

学位論文

東京工科大学
博士學位論文

赤唇部の加齢変化に関する組織学的研究

Histological investigation of changes in the vermilion with aging

西暦 2020 年 7 月
五味 貴優

目次

緒言	1
序章 赤唇の加齢変化	4
序章.1 加齢による赤唇色調の変化	4
序章.2 加齢による赤唇の形態変化	5
序章.3 加齢による赤唇の物性や機能の変化	5
序章.4 加齢による赤唇組織の変化	7
序章.5 小括	8
第1章 ヒト赤唇の真皮血管および真皮-上皮接合部の加齢変化	9
1.1. 序論	9
1.2. 実験材料および実験方法	9
1.2.1. ヒト赤唇組織	9
1.2.2. 抗体	11
1.2.3. 免疫組織化学	11
1.2.4. 画像解析	11
1.2.5. 統計解析	11
1.3. 結果	11
1.3.1. 年齢と真皮血管の関係	11
1.3.2. SSE の形態と年齢の関係	13
1.3.3. Rete ridges の発達度と真皮血管との関係	14
1.3.4. Rete ridges の発達度と上皮細胞の増殖との関係	15
1.4. 考察	15
第2章 ヒト赤唇の真皮細胞外結合組織 (ECM) 成分の加齢変化	17
2.1. 序論	17
2.2. 実験材料および実験方法	17
2.2.1. ヒト赤唇組織	17
2.2.2. 組織学的解析	18
2.2.3. ヒアルロン酸解析	18
2.2.4. 免疫蛍光染色	18
2.2.5. 統計解析	19
2.3. 結果	19
2.3.1. 膠原線維の加齢変化	19
2.3.2. 弾性線維の加齢変化	21
2.3.3. ヒアルロン酸の加齢変化	22
2.4. 考察	23
第3章 加齢に伴うヒト赤唇の口輪筋構成重鎖の変化	27
3.1. 序論	27
3.2. 実験材料および実験方法	27

3.2.1.	ヒト赤唇組織	27
3.2.2.	組織学的解析	27
3.2.3.	蛍光免疫染色	27
3.2.4.	統計解析	28
3.3.	結果	28
3.3.1.	口輪筋先端部の筋線維の加齢変化	28
3.3.2.	口輪筋筋線維を構成するミオシン重鎖の加齢変化	28
3.4.	考察	29
終章	総括	30
	参考文献	33
	謝辞	39
	索引	40

略語一覧

SSE:	stratified squamous epithelium
DEJ:	dermo-epithelial junction
ECM:	extracellular matrix
HAS:	hyaluronan synthase
CEMIP:	cell migration inducing hyaluronidase 1
MYH:	myosin heavy chain
HE:	hematoxylin and eosin
ILM:	intraoral labial mucosa
CD:	cluster of differentiation
PBS:	phosphate buffered saline
MT:	Masson's trichrome
EVG:	Elastica van Gieson
HABP:	hyaluronan-binding protein
HYAL:	hyaluronidase
IgG:	immunoglobulin G

口唇用語一覧

赤唇 (せきしん):	一般に唇と呼ばれる口唇の体表側の赤い部分 (英:vermilion)
口唇 (こうしん):	赤唇を含む口の周囲の組織 (英:labium oris)
口腔口裂 (こうくうこうれつ):	上下の赤唇の間の開口部 (英:rima oris)
鼻唇溝 (びしんこう):	鼻の側面から赤唇の外側を通るハの字型の皮膚の溝。ほうれい線 (英:nasolabial fold)
頤唇溝 (おとがいしんこう・いしんこう):	下赤唇と顎の先端の中間部の窪み (英:sulcus mentolabialis)
白唇 (はくしん):	口唇の皮膚と同じ外観を有する部分 (英:white lip)
唇紅縁 (しんこうえん):	赤唇と白唇の境界を縁取る部分 (英:vermilion border)
口唇粘膜 (こうくうねんまく):	口唇の赤唇より口腔内側の粘膜部分 (英:labial mucosa)
口輪筋 (こうりんきん):	口唇内に存在する表情筋の一種 (英:orbicularis oris muscle)
粘膜重層扁平上皮 (ねんまくじゅうそうじょうひ):	粘膜細胞が数層重なり合って形成される表面の組織 (英:mucous membrane)
口唇腺 (こうしんせん):	口唇の口腔側に存在する唾液や皮脂を分泌する混合腺 (英:glandulae labiales)
唇交連 (しんこうれん):	上赤唇と下赤唇の接合部。口角 (英:labial commissure)
上口唇結節 (じょうこうしんけつせつ):	上赤唇の中心にある左右上赤唇の結合部 (英:tuberculum labii superioris)

緒言

一般に唇と呼ばれる部位は医学用語で赤唇といわれる。赤唇は各人の表情や個性を構成する重要な部位として、美容や心理、認知分野での研究対象として関心が高い。そのため、外観的な特徴や非侵襲的な計測による研究報告は多く、加齢に伴う変化に関する報告もある。しかしながら、組織学的な研究報告は極めて少なく、とりわけ加齢に伴う組織変化の報告はほとんど認められない。この組織学的な情報の欠如は、赤唇の加齢変化を理解し、その変化に対する有効な対抗措置を開発する上で障害となる。本研究では、この認識に基づき、赤唇の加齢変化の概要を解明するための組織学的研究を実施した。

口唇の構造

口唇は口腔口裂周辺の器官で、鼻唇溝付近を水平方向の境界、鼻の下部を上側の境界、口裂と下顎先端との中間位にあたる頤唇溝を下側の境界として皮膚と連続している。大きく3部位に分類され、口裂部から離れた部位で皮膚と酷似した外観の白唇、一般に唇と呼ばれる、唇紅縁に囲まれた口裂部に向けての赤みを帯びた外観の赤唇、そして口腔側の口唇粘膜に分けられる(図1)。

組織は、中心に口輪筋が存在し、白唇は皮膚同様に角層・表皮・真皮・皮下脂肪の四層構造で、汗腺や脂腺、毛包などの付属器が存在する。口唇粘膜は、粘膜重層扁平上皮・真皮・皮下脂肪の三層構造で、口唇腺と呼ばれる唾液腺が多い。白唇と口唇粘膜の間の赤唇は皮膚と粘膜の移行部とみなされる。しかし、角層の層数が頬の皮膚と同等¹⁾であったり、角層の厚さが頬の皮膚より厚い²⁾にも関わらず、角層水分量や経皮水分蒸散量が皮膚に比べて多い²⁾ことや、赤唇の上皮である重層扁平上皮(stratified squamous epithelium:SSE)に含まれるケラチン分子種や分化マーカータンパク種の発現が、皮膚とも口腔粘膜とも異なる赤唇独自の特徴を有する³⁾こと、また、赤唇断面の組織像が、角層・SSE・真皮の三層構造で皮下脂肪層を認めないこと、真皮に突入した上皮細胞層であるrete ridgesは、口唇粘膜ほどではないものの皮膚よりも発達している³⁾こと、また、付属器が少ないことといったように、白唇とも口唇粘膜とも異なる組織である。

この赤唇は齧歯類などの他の哺乳類ではほとんど目立たず、シシバナザル属の一部の種(Rhinopithecus strykeriなど)を例外として、大半の霊長類においても口裂間際まで有毛の皮膚が観察され、常時外観から赤唇の目立つ種類は少ない。このことから、赤唇は、特にヒトにおいて顕著に発達した、ヒト特有の器官ともいえる。

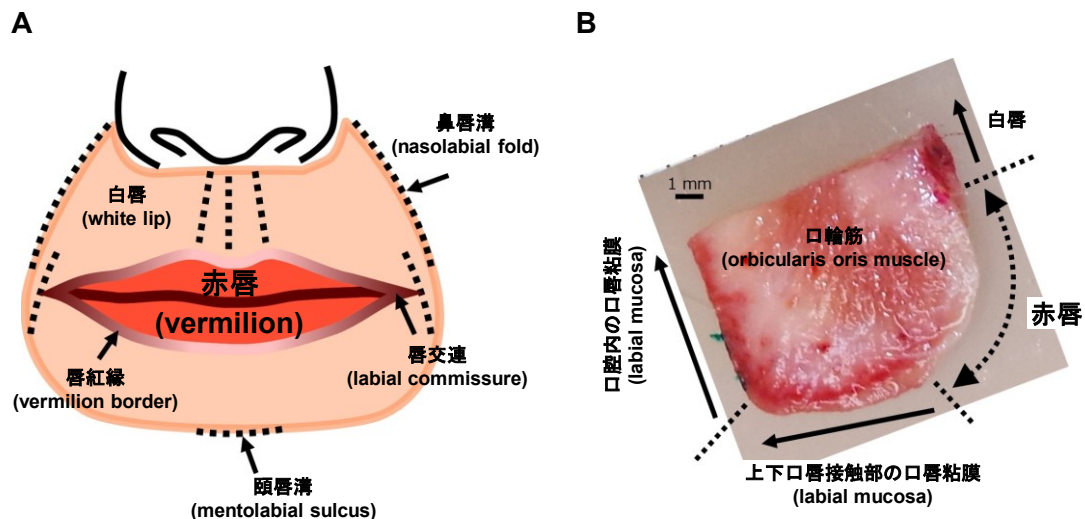


図1 赤唇

(A) 口唇の模式図。医学的には口唇は、鼻唇溝を水平方向の境界、鼻の下部を頭頂側の境界、頤唇溝を首側の境界とした一帯の組織である。外観が皮膚に見える部分が白唇、口裂部周囲に存在する赤みを帯びた外観の部分が赤唇であり、上下の赤唇は唇交連で結合する。(B) 摘出した上赤唇組織の断面。皮膚表面を赤色、口腔内の口唇粘膜表面を緑色に染色してある。断面中心に存在する口輪筋を境に、顔面表面側に白唇と赤唇が存在し、口腔側は口唇粘膜である。図の組織試料では、上下の口唇が接触していた部分は口唇粘膜部であるが、献体により上下の口唇が接触する部分に赤唇部が含まれる組織も存在する。スケールバー: 1 mm。

赤唇と印象形成との関係

赤唇は下部顔面の中央に位置し、明らかに周囲と異なる色で突出しているため、他者から容易に知覚される。そのため、対面コミュニケーションに重要な要素である「見た目の印象」に影響を及ぼすと考えられ、美容や心理、認知分野にて研究対象として着目されている。赤唇の状態と印象形成についての概要を表 1 にまとめた。赤唇が印象に与える影響として、写真やコンピュータグラフィック、ヒト生体を用いた研究から、赤唇の赤みの強さが、単なる明るさのコントラストによる古典的な錯覚とは異なる様式で、頬色を明るく判断させること⁴⁾や、赤唇の赤みを強くすることで他者から評価される魅力度を増加させること^{5,6)}といった、赤みと見た目の印象との関係が報告されている。赤唇の形態や位置と見た目の印象との関係についても研究報告が多く、正面顔での、赤唇の縦幅の減少に伴う魅力度の低下⁷⁾や、縦幅増加による審美的評価の改善^{7,8)}、上下の赤唇の縦幅の比率の違いが魅力度に与える影響^{9,10)}、側面顔での赤唇の突出度と魅力度との関係¹¹⁻¹³⁾、また、日本人に好まれる赤唇の位置¹²⁾といった研究が報告されている。

さらに、他者から評価される魅力の印象だけでなく、年齢の印象に対しても赤唇の影響は大きく、Nkengne らによる、見た目年齢評価と Visual Analog Scale (VAS) 評価を用いた顔面のパーツ毎の印象評価との関係の研究¹⁴⁾にて、見た目年齢への相対寄与率の最も大きい因子として赤唇のボリューム感 (約 12%) が報告されている。

このように赤唇の色や縦幅、ボリューム感が見た目の印象の形成や見た目年齢の評価結果に影響することから、様々な色の口紅や、体積を増大する目的での自己脂肪細胞やヒアルロン酸の注入¹⁵⁻²⁰⁾に代表されるような、化粧品、美容医療分野を主とした臨床的取り組みがなされている。

表 1 赤唇の状態と印象との関係の代表例

項目	変化の方向	印象への影響
色調	明度 (L*) の低下	頬部肌色の明るさ判断の増加 ⁴⁾ 魅力度の増加 ⁵⁾
	赤み (a*) の増強	頬部肌色の明るさ判断の増加 ⁴⁾ 魅力度の増加 ^{5,6)}
	黄み (b*) の増強	魅力度の増加 ⁵⁾
表面 形態	縦幅の増加 (厚くする)	魅力度の増加 ^{7,8)} (顔の下 1/3 部分の面積の 9.6%まで)
	縦幅の減少 (薄くする)	魅力度の低下 ⁷⁾
	上赤唇と下赤唇の厚さ比率の変化	1:1~1:1.25 で高い魅力度 ^{9,10)}
立体 形態	全体の突出の増加	顔型により魅力度の低下 ^{11,12)}
	上赤唇と下赤唇の突出比率の変化	評価者年代によっては、やや突出した上唇で魅力度が増加 ¹³⁾

本研究の目的と内容

上述のとおり、見た目の印象に影響を及ぼす赤唇であるが、その一方で、組織学的解析の報告は非常に少ない。研究の基盤情報となる組織レベルの知見が乏しいことは、赤唇の加齢変化の原因解明研究や、赤唇の加齢変化に対抗するエビデンスに基づいた手段の開発にあたっての障害である。そこで本研究では、情報の不足している赤唇組織の加齢変化の概要を明らかとし、研究基盤となる情報を追加することを目的とした。

本論文では、序章にて研究の背景となる赤唇の加齢変化についての既知情報を記した後、第 1 章に、外観上の赤みに影響する可能性から研究対象として選定した血管と、血液の色が外観に到達して色として認識されるまでの必須通路となる SSE に着目した研究の結果として、加齢に伴う赤唇真皮内の血管の減少と真皮-上皮接合部 (dermo-epithelial junction: DEJ) の平坦化を記した。続く第 2 章では、形態に影響を及ぼす組織と仮定した真皮に含まれる細胞外結合組織 (extracellular matrix: ECM) を研究対象とし、真皮 ECM のうち、量的・体積的に豊富な、膠原線維、弾性線維およびヒアルロン酸の 3 種に着目した研究の結果である、加齢に伴う膠原線維の減少と形態悪化とヒアルロン酸の減少、そして、これらの減少に関与する分子の候補として見出された、I 型プロコラーゲンとヒアルロン酸合成酵素の 1 種である hyaluronan synthase (HAS)

1の減少、ヒアルロン酸分解酵素の1種である cell migration inducing hyaluronidase 1 (CEMIP) の増加を記した。さらに、第2章の研究にて真皮の厚さと年齢の間に相関関係が認められなかったことから、第3章として、赤唇内で大きな容積を占める口輪筋の赤唇部への侵入部分を、真皮に代わる赤唇の体積に影響を及ぼす組織として推察した研究の成果である、加齢に伴う口輪筋内の筋線維の減少と、筋線維を構成するミオシン重鎖の一種である、myosin heavy chain (MYH) 2 と MYH7 の減少について記した。

本研究の成果は、赤唇の老化研究に対して新知見を提供するものである。今後、本研究の成果を基礎とした加齢変化の原因解明研究や対抗手段の開発研究により、赤唇外観の加齢変化の改善や治療、さらには、より魅力的な赤唇を導く手段の検討といった、基礎医学研究や、美容・医療分野への展開が期待される。

序章 赤唇の加齢変化

赤唇は見た目では評価される年齢に対して相対寄与率の大きい因子であると同時に、実年齢を目的変数とした際にも相対寄与率が大きく、様々な顔面の形状の中で、赤唇のボリューム感や上赤唇のシワへの評価結果が実年齢に対する相対寄与率の上位に位置づけられている¹⁴⁾。このことから、実年齢の進行に伴い、赤唇の形状・状態も変化すると考えられる。この序章では、赤唇の色調・形態・物性に関する加齢変化と、赤唇組織の加齢変化のそれぞれについての、主として非侵襲的な計測研究による先行研究の結果をまとめるとともに、考察を加えた。

序章.1 加齢による赤唇色調の変化

赤唇は顔面の他の皮膚とは異なる赤みのある色調を呈し、その赤みや明度は頬部皮膚の明るさ認知⁴⁾や他者からの魅力度印象に影響を及ぼす^{5,6)}。この赤唇の赤みと明度は加齢に伴い変化し、赤み (a*)^{21,22)}、明度 (L*)²¹⁻²³⁾の双方に加齢に伴う低下が報告されている (表 2)。一方で黄み (b*)には加齢変化は認められていない^{21,22)}。このような色調の加齢変化と印象に関する報告を合わせて考えると、加齢により赤唇は赤みのない暗い色調となり、頬部までも暗く感じさせたり、他者からの外観上の魅力度の評価を低下させたりすることが示唆される。すなわち、加齢に伴い、赤唇の色調は印象形成に負の影響を与える方向で変化すると考えられる。

色調変化に影響する要素では、色と同様の変化を示す吸光度からの計算ではあるものの、加齢に伴う紅斑インデックスの低下²¹⁾が報告されている。また、血流の減少²²⁾も報告されており、ここから、加齢に伴う赤みの低下が血管系に生じた変化に起因する可能性が推察される。加えて、メラニンインデックスの加齢に伴う増加²¹⁾や、メラニン産生細胞であるメラノサイトの加齢に伴う増加²⁴⁾も報告されており、メラニンの増加による暗色化が加齢に伴う明度低下の要因と考えられる。

この加齢に伴う明度低下は、高齢者であっても女性ホルモン補充療法を1年以上継続している群では認められないとの報告²³⁾があり、閉経後の女性ホルモンの低下から引き起こされる何らかの体内変化が、赤唇の明度低下に影響を及ぼすと考えられる。

表 2 赤唇の色調に関するパラメーターの加齢変化

項目	加齢変化	文献
赤み	下赤唇の a*値は年齢 ^a と負に相関	Tamura E et al., 2018 ²¹⁾
	上赤唇の a*値は年齢 ^b で低下	Kim H et al., 2019 ²²⁾
	下赤唇の a*値は、20代と比較して50代、60代で低値、また、30代と比較して50代で低値	
明度	下赤唇の L*値は年齢 ^a と負に相関	Tamura E et al., 2018 ²¹⁾
	上赤唇の L*値は年齢 ^b で低下	Kim H et al., 2019 ²²⁾
	下赤唇の L*値には年代との有意な関係無し ホルモン補充療法未実行の閉経後女性群 (平均 54.6 歳) の下赤唇の L*値は、若齢群 (平均 28.3 歳) や閉経前群 (平均 48.0 歳)、ホルモン補充療法実施群 (平均 53.3 歳) よりも低値	Caisey L et al., 2008 ²³⁾
黄み	下赤唇の b*値に年齢 ^a との相関は認められない	Tamura E et al., 2018 ²¹⁾
	上下赤唇の b*値に年齢 ^b との有意差は認められない	Kim H et al., 2019 ²²⁾
血液	下赤唇の紅斑インデックスは年齢 ^a と負に相関	Tamura E et al., 2018 ²¹⁾
	下赤唇の血流量は20代と比較して40代、50代、60代で低値	Kim H et al., 2019 ²²⁾
メラニン	下赤唇のメラニンインデックスは年齢 ^a と正に相関	Tamura E et al., 2018 ²¹⁾
	下赤唇のメラノサイト数は年齢に伴い増加 ^c	Mitsuhashi Y et al., 1991 ²⁴⁾

a: 16~78歳での検討、b: 20~69歳での検討、c: 0~85歳での検討

序章.2 加齢による赤唇の形態変化

赤唇の形態的な加齢変化を表 3 にまとめた。形態的な解析では、赤唇中央の上下の距離である縦幅に関しての報告が特に多く、上下の赤唇を合計した縦幅の加齢に伴う減少が、直接計測²⁵⁾や写真を用いた計測^{26, 27, 28)}、シリコンキャストを用いた 3 次元計測²⁹⁾、立体写真計測³⁰⁾にて共通に認められている。上下の別では、上赤唇の縦幅には、加齢に伴う減少の報告^{26, 28-31)}がある一方で、有意な変化はないとする報告^{22, 27)}も認められ、統一された結論は得られない。一方、下赤唇の縦幅には、全ての報告で加齢に伴う減少が認められている^{22, 26-31)}。上赤唇の縦幅の加齢変化の報告間での違いは、測定法の違いや被検者数、白人とアジア人といった人種の違いに由来している可能性もあり、今後のさらなる検討が望まれる。しかしながら、上赤唇の縦幅に有意な加齢減少を認めない報告においても、高齢者の値は若齢者に対して低値であり^{22, 27)}、上赤唇の縦幅は加齢に伴い減少傾向にあることが示されている。この上赤唇での縦幅の減少傾向と下赤唇での有意な縦幅の減少は、縦幅での解析のみならず、面積での解析でも同様の結果^{26, 29, 32)}が報告されている。このように、加齢に伴い上下の赤唇で縦幅は減少し、その減少は上赤唇では比較的緩和で、下赤唇ではより確実な減少であること、また、上下赤唇の減少が合わさることで、減少の印象がより強まることが知られている。緒言にて記したとおり、赤唇の縦幅の低下は魅力度の印象を低下させるため、加齢に伴い赤唇の形態は印象形成に負の影響を与える方向で変化すると考えられる。

縦幅の変化に加えて、赤唇の厚さ^{26, 28, 32, 33)}や体積^{14, 22, 29, 32)}の加齢に伴う減少も測定法の異なる複数の研究から同様の傾向が報告されている。加齢に伴う縦幅の減少と体積の減少の報告を総合すると、上赤唇の外観露出部形態の加齢変化は、下赤唇に比較して小さいと考えられる。

また、他の形態では、赤唇の横幅や赤唇表面のシワについても報告がある。赤唇の横幅（唇交連間の距離）については、Doll らの年代間比較²⁷⁾で有意な差が認められていないものの、それ以外では加齢による増加が報告されている^{22, 26, 28, 31)}。上赤唇のシワに関しては、Nkengne らによる上赤唇のシワの多さと深さを総合した VAS 評価の結果が実年齢との関係が深いとの報告¹⁴⁾と、Lévêque らによる被検者を直接観察したシワの数の増加²⁵⁾の報告がある。その一方で、計測的な検討では、上下赤唇での表面の粗さパラメーターである Ra の加齢による減少²²⁾や、下赤唇での縦ジワの数の減少、シワの間隔の増加、深さの減少³⁴⁾といったシワが目立たなくなる方向での変化も報告されている。このように、赤唇のシワに関しては、報告間で逆方向の加齢変化が認められている。この違いについて明らかとするためには、計測パラメーターと評価者の印象との関係に対する今後のさらなる検討が必要と考えられる。

序章.3 加齢による赤唇の物性や機能の変化

色や形態に加えて、物性や機能的な性質についても加齢変化が報告されている（表 4）。物性の加齢変化では、cutometer を用いた測定にて、Uf 値の年齢に伴う増加が認められる一方で、Ur/Uf には加齢変化は認められない報告²¹⁾と、ballistometer を用いた測定での、加齢に伴う alpha 値の増加²³⁾の報告がある。このように、吸引による引っ張り変形の最大伸展量であり、赤唇が伸びやすくなっていることを示す cutometer の Uf 値が増加し、引っ張り変形後の回復を示す戻り率を示す Ur/Uf に加齢変化が認められないこと、運動エネルギーの減衰されやすさを示す跳ね返りの減衰速度で、弾力性に反比例する値である、ballistometer の alpha 値が増加することから、加齢に伴い赤唇が柔らかくなることが示されている。

機能的な観点では水分に関する研究が多く、赤唇の乾燥スコアの年齢相関が報告されている²⁵⁾。測定研究からは、経皮水分蒸散量について加齢による減少^{21-23, 34, 35)}が報告されている。乾燥状態との強い関連が推測される角層水分量については、Tamura らにより加齢に伴う増加²¹⁾が報告されている一方で、Caisey らは高齢者と若齢者の間に差はない²³⁾と報告し、Kobayashi らも年齢との相関は検出されない³⁵⁾と報告しており、一致を認めない。詳細には、Tamura らの報告²¹⁾での有意な角層水分量増加は、10 代に対する 60 代および 70 代での増加での増加と、50 代に対する 70 代での増加であり、Caisey らの若齢群と高齢群での群間比較²²⁾に相当する 20~30 代と 40 代後半~50 代の間は、Tamura らの報告²¹⁾においても同等の値である。それぞれの報告で測定法、対象の年代、人種の違いもあり、その違いが加齢変化の有無に反映された可能性もあるが、統一された明白な違いが認められていないことから、赤唇の角層水分量の加齢変化は緩和で、加齢以外の要素の影響によってマスクされている可能性も考えられる。

さらに、触覚についても加齢変化の報告があり、赤唇表面に物理的接触を行った際に感知できる 2 点間の最短の距離は加齢で有意に長くなり^{23, 36)}、また、物理的な接触を感じる押し込みの深さが深くなる³⁶⁾。このように加齢により赤唇の触覚機能は低下することが知られている。

表 3 赤唇の形態に関するパラメーターの加齢変化

項目	加齢変化	文献
縦幅 (高さ)	上下赤唇合計の高さは年齢 (20~80 歳) と負に相関	Lévêque J-L et al., 2004 ²⁵⁾
	上赤唇、下赤唇とも年齢 (5~83 歳) と負に相関	Iblher N et al., 2008 ²⁶⁾
	上下赤唇合計、上赤唇、下赤唇のいずれにおいても年齢 (4~73 歳) と負に相関	Sforza C et al., 2010 ³¹⁾
	上赤唇、下赤唇とも、高齢群 (45~65 歳) で若齢群 (21~34 歳) に比較して低値	Gibelli D et al., 2015 ²⁹⁾
	下赤唇は高齢群 (平均 58.0 歳) で若齢群 (平均 27.4 歳) に比較して低値、 上赤唇には高齢群と若齢群の間に有意差無し	Doll C et al., 2016 ²⁷⁾
	上赤唇は年齢 (20~69 歳) との有意な関係無し、下赤唇は 20 代、30 代と比較して 60 代で低値	Kim H et al., 2019 ²²⁾
	上下赤唇合計、上赤唇、下赤唇のいずれにおいても年齢 (16~78 歳) と負に相関、上下赤唇の比は不変	Yasumori H et al., 2019 ²⁸⁾
	上下赤唇合計は 20 代、30 代と比較して 50 代で低値、20 代と比較して 40 代で低値、 上赤唇は 20 代、30 代、40 代と比較して 50 代で低値、下赤唇は 20 代、30 代と比較して 50 代で低値	Chong Y et al., 2020 ³⁰⁾
厚さ	上赤唇の赤唇縁表面から口唇粘膜の間の厚さは高齢群 (65~80 歳) で若齢群 (25~35 歳) に比較して低値	Iblher N et al., 2008 ²⁶⁾
	上赤唇、下赤唇ともに、表面から口腔粘膜間の厚さは年齢 (21~65 歳) と負に相関	De Menezes M et al., 2011 ³²⁾
	上赤唇の突出は 20 代、30 代と比較して 40 代、50 代、60 代で低値、 下赤唇では年齢 (20~69 歳) との有意な関係無し	Kim H et al., 2019 ²²⁾
	上赤唇の赤唇縁の厚さは高齢群 (65~79 歳) で若齢群 (20~30 歳) に比較して低値	Ramaut L et al., 2019 ³³⁾
	下赤唇の膨らみは年齢 (16~78 歳) と負に相関	Yasumori H et al., 2019 ²⁸⁾
体積	上赤唇、下赤唇ともに体積と年齢 (21~65 歳) との間に相関無し	De Menezes M et al., 2011 ³²⁾
	下赤唇の体積は高齢群 (45~65 歳) で若齢群 (21~34 歳) に比較して低値	Gibelli D et al., 2015 ²⁹⁾
	赤唇の体積は実年齢との関係式への寄与率の最上位項目	Nkengne A et al., 2018 ¹⁴⁾
横幅 (口幅)	年齢 (5~83 歳) と正に相関	Iblher N et al., 2008 ²⁶⁾
	年齢 (4~73 歳) と正に相関	Sforza C et al., 2010 ³¹⁾
	高齢群 (平均 58.0 歳) と若齢群 (平均 27.4 歳) の間に有意差無し、上唇全体に対する比は減少	Doll C et al., 2016 ²⁷⁾
	20 代は、30 代、40 代、50 代、60 代と比較して有意に低値	Kim H et al., 2019 ²²⁾
	年齢 (16~78 歳) と正に相関	Yasumori H et al., 2019 ²⁸⁾
	20 代は、30 代、40 代、50 代と比較して有意に低値	Chong Y et al., 2020 ³⁰⁾
シワ	上赤唇のシワの数、長さ、深さの総合評価の結果は実年齢との関係式への寄与率の上位項目	Nkengne A et al., 2018 ¹⁴⁾
	上赤唇のシワの数、視認性、総合評価は年齢と正に相関	Lévêque J-L et al., 2004 ²⁵⁾
	赤唇の表面粗さ (Ra) は 20 代と比較して 60 代で低値を示し、60 代で平坦 下赤唇中央のシワの数、深さは年齢 (20~58 歳) と負に相関、シワの間隔は正に相関	Kim H et al., 2019 ²²⁾ Nagase K et al., 1991 ³⁴⁾

表 4 赤唇の物性・機能に関するパラメーターの加齢変化

項目	加齢変化	文献
弾力性	下赤唇の Cutometer の Uf 値 (伸展量) と年齢 (16～78 歳) は正に相関、Ur/Uf (戻り率) に年齢との相関無し	Tamura E et al., 2008 ²¹⁾
	下赤唇の ballistometer の alpha 値 (跳ね返りの減衰速度) は高齢群 (50 代) で若齢群 (平均 28.3 歳) に比較して高値	Caisey L et al., 2008 ²³⁾
乾燥	上、下各赤唇の乾燥スコアは年齢と正に相関	Lévêque J-L et al., 2004 ²⁵⁾
	下赤唇の TEWL は年齢 (20～58 歳) と負に相関	Nagase K et al., 1991 ³⁴⁾
	下赤唇の TEWL は年齢 (21～80 歳) と負に相関	Kobayashi H et al., 2004 ³⁵⁾
	下赤唇の TEWL は高齢群 (50 代) で若齢群 (平均 28.3 歳) に比較して低値	Caisey L et al., 2008 ²³⁾
経皮水分蒸散	下赤唇の TEWL は 50 代以上で 20 代、30 代に比較して低値、40 代は 30 代に比較して低値	Tamura E et al., 2008 ²¹⁾
	上赤唇の TEWL は 50 代で 20 代、30 代に比較して低値、下赤唇では 50 代、60 代は 20 代、30 代に比較して低値、60 代は 40 代に比較して低値	Kim H et al., 2019 ²²⁾
角層水分量	下赤唇のキャパシタンスは 60 代、70 代で 10 代に比較して高値、70 代は 50 代に比較して高値	Tamura E et al., 2008 ²¹⁾
	上赤唇、下赤唇ともに SkinChip の平均グレーレベルに年齢群間の違い無し	Caisey L et al., 2008 ²³⁾
	下赤唇のコンダクタンスに年齢 (21～80 歳) との相関無し	Kobayashi H et al., 2004 ³⁵⁾
触覚	下赤唇の知覚可能な二点間距離は年齢と正の相関	Caisey L et al., 2008 ²³⁾
	上赤唇、下赤唇ともに知覚可能な二点間距離および押し込み深さは高齢群 (66～75 歳群、76～85 歳群) で若齢群 (18～25 歳) に比較して高値	Wohlert AB, 1996 ³⁶⁾

序章.4 加齢による赤唇組織の変化

ここまで示した非侵襲的に明らかとされている赤唇の加齢変化は、赤唇内部の組織変化を反映した現象と考えられる。赤唇組織の加齢変化として、角層の面積の加齢に伴う増大^{35,37)}、20代をピークとした角層中の有核細胞の年齢変化^{34,37)}や有核細胞の角層が検出される被検者の出現率の30代をピークとした年齢変化³⁾が知られている。低侵襲な解析が可能な角層に関しては、このように赤唇においても加齢変化が報告されている。一方、SSEや真皮、付属器、真皮の中に存在する血管や、それら組織中の成分に関しては、序章1に記したメラノサイト数の加齢変化を除いては、PubMed、Google scholar、Elsevier Scopusといった文献データベースを用いた調査からは加齢変化報告を見出すことができない。調査対象組織を赤唇だけでなく口唇全体に拡大することにより、加齢に伴う口輪筋形状の直線化と口輪筋内の筋線維萎縮、上唇の白唇部中央位置を解析部位とした、皮膚と脂肪層のそれぞれの厚さが口唇全体の厚さに対する比率の年代比較^{38,39)}の情報がかりうじて得られるのみで、口唇自体で組織の加齢変化情報が極めて少ないことがわかる(表5)。この情報の乏しさは、年齢比較のない報告でも同様であり、口唇部も測定部位に含む顔面全体の血管パターンの超音波測定による解析⁴⁰⁾、口唇全体における視認可能な大きな動脈の位置の解析⁴¹⁾、白唇や口唇粘膜と赤唇の上皮組織でのケラチン発現パターンの比較³⁾と、角化状態の皮膚との違い⁴²⁾が報告されているのみである。このように、病変部位を例外として、赤唇に関しての侵襲性を伴う組織学的解析からの研究報告は極めて少なく、組織学的な情報が著しく不足している。

表 5 赤唇組織の特徴とその加齢変化

項目	特徴	加齢変化
角層	層数：10層 ¹⁾ 、厚さ：約20 μm ²⁾	—
	ターンオーバー：平均3.5日 ³⁷⁾	—
	角質細胞面積：約785 μm ² ¹⁾	角質細胞面積は年齢(21~80歳)と正に相関 ³⁵⁾ 角質細胞面積は年齢(3~85歳)と正に相関 ³⁷⁾
	角質細胞の形状係数：約0.85 ¹⁾	—
	角層中の有核細胞の割合：—	30代をピークに加齢で減少 ³⁴⁾ 20代の3.3%をピークに加齢で減少 ³⁷⁾
	角層細胞あたりのメラニン顆粒： 約410個 ³⁴⁾	—
SSE	概観：Rete ridgesが皮膚よりも発達、 毛包と汗腺は認めないが脂腺をしばしば 認める ³⁾	—
	ケラチンパターン：基底層から顆粒層に かけてK5/K14が発現、有棘層と顆粒層で はK1/K10が強発現と、皮膚と口腔粘膜の それぞれの発現パターンが混合したパタ ーン ³⁾	—
	分化マーカー：有棘層からloricrinと involucrinが発現、顆粒層ではloricrin とinvolucrinに加え、filaggrinも 強発現し、皮膚とも口腔粘膜とも異なる ³⁾	—
	男性は女性よりメラノサイト数が多い ²⁴⁾	メラノサイト数は加齢に伴い増加 ²⁴⁾
真皮	—	—
皮下	皮下脂肪層：認めない	—
	口輪筋：赤唇内部に先端がカーブして 折れ曲がった状態で存在	赤唇へ侵入する折れ曲がり部分の角度が高齢群 (平均84歳)で増加し若齢群(平均38歳)に 比較して直線状となる ^{38,39)} 高齢者で筋線維が萎縮 ³⁸⁾
附属 器官	血管：上赤唇、下赤唇ともに約78%が 真皮内に存在し、筋肉中に約17%が存在、 下赤唇の正中部分では真皮内血管の比率 が低下し、筋肉中の血管の比率が増加 ⁴¹⁾	—

序章.5 小括

ここまでの序章に示したように、赤唇の色や形態、機能、性質は加齢に伴い変化する。しかしながら、非侵襲的な計測研究による加齢変化に関する報告が増加する一方で、これら変化の根底に存在する、組織内部の加齢変化に関する報告は、僅かに、低侵襲で解析可能な角層での加齢変化^{34,35,37)}、メラノサイト数の増加²⁴⁾が知られるのみである。また、赤唇だけでなく口唇全体を見ても、口輪筋の加齢による形状変化と、上唇の白唇部中央位置での口唇全体の厚さに対する皮膚と脂肪層の厚さの年代比較の報告³⁸⁾が追加されるのみである。このように、現在、赤唇に関する組織学的検討からの情報が著しく不足しており、SSEや真皮、血管等の付属器に関する情報は存在しない。

印象形成や見た目年齢への影響の大きさから、既に化粧品や美容医療を主とした臨床的取り組みが数多い、赤唇の色調や縦幅、体積の加齢変化に対して、効果的な対抗手段の作用点や加齢変化の原因が明らかになっていないばかりか、それらを見出すための原因解明研究の端緒となる基礎的知見すら未だに欠落していることは、赤唇研究における重要な課題である。

第1章 ヒト赤唇の真皮血管および真皮-上皮接合部の加齢変化

1.1. 序論

赤唇の赤みが、顔色を明るく知覚させること⁴⁾や、白人女性の顔の魅力を高めること⁵⁾が報告されている。さらに、実際にヒトを用いて、赤唇の赤みが異性からの魅力評価を高めることが検証されている⁶⁾。このように対人印象および対面コミュニケーションに影響する重要な因子である赤唇の赤みであるが、この赤みは加齢に伴い低下する^{21,22)}。

皮膚においては、外観上の色は、メラニン、血管、カロチノイド^{43,44)}の影響から構成され、赤みは、血管中の酸素結合型ヘモグロビンの存在量の影響を強く受けるとされている⁴⁴⁾。すなわち、赤みは、外部から視認可能な深さに存在する毛細血管の影響により支配されると考えられる。赤唇においても、寒暖差による色変化などの日常経験から、毛細血管が赤みの主要な影響因子であることは容易に推定される。口唇の血管に関連した研究として、Tucunduva MJらによる超音波計測での顔の種々部位の血管パターンのマップ化⁴⁰⁾、Cotofana Sらによる口唇全体の動脈分布⁴¹⁾が報告されている。しかしながら、Tucunduva MJらの報告では、測定装置のプロープの大きさの制限から、上下各口唇の白唇部と頬部内側を測定部位としており赤唇は解析していない⁴⁰⁾。Cotofana Sらの報告は、赤唇を含む研究であるものの、手術時に重要視される肉眼で視認可能な組織深部の大きな動脈のみに焦点が当てられており、外観上の色調に影響すると考えられる体表に近い毛細血管についての言及はなされていない⁴¹⁾。

このように、加齢に伴う赤唇の赤み低下に対して、毛細血管が及ぼす影響を検討する材料となる直接的なエビデンスは無く、未だ不明な点が多い。そこで本章では、赤唇の血管の加齢変化を明らかとするために、各年齢のヒト赤唇を組織学的に解析した。

1.2. 実験材料および実験方法

1.2.1. ヒト赤唇組織

ヒト由来組織の使用は、ポーラ化成工業株式会社の施設内審査委員会の承認後に実施した（承認年月日 2017年6月22日）。27～78歳の白人女性、14例の献体由来のヒト上唇組織試料はObio, LLC (El Segundo, CA) より提供された。各組織試料の保存期間について表6に記す。本研究へのヒト組織試料の提供に先立ち、倫理および適用されるすべての法律、規則、規制をObio, LLCが遵守していること、また、Obio, LLCが各ドナーから書面によるインフォームドコンセントを取得していることを、Obio, LLCに確認した。なお、実験の間、全ての組織試料は、ランダムに割り付けた英数字6桁の識別コードにて識別された。

組織試料の摘出部位は右口角から1 cm 上口唇結節側の部分とし、幅3 mmの大きさで、唇紅縁を超えて白唇部皮膚を含む範囲を、赤唇表面と垂直に口唇粘膜までの全層の厚さで摘出した（図1-1 A, B）。摘出後に、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片のhematoxylin and eosin (HE) 染色観察にて、角層、表皮、毛包、脂腺、皮下脂肪層を含む皮膚と、皮下脂肪層、口唇腺を含む口唇粘膜部の間に存在する赤唇が、摘出前に色素にて表面を染色した赤唇部と一致して検出されることを確認した（図2）。

表 6 上唇組織試料の保存期間

ドナー 年齢	死亡認定後、 組織試料採取までの 保存時間(4℃) ※1	組織試料 凍結方法	凍結から組織学的解析 のための切除までの 保存時間(-80℃) ※2
27	277	アセトン/ドライアイス法	1320
28	247	液体窒素	2976
32	204	アセトン/ドライアイス法	4824
33	94	液体窒素	3480
36	137	液体窒素	2952
45	253	アセトン/ドライアイス法	3504
49	199	液体窒素	1320
55	110	液体窒素	2256
55	82	液体窒素	2280
56	290	アセトン/ドライアイス法	480
64	88	液体窒素	4176
66	183	アセトン/ドライアイス法	4824
68	249	アセトン/ドライアイス法	4152
78	110	液体窒素	7056

※1 検死や剖検などの検査後に採取。

※2 ディープフリーザーにて保管（輸送中はドライアイスを使用）。

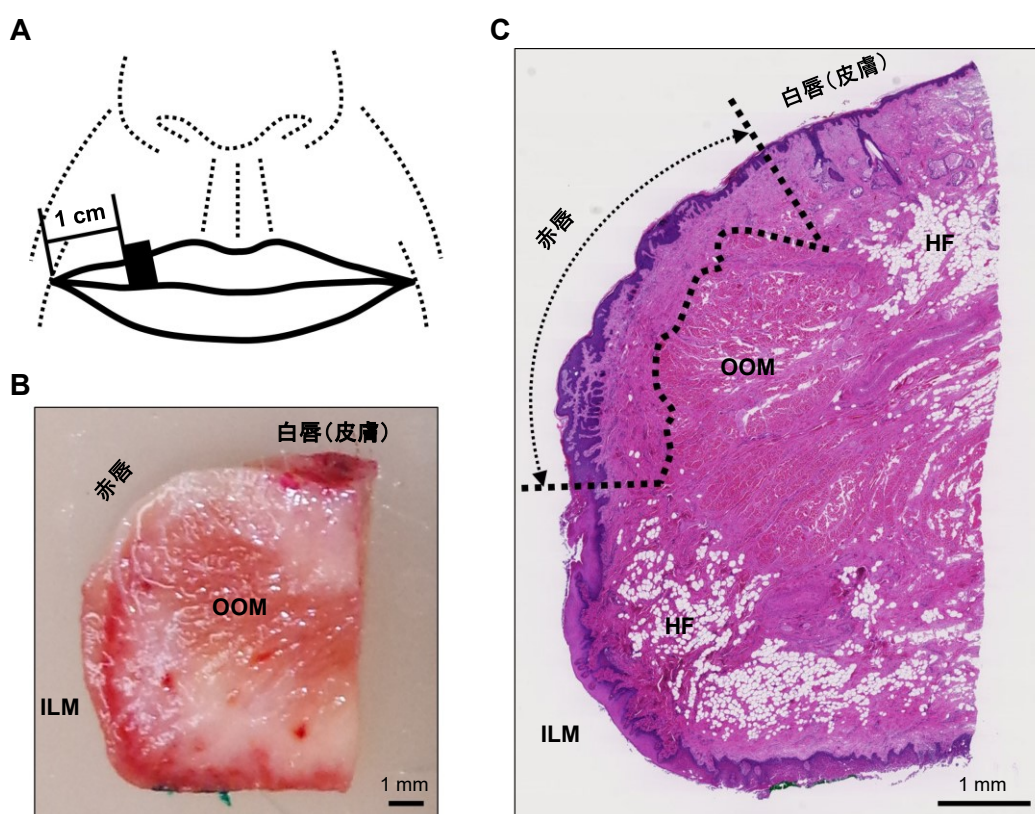


図 2 研究対象とした赤唇組織

(A) 上唇からの組織試料摘出部位。黒四角にて摘出部位を示した。(B) 摘出した上赤唇組織試料の代表例。皮膚表面を赤色色素、口腔内の口唇粘膜表面を緑色色素でそれぞれ染色。OOM：口輪筋、ILM：口唇粘膜 (intraoral labial mucosa)、スケールバー：1 mm。(C) HE 染色の代表例。点線：赤唇の境界、OOM：口輪筋、ILM：口唇粘膜、HF：皮下脂肪、スケールバー：1 mm。なお、全ての組織試料において、赤唇部の真皮と OOM の間に皮下脂肪層は認められなかった。

1.2.2. 抗体

血管の検出には、医療領域での病理診断にて汎用されている血管内皮細胞マーカーである、マウスモノクローナル抗ヒト cluster of differentiation (CD) 31 抗体 (clone JC70A) およびマウスモノクローナル抗ヒト CD34 抗体 (clone QBEnd/10) (いずれも Leica Biosystems, Newcastle, UK) を使用した。分裂細胞の検出には、マウスモノクローナル抗ヒト Ki67 抗体 (clone MM1, Leica Biosystems) を使用した。アイソタイプコントロール抗体および Bond Polymer Refine Detection は、Leica Biosystems より購入した。全ての抗体は使用可能な濃度に希釈済みの ready-to-use 製品を使用した。

1.2.3. 免疫組織化学

摘出した赤唇組織を 10%中性緩衝ホルマリン溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) 中で固定した後、パラフィン包埋した。赤唇表面から鼻方向への矢状に、厚さ 4 μm の切片を作製し免疫染色に供した。免疫染色は、定法にて脱パラフィンと再水和を実施した後、3%過酸化水素水による内因性の peroxidase 活性の失活、10%に希釈した正常ウサギ血清による非特異的なタンパク結合のブロッキングを順次行ない、phosphate buffered saline (PBS) で 5 分間の洗浄を 3 回実施した後、前記の抗体と 4°C で一晩反応させた。再度 PBS 洗浄した後、Bond Polymer Refine Detection を使用して製品のマニュアルに従い反応させた。免疫抗体反応の検出には、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を用いた。また、細胞核を検出するカウンターステインとして、hematoxylin 染色を実施した。

1.2.4. 画像解析

染色標本は NanoZoomer-XR スライドスキャナー (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を用いてデジタル化し、画像解析ソフトウェア WinROOF (Mitani Corporation, Fukui, Japan) にて解析した。CD31 と CD34 の両抗原に対する免疫染色で酷似の染色像が得られたことから、抗 CD31 抗体を用いた免疫染色像を画像解析に用いた。CD31 陽性領域のうち、25 μm^2 を最小の閾値として血管領域を抽出した。赤唇における DEJ から口輪筋の真皮側表面までの間を真皮全層とし、また、DEJ から 200 μm までの深さの真皮部分を真皮上層部として、赤唇領域の真皮の全層および上層部に対して血管の占める面積の割合と血管数をパラメーターとして解析した。

形態に関しては、下記パラメーターを解析した。

- 表面長：SSE の生細胞層の体表側輪郭の長さ (mm)
 - SSE の平均厚さ：SSE の面積を表面長で除算した値 (mm^2)
 - DEJ 長：SSE の真皮側の輪郭 (mm)
 - rete ridge (真皮に侵入する上皮の突起様形態) 発達度：DEJ 長 ÷ 表面長
- また、Ki67 陽性細胞数は、WinROOF の細胞カウント機能を用いて数えた。

1.2.5. 統計解析

全ての統計解析には R package (<http://www.R-project.org>) を使用した。相関解析はピアソンの相関解析を行い、p 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

1.3. 結果

1.3.1. 年齢と真皮血管の関係

赤唇の血管の加齢変化を解明する目的で、CD31 に対する免疫染色像を用いて、真皮全層 (図 3 A-C) および真皮上層部 (図 3 D-F) の血管を解析した。

真皮全層に存在する血管に関しては、真皮全層の面積あたりの血管断面積 ($r=-0.626$, $p=0.017$ 、図 3 G)、および、赤唇表面長あたりの血管断面積 ($r=-0.681$, $p=0.007$ 、表 7) に年齢に対する負の相関を認めた。しかしながら、血管の数は、真皮全層の面積あたり、赤唇表面の長さあたりの、いずれにも年齢との相関を認めなかった (図 3 I、表 7)。一方、真皮上層に存在する血管では、真皮上層の面積あたりの血管断面積 ($r=-0.571$, $p=0.033$ 、図 3 I、表 7) と、赤唇表面の長さあたりの血管断面積 ($r=-0.682$, $p=0.007$ 、表 7) について、真皮全層の血管と同様に年齢との

負の相関を認め、さらに、血管数においても、赤唇表面の長さあたりの血管数に、年齢との負の相関 ($r=-0.716$, $p=0.004$, 図 3 J, 表 7) が認められた。なお、真皮上層の面積当たりの血管数においても、真皮全層の血管数と同様に年齢との相関を認めなかった (表 7)。また、本結果が組織試料保管期間中の劣化による CD31 抗原の抗原性低下に起因するものでないことを確認するために、保存期間 (表 6) との相関を解析した結果、いずれにおいても有意な相関関係は検出されなかったことから、本結果が組織試料の劣化によるものではなく、ドナーの年齢によるものであることが示唆された (表 8)。

以上より、赤唇の真皮中では年齢を通じて真皮全体の血管数は維持されるが、加齢に伴い血管の断面積が小さくなる (血管が細くなる) こと、また、加齢に伴い血管が退縮し、真皮のより上層部にまで達する血管の数が減少することが示唆された。

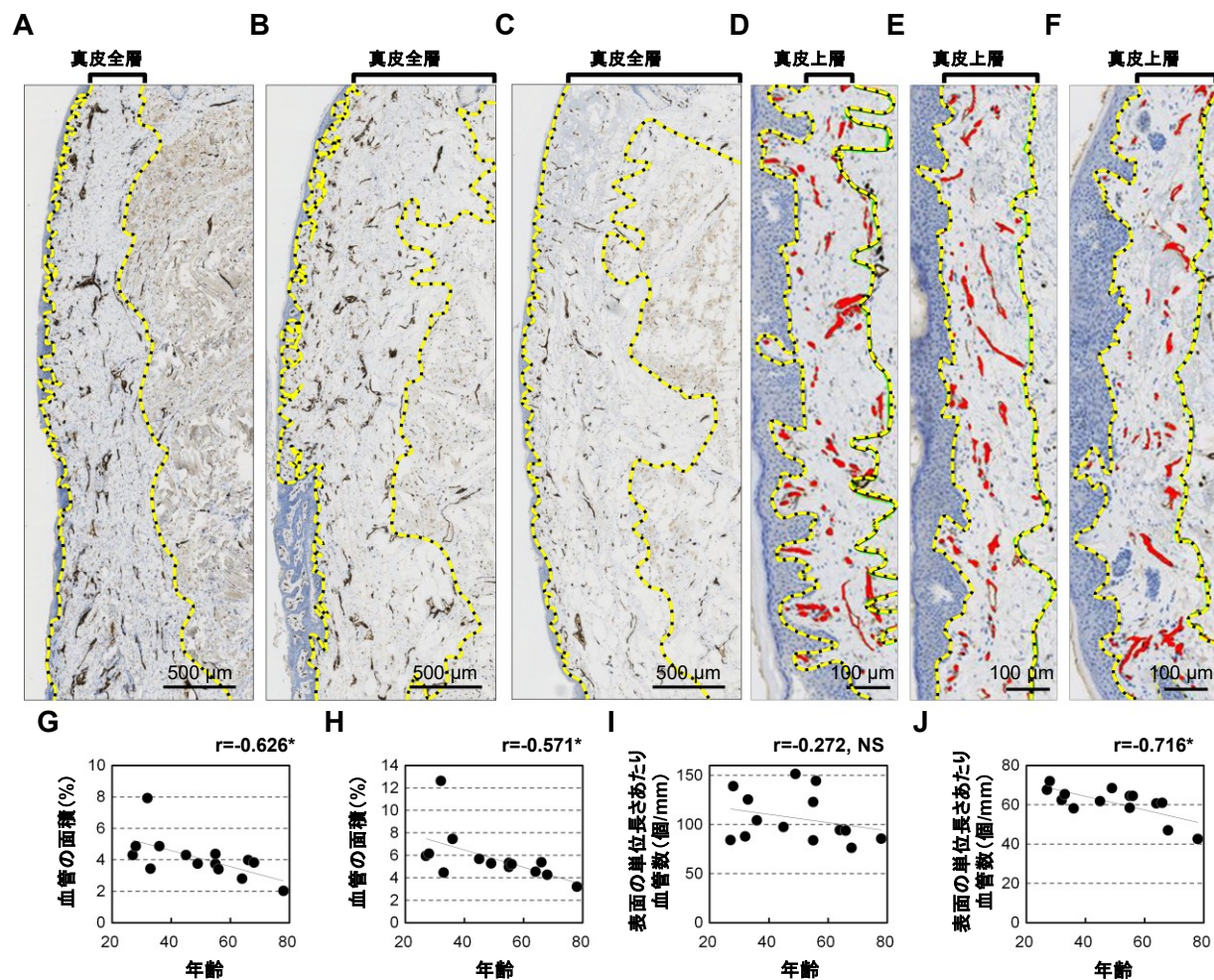


図 3 赤唇真皮の血管の加齢変化

(A-F) 代表的な CD31 抗体免疫染色像。(A-C) 真皮全層の染色像。褐色：CD31 陽性染色部、青：細胞核、献体年齢：28 歳 (A)、49 歳 (B)、64 歳 (C)、黄色点線：真皮の境界線、スケールバー：500 μm。

(D-F) 真皮上層部の染色像。赤：真皮上層部に検出された CD31 陽性染色部、青：細胞核、黄色点線：真皮上層部の境界線、献体年齢：27 歳 (D)、45 歳 (E)、68 歳 (F)、スケールバー：100 μm。(G-J) 代表的なパラメーターと年齢との関係。(G) 真皮全層の血管面積の割合と年齢。(H) 真皮上層部の血管面積の割合と年齢。(I) 表面長あたりの真皮全層の血管数と年齢。(J) 表面長あたりの真皮上層部の血管数と年齢。各 $n=14$, r ：ピアソンの相関係数、*： $p<0.05$ 。

表 7 血管パラメーターと年齢との相関解析結果（ピアソンの相関検定）

パラメーター	相関係数 (r)	p
真皮全層の血管		
血管断面積/真皮全層の面積 (%)	-0.626	0.017*
血管断面積/表面の長さ (%)	-0.681	0.007*
血管数/真皮全層の面積 (個/mm ²)	-0.014	0.963
血管数/表面の長さ (個/mm)	-0.272	0.347
真皮上層 (~200 μm) の血管		
血管断面積/真皮上層の面積 (%)	-0.571	0.033*
血管断面積/表面の長さ (%)	-0.682	0.007*
血管数/真皮上層の面積 (個/mm ²)	-0.349	0.221
血管数/表面の長さ (個/mm)	-0.716	0.004*

n=14, * 有意差あり

表 8 組織試料保存時間と血管染色性の確認結果

項目	死亡認定後から組織試料採取までの保存時間(4℃)		凍結から組織学的解析のための切除までの保存時間(-80℃)	
	相関係数 (r)	p	相関係数 (r)	p
血管断面積 (真皮全層)	0.276	0.340	-0.058	0.845
血管断面積 (真皮上層)	0.215	0.460	0.007	0.981
血管数 (真皮全層)	-0.244	0.401	-0.265	0.359
血管数 (真皮上層)	-0.244	0.400	-0.355	0.213

1.3.2. SSE の形態と年齢の関係

真皮層に存在する血管に到達して反射された光は、SSE を通過して外観に現われる。このことから、SSE の状態も赤唇の色に影響する要素であると考え、SSE の形態を解析した。

その結果、赤唇の表面の長さは、加齢に伴い減少傾向であったものの、有意な変化ではなかった (r=-0.524, p=0.055, 表 9)。SSE の平均の厚さ、および、DEJ の長さについても年齢との相関を認めなかった (表 9)。対称的に、rete ridge 発達度として算出した真皮へ侵入した上皮突起の度合いについては、年齢との負の相関が認められ (r=-0.593, p=0.026, 表 9, 図 4 A-D)、加齢に伴う DEJ の平坦化が示唆された。平均厚さの変化を伴わずに DEJ が平坦化していたことから、加齢に伴い SSE は厚さの多様性を失い、中間的な厚さに均一化している可能性が示唆された。

表 9 SSE の形態パラメーターと年齢との相関解析結果（ピアソンの相関検定）

パラメーター	相関係数 (r)	p
年齢との相関		
a) 赤唇表面の長さ (μm)	-0.524	0.055
b) SSE の平均の厚さ (μm)	-0.403	0.152
c) dermo-epithelial junction の長さ (μm)	-0.404	0.153
d) rete ridge 発達度 (c/a) (AU)	-0.593	0.026*

n=14, * 有意差あり

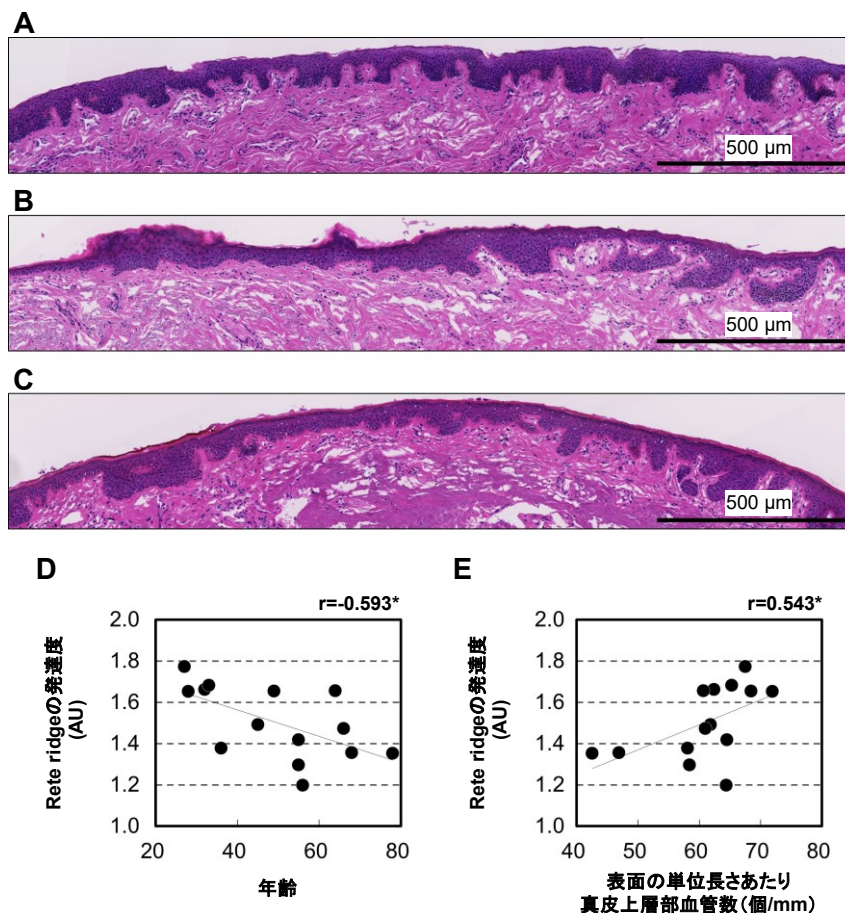


図 4 赤唇の rete ridge 発達度と年齢および真皮上層部血管状態の関係

(A-C) 代表的な HE 染色像。献体年齢：(A) 28 歳、(B) 45 歳、(C) 68 歳、スケールバー：500 μm 。

(D) rete ridge 発達度と年齢との関係。(E) rete ridge 発達度と表面長あたりの真皮上層部に存在する血管の数との関係。n=14、r：ピアソンの相関係数、*： $p < 0.05$ 。

1.3.3. Rete ridges の発達度と真皮血管との関係

Rete ridges の真皮側に位置する真皮乳頭には血管が認められることが多いことから、rete ridge に対する血管の影響が示唆されている⁴⁵⁻⁴⁷。このことから、rete ridge の発達度と血管との関係を解析した。

その結果、rete ridge 発達度と、真皮上層部の血管数を表面の長さ 1 mm あたりに換算規格化した数の間に正の相関 ($r = 0.543$, $p = 0.044$) が認められた (図 4 E、表 10)。しかしながら、真皮全層の血管に対するパラメーターや、真皮上層部においても、血管の断面積、真皮上層部面積あたりの血管数と rete ridge 発達度との間には相関を認めなかった (表 10)。

表 10 Rete ridge 発達度と血管パラメーターの相関解析結果 (ピアソンの相関検定)

パラメーター	相関係数(r)	p
真皮全層の血管		
血管断面積/真皮全層の面積 (%)	0.261	0.368
血管断面積/表面の長さ (%)	0.306	0.288
血管数/真皮全層の面積 (個/ mm^2)	-0.010	0.974
血管数/表面の長さ (個/mm)	-0.011	0.971
真皮上層 (~200 μm) の血管		
血管断面積/真皮上層の面積 (%)	0.331	0.248
血管断面積/表面の長さ (%)	0.285	0.323
血管数/真皮上層の面積 (個/ mm^2)	0.360	0.206
血管数/表面の長さ (個/mm)	0.543	0.044*

n=14, * 有意差あり

1.3.4. Rete ridges の発達度と上皮細胞の増殖との関係

上皮細胞の増殖による上皮の真皮への伸長もまた、rete ridge の形成に寄与すると考えられている⁴⁸⁻⁵¹⁾。そこで、上皮細胞の増殖状態を解析する目的で、細胞増殖が休止する G0 期には検出されないことから細胞増殖マーカーとして汎用されている、Ki67 抗原に対する免疫染色を用いて、SSE の細胞増殖活性と rete ridge の発達度合いとの関係を解析した。

しかしながら、SSE 中の Ki67 陽性細胞の数を、SSE の面積、表面の長さ、DEJ の長さのいずれの値に対して規格化換算した値を解析しても、Ki67 陽性細胞数と年齢や rete ridge 発達度との間に相関は認められなかった (図 5)。

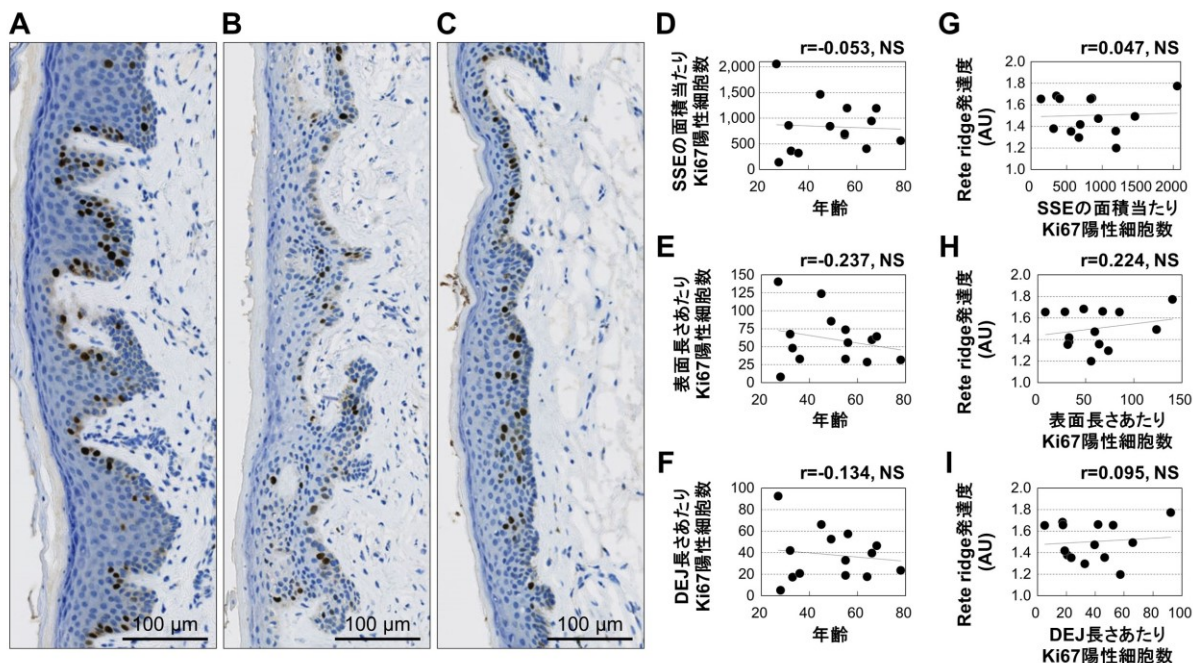


図 5 SSE 中の細胞増殖と年齢、rete ridge 発達度との関係

(A-C) 代表的な Ki67 抗体免疫染色像。褐色 : Ki67 陽性染色部、青 : 細胞核、献体年齢 : 32 歳 (A)、49 歳 (B)、78 歳 (C)、スケールバー : 100 μm。(D-F) Ki67 陽性細胞数と年齢との関係。(G-I) Ki67 陽性細胞数と rete ridge 発達度との関係。(D, G) SSE 面積あたりの Ki67 陽性細胞数でのプロット。(E, H) 表面長あたりの Ki67 陽性細胞数でのプロット。(F, I) DEJ 長あたりの Ki67 陽性細胞数でのプロット。n=14, r : ピアソンの相関係数、NS : 有意差無し。

1.4. 考察

第 1 章では上唇の赤唇の真皮に存在する血管についての解析を行い、加齢による全体的な悪化を明らかとした。具体的には、真皮全層と真皮上層部の双方において、血管断面の面積が加齢に伴い減少すること、真皮全層の血管数や、真皮上層部の面積あたりの血管数に加齢変化はなく、表面の長さに対する真皮上層部の血管数が加齢に伴い減少することを明らかとした。真皮全層での血管数の減少を伴わない断面積の減少から、加齢により赤唇の真皮全体の血管が細くなることが示唆された。また、真皮上層部のみでの血管数減少から、加齢に伴い血管が退縮し、真皮の上層部まで到達する血管の数が減少することが示唆された。

真皮上層部の血管数が減少した赤唇では、真皮上層部での血流低下も生じていると推察される。実際に、Kim らによる先行研究にて高齢者での血流低下²²⁾が報告されており、本研究の結果はこれを支持するものである。一般的に、表面に近い部位の血管系が、外観上の赤みに影響することと併せて考えると、真皮上層部の血管数減少は唇の色へも影響を及ぼすと考えられる。Tamura らによる先行研究²¹⁾では、加齢に伴う唇のヘモグロビンインデックスの減少と赤み (a*) の低下が示されているが、本研究の結果から、真皮上層部の血管数減少がその一因であると考えられる。

表面長あたりの血管数における真皮全層と真皮上層部の間での加齢変化の違いについては、皮膚血管系との類似性が認められる。Li らによる、ビデオキャピラリースコープを用いたループ状血管数の計測と、レーザードップラーフローメーターを用いた血流計測の比較研究⁵¹⁾では、上層部の血管数を反映するループ状血管の数は加齢で減少するのに対し、真皮の中・下層に存在する血管の影響を含む血流計測では加齢による減少は認められず、むしろ増加が認められている。す

なわち、皮膚での血管の加齢変化は、真皮全体の血管の減少ではなく、真皮の浅い部分での血管の減少である可能性が考えられている。このように本研究の上唇の赤唇での真皮上層部の顕著な血管数の減少と類似の真皮上層部の血管数の減少が皮膚でも生じている可能性があるため、本研究の成果は、皮膚の真皮上層と下層での血管の加齢変化の違いに対する研究の参考となると考えられる。皮膚においては、慢性的に光の影響を受ける顔面では、光曝露頻度の少ない股部皮膚とは異なり、加齢に伴い段階的に真皮の血管数や血管断面積が減少する⁵³⁾との報告がある。この変化は、本研究で得られた上唇の赤唇での結果とよく一致している。加えて、赤唇は突出しているため日光曝露されやすいと考えられ、皮膚と同様に光による影響^{54,55)}が生じている可能性が推定される。以上より、本研究にて明らかとした上唇の赤唇真皮での加齢に伴う血管の減少は、生理的な加齢変化に加えて、慢性的な光曝露の影響である光老化を反映したものであると考えられる。

このような赤唇と皮膚の血管の加齢変化の類似性とは逆に、赤唇は加齢に伴い赤みが減少する^{21,22)}、皮膚では加齢とともに赤みが増加する⁵¹⁾。赤唇での加齢による赤み低下と、皮膚での加齢による赤み増加との違いについては、赤唇の加齢変化のみを解析した本研究の結果からの考察は難しいものの、一つの可能性として、赤唇ではそもそもの真皮上層部の血管数が多く、赤みに対する真皮上層部の血管の影響が、真皮の深い部分の血管よりも大きい可能性が考えられる。また、別の可能性として、皮膚で報告されている加齢による真皮下層の血流増加は、赤唇では生じないという可能性も考えられる。この赤唇と皮膚の赤みの加齢変化の不一致に対しては、今後のさらなる検討が必要である。

第1章ではまた、加齢に伴う rete ridges の減少により、赤唇の DEJ が平坦化することも明らかとした。一方、SSE には平均の厚さの変化に加齢に伴う変化を認めなかった。平均の厚さの変化を伴わずに凹凸が無くなることから、SSE は加齢に伴い均一な厚さになると考えられる。これは、最も体表に近い部位まで到達する血管の、体表からの距離が遠くなることを意味しており、DEJ の平坦化もまた、外観から見た赤味の低下の一因として考えられる。また、この rete ridges の発達度合いは、SSE 中の細胞増殖活性と相関せず、真皮上層部の血管数と相関することも明らかとなった。皮膚での先行研究では、表皮の細胞増殖が rete ridges の形成に関わっていると報告されている⁴⁸⁻⁵¹⁾。一方、口唇粘膜での先行研究では、力学的な影響が rete ridges の形成に影響していると報告されている⁵⁶⁾。また、rete ridges の真皮側にあたる真皮乳頭層には血管が検出されることから、真皮上層部の血管もまた rete ridges の形成に寄与していると考えられている⁴⁵⁻⁴⁷⁾。本研究の相関解析により、赤唇においては SSE 中の上皮細胞の増殖よりもむしろ真皮上層部の血管が rete ridges の形成に影響するものと示唆された。さらに、表皮 keratinocytes にて、足場の形状が細胞形態や遺伝子発現に影響すると報告されていることから⁵⁷⁾、rete ridges の減少による DEJ の平坦化が SSE 中の細胞状態に影響を及ぼす可能性も考えられる。

このように、赤唇の血管と rete ridges の加齢変化が明らかとなったが、本研究の結果には考慮すべき点が存在する。第一として、摘出後に凍結された組織を用いた実験であるため、その過程での唇組織全体の変形や、凍結までの間の抗原の分解が生じている可能性が挙げられる。この可能性に対して、本研究では、真皮の面積に対する解析や SSE 表面の長さに対する割合を解析することで、結果に対する全体の変形の影響を緩和させている。抗原の分解に対しては、組織試料保存時間と血管染色性の確認結果(表 8)から、その可能性は低いと考えられる。第二に、組織提供者の詳細な背景情報が入手できず、既往歴、喫煙習慣、日光曝露頻度や食生活といった血管状態に影響しうる交絡因子⁵⁵⁾の影響が排除されていない点が挙げられる。第三は、本研究実施までに入手した 14 例が、結論を一般化させるには十分ではない点が挙げられる。これは、将来の研究により例数が追加されることで解決される。そして、最後に第四の考慮点として、組織切片の免疫染色による解析であることが挙げられる。組織切片の免疫染色は、多分野での長年の実績を有す、信頼性における方法であるが、血管は三次元的に分岐した構造であり、切片での断面解析では検出不可能な変化も生じうるため、血管の形態観察に対しては限界が存在する。この問題に対しては、近年報告の増加している BABB や CUBIC、iDISCO といった組織透明化技術⁵⁸⁻⁶⁰⁾を用いることで、体内側や体表面側から mm 単位での血管の三次元構造を明らかにできると考えられる。しかし、これら組織透明化技術の実験条件検討には、サイズの大きな組織を複数必要とするが、健常人から赤唇という外観上目立つ組織をバイオプシーで得ることは難しいため、実際の実施は困難である。近年、光干渉断層血管撮影や反射共焦点顕微鏡、二光子自家蛍光寿命イメージングといった最新のイメージング技術により、浅い深さまでではあるものの、表面から非侵襲で血管の三次元観察が可能^{45,46,61)}であることが報告されてきた。非侵襲的に赤唇内の血管の三次元観察が可能となることで、生きたヒトを用いた検討が可能となり、ここに列挙した考慮点が解決される。今後、これらの新しい機器の普及により、健常人を用いた、赤唇内の血管と見た目の関係をより明確にするための検討が行われると期待される。

第2章 ヒト赤唇の真皮細胞外結合組織 (ECM) 成分の加齢変化

2.1. 序論

正面から見た赤唇の高さ^{6,7)}や上下の高さの比^{8,9)}が、他者からの魅力度印象へ影響することが報告されているように、赤唇の高さもまた見た目の印象への重要性が認識されている。加えて、種々報告から、加齢に伴う赤唇の縦幅や体積の減少が示されている^{25,28-33)}。加齢による赤唇の縦幅や体積の減少は、唇が薄くなると評され、自家脂肪注入やヒアルロン酸注入などの赤唇を大きくし、縦幅を持たせるための施術が、現在の美容医療の一般的な項目となっている^{15-20,62,63)}。さらには、加齢に伴い赤唇が柔らかくなることも報告されている^{21,23)}。

赤唇は角層・SSEと真皮からなる三層構造であり、真皮はSSEに比べて5倍程度の厚みで観察されることから、赤唇の高さや厚みの変化に対して真皮が影響する可能性が考えられる。しかし、口唇の真皮の厚みに関連した組織学的な先行研究では、白唇の赤唇と鼻下端との中間にあたる部分を測定部位とした研究が³⁸⁾が報告されているのみで、非侵襲的研究^{25,28-33)}にて高さや体積の加齢減少が示されている赤唇についての真皮の組織変化を直接的に示す報告は見つからない。

そこで本章では、赤唇の真皮の加齢変化についての概略を得るために、各年齢のヒト赤唇を組織学的に解析した。研究にあたっては、数多くの真皮構成要素の中から、皮膚の真皮成分での知見を参考に、三次元構造を維持し、剛性を担う主要構造である膠原線維、膠原線維に次いで豊富に存在し、反跳力を持つ性質から弾力性への寄与が大きいと考えられる弾性線維⁶⁴⁾、また、構造体の隙間の間質成分として、最も量の多いグリコサミノグリカンであり、多くの水を包含でき、高い粘性を有する性質から体積と粘性の両方に影響を及ぼす可能性が示唆されているヒアルロン酸⁶⁵⁾、の3種に焦点をあてた。

2.2. 実験材料および実験方法

2.2.1. ヒト赤唇組織

第1章の検討後に追加入手した1例を加えた計15例の白人女性献体(49.2±15.8歳(平均±標準偏差)、27~78歳)由来のヒト上唇組織試料を検討に用いた。全ての組織試料はObio, LLCより提供された。各組織試料の保存期間について表11に記す。また、全ての組織試料は、実験の間、ランダムに割り付けた英数字6桁の識別コードにて識別された。ヒト由来組織の使用は、ポーラ化成工業株式会社の施設内審査委員会の承認後に実施した(承認年月日2017年6月22日)。本試験へのヒト組織試料の提供に先立ち、倫理および適用されるすべての法律、規則、規制をObio, LLCが遵守していること、また、Obio, LLCが各ドナーから書面によるインフォームドコンセントを取得していることを、Obio, LLCに確認した。

組織学的解析には、第1章での検討と同位置である右口角から上口唇結節側に1cm進んだ部位から3mm幅で摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液中で固定後、定法に従いパラフィン包埋した組織を用いた。ヒアルロン酸解析および免疫蛍光染色には、右口角から1.3cm上口唇結節側の部位から3mm幅の組織を摘出し、O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan)に包埋した未固定凍結組織を用いた。

表 11 上唇組織試料の保存期間

ドナー 年齢	死亡認定後、 組織試料採取までの 保存時間(4℃) ※1	組織試料 凍結方法	凍結から組織学的解析 のための切除までの 保存時間(-80℃) ※2
27	277	アセトン/ドライアイス法	1320
28	247	液体窒素	2976
32	204	アセトン/ドライアイス法	4824
33	94	液体窒素	3480
36	137	液体窒素	2952
45	253	アセトン/ドライアイス法	3504
46	217	アセトン/ドライアイス法	5328
49	199	液体窒素	1320
55	110	液体窒素	2256
55	82	液体窒素	2280
56	290	アセトン/ドライアイス法	480
64	88	液体窒素	4176
66	183	アセトン/ドライアイス法	4824
68	249	アセトン/ドライアイス法	4152
78	110	液体窒素	7056

※1 検死や剖検などの検査後に採取。

※2 ディープフリーザーにて保管（輸送中はドライアイスを使用）。

2.2.2. 組織学的解析

パラフィン切片（厚さ 4 μm 、赤唇表面から鼻への矢状方向）を、マッソントリクローム (MT) 染色およびエラスチカワンギーソン (EVG) 染色にて染色し、ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health, Maryland, USA) を用いて画像解析した。MT 染色像に対しては、真皮領域の青色に染色された領域を膠原線維として、真皮の面積に占める染色領域の割合を定量した。EVG 染色像に対しては、真皮領域に対する黒色染色領域の割合を弾性線維関連 ECM の指標として定量した。解析に際して、真皮全層を DEJ から口輪筋の真皮側表面までの間と定義した。また、EVG 染色を用いた解析においては、DEJ から 100 μm までの深さの真皮部分を真皮上層部と定義した。さらに、膠原線維の詳細な形態観察として、MT 染色切片で青色染色された膠原線維を励起波長 615-645 nm および蛍光波長 655-760 nm で蛍光観察した。なお、同部位に存在する赤く染色された膠原線維以外のタンパクや細胞の確認には、励起波長 530-560 nm、蛍光波長 570-650 nm を使用した。

2.2.3. ヒアルロン酸解析

厚さ 8 μm の凍結切片を専用固定液（ホルムアルデヒド溶液 20 mL、エタノール 140 mL、酢酸 10 mL、リン酸緩衝液 30 mL⁶⁾）を用いて、室温にて 10 分間固定した。Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を使用した内在性ビオチンに対する反応のブロッキングと、1%ウシ血清アルブミンを用いた非特異的なタンパク結合に対するブロッキングの後、切片を 1:250 希釈したビオチン化ヒアルロン酸結合タンパク (HABP) (Hokudo, Sapporo, Japan) と、4℃下で一晩反応させた。ビオチン化ヒアルロン酸結合タンパクの可視化は fluorescein isothiocyanate conjugate streptavidin (Vector Laboratories) にて実施した。HABP の結合特異性の確認には、hyaluronidase from *Streptomyces hyalurolyticus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で消化した切片を陰性コントロールとして用いた。蛍光顕微鏡写真の蛍光面積および蛍光強度を ImageJ ソフトウェアを用いた画像解析にて定量した。

2.2.4. 免疫蛍光染色

一次抗体として表 12 の抗体を用いた。各一次抗体のアイソタイプコントロールは、一次抗体を免疫動物に応じて、ラットイムノグロブリン G (IgG) (ab37361, Abcam, Cambridge, UK)、マウ

ス IgG (ab18447, Abcam)、またはウサギ IgG (ab37361, Abcam) のいずれかに置き換えて実施した。二次抗体は、Alexa Fluor 488 標識のヤギ抗ラット IgG (ab150165, Abcam)、ヤギ抗マウス IgG (ab150117, Abcam)、もしくはヤギ抗ウサギ IgG (ab150081, Abcam) を、それぞれの一次抗体の免疫動物に応じて用いた。

免疫蛍光染色は定法に従い、次のとおり実施した。厚さ 6 μm の凍結切片を 4%パラホルムアルデヒド溶液(FUJIFILM Wako Pure Chemical)中で、4°Cにて 3 時間固定し、その後、Target Retrieval Solution (Agilent, Santa Clara, CA) 中に浸漬し、12 時間、60°Cに加温して抗原賦活した。PBS による洗浄後、0.1% Triton-X 100 (Sigma-Aldrich) を含む PBS 中に 10 分間浸し、膜透過性を向上させた。ただし、HAS3、HYAL1、HYAL2 に対する免疫蛍光染色ではこの膜透過性を向上させるステップは実施しなかった。その後、10%正常ヤギ血清 (ab7481, Abcam) での室温、1 時間のブロッキングと、4°C下で 12 時間の一次抗体との反応を行った。洗浄後、二次抗体との反応を室温にて 1 時間実施した。

表 12 免疫蛍光染色に用いた一次抗体の一覧

抗原	抗体種	希釈率	型番	供給元
I 型プロコラーゲン	ラット			
	モノクローナル (clone M-58)	1:100	ab64409	Abcam
III型プロコラーゲン	ウサギ			LifeSpan
	ポリクローナル	1:400	LS-C664143-200	BioSciences, Seattle, WA
HAS1	ウサギ			Atlas
	ポリクローナル	1:200	HPA067602	Antibodies, Stockholm, Sweden
HAS2	マウス			Novus
	モノクローナル (clone 4E7)	1:400	NBP2-37446	Biologicals, Littleton, CO
HAS3	ウサギ			LifeSpan
	ポリクローナル	1:100	LS-B10150-200	BioSciences
CEMIP	ウサギ			Proteintech,
	ポリクローナル	1:25	21129-1-AP	Rosemont, IL
HYAL1	ウサギ			Abcam
	ポリクローナル	1:100	ab85375	
HYAL2	ウサギ			Thermo Fisher
	ポリクローナル	1:50	PA5-24223	Scientific, Waltham, MA

2.2.5. 統計解析

R package を使用してピアソンの相関解析を行い、p 値 0.05 未満を有意差有りと判断した。

2.3. 結果

2.3.1. 膠原線維の加齢変化

赤唇真皮の膠原線維の加齢変化を解明する目的で、MT 染色像を用いた解析を実施した結果、若齢献体由来の赤唇の真皮では膠原線維が密に観察されたが、高齢献体由来の赤唇では膠原線維は疎に観察された (図 6 A)。さらに、赤唇真皮中に占める膠原線維の割合と年齢との間に負の相関 ($r=-0.721$, $p=0.003$) が認められた (図 6 B)。また、MT 染色像の真皮中層を高倍率で蛍光観察した結果、若齢献体由来の赤唇では、規則正しく配列している膠原線維が密に観察されるのに対し、高齢献体由来の赤唇には、太く、不規則な膨れた状態の膠原線維が観察された (図 6 C)。これらの加齢による膠原線維の減少や悪化に、膠原線維を構成するタンパクの産生が関与するかどうかを解析する目的で、I 型プロコラーゲンおよびIII型プロコラーゲンに対する免疫蛍光染色を実施した。その結果、I 型プロコラーゲンは、若齢献体由来の赤唇では真皮乳頭層全体に広く、

皮膚での報告⁶⁷⁻⁶⁹⁾同様のシグナルが認められ、一部は真皮中層にも検出されたが、高齢献体由来の赤唇ではSSE直下に局在したシグナルが認められるのみであった(図6D)。このことから、高齢献体由来の赤唇ではI型コラーゲンの産生が低下しているものと考えられた。一方、III型プロコラーゲンについては、若齢、高齢の両者にてI型プロコラーゲンと同様のSSE直下の強いシグナルが認められたものの、由来献体の年代間における顕著な差異は認められなかった(図6E)。

膠原線維が赤唇の真皮の大部分を占めて観察されることから、真皮体積に対する膠原線維の影響が考えられたため、膠原線維の面積と真皮の厚さとの関係を解析したが、両者の間に相関関係は認められなかった($r = -0.166$, $p = 0.553$, 図6F)。なお、真皮の平均厚さを示すDEJから口輪筋までの平均距離は $534.0 \pm 156.8 \mu\text{m}$ (平均±標準偏差)、SSEの平均厚さを示すSSE表面からDEJまでの平均距離は $93.8 \pm 25.1 \mu\text{m}$ であり、いずれも年齢との相関を認めなかった(図6G)。

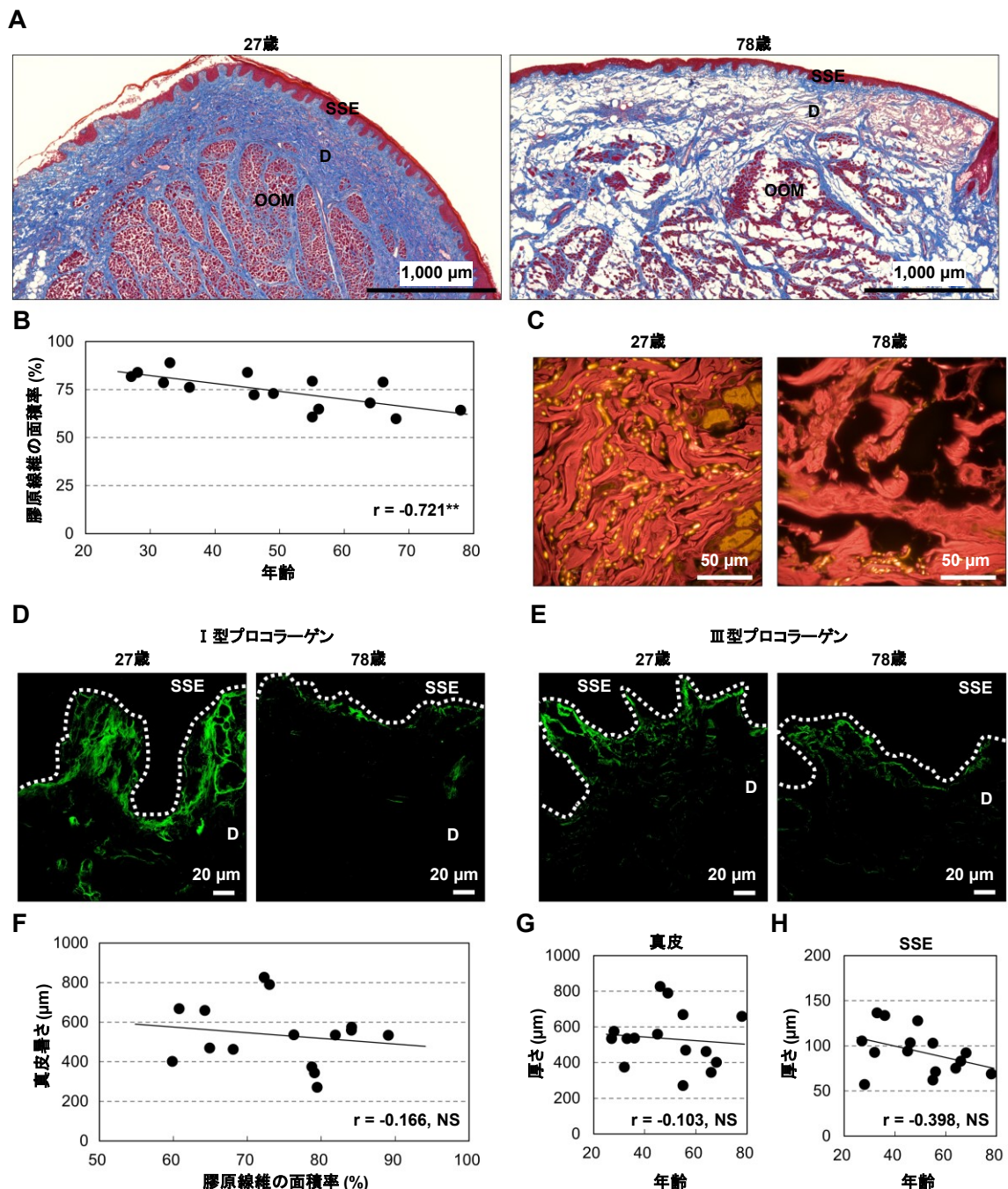


図6 上唇の赤唇の真皮膠原線維とプロコラーゲンの加齢変化

(A) MT染色像。青：膠原線維、褐色：上皮や筋肉のタンパク、スケールバー：1,000 μm 。(B) 真皮中の膠原線維面積の加齢変化。(C) MT染色像の真皮中層部の高倍率蛍光像。赤：膠原線維、黄色：他のタンパク、スケールバー：50 μm 。(D) I型プロコラーゲンの免疫蛍光染色像。(E) III型プロコラーゲンの免疫蛍光染色像。点線：DEJ、スケールバー：20 μm 。(F) 真皮の厚さと膠原線維の割合の関係。(G) 真皮の厚さの加齢変化。(H) SSEの厚さの加齢変化。SSE：重層扁平上皮、D：真皮、OOM：口輪筋、

r ：ピアソンの相関係数、**： $p < 0.01$ 、NS：有意差無し、 $n = 15$ 。

2.3.2. 弾性線維の加齢変化

赤唇の真皮に存在する弾性線維の加齢変化を解明する目的で、EVG 染色像を用いた解析を実施した。その結果、赤唇の真皮中で EVG 染色にて黒色に染色される弾性線維の面積には、年齢との相関が認められなかった ($r=-0.183$, $p=0.513$, 図 7 A)。真皮上層部に存在する弾性線維の末端は加齢で減少しやすい⁷⁰⁾と報告されていることから、DEJ から 100 μm の深さまでの真皮上層部に限定したさらなる解析を実施したが、真皮上層部においても弾性線維と年齢との間に相関は認められなかった ($r=-0.350$, $p=0.200$, 図 7 B)。黒色染色された弾性線維は同世代の献体の間でも大きな個人差を示し、隣接の白唇部皮膚でエラストーシスが同等に観察されることから近傍部位の光暴露が同程度であると考えられるサンプルの間においても、赤唇では弾性線維に個人差が認められた (図 7 C)。

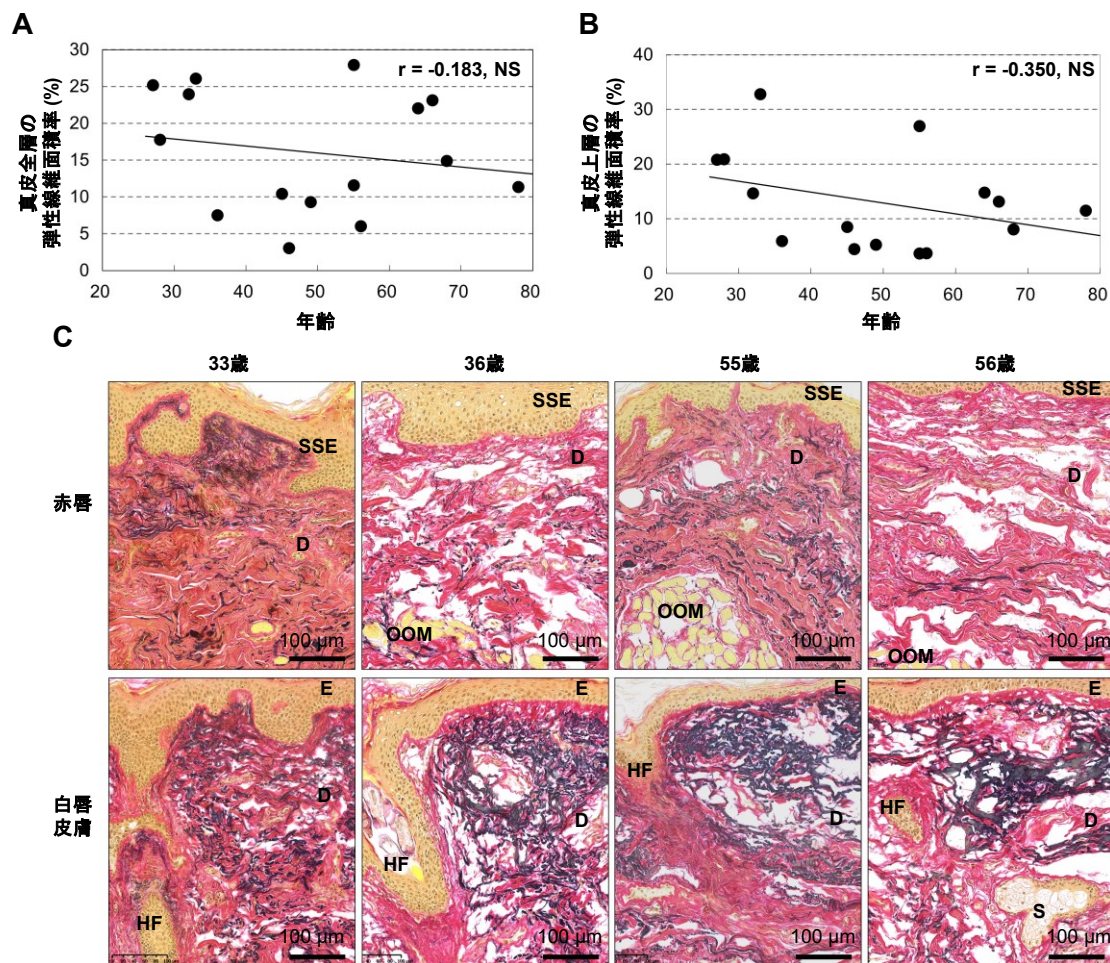


図 7 上唇の赤唇の真皮弾性線維と年齢との関係

(A) 真皮中の弾性線維と年齢との関係。(B) 真皮上層部の弾性線維と年齢との関係。n=15, r: ピアソンの相関係数, NS: 有意差無し。(C) 赤唇および隣接する白唇の EVG 染色の代表例。黒: 弾性線維、赤: 膠原線維および角層、黄色: 上皮や筋肉等のタンパク、D: 真皮、SSE: 重層扁平上皮、OOM: 口輪筋、E: 表皮、HF: 毛包、S: 脂腺、スケールバー: 100 μm 。

2.3.3. ヒアルロン酸の加齢変化

赤唇の真皮に存在するヒアルロン酸の加齢変化を解明する目的で、HABP を用いた組織染色での解析を実施した。高齢献体由来の赤唇と比較して、若齢献体由来の赤唇では、真皮の広い領域に HABP 陽性のシグナルが観察された (図 8 A)。相関解析から、HABP 陽性面積と年齢との強い負の相関 ($r=-0.777$, $p<0.001$) が明らかとなった (図 8 B)。同様に、蛍光強度においても年齢との強い負の相関 ($r=-0.770$, $p<0.001$) が認められた (図 8 C)。

この年齢に伴うヒアルロン酸減少に関与する候補メカニズムを推測するために、3 種のヒアルロン酸合成酵素 (HAS1、HAS2、HAS3) と 3 種のヒアルロン酸分解酵素 (CEMIP、HYAL1、HYAL2) に対する免疫蛍光染色を実施した (図 9)。その結果、ヒアルロン酸合成酵素に関しては、高齢献体由来の赤唇での HAS1 の減少が認められた。しかし、HAS2 では若齢と高齢の間に顕著な差異は認められず、HAS3 は SSE のみに検出された (図 9 A)。ヒアルロン酸分解酵素に関しては、CEMIP では高齢献体における真皮の免疫蛍光が増加して観察されたが、HYAL1 と HYAL2 に関しては若齢と高齢の間に顕著な違いは認められなかった (図 9 B)。

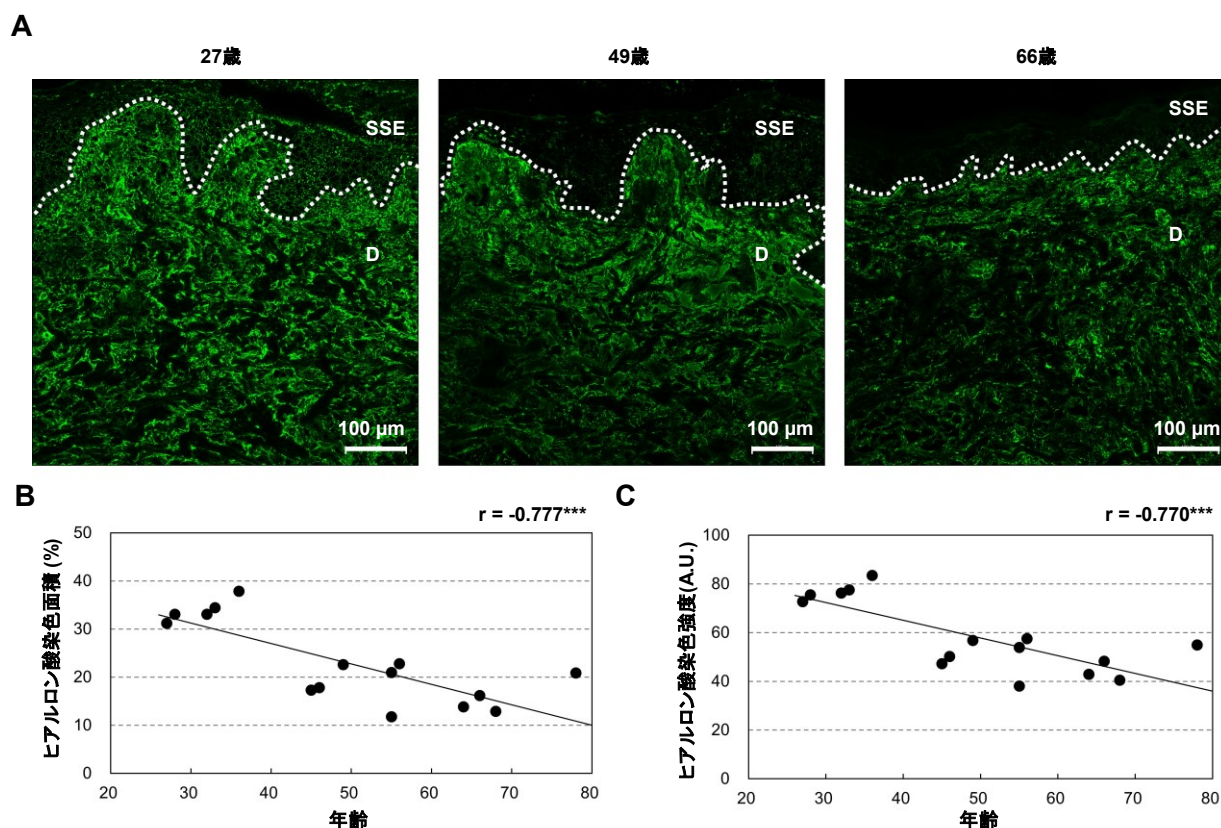


図 8 上唇の赤唇真皮におけるヒアルロン酸の加齢による減少

(A) ヒアルロン酸染色の代表例。緑：ヒアルロン酸、点線：DEJ、D：真皮、SSE：重層扁平上皮、スケールバー：100 μm。(B) 真皮のヒアルロン酸染色陽性面積と年齢との関係。(C) 真皮のヒアルロン酸染色強度と年齢との関係。n=15、r：ピアソンの相関係数、***： $p<0.001$ 。

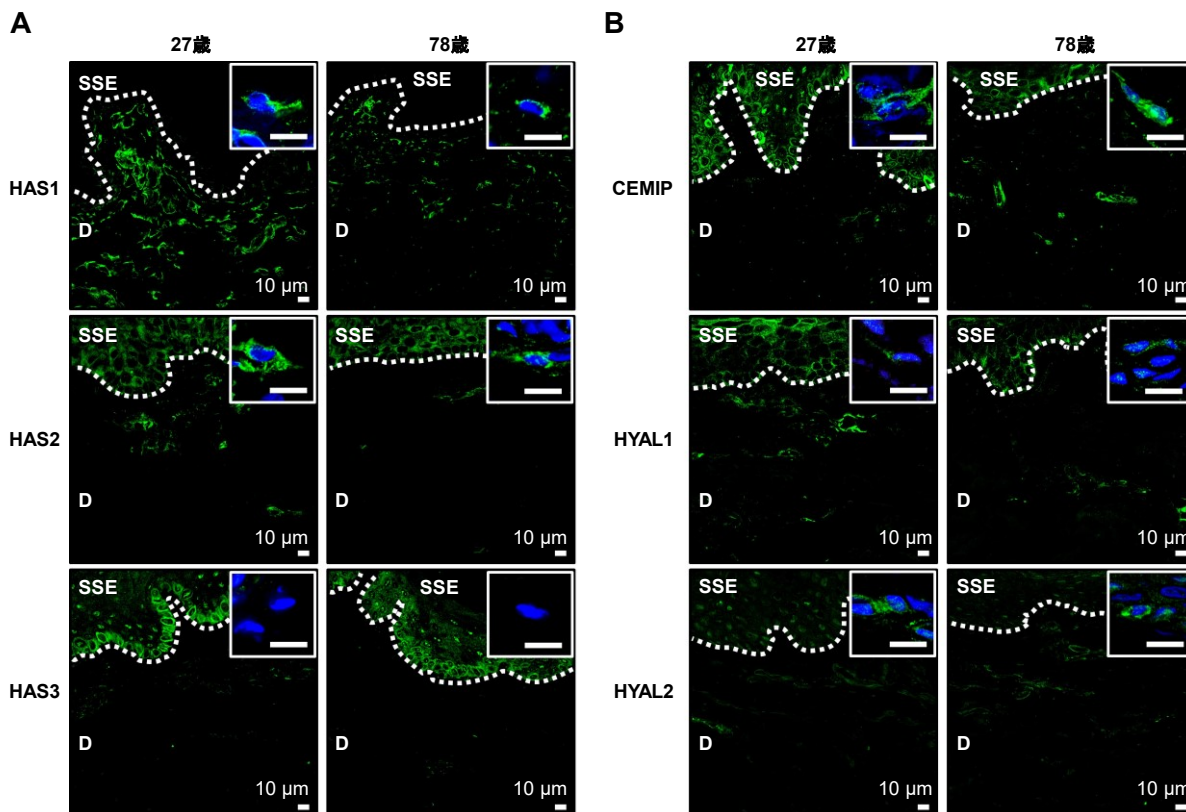


図 9 上唇の赤唇真皮におけるヒアルロン酸代謝に関連する酵素の免疫蛍光染色

ヒアルロン酸関連酵素の免疫蛍光染色の代表例。(A)ヒアルロン酸合成酵素。HAS1 (上段)、HAS2 (中段)、HAS3 (下段)。(B)ヒアルロン酸分解酵素。CEMIP (上段)、HYAL1 (中段)、HYAL2 (下段)。緑はそれぞれの酵素に対する抗体の免疫シグナルを示す。挿入図はDAPIと共染色した真皮中の細胞の高倍率像の代表例。青：核、点線：DEJ、D：真皮、SSE：重層扁平上皮、スケールバー：10 μm。

2.4. 考察

第2章では上唇赤唇の真皮の主要なECM成分についての加齢変化を研究し、加齢に伴う膠原線維の減少とヒアルロン酸の減少を明らかとした。さらに、膠原線維については、線維形態の悪化も明らかとした。加えて、免疫蛍光染色による観察から、膠原線維の減少に関わる可能性のある分子レベルでの変化として、I型プロコラーゲンの減少を見出し、ヒアルロン酸の減少に関わる可能性のある分子レベルでの変化として、ヒアルロン酸合成酵素であるHAS1の減少と、ヒアルロン酸分解酵素であるCEMIPの増加の、産生と分解の双方からのヒアルロン酸減少メカニズムの可能性を見出した。第2章で得られた主要な解析結果には、いずれも組織試料の保存期間との間に有意な相関関係は認められず(表13)、本結果が組織試料の劣化によるものではなく、ドナーの年齢に由来する変化であることが示唆された。

表 13 主要な組織染色結果と組織試料保存期間との相関解析結果

項目	死亡認定後から組織試料採取までの保存時間(4℃)		凍結から組織学的解析のための切除までの保存時間(-80℃)	
	相関係数(r)	p	相関係数(r)	p
膠原線維面積	0.049	0.862	-0.099	0.725
弾性線維面積	-0.304	0.271	0.012	0.967
ヒアルロン酸	0.079	0.778	-0.184	0.512

加齢した皮膚でのコラーゲンの減少は広く受け入れられており^{64,67,68,71)}、コラーゲン線維束形態の悪化と粘弾性との相関⁷²⁾から、量の変化に加えて形態の変化も重要とされている。このこと

から、本章では、赤唇真皮での膠原線維の加齢変化の概略を得るために、簡便な方法を用いて、コラーゲンを量と形態の両側面から解析した。その結果、コラーゲン量を反映する膠原線維面積の減少と、コラーゲン線維束形態の悪化が明らかとなった。このように、赤唇真皮の膠原線維は皮膚と類似の加齢変化を示した。同様に、免疫蛍光染色においても、I型プロコラーゲンの減少と、一貫して低レベルのIII型プロコラーゲンという、皮膚での生理老化での両プロコラーゲンの変化^{67,68,73})と同様の挙動が認められた。I型プロコラーゲンの減少は、光老化皮膚での変化の報告^{68,74})とも一致していたが、III型プロコラーゲンについては、光老化皮膚での変化の報告⁷⁴)とは異なった。このような皮膚と赤唇との相違点に関して本研究の結果のみから考察を行うことは難しいものの、光老化の程度の違いや組織間の線維芽細胞の性質の違い⁷⁵)に加え、メカニカルストレスの違いも影響を及ぼしていると考えられる。メカニカルストレスはI型プロコラーゲンとIII型プロコラーゲンの発現に異なる影響を与え、メカニカルストレスに対する反応は線維芽細胞の由来組織間でも異なることが報告されている⁷⁶)。赤唇は顔の他の部位の皮膚に比べて、発声や食事、表情の表出などに伴う大きな動きを頻繁に受けるため、強度と頻度の両面において、強いメカニカルストレスに曝されている可能性がある。このことから、生理老化や光老化にメカニカルストレスが加わることで、線維芽細胞のIII型プロコラーゲン産生に皮膚とは異なる結果が生じた可能性が考えられる。このように複数の異なる要因の影響が考えられるため、赤唇と皮膚でのI型、III型プロコラーゲン発現の違いや詳細なメカニズムの考察には、今後のより複雑な条件での検討が望まれる。また、本研究では使用可能な組織試料量の限界から、真皮膠原線維の主要構成成分であるI型、III型コラーゲンの産生指標である各プロコラーゲンのみを解析したが、膠原線維の状態には、タンパク分解酵素やコラーゲンの線維束形成に関わる他の分子を含めた、産生の低下と分解の亢進の双方からの解析が必要である。赤唇の真皮における膠原線維の悪化を引き起こす原因因子の解明には、これらの分子を解析項目とした今後の詳細な研究が必要ではあるが、本研究の結果から、少なくともI型コラーゲンの産生低下が加齢に伴う赤唇の真皮における膠原線維減少の原因の一つである可能性が示唆された。

本章では、膠原線維が真皮の3次元構造を維持する構造体であることから、真皮の体積に影響を及ぼすと考えて検討を開始したが、結果として、赤唇の真皮の膠原線維面積と真皮の厚さの間に相関は認められなかった。それだけでなく、非侵襲的測定により縦幅や厚さが加齢により減少することを示した先行文献^{25,28-33})や、白唇部にて高齢者では唇全体の厚さに対する皮膚の厚さの比率が低いことを示した参考文献^{38,39})からは加齢による真皮の薄化が期待されるにも関わらず、本研究では赤唇の真皮の厚さと年齢の間にも相関関係は認められなかった。真皮の厚さには同世代内においても大きな個人差が計測されたことから、結論を得るためには例数を増やした解析が必要ではあるものの、先行研究での赤唇の厚さの減少が、赤唇表面から口輪筋を跨ぎ口腔粘膜までに到達する唇全体の厚さの計測³³)であることや、同部位に存在する口輪筋が加齢により直線状の形態に変化し、この変化が唇の湾曲を緩やかにさせることで、視認される赤唇を減少させる可能性が考えられる³⁸)ことから、唇全体の厚さに対しては、真皮の厚さではなく口輪筋の形態の影響が大きい可能性が考察される。このように、膠原線維と赤唇の真皮の厚さの関係を本研究の結果から見出すことは難しい。しかし、組織の三次元構造を維持し、組織に剛性を付与する膠原線維の性質を考慮すると、コラーゲン量の減少とコラーゲン線維束の形態的な変性は、少なくとも、高齢者での赤唇の軟化^{21,23})のメカニズム解明の一端として有用な情報となると考えられる。

弾性線維については、本研究では明確な加齢変化は示されず、同世代においても弾性線維を多く含む組織試料と弾性線維の少ない組織試料が認められた。また、赤唇に隣接する白唇の皮膚でのエラストーシスが同程度に観察されても、赤唇の弾性線維に明らかな違いが認められた。皮膚での先行研究においては、弾性線維は生理老化でエラストライシスを生じ、光老化でエラストーシスを生じること^{77,78})が広く知られており、歯肉では、弾性線維の3つに分類される一連の部位のうち、オキシタラン線維とエラウニン線維の2部位は加齢により減少するが、エラスティックファイバーには加齢での変化が認められないと報告されている⁷⁰)。これらの情報を総合すると、本研究で認められた弾性線維の大きな個人差の原因として、光への暴露頻度の違いが影響していた可能性が考えられる。唇は顔の他部位に比べ突出した器官であるものの、赤唇のすぐ上に位置する白唇の皮膚は多くの人でやや上方向きで、常に日光曝露頻度が高いと考えられるのに対して、赤唇の角度には個人差が大きいと想定される。このことから、組織提供者の赤唇の角度に起因する日光曝露の差が、本研究の弾性線維の解析における大きな個人差につながった可能性も考えられる。提供された献体組織を用いた本研究では、摘出前の形態計測は不可能であったこと、背景情報としての組織提供者の日光曝露頻度の情報は入手できないことから、弾性線維の加齢変化の解明には、形態計測、被験者情報の取得、赤唇組織採取の全てを備えた研究が望まれる。

本章の研究において最も顕著が得られたのは、赤唇真皮のヒアルロン酸の加齢に伴う減少であ

った。本研究のヒアルロン酸関連のデータを総合すると、加齢に伴うヒアルロン酸の減少は、合成の減少と分解の増加の双方に起因している可能性があり、その原因酵素として、合成においては HAS1 の減少、分解に関しては CEMIP の増加が候補であることが示唆された。ヒアルロン酸は高い粘性を有すること⁶⁵⁾から、このヒアルロン酸の減少もまた、加齢に伴う赤唇の軟化^{21,23)}についての原因メカニズムの解明につながる一端として有用な情報となると考えられる。

皮膚でのヒアルロン酸の加齢変化については、生理老化においても⁷⁹⁻⁸¹⁾、光老化⁸¹⁻⁸⁴⁾においても既報に相違点が存在する。皮膚ではないものの、本研究の結果は、真皮ヒアルロン酸の加齢による減少を支持している。この減少の原因には、部位特有の性質と光の影響の二つの可能性が考えられる。部位特有の性質については、近接部位の歯肉ではヒアルロン酸は加齢で減少する⁸⁵⁾ことが知られていること、真皮ヒアルロン酸ではないが、赤唇は上皮のケラチン発現パターンや分化マーカーにおいて部位特異的な性質を有す³⁾ことが知られている。加えて、真皮のヒアルロン酸を産生する主な細胞と考えられる線維芽細胞にも、由来する生体内の部位により同一の刺激に対する反応の違いが知られている。例えば、咽頭粘膜由来の線維芽細胞は無刺激下でもある種のサイトカインやグロースファクターを高発現している⁸⁶⁾ことや、赤唇の近傍組織である口腔内でも、歯肉由来の線維芽細胞では bradykinin や histamine により prostaglandin E2 (PGE2) 産生が亢進するのに対して、歯根膜由来の線維芽細胞では bradykinin や histamine 刺激による PGE2 亢進は少ない⁸⁷⁾こと、歯肉由来の線維芽細胞は I 型コラーゲンに接着すると細胞増殖が増加するが、歯周由来の線維芽細胞では細胞増殖ではなくタンパク合成が亢進する⁸⁸⁾といった、由来部位による性質や反応性の違いが報告されている。ヒアルロン酸に関しても、皮膚の真皮線維芽細胞は thyroid hormone や glucocorticoid による刺激でヒアルロン酸の産生が低下するが、後眼窩粘膜由来の線維芽細胞ではこれらホルモンによるヒアルロン酸産生低下を示さない⁸⁹⁾といった由来部位による違いが示されている。このような情報から、赤唇の真皮線維芽細胞がヒアルロン酸に及ぼす影響に関しても、部位特有の性質を示す可能性が考えられる。もう一つの可能性である光の影響については、光老化皮膚や皮膚への B 波紫外線照射によりヒアルロン酸関連酵素の発現が調節されること^{82,84)}から、より可能性が高いと考えられる。本研究では高齢者献体由来の赤唇組織での HAS1 の減少と CEMIP の増加を見出している。HAS1 の減少は、皮膚における生理老化、光老化の双方での報告^{82,84,90)}と一致した変化である。CEMIP には生理老化での増減に関する報告は見つからないものの、光老化皮膚での増加報告⁸²⁾があり、本結果と一致している。本研究で増減の認められなかったヒアルロン酸合成酵素のうち、HAS2 と HAS3 の結果は皮膚での報告^{84,90)}と矛盾があるが、HAS2 に関しては mRNA とタンパクという検出対象の違い、HAS3 に関しては赤唇における SSE に局在した発現が、皮膚での報告との差異を生じた原因であると考えられる。なお、ヒアルロン酸分解酵素に関しては、生理老化皮膚における HYAL2 の減少⁹⁰⁾が報告されているものの、HYAL1 についての情報は認められない。

このように、比較可能な真皮の ECM 成分の加齢変化に関する研究は、これまでにほとんどが皮膚真皮について行われているが、それらの報告において加齢性変化の質に関する結論は多様である。また歯肉真皮についての報告は僅かである。それらの先行知見と、本研究で示した赤唇真皮の ECM 成分の加齢変化の比較を一覧表としてまとめた (表 14)。このように、赤唇の真皮 ECM 成分については、周辺組織と比較して加齢変化の原因を考察するための情報が十分でなく、また、III型プロコラーゲンや弾性線維のように周辺組織での報告と完全に一致しきれない部分は残されているものの、I型コラーゲンの減少、HAS1 の減少、CEMIP の増加を合わせて考えると、赤唇の加齢変化には、部位特異性に加え、光暴露の影響も存在している可能性が示唆される。

表 14 真皮 ECM 成分の加齢変化：赤唇、皮膚、歯肉の比較

ECM	赤唇（本研究）	皮膚（先行知見）	歯肉（先行知見）
膠原線維	膠原線維の密度が低く変化	生理老化で減少 ^{64,70)} 進行した生理老化で減少 ⁷¹⁾ 進行した光老化 ⁶⁴⁾ で減少	—
	コラーゲン線維束は太く、不規則な膨れた形態に変性	生理老化で真皮上層の線維は細くなり、中下層の網状層では40代をピークに太くなった後、線維間の間隙増加を伴いながら細くなる ⁷¹⁾ 生理老化で太くなり、線維間の間隙が増加 ⁷⁰⁾ 光老化で線維がほぐれたような形態変性 ⁷²⁾	太くなり、線維間の間隙が減少 ⁷⁰⁾
	I型プロコラーゲンの減少	生理老化 ^{67,68,73)} で減少 光老化 ^{68,74)} で減少	—
	III型プロコラーゲンに加齢変化なし	生理老化 ^{67,73)} で減少 光老化 ⁷⁴⁾ で減少	—
弾性線維	明確な加齢変化なし 白唇のエラストーシスが同程度の献体間にも個人差大	生理老化で減少 (エラストライシス) ⁷⁷⁾ 光老化で増加・異常凝集 (エラストーシス) ^{77,78)}	真皮上層のオキシタラン線維、エラウニン線維は減少、エラスティックファイバーに変化なし ⁷⁰⁾
ヒアルロン酸	減少	生理老化で変化なし ^{79,81)} 生理老化で減少 ⁸⁰⁾ 光老化で増加 ⁸¹⁾ 光老化で変化なし ⁸³⁾ 光老化で減少 ^{82,84)}	減少 ⁸⁵⁾
	HAS1の減少	生理老化で変化なし ⁸⁴⁾ 生理老化で減少 ⁹⁰⁾ 光老化で減少 ^{82,84)}	—
	HAS2に顕著な変化なし	生理老化で変化なし ⁸⁴⁾ 生理老化で減少 ⁹⁰⁾ 光老化で減少 ^{82,84)}	—
	HAS3はSSEのみに検出	生理老化で増加 ⁹⁰⁾ 生理老化で減少傾向 ⁸⁴⁾ 光老化で減少 ⁸⁴⁾	—
	CEMIPの増加	光老化で増加 ⁸²⁾	—
	HYAL1に顕著な変化なし	特段の記述無し ⁸⁴⁾	—
	HYAL2に顕著な変化なし	生理老化で減少 ⁹⁰⁾	—

第3章 加齢に伴うヒト赤唇の口輪筋構成重鎖の変化

3.1. 序論

前章に示した真皮に対する研究から、赤唇では真皮の厚さに加齢変化を認めなかったことから、非侵襲的計測研究で報告されている赤唇の縦幅や体積の加齢に伴う減少^{25,26,28-33)}に関わる組織として口輪筋の影響を考えた。口輪筋は、赤唇周辺の組織内において相当の体積を占め、かつ赤唇近くで体表側に向かって湾曲しJ字形を形成している。この湾曲が、赤唇が正面から目立つ方向へと唇全体を曲げている。加齢変化として、口輪筋の先端形状の加齢によるJ字形から直線状への変形と筋線維の萎縮が示され、この萎縮が口輪筋の形態変化の一因と考察されている³⁸⁾ことから、本章では、さらに詳細な研究として、口輪筋を構成する筋線維についての加齢変化を解析した。口輪筋は骨格筋であることから、4種類の筋線維 (fast-twitch glycolytic fibers、fast-twitch oxidative glycolytic fibers、fast-twitch oxidative fiber、slow-twitch fibers) のいずれかにて構成されると考えられる。それぞれの筋線維種は、MYH1、MYH2、MYH4 および MYH7 という特定のミオシン重鎖タンパクが指標となる⁹¹⁾ため、これら MYH 種の加齢変化を解析した。

3.2. 実験材料および実験方法

3.2.1. ヒト赤唇組織

第2章2.2.1項に記載のObio, LLCより提供された計15例の白人女性献体(49.2±15.8歳(平均±標準偏差)、27~78歳)由来のヒト上唇組織試料を用いた。ヒト由来組織の使用は、ポーラ化成工業株式会社の施設内審査委員会の承認後に実施した(承認年月日2017年6月22日)。本試験へのヒト組織試料の提供に先立ち、倫理および適用されるすべての法律、規則、規制をObio, LLCが遵守していること、また、Obio, LLCが各ドナーから書面によるインフォームドコンセントを取得していることを、Obio, LLCに確認した。

組織学的解析には、第1章での検討と同位置である右口角の1cm上唇結節側から3mm幅で摘出され、10%中性緩衝ホルマリン溶液中で固定後に、定法に従いパラフィン包埋された組織を用いた。蛍光免疫染色には、組織学的解析に用いた組織の上唇結節側に隣接する組織を3mm幅で摘出し、O.C.T. Compoundに包埋した未固定凍結組織を用いた。

3.2.2. 組織学的解析

第2章2.2.2項に記載した方法にて得られたMT染色像を用いて、口輪筋の先端に存在する瘤状領域を解析領域とし、そこに含まれる赤色の染色領域を筋線維の領域として、解析領域の面積に占める染色領域の割合を、ImageJソフトウェアを用いた画像解析にて定量した。

3.2.3. 蛍光免疫染色

一次抗体として表15に記載の抗体を用い、第2章記載の方法に準じて蛍光免疫染色を実施した。

表 15 免疫組織化学に用いた一次抗体の一覧

抗原	抗体種	希釈率	型番	供給元
MYH1	ウサギ ポリクローナル	1:500	bs-5885R	Bioss Antibodies, Woburn, MA
MYH2	マウス モノクローナル (clone TH81)	1:500	NB100-65675	Novus Biologicals
MYH4	マウス モノクローナル (clone MF20)	1:1000	53-6503-82	Thermo Fisher Scientific
MYH7	ウサギ ポリクローナル	1:50	22280-1-AP	Proteintech

3.2.4. 統計解析

R package を使用してピアソンの相関解析を行い、p 値 0.05 未満を有意差有り と判断した。

3.3. 結果

3.3.1. 口輪筋先端部の筋線維の加齢変化

先行文献³⁸⁾と同様に、口輪筋が赤唇部まで侵入していること、若齢献体では先端は丸い瘤状を示すが、高齢献体では直線状に近い形態となることが確認された (図 10 A)。また、高齢献体では、この領域の内部の筋線維は萎縮して観察された (図 10 B)。そこで、口輪筋先端の瘤状部における筋線維の占める割合と年齢との関係を解析した結果、予想された通り、年齢との負の相関が認められた ($r=-0.573$, $p=0.025$, 図 10 C)。本検討結果の筋線維面積は、組織試料保存期間との間に有意な相関関係は認められなかった (死亡認定後からサンプリングまでの 4°C 保存期間との相関: $r=0.039$, $p=0.890$ 、サンプリングから解析までの -80°C 保存期間との相関: $r=0.196$, $p=0.483$)。

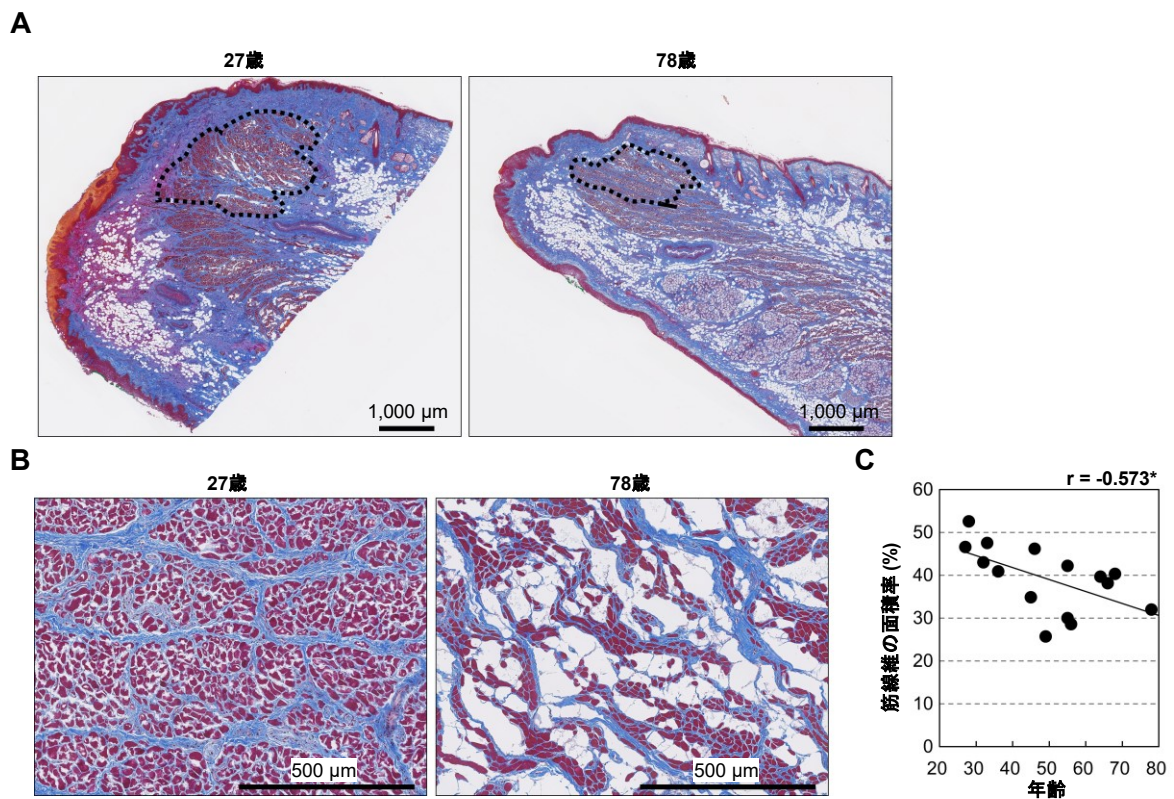


図 10 上唇の赤唇下部の口輪筋における筋線維の加齢変化

(A) 低倍率の MT 染色像の代表例。赤：筋線維、青：膠原線維、点線：口輪筋先端の丸い瘤状部分として解析された領域、スケールバー：1,000 μm 。(B) 口輪筋先端の丸い瘤状部分の高倍率像。赤：筋線維、青：膠原線維、スケールバー：500 μm 。

3.3.2. 口輪筋筋線維を構成するミオシン重鎖の加齢変化

口輪筋先端部の丸い瘤状部における筋線維中のミオシン重鎖を免疫蛍光染色し、若齢献体と高齢献体で比較した結果、若齢献体由来の組織にて MYH2、MYH4、MYH7 の 3 種のミオシンが強く染色され、高齢献体では MYH2 と MYH7 が減少して観察された。MYH4 には顕著な違いは認められなかった。なお、MYH1 に関しては若齢献体においてもごくわずかにしか染色が検出されず、年代間の比較は困難であった (図 11)。

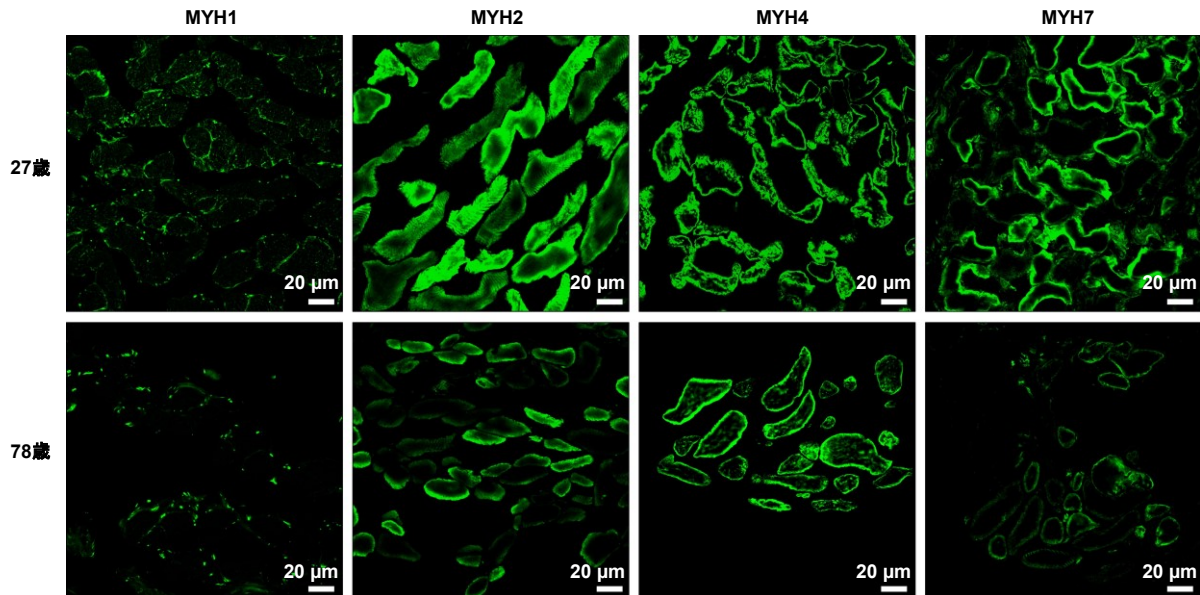


図 11 上唇の赤唇下部における口輪筋の筋線維を構成するミオシン重鎖の免疫蛍光染色
 MYH1、MYH2、MYH4、MYH7 に対する免疫蛍光染色の代表例。緑：各 MYH の抗体により検出されたシグナル、スケールバー：20 μm 。

3.4. 考察

第 2 章の研究にて、上唇赤唇の厚さの減少に対する真皮の寄与が示唆されなかったことから、本章では赤唇部に侵入している口輪筋の先端の瘤状部分における筋線維に対する研究を実施した。その結果、赤唇部に侵入している口輪筋先端の瘤状部においても、先行文献³⁸⁾にて示される口輪筋の筋線維の加齢に伴う萎縮が確認された(図 3-1 A-C)。さらに、この萎縮の詳細を明らかにするための一端として、骨格筋の筋線維を構成する MYH について免疫染色を実施し、口輪筋の筋線維は主として MYH2、MYH4、MYH7 をミオシン重鎖とする筋線維から構成されることを明らかとした。すなわち、口輪筋は速筋線維と遅筋線維の両方から構成されるという先行研究^{92,93)}との一致を、筋原線維を構成するミオシン重鎖のタンパク種レベルで明らかとした。さらに、加齢変化の解析結果から、口輪筋における筋線維構成 MYH 種の減少が、MYH2 と MYH7 の減少であることを明らかとした。これらの結果から、MYH2 と MYH7 の減少が加齢に伴う口輪筋の筋線維萎縮の原因である可能性が示唆された。

筋線維は、外部要因や老化によって筋線維型が変化する⁹⁴⁻⁹⁷⁾。本研究にて減少の認められた MYH2、MYH7 はそれぞれ、MYH2 が解糖と酸化の両系にて ATP を供給する fast-twitch oxidative glycolytic muscle fibers、MYH7 が主として酸化的リン酸化系にて ATP を供給する slow-twitch oxidative fibers のミオシン重鎖と、酸化型の特性を有す筋線維である。他方、顕著な減少を認めなかった MYH4 は、主として解糖系にて ATP を供給する fast-twitch glycolytic muscle fiber のミオシン重鎖であることから、口輪筋の先端部で認められる、MYH4 が維持されながらの MYH2 と MYH7 の減少は、口輪筋の加齢変化が、酸化型から解糖型へと筋線維の型がシフトするという、高齢者の外側広筋⁹⁴⁾や高齢ラットの腓腹筋⁹⁷⁾とは逆の、高齢ラットのヒラメ筋⁹⁷⁾と類似の質的変換を伴う変化であることが明らかとなった。このことから、口輪筋の加齢変化にはヒラメ筋と類似のメカニズムが働いており、生体を用いた検討^{96,97)}がなされているヒラメ筋の研究から将来明らかとされるメカニズムを参考にできる可能性が示唆された。

終章 総括

赤唇は消化器官と皮膚を隔てる境界で、咀嚼や言語コミュニケーションのための発音といった基本機能を担うだけでなく、他者による健康状態・美的魅力に関する印象形成の判断材料として、美容や QOL の面でも重要である。赤唇の色や形態が他者からの印象に及ぼす影響についての種々報告があるが³⁻¹³⁾、これらは、加齢により印象に悪影響を及ぼす方向で変化する(赤みの低下^{21, 22)}、縦幅や厚みの減少^{22, 25-33)})。また、加齢により赤唇自体が柔らかくなる^{21, 23)}という物性の変化も報告されている。一方で、このように外観に表れる加齢変化の根底にある、組織内の変化に関する報告はほとんどなかった(表 5)。

本申請論文の研究では、赤唇の老化研究の基礎情報となる組織変化の知見を取得することを主眼とした。具体的には、序章での調査研究にて抽出した加齢による組織変化の情報が欠落していた項目(表 5)のうち、他者からの印象に影響する色調(表 2)と形態(表 3)の加齢変化に対する成因解明研究や、対抗策開発に向けた効果的作用点の探索研究のための、端緒となる基礎情報を提供する目的で、組織内の赤色の代表要素である血管と組織内の色が外部に到達するまでの壁となる SSE についての研究(第 1 章)と、赤唇の厚さに影響を及ぼすと仮定した真皮の成分についての研究(第 2 章)を実施した。さらに、第 2 章の研究にて、真皮の厚さと年齢との間に相関関係が見出されなかったことから、赤唇全体の顔面正面への露出に影響しうる別の組織である口輪筋についても検討した(第 3 章)。

第 1 章の血管に着目した研究では、加齢に伴う赤唇の真皮における血管の悪化と、DEJ の平坦化を明らかとした。詳細には、様々な年齢の検体から入手したヒト赤唇組織に対する抗 CD31 抗体を用いた免疫組織化学にて、赤唇の真皮全層での数的変化を伴わない染色面積の減少を明らかとし、加齢に伴い赤唇の真皮全体の血管が細くなる可能性を示した。また、真皮上層部での血管の数と染色面積の両方の減少を明らかとし、加齢に伴い血管が退縮し、真皮の上層部まで到達する血管の数が減少する可能性を示した。血管が細くなることや血管数の減少は血流の低下につながるため、組織内での主要な赤色要素である酸素結合型ヘモグロビンを含む赤血球を減少させると考えられる。特に、赤唇表面に近い真皮上層部の血管数の減少は、外観から視認される赤みの減少につながると考えられる。このことから、加齢に伴う真皮の血管の太さの減少と真皮上層部の血管数の減少は、加齢に伴う赤唇の赤み低下に寄与すると考えられた。血管の検討に加えて実施した、組織内部の色が外部に到達して視認されるまでの必須通路である SSE に関する検討では、加齢に伴う rete ridges の減少と、rete ridges の発達度合いと真皮上層部の血管数の正の相関関係を明らかとした。rete ridges の減少は DEJ の平坦化を意味しているが、同時に SSE の面積に加齢と相関する変化が認められなかったことから、加齢に伴い SSE が凹凸を失った中間の平均的な厚さに変化する可能性を示した。また、rete ridges の発達度と真皮上層部の血管数との正の相関を明らかとし、SSE 中の細胞増殖活性には相関が認められなかったことと合わせて、加齢に伴う真皮上層部の血管の変化が DEJ の平坦化に寄与している可能性を示唆した。この DEJ の平坦化に関しては、皮膚の上皮系細胞である表皮 keratinocytes での既存報告⁵⁷⁾にて足場の形状が上皮細胞の性質を変化させることが知られていることから、真皮上層部の血管の悪化が、DEJ の平坦化を通じて、SSE の大部分を占める上皮細胞の状態に影響し、さらには上皮細胞が分化した結果である角層の状態にまで影響を及ぼす可能性も考えられる。

第 2 章の真皮の成分に着目した研究では、加齢に伴い赤唇が薄くなる(縦幅が小さくなる)原因として真皮の変化が寄与する可能性を考え、真皮の主要な ECM 成分である膠原線維、弾性線維、ヒアルロン酸について解析した。その結果、膠原線維とヒアルロン酸の加齢に伴う減少、膠原線維の主要構造であるコラーゲン線維束の形態悪化を明らかとした。さらに、膠原線維の減少に関わる因子として、I 型プロコラーゲンの減少、すなわち膠原線維の主成分である I 型コラーゲンの産生低下があることを見出した。また、ヒアルロン酸の減少に関わる原因酵素として、ヒアルロン酸合成酵素である HAS1 の減少と、ヒアルロン酸分解酵素である CEMIP の増加を見出し、このことから、赤唇真皮での年齢依存性のヒアルロン酸減少は、産生と分解の双方の結果と結論付けた。これらの結果より、加齢により赤唇が柔らかくなるメカニズムを解明するための参考となる基礎情報として、コラーゲン量の減少とコラーゲン線維束の変性、ヒアルロン酸の減少という情報が追加された。一方、膠原線維やヒアルロン酸とは対照的に、弾性線維では大きな個人差により年齢との相関が認められず、加齢変化を見出すにはいたらなかった。

上記のように、第 2 章の研究にて、赤唇の真皮での膠原線維とヒアルロン酸の加齢に伴う減少を明らかとし、赤唇の物性の加齢変化に対しての考察を示したものの、同時に第 2 章の解析では真皮の厚さと年齢との間に相関関係を見出せず、加齢に伴い赤唇が薄くなる原因としての真皮の可能性が支持されなかった。そこで、先行研究³⁸⁾を参考に、正面から赤唇が目立つ方向へと唇全

体を曲げている口輪筋の加齢変化に赤唇が薄くなる要因を求め、第3章の研究を実施した。

第3章では、口輪筋先端部の赤唇に侵入している部分の筋線維の加齢変化を解析し、その結果、口輪筋の先端部における筋線維の萎縮を定量的に示した。加齢による口輪筋の萎縮はこれまでも報告³⁸⁾されているものの、萎縮する筋線維の種類は不明であったが、第3章での筋原線維を構成するミオシン重鎖種の解析から、口輪筋の先端部の筋線維にMYH2、MYH4、MYH7が含まれることを明らかとして、先行研究^{92,93)}で示される口輪筋は速筋線維と遅筋線維の両方から構成されるという知見をミオシン重鎖のタンパク種レベルで裏付けた。それとともに、加齢により、MYH4が維持されたまま、MYH2とMYH7が減少することを新たに見出した。これらの結果から、口輪筋先端の赤唇に侵入部の筋線維の萎縮が、加齢に伴い赤唇が薄くなる原因である可能性が示唆されるとともに、萎縮の原因がMYH2とMYH7の減少である可能性が示唆された。また、口輪筋先端部で認められた各ミオシン重鎖タンパク種の変化から、ヒラメ筋の加齢変化⁹⁷⁾と類似の酸化型から解糖型への質的な筋線維型のシフトが口輪筋にも生じる可能性が考察され、生体を用いた研究^{96,97)}がなされているヒラメ筋の研究から得られる知見を、口輪筋の加齢萎縮のメカニズム解明に応用できる可能性が示唆された。

以上、本申請論文により、既存報告で情報が欠落していた赤唇組織の加齢変化のうち、真皮の血管、コラーゲン、ヒアルロン酸の加齢に伴う減少という基礎的な情報が追加され、口輪筋についても、口輪筋先端部の筋萎縮の定量データが初めて提供された。また、同時に、SSEを構成する上皮細胞の細胞増殖や、真皮の弾性線維には年齢と相関する変化が乏しいことが明らかとなった。さらには、分子レベルの加齢変化として、真皮では、I型プロコラーゲンおよびHAS1の減少とCEMIPの増加が、口輪筋ではMYH2とMYH7の減少がそれぞれ示され、これらタンパクの加齢変化が組織レベルでの加齢変化の原因となる可能性が示唆された。本申請論文による、赤唇組織の加齢変化情報の追加結果一覧を表16に示す。

本申請論文で明らかとした結果にて、赤唇の加齢変化のうち色調の変化に対しては、加齢により真皮上層部まで伸展する血管が減少して赤色の成分が減少することに加えて、真皮上層部の血管の減少に伴いSSEと真皮の境目の接合部の平坦化が引き起こされ、凹凸の少ない均一な厚さのSSEになることで、血液の赤みが外部まで届きにくくなるというメカニズムの可能性が示唆される。物性の加齢変化に対しては、真皮ECMのうち、ヒアルロン酸がHAS1の減少による産生の低下と、CEMIPの増加による分解の亢進により減少するとともに、I型プロコラーゲン産生の低下を一因とした膠原線維の減少と形態の悪化が生じて、真皮の粘性や剛性が低下し、赤唇が柔らかくなるというメカニズムの可能性が示唆される。さらに加齢に伴う赤唇縦幅の減少に対しても、赤唇直下の深部に存在する口輪筋で、MYH2とMYH7の減少により筋線維が萎縮して、丸い瘤状部分が縮小し、折れ曲がり角度の拡大と合わさることで、顔面正面への赤唇の露出が減少するというメカニズムの可能性が示唆される。このように、本研究によって、3種の赤唇の加齢変化に対して、加齢に伴う赤唇組織内での変化と外観の変化を説明するメカニズムが推測される(図12)。

本申請論文での検討では、今回明らかとなった加齢変化が生じる原因やそこに至るプロセスを解明するまでには至っていない。しかし、これらの新たな知見は、今後の赤唇の加齢関連研究における基礎知見として、例えば、本研究にて明らかとなったrete ridgesの減少によるDEJの平坦化を手掛かりに、足場形状毎での重層扁平上皮細胞の遺伝子発現変化を解析し、加齢による乾燥の増加、経皮水分蒸散量の低下に影響するメカニズムを推測する研究や、真皮の膠原線維や口輪筋先端の瘤状部における筋線維の密度低下を手掛かりに、赤唇表面の微細な形態であるシワを横断する方向の組織切片を解析し、膠原線維密度や筋線維密度とシワとの関係を解明する研究に発展したり、本研究では未検討のコラーゲン線維束や弾性線維を構成する各種ECM成分や、これらの形成過程に関わる各種酵素、分解酵素などの加齢変化や、その加齢変化の原因となる外的要因や体内の全身性因子の検討といった、赤唇の加齢変化のより深い理解のための研究の導入となる。さらに、本研究で得られた結果を加齢現象のエビデンスとして、例えば、赤唇の赤み改善を目指した、重層扁平上皮細胞に作用して真皮上層部に毛細血管新生を誘導する有効成分の開発や、SSEの凹凸を増加させるような有効成分の開発が行われたり、口輪筋の筋線維の改善による赤唇の体積増加へのアプローチが開発されることで、これまで推測に基づいた対策が講じられていた赤唇の加齢変化に対する美容・医学的な処置が、エビデンスに基づいた、より自然で効果的な処置法へと発展するものと考えられる。

表 16 本研究で得られた赤唇組織の加齢変化に関する新発見

部位	加齢変化に関する 本論文発表前の情報	本研究にて追加された 加齢変化の新発見
角層	<ul style="list-style-type: none"> ・角質細胞面積の増加^{35,37)} ・有核細胞の割合の減少^{34,37)} 	—
SSE	<ul style="list-style-type: none"> ・メラニン量、メラノサイト数の増加²⁴⁾ 	<ul style="list-style-type: none"> ・Rete ridges の平坦化 ・表面の長さ、平均の厚さ、DEJ の長さ、増殖細胞の割合には、年齢との有意な相関無し
真皮	—	<ul style="list-style-type: none"> ・膠原線維が占有する領域の減少 ・コラーゲン線維束形態の悪化 ・I型コラーゲン産生の低下 ・ヒアルロン酸の減少 ・HAS1 の減少、CEMIP の増加 ・弾性線維には特定の加齢変化なし
血管	<ul style="list-style-type: none"> ・紅斑インデックスの低下²¹⁾ ・血流量の減少²²⁾ 	<ul style="list-style-type: none"> ・血管が占有する面積の減少 ・真皮上層部での血管数の減少
口輪筋	<ul style="list-style-type: none"> ・赤唇へ侵入する折れ曲がり部分の折れ曲がり角度の直線化^{38,39)} ・筋線維萎縮の所見³⁸⁾ 	<ul style="list-style-type: none"> ・口輪筋先端部筋での筋線維が占める面積の減少 ・MYH2、MYH7 の減少

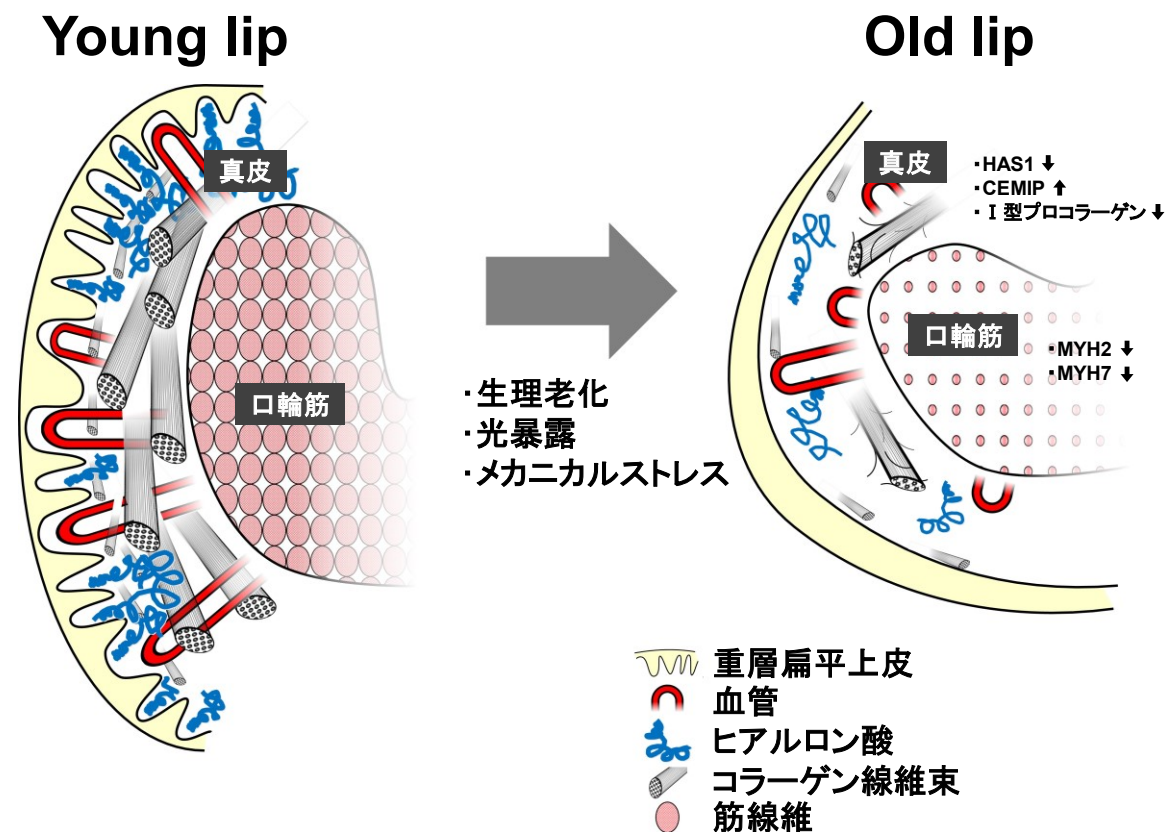


図 12 上唇の赤唇の加齢変化の模式図

加齢した上唇の赤唇では、真皮上層部まで伸長する血管が減少し、それに伴い、SSE と真皮の境目の接合部の平坦化が生じる。真皮の ECM では、ヒアルロン酸が減少し、膠原線維が形態の悪化を伴いながら減少する。深部に位置する口輪筋では筋線維が萎縮する。真皮上層部での血管の減少は唇の赤みの低下、真皮の ECM の異常や口輪筋の筋線維の萎縮は唇の硬さの低下、口輪筋の筋線維の萎縮は唇の厚みの低下、といった外観に表れる加齢変化の原因と考えられる。タンパクレベルでは、ヒアルロン酸の減少には HAS1 によるヒアルロン酸産生の低下と CEMIP によるヒアルロン酸分解の亢進が関与し、コラーゲンの減少には I 型プロコラーゲン産生の低下が関与する可能性がある。萎縮した筋線維中では MYH2 と MYH7 の減少が生じている。これらの加齢変化の原因として、生理老化や光への曝露、メカニカルストレスの影響が考えられる。

参考文献

1. Ya-Xian Z, Suetake T, Tagami H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin – relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch. Dermatol. Res.* 1999;291(10):555-559. doi:10.1007/s004030050453
2. Bielfeldt S, Laing S, Sadowski T, Gunt H, Wilhelm K. Characterization and validation of an in vivo confocal raman spectroscopy led tri-method approach in the evaluation of the lip barrier. *Ski Res Technol.* 2019;26(3):390-397. doi:10.1111/srt.12814
3. Barrett AW, Morgan M, Nwaeze G, Kramer G, Berkovitz BKB. The differentiation profile of the epithelium of the human lip. *Arch Oral Biol.* 2005;50(4):431-438. doi:10.1016/j.archoralbio.2004.09.012
4. Kobayashi Y, Matsushita S, Morikawa K. Effects of lip color on perceived lightness of human facial skin. *Iperception.* 2017;8(4):2041669517717500. doi:10.1177/2041669517717500
5. Stephen ID, McKeeganh AM. Lip colour affects perceived sex typicality and attractiveness of human faces. *Perception.* 2010;39(8):1104-1110. doi:10.1068/p6730
6. Guéguen N. Does red lipstick really attract men? An evaluation in a bar. *Int J Psychol Stud.* 2012;4(2):206-209. doi:10.5539/ijps.v4n2p206
7. Scott CR, Goonewardene MS, Murray K. Influence of lips on the perception of malocclusion. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2006;130(2):152-162. doi:10.1016/j.ajodo.2004.11.036
8. Jacono AA, Quatela VC. Quantitative analysis of lip appearance after V-Y lip augmentation. *Arch Facial Plast Surg.* 2004;6(3):172-177. doi:10.1001/archfaci.6.3.172
9. Heidekrueger PI, Juran S, Szpalski C, Larcher L, Ng R, Broer PN. The current preferred female lip ratio. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(5):655-660. doi:10.1016/j.jcms.2017.01.038
10. Popenko NA, Tripathi PB, Devcic Z, Karimi K, Osann K, Wong BJF. A quantitative approach to determining the ideal female lip aesthetic and its effect on facial attractiveness. *JAMA Facial Plast Surg.* 2017;19(4):261-267. doi:10.1001/jamafacial.2016.2049
11. Zarif Najafi H, Sabouri SAA, Ebrahimi E, Torkan S. Esthetic evaluation of lip position in silhouette with respect to profile divergence. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2016;149(6):863-870. doi:10.1016/j.ajodo.2015.11.028
12. Shimomura T, Ioi H, Nakata S, Counts AL. Evaluation of well-balanced lip position by Japanese orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139(4):e291-297. doi:10.1016/j.ajodo.2009.06.030
13. Khosravanifard B, Rakhshan V, Raeesi E. Factors influencing attractiveness of soft tissue profile. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;115(1):29-37. doi:10.1016/j.oooo.2012.03.021
14. Nkengne A, Bertin C, Stamatas GN, et al. Influence of facial skin attributes on the perceived age of Caucasian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008;22(8):982-991. doi:10.1111/j.1468-3083.2008.02698.x
15. Downie J, Mao Z, Rachel Lo TW, et al. A double-blind, clinical evaluation of facial augmentation treatments: a comparison of PRI 1, PRI 2, Zyplast® and Perlane®. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2009;62(12):1636-1643. doi:10.1016/j.bjps.2008.06.056
16. Metzinger S, Parrish J, Guerra A, Zeph R. Autologous fat grafting to the lower one-third of the face. *Facial Plast Surg.* 2012;28(1):21-33. doi:10.1055/s-0032-1305787
17. Gamboa GM, Ross WA. Autologous fat transfer in aesthetic facial recontouring. *Ann Plast Surg.* 2013;70(5):513-516. doi:10.1097/SAP.0b013e31827eac42
18. Bass LS. Injectable filler techniques for facial rejuvenation, volumization, and augmentation. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2015;23(4):479-488. doi:10.1016/j.fsc.2015.07.004
19. Chiu A, Fabi S, Dayan S, Nogueira A. Lip injection techniques using small-particle hyaluronic acid dermal filler. *J Drugs Dermatol.* 2016;15(9):1076-1082. PMID:27602969
20. Chopra R, Graivier M, Fabi S, Nestor M, Meuse P, Mashburn J. A multi-center, open-label,

- prospective study of cannula injection of small-particle hyaluronic acid plus lidocaine (SPHAL) for lip augmentation. *J Drugs Dermatol*. 2018;17(1):10-16. doi:10.1111/febs.14502
21. Tamura E, Ishikawa J, Sugata K, Tsukahara K, Yasumori H, Yamamoto T. Age-related differences in the functional properties of lips compared with skin. *Ski Res Technol*. 2018;24(3):472-478. doi:10.1111/srt.12456
 22. Kim H, Lee M, Park SY, Kim YM, Han J, Kim E. Age-related changes in lip morphological and physiological characteristics in Korean women. *Ski Res Technol*. 2019;25(3):277-282. doi:10.1111/srt.12644
 23. Caisey L, Gubanova E, Camus C, Lapatina N, Smetnik V, Lévêque J-L. Influence of age and hormone replacement therapy on the functional properties of the lips. *Ski Res Technol*. 2008;14(2):220-225. doi:10.1111/j.1600-0846.2007.00283.x
 24. Mitsuhashi Y, Deguchi H, Hayashi Y. Distributions of human lip mucosal Melanocytes and aging process and sex differences. *J Japanese Stomatol Soc*. 1991;40(4):766-771. doi:https://doi.org/10.11277/stomatology1952.40.766
 25. Lévêque J-L, Goubanova E. Influence of age on the lips and perioral skin. *Dermatology*. 2004;208(4):307-313. doi:10.1159/000077838
 26. Iblher N, Kloepper J, Penna V, Bartholomae J-P, Stark GB. Changes in the aging upper lip—a photomorphometric and MRI-based study (on a quest to find the right rejuvenation approach). *J Plast Reconstr aesthetic Surg*. 2008;61(10):1170-1176. doi:10.1016/j.bjps.2008.06.001
 27. Doll C, Nahles G, Voss JO, et al. Age-related changes of the orolabial region in Caucasian women: An anthropometric analysis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016;74(12):2497-2503. doi:10.1016/j.joms.2016.08.007
 28. Yasumori H, Tamura E, Tsukahara K, Inoue Y, Yamamoto T. Age-Related Changes in Lip Morphological Characteristics in Japanese Women. *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan* 2019;53(4):287 - 296. doi:10.5107/sccj.53.287
 29. Gibelli D, Codari M, Rosati R, et al. A quantitative analysis of lip aesthetics: The influence of gender and aging. *Aesthetic Plast Surg*. 2015;39(5):771-776. doi:10.1007/s00266-015-0495-7
 30. Chong Y, Dong R, Liu X, Wang X, Yu N, Long X. Stereophotogrammetry to reveal age-related changes of labial morphology among Chinese women aging from 20 to 60. *Ski Res Technol*. 2020; In press. doi:10.1111/srt.12906
 31. Sforza C, Grandi G, Binelli M, Dolci C, De Menezes M, Ferrario VF. Age- and sex-related changes in three-dimensional lip morphology. *Forensic Sci Int*. 2010;200(1-3):182.e1-7. doi:10.1016/j.forsciint.2010.04.050
 32. De Menezes M, Rosati R, Baga I, Mapelli A, Sforza C. Three-dimensional analysis of labial morphology: effect of sex and age. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011;40(8):856-861. doi:10.1016/j.ijom.2011.03.004
 33. Ramaut L, Tonnard P, Verpaele A, Verstraete K, Blondeel P. Aging of the upper lip: Part I: A retrospective analysis of metric changes in soft tissue on magnetic resonance imaging. *Plast Reconstr Surg*. 2019;143(2):440-446. doi:10.1097/PRS.0000000000005190
 34. Nagase K, Ando Y, Hirose O, et al. Characters and age-associated changes on lip surface. *J Soc Cosmet Chem Japan*. 1991;25(1):21-26. doi:http://doi.org/10.5107/sccj.25.21
 35. Kobayashi H, Tagami H. Functional properties of the surface of the vermilion border of the lips are distinct from those of the facial skin. *Br J Dermatol*. 2004;150(3):563-567. doi:10.1046/j.1365-2133.2003.05741.x
 36. Wohlert AB. Tactile perception of spatial stimuli on the lip surface by young and older adults. *J Speech Hear Res*. 1996;39(6):1191-1198. doi:10.1044/jshr.3906.1191
 37. Arai S, Oshida K, Hikima T, Fukuda Y. Study on lip surface - characteristics of stratum corneum and corneocytes on lip -. *J Japanese Cosmet Sci Soc*. 1990;14(2):66-70.
 38. Penna V, Stark G-B, Eisenhardt SU, Bannasch H, Iblher N. The aging lip: a comparative histological analysis of age-related changes in the upper lip complex. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(2):624-628.

doi:10.1097/PRS.0b013e3181addc06

39. Penna V, Stark GB, Iblher N. Aging Changes of the Male Lips – A Lesser Evil Than in Females? *Ann Plast Surg.* 2017;78(3):334–337. doi:10.1097/SAP.0000000000000931
40. Tucunduva M-J, Tucunduva-Neto R, Saieg M, Costa A-L, de Freitas C. Vascular mapping of the face: B-mode and doppler ultrasonography study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21(2):e135–141. doi:10.4317/medoral.20754
41. Cotofana S, Pretterklieber B, Lucius R, et al. Distribution pattern of the superior and inferior labial arteries. *Plast Reconstr Surg.* 2017;139(5):1075–1082. doi:10.1097/PRS.00000000000003244
42. Hashimoto K. Fine structure of horny cells of the vermilion border of the lip compared with skin. *Arch Oral Biol.* 1971;16(4):397–410. doi:10.1016/0003-9969(71)90164-6
43. Lee R, Mathews-Roth MM, Pathak MA, Parrish JA. The detection of carotenoid pigments in human skin. *J Invest Dermatol.* 1975;64(3):175–177. doi:10.1111/1523-1747.ep12533341
44. Takiwaki H, Miyaoka Y, Kohno H, Arase S. Graphic analysis of the relationship between skin colour change and variations in the amounts of melanin and haemoglobin. *Ski Res Technol.* 2002;8(2):78–83. doi:10.1034/j.1600-0846.2002.00333.x
45. Batani A, Brănișteanu DE, Ilie MA, et al. Assessment of dermal papillary and microvascular parameters in psoriasis vulgaris using in vivo reflectance confocal microscopy. *Exp Ther Med.* 2018;15(2):1241–1246. doi:10.3892/etm.2017.5542
46. Shirshin EA, Gurfinkel YI, Priezzhev A V, Fadeev V, Lademann J, Darvin ME. Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: Assessment of blood capillaries and structural proteins localization. *Sci Rep.* 2017;7(1):1171. doi:10.1038/s41598-017-01238-w
47. Kono F, Honda T, Aini W, Manabe T, Haga H, Tsuruyama T. Interferon- γ /CCR5 expression in invariant natural killer T cells and CCL5 expression in capillary veins of dermal papillae correlate with development of psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol.* 2014;170(5):1048–1055. doi:10.1111/bjd.12812
48. Iizuka H, Ishida-Yamamoto A, Honda H. Epidermal remodelling in psoriasis. *Br J Dermatol.* 1996;135(3):433–438. doi:10.1111/j.1365-2133.1996.tb01509.x
49. Petrovic A, Petrovic V, Milojkovic B, et al. Immunohistochemical distribution of Ki67 in epidermis of thick glabrous skin of human digits. *Arch Dermatol Res.* 2018;310(1):85–93. doi:10.1007/s00403-017-1793-5
50. Sheng P, Cheng YL, Cai CC, et al. Clinicopathological features and immunohistochemical alterations of keratinocyte proliferation, melanocyte density, smooth muscle hyperplasia and nerve fiber distribution in becker's nevus. *Ann Dermatol.* 2016;28(6):697–703. doi:10.5021/ad.2016.28.6.697
51. Jensen UB, Lowell S, Watt FM. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development.* 1999;126(11):2409–2418. PMID:10226000
52. Li L, Mac-Mary S, Marsaut D, et al. Age-related changes in skin topography and microcirculation. *Arch Dermatol Res.* 2006;297(9):412–416. doi:10.1007/s00403-005-0628-y
53. Chung JH, Yano K, Lee MK, et al. Differential effects of photoaging vs intrinsic aging on the vascularization of human skin. *Arch Dermatol.* 2002;138(11):1437–1442. doi:10.1001/archderm.138.11.1437
54. Kelly RI, Pearse R, Bull RH, Leveque JL, de Rigal J, Mortimer PS. The effects of aging on the cutaneous microvasculature. *J Am Acad Dermatol.* 1995;33(5 Pt 1):749–756. doi:10.1016/0190-9622(95)91812-4
55. Bentov I, Reed MJ. The effects of aging on the cutaneous microvasculature. *Microvasc Res.* 2015;100:25–31. doi:10.1016/j.mvr.2015.04.004
56. Wu T, Xiong X, Zhang W, Zou H, Xie H, He S. Morphogenesis of rete ridges in human oral mucosa: A pioneering morphological and immunohistochemical study. *Cells Tissues Organs.* 2013;197(3):239–248. doi:10.1159/000342926

57. Lammers G, Roth G, Heck M, et al. Construction of a microstructured collagen membrane mimicking the papillary dermis architecture and guiding keratinocyte morphology and gene expression. *Macromol Biosci.* 2012;12(5):675–691. doi:10.1002/mabi.201100443
58. Azaripour A, Lagerweij T, Scharfbillig C, et al. Three-dimensional histochemistry and imaging of human gingiva. *Sci Rep.* 2018;8(1):1647. doi:10.1038/s41598-018-19685-4
59. Peeters G, Debbaut C, Laleman W, et al. A multilevel framework to reconstruct anatomical 3D models of the hepatic vasculature in rat livers. *J Anat.* 2017;230(3):471–483. doi:10.1111/joa.12567
60. Lagerweij T, Dusoswa SA, Negrean A, et al. Optical clearing and fluorescence deep-tissue imaging for 3D quantitative analysis of the brain tumor microenvironment. *Angiogenesis.* 2017;20(4):533–546. doi:10.1007/s10456-017-9565-6
61. Deegan AJ, Talebi-Liasi F, Song S, et al. Optical coherence tomography angiography of normal skin and inflammatory dermatologic conditions. *Lasers Surg Med.* 2018;50(3):183–193. doi:10.1002/lsm.22788
62. Penna V, Stark GB, Voigt M, Mehlhorn A, Iblher N. Classification of the aging lips: A foundation for an integrated approach to perioral rejuvenation. *Aesthetic Plast Surg.* 2015;39(1):1–7. doi:10.1007/s00266-014-0415-2
63. San Miguel Moragas J, Reddy RR, Hernández Alfaro F, Mommaerts MY. Systematic review of “filling” procedures for lip augmentation regarding types of material, outcomes and complications. *J cranio-maxillo-facial Surg.* 2015;43(6):883–906. doi:10.1016/j.jcms.2015.03.032
64. Naylor EC, Watson REB, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas.* 2011;69(3):249–256. doi:10.1016/j.maturitas.2011.04.011
65. Papakonstantinou E, Roth M, Karakioulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol.* 2012;4(3):253–258. doi:10.4161/derm.21923
66. Evanko SP, Potter-Perigo S, Johnson PY, Wight TN. Organization of hyaluronan and versican in the extracellular matrix of human fibroblasts treated with the viral mimetic poly I:C. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(11):1041–1060. doi:10.1369/jhc.2009.953802
67. Varani J, Warner RL, Gharaee-Kermani M, et al. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol.* 2000;114(3):480–486. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00902.x
68. Chung JH, Seo JY, Choi HR, et al. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 2001;117(5):1218–1224. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01544.x
69. Kim M-S, Kim YK, Cho KH, Chung JH. Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. *Mech Ageing Dev.* 2006;127(12):875–882. doi:10.1016/j.mad.2006.09.007
70. Gogly B, Godeau G, Gilbert S, et al. Morphometric analysis of collagen and elastic fibers in normal skin and gingiva in relation to age. *Clin Oral Investig.* 1997;1(3):147–152. doi:10.1007/s007840050026
71. Marcos-Garcés V, Molina Aguilar P, Bea Serrano C, et al. Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing – a morphometric and comparative study. *J Anat.* 2014;225(1):98–108. doi:10.1111/joa.12186
72. Nishimori Y, Edwards C, Pearse A, Matsumoto K, Kawai M, Marks R. Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hairless mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles. *J Invest Dermatol.* 2001;117(6):1458–1463. doi:10.1038/jid.2001.2
73. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol.* 2002;11(5):398–405. doi:10.1034/j.1600-0625.2002.110502.x
74. Talwar HS, Griffiths CEM, Fisher GJ, Hamilton TA, Voorhees JJ. Reduced type I and type III

- procollagens in photodamaged adult human skin. *J Invest Dermatol.* 1995;105(2):285–290. doi:10.1111/1523-1747.ep12318471
75. Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur J Cell Biol.* 2015;94(11):483–512. doi:10.1016/j.ejcb.2015.08.001
 76. Wang S, Lü D, Zhang Z, Jia X, Yang L. Effects of mechanical stretching on the morphology of extracellular polymers and the mRNA expression of collagens and small leucine-rich repeat proteoglycans in vaginal fibroblasts from women with pelvic organ prolapse. *PLoS One.* 2018;13(4):e0193456. doi:10.1371/journal.pone.0193456
 77. O'Brien JP, Regan W. A study of elastic tissue and actinic radiation in “aging,” temporal arteritis, polymyalgia rheumatica, and atherosclerosis. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24(5):765–776. doi:10.1016/0190-9622(91)70118-L
 78. Bhawan J, Andersen W, Lee J, Labadie R, Solares G. Photoaging versus intrinsic aging: A morphologic assessment of facial skin. *J Cutan Pathol.* 1995;22(2):154–159. doi:10.1111/j.1600-0560.1995.tb01399.x
 79. Meyer LJM, Stern R. Age-dependent changes of hyaluronan in human skin. *J Invest Dermatol.* 1994;102(3):385–389. doi:10.1111/1523-1747.ep12371800
 80. Longas MO, Rull CS, He XY. Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging. *Carbohydr Res.* 1987;159(1):127–136. doi:10.1016/S0008-6215(00)90010-7
 81. Oh J-H, Kim YK, Jung J-Y, et al. Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *J Dermatol Sci.* 2011;62(3):192–201. doi:10.1016/j.jdermsci.2011.02.007
 82. Yoshida H, Nagaoka A, Komiya A, et al. Reduction of hyaluronan and increased expression of HYBID (alias CEMIP and KIAA1199) correlate with clinical symptoms in photoaged skin. *Br J Dermatol.* 2018;179(1):136–144. doi:10.1111/bjd.16335
 83. Margelin D, Fournanier A, Thevenin T, Medaisko C, Breton M, Picard J. Alterations of proteoglycans in ultraviolet-irradiated skin. *Photochem Photobiol.* 1993;58(2):211–218. doi:10.1111/j.1751-1097.1993.tb09551.x
 84. Dai G, Freudenberger T, Zipper P, et al. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1451–1461. doi:10.2353/ajpath.2007.070136
 85. Weinstein M, Liao YH, Slomiany A, Slomiany BL. Glycosaminoglycan patterns in gingival proteoglycans of rat with age. *Arch Oral Biol.* 1992;37(5):323–330. doi:10.1016/0003-9969(92)90013-X
 86. Knerer B, Formanek M, Temmel A, Martinek H, Schickinger B, Kornfehl J. The role of fibroblasts from oropharyngeal mucosa in producing proinflammatory and mitogenic cytokines without prior stimulation. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1999;256(5):266–270. doi:10.1007/s004050050155
 87. Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, Sugiya H. Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontol.* 1995;66(12):1025–1031. doi:10.1902/jop.1995.66.12.1025
 88. Giannopoulou C, Cimasoni G. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res.* 1996;75(3):895–902. doi:10.1177/00220345960750030601
 89. Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA, Cheavens M. Stimulation of glycosaminoglycan accumulation by interferon gamma in cultured human retroocular fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;72(5):1169–1171. doi:10.1210/jcem-72-5-1169
 90. Tzellos TG, Sinopidis X, Kyrgidis A, et al. Differential hyaluronan homeostasis and expression of proteoglycans in juvenile and adult human skin. *J Dermatol Sci.* 2011;61(1):69–72. doi:10.1016/j.jdermsci.2010.10.010
 91. Schiaffino S. Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies. *FEBS J.* 2018;285(20):3688–3694. doi:10.1111/febs.14502

92. Dong C, Zheng S. Immunohistochemical analysis of orbicularis oris muscle fiber distribution at the philtrum in healthy infants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2015;79(12):2208–2212. doi:10.1016/j.ijporl.2015.10.005
93. Hwang K, Kim DJ, Hwang SH. Immunohistochemical study of differences between the muscle fiber types in the pars peripheralis and marginalis. *J Craniofac Surg.* 2007;18(3):591–593. doi:10.1097/scs.0b013e318052ff59
94. Kelly NA, Hammond KG, Stec MJ, et al. Quantification and characterization of grouped type I myofibers in human aging. *Muscle Nerve.* 2018;57(1):E52–E59. doi:10.1002/mus.25711
95. Reyes-Fernandez PC, Periou B, Decrouy X, Relaix F, Authier FJ. Automated image-analysis method for the quantification of fiber morphometry and fiber type population in human skeletal muscle. *Skelet Muscle.* 2019;9(1):15. doi:10.1186/s13395-019-0200-7
96. Sun KT, Leung KS, Siu PMF, Qin L, Cheung WH. Differential effects of low-magnitude high-frequency vibration on reloading hind-limb soleus and gastrocnemius medialis muscles in 28-day tail-suspended rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2015;15(4):316–324. PMID: 26636277
97. Faitg J, Leduc-Gaudet J-P, Reynaud O, Ferland G, Gaudreau P, Gouspillou G. Effects of aging and caloric restriction on fiber type composition, mitochondrial morphology and dynamics in rat oxidative and glycolytic muscles. *Front Physiol.* 2019;10:420. doi:10.3389/fphys.2019.00420

謝辞

本申請論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご助言を賜りました東京工科大学応用生物学部・今村亨教授に深甚なる謝意を表します。また、学位取得の機会を与えて下さったとともに、本研究の遂行にあたって、施設や設備機器、材料、試薬類の使用を許可し、費用を提供して下さいましたポーラ化成工業株式会社横浜研究所の皆様に心から感謝の意を表します。

索引

I 型コラーゲン	20, 24, 25, 30, 32
I 型プロコラーゲン	2, 19, 20, 23, 24, 26, 30, 31, 32
III型コラーゲン	24
III型プロコラーゲン	19, 20, 24, 25, 26
cell migration inducing hyaluronidase 1 (CEMIP)	2, 19, 22, 23, 25, 26, 30, 31, 32
cluster of differentiation 31 (CD31)	11, 12, 30
dermo-epithelial junction (DEJ)	2, 11, 13, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 30, 31, 32
extracellular matrix (ECM)	2, 17, 18, 23, 26, 30, 31, 32
glucocorticoid	25
hyaluronan synthase 1 (HAS1)	3, 19, 22, 23, 25, 26, 30, 31, 32
hyaluronan synthase 2 (HAS2)	19, 22, 23, 25, 26
hyaluronan synthase 3 (HAS3)	19, 22, 23, 25, 26
hyaluronidase 1 (HYAL1)	19, 22, 23, 25, 26
hyaluronidase 2 (HYAL2)	19, 22, 23, 25, 26
keratinocyte	16, 30
Ki67	11, 15
myosin heavy chain 1 (MYH1)	27, 28, 29
myosin heavy chain 2 (MYH2)	3, 27, 28, 29, 31, 32
myosin heavy chain 4 (MYH4)	27, 28, 29, 31
myosin heavy chain 7 (MYH7)	3, 27, 28, 29, 31, 32
prostaglandin E2	25
rete ridges	1, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 30, 31, 32
stratified squamous epithelium (SSE)	1, 2, 7, 8, 11, 13, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 30, 31, 32
thyroid hormone	25
エラウニン線維	24, 26
エラスティックファイバー	24, 26
エラストーシス	21, 24, 26
エラストライシス	24, 26
オキシタラン線維	24, 26
頤唇溝	1
角層	1, 7, 8, 9, 17, 21, 30, 32
角層水分量	1, 5, 7
汗腺	1, 8
筋線維	3, 7, 8, 27, 28, 29, 31, 32
経皮水分蒸散量	1, 5, 7, 31
血管	2, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 30, 31, 32
ケラチン	1, 7, 8, 25
口腔口裂	1
膠原線維	2, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32
口唇	1, 7, 9, 17
口唇腺	1, 9
口唇粘膜	1, 6, 7, 9, 10, 16
口輪筋	1, 3, 7, 8, 10, 11, 18, 20, 21, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32
コラーゲン	23, 24, 30, 31, 32
コラーゲン線維束	23, 24, 26, 30, 32
細胞外結合組織 → extracellular matrix (ECM)	
脂腺	1, 8, 9, 21
脂肪層	7
重層扁平上皮 → stratified squamous epithelium (SSE)	
上口唇結節	9, 17, 27
唇紅縁	1, 9
唇交連	1

真皮	1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 31, 32
真皮上層部	11, 12, 14, 15, 18, 21, 30, 31, 32
真皮-上皮接合部 → dermo-epithelial junction (DEJ)	
赤唇	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32
唾液腺	1
弾性線維	2, 17, 18, 21, 23, 24, 25, 30, 31, 32
動脈	7, 9
粘膜重層扁平上皮	1
白唇	1, 7, 8, 9, 17, 21, 24, 26
ピアソンの相関解析	11, 19, 28
ピアソンの相関係数	12, 14, 15, 20, 21, 22
ヒアルロン酸	2, 17, 18, 22, 23, 24, 25, 30, 31, 32
ビオチン化ヒアルロン酸結合タンパク (HABP)	18, 22
皮下脂肪	1, 8, 9, 10
鼻唇溝	1
表皮	1, 9, 16, 21
ヘモグロビン	9, 15, 30
ミオシン重鎖	3, 27, 28, 29, 31
毛細血管	9
毛包	1, 8, 9, 21

本研究の内容は以下の論文に発表した。

第1章

Gomi T, Imamura T. Age-related changes in the vasculature of the dermis of the upper lip vermilion. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(11): 3551-3560.
doi:10.18632/aging.101996 PMID: 31170092

第2章および第3章

Gomi T, Imamura T. Comprehensive histopathological investigation of age-related changes in the dermal extracellular matrix and muscle fibers in the upper lip vermilion. *International Journal of Cosmetic Science*. 2020; 42(4): 359-368.
doi:10.1111/ics.12622 PMID: 32274802