

ポリオキサゾリンを用いた防腐固定法の基礎的検討

児玉 孝憲

東北大学 総合技術部, 東北大学大学院 農学研究科 (旧所属 同医学系研究科 器官解剖学分野)

1. 研究の背景

本邦医学部の肉眼解剖学実習に供される遺体について、その防腐固定処置では専らホルムアルデヒド(Formaldehyde:FA)が使用されている。しかし、FAはその発がん性を含めて人体に有害^[1]であり、解剖実習中は遺体から拡散したFAに学生が曝露するため、マスクなどの防護装備や換気設備が必須である。また、解剖学に関わる教職員に対しても、FAの使用は作業環境測定の実施が必要となるなどの教育実務上の負荷も高い。これらの理由からFAに代替する物質を用いた防腐固定法の検討がなされているが、未だ有効な方策は不明である。

ポリ-2-オキサゾリン (POx) は近年の生体工学分野で応用が盛んな水溶性ポリマーで、生体にも極めて低毒性であり、カルボキシル基の架橋を作る^[2]。この特性を応用することで蛋白質同士の緩やかな架橋を惹起し、組織の弾性のある程度保持しつつ防腐固定できる可能性があるが、未だ詳細な検討が行われていない。これらの背景から、POxを用いた新しい防腐固定法を考案した。

2. 方法

本研究では、POxが各種組織に対して防腐固定能を十分に発揮しうるかということについて、実験動物を用いて検討を行った。使用する動物はハンドリングや実験手技の観点からマウスを選定し、10週齢のJc1:ICR(雄)に対して実験を行った。防腐固定手技として、麻酔下のマウスにシリンジにて左心からPBSを還流し、下大静脈を切断することで脱血を行った。その後、FA溶液(ホルマリン、3.7%FA)またはPOx溶液としてPOx含有ポリマー(10 wt%, 7.7 mmol/g oxazoline base)を左心室から全身に還流した。FA溶液またはPOx溶液について還流を行ったものを、それぞれFA固定群またはPOx固定群として、肝臓、小腸、腎臓、大腿骨を含む下肢を摘出し、それぞれ還流溶液に浸漬し保管した。固定状態の評価に

ついては肉眼的に外観の観察を行うとともにHE染色による組織標本を作成し、組織構造変化や脱核の有無などの組織学的検討を行った。また、採取された下肢については、足関節可動域の評価に加え、組織の弾性評価として大腿周囲筋組織の弾性を経時的に計測した。筋組織の弾性の測定には、筋硬度計(TDM-N1)を使用し測定値の比較を行った。

3. 結果

3.1 固定後の組織外観の比較

FA溶液またはPOx溶液について還流を行った1週間後の組織外観を図1に示す。FA固定群と比較してPOx固定群では肝臓、腎臓、下肢(骨格筋)に大きな組織構造の変化はみられなかったものの、小腸では組織の大幅な軟化が観察された。また、FA固定群の肝臓では灌流液によってやや膨化し、他の臓器では色調がやや白化しているものの、POx固定群では小腸以外ではそれらが確認されず、色調もやや赤みを呈していた。

図1 固定1週間後の組織

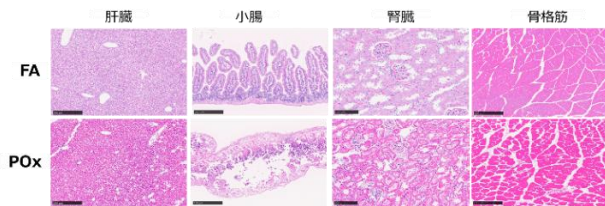


3.2 固定後の組織のHE染色像の比較

固定後の組織についてHE染色像を図2に示す。POx固定群の肝臓や腎臓ではそれぞれ中心静脈・グリソン鞘や糸球体などの特徴的な組織構造が保持されている状態が観察されたが、FA固定群に比べるとやや間隙が生じており、組織の結合性が良好でなかった。骨格筋についても同様にPOx固定群では組織構造が保持されているものの、筋繊維周縁がやや丸みを帯びており、組織の融解が示唆された。また、POx

固定群の小腸においては大きく組織が損傷しており、組織像が不明瞭となった。

図2 HE染色像



3.3 筋組織の弾性と足関節の可動域について

大腿周囲筋組織の弾性を経時的に計測したところ、POx 固定群において FA 固定群と同様に経時的な弾性の増加が観察された。ただし、FA 固定群と比較して POx 固定群では、固定後 48 時間時点を除き、弾性が有意に低かった (図 3、 $P < 0.05$)。また、固定後 72h 時点での足関節の可動域※1 については、FA 固定群に比べて POx 固定群では有意に可動域が大きかった (図 4、 $P < 0.05$)。

図3 大腿周囲筋組織の弾性 経時変化

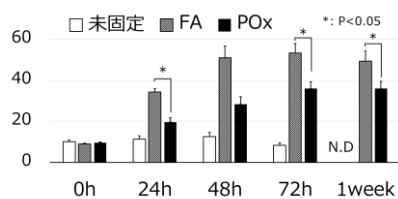
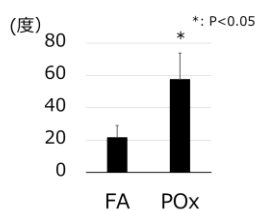


図4 足関節可動域



足関節可動域=足関節底屈角-足関節背屈角。膝関節と外果を結んだ線を基準線として、最大背屈・底屈した際に足底が基準線と作る角度をそれぞれ背屈角・底屈角とした。

4. 考察

マウスに対する POx 溶液の還流後の組織観察の結果や筋組織の弾性が増加したことから、POx 含有ポリマーを用いることで、FA と同様に組織の構造を保

持できる可能性が示唆された。また、FA 固定群と比較して POx 固定群では筋組織の弾性の増加は緩やかで足関節可動域も大きいことから、POx 還流は外科手術手技研修などで多用される Thiel 固定法^[3]のような、組織硬化を低減させた固定法となり得る可能性がある。

POx が組織構造を維持できる可能性が示唆された一方で、FA 固定群と比べると POx 固定群では組織の構造保持能力は劣っており、小腸では十分な固定を行うことができなかった。肉眼解剖学実習はそのほとんどが数ヶ月にわたって実施される事を考慮すると、POx を固定物質として人体に使用するには遺体の管理・保管上の課題も未だ多いと考えられる。また、組織の固定状況についてもさらに長期かつ網羅的な確認が必要である。POx による固定の状態を改善する具体的な方策としては、亜硝酸 Na や 4-クロロ-3-メチルフェノール^[3]など他の固定法で用いられる固定に資する薬剤の併用や、POx 溶液の加温によるカルボキシル基の架橋の促進などが挙げられるが、本研究期間内での検討は行うことができなかった。今後、先述の POx を用いた固定方法の改善に加えて、解剖学の教育実務の視点から献体遺体の管理保管方法も含めた多角的な検討が行われることで、FA 代替物質に関する知見の蓄積と安全な防腐固定法の開発が期待される。

参考文献

- [1] 安全データシート-ホルムアルデヒド. 厚生労働省, 職場のあんぜんサイト.
<https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/50-00-0.html>
- [2] オキサゾリン基の反応性について. 日本触媒.
<https://www.shokubai.co.jp/ja/products/detail/epocros/>
- [3] N. Ottone et al. Walter Thiel's Embalming Method: Review of Solutions and Applications in Different Fields of Biomedical Research. *Int. J. Morphol.* 2016.34(4):1442-1454. doi: [10.4067/S0717-95022016000400044](https://doi.org/10.4067/S0717-95022016000400044)

謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP24H02513 の助成を受けたものです (2024 年度 奨励研究)。また、研究にご協力いただいた東北大学医学系研究科 器官解剖学分野、東北大学農学研究科 生殖科学分野ならびに動物研究棟の皆様にご礼申し上げます。