、膜貫通ヘリックスの再配列やチャンネル回復過程の効率化が、高感度性と応答安定性に寄与している可能性が示されている (27) (図 4)。また、光照射時の不活性化が比較的小さいことから、連続的な視覚入力の実現にも有利と考えられる。実際に、網膜変性モデルマウスの網膜神経節細胞に GtCCR4 を導入した研究では、 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ レベルの弱光刺激に対する応答が観察されており、環境光作動型ツール開発の方向性を強く支持する成果となっている (26)。

Chronos

高感度ツールとして忘れてはならないのが Chronos である (28)。Chronos は高い光感度と高速キネティクスを兼ね備えた ChR として知られ、短い光パルスでも効率よく神経発火を誘導できる点で、神経科学分野では広く利用されてきた。視覚再生の観点では、単に感度が高いだけでなく、視覚情報の時間特性をどこまで保持できるかが重要である。Chronos はオン・オフ応答の追従性に優れ、高頻度刺激にも比較的忠実に応答できることから、動的視覚情報の再構成に有利な特性を持つ。さらに近年、Chronos を基盤に視覚再生用途へ最適化を図った分子として BS01 が注目されている (29)。BS01 は Chronos 系の高感度・高速応答という長所を維持しつつ、網膜神経細胞での発現性や実用的な応答性の改善を目指した設計思想を反映した分子である。視覚再生では、光感度、膜発現、応答速度、不活性化の少なさ、細胞毒性の低さといった複数の要素を同時に満たす必要があるが、BS01 はそのバランス最適化の方向性を示す好例といえる。とくに、従来の「高感度化すると応答が遅くなる」、「高電流化すると発現や安定性に難が出る」といったトレードオフをどのように克服するかという点で、Chronos/BS01 系は重要な足がかりを与えている。

MCO1

さらに、複数の特性を統合したツールとして Multi-Characteristic Opsin 1 (MCO1) が開発されている (30)。MCO1 は、2 種の ChR を直列に融合するように設計された広帯域応答型ロドプシンであり、従来の ChR が必要とした高強度光刺激への依存を低減することを目的としている。MCO1 は、緑藻クラミドモナス由来青色光応答性の ChR2 の改変体である CatCh (31) と、赤色光応答性 ChRimson (28) の 2 種のロドプシンの特性を統合することで青色光から赤色光 (450 nm~600 nm) にわたる幅広い波長に応答し、光刺激に必要なエネルギーを低減できる点が特徴である。培養細胞発現時におけるチャンネル活性は低いものの、網膜変性モデルマウスにおいては、AAV を介した発現により網膜細胞で安定した機能発現が確認され、視覚誘導行動の有意な回復が示されている (32)。このような広帯域かつ高光感度の分子設計は、先に述べた光増幅ゴーグルのような外部光増幅デバイスへの依存を低減し、より実用的な視覚再生戦略につながるものと考えられる。これは、天然高光感度オプシンと並び、分子設計により光応答特性を最適化するアプローチの重要性を示している。

このように、高光感度 ChR の開発は、単なる性能向

上ではなく、視覚再生の実装条件そのものを変える可能性を持つ。十分に高感度な分子が得られれば、より自然な視覚再建戦略が見えてくる。また、高活性分子の分子構造基盤を解明することは、今後の合理的分子設計に直結する。すなわち、天然ロドプシンの多様性探索と、構造・電気生理・分光光学を融合した設計研究こそが、次世代視覚再生ツール開発の原動力である。

6. 動物ロドプシンによる視覚再生

これまで述べてきたように、光遺伝学的視覚再生研究の多くは ChR を利用して進められてきた。ChR は光刺激により直接イオンチャネルとして機能し、膜電位変化を誘導できるため、高速かつ明確な神経応答を得られるという利点を持つ。一方で、十分な光応答を得るためには比較的強い光強度を必要とする場合が多い。この課題に対する代替戦略として、動物ロドプシン (type II rhodopsin) を利用した視覚再生が提案されている。動物ロドプシンは G タンパク質共役型受容体 (GPCR) として機能し、光刺激によって G タンパク質シグナルを活性化する (2)。GPCR シグナル伝達では分子増幅が生じるため、微生物ロドプシンと比較して弱い光でも神経応答を誘導できる可能性がある。この特性は、自然環境光条件での視覚再生を目指す上で大きな利点となる。しかしながら、動物ロドプシンの光反応サイクルは視細胞における生理機構に最適化されたものであり、その分子特性は光遺伝学用途において必ずしも理想的とは限らない。以下ではまず、動物ロドプシンに共通する光反応サイクルの特徴を整理したうえで、視覚再生研究に利用されている代表的分子を概説する。

動物ロドプシンの分子特性

動物ロドプシンは、光吸収によってレチナールの異性化を起点とする構造変化を起こし、G タンパク質を活性化する GPCR 型光受容体である。分子増幅による高い光感度を実現できるという特徴を持つ。一方で、動物ロドプシンの光反応サイクルにはいくつかの特徴があり、これが光遺伝学的利用において制約となる場合がある。

まず、脊椎動物由来ロドプシンの多くは単反応性 (monostable) である (1)。すなわち、光を吸収すると活性化状態へ移行した後、発色団レチナールがタンパク質から解離する。再び光応答可能な状態へ戻るためには 11-cis retinal の再結合が必要となる。この再生過程は視細胞では網膜色素上皮を含むレチノイドサイクルによって効率的に維持されているが、視覚再生で標的となる双極細胞や網膜神経節細胞では同様の再生系が十分に機能しない可能性がある。そのため、脊椎動物型ロドプシンは繰り返しの光刺激に対する応答持続性が制限される場合がある。

一方、無脊椎動物由来ロドプシンの多くは双安定性 (bistable) を示す (33)。これは光によって生成される活性状態が比較的安定であり、レチナールを保持したまま第二の安定状態へ移行する性質である。この場合、レチナール解離を伴わないため分子の再利用が可能であるが、暗状態へ戻るためには通常、別波長の光による逆異性化が必要となる。そのため、単一波長刺激による

高速なオン・オフ制御が求められる光遺伝学用途では、この双安定性も必ずしも理想的とは言えない。このように、動物ロドプシンは高感度な光受容を実現できる一方で、単反応性あるいは双安定性に由来する光反応サイクルの制約を持つ。以下では、視覚再生研究で利用が試みられている代表的な動物ロドプシンを紹介する。

メラノプシン (OPN4)

メラノプシン (OPN4) は網膜神経節細胞の一部に発現する光感受性 GPCR であり、概日リズムの同調や瞳孔反射などの非視覚光応答に関与する (34)。視細胞が欠損した網膜において OPN4 を神経節細胞に発現させることで光応答を回復できることが示され、動物ロドプシンを利用した視覚再生研究の初期例として重要な成果となった (35, 36)。メラノプシンは比較的高い光感度を持つ一方で応答速度が遅く、時間分解能の高い視覚情報処理には制限があると考えられている。それでも、GPCR 型光受容体が視覚再生に利用可能であることを示した点で、この研究は重要な意義を持つ。

錐体ロドプシン (MW-opsin)

錐体視細胞に発現するロドプシンを利用した視覚再生も試みられている。中波長感受性錐体ロドプシン (MW-opsin) を網膜神経節細胞に導入すると、視細胞が失われた網膜でも光応答を誘導できることが報告されている (37)。しかし、脊椎動物型ロドプシンは単反応性であり、光活性化後にレチナールを解離する。このため、異所性発現環境ではレチナール再結合が律速となり、繰り返し光刺激に対する応答持続性が制限される可能性がある。したがって、MW-opsin のような錐体ロドプシンを視覚再生ツールとして利用する場合には、細胞内レチノイド供給やレチナール再生機構の検討が重要となる。

クラゲ由来ロドプシン (JellyOp)

近年注目されている分子の一つが、箱クラゲ *Carybdea rastonii* 由来の視覚ロドプシン JellyOp である (38)。JellyOp は G α s タンパク質と複合体を形成した状態で存在することが報告されており、この特性により GPCR 型ロドプシンとしては例外的に高速な光応答を示す。JellyOp を網膜双極細胞に発現させた研究では、視細胞が欠損したマウスモデルにおいて網膜神経回路の光応答および視覚行動の回復が示されている (39)。GPCR 型ロドプシンでありながら高速応答を示す点で、動物ロドプシンの時間分解能の制約を克服する可能性を示した分子として注目されている。

キメラロドプシン (GHCR)

動物ロドプシンの高光感度と微生物ロドプシンの安定性を組み合わせる試みとして、キメラロドプシン (GHCR) が開発されている (40)。GHCR はシアノバクテリア由来の微生物ロドプシン骨格とヒトロドプシンの構造要素を組み合わせた分子であり、G タンパク質シグナルを介した光応答を誘導できる (41)。網膜変性モデル動物では、GHCR 導入により視覚誘発電位や視覚依存行動の回復が報告されており、GPCR 型ロドプ

シンを利用した視覚再生戦略の有望な例として注目されている。このようなキメラ設計は、動物ロドプシンと微生物ロドプシンの長所を統合する分子工学的アプローチとして重要である。

動物ロドプシン戦略の意義

以上のように、動物ロドプシンを利用した視覚再生は、微生物ロドプシンとは異なる分子機構に基づくアプローチである。動物ロドプシンはGタンパク質シグナルを介した分子増幅によって光信号を伝達するため、弱い光でも応答を誘導できる可能性を持ち、自然環境光条件下での視覚再生において重要な戦略となる。一方で、脊椎動物型ロドプシンの単反応性や無脊椎動物型ロドプシンの双安定性といった光反応サイクルの特性は、光遺伝学用途において制約となる。従って、これらの分子特性を克服する設計、すなわち異所性発現環境でも効率的に再利用可能なロドプシン分子の開発や、単一波長刺激下で反復応答可能な分子設計が実現すれば、動物ロドプシンの潜在能力は大きく拡張される。今後の視覚再生研究では、微生物ロドプシンによる高速・直接的な光応答と、動物ロドプシンによる高感度シグナル増幅という二つの分子戦略が相補的に発展し、目的に応じた光受容分子の選択および分子設計が進むと考えられる。

7. まとめと今後の展望

光遺伝学的視覚再生は、ロドプシンの分子機構研究から生まれ、現在では遺伝子治療・再生医療の有力な一分野へと成長した。とくにChRの発見は、光刺激を直接神経活動へ変換できる分子ツールを提供し、視細胞が失われた網膜においても光応答を再構築できるという新しい治療概念をもたらした。その後、長波長応答性、高光感度、高発現性、応答安定性といった実用上の要請に応えるべく、分子探索と分子設計が急速に進展してきた。現在の視覚再生研究は、大きく二つの戦略に支えられている。第一は、微生物ロドプシンを用いて膜電位を直接制御する戦略であり、高速で明快な信号変換に優れる。第二は、動物ロドプシンを用いてGタンパク質シグナルによる増幅を利用する戦略であり、より弱い光環境での作動に可能性を持つ。今後は、この二つを単純に競合させるのではなく、網膜の病態段階、標的細胞、必要とされる空間・時間分解能、臨床実装のしやすさに応じて使い分け、あるいは融合させる視点が重要になる。

さらに、視覚再生治療開発は分子単独では決まらない。網膜変性に伴う回路再編、細胞生存性、標的細胞選択、AAV送達効率、慢性発現時の安全性、さらには脳が再入力された視覚情報をどこまで利用できるかという神経可塑性の問題も重要である。従って、今後の研究では、分子開発と並行して、網膜回路生理、病態進行に応じた介入時期、視覚情報の符号化戦略を統合的に検討する必要がある。

それでもなお、この分野の展望はきわめて明るいと考える。ロドプシン研究は、光受容の基礎機構解明から始まり、光で細胞を操る技術を生み、いまや失われた視覚を回復する医療へと到達しつつある。光遺伝学的視覚再生は、分子機能解析、分子設計、遺伝子治療、

神経科学、臨床医学が交差する学際領域であり、その進展は光生物学の成果が患者の生活に直接結びつく希有な例である。天然ロドプシンの多様性と分子工学を融合した次世代光受容分子の開発により、将来的には外部デバイス依存を最小限に抑えた、より自然で実用的な視覚再建が実現すると期待される。ロドプシン研究は今後も、光を理解する学問であると同時に、光を患者へ返す学問として発展していくであろう。

謝辞

ロドプシンの分子機能研究、光遺伝学研究、本稿の作成にあたり、多大なるご助言とご指導を賜りました名古屋工業大学、神取秀樹特別教授に深く感謝いたします。また、GtCCR4の光遺伝学研究について、名古屋工業大学、細島頌子特任准教授に深く感謝いたします

参考文献

1. Ernst OP, Lodowski DT, Elstner M, Hegemann P, Brown LS, Kandori H. Microbial and animal rhodopsins: Structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem Rev*, 2014; 114: 126–163.
2. Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN Jr. G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol*, 2002; 64:153-187.
3. Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae. *Science*, 2002; 296: 2395–2398.
4. Nagel G, Szellas T, Huhn W et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 13940–13945.
6. Govorunova EG, Sineshchekov OA, Janz R, Liu X, Spudich JL. Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics. *Science*, 2015; 349: 647–650.
5. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K, Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 2005; 8: 1263–1268.
7. Govorunova EG, Gou Y, Sineshchekov OA. et al. Kalium channelrhodopsins are natural light-gated potassium channels that mediate optogenetic inhibition. *Nat Neurosci*, 2022; 25: 967–974.
8. Vierock J, Shiewer E, Grimm C et al. WiChR, a highly potassium-selective channelrhodopsin for low-light one- and two-photon inhibition of excitable cells. *Sci Adv*, 2022; 8: eadd7729.
9. Sahel JA, Roska B. Gene therapy for blindness. *Annu Rev Neurosci*. 2013; 36: 467-488.
10. Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res*, 2018; 66: 157-86.
11. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY, Age-related macular degeneration, *Lancet*, 2012; 379: 1728-1738.
12. Bi A, Cui J, Ma Y. et al. Ectopic Expression of a Microbial-Type Rhodopsin Restores Visual Responses in Mice with Photoreceptor Degeneration.

- Neuron, 2006; 50: 23–33.
13. Lagali PS, Balya D, Awatramani GB. et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci*, 2008; 11: 667–675.
 14. Zhang Y, Ivanova E, Bi A, Pan ZH. Ectopic Expression of Multiple Microbial Rhodopsins Restores on and off Light Responses in Retinas with Photoreceptor Degeneration. *J Neurosci*, 2009; 29: 9186–9196.
 15. Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR. et al. In Vivo-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous. *Sci Transl Med*, 2013; 5: 189ra76.
 16. Jüttner J, Szabo A, Gross-Scherf B. et al. Targeting neuronal and glial cell types with synthetic promoter AAVs in mice, non-human primates and humans. *Nat. Neurosci*, 2019; 22: 1345–1356.
 17. Sahel JA, Boulanger-Scemama E, Pagot C. et al. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat Med*, 2021; 27: 1223–1229.
 18. Zhang F, Prigge M, Beyrière F. et al. Red-Shifted Optogenetic Excitation: A Tool for Fast Neural Control Derived from *Volvox carter*. *Nat Neurosci*, 2008; 11: 631–633.
 19. Lin JY, Knutsen PM, Muller A, Kleinfeld D, Tsien RY. ReaChR: A Red-Shifted Variant of Channelrhodopsin Enables Deep Transcranial Optogenetic Excitation. *Nat Neurosci*, 2013; 16: 1499–1508.
 20. Tomita H, Sugano E, Murayama N. et al. Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified *volvox* channelrhodopsin-1. *Mol Ther*, 2014; 22: 1434–1440.
 21. Watanabe Y, Sugano E, Tabata K. et al. Development of an optogenetic gene sensitive to daylight and its implications in vision restoration. *NPJ Regen Med*, 2012; 6(1):64, 2021.
 22. Sengupta A, Chaffiol A, Macé E. et al. Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina. *EMBO Mol Med*, 2016; 8: 1248–1264.
 23. Marshel JH, Kim YS, Machado TA. et al. Cortical layer-specific critical dynamics triggering perception. *Science*, 2019; 365: eaaw5202.
 24. Kishi KE, Kim YS, Fukuda M. et al. Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine. *Cell*, 2022; 185: 672–689.
 25. Alekseev A, Hunniford V, Zerche M. et al. Efficient and sustained optogenetic control of sensory and cardiac systems. *Nat Biomed Eng*, 2026; 10(2):277–292.
 26. Hososhima S, Ueno S, Okado S. et al. A light-gated cation channel with high reactivity to weak light. *Sci Rep*, 2023; 13: 7625.
 27. Tanaka T, Hososhima S, Yamashita Y. et al. The high-light-sensitivity mechanism and optogenetic properties of the bacteriorhodopsin-like channelrhodopsin GtCCR4. *Mol Cell*. 2024; 84(18): 3530–3544.
 28. Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS. et al. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat Methods*, 2014; 11(3): 338–346.
 29. Yan B, Viswanathan S, Brodie SE. et al. A clinically viable approach to restoring visual function using optogenetic gene therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023; 9:29:406–417.
 30. Wright WW, Gajjaraman S, Batabyal S. et al. Vision in Mice with Retinal Degeneration Using Multicharacteristic Opsin. *Neurophotonics*, 2017; 4: 1.
 31. Kleinlogel S, Feldbauer K, Dempski RE. et al. Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci*, 2011; 14(4): 513–518.
 32. Batabyal S, Kim S, Carlson M. et al. Multi-Characteristic Opsin Therapy to Functionalize Retina, Attenuate Retinal Degeneration, and Restore Vision in Mouse Models of Retinitis Pigmentosa. *Transl Vis Sci Technol*, 2024; 13: 25.
 33. Terakita A, Kawano-Yamashita E, Koyanagi M. Evolution and diversity of opsins. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*, 2012; 1: 104–111.
 34. Panda S, Sato TK, Castrucci AM, et al. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science*, 2002; 298(5601): 2213–2216.
 35. Lin B, Koizumi A, Tanaka N, Panda S, Masland RH. Restoration of Visual Function in Retinal Degeneration Mice by Ectopic Expression of Melanopsin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105: 16009–16014.
 36. DeSilva SR, Barnard AR, Hughes S. et al. Long-Term Restoration of Visual Function in End-Stage Retinal Degeneration Using Subretinal Human Melanopsin Gene Therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017; 114: 11211–11216.
 37. Berry MH, Holt A, Salari A. et al. Restoration of High-Sensitivity and Adapting Vision with a Cone Opsin. *Nat Commun*, 2019; 10: 1221.
 38. Koyanagi M, Takano K, Tsukamoto H, Ohtsu K, Tokunaga F, Terakita A. Jellyfish vision starts with cAMP signaling mediated by opsin-G(s) cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008; 105(40):15576–15580.
 39. van Wyk M, Kleinlogel S. A visual opsin from jellyfish enables precise temporal control of G protein signalling. *Nat Commun* 2023; 14(1): 2450.
 40. Katada Y, Yoshida K, Serizawa N. et al. Highly sensitive visual restoration and protection via ectopic expression of chimeric rhodopsin in mice. *iScience*, 2023; 26: 107716.
 41. Sasaki K, Yamashita T, Yoshida K, Inoue K, Shichida Y, Kandori H. Chimeric Proton-Pumping

Rhodopsins Containing the Cytoplasmic Loop of
Bovine Rhodopsin. PLoS One, 2014; 9: e91323.

利益相反

著者は、本論文に関連して申告すべき利益相反
(COI) はありません。

Chemical Probes for Capture and Labeling of Organic Sulfur Oxides: Focus on Fluorescent Molecules Responsive to Conjugation with Sulfenic and Sulfinic Acids

Hiroki Tanimoto* and Takenori Tomohiro

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

*Corresponding author:

Hiroki Tanimoto

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

Tel: +81-76-434-7518, Fax: +81-76-434-5063, E-mail: tanimoto@pha.u-toyama.ac.jp

Abstract:

Redox systems involving organosulfur species play critical roles in metabolic regulation, signal transduction, and diseases associated with oxidative stress. Among cysteine-derived sulfur oxides, sulfenic acids ($R-SO_2H$) have received considerably less attention than thiols ($R-SH$) and sulfinic acids ($R-SOH$), primarily because their weak nucleophilicity and electrophilicity make selective capture and detection difficult. This review summarizes recent advances in chemical probes designed to covalently capture and label sulfenic and sulfinic acids, with particular emphasis on turn-on fluorescent molecules that emit only upon conjugation with sulfenic and sulfinic acid species. Following the early colorimetric work using aryldiazonium salts, reactive scaffolds such as nitroso compounds, azodicarboxylates, *S*-nitroso derivatives, and maleimides have been established for capturing sulfenic acids, while strained cycloalkynes, *trans*-cyclooctenes, and dimedone-inspired motifs have enabled selective trapping of sulfinic acids. Turn-on fluorescent probes have recently emerged, including a dimedone-type scaffold that captures sulfinic acids via ene-type C–S bond formation, a 1,2-allenic ketone scaffold that operates via disruption of photoinduced electron transfer, and 1,8-naphthalimide-based azocarboxylates that exhibit large Stokes shifts and high fluorescence quantum yields upon sulfinate addition. Polymer-tethered probes have further expanded this toolkit. Chemical probes targeting sulfenic and sulfinic acids are rapidly maturing into practical tools for analyzing trace sulfur-oxidized proteins under oxidative stress, and their further development is expected to contribute to the elucidation of redox-related disease mechanisms and to new diagnostic and therapeutic strategies.

Keywords: oxidative stress, sulfenic acid, sulfinic acid, chemical probe, turn-on fluorescence

1. INTRODUCTION

Biological redox systems play essential roles in metabolic activity, signal transduction, and physiological functions, and are also closely associated with oxidative stress implicated in various diseases (1–4). In particular, thiols ($R-SH$), which bear highly reactive sulfhydryl groups, serve as oxidation targets and undergo both reversible and irreversible transformations to different oxidation states (Figure 1). Specifically, thiols are converted to disulfides ($R-S-S-R'$) and polysulfides ($R-(S)_n-R'$) through oxidative oligomerization, and these species can be reduced back to the original thiols by thiol–disulfide exchange or by the glutathione and thioredoxin systems (5). An alternative oxidation pathway exists, in which thiols are sequentially oxidized to sulfenic acids ($R-SOH$), sulfinic acids ($R-SO_2H$), and finally sulfonic acids ($R-SO_3H$) (6). These sulfur oxoforms are not limited to transient intermediates of cysteine oxidation but also occur as bioactive natural products. For example, cysteine-derived sulfenic acids such as L-cysteine sulfenic acid and hypotaurine are well-known endogenous metabolites in mammals (Figure 1), and the chemistry and biology of sulfinylated peptides

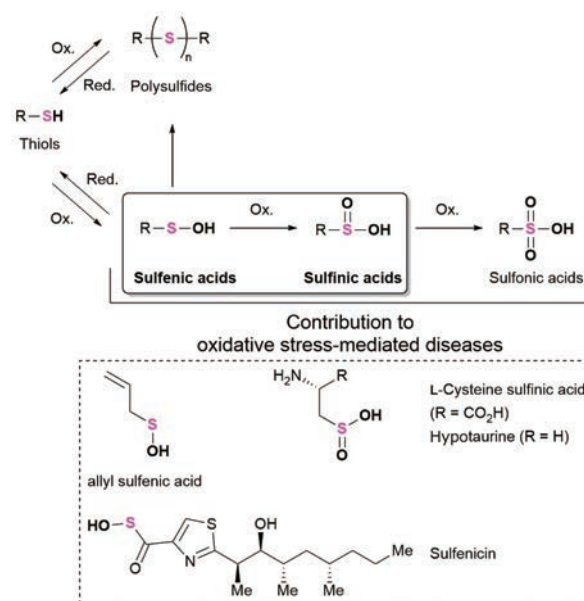


Figure 1. Oxidative transformation of thiols into sulfur oxide species.

have also been recently reviewed (7). In contrast, sulfenic acids are generally too reactive to be isolated in pure form. However, allyl sulfenic acid generated from alliin by alliinase condenses spontaneously to give allicin, the well-known defence molecule from garlic (8). More recently, sulfenicin—a natural product bearing an acylsulfenic acid functional group—was discovered from a marine *Streptomyces* bacterium. Although the free acid was unstable, it could be structurally characterized by X-ray crystallography as its copper(II) complex (9). While sulfenic acids can be reduced back to thiols or converted to polysulfides through intermolecular reactions, further oxidation to sulfinic and sulfonic acids is generally considered irreversible under physiological conditions (7, 10). Notably, a reduction pathway of sulfinic acids back to thiols by sulfiredoxin has been identified, establishing the reversibility of this step (11, 12).

These oxidized sulfur species are estimated to constitute approximately 5% of cellular protein Cys residues under steady-state conditions (10), and this level can rise to as much as 40% under oxidative stress (13). Among these modifications, sulfenylation of redox-sensitive cysteines has emerged as a key regulatory switch that modulates protein activity, localization, and interactions, thereby contributing to the pathogenesis of thrombotic disorders, diabetes, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, and cancer (11–13). Notably, sulfenylated proteins have also been explored as molecular targets for diagnostic radiotracers and as starting points for covalent inhibitor design (13). Understanding the mechanisms that control the balance among these sulfur species and their physiological roles is therefore critically important, and has driven significant interest in the fields of chemical biology and drug discovery, particularly in the detailed study of cysteine-derived redox reactions (1–4). Among these oxidized sulfur species, sulfinic acids ($R-SO_2H$) have attracted particular attention, partly because efficient methods for their selective and direct monitoring remain to be established.

Various methods are known for the detection and imaging of sulfur compounds, including chemical probes for hydrogen sulfide (H_2S) and other reactive sulfur species (14). In contrast, protein-bound sulfur species exist in diverse molecular environments rather than as discrete small molecules. Therefore, directly attaching a tag to the target through covalent bonding (i.e., labeling) is desirable for their detection, stable isolation, and identification.

2. ORGANIC MOLECULES CAPABLE OF CAPTURING SULFINIC AND SULFENIC ACIDS

Sensing technologies for supersulfides have attracted considerable attention in recent years (15). Beyond supersulfides, the development of selective methods for capturing sulfenic and sulfinic acids—the other major branch of cysteine oxidation chemistry—has also emerged as a pressing need. In contrast to thiols ($R-SH$),

which possess very high nucleophilicity and oxidative reactivity, the products of this alternative oxidation pathway differ markedly: sulfenic acids ($R-SOH$) are extremely unstable and thus require rapid capture, while sulfinic acids ($R-SO_2H$) exhibit weak nucleophilicity and electrophilicity, making their capture and labeling difficult. As a result, effective detection and analytical methods have remained limited.

The early analytical method for sulfinic acid detection was a colorimetric assay. For example, Babbs and Gale reported a colorimetric assay in which methanesulfinic acid reacts with aryl diazonium salts to form a colored azosulfone (**Figure 2a**) (16). While this approach provided a simple readout for sulfinate quantification in solution, it lacked the selectivity and sensitivity required for proteomic applications. Carroll and co-workers reported the first major advance in chemoselective sulfinate capture, demonstrating that aryl-nitroso compounds undergo rapid and chemoselective ligation with sulfinic acids to give stable sulfonamide adducts (17). Building on this principle, the same group later introduced an electrophilic diazene probe bearing an alkyne handle for click chemistry, which enabled chemoproteomic mapping of protein S-sulfinylation in HeLa cells and identified more than 50 new substrates of sulfiredoxin (18). In parallel, Martin and co-workers established complementary capture chemistries: a biotinylated S-nitroso reagent for affinity enrichment of sulfinylated cysteines (19), and a maleimide-linked profiling probe for monitoring protein S-sulfinylation across the proteome (20). Together, these MS/MS-based proteomic studies marked a turning point in the field, transforming sulfinic acid from an analytically intractable modification into a quantifiable post-translational mark.

For the less oxidized but highly unstable sulfenic acids ($R-SOH$), dimedone has long been used as a sulfenic acid trap, forming a stable thioether adduct upon nucleophilic addition (**Figure 2b**). In fact, Chang and co-workers used a cholic acid-conjugated dimedone probe to chemoproteomically profile the active-site cysteine sulfenic acid form of bile salt hydrolases (BSHs), revealing that BSH activity is regulated by oxidative post-translational modifications (21). In addition, more efficient capture methods have since been developed, including strained cycloalkynes by King and co-workers (22) and *trans*-cyclooctenes by Fox and co-workers (23).

As described above, sulfinic and sulfenic acid species among organic sulfur oxides have been recently recognized as molecular targets, and effective capture methods are beginning to emerge. These probes function as light-emitting reporters that signal target capture, enabling analysis of cysteine oxoforms in cells. Although practical implementation still requires further development and broader participation across the community, effective covalent capture methods illustrate the growing interest in this expanding research field.

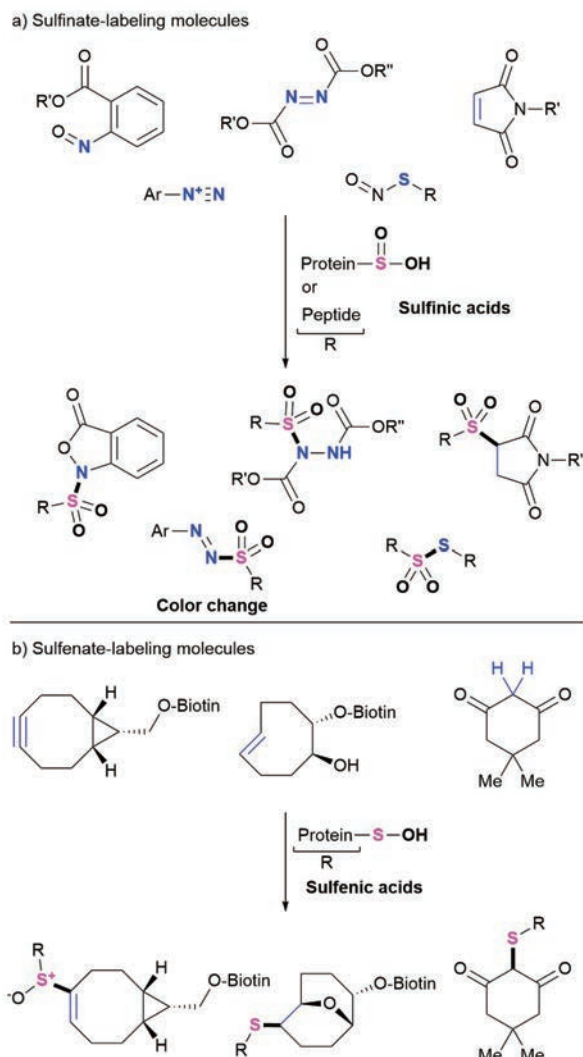


Figure 2. Molecular designs for scavenging sulfinic and sulfenic acids.

3. TURN-ON FLUORESCENT PROBES FOR SULFENIC AND SULFINIC ACID DETECTION

Although covalent capture strategies for sulfinic and sulfenic acids have been developed, as outlined in the previous section, several practical limitations remain. Except for the early colorimetric assay with aryl diazonium salts, most existing probes are "always-on" molecules or require conjugation with separate fluorophore units. The intrinsic fluorescence of "always-on" probes necessitates a washing step to remove unreacted probe, which is unsuitable for the analysis of low-abundance sulfenylated and sulfinylated proteins. To overcome this limitation, "turn-on" fluorescent probes—in which fluorescence emission is activated only upon covalent ligation with the sulfenic and sulfinic acid moieties—offer a powerful alternative for the selective and wash-free detection of S-sulenylation and S-sulfinylation.

Building on the sulfenic acid-scavenging strategies

(**Figure 2b**), Carroll and co-workers extended their dimedone-based chemistry into a turn-on fluorogenic platform, in which fluorescence emission is selectively activated upon covalent adduct formation with cysteine sulfenic acid ($\Phi_{\text{FL}} = 0.009$ and 0.02 in PBS for **CysOx1** and **CysOx2** adducts, respectively) (**Figure 3a**) (24). Through an ene-reaction-type covalent C–S bond formation at the α -carbon of the sulfonyl ketone scaffold, the keto-enol tautomerism responsible for fluorescence quenching is suppressed, resulting in turn-on fluorescence. The resulting cell-permeable probes **CysOx1** and **CysOx2** exhibited rapid reactivity, high selectivity, and minimal cytotoxicity, enabling no-wash live-cell confocal imaging of endogenous protein S-sulenylation in HeLa cells. These probes were further adapted into a high-throughput assay for screening kinase inhibitors, revealing GSK3-mediated regulation of the cellular sulfenome.

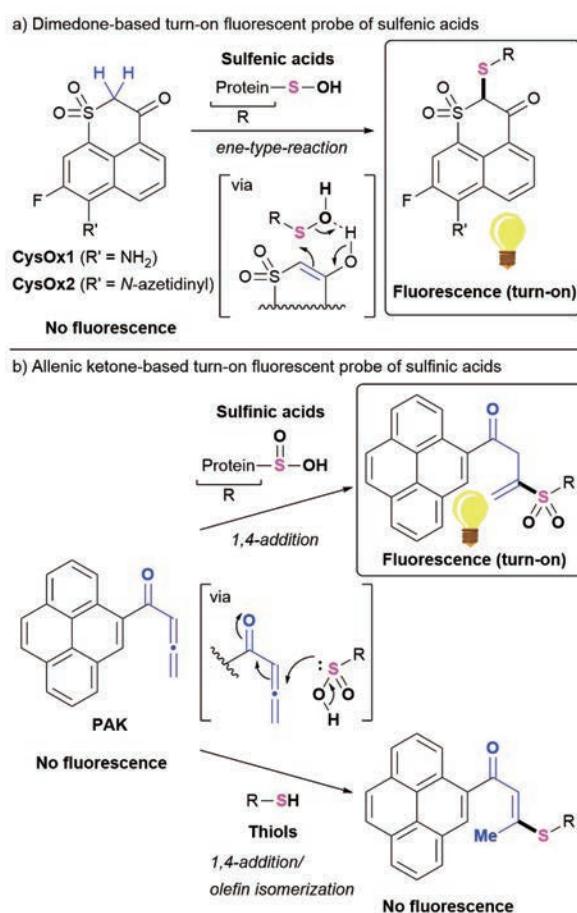


Figure 3. Turn-on fluorescent probes of sulfenic and sulfinic acids based on dimedone- and allenic ketone-type molecules.

Whereas Carroll's CysOx probes target sulfenic acids, Strongin, Yang and co-workers focused on the more oxidized sulfinic acids and designed a fluorogenic probe, pyrene allenyl ketone (named as PAK in the literature), that incorporates a 1,2-allenic ketone as the sulfinic acid recognition unit tethered to a pyrene fluorophore quenched by intramolecular photoinduced electron transfer (PeT or PET) (**Figure 3b**) (25). Nucleophilic

1,4-conjugate addition of a sulfinic acid to the central sp²-hybridized carbon of the allenic ketone converts it into a β,γ -unsaturated enone, disrupting the PeT pathway and producing a pronounced turn-on fluorescence response ($\Phi_{\text{FL}} = 0.44$ in phosphate buffer). Although biothiols (e.g., Cys, GSH) also add to the allenic ketone, they generate α,β -unsaturated enone adducts in which PeT is retained, rendering these products only weakly emissive and thereby avoiding interference. PAK exhibited high selectivity and sensitivity for sulfinic acids *in vitro* and, critically, enabled direct fluorescence imaging of protein S-sulfinylation in living cells, providing a rare example of a chemoselective, reaction-based turn-on probe for this oxidative cysteine modification.

Independently of the studies by Carroll and co-workers (18), Tanimoto's group had observed that azodicarboxylates rapidly capture sulfinic acids both at room temperature and even at cryogenic temperatures down to $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, a finding made during unrelated investigations of nitrosoallene chemistry (26–28). Inspired by this serendipitous reactivity together with Carroll's chemical biology applications of azodicarboxylates, Tanimoto and co-workers sought to exploit it for the development of fluorescent probes targeting sulfinic acids. Specifically, they employed 1,8-naphthalimide as a molecular scaffold and installed an electron-donating hydrazino group at the 4-position; subsequent oxidation generated the corresponding electron-withdrawing and photo-quenching azo (diazene) functionality, whose disruption upon sulfinic acid addition was designed to switch on intramolecular charge transfer (ICT) fluorescence (Figure 4a) (29).

Synthesis and evaluation of various substrates revealed that, when acyl-type protecting groups were employed on the nitrogen atom, the diazene intermediate—generated by oxidation of the hydrazide—was unstable and underwent loss of the azo group, affording the non-fluorescent naphthalimide scaffold without sulfinate capture. In contrast, replacing the acyl group with a carbamate group afforded a stable diazene that, upon oxidative activation, reacted rapidly and quantitatively with sulfonyl radicals generated *in situ* from sulfinate salts and acetyl chloride at room temperature to give the corresponding adducts. Notably, the regioisomer in which sulfinic acid added to the nitrogen on the carbamate side (the bold N in Figure 4a) exhibited strong fluorescence with a large Stokes shift exceeding 100 nm and remarkably high fluorescence quantum yields of 0.91 in THF and 0.54 in methanol. In contrast, the starting hydrazide, the unreacted diazene itself, and the corresponding regioisomeric sulfonyl hydrazide adduct showed virtually no or only faint emission in most solvents. These properties enable highly sensitive detection of sulfinylated species even at trace levels, thereby establishing a turn-on fluorogenic platform in which only sulfinic acid-capturing molecules emit fluorescence.

Building on the success of this monomeric system, Tanimoto and co-workers further developed a polymeric

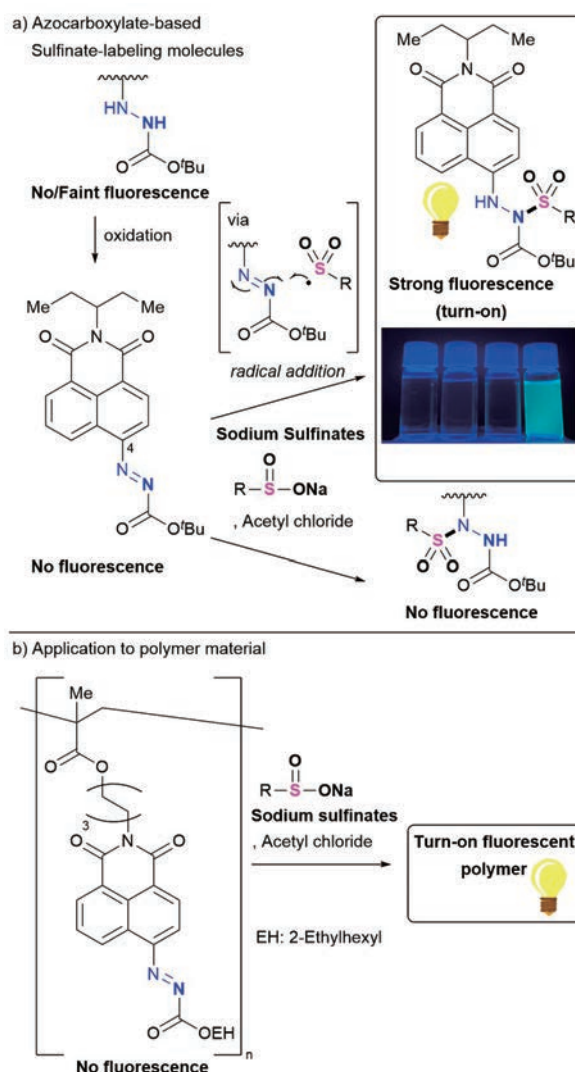


Figure 4. Azocarboxylate-based turn-on fluorescent probe of sulfinites and its polymer application.

turn-on fluorescent probe for sulfinic acids by tethering the naphthalimide-based azocarboxylate reactive unit to a polymethacrylate backbone (Figure 4b) (30). Before sulfinate capture, the azo group efficiently quenches the naphthalimide emission, rendering the pendant naphthalimide units essentially non-fluorescent. Nucleophilic addition of a sulfinate salt to the azo nitrogen affords a sulfonylhydrazide-type adduct, eliminating the azo-based quenching pathway and switching on strong naphthalimide fluorescence. A key design finding was that, within the polymer scaffold, non-emissive regioisomeric adducts exerted only minimal intramolecular quenching on neighboring activated fluorophores, allowing the polymer to retain a substantial turn-on fluorescence ($\Phi_{\text{FL}} = 0.38$ in THF and 0.20 in methanol) upon sulfinate addition. The authors demonstrated selective, covalent capture of sulfinites with robust fluorescence enhancement, highlighting the polymethacrylate-tethered naphthalimide azocarboxylate as a promising scaffold for fluorescent

Turn-on fluorescent probe molecules	CysOx	PAK	Azonaphthalimide
capturing sulfur oxoforms	Sulfenic acids (R-S-OH)	Sulfinic acids (R-SO ₂ H)	Sulfonyl radicals generated <i>in situ</i> from sulfinates (R-SO ₂ •)
Fluorescence quantum yields (Φ_{FL})	0.009 (CysOx1) 0.02 (CysOx2) (PBS)	0.44 (phosphate buffer)	monomer: 0.91 (THF), 0.54 (MeOH) polymer: 0.38 (THF), 0.20 (MeOH)
λ_{em} and Stokes shift (nm)	606 (159)	468 (101)	Monomer: 505 (139) Polymer: 503 (125) (MeOH)

Table 1. Summary of the introduced turn-on fluorescent probe compounds for sulfenic and sulfinic acids

labeling and detection of protein S-sulfinylation.

Table 1 summarizes the photophysical and mechanistic features of the three turn-on fluorescent platforms described above. These probes target distinct cysteine oxoforms through complementary activation mechanisms. **CysOx** detects sulfenic acids via ene-type C–S bond formation that suppresses the keto–enol tautomerism responsible for fluorescence quenching. For sulfinic acids, **PAK** operates via 1,4-conjugate addition that disrupts PeT through formation of a β,γ -unsaturated enone. In contrast, the naphthalimide–azocarboxylate platform captures sulfonyl radicals generated *in situ* from sulfinates via ICT activation accompanying loss of the diazenyl quencher. The emission wavelengths of these adducts span blue (**PAK**, 468 nm), green (the azonaphthalimide platform, *ca.* 505 nm), and red (**CysOx**, 606 nm), offering opportunities for multiplexed imaging of distinct cysteine oxoforms. Together, these mechanistically complementary platforms provide a versatile toolkit for selective, wash-free detection of cysteine oxidation states in complex biological samples.

4. CONCLUSION AND OUTLOOK

This review has summarized recent developments in capture-labeling molecules and luminescent probes targeting sulfenic and sulfinic acid species, less-studied oxidative cysteine modifications generated under oxidative stress. The chemical strategies surveyed here illustrate two complementary modes of selective capture. Sulfenic acids (R-SOH), as transient and electrophilic species, are most efficiently trapped by carbon-based reactive scaffolds such as 1,3-dicarbonyl compounds (e.g., dimedone derivatives), strained cycloalkynes, and *trans*-cyclooctenes. In contrast, sulfinates (R-SO₂[−]), with weak nucleophilicity and electrophilicity, require electrophilic counterparts that include aryl-nitroso compounds,

azodicarboxylates, S-nitroso reagents, and maleimides. The recent integration of these capture chemistries with fluorogenic readouts—exemplified by pyrene-conjugated 1,2-allenic ketone and naphthalimide–azocarboxylate platforms—represents an important step toward the selective, wash-free detection of cysteine oxoforms in complex biological samples. Although many challenges remain before these technologies can be applied in practice, further development of chemical probes targeting reactive sulfur species is anticipated to enable the sensitive detection of low-abundance oxidatively damaged proteins under oxidative stress conditions. For example, turn-on fluorescent probes targeting cysteine oxoforms could enable real-time visualization of oxidative stress hotspots in living tissues, supporting applications such as intraoperative fluorescence imaging and image-guided surgical resection of pathological lesions. They could also serve as companion diagnostics for monitoring the efficacy of redox-targeted therapies, including photodynamic treatments, in which precise control of oxidative damage is essential. As analytical methods continue to advance in precision, these developments are expected to lead to novel therapeutic and diagnostic strategies for redox-related diseases.

Acknowledgement

This work was supported in part by research grants from the Takeda Science Foundation and JSPS KAKENHI (C, JP22K06523).

Notes

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- (1) Paulsen CE, Carroll KS. Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *Chem Rev*, 2013;113:4633–4679.

- (2) Shi Y, Carroll KS. Chapter 7 – Redox-based reactivity of thiols. In: Alvarez B, Comini MA, Salinas G, Trujillo M, eds. *Redox Chemistry and Biology of Thiols*. London: Academic Press, 2022;133-152.
- (3) Ogata S, Matsunaga T, Jung M, Barayeu U, Morita M, Akaike T. Persulfide biosynthesis conserved evolutionarily in all organisms. *Antioxid Redox Signal*, 2023;39:983-999.
- (4) Zhang T, Toyomoto T, Sawa T, Akaike T, Matsunaga T. Supersulfides: A promising therapeutic approach for autoinflammatory diseases. *Microbiol Immunol*, 2025;69:191-202.
- (5) Dóka É, Ida T, Dagnell M, et al. Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Sci Adv*, 2020;6:eaax8358.
- (6) Lo Conte M, Carroll KS. The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfinylation. *J Biol Chem*, 2013;288:26480-26488.
- (7) Hayward L, Baud MGJ. Cysteine sulfinic acid and sulfinylated peptides. *RSC Chem Biol*, 2025;6:1019-1033.
- (8) Borlinghaus J, Albrecht F, Gruhlke MCH, Nwachukwu ID, Slusarenko AJ. Allicin: Chemistry and Biological Properties. *Molecules*, 2014;19:12591.
- (9) Xue D, Zou H, Qiu Y, et al. Discovery of acylsulfinic acid-featuring natural product sulfenicin and characterization of its biosynthesis. *Nat Chem*, 2025;17:1011.
- (10) Hamann M, Zhang TQ, Hendrich S, Thomas JA. Quantitation of protein sulfinic and sulfonic acid, irreversibly oxidized protein cysteine sites in cellular proteins. *Methods Enzymol*, 2002;348:146-156.
- (11) Wei Q, Jiang H, Xiao Z, Baker A, Young MR, Veenstra TD, Colburn NH. Sulfiredoxin–peroxiredoxin IV axis promotes human lung cancer progression through modulation of specific phosphokinase signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011;108:7004-7009.
- (12) Kim H, Lee GR, Kim J, Baek JY, Jo YJ, Hong SE, Kim SH, Lee J, Lee HI, Park SK, Kim HM, Lee HJ, Chang TS, Rhee SG, Lee SG, Jeong W. Sulfiredoxin inhibitor induces preferential death of cancer cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial damage. *Free Radical Biol Med*, 2016;91:264-274.
- (13) Mu B, Zeng Y, Luo L, Wang K. Oxidative stress-mediated protein sulfenylation in human diseases: past, present, and future. *Redox Biol*, 2024;76:103332.
- (14) Lin VS, Chen W, Xian M, Chang CJ. Chemical probes for molecular imaging and detection of hydrogen sulfide and reactive sulfur species in biological systems. *Chem Soc Rev*, 2015;44:4596-4618.
- (15) Ihara H, Motohashi H, Akaike T. Kassei iou kenkyu no shintenkai (in Japanese). *Seikagaku*, 2019;91:388-398.
- (16) Babbs CF, Gale MJ. Colorimetric Assay for methanesulfinic acid in biological samples. *Anal Biochem*, 1987;163:67-73.
- (17) Lo Conte M, Carroll KS. Chemoselective ligation of sulfinic acids with aryl-nitroso compounds. *Angew Chem Int Ed*, 2012;51:6502–6505.
- (18) Akter S, Fu L, Jung Y, et al. Chemical proteomics reveals new targets of cysteine sulfinic acid reductase. *Nat Chem Biol*, 2018;14:995-1004.
- (19) Majmudar JD, Konopko AM, Labby KJ, et al. Harnessing redox cross-reactivity to profile distinct cysteine modification. *J Am Chem Soc*, 2016;138:1852-1859.
- (20) Kuo YH, Konopko AM, Borotto NB, Majmudar JD, Haynes SE, Martin BR. Profiling protein S-sulfination with maleimide-linked probes. *ChemBioChem*, 2017;18:2028-2032.
- (21) Bracken AK, Malarney KP, Chang PV. Chemical proteomics reveals regulation of bile salt hydrolases via oxidative post-translational modifications. *J Am Chem Soc*, 2026;148:5378-5386.
- (22) Poole TH, Reisz JA, Zhao W, Poole LB, Furdui CM, King SB. Strained cycloalkynes as new protein sulfinic acid traps. *J Am Chem Soc*, 2014;136:6167-6170.
- (23) Scinto SL, Ekanayake O, Seneviratne U, et al. Dual-reactivity *trans*-cyclooctenol probes for sulfenylation in live cells enable temporal control via bioorthogonal quenching. *J Am Chem Soc*, 2019;141:10932-10937.
- (24) Ferreira RB, Fu K, Jung Y, Yang J, Carroll KS. Reaction-based fluorogenic probes for detecting protein cysteine oxidation in living cells. *Nat Commun*, 2022;13:5522.
- (25) Wu L, Liu K, Shi Y, Peng P, Wang J, Zhang C, Strongin RM, Yang X-F. 1,2-Allenic ketone-based fluorogenic probes for imaging of S-sulfinylation in living cells. *Anal Chem*, 2025;97:5538-5545.
- (26) Tanimoto H, Yokoyama K, Mizutani Y, et al. Synthesis of α -substituted enoximes with nucleophiles via nitrosoallenes. *J Org Chem*, 2016;81:559-574.
- (27) Tanimoto H, Shitaoka T, Yokoyama K, Morimoto T, Nishiyama Y, Kakiuchi K. Formal [3+2] cycloaddition of nitrosoallenes with carbonyl and nitrile compounds to form functional cyclic nitrones. *J Org Chem*, 2016;81:8722-8735.
- (28) Tanimoto H, Ueda S, Morimoto T, Kakiuchi K. Nitrosoallene-mediated *endo*-cyclizations for the synthesis of (hetero)cyclic α -substituted exo-unsaturated oximes. *J Org Chem*, 2018;83:1614-1626.
- (29) Tanimoto H, Kyogaku S, Otsuki A, Tomohiro T. Synthesis of naphthalimide azocarboxylates showing turn-on fluorescence by substitution reaction with sulfonates. *Chem Asian J*, 2024;19:e202400145.
- (30) Tanimoto H, Otsuki A, Tomohiro T. Synthesis of a naphthalimide-functionalized polymethacrylate: a turn-on fluorescent probe for sulfinic acids via covalent bond formation. *Org Biomol Chem*, 2025;23:7759-7765.

非視覚光受容による近視進行抑制経路の探索

栗原 俊英^{1,2*}

慶應義塾大学医学部 光生物学研究室¹ 眼科学教室²

Exploration of Non-Visual Photoreceptive Pathways Suppressing Myopia Progression

*Corresponding author:

Toshihide Kurihara, MD, PhD

¹Laboratory of Photobiology, ²Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

35 Shinanomachi, Shijuku-ku, Tokyo 160-8582, JAPAN

E-mail: kurihara.z8@keio.jp

ABSTRACT

Myopia prevalence has rapidly increased worldwide, particularly in East Asia, and pathological myopia is now a major cause of visual impairment. Recent studies have revealed that myopia progression is not merely a refractive error but a dynamic dysregulation of ocular growth involving coordinated interactions among the retina, choroid, and sclera. Epidemiological studies have consistently demonstrated the protective effects of outdoor activity against myopia progression, suggesting the importance of environmental light exposure. We identified violet light (360–400 nm), which is abundant in sunlight but largely absent from modern indoor environments, as a suppressive factor for myopia progression. Experimental studies demonstrated that violet light suppresses axial elongation and choroidal thinning through the non-visual opsin OPN5, expressed in retinal ganglion cells. Furthermore, OPN5-dependent activation of the transcription factor EGR1 was shown to contribute to myopia suppression. Recent studies also revealed that maintenance of choroidal homeostasis plays a critical role in ocular growth regulation. These findings suggest that non-image-forming photoreception constitutes a novel biological system regulating axial elongation and highlight the therapeutic potential of photobiology-based interventions for myopia control.

Key words: Myopia progression, axial elongation, non-visual opsin, OPN5, EGR1

1. はじめに

近年、東アジアを中心として近視の有病率は急速に増加しており、世界的な公衆衛生上の課題として認識されている¹。特に日本を含む東アジア各国では、小児から若年成人における近視有病率の著明な上昇が報告されており、我々が2017年に実施した調査研究では東京都内の一中学校における近視(-0.5ジオプター(D)以下)の有病率は94.9%に上る結果となり²、都市部では若年世代の大多数が近視を有する時代となりつつある。さらに、単なる有病率増加のみならず、将来的な視覚障害リスクと密接に関連する強度近視(-6D以下)の増加が深刻な問題となっている。強度近視では、眼軸長の過剰な伸長に伴い、網膜、脈絡膜、強膜といった後眼部組織に慢性的な負荷が加わることで、近視性黄斑症、裂孔性網膜剥離、緑内障などの視覚障害性疾患の発症リスクが顕著に増加することが知られている³。

こうした背景のもと、近視進行に対する環境因子として「光環境」が注目を集めている。疫学研究では、屋外活動時間の減少が近視発症および進行を加速させることが世界各国の疫学調査で報告され、近視進行のリスク因子として広く受け入れられている。一方、屋外活動がどのような分子機構を介して眼軸伸長を抑制するのかについては、長らく不明であった。近年、可視光短波長側に位置するバイオレットライト(360–400 nm)

が近視進行抑制に関与する可能性が明らかとなり^{4,5}、光波長依存的な眼軸長制御機構の存在が注目されるようになった。

従来、網膜における光受容は、桿体および錐体細胞による「形態視覚」のための機構として理解されてきた。一方で近年では、概日リズム調節や対光反射などを担う「非視覚光応答」の分子基盤として、メラノプシン(OPN4)をはじめとする非視覚型オプシン群の存在が明らかとなっている⁶。さらに、バイオレットライトを最大吸収波長とするニューロプシン(OPN5)が網膜神経節細胞に発現し、近視進行抑制に関与することが明らかとなった⁷ことで、非視覚光受容が眼軸長伸長制御機構に関与する可能性が浮かび上がってきた。

本総説では、近視進行の分子細胞生物学的背景を概説した上で、非視覚型オプシンを介した光受容機構、とりわけOPN5を介するバイオレットライト応答に焦点を当て、網膜-脈絡膜-強膜カスケードによる眼軸長制御機構について概説する。さらに、光生物学に基づく近視進行抑制治療の可能性についても考察したい。

2. 正視化現象と眼軸長伸長

ヒトを含む脊椎動物の眼球は、発達過程において外界からの光を網膜上へ正確に結像させるため、眼軸長と屈折力を協調的に調節する「正視化現象(em-

metropization)」機構を有している。出生直後の眼球は一般に遠視傾向を示すが、成長に伴う眼軸長伸長と、角膜および水晶体屈折力の低下が精緻に協調することで、網膜面へ焦点が一致した正視状態へと近づき維持される。この正視化現象は、多くの動物種で保存された生理的機構であり、視覚入力依存的な眼球発達制御系の存在を示唆している。しかし、この協調的恒常性機構が破綻し、眼軸長伸長が過剰となると、網膜面より前方に焦点が形成される軸性近視が生じる。学童近視の大部分は、この眼軸長伸長を主体とする軸性近視であると考えられている。

近年の研究により、眼軸長制御は単一組織による受動的現象ではなく、網膜、脈絡膜、強膜が相互に関連した多段階の生物学的応答として理解されるようになってきた。視覚情報はまず網膜において認識され、焦点ずれ（デフォーカス）に関するシグナルが下流組織へ伝達される。その結果、脈絡膜厚や脈絡膜血流が変化し、さらに最終的には強膜細胞外マトリクスのリモデリングが誘導されることで、眼軸長が伸長すると考えられている（図1）。

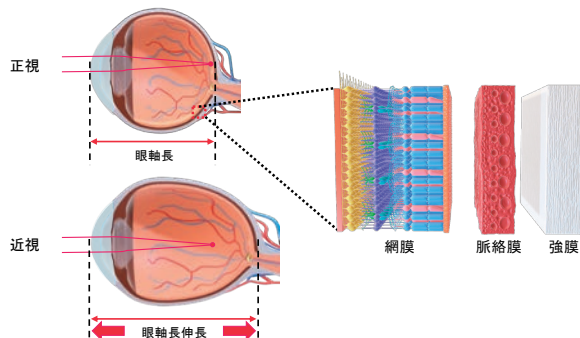


図1 軸性近視に関わる眼の各組織

近視は角膜・水晶体といった眼の組織の屈折力が強くなる「屈折近視」と、眼球の前後径である眼軸長が長くなる「軸性近視」に大別される。学童期に発症する学童近視のほとんどは軸性近視であり、その進行には網膜における焦点ずれ（デフォーカス）、脈絡膜の非薄化、強膜細胞外マトリクスのリモデリングといった後眼部各組織の多層的な応答を経て眼軸長伸長という表現型へ至る。

実験近視動物モデルは、こうした眼軸長制御機構の理解に大きく貢献してきた。代表的なモデルとして、視覚遮断による形態覚遮断近視およびマイナスレンズ装用によるレンズ誘導近視が知られている。レンズ誘導近視モデルでは、網膜後方へ焦点が形成される「遠視性デフォーカス」を人工的に誘導することで、眼軸長伸長と近視化が生じる。この現象は、眼球が網膜面への焦点一致を目指して発達を調節していることを示している。

近視進行に伴う組織変化として特に注目されるのが脈絡膜非薄化である。脈絡膜は網膜と強膜の間に位置する血管豊富な組織であり、網膜外層への酸素・栄養供給を担うとともに、眼軸長制御にも重要な役割を果たしていると考えられている。ヒトでは近視の程度に応じた脈絡膜非薄化が観察されるが、動物モデルにおいても近視誘導によって脈絡膜厚減少が認められる。従来、この脈絡膜厚変化は眼軸長伸長に伴う受動的な現

象と捉えられていた。

また、近視進行における最終的な形態変化は強膜において生じる。強膜組織の大部分は線維芽細胞が産生する細胞外マトリクスで構成され、その多くはコラーゲンによって占められる。近視進行過程においてコラーゲン線維配列や細胞外マトリクス構成成分の変化が生じ、組織の生体力学的強度が低下することで、眼球壁を構成する強膜の伸展性が亢進する。この強膜リモデリングには低酸素応答、炎症応答、細胞外マトリクス代謝異常など、多様な分子機構の関与が報告されている。

このように近視進行は、網膜による視覚情報認識を起点として、脈絡膜および強膜に至る組織間シグナル伝達によって成立する動的な眼球の屈折系発達制御機構の破綻として理解されつつある。とりわけ近年では、光環境依存的な網膜内シグナル伝達機構が注目されており、非視覚型オプシンを介した光受容機構が、この網膜－脈絡膜－強膜連関の上流に位置する可能性が示唆されている。

3. 光環境と近視

近視進行に影響を及ぼす環境因子として、これまで近業作業、教育環境、デジタルデバイス使用などが注目されてきた。スマートフォンやタブレット使用時間と近視との関連が報告されているが、デジタルデバイス特有の影響なのか、近業負荷全体を反映する指標なのかについては一定の議論が残されている⁹。一方で近年、特に強い関心を集めているのが「光環境」と近視との関連である。2008年にオーストラリアの研究グループが、近業時間と独立した因子として、屋外活動時間の長い児童ほど近視有病率が低いことを報告した⁹。その後も世界各国における多数のコホート研究において同様の結果が再現され、屋外活動の近視に対する抑制的効果は人種や地域を超えて比較的一貫した現象であることが示されている。この効果は近業作業と独立した事象であることから、「屋外光曝露」そのものが重要な生理的刺激である可能性が注目されるようになった。疫学研究では、屋外活動時間の増加が近視発症および進行を抑制することが一貫して報告されており、現在に至るまで屋外活動は近視進行抑制因子として広く受け入れられている。当初、屋外活動の近視抑制効果は、高照度光による網膜ドパミン放出増加を介した機序が想定されていた。実際、動物モデルでは高照度光環境下において近視進行が抑制されることが報告されている。一方、自然光と室内光の差異は単純な照度のみでは説明できず、光スペクトル、時間変化、概日リズムとの相互作用など、多面的要素の関与が考えられている^{10,11}。

学童近視の大部分は9-15歳の間に進行し収束するが、強度近視は程度が強いほど成人後も近視が進行することが知られている。我々は屈折矯正手術の一つである有水晶体眼内レンズ挿入術後の強度近視患者において、異なる素材のレンズ間で近視進行の程度に差異が生じることを見出した。検証を続ける中でレンズの差異は波長の透過性であることが明らかとなり、バイオレットライト透過性レンズ群では、バイオレットライトをほぼ遮断するレンズ群と比較して、術後の眼軸

長伸長が抑制されることが確認された⁵。このバイオレットライト透過性の有無による近視進行への影響は、コンタクトレンズ⁴や白内障手術に用いる眼内レンズでも確認され¹²、特定波長光すなわちバイオレットライトがヒト近視進行制御に関与する可能性が示唆された。これら臨床研究における知見から、我々は屋外環境のうち近視進行抑制に与える因子がバイオレットライトであるという作業仮説を設定した。バイオレットライトは可視光と紫外線の境界領域に存在する短波長光であり、太陽光には豊富に含まれる一方、一般的な室内照明や窓ガラス環境下では大きく減衰する特徴を有する。さらに蛍光灯やLEDなど人工照明には基本的にバイオレットライトが含まれておらず、現代生活環境においてバイオレットライト曝露量が大きく減少している可能性が示唆される^{4,13}。

4. 非視覚型オプシンと光受容

生物は進化の過程において、多様な光環境へ適応するため様々な光受容機構を獲得してきた。光は単に視覚情報としてのみ利用されるのではなく、概日リズム、季節応答、行動制御、代謝調節など、多様な生命現象を制御する環境シグナルとして機能している。こうした光応答の中心を担う分子群がオプシンである。オプシンは7回膜貫通型G蛋白共役受容体(G protein-coupled receptor: GPCR)に属する光感受性蛋白であり、発色団であるレチナールと結合することで光受容能を獲得する。従来、眼科領域における光受容は、桿体細胞に発現するロドプシン(OPN2)および、錐体細胞に発現する赤・緑・青オプシン(OPN1LW, OPN1MW, OPN1SW)による視覚形成機構として理解されてきた。これら視覚型オプシンは、外界光を神経電気信号へ変換し、画像形成視覚を成立させる中心的役割を担っている。一方、近年の分子生物学的研究の進歩により、視覚形成以外の光応答を担う「非視覚型オプシン」の存在が明らかとなっていった。ヒト網膜においては上述の4種類の視覚型オプシンに加えて、メラノプシン(OPN4)、ニューロプシン(OPN5)、エンセファロプシン(OPN3)、ペロプシン(RRH)、retinal G protein-coupled receptor(RGR)という5つの非視覚型オプシンが発現していることが知られている(図2)。これらは網膜のみならず、中枢神経系や末梢組織にも発現し、多様な生理機能へ関与していることが報告されている。非視覚型オプシンの中で最も研究が進んでいるのが、メラノプシン(OPN4)である。OPN4は網膜神経節細胞の一部に発現し、概日リズム同調や対光反射などの非視覚光応答を担うことが示された。これらメラノプシン発現網膜神経節細胞(intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: ipRGCs)は、従来の桿体・錐体視細胞系とは独立して光応答能を有しており、「網膜神経節細胞自体が光受容を行う」という新たな概念をもたらした。OPN3およびOPN5も網膜では網膜神経節細胞の一部が発現している。

非視覚型オプシンは進化系統的に視覚型オプシンより古くから現れており、外界環境変化を比較的原始的かつ全身的に感知するセンサーとして機能している。実際、光環境変化は概日リズム、代謝、体温調節、内分泌機能など多様な生理応答に関連している。また、自然

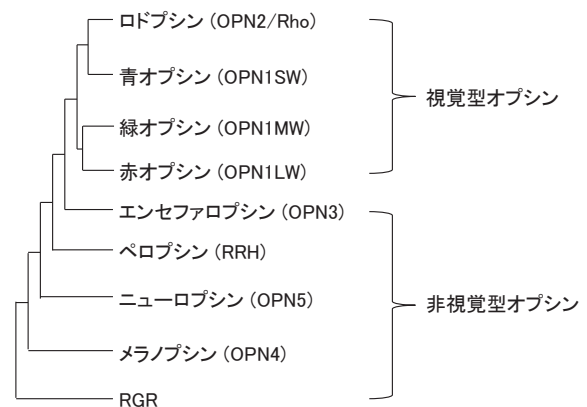


図2 オプシンの進化系統樹

オプシンは、7回膜貫通型G蛋白共役受容体に属する光感受性タンパク質であり、ビタミンA由来分子であるレチナールを発色団として結合することで光受容能を有する。ヒト網膜には、形態視覚に関わる4種類の視覚型オプシンに加え、5種類の非視覚型オプシンが発現する。視覚型オプシンには桿体視細胞に発現するロドプシンおよび錐体視細胞に発現する赤・緑・青オプシンが含まれる。非視覚型オプシンは概日リズム、対光反射、代謝制御、体温調節など多様な非視覚光応答に関与し、より原始的な光環境感知システムを担ってきたと考えられる。このうちOPN5はバイオレットライト領域の380 nmを最大吸収波長とする短波長可視光感受性オプシンであり、屋外環境における近視進行抑制作用の分子機構として注目されている。

環境下において脊椎動物は太陽光スペクトルの変化に曝露されながら進化してきた。特に短波長光は大気散乱や時間帯変化の影響を受けやすく、生体にとって必要な環境情報である可能性が考えられる。一方、現代社会ではLED照明やUVカット環境の普及に伴い、暴露する環境光スペクトルが急激に変化している。このような人工的光環境変化が、非視覚型オプシンを介した生理機構へ影響を与えている可能性も考えられる。

5. OPN5による近視進行抑制機構

近視研究において、眼軸長変化を安定して再現可能な動物モデルの存在は極めて重要である。従来、ニワトリやモルモットを用いた研究が広く行われてきた一方、遺伝学的解析に優れるマウスでは、眼球サイズが小さいことなどから、安定した近視モデル構築が課題であった。我々は、マウス用に最適化したレンズ装用システムを開発し、再現性の高いレンズ誘導近視マウスモデルを確立した¹⁴。このモデルでは、マイナスレンズ装用によって遠視性デフォーカスを誘導することで、屈折近視化および眼軸長伸長が安定して再現される。

我々はバイオレットライトが近視進行に与える影響とその分子機構を解明すべく、ヒヨコおよびマウスを用いた実験近視モデル実験を行った結果、バイオレットライト照射条件下では近視進行および眼軸長伸長が有意に抑制されることが明らかとなった⁴⁷。一方、ブルー、グリーン、レッドいずれの照射によっても同等の抑制効果は認められず、近視抑制作用が波長依存性である可能性が示唆された⁷。これらの結果は、屋外活動による近視進行抑制は、単なる高照度光刺激だけではなく、特定波長光に対する網膜内光受容機構の存在

を支持するものである。

これらの結果を受け、我々は非視覚型オプシンのうち OPN5 に着目した。ヒトおよびマウス OPN5 はいずれも約 380 nm 付近を最大吸収波長とし、バイオレットライト領域を効率的に感知する特徴を有する。ヒヨコ（ニワトリ）では、哺乳類の OPN5 ホモログである OPN5m に加えて OPN5L1、OPN5L2 など複数の OPN5 関連分子が発現しているが、OPN5m は哺乳類と同様に 360-380nm を吸収域としている。OPN4（最大吸収波長 480nm）を含め、他の非視覚型オプシンは概ねブルーライト領域を吸収波長と持つことから、OPN 5 が短波長端光を受容することは特異的である。そこで、OPN5 が近視進行抑制へ直接関与しているかを検証するため、網膜特異的 OPN5 コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作成した。野生型マウスでは、バイオレットライト照射により近視化および眼軸長伸長が抑制されるのに対し、OPN5 cKO マウスではこれらバイオレットライトによる近視抑制効果が消失した。さらに、バイオレットライト照射により、マウス近視モデルでもヒト近視眼と同様に観察される脈絡膜非薄化が抑制されるが、OPN5 cKO マウスではバイオレットライトによる脈絡膜厚維持作用もキャンセルされており、OPN5 がバイオレットライト依存的眼軸長制御に必要であることが明らかとなった⁷。これら結果を統合すると、バイオレットライトは網膜神経節細胞の一部が発現する OPN5 によって受容され、その下流で近視抑制関連シグナルが活性化されることで、脈絡膜厚維持および眼軸長伸長が抑制され、近視進行抑制に寄与することが示唆された。

6. EGR1 を介した近視進行抑制機構

OPN5 下流の分子メカニズムを検討する上で、バイオレットライト照射による網膜内分子応答を解析した結果、近視進行抑制に関わることが知られている転写因子 EGR1 (early growth response 1) の活性がバイオレットライト依存的に誘導されることを我々は見出した⁴。この EGR1 活性効果は、可視光の中で波長がバイオレットライトに近づくほど増加し、OPN5 遺伝子を欠損させることで消失することが確認された¹⁵。これら結果から OPN5-EGR1 軸が、バイオレットライト受容が眼軸長制御へ至る中心的シグナル経路の一つであることが示唆された。

EGR1 は zinc finger 型転写因子に属し、神経活動、細胞分化、機械刺激、増殖因子刺激などに応答して速やかに発現誘導されることが知られている。ヒヨコでレンズ誘導近視を施すと網膜での EGR1 発現が低下することから近視進行に抑制的な機能を持つ分子として着目され¹⁶、EGR1 ノックアウトマウスで自然発症の屈折近視化が見られるなど、種を超えて EGR1 は眼軸伸長抑制方向へ働く重要な制御因子と考えられている。

そこで我々は、この EGR1 活性を指標として、近視進行抑制作用を有する候補物の探索を行った。光刺激そのものを用いずに、EGR1 経路を活性化可能な物質を同定できれば、新たな近視進行抑制治療へ応用可能と考えられた。その結果、クロセチンやイチョウ葉エキスなど、一部天然由来化合物が EGR1 活性を増強し、近視進行抑制作用を示すことを見出した。クロセチン

は天然カロテノイドであり、抗酸化作用や血流改善作用を有することが知られている。我々はマウス近視モデルにおいて、クロセチンあるいはイチョウ葉エキス投与により屈折近視化および眼軸長伸長を抑制することを確認した^{17,18}。さらに学童近視を対象としたランダム化臨床試験においても、クロセチン摂取群では眼軸長伸長抑制効果が認められ¹⁹、EGR1 活性を指標とした近視制御の可能性が支持された。

7. 脈絡膜の機能的・構造的変化と近視進行

近視進行に伴う後眼部変化の中でも、近年特に注目されているのが脈絡膜の構造変化である。脈絡膜は網膜と強膜の間に存在する血管豊富な組織であり、外網膜への酸素・栄養供給を担うとともに、眼温調節、老廃物除去、免疫応答など多様な生理機能を有している。脈絡膜は外側から大血管層 (Haller 層)、中血管層 (Sattler 層)、脈絡毛細血管板から構成される。このうち脈絡毛細血管板は、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE) 直下に存在する高密度毛細血管ネットワークであり、視細胞および RPE 細胞へ酸素と栄養を供給している。脈絡毛細血管板は全身でも極めて高い血流量を有する組織であり、網膜恒常性維持に不可欠である。

近視進行に伴う脈絡膜非薄化は、ヒトおよび動物モデルの双方で一貫して観察される。特に強度近視眼では、正常眼と比較して著明な脈絡膜厚減少が認められ、中心窩下脈絡膜厚が極端に非薄化した症例が観察される。近視誘導動物モデルにおいても、眼軸長伸長に先行あるいは並行して脈絡膜厚減少が生じることが報告されている。そのうえで我々は、家族性に強度近視を発症する Donnai-Barrow 症候群の原因遺伝子 *Lrp2* に着目した。LRP2 (megalin) は巨大エンドサイトーシス受容体であり、ビタミン代謝、増殖因子シグナル、脂質輸送など多彩な生理機能に関与している。我々は、感覚網膜もしくは RPE 特異的に *Lrp2* を欠損する cKO マウスを作成したところ、感覚網膜特異的 *Lrp2* cKO マウスは表現型を示さないが、RPE 特異的 *Lrp2* cKO マウスは著明な眼軸長伸長、近視化、および脈絡膜非薄化が認められた (図 3)。さらに詳細な組織解析では、脈絡毛細血管板がほぼ消失することが観察され、RPE 細胞における血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: *Vegf*) の発現低下も認められた²⁰。興味深いことに、RPE 特異的 *Vegf* cKO マウスでも脈絡毛細血管板の欠失が観察される²¹とともに、眼軸長伸長および屈折近視化が認められた²⁰。

脈絡膜は豊富な血管系、自律神経支配、免疫細胞集積を有しており、極めて動的な組織である。我々はさらに、脈絡膜に局在するマクロファージ活性化²²および肥満細胞の脱顆粒²³が脈絡膜非薄化を介して近視進行に関わることを見出した。こうした知見は、脈絡膜非薄化が単なる眼球伸展の受動的結果ではなく、近視進行そのものを加速させる要因である可能性を示唆している。以上より、近視進行は単なる強膜伸展現象ではなく、網膜による光情報認識を起点として、RPE、脈絡毛細血管板、脈絡膜、強膜へ至る多層的組織応答によって成立していると考えられる。特に脈絡膜恒常性維持は、眼球形態安定性維持の中心的要素であり、近視進行制御における重要な治療標的となる可能性がある。

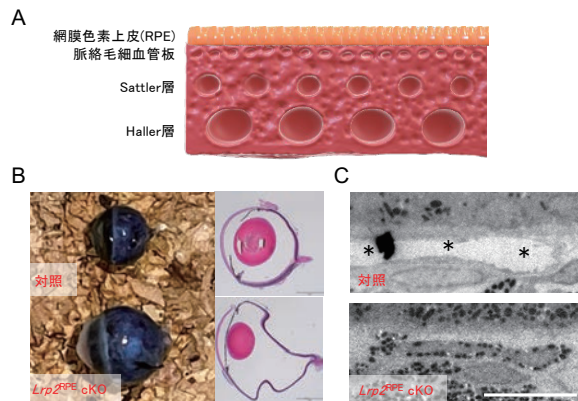


図3 近視進行に関わる脈絡膜の構造的変化

(A) 脈絡膜の模式図。脈絡膜は網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE) の外側に存在する血管豊富な組織であり、網膜外層へ酸素・栄養供給、老廃物除去、免疫応答、温度調節などを担っている。脈絡膜は RPE を裏打ちする脈絡毛細血管板、その外側に存在する中血管層 (Sattler 層)、大血管層 (Haller 層) から構成される。(B) 対照マウス眼 (上段) と比較して RPE 特異的 *Lrp2* コンディショナルノックアウト (cKO) マウス眼 (下段) は、著明な眼軸長伸長を伴う強度近視を呈する。(C) 対照マウス眼で観察される脈絡毛細血管板が、RPE 特異的 *Lrp2* cKO マウス眼では消失する。スケールバー: 20 μ m。文献 20 より Creative Commons Attribution (CC BY) ライセンスに基づき改変引用。

8. おわりに

非視覚光受容を介した近視進行抑制経路の解明は、近視研究における基礎的理解を深めるのみならず、新たな予防・治療戦略の開発へ直結する可能性を有している。従来の近視進行抑制治療は、低濃度アトロピン点眼、オルソケラトロジー、多焦点コンタクトレンズ、近視進行抑制眼鏡レンズなど、主に薬理的または光学的介入を中心に発展してきた。一方、非視覚光受容に基づく介入は、環境光を生理的刺激として活用し、網膜-脈絡膜-強膜連関を制御するという点で、従来とは異なる光生物学的アプローチである。

バイオレットライトを用いた近視進行抑制は、その代表的な応用候補である。臨床応用の観点からは、バイオレットライトを透過または照射する眼鏡型デバイスが検討されてきた。バイオレットライト透過眼鏡を用いたランダム化試験では、特定条件下において小児の眼軸長伸長抑制効果が認められた²⁴。また、バイオレットライト照射眼鏡を用いたランダム化試験においても、対象年齢や近業時間などの条件により効果が異なる可能性が示唆されている²⁵。これらの結果は、バイオレットライト介入がすべての対象に一律な効果を示すというよりも、年齢、近視進行速度、生活環境、屋外活動時間、眼鏡装用歴などによって反応性が異なる可能性を示している。

近年、近視研究は単なる屈折異常の解析から、眼軸長伸長制御機構そのものを理解する研究領域へと大きく発展している。特に、網膜による光情報認識を起点として、脈絡膜、強膜へ至る多層的組織応答によって眼軸長が制御されるという概念は、近視進行を生物学的恒常性制御異常として捉える新たな視点をもたらした。我々はバイオレットライトが近視進行抑制作用を

有することを見出し、その分子基盤として非視覚型オプシン OPN5 に着目して研究を進めてきた。さらに、OPN5 を介した非視覚光受容が EGR1 シグナル活性化を通じて脈絡膜恒常性維持へ結びつき、最終的に眼軸長伸長抑制へ至る可能性が示されつつある。これらの知見は、「見るための光受容」だけではなく、「環境知覚のための光受容」という新たな光生物学的概念を提示するものである。

また近年では、近視進行における強膜リモデリングの重要性も明らかとなり²⁶、現在では、網膜-脈絡膜-強膜連関を介した組織間シグナル伝達異常として理解されるようになってきた。特に脈絡膜は、血流、代謝、炎症、低酸素応答、自律神経系など多様な生理機構が集約する動的組織であり、近視進行制御における重要な中間調節組織として位置づけられる。こうした基礎研究の進展は、近視進行抑制治療のあり方にも変化をもたらしつつある。従来の光学的・薬理的治療に加え、光環境そのものを治療標的とする「光生物学的治療」の概念が現実味を帯び始めている。さらに今後は、個々の生活環境、遺伝背景、光曝露状況、脈絡膜状態などを統合的に評価し、それぞれの患者に最適化された近視進行抑制戦略を構築することが重要になると考えられる。すなわち、近視研究は今後、「precision medicine」に加えて、「precision environmental medicine」へ発展していく可能性を有している。光という環境因子を分子細胞生物学的に理解し、それを個別化医療へ応用することは、今後の光医学・光生物学研究における重要な方向性の一つである。

近視人口の急増は世界的課題であり、その克服には基礎研究と臨床研究を横断した translational research の推進が不可欠である。非視覚光受容機構の理解を通じて、近視進行制御の新たな生理学的原理が明らかとなり、将来的な視覚障害予防へつながることが期待される。

謝辞

本稿は、2025 年 7 月 11 ~ 12 日に富山国際会議場で開催された第 47 回日本光医学・光生物学会にて行った第 46 回日本光医学・光生物学会学術奨励賞 (医学領域) 受賞講演を基に執筆いたしました。本稿で取り上げた研究を実施するにあたり、坪田一男名誉教授 (現株式会社坪田ラボ CEO)、根岸一乃教授をはじめ、慶應義塾大学医学部眼科学教室の皆様、光生物学研究室の皆様、共同研究を実施いただいた国内外の研究機関・企業の皆様に深謝申し上げます。これら研究の一部は、AMED-CREST「非視覚型光受容体による光マルチセンシング機構の解明と光新規治療法開発」をはじめとする公的研究助成、民間研究助成により実施しました。

文献

1. Dolgin E. The myopia boom. *Nature*. 2015;519(7543):276.
2. Yotsukura E, Torii H, Inokuchi M, et al. Current Prevalence of Myopia and Association of Myopia With Environmental Factors Among Schoolchildren in Japan. *JAMA Ophthalmol*.

- Nov 01 2019;137(11):1233-1239. doi:10.1001/jamaophthalmol.2019.3103
3. Haarman AEG, Enthoven CA, Tideman JW, Tedja MS, Verhoeven VJM, Klaver CCW. The Complications of Myopia: A Review and Meta-Analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Apr 09 2020;61(4):49. doi:10.1167/iovs.61.4.49
 4. Torii H, Kurihara T, Seko Y, et al. Violet Light Exposure Can Be a Preventive Strategy Against Myopia Progression. *EBioMedicine*. Feb 2017;15:210-219. doi:10.1016/j.ebiom.2016.12.007
 5. Torii H, Ohnuma K, Kurihara T, Tsubota K, Negishi K. Violet Light Transmission is Related to Myopia Progression in Adult High Myopia. *Sci Rep*. Nov 06 2017;7(1):14523. doi:10.1038/s41598-017-09388-7
 6. Hatori M, Panda S. The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends Mol Med*. Oct 2010;16(10):435-46. doi:10.1016/j.molmed.2010.07.005
 7. Jiang X, Pardue MT, Mori K, et al. Violet light suppresses lens-induced myopia via neuropsin (OPN5) in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 06 01 2021;118(22):doi:10.1073/pnas.2018840118
 8. Ha A, Lee YJ, Lee M, Shim SR, Kim YK. Digital Screen Time and Myopia: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *JAMA Netw Open*. Feb 03 2025;8(2):e2460026. doi:10.1001/jamanetworkopen.2024.60026
 9. Rose KA, Morgan IG, Ip J, et al. Outdoor activity reduces the prevalence of myopia in children. *Ophthalmology*. Aug 2008;115(8):1279-85. doi:10.1016/j.ophtha.2007.12.019
 10. Jiang X, Kurihara T, Torii H, Tsubota K. Progress and Control of Myopia by Light Environments. *Eye Contact Lens*. Sep 2018;44(5):273-278. doi:10.1097/ICL.0000000000000548
 11. Gettinger K, Tsubota K, Negishi K, Kurihara T. Light and myopia: a focus on the expanding role of non-visual opsins. *Eye Vis (Lond)*. Jan 31 2026;13(1):6. doi:10.1186/s40662-025-00472-y
 12. Yotsukura E, Torii H, Hayashi K, et al. Violet light-transmitting intraocular lens increases choroidal thickness: 1-year prospective, randomised controlled trial. *BMJ Open Ophthalmol*. Dec 10 2025;10(1) doi:10.1136/bmjophth-2025-002441
 13. Kondo S, Jiang X, Torii H, et al. Violet Light Is Abundant Outdoors but Deficient Indoors in Modern Lifestyle in Tokyo. *Int J Environ Res Public Health*. Mar 17 2025;22(3):doi:10.3390/ijerph22030444
 14. Jiang X, Kurihara T, Kunimi H, et al. A highly efficient murine model of experimental myopia. *Sci Rep*. Feb 01 2018;8(1):2026. doi:10.1038/s41598-018-20272-w
 15. Jeong H, Lee D, Jiang X, Negishi K, Tsubota K, Kurihara T. Opsin 5 mediates violet light-induced early growth response-1 expression in the mouse retina. *Sci Rep*. Oct 19 2023;13(1):17861. doi:10.1038/s41598-023-44983-x
 16. Fischer AJ, McGuire JJ, Schaeffel F, Stell WK. Light- and focus-dependent expression of the transcription factor ZENK in the chick retina. *Nat Neurosci*. Aug 1999;2(8):706-12. doi:10.1038/11167
 17. Mori K, Kurihara T, Miyauchi M, et al. Oral crocetin administration suppressed refractive shift and axial elongation in a murine model of lens-induced myopia. *Sci Rep*. Jan 22 2019;9(1):295. doi:10.1038/s41598-018-36576-w
 18. Hou J, Mori K, Ikeda SI, et al. Ginkgo biloba extracts improve choroidal circulation leading to suppression of myopia in mice. *Sci Rep*. Mar 07 2023;13(1):3772. doi:10.1038/s41598-023-30908-1
 19. Mori K, Torii H, Fujimoto S, et al. The Effect of Dietary Supplementation of Crocetin for Myopia Control in Children: A Randomized Clinical Trial. *J Clin Med*. Aug 07 2019;8(8):doi:10.3390/jcm8081179
 20. Zhang Y, Jeong H, Mori K, et al. Vascular endothelial growth factor from retinal pigment epithelium is essential in choriocapillaris and axial length maintenance. *PNAS Nexus*. 2022;1(4):pgac166. doi:https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac166
 21. Kurihara T, Westenskow PD, Bravo S, Aguilar E, Friedlander M. Targeted deletion of Vegfa in adult mice induces vision loss. *J Clin Invest*. Nov 2012;122(11):4213-7. doi:10.1172/JCI65157
 22. Hou J, Ikeda SI, Yang Y, et al. The choroidal macrophage polarization significantly influences myopia development in murine models. *iScience*. 2026;115764.
 23. Shi J, Ikeda SI, Fukuchi T, et al. Choroidal mast cells and their degranulation are a pivotal trigger for myopia development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2025;66(14):22.
 24. Mori K, Torii H, Hara Y, et al. Effect of Violet Light-Transmitting Eyeglasses on Axial Elongation in Myopic Children: A Randomized Controlled Trial. *J Clin Med*. Nov 22 2021;10(22):doi:10.3390/jcm10225462
 25. Torii H, Mori K, Okano T, et al. Short-Term Exposure to Violet Light Emitted from Eyeglass Frames in Myopic Children: A Randomized Pilot Clinical Trial. *J Clin Med*. Oct 11 2022;11(20):doi:10.3390/jcm11206000
 26. Ikeda SI, Kurihara T, Jiang X, et al. Scleral PERK and ATF6 as targets of myopic axial elongation of mouse eyes. *Nat Commun*. Oct 10 2022;13(1):5859. doi:10.1038/s41467-022-33605-1

Monitoring of protonation in triplex-forming oligodeoxynucleotides by Raman spectroscopy

Runa Ishida, Rio Watanabe, Tatsuya Nishihara, Tadashi Suzuki, Ryo Takeuchi and Kazuhito Tanabe*

Department of Chemistry and Biological Science, College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, 5-10-1 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara, Kanagawa 252-5258, Japan

ABSTRACT

Elucidating the DNA structures formed through protonation of cytosine bases is essential for understanding the fundamental properties and functions of DNA. In this study, we designed a Raman-based approach for detecting cytosine protonation in a triplex structure using oligodeoxynucleotides (ODNs) bearing a phenylacetylene-tagged cytosine derivative, d^{MP}C. A pH-dependent Raman shift was observed when monomeric d^{MP}C was exposed to different pH conditions, indicating that cytosine protonation can be monitored by tracking the acetylene signal. We applied this system to a triplex-forming DNA sequence and confirmed high-wavenumber shift of the acetylene band of d^{MP}C in the strand, when the ODNs formed triplex that accompanied protonation. Thus, Raman spectroscopy using an acetylene-tagged cytosine probe enables direct monitoring of cytosine protonation associated with DNA triplex formation.

KEY WORDS: Raman spectroscopy, Cytosine Protonation, Oligodeoxynucleotides, Acetylene Tag

INTRODUCTION

DNA forms higher-order structures under specific conditions.^{1,2} For example, in guanine-rich DNA, guanine bases stack in a planar arrangement to form a quadruplex known as a G4, while in cytosine-rich DNA, a quadruplex called an i-motif is formed.^{3,4} Furthermore, polypurine and polypyrimidine sequences form triplex under acidic conditions in the presence of metal ions.⁵ The formation of these higher-order structures has been reported in living organisms, and it is recognized that they have played an important role in regulating the functions of DNA transcription and translation.^{6,7} Therefore, elucidating the functions of these higher-order DNA structures remains a major challenge in understanding the fundamental roles of DNA, and detecting the formation of these structures is of great importance.

Methods for analysis of biomolecular structures and for bioimaging using Raman spectroscopy have attracted scholarly attention.^{8,9} Raman spectroscopy has been widely utilized to detect molecular vibrations. Since the Raman scattered light contains information about vibrations originating from interatomic bonds within molecules, detecting it allows us to obtain structural information at the atomic level. Recently, a number of Raman probes bearing acetylene tags that emit strong signals have been designed to visualize cell nuclei, enzymes, and other biomolecules.^{10,11} Our group has also developed a molecular system to detect the detailed structure of DNA using Raman spectroscopy.¹² We prepared oligodeoxynucleotides (ODNs) bearing an acetylene tag on cytosine base to monitor its behavior. Monitoring of the Raman signal enabled clear detection of cytosine protonation in i-motif DNA, even in complicated environments.

In this study, we focused on Raman spectroscopy to

monitor one of the most important DNA structures, triplex. DNA triplex consists of Hoogsteen hydrogen bonding that includes the protonation at cytosine. Based on our previous results, we expected that Raman spectroscopy would enable the monitoring of DNA triplex formation through the detection of cytosine protonation. Herein, we attempted to prepare ODNs bearing a Raman tag (a phenylacetylene tag) on cytosine (d^{MP}C) and applied them to monitor protonation at cytosine base that caused triplex formation (Fig. 1). Eventually, we found that pH change resulted in a band shift of the signal from the acetylene tag upon protonation at the conjugated pyrimidine ring on d^{MP}C. We also applied the system to the identification of protonation of ^{MP}C in triplex structures. The band shift of the acetylene unit in triplex-forming ODNs occurred around pH 5.0, under conditions in which the ODNs

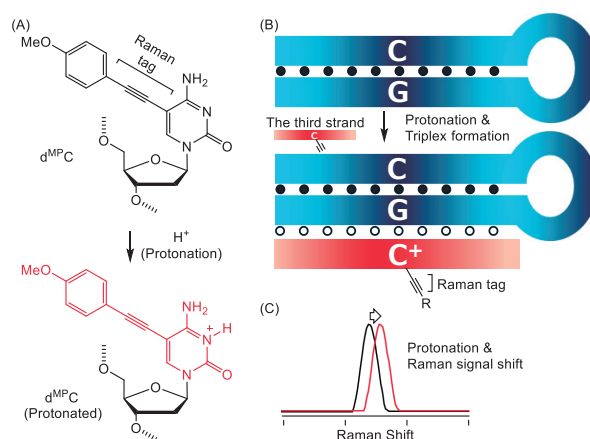


Fig. 1. (A) Chemical structure and protonation of d^{MP}C. (B) Schematic illustration of protonation and triplex formation of ODNs bearing Raman tag (d^{MP}C). filled circle: Watson-Crick base pair, open circle: Hoogsteen base pair. (C) Conceptual drawing of the signal shift in Raman spectra upon protonation. Non-protonated (black line) or protonated ODNs (red line).

formed triplex. Thus, the triplex formation through cytosine protonation could be tracked by means of Raman spectroscopy.

MATERIALS AND METHODS

General Method. Reagents were purchased from Wako pure chemical industries, Tokyo chemical industries and Sigma Aldrich. The compound 1 ($d^{MP}C$) was synthesized by the methods reported previously.¹³ NMR spectra were recorded on JEOL JIN-ECX500 II (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz) spectrometer and chemical shifts were expressed in ppm downfield from tetramethylsilane, using residual protons in solvents as internal standards. Raman spectrum measurement was carried out on a RENISHAW in Via Raman Microscope.

Synthesis of ODN 1 (General procedure for the preparation of ODNs bearing $d^{MP}C$)

A solution of $d^{MP}C$ (219.6 mg, 0.614 mmol) in 3 mL of anhydrous pyridine was added to 4,4'-dimethoxytrityl chloride (306.3 mg, 0.904 mmol) and then stirred for 5 h under N_2 atm at room temperature. The resulting mixture was concentrated with toluene under vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography (chloroform / methanol = 10 / 1) to give tritylated $d^{MP}C$ (147.7 mg, 57%) as white solid. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 8.02 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.42 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 7.32-7.27 (m, 6H), 7.22-7.15 (m, 3H), 6.99 (s, 1H), 6.88-6.83 (m, 6H), 6.15 (t, J = 10.0 Hz, 1H), 5.31 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.28 (ddd, J = 18.5, 10.0, 2.5, 1H), 3.99-3.96 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.66 (d, J = 3.0 Hz, 6H), 3.22-3.14 (m, 2H), 2.28 (ddd, J = 13.5, 5.5, 3.0 Hz, 1H), 2.14-2.08 (m, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ 163.8, 159.2, 158.0, 153.1, 148.9, 146.1, 144.6, 143.3, 135.6, 135.4, 132.8, 129.7, 129.6, 127.9, 127.6, 126.7, 114.3, 113.8, 113.2, 99.4, 98.5, 96.4, 93.8, 90.3, 86.1, 85.9, 85.6, 79.5, 70.8, 63.7, 55.2, 54.9, 41.0; FABMS (NBA) m/z 660 [(M + H) $^+$]; HRMS calcd. for $C_{39}H_{37}N_3O_7$ [(M + H) $^+$], 660.2632; found, 660.2723; mp, 239.5–244.8 °C.

N,N -diisopropylethylamine (77 μ l, 0.442 mmol) and 2-cyanoethyl-diisopropyl-chlorophosphor-amidite (55 μ l, 0.247 mmol) were added to tritylated $d^{MP}C$ (65.5 mg, 0.0957 mmol) in THF (950 μ l) and stirred for 4 h at room temperature. After the reaction, the mixture was filtered and placed on DNA synthesizer. After automated DNA synthesis, ODN 1 was purified by reversed phase HPLC. Identities of synthesized oligomers were identified by MALDI-TOF mass spectrometry (ODN 1: [M - H] $^-$ calcd. 6439.1, found 6438.2, ODN 2: [M - H] $^-$ calcd. 3629.5, found 3629.2).

Measurement of Raman Spectra. The samples of ODNs were prepared in sodium phosphate buffer and the sample solution was dropped on a hole glass slide (14–15 ϕ $\times$ 0.6 mm), then a cover glass (0.12–0.17 mm) was placed on the hole. Raman spectra were measured by means of the excitation at 532 nm. The laser output was focused

into the sample by 100 $\times$ objective lens (Leica N Plan Epi 100x/0.85). The slid width of the spectrograph was 20 μ m. The laser power was 50 mW and exposure time for a point was 80–100 sec. Raman spectra were acquired with a confocal unit Renishaw in Via Raman Microscope (Renishaw plc). The acquired images were analyzed and processed for multicomponent analysis with the software WiRE 2.0 (Renishaw plc, UK).

Measurement of absorption spectra and CD spectra.

The samples were prepared and the absorption spectra were recorded on a JASCO-V630 spectrophotometer. UV spectra were obtained by monitoring the UV absorbance at 240–400 nm. For measurement of melting temperature (T_m), 2.0 μ M of appropriate ODNs were dissolved in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.0) containing 100 mM KCl. Melting curves were obtained by monitoring the UV absorbance at 260 nm with elevating temperature from 2 °C to 90 °C at a rate of 1 °C/min. CD spectra were recorded using JASCO J-805 circular dichroism spectrometer. The scans were gathered over the wavelength ranging from 200 to 350 nm in a 0.1 cm path length cell at the standard sensitivity, data pitch 0.5 nm, continuous scanning mode, scanning speed 50 nm min $^{-1}$, response 8 sec, and bandwidth 1 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Initially, we measured absorption spectra of monomeric $d^{MP}C$ under different pH conditions in order to elucidate its protonation. As shown in Fig. 2A, distinct pH-dependent changes in the absorption bands were clearly observed. At pH 1.5, $d^{MP}C$ predominantly existed in its protonated form and exhibited an absorption maximum at 330 nm, whereas at pH 5.0, it shifted almost entirely to its neutral form and exhibited an absorption maximum at 320 nm. Based on these spectral changes, the pK_a value of $d^{MP}C$ was estimated to be 3.0. Next, Raman spectra of $d^{MP}C$ were measured using 532 nm excitation. As shown in Fig. 2C, $d^{MP}C$ exhibited a characteristic acetylene band at approximately 2218 cm $^{-1}$ under neutral conditions. Upon decreasing the pH from 7.2 to 2.1, a shift in the acetylene band was observed. The band position remained almost unchanged between pH 7.2 and 5.0; however, under more acidic conditions below pH 3.5, the band shifted markedly from 2218 to 2225 cm $^{-1}$. The fact that the Raman spectra exhibited pH-dependent behavior similar to that of the absorption spectra indicates that the protonation of $d^{MP}C$ can be monitored using the Raman spectroscopy.

To monitor the protonation in ODNs by Raman spectroscopy, we attempted to introduce $d^{MP}C$ into the strand. For the preparation of ODNs bearing $d^{MP}C$ (ODN 1 and ODN 2), we synthesized the amidite derivative of $d^{MP}C$ (Fig. 3A) that was incorporated into the strand by means of standard automated DNA synthesis.¹⁴ The sequence of synthesized ODNs as confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry are summarized in Fig. 3B. Initially, Raman spectra of ODN 1 were recorded to evaluate its protonation

behavior. Under neutral conditions, a strong Raman band appeared at 2216 cm^{-1} , which was assigned to the acetylene units of ODN 1. Upon lowering the pH to 2.0,

the band of d^{MP}C in ODN 1 shifted to 2225 cm^{-1} . Stepwise acidification showed that the wavenumber changes of ODN 1 exhibited an inflection point at approximately pH

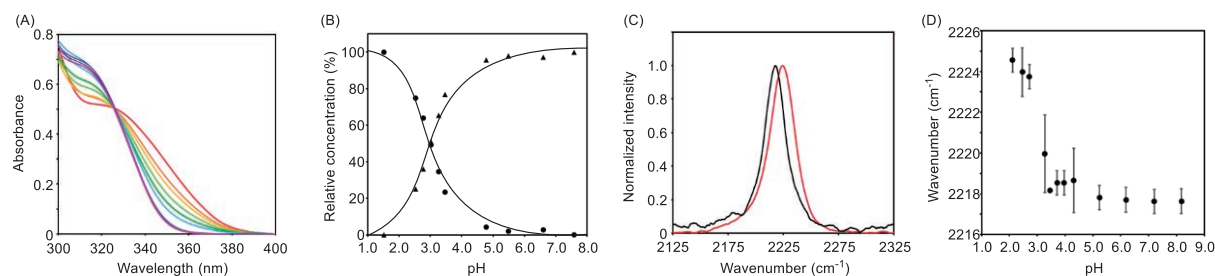


Fig. 2. (A) Absorption spectra of d^{MP}C (50 μM) at pH 7.6 (deep red), 6.6 (purple), 5.5 (dark blue), 4.8 (blue), 3.5 (light blue), 3.3 (green), 3.0 (light green), 2.8 (yellow), 2.5 (orange) and 1.5 (red). (B) Concentration profiles of protonated or unprotonated d^{MP}C. The data were obtained from absorbance at 350 nm in Figure 2A ($pK_a = 3.0$). (C) Raman spectra of d^{MP}C (50 mM) measured under different pH conditions (pH 7.2: black line, pH 2.1: red line). Raman spectra of d^{MP}C were obtained with excitation at 532 nm. (D) Signal shift of d^{MP}C as decreasing pH conditions. Results are shown with the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

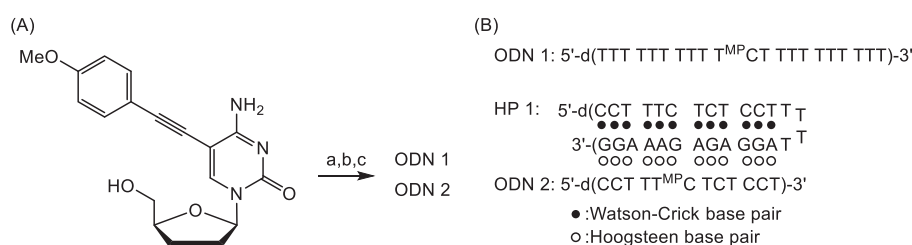


Fig. 3. (A) Synthesis of ODNs. Reagents and conditions: (a) DMTrCl, Pyridine, 57%. (b) 2-Cyanoethyl-diisopropyl chlorophosphoramidite, diisopropylethylamine, CH₃CN (c) Automated DNA synthesis. (B) The ODNs used in this study.

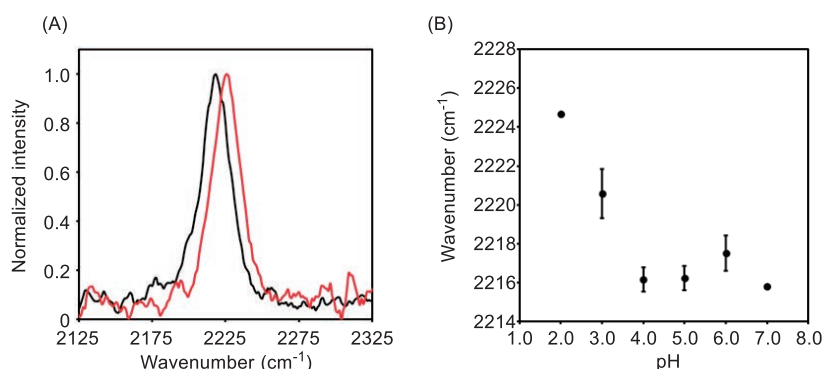


Fig. 4. (A) Raman spectra of ODN 1 (2 mM) measured under different pH conditions (pH 7.2: black line, pH 2.1: red line). Raman spectra of ODN 1 were obtained with excitation at 532 nm. (B) Signal shift of ODN 1 as decreasing pH conditions. Results are shown with the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

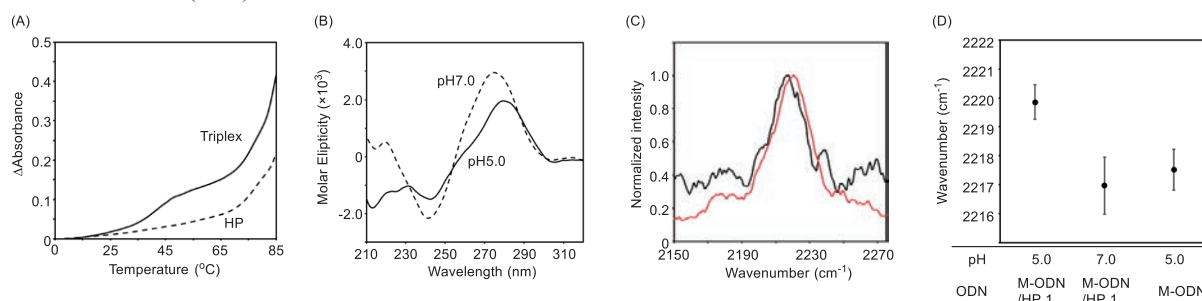


Fig. 5. (A) UV melting curve measured at 260 nm for ODN 2/HP 1 (2 mM, solid line) and HP 1 (2 mM, dashed line) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.0) containing 100 mM KCl. (B) CD spectra of ODN 2/HP 1 (10 μM) at varying pH values (pH 5.0: solid line, pH 7.0: dashed line). (C) Raman spectra (Excitation at 532 nm) of ODN 2/HP 1 (2 mM) in 50 mM sodium phosphate buffer at different pH conditions (pH 7.0: black line, pH 5.0: red line). (D) Signal shift of ODN 2/HP 1 triplex or single-stranded ODN 2 at different pH conditions (pH 5.0 or 7.0). Results are shown with the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

3.0 (Fig. 4B), consistent with the pK_a value of $d^{MP}C$. These findings strongly suggest that the observed Raman band shift arises from protonation of $d^{MP}C$ within the ODNs.

As described above, we found that protonation in ODNs can be detected using Raman spectroscopy. Finally, we monitored triplex formation that accompanied protonation at cytosine using DNA sequences capable of forming a triplex. The triplex-forming sequence was designed based on a previous report in which a 12-mer single-stranded DNA formed a triplex with a hairpin-type 28-mer DNA (HP 1) through Hoogsteen hydrogen bonding.¹⁵ For this evaluation, we used an ODN (ODN 2) in which the central cytosine base was replaced by $d^{MP}C$. To confirm whether ODN 2/HP 1 formed a triplex, we conducted two experiments. The first method involved measuring the melting temperatures (T_m) of hairpin HP 1 or ODN 2/HP 1 triplex. We measured the T_m value in the presence of KCl at pH 5.0. As shown in Fig. 5A, for ODN 2/HP 1 triplex, a first T_m was observed at 41.5 °C and a second T_m at 77.5 °C. The control experiment revealed that the HP 1 alone exhibited no T_m near 41 °C, but a transition point believed to be the T_m of HP 1 was observed at the high temperature of 77.5 °C. Therefore, we concluded that the lower-temperature T_m (41.5 °C) corresponds to the dissociation of the triplex into a duplex. Subsequently, we monitored triplex formation using CD spectroscopy. For the ODN 2/HP 1 triplex, CD spectra were recorded at pH 5.0 and 7.0 to examine the pH dependence of triplex formation. At pH 7.0, no negative Cotton effect was observed around 210 nm. In contrast, as the pH was lowered, a characteristic negative Cotton effect appeared around 210 nm, indicating triplex formation.^{16,17} These results clearly indicate that the ODNs formed a triplex at around pH 5.0. Similar results were obtained in the corresponding experiments using the sequence lacking $d^{MP}C$. These results of T_m and CD measurements indicate that the ODN 2 formed a stable triplex with HP 1 under slightly acidic conditions even at room temperature.

Subsequently, we measured Raman spectra of the ODN 2/HP 1 under conditions of pH 5.0 and 7.0. As shown in Fig. 5C, under neutral conditions, the acetylene-derived signal was observed at 2217 cm^{-1} for the mixture of ODN 2 and HP 1. On the other hand, under acidic conditions, the signal for ODN 2/HP 1 shifted to a higher wavenumber by approximately 3 cm^{-1} . Since this change was small, the possibility of experimental error was considered; however, repeated measurements revealed a consistent trend toward higher wavenumbers under acidic conditions. We also found that the signal of single-stranded ODN 2 did not shift at pH 5.0, because the pK_a of $d^{MP}C$ is approximately 3.0 and $d^{MP}C$ on single-stranded ODN 2 was not protonated within the pH range of 5.0 to 7.0. Based on these findings, we concluded that this signal change of ODN 2/HP 1 at pH 5.0 indicates protonation at $d^{MP}C$ resulting from triplex formation. In addition, in the case of monomeric $d^{MP}C$ and $d^{MP}C$ in the single stranded ODN, the Raman spectral change was observed at around

pH 3.0. In contrast, the change in the Raman band of $d^{MP}C$ incorporated into ODN 2 was observed at pH 5.0 under triplex-forming conditions. According to our CD measurements, the triplex structure was clearly formed around pH 5.0. These results suggest that the formation of the higher-order triplex structure alters the local environment and physical properties of $d^{MP}C$, thereby facilitating protonation and/or changing the Raman signal of $d^{MP}C$ even at pH 5.0. Similar changes in the physical properties of nucleobases induced by stacking interactions and higher-order structure formation have been reported for unmodified DNA structures.¹² Therefore, we believe that changes in the local environment of the nucleobase caused by triplex formation may also occur in our system and contribute to the Raman band shift observed at pH 5.0.

CONCLUSION

In conclusion, we attempted to monitor the protonation at cytosine base in triplex structure. We prepared cytosine derivative $d^{MP}C$ bearing an acetylene unit as a Raman tag. The measurement of Raman spectra revealed that $d^{MP}C$ exhibited characteristic signal around 2220 cm^{-1} and the protonation at $d^{MP}C$ resulted in a significant change in the Raman band shift. We also found that ODNs bearing $d^{MP}C$ showed similar behavior under acidic conditions, indicating that protonation of ODNs bearing $d^{MP}C$ could be monitored using Raman spectra. In addition, Raman signal obtained from $d^{MP}C$ in ODNs was changed by approximately 3 cm^{-1} to higher wavenumber, when the ODNs formed triplex at pH 5.0. Thus, we successfully monitored cytosine protonation using Raman spectroscopy.

Acknowledgements

This work was supported in part by The Science Research Promotion Fund from Promotion and Mutual Aid Corporation for Private School of Japan (for K.T., T.S. and R.T.).

Notes

The authors declare no conflict of interests.

References

- (1) Hong, F., Zhang, F., Liu, Y., Yan, H. DNA Origami: Scaffolds for Creating Higher Order Structures. *Chem. Rev.* 2017; 117; 12584–12640.
- (2) Wang, G., Vasquez, K. M. Dynamic alternative DNA structures in biology and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2023; 24; 211–234.
- (3) Robinson, J., Raguseo, F., Nuccio, S. P., Liano, D., Antonio, M. D. DNA G-quadruplex structures: more than simple roadblocks to transcription? *Nucleic Acids Res.* 2021; 49; 8419–8431.
- (4) Tao, S., Run, Y., Monchaud, D., Zhang, W. i-Motif DNA: identification, formation, and cellular functions. *Trends Genet.* 2024; 40; 853–867.
- (5) Pozza, M. D., Abdullrahman, A., Cardin, C. J., Gasser, G., Hall, J. P. Three's a crowd – stabilisation,

- structure, and applications of DNA triplexes. *Chem. Sci.* 2022; 13; 10193–10215.
- (6) Makova, K., Weissensteiner, M. Non-canonical DNA structures are drivers of genome evolution. *Trends Genet.* 2023; 39; 109–124.
 - (7) Leisegang, M. S., Warwick, T., Stötzl, J., Brandes, R. P. RNA-DNA triplexes: molecular mechanisms and functional relevance. *Trends Biochem. Sci.* 2024; 49; 532–544.
 - (8) Larkin, P. *Infrared and Raman Spectroscopy*; Elsevier: 2011.
 - (9) Hernández, B., Pflüger F., Kruglik, S. G., Fhomi, M. Protonation–Deprotonation of the Glycine Backbone as Followed by Raman Scattering and Multiconformational Analysis. *Chem. Phys.* 2013; 425; 104–113..
 - (10) Fujioka, H., Kawatani, M., Spratt, S. J., Komazawa, A., Misawa, Y. Shou, J., Mizuguchi, T., Sakamoto, H., Kojima, R., Urano, Y., Obata, F., Ozeki, Y., Kamiya, M. Activatable Raman Probes Utilizing Enzyme-Induced Aggregate Formation for Selective *Ex Vivo* Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2023; 145; 8871–8881.
 - (11) Zhang, S., Mei, Y., Liu, J., Liu, Z., Tian, Y. Alkyne-tagged SERS nanoprobe for understanding Cu^+ and Cu^{2+} conversion in cuproptosis processes. *Nat. Commun.* 2024; 15; 3246.
 - (12) Itaya, R., Idei, W., Nakamura, T., Nishihara, T., Kurihara, R., Okamoto, A., Tanabe, K. Changes of $\text{C}\equiv\text{C}$ Triple Bond Vibration that Disclosed Non-Canonical Cytosine Protonation in i-Motif-Forming Oligodeoxynucleotides. *ACS Omega*, 2021; 6; 31595–31604.
 - (13) Bhilare, S., Gayakhe, V., Ardhapure, A. V., Sanghvi, Y. S., Schulzke, C., Borozdina, Y., Kapdi, A. R. Novel water-soluble phosphatriazenes: versatile ligands for Suzuki–Miyaura, Sonogashira and Heck reactions of nucleosides. *RSC Adv.* 2016; 6; 83820–83830.
 - (14) Matteucci, M. D., Caruthers, M. H. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* 1981; 103; 3185–3191.
 - (15) Teng, Y., Tateishi-Karimata, H., Ohyama, T., Sugimoto, N. Effect of Potassium Concentration on Triplex Stability under Molecular Crowding Conditions. *Molecules*, **2020**; 25; 387.
 - (16) Kan, Y., Schuster, G. B. Radical Cation Transport and Reaction in Triplex DNA: Long-Range Guanine Damage. *J. Am. Chem. Soc.* 1999; 121; 11607–11614.
 - (17) Tanabe, K., Iida, H., Haruna, K., Kamei, T., Okamoto, A., Nishimoto, S. Electrochemical evaluation of alternating duplex–triplex conversion effect on the anthraquinone-photoinduced hole transport through DNA duplex immobilized on a gold electrode. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128; 692–693.

222 nm Far-UVCの眼安全性:角膜障害とヒト曝露研究

杉原 一暢

島根大学医学部眼科学講座

Abstract

Background: Far-ultraviolet-C (Far-UVC) light at 222 nm has attracted interest as a germicidal technology that may be used in occupied spaces because of its limited penetration into biological tissues compared with conventional 254-nm UVC. The ocular surface is a key tissue for safety evaluation because it is directly exposed to the external environment.

Methods: This review summarizes experimental and clinical evidence on the ocular safety of 222-nm Far-UVC, with emphasis on corneal epithelial injury, ocular surface penetration, effects on corneal limbal epithelial basal cells, controlled human exposure studies, and long-term observation in real-world irradiated rooms.

Results: Animal studies showed that filtered 222-nm Far-UVC caused substantially less acute corneal epithelial damage than 254-nm UVC under comparable experimental conditions. Studies of the corneal limbus indicated that DNA damage markers induced by Far-UVC were largely limited to the superficial epithelial layer and were unlikely to reach the basal cell layer. Human exposure studies up to 75 mJ/cm² and prospective observations of workers in rooms irradiated with filtered 222-nm Far-UVC for 1 year and 36 months reported no clinically significant ocular injury under the tested conditions. However, transient ocular symptoms and the dependence of safety on source spectrum, filtration, dose, exposure geometry, and ocular surface condition remain important considerations.

Conclusions: Filtered 222-nm Far-UVC may have a favorable ocular safety profile under controlled exposure conditions. Its safety should not be generalized solely from wavelength; implementation requires verified spectral filtering, exposure measurement, device maintenance, and further evaluation in susceptible populations and long-term real-world settings.

Key words: 222-nm Far-UVC; corneal epithelial injury; human ocular safety; ultraviolet germicidal irradiation

1. はじめに

紫外線殺菌は、空気中、物体の表面、水中の微生物を不活化する物理的手段の1つとして長く用いられてきた。とくに254 nmを中心とする従来型UVは高い殺菌効果を示す一方、角膜炎や皮膚障害を生じうするため、有人環境での直接照射には制約があった。これに対し、222 nmを中心とする遠紫外線C波(far-ultraviolet-C; Far-UVC)は、核酸やタンパク質に吸収されやすく微生物を不活化しうる一方、生体表面では涙液、角質層、角膜上皮の表層成分に強く吸収され、深部組織への到達が限られると考えられている。この特徴により、222 nm Far-UVCは、有人空間における連続的な空気・環境表面の微生物制御を可能にする技術として注目されている。実際、222 nm Far-UVCは空気中のヒトコロナウイルスを効率よく不活化することが示されており、室内スケールの実験でもエアロゾル化した細菌負荷を大きく低減しうることが報告されている(1,2)。しかし、有人環境での利用を考えるうえで最も重要なのは、微生物不活性化能そのものではなく、人に対する安全性である。とくに眼は、角膜上皮、結膜、涙液層、角膜輪部などが外界に直接接するため、Far-UVCの社会実装において安全性評価の大切な指標である。

皮膚に関する研究も進んでおり、3次元ヒト皮膚モデルを用いた研究において、222 nm Far-UVCは、254 nm UVCと比較してDNA損傷および細胞毒性が著しく少ないことが報告されている(3)。また、健常成人を対象とした試験では、50-500 mJ/cm²の照射で紅斑を認めず、500 mJ/cm²照射後には皮膚常在菌のコロニー数が有意に減少する一方で、照射部位ではDNA損傷指標

であるcyclobutane pyrimidine dimerがわずかながら上昇していることが報告されている(4)。皮膚に対する長期反復曝露や高感受性集団(光線過敏症、色素性乾皮症、湿疹など正常皮膚ではない場合)に対する影響は引き続き検討が必要である。

222 nm Far-UVCの眼安全性を考える際には、単に「UVCは有害である」または「222 nmは安全である」と単純に言い切ることができない。UVCの生体影響は波長、光源スペクトル、照射量、曝露時間、照射距離、フィルター性能、組織透過性によって大きく変化する。従来型254 nm UVCは角膜上皮障害や光角膜炎を生じうるが、222 nm Far-UVCはタンパク質などに強く吸収されるため、角膜深部へ到達しにくいと考えられている。この仮説を検証するために、我々は、ラット角膜を用いた急性障害評価、短波長UVの再評価、角膜輪部上皮基底細胞への到達性評価を行い、さらにヒト介入試験および実環境での長期観察へ研究を発展させてきた(5-10)。

本総説の目的は、222 nm Far-UVCの眼安全性を、角膜障害性、組織透過性、角膜輪部への影響、ヒト曝露研究、実環境での長期観察という観点から整理することである。以下では、まず222 nm Far-UVCの物理学的特徴を概説し、次に角膜および眼表面での組織透過性を整理する。そのうえで、我々の一連の安全性研究を検討し、最後に臨床応用および公共空間での導入に向けた課題を考察する。

2. 222 nm Far-UVCの物理学的特徴

紫外線は波長によりUVA、UVB、UVCに分類され、

生体影響と殺菌効果は波長に強く依存する。一般に、UVA および UVB は太陽光に含まれ、皮膚や眼の光障害（紫外線角膜炎や翼状片、また長期的には白内障）に関与する（図 1）。一方、UVC はオゾン層でほとんどが吸収されるため、自然環境では地表にほとんど到達しない。しかし、人工光源として用いられる UVC は微生物の核酸やタンパク質に吸収され、強い殺菌効果を示す。従来の紫外線殺菌では主に低圧水銀ランプ由来の 254 nm UVC が用いられてきたが、254 nm UVC は角膜炎や皮膚障害を引き起こしうするため、原則として無人環境または遮蔽下での使用が前提となる。本邦では、浄水場や食品工場、また一部の空調設備内や器具保管庫内の殺菌補助など、直接目には見えない場所で多く活躍している。

これに対し、200–235 nm 程度の短波長 UVC は Far-UVC と呼ばれ、そのなかでも KrCl エキシマランプに由来する 222 nm 光は、微生物不活化能と生体組織への低透過性を併せ持つ波長として、近年注目されている。222 nm 光は、微小な細菌やウイルス粒子には到達しう一方、ヒトの皮膚や眼では表層のタンパク質、涙液、角膜上皮成分に強く吸収され、深部への到達が制限されると考えられている。Buonanno らは、222 nm Far-UVC がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌を効率よく不活化する一方、三次元ヒト皮膚モデルでは 254 nm UVC と比べて DNA 損傷や細胞毒性が著しく少ないことを示した (3)。この知見は、Far-UVC の低透過性が安全であるという近年の研究のスタートとなった。

ただし、KrCl エキシマランプは 222 nm 付近に主な発光ピークを持つが、完全な単色光源ではなく、222 nm 以外の波長成分を含みうる。とくに長波長側の紫外線成分が混入すると、組織透過性や DNA 損傷能が変化し、眼表面や皮膚へのリスク評価が異なる可能性がある。したがって、有人環境で使用する 222 nm Far-UVC 機器では、222 nm を選択的に透過し、不要な長波長成分を十分に遮断する光学フィルターが不可欠である。Hessling らは、Far-UVC に関する広範なレビューにおいて、222 nm KrCl エキシマランプの抗微生物作用とともに、230 nm を超える成分を光学フィルターで遮断する必要性を指摘している (11)。

222 nm Far-UVC の安全性を評価する際には、光源スペクトル、フィルターの有無、ランプおよびフィルター劣化、照射距離、照射角度、照射時間、照射面での実測線量を明確にする必要がある。単に「222 nm を照射した」だけでは、安全性や有効性を比較できない。特に眼安全性では、角膜が受ける直接光だけでなく、姿勢、視線方向、眼瞼による遮蔽、瞬目、涙液状態を考慮する

必要がある。したがって、222 nm Far-UVC の安全性評価は、光生物学、眼科学を横断する課題となっている。

3. 眼表面における組織透過性

222 nm Far-UVC の眼安全性を理解するうえで大切なのは、生体組織内での光の到達深度である。紫外線の生体影響は、照射エネルギー量だけでなく、照射された光がどの組織層まで到達し、どの分子に吸収されるかによって決まってくる。222 nm の光は、核酸だけでなくタンパク質、ペプチド結合、アミノ酸などに強く吸収されるため、生体表面で急速に減衰する。この性質により、皮膚では角質層、眼では涙液層および角膜上皮表層が主要な吸収部位となり、より深部の生細胞層や角膜実質、水晶体への到達は制限されると考えられている。

眼表面においては、涙液層、角膜上皮、Bowman 膜、角膜実質、角膜内皮、前房、水晶体が光の通過経路となる。254 nm UVC は角膜上皮に障害を生じうるが、222 nm Far-UVC は角膜上皮のごく表面で吸収されやすく、深部への透過が限られる。ただし、全く影響がないわけではなく、照射量によっては角膜最表層や涙液層では光化学反応が生じている。したがって、222 nm Far-UVC の眼安全性は、「深部へ到達しにくい」、また「表層でどのような反応が生じるか」という観点から我々は評価を行った。

角膜上皮の表層に明らかな障害が認められないことは重要であるが、それだけでは眼安全性を十分に説明できない。特に角膜輪部には、角膜上皮の再生を担う基底細胞および幹細胞があり、角膜の最内層には分裂能を持たない内皮細胞が存在する。ここが障害されると、角膜上皮・角膜透明性の恒常性維持が損なわれ、遷延性上皮欠損、角膜混濁、結膜侵入、視機能低下につながる可能性がある。したがって、角膜中央部の上皮障害が認められない場合でも、角膜輪部上皮基底細胞・内皮細胞への到達性を別に評価した。

我々は、222 nm および 207 nm Far-UVC の角膜輪部上皮基底細胞への影響を評価し、Far-UVC による DNA 損傷指標であるシクロブタン型ピリミジン二量体 (cyclobutane pyrimidine dimer; CPD) の形成が主として上皮表層に局限し、基底細胞層への影響が限定的であることを示した (7)。この知見は、222 nm Far-UVC の低透過性が角膜中央部だけでなく、角膜輪部にも当てはまりうることを示しており、長期眼安全性を考えるうえで重要である。

ただし、組織透過性の評価には限界もある。動物眼や摘出組織を用いた研究では、ヒト眼表面における瞬

図 1. さまざまな UV の種類と特徴

種類	代表波長	透過性	眼への影響	有人環境での扱い
UVA	315–400 nm	比較的深部まで到達	長期曝露で水晶体・網膜・眼表面への影響が問題となる	強い人工光源では防護が必要
UVB	280–315 nm	UVA より浅いが眼表面・水晶体に影響	紫外線角膜炎、翼状片、白内障などに関与	人体曝露の管理が必要
254 nm UVC	254 nm	角膜上皮・皮膚表層で吸収	紫外線角膜炎、角膜上皮障害、皮膚障害を生じる	原則として無人または遮蔽下で使用
222 nm Far-UVC	222 nm	生体表層で急速に減衰	管理条件下では角膜深部への障害が生じにくい可能性	条件管理下で有人環境応用が検討

目、涙液動態、眼瞼遮蔽、眼表面疾患、コンタクトレンズ装用などの条件を完全には反映していない。また、CPD 形成は紫外線到達性を評価する有用な指標であるが、酸化ストレス、炎症、細胞外マトリックス変化、角膜神経への影響など、眼表面機能に関わるすべての影響を網羅していない。したがって、組織透過性の低さは眼安全性を支持する重要な根拠であるが、臨床実装の判断にはヒト介入試験および長期観察研究と統合して評価する必要があった。

4. 動物実験における角膜障害性評価

222 nm Far-UVC の眼安全性研究における重要な出発点は、従来型 254 nm UVC との直接比較である。254 nm UVC は殺菌灯として広く用いられてきたが、角膜上皮に吸収され、紫外線角膜炎、点状表層角膜炎、角膜上皮欠損などを起こし健康被害が起きる場合がある。一方、222 nm Far-UVC は同じ UVC 領域に属するものの、タンパク質や水分子への吸収がより強く、生体組織内での到達深度が浅い。このため、254 nm UVC と同じ線量で比較した場合でも、角膜障害性が異なる。

我々は、6 週齢 Sprague-Dawley アルビノラットを用い、222 nm および 254 nm 紫外線を角膜に照射して急性角膜障害を比較した。照射量は各波長で 30、150、600 mJ/cm² に設定され、角膜上皮欠損はフルオレセイン染色により評価された。254 nm UVC では 150 mJ/cm² 以上で点状表層角膜炎が生じ、600 mJ/cm² では角膜びらんが観察された。一方、フィルター付き 222 nm Far-UVC では、同条件下で角膜上皮に明らかな障害は認められなかった (5)。組織学的評価でも、254 nm 照射では角膜上皮障害が確認されたのに対し、222 nm 照射では角膜上皮構造が保たれていることが確認された (5)。

従来、UVC は強い殺菌力と同時に眼・皮膚への有害性を持つものとして扱われてきた。しかし、我々の結果は、222 nm Far-UVC が 254 nm UVC とは異なる角膜障害性を示すことを明確にし、Far-UVC の有人環境応用を検討するためのスタートとなった。

その後、我々は短波長 UV のより多くの波長によるラット角膜障害性を再評価し、Far-UVC が従来型 UVC と比較して著しく低い角膜障害性を示すことを報告した (6)。この研究は、222 nm と 254 nm の比較だけでなく、UVC 領域内の波長依存性をより広く検討した点で重要である。UVC による生体影響は、核酸吸収、タンパク質吸収、水分子吸収、組織透過性のバランスにより規定されるため、波長が数十 nm 異なるだけでも角膜上皮への到達性や障害性が変化しうる。Far-UVC を「従来型 UVC より短波長の光」として一括して扱うのではなく、波長ごとの組織深達性と生物学的影響を区別して評価することが重要である。

一方で、動物実験の結果をヒトへ適用する際には種差を考慮する必要がある。角膜厚、上皮厚、涙液層、瞬目、眼瞼による遮蔽、眼表面の乾燥状態は、実際の曝露量や組織到達性に影響する。したがって、我々の一連の研究は、Far-UVC の低障害性がある程度は支持するが、ヒト眼表面における安全性を結論づけるため、角膜輪部評価、ヒト介入試験、実環境での長期観察と組み合わせる必要があった。

5. 角膜輪部上皮基底細胞への影響

角膜輪部は、222 nm Far-UVC の眼安全性を評価するうえで特に重要な部位である。角膜輪部には角膜上皮の再生を担う基底細胞および幹細胞ニッチが存在し、この領域が障害されると、角膜上皮の恒常性維持が損なわれる。角膜上皮は日常的にターンオーバーを繰り返しており、その再生は角膜輪部幹細胞に依存している。そのため、角膜中央部に明らかな上皮欠損が認められない場合でも、輪部基底細胞への慢性的または累積的影響を評価することは不可欠である。

Kaidzu らは、ラット角膜輪部およびブタ角膜輪部を用いて、Far-UVC が角膜輪部上皮基底細胞へ到達するかを検討した。この研究では、紫外線照射後に生じる DNA 損傷指標として CPD を用い、207、222、235、254、311 nm の各波長における組織内到達性を比較した (7)。ラット角膜輪部では、254 nm UVC および 311 nm UVB 照射後に CPD が上皮基底層まで認められたのに対し、207 nm および 222 nm Far-UVC では CPD 陽性細胞は主に上皮最表層に局限した。ブタ角膜輪部を用いた評価でも、222 nm Far-UVC による CPD 形成は上皮最表層に局限し、基底細胞層への到達は認められにくいことが示された (7)。

元々輪部の幹細胞は比較的組織の深い位置に存在しているため、角膜上皮細胞に障害がなければ幹細胞は障害されないと予想されたが、この知見は、222 nm Far-UVC の低透過性が角膜中央部だけでなく、角膜輪部にも当てはまりうることを示した。特に、角膜輪部上皮基底細胞は角膜上皮のターンオーバーを支える細胞群であるため、この層に DNA 損傷が及びにくいという結果は、Far-UVC の長期限安全性を支持する重要な根拠となった。

ただし、この研究結果にも限界がある。まず、ラットおよび摘出ブタ角膜を用いた評価であり、ヒト眼表面における瞬目、涙液動態、眼瞼遮蔽、眼表面疾患、コンタクトレンズ装用などの条件を完全には反映していない。また、CPD 形成は紫外線到達性を評価する有用な指標であるが、炎症、酸化ストレス、角膜神経、涙液安定性、結膜応答などの機能的影響を直接評価するものではない。また、角膜輪部への影響は線量、照射角度、照射距離、光源スペクトル、フィルター性能により異なる。そのため、臨床実装を進めるため、ヒト介入試験を行うこととなった。

6. ヒト介入試験における眼安全性

動物実験および摘出組織を用いた研究は、222 nm Far-UVC が角膜上皮および角膜輪部の深部へ到達しにくいことを示してきた。しかし、臨床実装を考えるうえでは、ヒト眼表面において同様の安全性が成り立つかを直接評価する必要がある。ヒト眼では、涙液層、瞬目、眼瞼による遮蔽、眼表面の乾燥状態、主観的な症状、日内変動などが曝露後の所見に影響しうる。また、実際の有人環境では、照射は必ずしも一回限りではなく、反復または長時間に及ぶ可能性がある。

我々は、健康成人を対象として 222 nm Far-UVC ランブ照射によるヒト眼安全性を検討した。この研究では、222 nm Far-UVC を 22、50、75 mJ/cm² の線量で眼に照射し、照射後の眼科所見および自覚症状が評価された

(9). 75 mJ/cm² までの照射条件では、臨床的に明らかな光角膜炎、角膜上皮障害、視力低下、眼圧変化などの重篤な有害所見は認められなかったと報告されている (9)。一方で、一部の被験者では乾燥感、流涙、違和感などの一過性症状が生じたことから、222 nm Far-UVC の曝露後評価では、客観的所見だけでなく主観症状も含めた観察が必要である。

この研究は、222 nm Far-UVC の眼安全性をヒトで直接検証した点が特徴で特に、従来の American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) の許容閾値に近い 22–23 mJ/cm² に加え、それを上回る 50 および 75 mJ/cm² の条件での照射を行った。ACGIH の TLV では、2022 年以降、222 nm に対する 8 時間眼曝露限界として約 160 mJ/cm² が提示されており、従来基準より高い曝露量の議論が進んでいる (12, 13)。

ただし、この結果にはいくつかの制約がある。第一に、対象は基本的に健康成人であり、ドライアイ、角膜上皮障害、角膜移植後、角膜輪部機能不全、コンタクトレンズ装用、眼科手術後、小児、高齢者、日光過敏症患者などの高感受性集団にそのまま適用できるとは限らない。第二に、試験は管理された照射条件下で実施されており、実環境における照射角度、反射光、累積曝露、眼表面の乾燥、長時間勤務中の曝露パターンを完全には再現できない。照射設定が同じであれば、照射ランプに近づくとも想定以上の光障害が起きる可能性がある。第三に、照射後の短期的眼所見が正常であっても、反復曝露による慢性変化、涙液安定性、角膜知覚、結膜炎など眼表面への影響は、別途検討が必要である。したがって、我々のヒト介入試験は、222 nm Far-UVC の急性期の安全性としては重要な根拠であるが、臨床実装の判断には、実環境での長期観察研究と組み合わせた評価が必要であった。

7. 実環境における 1 年および 36 か月観察

ヒト介入試験は、管理された条件下で 222 nm Far-UVC を眼に照射した際の短期的安全性を評価するうえで重要である。一方、有人環境で 222 nm Far-UVC を実装する場合には、単回曝露ではなく、低線量の反復曝露、室内反射、勤務中の姿勢変化、眼表面の乾燥、日内変動、照射装置の運用条件などが複合的に関与する。そのため、実際の室内環境で 222 nm Far-UVC を運用し、就労者の眼所見を長期に追跡する観察研究は、臨床実装に近いエビデンスとして重要である。

我々は、222 nm Far-UVC ランプを設置した眼科診療室に勤務する医療従事者を対象に、1 年間の眼安全性観察を実施した。この研究では、実際の診療室で 222 nm Far-UVC を運用し、勤務者の眼科所見を追跡し、室内における微生物不活化効果も推定した (8)。この点で、本研究は単なる眼安全性試験ではなく、「有人環境で眼安全性を保ちながら微生物制御効果を得られるか」という不活化効果と安全性を同時に評価した研究である。観察期間中、222 nm Far-UVC 照射室で勤務した対象者において、臨床的に問題となる眼障害は報告されず、眼科診療室という実環境での長期使用に関する初期的根拠が示された (8)。

その後、我々は観察期間を 36 か月に延長し、222 nm

Far-UVC による全室殺菌照射環境で勤務する眼科医を対象に、眼安全性を前向きに評価した。この 36 か月臨床観察研究は、222 nm Far-UVC の有人環境使用に関する長期眼安全性データとして重要である (10)。本研究は、222 nm UV-C ランプを備えた眼科診療室で働く医師を 36 か月追跡した前向き観察研究であり、単回曝露試験では捉えにくい累積曝露の影響を評価した (10)。

これらの研究では、ドライアイや点状びらん、増悪、白内障の進行、角膜混濁などの明らかな眼障害は認められなかった。

ただ、この研究にも限界があり、第一に、観察対象は特定の眼科診療室で勤務する医療従事者（主として眼科医）であり、一般集団ではない。第二に、実環境での曝露量は、勤務時間、室内での位置、眼の向き、眼瞼遮蔽、反射光、装置の配置により個人差が生じうる。第三に、観察研究では比較対照や盲検化に限界があり、軽微な主観症状や眼表面機能の変化を検出する感度には制約がある。第四に、使用された装置のスペクトル特性、フィルター性能、線量管理が厳密にされており、実社会では同一条件を厳密に再現できない場合や、異なる製品や設置条件で同じ結果が得られるとは限らないという点が挙げられる。

以上より、我々の 1 年および 36 か月観察研究は、222 nm Far-UVC の有人環境使用を支持する重要な臨床データであるが、一方で、これらの知見は「222 nm Far-UVC はすべての条件で安全である」という結論とはなっていない。むしろ、適切にフィルターされた光源、管理された曝露量、明確な対象集団、規定された観察期間という条件下で得られたエビデンスとして理解する必要がある。

8. 曝露限界値と安全基準

222 nm Far-UVC の社会実装は、感染対策技術としての有効性だけでなく、有人環境における曝露管理と安全基準に強く依存する。従来型 254 nm UVC は、空気・水・表面の消毒に広く用いられてきたが、角膜炎や皮膚障害のリスクがあるため、原則として無人環境、遮蔽空間、上部空間照射などで使用されてきた。一方、222 nm Far-UVC は生体表層で強く吸収されるため、適切にフィルターされた光源を用い、曝露量を管理すれば、有人環境での連続的な微生物制御に応用できる可能性がある。

222 nm Far-UVC の安全基準を論じる際には、ACGIH と ICNIRP の曝露限界値の違いを理解する必要がある。ICNIRP に基づく 222 nm の 8 時間曝露限界としては、23 mJ/cm² が多くの研究で参照されてきた (2, 14)。この値は、Far-UVC 研究の初期段階において、安全側に立った基準として広く使われ、室内規模の微生物不活化実験でも曝露設計の基準として採用されている。

一方、ACGIH は 2022 年以降、UVC 領域の曝露限界値を見直し、222 nm に対して従来より高い許容曝露量を提示している。Duncan らによると、ACGIH の新しい TLV では、222 nm における 8 時間曝露限界は眼で約 160 mJ/cm²、皮膚で約 479 mJ/cm² とされている (13)。これは、222 nm Far-UVC が角膜および皮膚の深部へ到達しにくいという近年の知見を反映した変更である。ただし、ACGIH の TLV は主に労働衛生上の管理指標

であり、すべての一般集団、疾患を有する集団、小児、高齢者にそのまま適用できるとは限らない。

したがって、222 nm Far-UVC の安全性を論じる際には、「基準値以下である」という記載だけではいまだに不十分であり、8 時間平均曝露なのか短時間曝露なのか、直接光と反射光を含めた実測値なのかを明記する必要がある。また、ACGIH と ICNIRP では許容曝露量に差があるため、国や施設、製品認証、研究デザインによって採用基準が異なりうる。この点は、文献間で 222 nm Far-UVC の「安全な線量」や「実装可能な出力」を比較する際の重要な注意点である。

曝露限界値と同じく重要なのが、光源そのものの管理である。KrCl エキシマランプは 222 nm 付近に主発光ピークを持つが、長波長側の副次的発光を含みうる。222 nm 光そのものは生体表層で吸収されやすいが、230 nm を超える成分やより長波長の紫外線が混入すると、組織透過性や DNA 損傷能が変化する可能性がある。したがって、有人環境での使用では、222 nm を選択的に透過し、不要な長波長成分を遮断するフィルターが安全性の前提となる。製品評価では、単に「222 nm」と表記されていることだけでなく、分光スペクトル、フィルター性能、フィルター劣化、照度分布、測定器の校正、室内反射を含めた線量測定が不可欠である。年単位ではランプの出力低下などもあり、殺菌効果が落ちてしまう点も指摘されている。

9. 安全性評価における未解決課題

これまでの研究により、適切にフィルターされた 222 nm Far-UVC は、健常眼に対して比較的低い障害性を示すことが報告されている。我々の研究は、ラット角膜、角膜輪部、ヒト介入試験、1 年および 36 か月の実環境観察を通じて、眼安全性に関するデータを蓄積してきた。今後特に検討すべき対象は、ドライアイ患者、角膜上皮障害を有する患者、角膜移植後または屈折矯正手術後の患者、角膜輪部機能不全を有する患者、コンタクトレンズ装用者、小児、高齢者である。これらの集団では、涙液層、角膜上皮バリア、瞬目、角膜知覚、眼表面炎症、修復能が健常成人と異なる可能性がある。

長期反復曝露も重要な課題である。有人環境で 222 nm Far-UVC を使用する場合、曝露は一回限りではなく、日常的・反復的に生じる。したがって、単回曝露後の急性角膜障害が認められないことだけでは、長期安全性を十分に説明できていない。長期反復曝露では、角膜上皮ターンオーバー、涙液安定性、結膜炎症、角膜知覚、眼表面マイクロバイオーーム、慢性的な不快感、累積 DNA 損傷の有無を評価する必要がある。我々の 36 か月観察研究は重要な臨床データであるが、今後検討が必要である (10)。

また、眼安全性と微生物制御効果のバランスも実装上の課題である。曝露量を低くすれば眼・皮膚の安全性は高まるが、空气中または表面上の微生物への線量が不足すれば、感染対策としての有効性は低下する。一方、微生物不活化効果を高めるために出力や照射時間を増やすと、眼や皮膚の曝露限界に近づく可能性がある。このバランスを評価するには、人の曝露量と微生物の実効線量を別々に測定する必要がある。人の眼が受ける最大線量は、照射装置の位置、照射角度、天井高、

反射面、利用者の姿勢により変化する。一方、微生物が受ける線量は、空気流、エアロゾル粒径、滞留時間、表面材質、影、有機物、バイオフィームにより変化する。

装置管理の標準化も不可欠である。KrCl エキシマランプは 222 nm 付近を主波長とするが、光源スペクトル、フィルター性能、ランプ劣化、照度低下、長波長漏れは時間とともに変化する。特に、フィルターが劣化して不要な長波長成分が増加すれば、生体障害性が増すこととなる。したがって、定期的な分光測定、照度測定、フィルター点検、ランプ交換基準、装置清掃、記録管理が必要である。

最後に、222 nm Far-UVC は感染対策を置き換える単独技術ではなく、既存の対策を補完する技術として位置づけるべきである。換気、手指衛生、環境清掃、マスク、ワクチン、標準予防策は、それぞれ異なる伝播経路に作用する。Far-UVC は、空气中および露出表面上の微生物負荷を連続的に低減しうるが、照射の影となる部分、厚い汚れの内部、バイオフィームの中、体内感染巣には効果がない。したがって、Far-UVC 導入により清掃や換気を完全に省略できるわけではない。むしろ、222 nm Far-UVC の利点は、人がいる空間で連続的に環境殺菌ができる点にあり、その利点を活かすには、安全な曝露管理と、微生物が実際に光へ曝露される環境設計が両立している必要がある。

10. 結論

222 nm Far-UVC は、従来型 254 nm UVC と同様に微生物不活化能を有しながら、生体表層で強く吸収されるという特徴を持つ。この低透過性により、適切にフィルターされた 222 nm Far-UVC は、角膜内層や角膜輪部基底細胞などの角膜深部へ到達しにくく、有人環境で使用しうる感染制御技術として注目されている。これまでの研究は、222 nm Far-UVC が適切な照射条件下では眼表面に対して低侵襲である可能性を支持している。

一方、222 nm Far-UVC の安全性は、「222 nm」という波長名だけで保証されるものではない。安全性評価には、主波長、スペクトル幅、不要な長波長成分の有無、フィルター性能、照射量、照射距離、曝露時間、累積曝露、室内反射、対象者の眼表面状態を含めた検討が必要である。特に眼安全性については、角膜上皮障害の有無だけでなく、角膜輪部、涙液層、結膜、眼瞼、主観症状、反復曝露後の慢性変化を評価する必要がある。課題としては健常成人を対象とした研究で安全性が示されたとしても、眼表面疾患を有する患者や高感受性集団における安全性を担保することはできない。

今後は、眼安全性と微生物不活化効果を同時に満たす実装条件を明確にすることが重要である。222 nm Far-UVC は、適切な光源管理と曝露設計のもとで、人が存在する空間における感染制御を強化しうる技術である。しかし、その実装には、安全性を過度に一般化せず、装置、環境、人、微生物の条件を明示したうえで、慎重かつ継続的に評価する姿勢が必要である。

謝辞

本総説の作成にあたり、研究の遂行および眼安全性

評価に関してご指導を賜りました島根大学医学部眼科学講座 谷戸正樹教授ならびに前任教授の大平明弘先生に深謝いたします。また、222 nm Far-UVC 光源および関連技術に関する情報提供・研究支援をいただいたウシオ電機株式会社の関係各位に感謝申し上げます。

利益相反

著者 杉原一暢 は、参天製薬株式会社、興和株式会社、中外製薬株式会社、ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社、ノバルティス ファーマ株式会社、グラウコス・ジャパン合同会社、日本アルコン株式会社より講演料等を受領している。

参考文献

1. Buonanno M, Welch D, Shuryak I, Brenner DJ. Far-UVC light (222 nm) efficiently and safely inactivates airborne human coronaviruses. *Sci Rep*, 2020;10:10285.
2. Eadie E, Hiwar W, Fletcher L, et al. Far-UVC (222 nm) efficiently inactivates an airborne pathogen in a room-sized chamber. *Sci Rep*, 2022;12:4373.
3. Buonanno M, Ponnaiya B, Welch D, et al. Germicidal efficacy and mammalian skin safety of 222-nm UV light. *Radiat Res*, 2017;187:483-491.
4. Fukui T, Niikura T, Oda T, et al. Exploratory clinical trial on the safety and bactericidal effect of 222-nm ultraviolet C irradiation in healthy humans. *PLoS One*, 2020;15:e0235948.
5. Kaidzu S, Sugihara K, Sasaki M, Nishiaki A, Igarashi T, Tanito M. Evaluation of acute corneal damage induced by 222-nm and 254-nm ultraviolet light in Sprague-Dawley rats. *Free Radic Res*, 2019;53:611-617.
6. Kaidzu S, Sugihara K, Sasaki M, Nishiaki A, Igarashi T, Tanito M. Re-evaluation of rat corneal damage by short-wavelength UV revealed extremely less hazardous property of far-UV-C. *Photochem Photobiol*, 2021;97:505-516.
7. Kaidzu S, Sugihara K, Sasaki M, et al. Safety evaluation of far-UV-C irradiation to epithelial basal cells in the corneal limbus. *Photochem Photobiol*, 2023;99:1142-1148.
8. Sugihara K, Kaidzu S, Sasaki M, et al. One-year ocular safety observation of workers and estimations of microorganism inactivation efficacy in the room irradiated with 222-nm far ultraviolet-C lamps. *Photochem Photobiol*, 2023;99:967-974.
9. Sugihara K, Kaidzu S, Sasaki M, Tanito M. Interventional human ocular safety experiments for 222-nm far-ultraviolet-C lamp irradiation. *Photochem Photobiol*, 2025;101:517-526.
10. Sugihara K, Kaidzu S, Sasaki M, et al. Ocular safety of 222-nm far-ultraviolet-C full-room germicidal irradiation: A 36-month clinical observation. *Photochem Photobiol*, 2025;101:1343-1349.
11. Hessling M, Haag R, Sieber N, Vatter P. The impact of far-UVC radiation on pathogens, cells, skin, and eyes: A collection and analysis of a hundred years of data. *GMS Hyg Infect Control*, 2021;16:Doc07.
12. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. TLVs and BEIs: Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati: ACGIH, 2022.
13. Duncan MA, Eadie E, Wood K, Barnard IRM. Ocular and facial far-UVC doses from ceiling-mounted filtered KrCl lamps. *Photochem Photobiol*, 2023;99:556-565.
14. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). *Health Phys*, 2004;87:171-186.

Author Guidelines

Submission of manuscripts

Editor-in-Chief requests authors to submit manuscripts via e-mail <tmakino@med.u-toyama.ac.jp>. The first author or corresponding author is required to be a member of the Japanese Society for Photomedicine and Photobiology. Manuscripts must be submitted as Microsoft Word or compatible software (doc or docx files). Figures should be prepared as high resolution (>300 dpi) JPEG files. Word limit for summary must be 250 words. Authors for whom English is not a mother tongue may submit their manuscript to professional English Editing Service. The work to be submitted has not been published before, is not considered for publication elsewhere. The manuscript for submission must be carefully written and approved fully by all authors. Color artwork is free for submission.

Editor-in-Chief

Teruhiko Makino, MD, PhD
Department of Dermatology
Faculty of Medicine, Academic Assembly,
University of Toyama
2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

Manuscript types

Photomedicine and Photobiology accepts original articles, review articles, and letters to the editor. Figures are acceptable in either black and white or color, according to the authors' preference. The use of color is encouraged when it enhances clarity or data interpretation.

Original articles are investigative studies in fields such as photomedicine, photobiology, and photochemistry. It should not exceed 3500 words (10,000 characters in Japanese), including 250 words (750 characters in Japanese) abstract, Figure legends (excluding references), and a maximum of 4 figures/ tables.

Review articles are for authors essentially invited by Editors. However, suggestions from readers are welcome. It should not exceed 5000 words (15,000 characters in Japanese), including 250 words (750 characters in Japanese) abstracts, figure legends (excluding references), and maximum of 5 figures/tables.

Letters to the Editor are for brief reports. Word count limits for this category are 1500 words (4,000 characters in Japanese), including legends (excluding references) with 2 figures or tables. Reference should not exceed 10 in number. Abstract is not required for this category.

Manuscript arrangement

The manuscript should be written in either English or Japanese. Double spaced typing and minimal margin of 25 mm are required. Each manuscript requires following: 1) Title page, 2) Abstract and 3-5 key words, 3) Text, 4) acknowledgements, 5) References, 6) Tables/Figures with separate legends. Please number each page. Structured abstract, including Background, Methods, Results and Conclusions, is requested. The abstract should be written in English even if the manuscript was written in Japanese.

References

Number references consecutively in the order appeared in the text. Identify references by Arabic numerals in parentheses. Ex) (1). List all authors when 6 or less. When 7 or more authors exist, list only the first 3 and add "et al." Journal titles should be properly abbreviated according to Index Medicus style. Examples of references are as follows:

1. Rahmani F, Razaee N. Therapeutic targeting of Toll-like receptors: a review of Toll-like receptors and their signaling pathways in psoriasis. *Expert Rev Clin Immunol*, 2016;12:1289-1298.
2. Frain-Bell W. The photodermatoses. In: Rook A, ed. *Recent advances in dermatology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1973: 101-133.

Conflict of Interest

Please disclose all conflict of interests. These include financial, personal, political, intellectual or religious interests.

Peer review

Submitted paper will be peer reviewed.

「Photomedicine and Photobiology」投稿規定

1. 筆頭著者あるいは責任著者は日本光医学光生物学会員とする。
2. 投稿内容は original article (原著), review article (総説), letter to the editor (短報) を主とし, 英文または和文で他誌に掲載されていないものとする。投稿原稿は和文と英文のいずれも可とする。
3. 投稿原稿の執筆要綱は下記のとおりとする。
原著 (英文 3,500 語, 和文 10,000 字):
医学, 薬学, 生物学, 化学, 物理学などの分野における光に関連した研究論文。
本文, 要約, 図の説明を含む (参考文献は除く)。図・表は 4 点以内。
総説 (英文 5,000 語, 和文 15,000 字):
原則, 編集者からの依頼原稿であるが購読者からの推薦も歓迎する。
本文, 要約, 図の説明を含む (参考文献は除く)。図・表は 5 点以内。
短報 (英文 1,500 語, 和文 4,000 字):
臨床症例報告や速報的研究。
本文, 図の説明を含む。参考文献は 10 編以内。要約は不要。図・表は 2 点以内。
要約は英語で 250 字以内とする。
図・表が制限を超える場合については, 編集委員会で調整する。
4. 原稿は英文あるいは和文で Microsoft Word かそれと互換性のあるソフトウェア (doc or docx file) で作成し, メールで tmakino@med.u-toyama.ac.jp へ提出する。
5. 原稿には 1) タイトルページ, 2) 要約と key words (3-5 個), 3) 本文, 4) 謝辞, 5) 参考文献, 6) 図・表の説明を記載し, 頁番号をつける。
6. 要約は和文, 英文に関わらず英語 (250 語) で, 背景, 方法, 結果, 結論と構造化して記載する。
7. 図は高解像度 (300 dpi 以上) の JPEG ファイルで作成し必ず説明を付ける。図は, 著者の選択に応じて白黒またはカラーのいずれでも可とする。カラーの使用は, 明瞭性やデータ解釈を向上させる場合に推奨される。
8. 文献は本文に用いられたもののみをあげる。引用番号は本文の引用順とし, 本文中の引用箇所にはアラビア数字を入れた括弧を記載する。例 (1)。
9. 文献は, 下記の形式に従って記載する。著者は 6 名以下の場合は全員を, 7 名以上の場合は最初の 3 名を記載し, 「他」または et al. を付ける。雑誌名は Index Medicus に従い適切に略記する。
(例) Rahmani F, Razaei N. Therapeutic targeting of Toll-like receptors: a review of Toll-like receptors and their signaling pathways in psoriasis. Expert Rev Clin Immunol, 2016;12:1289-1298.
Frain-Bell W. The photodermatoses. In: Rook A, ed. Recent advances in dermatology. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1973: 101-133.
10. 利益相反に関してはすべて記載する。
11. 投稿論文は専門家により査読される。

Photomedicine and Photobiology

編集長 牧野 輝彦

〒930-0194 富山県富山市杉谷 2630

富山大学学術研究部医学系皮膚科学

E-mail: tmakino@med.u-toyama.ac.jp



ヒト化抗ヒトIL-23p19モノクローナル抗体製剤
イルミア® 薬価基準収載
 皮下注 100mgシリンジ
 ILUMYA® チルドラキズマブ(遺伝子組換え)注射液
 生物由来製品 劇薬 処方箋医薬品* *注意-医師等の処方箋により使用すること

効能又は効果、用法及び用量、警告・禁忌を含む注意事項等の詳細については電子添文をご参照ください。

製造販売元〔文献請求先〕

サンファーマ株式会社

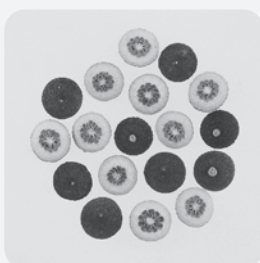
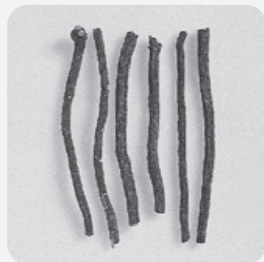
東京都港区芝公園 1-7-6

お問い合わせ先

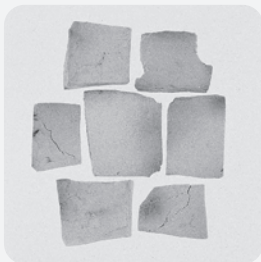
くすり相談センター

TEL:0120-22-6880

2024年11月作成



生薬には、
個性がある。



漢方製剤にとって「良質」とは何か。その答えのひとつが「均質」である、とツムラは考えます。自然由来がゆえに、ひとつひとつに個性がある生薬。漢方製剤にとって、その成分のばらつきを抑え、一定に保つことが「良質」である。そう考える私たちは、栽培から製造にいたるすべてのプロセスで、自然由来の成分のばらつきを抑える技術を追求。これからもあるべき「ツムラ品質」を進化させ続けます。現代を生きる人々の健やかな毎日のために。自然と健康を科学する、漢方のツムラです。

良質。均質。ツムラ品質。



株式会社ツムラ <https://www.tsumura.co.jp/> 資料請求・お問合せは、お客様相談窓口まで。

医療関係者の皆様 tel.0120-329-970 患者様・一般のお客様 tel.0120-329-930 受付時間 9:00~17:30(土・日・祝日は除く)

2021年4月制作 (審)



maruho

生物由来製品、創薬、処方箋医薬品*

ヒト化抗ヒトIL-31受容体Aモノクローナル抗体 薬価基準収載

ミチーガ® 皮下注用60mgシリンジ
皮下注用30mgバイアル

Mitchga®: ネモリズマブ(遺伝子組換え)注射剤

60mgシリンジ: 最適用推進ガイドライン対象品目
30mgバイアル(一部): 最適用推進ガイドライン対象品目

* 注意: 振頭等の処方箋により使用すること

製造販売(文献請求先及び問い合わせ先)
maruho マルホ株式会社
大阪市北区中津1-5-22

●効能・効果、用法・用量、警告・禁忌を含む注意事項等情報等については、電子添文をご参照ください。

2025年5月作成



Lilly
A MEDICINE COMPANY

抗ヒトIL-13モノクローナル抗体製剤 薬価基準収載

イブグリース® 皮下注250mg
オートインジェクター
シリンジ

レプリキズマブ(遺伝子組換え)注射液
Ebglyss® Subcutaneous Injection Autoinjectors, Ebglyss® Subcutaneous Injection Syringes

生物由来製品 創薬 処方箋医薬品(注意-医師等の処方箋により使用すること)
最適用推進ガイドライン対象品目

効能又は効果、用法及び用量、
警告・禁忌を含む注意事項等
情報等については、電子添文を
ご参照ください。

製造販売元(文献請求先及び問い合わせ先)
日本イーライリリー株式会社
〒651-0086 神戸市中央区磯上通5丁目1番28号

日本イーライリリー医薬情報問合せ窓口
medical.lilly.com/jp

(医療関係者向け)
0120-360-605 ^{※1}
受付時間 月曜日～金曜日 8:45～17:30 ^{※2}
^{※1} 通話料は無料です。携帯電話からでもご利用いただけます。
尚、IP電話からはフリーダイヤルをご利用できない場合があります。
^{※2} 祝祭日および当社休日を除きます。

笑顔につながる 明日を、共に。



米国に本社を置く、グローバルな研究開発型のバイオ医薬品企業アッヴィ。
私たちが目指すのは、この社会の誰もがその人らしく笑顔ある日々を過ごせること。
そのために、多様な社員が想いをひとつに、
新しい医薬品や治療法を生み出すことに挑み続けます。
そして、医療分野にとどまることなく、同じ想いを持つ人々と共に、
社会課題の解決に向けて取り組んでいきます。

abbvie

アッヴィ合同会社

〒108-0023 東京都港区芝浦三丁目1番21号
msb Tamachi 田町ステーションタワーS
<https://www.abbvie.co.jp/>