

# 成長期ラットの片側鼻閉塞が脾臓NK細胞に及ぼす影響

日本大学大学院松戸歯学研究科歯科矯正学専攻

村上 嘉規

(指導：葛西 一貴 教授)

本稿は、主となる参考論文 Exposure to Mild Hypoxia Associated with Oral Breathing Affects The NK Cell Ratio in The Spleen (*International Journal of Oral-Medical Sciences* Vol 14, No 4, March 2016 掲載予定) および副となる参考論文 鼻閉塞が成長期ラットにおける脾臓NK細胞比率に及ぼす影響 (*Orthodontic Waves-Japanese Edition* 日本矯正歯科学会雑誌 Vol 75, No 1, March 2016 掲載予定)をまとめたものである。

## 1. 緒言

成長期におけるアレルギー性鼻炎，扁桃肥大，副鼻腔炎などの鼻咽腔疾患は鼻閉塞を引き起こし，呼吸形態を正常な鼻呼吸から口呼吸へと変化させる[1]。歯科矯正学分野において，鼻閉塞に伴う口呼吸が慢性化することにより，成長期児童の顎顔面の成長発育が影響を受け，とくに垂直方向の成長が促進すると報告されている[2]。Moss の functional matrix theory[3]では，顔面の成長は頭頸部領域の機能活動と密に関連しているという原理に基づき，成長期における鼻閉塞に伴う鼻から口への呼吸パターンの変化は，頭位，顎位，ならびに舌位を変化させ[4]，結果として下顎骨の後下方回転・上下顎歯列弓の狭小・臼歯の過萌出に伴う顔面高の増大などを引き起こし[5-7]，顎顔面複合体の正常な発育を阻害する[8]としている。

鼻閉塞の全身的な影響として，代償的に生じる口呼吸は酸素の供給量の低下を引き起こす[9]とされ，Lundberg ら[10]は口呼吸を行う事で，鼻呼吸時に副鼻腔内で連続的に排出される血管拡張気体である一酸化窒素（NO）の産生が減少するため，口呼吸時では肺への酸素供給量が低下すると述べている。また，小久江ら[11]は口呼吸における全身への影響に関するアンケート調査を行った結果，口呼吸児童は鼻呼吸児童と比較し，風邪をひきやすいと答えた児童が多かったと報告しており，鼻閉塞による軽度低酸素状態が免疫系に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

以上のことから，重度の低酸素症はチアノーゼや低酸素脳症，中枢神経障害といった症状を引き起こすが，鼻閉塞に伴う代償的な口呼吸は，全身への酸素供給量を低下させ，軽度の低酸素状態を惹起していると考えられるが，生体に及ぼす影響に関しては，現在に至るまで多くは報告されていない。また，低酸素状態がヘルパーT細胞の分化を促進させると報告されている[12]が，免疫細胞に対する酸素濃度の影響についての報告はいまだ少ない。

そこで本研究は、鼻閉塞による軽度低酸素状態が免疫系に及ぼす影響を検証するため、成長期ラットを用いた片側鼻閉塞モデルおよび軽度低酸素モデルを作製し、自然免疫の主要因子として働く細胞傷害性リンパ球の1つであるナチュラルキラー(NK)細胞に及ぼす低酸素状態の影響について検討した。

## 2. 材料及び方法

### 2-1. 実験動物

生後 5 週の Wistar 系雄性ラット (n=120) (三協ラボサービス, 東京) を, 1 週間の予備飼育後, 実験に使用した。飼育条件は, 室温  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 12 時間明暗サイクル (点灯時間: 午前 7 時, 消灯時間: 午後 7 時) とし, 個別に金網ゲージにて飼育した。飼育期間中は, 固形飼料および飲料水を自由に摂取させ, 体重を毎日測定した。本研究は日本大学松戸歯学部動物実験委員会指針 (AP13MD019 号・AP15MD012 号) に基づき実施された。

### 2-2. 鼻閉塞モデルの作製

ラット(n=60)は無作為に, 片側鼻腔の完全閉鎖術を行う鼻閉塞群 (n=30) と対照群 (n=30) の 2 群に分けた。鼻閉塞モデルは Scarano ら[13] の方法を参考に, ペントバルビタール (0.05ml/g) を腹腔内投与し, 全身麻酔下で片側鼻腔に歯科用縮合型シリコン印象材 (GC, 東京) を流し込み, 作製した。対照群には全身麻酔処置による偽手術を施した (Fig.1)。

### 2-3. 軽度低酸素モデルの作製

ラット(n=60)は無作為に, 軽度低酸素群 (n=30) と対照群 (n=30) の 2 群に分けた。軽度低酸素モデルは, 大気中の空気と窒素 (窒素ガスボンベからの供給) の混合気を 0.1%単位で酸素濃度を調整することができる酸素コントローラー (ProOx, Biospherix, NY, USA) を用い, 混合気を供給した小動物実験用チャンバー内に入れ, 作製した。本実験においては, 軽度低酸素状態を再現するために酸素濃度を 18%に設定した。対照群は通常大気下で飼育した (Fig.2)。

#### 2-4. 経皮動脈血酸素飽和度（oxygen saturation pulse oximetry : SpO<sub>2</sub>）の測定

鼻閉塞モデル及び軽度低酸素モデルにおける呼吸状態の確認には、小動物用パルスオキシメーターを使用した。SpO<sub>2</sub> の測定には MouseOx システム(STARR Life Sciences, PA, USA)を用いた。SpO<sub>2</sub> は実験開始後、鼻閉塞群、軽度低酸素群、ならびに各群に対する対照群に覚醒下でラット頸部にセンサーを装着し測定した。すべてのデータは MouseOx ソフトウェア(STARR Life Sciences, PA, USA)を用いて解析した (Fig.3)。

#### 2-5. 試料採取

##### 1) 実験スケジュール

実験開始後の 1, 3, 7, 14, 21 日目において鼻閉塞群、軽度低酸素、ならびに各群に対する対照群、それぞれ 6 匹ずつのラットを炭酸ガスにて安楽死させ、脾臓を摘出した (Fig.4A, B)。

##### 2) 白血球の分離およびNK細胞数の調整

ラットから脾臓を摘出後、組織培養皿に置いてシリンジのプランジャーで静かに押し、メッシュにて脾臓から細胞を分離した。その後、2% new born calf serum (Wako, 大阪) を含む培養液 (RPMI1640, Wako, 大阪) に浮遊させた。細胞懸濁液を 4°C で 1200 rpm, 8 分間遠心分離し、上清を捨てた後、Red Blood Cell Lysis Solution (Wako, 大阪) にて赤血球を破壊した。先程と同じ条件で再び遠心分離し、白血球を分離した。40µm セルストレーナー (BD Bioscience, CA, USA) を通して細胞塊を除き、血球算定板にて白血球数を算定し、 $1 \times 10^7$  個/ml になるように細胞数の調整を行った。

## 2-6. フローサイトメトリー

CD161 抗原はラットにおいて、NK 細胞に対し特異的に発現するタンパク質である [14]。CD3<sup>-</sup>CD161<sup>+</sup>細胞を NK 細胞と考え、フローサイトメトリーを用いて、脾臓リンパ球中 NK 細胞比率を求めた [15,16] (Fig.5)。免疫蛍光染色には FITC 標識 anti-rat CD3 抗体 (clone:1F4, Biolegend, CA, USA), APC 標識 anti-rat CD161 抗体 (clone:3.2.3, Biolegend, CA, USA) を用いた。解析には BD FACS Calibur™ (BD Bioscience, CA, USA) を使用した。

## 2-7. 統計解析

統計分析は各計測項目 (体重, SpO<sub>2</sub>, リンパ球中 NK 細胞比率) について各群共に平均値, 標準偏差を算出するとともに, 群間比較には Mann-Whitney U test を用いて行った。いずれにおいても危険率 5% を統計的有意性の判定基準とした。

### 3. 結果

#### 3-1. 体重測定

1, 3 日目における鼻閉塞群の体重は対照群と比較して有意に高い値を示したが ( $P<0.05$ ) , 7, 14, 21 日目における鼻閉塞群の体重は対照群と比較して有意差は認められなかった (Fig.6 A)。また, 1 日目における軽度低酸素群の体重は対照群と比較して有意に高い値を示したが ( $P<0.05$ ) , 3, 7, 14, 21 日目における軽度低酸素群の体重は対照群と比較して有意差は認められなかった (Fig.6 B)。

#### 3-2. SpO<sub>2</sub> 測定

1, 3, 7, 14, 21 日目における鼻閉塞群の SpO<sub>2</sub> は約 93%で, 対照群と比較し有意に低い値を示した ( $P<0.05$ ) (Fig.7A)。1, 3, 7, 14, 21 日目における軽度低酸素群の SpO<sub>2</sub> は約 94%で, 対照群の SpO<sub>2</sub> と比較し有意に低い値を示した ( $P<0.05$ ) (Fig.7B)。

#### 3-3. リンパ球中 NK 細胞比率

1, 3, 7, 14, 21 日目における鼻閉塞群のリンパ球中 NK 細胞比率は, 対照群と比較して有意に低い値を示した ( $P<0.05$ ) (Fig.8A,B) 。軽度低酸素群におけるリンパ球中の NK 細胞比率は, 1 日目において対照群と比較して有意に高い値を示した ( $P<0.05$ ) が, 7, 14, 21 日目では, 軽度低酸素群ラットにおける NK 細胞比率はいずれも対照群と比較して有意に低い値を示した ( $P<0.05$ ) (Fig.9A,B)。

#### 4. 考察

鼻閉塞ラットを用いた研究で、両側および片側鼻閉塞で鼻上顎複合体の垂直的成長や頭蓋の前後方向への劣成長を誘発することが報告されている [17]。しかしながら、両側鼻閉塞ラットは体重が有意に減少するとの報告があり [18]、本研究の予備実験においても著しく体重が減少した。そこで、体重減少はNK細胞の機能に与える影響が大きい [19] と考え、本実験では体重変化が少なかった片側鼻閉塞とした。実験の結果、1, 3 日目において対照群に比べて鼻閉塞群の体重は減少したが、7, 14, 21 日目において有意差は認められなかった (Fig.6 A)。また、軽度低酸素群は、1 日目において対照群に比べて体重は減少したが、3, 7, 14, 21 日目において有意差は認められなかった (Fig.6 B)。これらの知見は、片側鼻閉塞処置では体重が大幅な減少はしないという Funaki ら [20] の知見と一致するものである。

血中の SpO<sub>2</sub> は 96-99% が基準値とされ、95% 以下で何らかの呼吸障害の存在が疑われる [21]。鼻閉塞群の SpO<sub>2</sub> は実験期間を通じて約 93% であり (Fig.7 A)，軽度低酸素群の SpO<sub>2</sub> と近似した値を示したことから (Fig.7 B)，鼻閉塞モデルラットは軽度低酸素状態であったと考えられる。また、鼻閉塞群及び軽度低酸素群は、SpO<sub>2</sub> の低下状態が継続しているものの、長期的には体重への影響は認められなかった。

免疫系は自然免疫と獲得免疫に大別され、1975 年に Kiessling らおよび Herberman らによって発見されたナチュラルキラー (NK) 細胞は、自然免疫の主要因子として非特異的に働く細胞傷害性リンパ球である。NK 細胞は抗腫瘍作用及び抗ウイルス作用があり、感染または形質転換細胞に対して早期免疫防御に貢献している。一方、獲得免疫には T 細胞及び B 細胞が含まれ、抗原提示により特異的な免疫反応を起こす。近年、自然免疫に含まれる NK 細胞とストレスとの関連について研究が進んでおり、ストレスが視床下部—下垂体—副腎皮質系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA) と

自律神経系の2つの系により、その影響が免疫系に及ぶことが示唆されている[22]。HPA系ではストレスにより、グルココルチコイドの合成・分泌によりNK細胞を含めた免疫細胞を減少させ、自律神経系ではアセチルコリンやサブスタンスPなどの神経伝達物質が受容体を介してNK細胞の機能に影響を及ぼすと考えられている[23]。

本研究で1, 3, 7, 14, 21日目において、いずれも鼻閉塞群のNK細胞比率は対照群と比較し有意に低い値を示した (Fig.8)。Strüderら[24]は低酸素暴露下において、アドレナリン、ノルアドレナリン、グルココルチコイドに含まれるコルチゾールの血中濃度が、通常大気化と比較し有意に高かったと報告している。本研究における鼻閉塞に伴う軽度低酸素状態においても、HPA系と自律神経系の2つの経路を介してNK細胞比率が減少したと推測される。また、軽度低酸素群のNK細胞比率が、3, 7, 14, 21日目において対照群と比較し有意に低い値を示したが、1日目では有意に高い値を示した。急性ストレス状況下では、NK細胞数に表される先天性免疫細胞数が一時的に増加する事が示されており[25]、1日目におけるNK細胞比率の上昇は、軽度低酸素状態による急性ストレスの影響と考えられる(Fig.9)。また本研究では、どの程度の低酸素ストレスが生体に影響を及ぼしているか明らかでないため、内分泌指標として血清内コルチゾール濃度を、自律神経指標として心拍数、血圧、心拍変動数を調査する事が今後必要であろう。

本研究の結果から、片側鼻閉塞は軽度低酸素暴露を介して成長期ラットにおける脾臓NK細胞比率に影響を及ぼすことが明らかになった。本研究では、フローサイトメトリー法におけるNK細胞比率を指標として評価した。このような割合測定は実質的に相対評価であるため、NK細胞数の増減については不明確な部分がある。しかし経時的に両群のNK細胞比率を比較し、対照群のNK細胞比率に大きな変化が見られない事から、軽度低酸素によるストレスがNK細胞比率を減少させたと考えられる。

また, NK 細胞の数と機能は異なる機序で制御されている可能性がある[26]ため, 今後さらなる追求が必要であろう。

## 5. 結論

片側鼻閉塞における軽度低酸素状態が全身に及ぼす影響を検証するため、成長期ラットを用いた片側鼻閉塞モデル及び軽度低酸素モデルを作製し、フローサイトメトリーを用いて、リンパ球中 NK 細胞比率への影響について検討し、以下の結論を得た。

1. 片側鼻閉塞は SpO<sub>2</sub> を低下させ軽度低酸素状態を引き起こす。
2. 片側鼻閉塞による軽度低酸素状態はリンパ球中 NK 細胞比率を低下させる。

以上のことから、片側鼻閉塞は軽度の呼吸障害を引き起こし、成長期ラットのリンパ球中 NK 細胞比率を低下させることにより、免疫系に影響を及ぼす可能性が示唆された。

## 6. 文献

1. Emslie RD, Massler M, Zwemer JD. Mouth breathing : I. Etiology and effects (a review). *J Am Dent Assoc.* 1952; 44: 506-521.
2. Smith RM, Gonzalez C. The relationship between nasal obstruction and craniofacial growth. *Pediatr Clin North Am* 1989; 36: 1423–1434.
3. Moss ML. The functional matrix hypothesis revisited. 1. The role of mechanotransduction. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1997; 112: 8-11.
4. Tourne LP, Schweiger J. Immediate postural responses to total nasal obstruction. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1996; 110: 606-611.
5. Mattar SE, Anselmo-Lima WT, Valera FC, et al. Skeletal and occlusal characteristics in mouth-breathing pre-school children. *J Clin Pediatr Dent* 2004; 28: 315–318.
6. Schlenker WL, Jennings BD, Jeered MT, et al. The effects of chronic absence of active nasal respiration on the growth of the skull: a pilot study. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2000; 117: 706–713.
7. Harari D, Redlich M, Miri S, et al. The effect of mouth breathing versus nasal breathing on dentofacial and craniofacial development in orthodontic patients. *Laryngoscope* 2010; 120: 2089–2093.
8. Fields HW, Warren DW, Black K, et al. Relationship between vertical dentofacial morphology and respiration in adolescents. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1991; 99: 147-154.
9. Niaki EA, Chalipa J, Taghipoor E. Evaluation of oxygen saturation by pulse-oximetry in mouth breathing patients. *Acta Med Iran* 2010; 48: 9-11.
10. Lundberg JO, Settergren G, Gelinder S, et al. Inhalation of nasally derived nitric oxide modulates pulmonary function in humans. *Acta Physiol Scand* 1996; 158: 343-347.

11. 小久江 由佳子, 猪狩 和子, 小松 偉二, 他. 小児の口呼吸に関する実態調査—保育園年長児の保護者に対するアンケート調査—. 小児歯科学雑誌 2003; 41: 140-147.
12. Shi LZ, Wang R, Huang G, et al. HIF1 $\alpha$ -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. J Exp Med 2011; 208: 1367-1376.
13. Scarano E, Ottaviani F, Di Girolamo S, et al. Relationship between chronic nasal obstruction and craniofacial growth: an experimental model. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 1998; 45: 125-131.
14. Inngjerdingen M, Kveberg L, Vaage JT. A novel NKR-P1B(bright) NK cell subset expresses an activated CD25(+)CX(3)CR1(+)CD62L(-)CD11b(-)CD27(-) phenotype and is prevalent in blood, liver, and gut-associated lymphoid organs of rats. J Immunol 2012; 188: 2499-2508.
15. Van den Brink MR, Hunt LE, Hiserodt JC. In vivo treatment with monoclonal antibody 3.2.3 selectively eliminates natural killer cells in rats. J Exp Med 1990; 171: 197-210.
16. Schwartzkopff J, Schlereth SL, Berger M, et al. NK cell depletion delays corneal allograft rejection in baby rats. Mol Vis 2010; 16: 1928-1935.
17. Padzys GS, Tankosic C, Trabalon M, et al. Craniofacial development and physiological state after early oral breathing in rats. Eur J Oral Sci 2012; 120: 21-28.
18. Padzys GS, Omouendze LP. Temporary forced oral breathing affects neonates oxygen consumption, carbon dioxide elimination, diaphragm muscles structure and physiological parameters. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2014; 78: 1807-1812.
19. 久保 千春. 栄養と免疫・アレルギー -環境因子の重要性-. CRJ Letters 1993; 6:

1-8.

20. Funaki Y, Hiranuma M, Shibata M, et al. Effects of nasal obstruction on maturation of the jaw-opening reflex in growing rats. *Arch Oral Biol* 2014; 59: 530-538.

21. 相澤 久道, 阿部 直, 安藤 守秀, 他. 呼吸機能検査ガイドラインⅡ— 血液ガス, パルスオキシメーター — 日本呼吸器学会 2006; 34-37.

22. 出村 博. ストレスとホルモン. *日本内分泌学会誌* 1994; 70: 479-488.

23. 小島 英史. ストレスと免疫系 細胞性免疫を中心に. *アニムス* 2008; 13; 21-24.

24. Strüder HK, Hollmann W, Donike. Effect of O<sub>2</sub> availability on neuroendocrine variables at rest and during exercise: O<sub>2</sub> breathing increases plasma prolactin. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996; 74: 443-449.

25. Oya H, Kawamura T, Shimizu T, et al. The differential effect of stress on natural killer T (NKT) and NK cell function. *Clin Exp Immunol* 2000; 121: 384-90.

26. Espi A, Arenas J, Garcia-Granero E, et al. Relationship of curative surgery on natural killer cell activity in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 429-34.

## 図および表

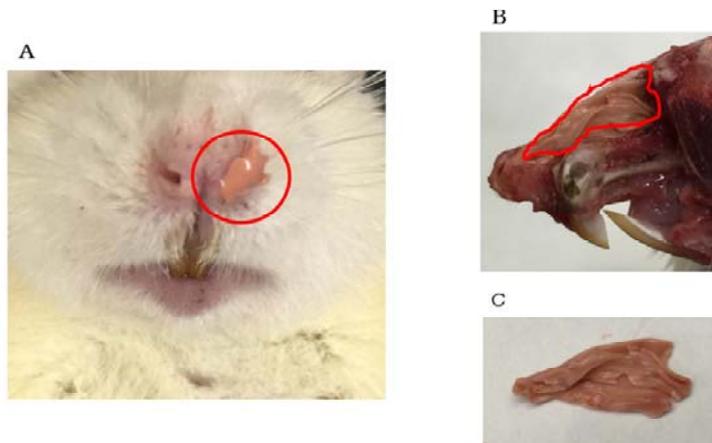


Fig.1 シリコン印象材を用いた片側鼻閉塞処置

シリコン印象剤をラットの鼻腔奥深くまで挿入 (A) し、片側鼻閉塞状態を再現した。鼻閉塞状態での頭蓋部横断面 (B) と、印象材を取り出した写真 (C) を示す。



Fig.2 軽度低酸素チャンバー

軽度低酸素モデルは、窒素ガスをチャンバー内に混入させる事で作製した。酸素濃度は常時18.0%に設定した。



Fig. 3 経皮動脈血酸素飽和度 (SpO<sub>2</sub>) の測定

小動物専用パルスオキシメーターを使用し、SpO<sub>2</sub>の測定を行った。頸部にセンサーを取り付け、リアルタイムでパソコン上でSpO<sub>2</sub>をモニタリングし、連続する10秒間の平均値で算出した。

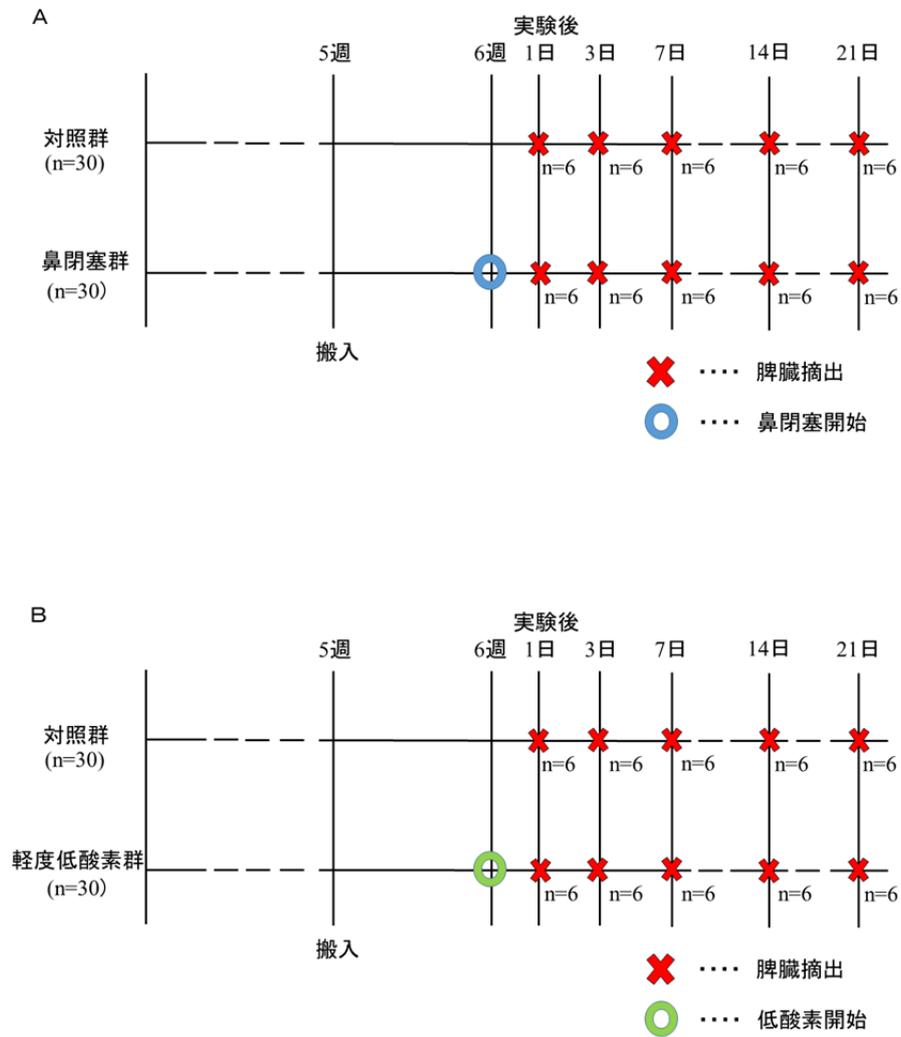


Fig.4 実験スケジュール

鼻閉塞群における実験スケジュール (A) および、軽度低酸素群における実験スケジュール (B) を示す。

鼻閉塞群は6週齢で鼻閉塞処置を開始し、軽度低酸素群は6週齢で低酸素チャンバーに入れることで実験を開始した。開始後、1、3、7、14、21日目に、フローサイトメトリーを用いてラットの脾臓を取り出し、リンパ球中のNK細胞比率を測定した。

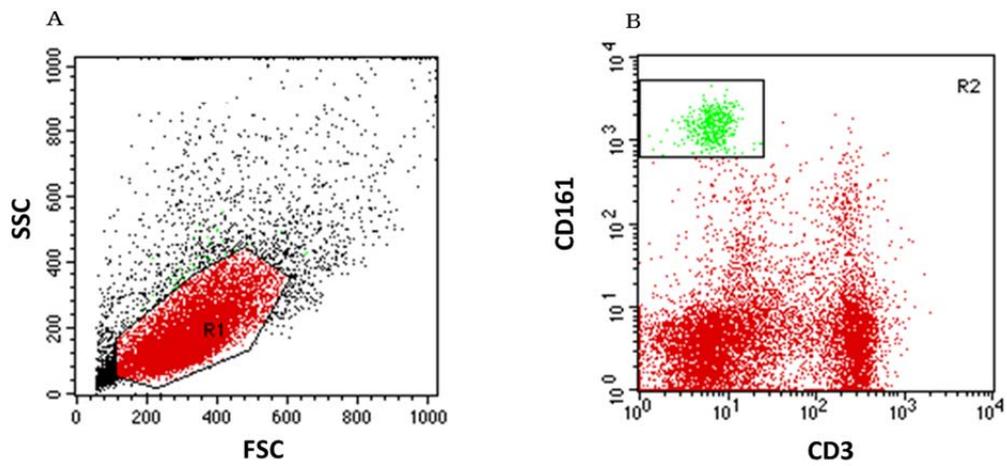


Fig. 5 フローサイトメトリーによるFACS像

摘出した脾臓をフローサイトメトリーを用いて解析した。鼻閉塞群，軽度低酸素群，ならびに各群に対する対照群において，白血球中のリンパ球(R1；赤)を分画(A)後，さらにCD3抗体およびCD161抗体を用いて，NK細胞(R2；黄緑)を展開(B)した。

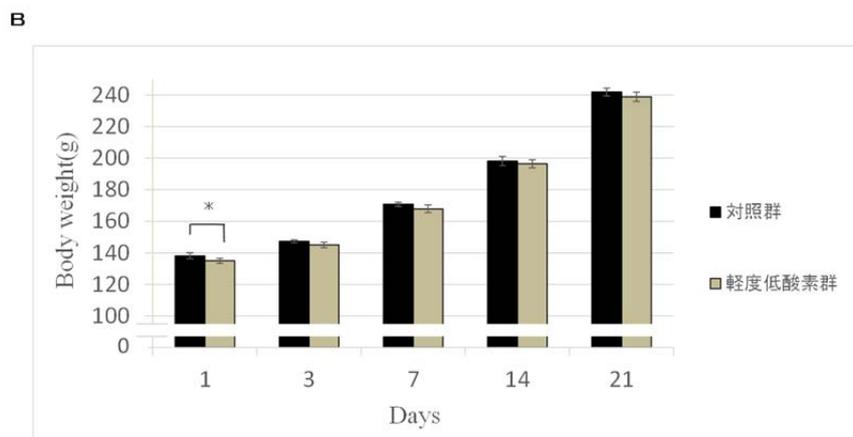
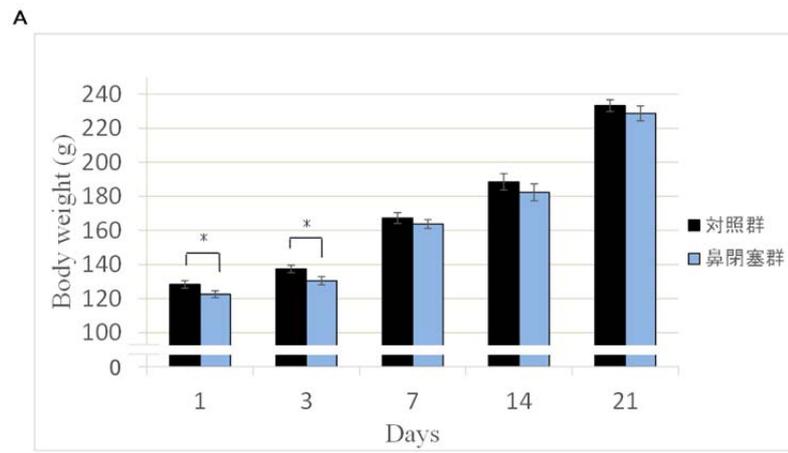


Fig.6 体重測定

鼻閉塞群と対照群の体重変化 (A) および、軽度低酸素群と対照群の体重変化 (B) を示す。鼻閉塞群と対照群、および軽度低酸素群と対照群の体重変動において、共にキャッチアップが認められた。 (\*:  $P < 0.05$ )

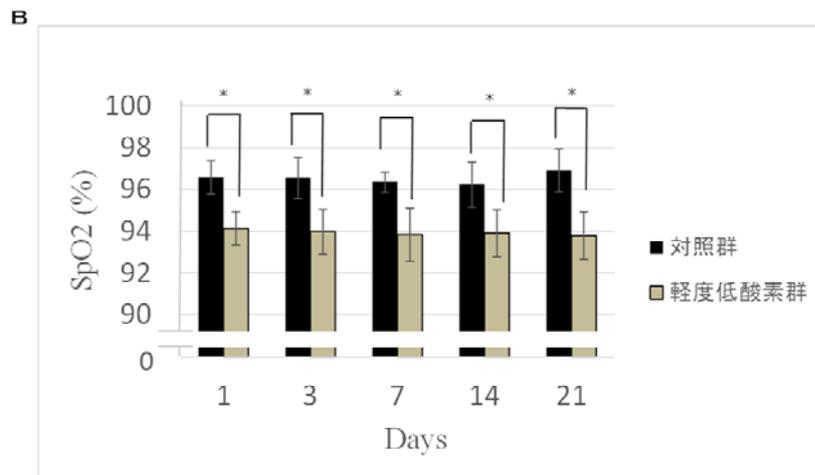
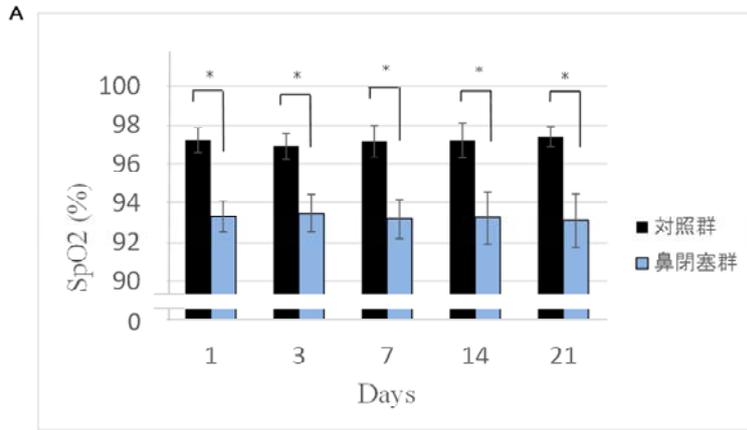


Fig. 7 経皮動脈血酸素飽和度(SpO2) (%) の測定

実験開始21日目までの鼻閉塞群と対照群 (A) , および, 軽度低酸素群と対照群 (B) のSpO2の変動を示す。鼻閉塞群および軽度低酸素群のSpO2は, 共に基準値の下限である95%をすべての日数で下回っていた。(\* :  $P < 0.05$ )

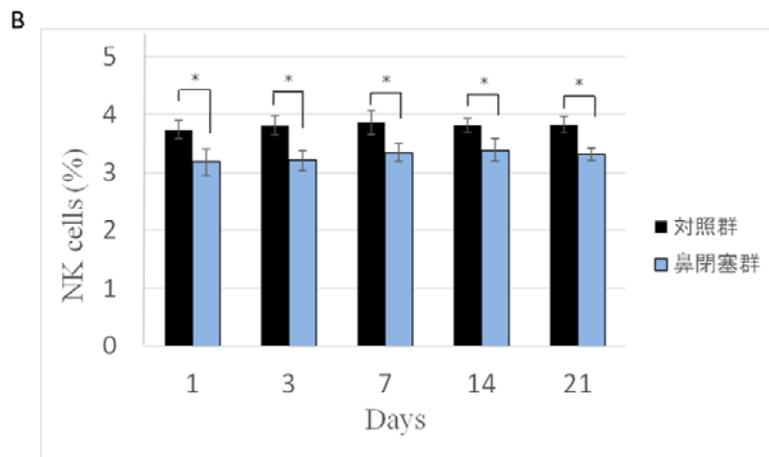
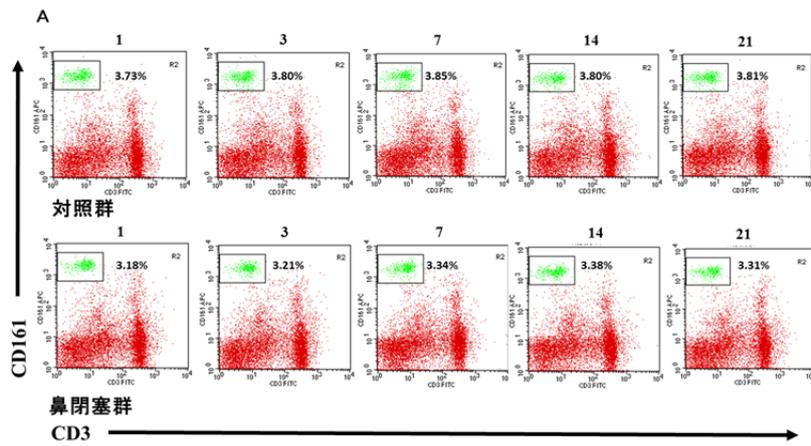


Fig. 8 鼻閉塞モデルにおけるリンパ球中NK細胞比率の評価

鼻閉塞群と対照群とのフローサイトメトリーにおけるFACS像 (A) と、リンパ球中に占めるNK細胞 (図A緑) の比率 (B) をグラフに示す。鼻閉塞群のリンパ球中NK細胞比率は、すべての日数で有意に低い値を示した。 (\* :  $P < 0.05$ )

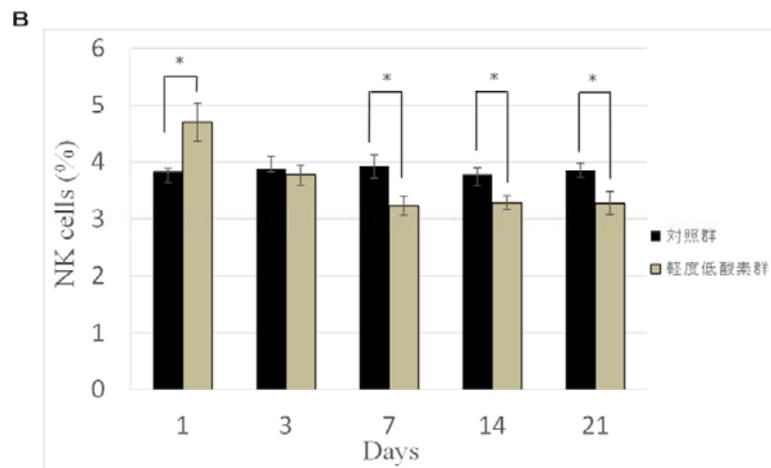
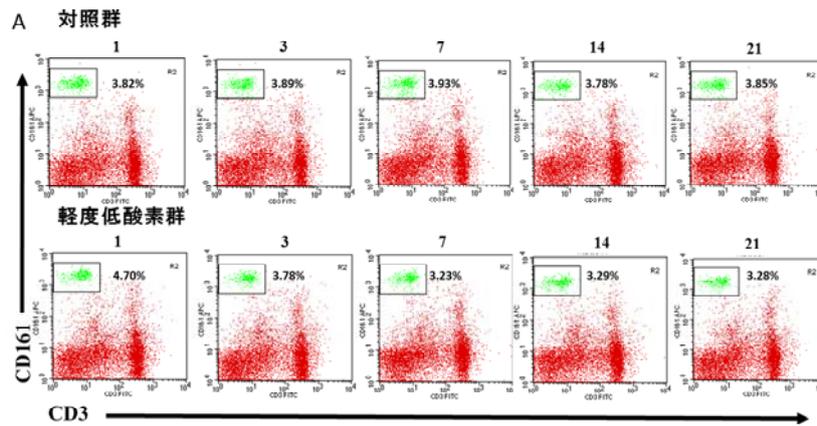


Fig. 9 軽度低酸素モデルにおけるリンパ球中NK細胞比率の評価

軽度低酸素群と対照群とのフローサイトメトリーにおけるFACS像 (A) と、リンパ球中に占めるNK細胞 (A, 緑) の比率 (B) をグラフに示す。1日目において、軽度低酸素群のリンパ球中のNK細胞比率が有意に高い値を示した。(\* :  $p < 0.05$ )