

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10198

研究課題名(和文) 成長期鼻呼吸障害の早期改善による顎顔面成長機構への影響と治療意義の解明

研究課題名(英文) Differential Recovery Patterns of the Maxillofacial bone and muscles after eliminating nasal obstruction in growing rats

研究代表者

米満 郁男 (Yonemitsu, Ikuo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00431940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラット鼻呼吸障害回復モデルを作成し、成長期の鼻閉からの回復がもたらす顎顔面骨格の変化、さらには咀嚼筋の筋組成ならびに筋収縮特性の変化を明らかにすることで、その治療最適時期を解明することを目的とした。

4週齢Wistar系雄性ラット42匹を全6群(対照群、1週回復群(以下W1群)、W3群、W5群、W7群、W9群(各群 n 7))に無作為に分け実験を行った。実験群は吸入麻酔後に左鼻孔を縫合し、抜糸により回復した。全ての群を13週齢まで飼育し、屠殺した。組織・生化学的実験の結果、硬組織および軟組織の両面から、その最適時期ならびにその臨界期を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鼻閉は口呼吸を誘発し、全身に様々な悪影響を与えることが報告されている。鼻閉モデルを用いた基礎研究において、咀嚼筋の成長阻害を介した下顎骨・下顎頭成長の抑制が明らかにされてきた。しかし、鼻呼吸障害に対する介入による顎顔面への影響や、その成長回復が何歳まで期待できるかという臨界期を明らかにした研究は存在しない。

本研究において、成長期ラット鼻呼吸障害モデルを用いて、鼻閉解除後に顎顔面形態が正常な成長を遂げるかを明らかにし、形態学および組織学観点から最適な介入時期を明らかにしたことは、小児の顎顔面成長を明らかにする上で、大変重要な意義を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Nasal obstruction during growth has a suppressive effect on maxillofacial growth, however, there are no previous studies that have clarified whether it is possible to recover to the normal growth volume by improving nasal obstruction and the optimal timing of its treatment.

In this study, we clarified these issues using a rat model for restoring nasal obstruction. Forty-two 4-week-old male Wistar rats were randomly divided into six groups (C, W1, W3, W5, W7 and W9) according to the timing of recovery(n=7). The left nostril was sutured and removed to reproduced unilateral nasal obstruction and its recovery. Morphological growth recovery of the maxillary and mandibular bones and masticatory muscles were observed when the nasal breathing disorder was recovered, suggesting that the optimal timing for each area.

研究分野：矯正歯科

キーワード：鼻呼吸障害 上顎骨 下顎骨 咀嚼筋 顎顔面成長 回復

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

鼻閉は口呼吸を誘発し、その結果、血中酸素飽和度(SpO<sub>2</sub>)を低下することで全身に様々な悪影響を与えることが報告されている。特に顎顔面成長における抑制的な影響は大きく、臨床研究より、口蓋平面の下方成長、上顎骨の狭窄、高口蓋ならびに下顎骨の垂直方向への成長を助長するとの報告がある。

鼻閉に伴う咀嚼筋の変化として、我々は基礎研究において、鼻呼吸群と比較して口呼吸群では、筋断面積が小さくなることや、筋組成が遅筋化することを報告してきた。また、顎顔面形態が変化する要因として、顎顔面筋の成長阻害を介した骨成長の抑制や、低酸素誘導因子(HIF-1)の発現増加による下顎頭軟骨の成長阻害と軟骨下骨における破骨細胞の活性化が生じていることが明らかにしてきた。このように、鼻閉が顎顔面成長に与える影響に関する報告は見受けられるものの、鼻呼吸障害を改善した場合の影響について検討した研究は殆ど存在しない。

臨床研究において、アデノイド肥大に伴う鼻呼吸障害を呈する患者に対して、アデノイド切除術を行うことで鼻呼吸を改善させると、下顎の成長が健常者の成長量まで回復したことが報告されている。アデノイド切除術は肥大の罹患率の高い4~7歳で施行されることが多いが、鼻呼吸障害に対する介入により顎顔面の成長回復が何歳まで期待できるかという臨界期を明らかにした研究は存在しない。

### 2. 研究の目的

成長期ラット鼻呼吸障害モデルを用いて、鼻閉塞解除後に顎顔面骨格ならびに咀嚼筋が正常な成長を遂げるかどうかを明らかにし、鼻呼吸障害に対する最適な介入時期と臨界期を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

4週齢 Wistar 系雄性ラット 42匹を全6群(対照群と実験5群)に無作為に分けた。実験群は左鼻孔を縫合することで閉塞し、抜糸により回復[1週回復(W1)群、W3群、W5群、W7群およびW9群(各n=7)]した。全ての群は13週齢でCO<sub>2</sub>ガスにて屠殺し、観察した。実験期間中、SpO<sub>2</sub>および体重を経時的に測定した。

Micro CT(電圧75kV、電流30mA)によりラットの頭蓋骨を撮影した。上下顎骨の部位各9項目を、3次元画像解析ソフト(TRI/3D-BON)を用いて計測した。鼻腔体積の計測は、CT画像から空気占有部分を抽出し、その体積を計測した。Micro CTによる形態学的評価の後、顎関節とその周辺組織をパラフィン包埋し、マイクロームで厚さ6μm顎関節矢状断切片を作製した。

各切片は、それぞれトリイジンブルー染色および免疫組織染色として抗HIF-1抗体、抗RANKL抗体および抗OPG抗体の3種類を用いて行った。測定項目は、軟骨層の厚み、各種免疫染色における陽性細胞率、ならびに軟骨下骨におけるRANKL/OPG比とした。軟骨層の厚みは、先行研究に基づき、線維層、増殖細胞層、成熟細胞層、ならびに肥厚細胞層の4層に分け、画像解析ソフトを用いてそれぞれの厚さを測定した。統計学的解析にはTukey法およびピアソンの相関(p<0.05)を用いた。

閉口筋である咬筋・側頭筋に加え、開口筋である顎二腹筋を観察した。屠殺直後に各被験筋を起始・停止部より切除、摘出し、急速冷凍保存後、10マイクロメートル凍結連続切片を用いたATPase染色を行い、筋線維タイプの改変を明らかにした。

各咀嚼筋筋収縮能の変化をGLUT4および拮抗するタンパクであるTNF- $\alpha$ の免疫組織化学染色を行うとともに、RT-PCR法を用いて定量化した。

### 4. 研究成果

6群間の体重に有意な差は認められなかった。SpO<sub>2</sub>はW7群以降で有意に減少した。

下顎骨はGo-MnのみにおいてW7群以降で有意に減少した。その他の下顎骨計測値においては有意な変化は認められなかった。それに対し上顎骨は、どの計測値も減少した。特にANS-PNSにおいてはW5群より有意に減少した。気道体積はW1群より有意に減少した。

下顎頭軟骨のトリイジンブルー染色を行い、superior regionにおける軟骨層の厚みを計測した結果、軟骨層全層、特に肥大細胞層において、W7群以降に有意に減少した。線維層、増殖細胞層、成熟細胞層においては有意な差は認められなかった。

HIF-1は、肥大細胞層に特異的に発現していた。一方、OPGとRANKLは、肥大細胞層と軟骨下骨との境界で特異的に発現していた。HIF-1陽性細胞率は、W5、W7およびW9群では、対照群と比較して有意に高かった。HIF-1陽性細胞率は、肥大細胞層の厚さと有意な負の相関を示した。OPGは、W7およびW9群で有意に減少、一方でRANKLは、W7およびW9群で有意に増加した。RANKL/OPG比は、W7およびW9群で対照群と比較して有意に高かった。SpO<sub>2</sub>は、HIF-1およびRANKL陽性細胞率、ならびにRANKL/OPG比と有意な負の相関を示した一方で、OPG陽性細胞率とは有意な正の相関を示した。

咬筋と側頭筋の筋断面積は W5 群以降は鼻閉回復後も有意に減少した。ATPase 染色において、MHC-2b 線維の割合は、咬筋で W7 群以降の回復で、側頭筋では W9 群で有意に減少した。PCR の結果、咬筋では TNF は W7 群以降の回復で有意に増加、GLUT4 は W9 群で有意に減少、nNOS は W9 群で有意に増加した。また、側頭筋においては TNF は W9 群で有意に増加、GLUT4 は W9 群で有意に減少、nNOS は W9 群で有意に増加した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keitoku Mirei, Yonemitsu Ikuo, Ikeda Yuhei, Tang Huan, Ono Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Differential Recovery Patterns of the Maxilla and Mandible after Eliminating Nasal Obstruction in Growing Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 7359 ~ 7359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm11247359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 慶徳 美怜, 米満 郁男, 池田 侑平, 湯 歆, 小野 卓史
2. 発表標題 成長期ラットにおける鼻呼吸障害の回復がもたらす上下顎骨の形態学的変化とその最適時期の解明
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keitoku Mirei, Yonemitsu Ikuo, Ono Takashi
2. 発表標題 Differential recovery patterns in the maxillary and mandibular bones from nasal obstruction in the growing rats
3. 学会等名 第87階口腔病学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清水 康広 (Shimizu Yasuhiro) (60631968)	東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師  (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	慶徳 美伶  (Keitoku Mirei)	東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・大学院生  (12602)	
研究協力者	池田 侑平  (Ikeda Yuhei)	東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・非常勤講師  (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関