

口唇裂自然発症胎児マウス(CL/Fraserマウス) での 外科的口唇閉鎖術の可能性と有効性の検索

小濱, 一睦
九州大学大学院歯学研究院顎顔面病態学講座

野中, 和明
九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座小児口腔医学分野

長田, 哲次
九州大学大学院歯学研究院顎顔面病態学講座

緒方, 克哉
九州大学大学院歯学研究院顎顔面病態学講座

他

<https://doi.org/10.15017/7183577>

出版情報：福岡醫學雑誌. 93 (1), pp.11-16, 2002-01-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



原 著

口唇裂自然発症胎児マウス (CL/Fraser マウス) での
外科的口唇閉鎖術の可能性と有効性の検索

九州大学大学院歯学研究院顎顔面病態学講座

*九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座小児口腔医学分野

小濱一睦・野中和明*・長田哲次

緒方克哉・細川亮一・大石正道

A Study of the Feasibility and Efficacy of Fetal Surgical Closure of
Spontaneous Cleft Lip in CL/Fraser MiceKazutoki KOHAMA, Kazuaki NONAKA*, Tetsuji NAGATA,
Katsuya OGATA, Ryouichi HOSOKAWA and Masamichi OHISHI*Division of Maxillofacial Diagnostic and Surgical Sciences, Faculty of
Dental Science, Kyushu University***Pediatric Dentistry, Division of Oral Health, Growth & Development,
Faculty of Dental Science, Kyushu University*

Abstract Cleft lip with or without cleft palate is one of the most common human craniofacial congenital malformations. Failure to form a continuous tissue in the upper lip during the early embryonic period results in cleft lip. There has been an increasing interest in the possibility of in-utero correction of life threatening fetal abnormalities. In the present study, the feasibility and efficacy of surgical suturing of the fetal mouse lip was examined by using CL/Fraser mouse fetuses (spontaneous of cleft lip) at embryonic 15, 16 or 17 days. The obtained results were as follows.

#1. Abortion rate of pregnant dam applied inhalation of Ethrane was less than that of intraperitoneal injection of Nembutal.

#2. Successful delivery rate of fetal mouse surgically treated at the embryonic 16 day or 17 day is higher than that on the embryonic 15 day.

#3. Fusion rate of mouse fetal lip surgically treated on the embryonic 16 day was higher after 60 hours in dam's uteri than that after 36 hours.

These results suggest that inhalation of Ethrane is more recommendable, and that the optimal timing of fetal surgery of spontaneous cleft lip in CL/Fr. mouse fetus is an embryonic 16 day, and that the average time of 60 hours after surgical operation is enough for sutured lip to fuse in dam's uteri.

Key words: fetal microsurgery, spontaneous incidence of cleft lip, CL/Fr mouse fetus, anesthesia

はじめに

最近の周産期医療の発展には目覚ましいものがある⁹⁾¹⁰⁾。超音波検査、胎児鏡などの出生前診断法の発展により、先天異常の早期発見が可能となった。現在、胎児外科を先天異常の出生前治療に応用し、

形態と機能の両面から正常な新生児として分娩させることが試みられるようになってきた。したがって発生率の高い先天異常のひとつである口唇口蓋裂に対する治療法として、胎児期の外科的口唇閉鎖術を行う選択肢も将来的には考えられる⁹⁾。胎児外科の手技は、実験動物を用いた先天性奇形

について実験的出生前治療法の開発において応用されてきた。古くはブタに胎児外科を試み成功した例から始まり、マウスやウサギの胎児外科も同様に報告されている²⁾。このように胎児期の治療過程を明らかにしようとする実験動物を用いた多くの研究が報告されている^{1)4)~7)9)11)}。催奇形物質を用いて口唇裂を誘発したマウスと口唇裂自然発症マウスに胎児外科を施した実験系では、催奇形物質の全身的悪影響を考慮すると、口唇の再癒合のメカニズムにおいて相違が生じる可能性が推測される。ところが口唇裂自然発症マウス (CL/Fraser マウス) を用い、胎児マウスの外科的口唇閉鎖術を試みた研究はいまだない。そこで本研究の目的は、口唇裂自然発症マウス (CL/Fr マウス) を用いて、胎児マウスの外科的口唇閉鎖術の可能性と有効性を実験動物学的に検索することにある。

実験動物と実験方法

1. 実験動物

口唇裂自然発症マウス (CL/Fr) の口唇裂自然発症率は約 25% である⁴⁾。本研究では CL/Fr 系統成獣雄雌マウス間で一晚のみの同居交配を行った。即ち、発情期にある雌マウスと雄マウスを 1 匹ずつ一晚同一ゲージに入れ、翌朝膣栓の存在によって交尾を確認した。膣栓を認めた日の午前 12 時 00 分を、胎齢 0.5 日と定義し、妊娠マウスを隔離飼育した。

2. 麻酔法

麻酔法は過去に多く使用されているネブタール腹腔内麻酔法 (20 mg/母獣マウス体重) とエトレン吸入麻酔法の両方についての有効性を検討した。

3. 手術用器具

妊娠母獣マウスの開腹手術用器械として、眼科用セーレ、モスキートペアン、ヘーガル持針器、アドソン有鉤ピンセットを用意した。妊娠母獣マウスの子宮切開ならびに胎児マウスの手術用器械として、microsurgery 用セーレ、microsurgery 用持針器と microsurgery 用顕微鏡を用意した。縫合糸は母獣マウスの開腹手術用に 6-0 ナイロン糸、母獣マウスの子宮閉鎖ならびに胎児マウス外科的口唇閉鎖術用として 11-0 ナイロン糸を用いた。

4. 胎児マウスの外科的口唇閉鎖術法 (図 1)

実験動物は、次の 4 群に分けた。

A 群：口唇裂発症マウス外科的口唇閉鎖術群

B 群：口唇裂発症マウス非処置群

C 群：正常マウス外科的口唇閉鎖術群

D 群：正常マウス非処置群

まず妊娠母獣マウスにネブタール腹腔内麻酔またはエトレン吸入麻酔を施した (図 1 a)。次に正中背部皮膚に切開を入れ、卵巣及び子宮の位置を腹膜上より確認した。これを一塊として取り出した (図 1 b)。子宮は極力腹腔内に保ち、乾燥や冷却などの不都合な刺激を可及的に避けた。子宮膜を通して、胎児マウスの各部分は判別可能であり、顕微鏡下にて子宮外から口唇裂の有無を確認した。さらに子宮膜の毛細血管の乏しい部位で、胎児の頭部付近に眼科用メスで切開を加えた。続いて羊膜、絨毛膜に切開を加え、口唇及び鼻部のみを露出させた。子宮切開口は術野となる胎児マウスで塞ぎ、羊水の漏出を最小限に留めた。温生食水の散布を行い、子宮壁ならびに胎児の低体温と乾燥を防いだ。胎児マウス上口唇の裂隙端を切開した後、11-0 ナイロン糸を用いて顕微鏡下で外科的に縫合閉鎖した (図 1 c, d)。次に胎児の口唇及び鼻部を子宮内に戻し、腹膜を 11-0 ナイロン糸にて縫合した。最後に背部を 6-0 ナイロン糸で縫合し、一連の外科的口唇閉鎖術を終了した。胎児マウス外科的口唇閉鎖術法に要した平均時間は、12 分であった。その後子宮内での胎児マウスの発育を促し、分娩直後の新生児マウスを得た。口唇裂新生児マウスが母獣マウスに食殺されることを防止するための工夫として、飼育ゲージを二重底とした。

5. 組織学的検索法

得られた新生児マウスの口唇部を 4% Paraformaldehyde で 24 時間固定した後、ライカ社製ミクロトームで約 4 μ m の厚さに薄切した。通法に従ってヘマトキシリン・エオジンによる 2 重染色法を行い、顕微鏡下にてその組織像を観察した。

結 果

1. 胎児マウスの外科的口唇閉鎖術における麻酔法

胎齢 15 日齢 (3 例)、16 日齢 (3 例) および 17 日齢 (3 例) の妊娠母獣マウスにネブタール腹腔内麻酔を施した。口唇閉鎖術後 24 時間以内に胎

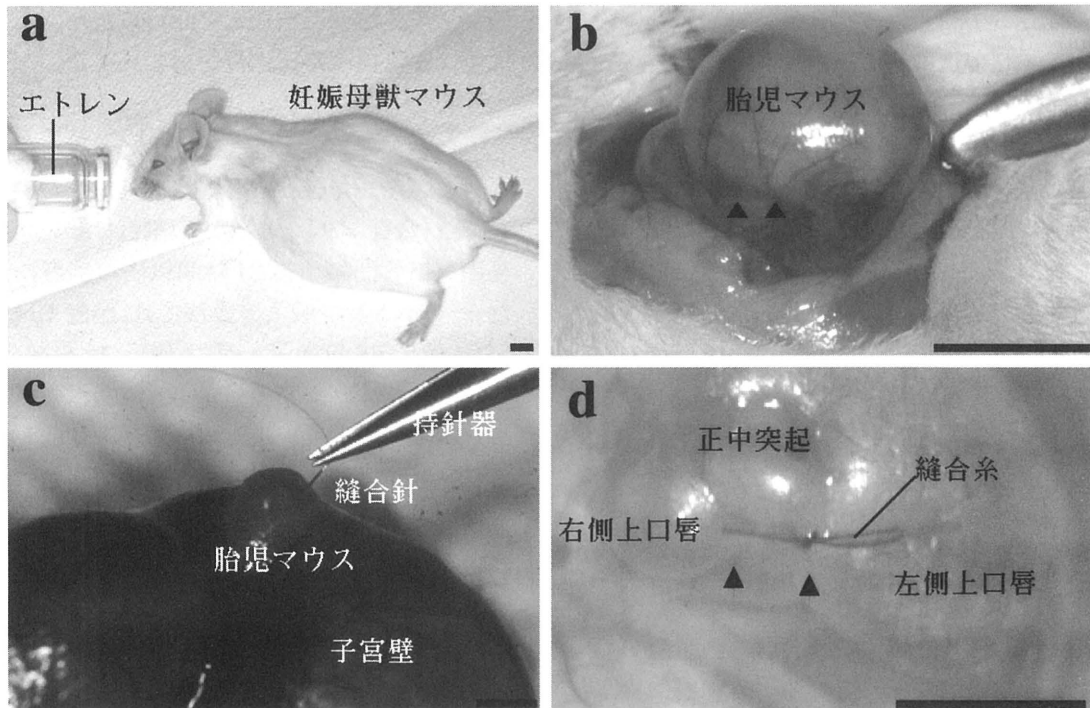


図1 胎児マウスの外科的口唇閉鎖術

成獣マウスにネンプタル腹腔内麻酔またはエトレンを用い吸入麻酔を施した(図1 a)。次に正中背部皮膚に切開を入れ、卵巣及び子宮の位置を腹膜上より確認した。これを一塊として取り出した(図1 b)。子宮膜の毛細血管の乏しい部位で、胎児の頭部付近に眼科用メスで切開を加えた。続いて羊膜、絨毛膜に切開を加え、口唇及び鼻部のみを露出させた。口唇の裂隙端を切開した後、11-0 ナイロン糸を用いて顕微鏡下で外科的に縫合閉鎖した(図1 c, d)。スケール・バーは1 cm である。

児マウスが母獣マウスより出産された場合を早産と定義した。その結果、いずれの胎齢においても100% (合計: 9 例/9 例) の早産が生じ、十分に発達した胎児マウスを得ることが出来なかった。そこで次にエトレン吸入麻酔法を妊娠母獣マウスに施したところ、胎齢15日齢(4例)、16日齢(4例)および17日齢(4例)のいずれの日齢の妊娠母獣マウスでも、早産は起きることなく100%(合計: 12 例/12 例) の成功率を得た。

2. 胎児マウスの外科的口唇閉鎖術に適した時期

胎齢15日齢に外科的口唇閉鎖術を施した胎児マウスにおいては、24時間以内に早産するか、または胎齢19日齢の満期分娩時まで吸収された例が25%(4例/16例)もあり、必ずしも満足のいく結果を得ることができなかった。胎齢16日齢に外科的口唇閉鎖術を施した胎児マウスにおいては、早産率は2.6%(1例/38例)と低かった。さらに胎齢17日齢に外科的口唇閉鎖術を施した胎児マウスにおいては、早産率は0%(0例/23例)

であった。しかし大多数の胎児マウスは胎齢19日齢で自然分娩されるため、胎齢17日齢で外科的口唇閉鎖術を施された胎児マウスは母獣マウスの子宮内で発育する時間が不十分であったため、口唇癒合にいたらなかった。以上の結果より、胎齢16日齢での外科的口唇閉鎖術が、口唇閉鎖術後の口唇癒合のプロセスを検索して行く上で最適の時期であると考えることができた。

3. 胎児マウスの外科的口唇閉鎖術後の癒合率(図2)

胎齢16日齢での外科的口唇閉鎖術を施行した胎児マウスは、A群(口唇裂発症マウス口唇閉鎖術群)19例、B群(口唇裂発症マウス非処置群)19例、C群(正常マウス口唇閉鎖術群)19例、D群(正常マウス非処置群)20例の4群に分類して、外科的口唇閉鎖術後の癒合率を検索した。外科的口唇閉鎖術後平均36時間(±12時間)で分娩された新生児マウスでは、口唇裂発症マウス外科的口唇閉鎖術群で8.3%(1例/12例)のみ口唇の癒合を認めた。しかし他の口唇裂発症マウス非処

置群 (0 例/9 例) や正常マウス外科的口唇閉鎖術群 (0 例/10 例) では口唇の癒合を認めなかった。外科的口唇閉鎖術後平均 60 時間 (±12 時間) で分娩された口唇裂発症マウス (7 例/7 例), 正常マウス (9 例/9 例) の外科的口唇閉鎖術群においては 100% の割合で癒痕を伴わない口唇での間葉組織の癒合を認めた。コントロール群である口唇裂発症マウス非処置群においては, 外科的口唇閉鎖術後 36 時間 (±12 時間) と 60 時間 (±12 時間) のいずれかにおいても口唇の癒合を認めることはなかった。

4. 胎児マウス外科的口唇閉鎖術後の組織学検索所見 (図 3)

図 3 a は, 両側性口唇裂発症マウス非処置群の組織像を示している。図 3 b は, 口唇裂発症マウス切開縫合群の外科的口唇閉鎖術後 36 時間~48 時間経過した組織像を示している。外科的口唇閉鎖術後 36 時間~48 時間では, 口唇上皮が切開部に移入し, さらに一部では再癒合に関わっていると思われる間葉細胞の存在を示す組織像が認められた。図 3 c は, 口唇裂発症マウス切開縫合群の外科的口唇閉鎖術後 60 時間の組織像を示している。口唇裂発症マウスに外科的口唇閉鎖術を施した群では, 多くの間葉細胞と細胞外マトリックスにより満たされた組織の癒合がみられた。切開を加えた直後には赤血球の浸潤を多く認めたが外科的口唇閉鎖術後 60 時間経過した組織では癒痕の原因の一因と考えられる炎症細胞やリンパ球の浸潤を認めなかった。図 3 d は正常マウス非処置群の組織像を示している。皮膚付属器官である小唾

液腺・皮脂腺や毛根などが認められた。△は癒合部位, ▲は口唇裂隙部位を示す。

考 察

ネンブタール腹腔内麻酔法を利用した例では, 100% (合計: 9 例/9 例) の割合で胎児マウスの早産 (口唇閉鎖術後 24 時間以内の出産) を認めた。一方エトレン吸入麻酔法では, 胎齢 15 日齢 (4 例/4 例), 16 日齢 (4 例/4 例), 17 日齢 (4 例/4 例) のいずれも早産は起きず 100% の成功率を得た。ネンブタール腹腔内麻酔法と比較して, エトレン吸入麻酔法の成績が良好であった理由としては, 母獣マウスの麻酔の深度と時間の調節が可能であり, 母体に与える影響が小さかった点と短時間での薬物代謝により胎児マウスへの影響を軽減できた点などが考えられる。また胎齢 15 日齢で胎児マウスの外科的口唇閉鎖術を施すと 25% (4 例/16 例) という割合での早産率を示した。さらに胎齢 17 日齢で胎児マウスの外科的口唇閉鎖術を施した場合は, 口唇の癒合に必要なかつ十分な在胎期間を提供できなかった。従って我々は, 胎児マウスの外科的口唇閉鎖術後の口唇癒合プロセスを検索して行く上で適した時期は胎齢 16 日齢であると判断した。

胎齢 16 日齢の外科的口唇閉鎖術後 24 時間~36 時間の間に分娩した新生児マウスについては A 群の口唇裂発症マウス口唇閉鎖術群 12 例中 11 例, C 群の正常マウス口唇閉鎖術群 10 例中 10 例の合計 22 例中 21 例で口唇が離開していた。この結果より, 口唇裂発症胎児マウスおよび正常胎児マウ

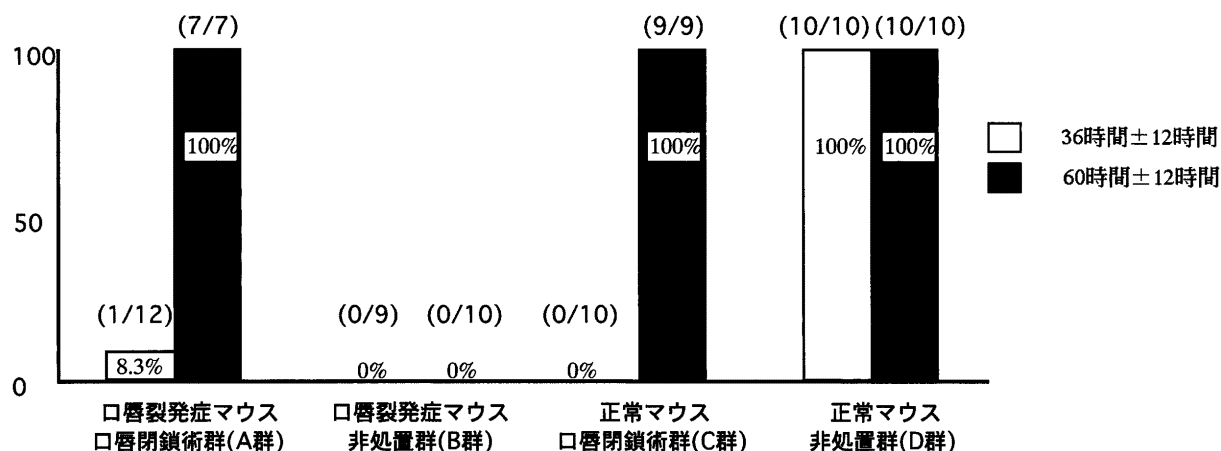


図 2 胎児マウスの外科的口唇閉鎖術後の癒合率

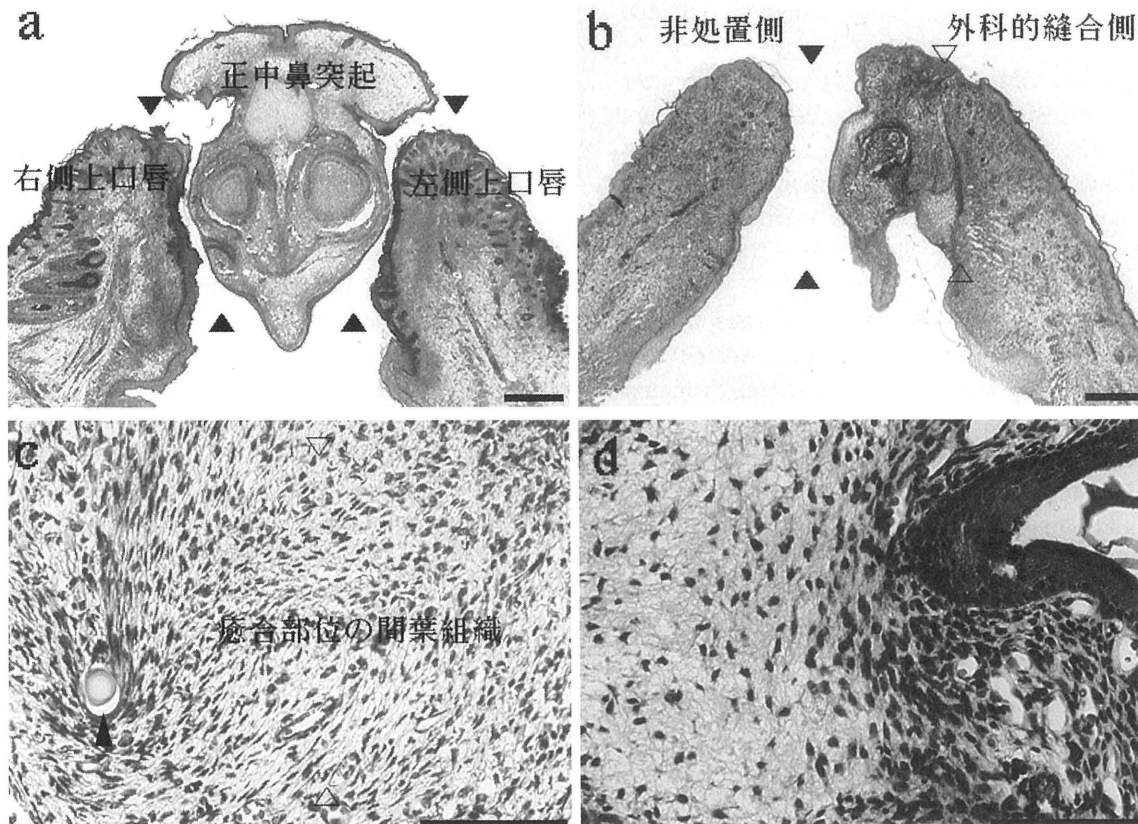


図3 胎児マウスの外科的口唇閉鎖術後の組織学的所見
口唇裂発症マウス非処置群 (図3 a), 口唇裂発症マウスでの口唇閉鎖術後 36 時間～48 時間 (図3 b), 口唇裂発症マウスでの口唇閉鎖術後 60 時間 (図3 c), 正常マウス非処置群 (図3 d). スケール・バーは, (a) と (b) で 5 mm, (b) と (d) で 100 μ m である.

スの外科的口唇閉鎖術後 24 時間～36 時間経過では, 口唇の裂隙端での組織学的癒合は生じていないことが判明した. また外科的口唇閉鎖術後 36 時間～48 時間では, 口唇上皮が切開部に移入し, さらに一部では再癒合に関わっていると思われる間葉細胞の存在を示す組織像が認められた. また同両群では, 外科的口唇閉鎖術後平均 60 時間で 100% (16 例/16 例) の割合で口唇の間葉組織の組織学的癒合が認められた. 胎児マウス口唇の裂隙端の組織的癒合は外科的口唇閉鎖術後平均 60 時間経過するとほぼ完了することを示唆していた. 口唇裂発症胎児マウスの外科的口唇閉鎖術群と同様に正常胎児マウスの外科的口唇閉鎖術群でも, 癒合を伴わない癒合を示した. このことから外科的口唇閉鎖術後の口唇間葉組織の癒合は, 口唇裂発症胎児マウスについてだけではなく正常胎児マウスについても類似した現象であると考えられた. 今回行った胎児外科的口唇閉鎖術は, 平均 12 分間 (最長 15 分間) で一連の外科的口唇閉鎖術を完了

できたことも再癒合率における好成績に貢献したと考えられる.

胎児マウスの外科的口唇閉鎖術後 60 時間経過した組織像では, 間葉細胞と細胞外マトリックスにより満たされた組織の再癒合が認められた. しかし口唇間葉組織の癒合プロセスのメカニズムやそれに関与する因子についての情報は必ずしも多くない. 今後は, 胎児マウスの外科的口唇閉鎖術後の間葉細胞の分裂能や移走能などを中心に癒合プロセスを分子生物学的に調べる予定である.

参考文献

- 1) Adzick NS and Lorenz HP: Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. *Ann Surg.* 220: 10-8, 1994.
- 2) Hallock GG: In utero cleft lip repair in A/J mice. *Plast Reconstr Surg* 75: 785-790, 1985.
- 3) Igawa H H, Ohura T, Iwao F, Yamamoto Y and Fujioka H: Intrauterine repair of cleft lip

- in mouse fetuses. *Cong. Anom* 31: 95-100, 1991.
- 4) Juriloff DM and Fraser FC: Genetic maternal effects on cleft lip frequency in A/J and CL/Fr mice. *Teratology* 21: 167-175, 1980.
 - 5) Long J: Bilobate flap applied to the treatment of secondary deformity after cheiloplasty. *Human Yi Ke Da Xue Xue Bao* 23: 167-168, 1998.
 - 6) Longaker MT, Whitby DJ, Ferguson MW, Lorenz HP, Harrison MR and Adzick NS: Adult skin wounds in the fetal environment heal with scar formation. *Ann Surg* 219: 65-72, 1994.
 - 7) Molsted K: Treatment outcome in cleft lip and palate: issues and perspectives. *Crit Rev Oral Biol Med* 10: 225-239, 1999.
 - 8) Nodder S and Martin P: Wound healing in embryos: a review. *Anat Embryol (Berl)* 195: 215-228, 1997.
 - 9) Oberg KC, Evans ML, Nguyen T, Peckham NH, Kirsch WM and Hardesty RA: Intra-uterine repair of surgically created defects in mice (lip incision model) with a microclip: preamble to endoscopic intrauterine surgery. *Cleft Palate Craniofac J* 32: 129-137, 1995.
 - 10) Oberg KC, Robles AE, Ducsay C, Childers B, Rasi CR, Gates DL, Kirsch WM and Hardesty RA: Endoscopic excision and repair of simulated bilateral cleft lips in fetal lambs. *Plast Reconstr Surg* 102: 1-9, 1998.
 - 11) Rowsell AR: The intra-uterine healing of fetal muscle wounds: experimental study in the rat. *British Journal of Plastic Surgery* 37: 635-642, 1984.
 - 12) Sullivan W G: In utero cleft lip repair in mouse without an incision. *Plast Reconstr Surg* 84: 723-730, 1989.

(受付 2001-12-13)