

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590177

研究課題名(和文)ホルムアルデヒド代替液(ピロリドン水溶液)による臓器保存、組織固定方法の開発

研究課題名(英文)Development of formaldehyde alternative liquid (aqueous N-vinyl-2-pyrrolidone) for organ preservation and tissue fixation

研究代表者

藤倉 義久(FUJIKURA, Yoshihisa)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：10165368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ホルムアルデヒド(FA)は2007年に国際がん研究機関により発癌性物質と認証された。しかしFAは依然として医学領域で汎用されており、本研究ではFA代替液の開発を試みた。現在FAの主たる用途は以下の3つである。それらについて検討した。(1) 組織切片作製のための組織固定液として、(2) 臓器を肉眼標本として長期にわたり保存する時の保存液として、(3) 献体されたご遺体の防腐・固定のため、である。その結果、我々は特許を2件取得し、プリザーブとして商品化しつつある。

研究成果の概要(英文)：Formaldehyde (FA) was authenticated international cancer carcinogens by IARC in 2007. As an FA is still commonly used in the medical area, we tried to develop FA alternative solutions in this study. Its principal use is in three areas. We examined whether the alternative solutions were effective or not instead of formaldehyde. (1) As a tissue fixative for tissue sections preparation, (2) As a solution of organs over the long term as a gross specimens and storing at, (3) For the embalming and fixation of the donated cadavers. As a result, we got 2 patents, and are commercializing the solution as a name of Preserve.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：ホルムアルデヒド代替液 親水性高分子モノマー ピロリドン 組織固定 臓器保存 有害化学物質
環境対応 病原微生物不活性化

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

ホルムアルデヒド (FA) はシックハウス症候群や多種化学物質過敏状態 (化学感受性症候群) の原因物質であり、非常に有用である反面、問題のある物質である。

平成 20 (2007) 年 2 月に WHO の外郭団体である国際がん研究機関 (IARC) が FA の発癌性の評価をそれまでの 2A (ヒトに対しておそらく発癌性あり) から 1 (ヒトに対して発癌性あり) に変更し、また国内でも労働安全衛生法施行令 (安衛法) が改正され、FA は別表第 3 第 3 類物質から第 2 類物質 (健康診断を 6 ヶ月毎に受けるよう義務化) へ、更に特定化学物質障害予防規則 (特化則) も改正され、作業環境下での許容濃度が 0.1 ppm 以下と大変厳しい条件が求められた。

多くの大学ではその条件を満たすため、多額の費用を掛けて①局所排気による汚染物質の拡散防止、②全体換気による汚染物質の希釈強制排出、③防護具の使用による人体侵入の防止という方法を駆使し安衛法、及び特化則の基準をクリアしようとした。実際かなり作業環境は改善されたが FA を使用している限り根本的な解決にはなっていない。

我々は平成 11 年より科研費や学長裁量経費を取得し解剖実習室の環境改善に取り組んできた。また同時に FA 代替液の開発を行うべく、親水性高分子モノマーである N-vinyl-2-pyrrolidone (NVP) を主成分とし、重合阻止剤 (N,N-Di-sec-butyl-p-phenylenediamine 他) と架橋剤 (N,N'-Methlenebisacrylamide 他) を添加した試薬で FA 代替を検討し、平成 16 (2004) 年と平成 20 (2008) 年に特許申請し、以下を取得した。取得特許権 ①特許第 4374435 号「高親水性高分子による組織包埋方法」(登録日:平成 21 年 9 月 18 日) ②特許第 4956839 号「高親水性高分子モノマー水溶液による組織包埋方法」(登録日:平成 24 年 3 月 30 日) である。

2. 研究の目的

既に取得した特許権を発展させ、FA 代替液として親水性高分子モノマーを主とした混合液が以下の (1) ~ (3) の用途に用いられないか検討することであった。また、取扱者の安全のため、(4)、(5) の実験も行った。

- (1) 組織切片作製のための組織浸漬固定液
- (2) 臓器を肉眼標本として長期保存するための保存液
- (3) 献体されたご遺体への注入固定・防腐液
- (4) 病原微生物不活化能の検討
- (5) 残留モノマーの定量

3. 研究の方法

(1) 組織切片作製のための組織浸漬固定液への応用

ラットの諸臓器 (腸、肺、肝臓、心筋、骨格筋、精巣、腎臓、脳、脾臓、膵臓、胸腺、皮膚) を摘出し、 $3 \times 3 \times 3 \text{mm}^3$ に切り出した後固定液に浸漬した。固定液は N-vinyl-2-pyrrolidone (NVP) を主とした混合液 (NVP 濃度 20%、30%、40%、50%、70%、90%) で、固定温度 (25°C、43°C)、固定時間 (1h、3h、24h)、架橋剤・重合阻止剤の影響を調べた。染色は HE 染色、特殊染色として PAS 染色と AZAN 染色を行った。対象は FA 固定した組織である。また、FA 固定パラフィン切片上で抗原を認識する抗体を用いて NVP 固定切片上で反応するかどうかを免疫染色法で調べた。使用する抗体として、CD4、CD8、CD3、ED-3、Ki-67、PCNA、collagen I、インスリン、グルカゴン等の抗原を認識する抗体を用いて行う予定であった。

(2) 臓器を肉眼標本として長期保存するための保存液作成

20~100%NVP 水溶液に中・小型臓器を浸漬し肉眼標本として長期保存できるか調べた。材料は市販ブタ腎臓 (重量 180g~250g) で精肉店より購入した。比較的新鮮材料と思われた。また、大型実質性臓器としてウシ肝臓 (500g 程度に切り落としたもの)、中空性臓器としてウシ心臓と 1m 長の消化管についても 3 年から 5 年保存できるか調べることとした。

(3) 献体されたご遺体への注入固定・防腐液としての応用

まずラットで基礎実験を詳細に行った。大腿動脈から 30%濃度の NVP 水溶液を体重の 1/6 量注入した後、5%NVP 水溶液に浸漬すると 1.5 年は腐敗せずに保存できていた。同動物は比較的軟らかく、関節の可動性も良好であった。しかし、肝臓や消化管は軟らかすぎて解剖しづらく、注入 NVP 濃度を上げたり、同液中に架橋剤を 2~5%添加して硬化を図ったが困難を極めた。本研究では動物を屠殺後、関節可動域を測定し (固定前)、大腿動脈から体重の 1/10~1/5 量の 12.5~50% NVP 混合液を注入、終濃度 2.5、5、7.5、10% となるようにした。終濃度とは、注入 NVP 濃度、注入量からラット体内で純 NVP が何%になっているか予測したもので、例えば 600g のラットに 50%NVP 混合液を 66ml 注入したら終濃度 5%と判定した。処置後、動物は 5% NVP 水溶液に 1 週間浸漬し、引揚げ後、関節可動域の測定 (固定後)、約 1 分間の関節マッサージ後、再度可動域の測定 (軟化後) を行った後、胸腹部内臓の色調、弾力性の検索

などを行った。

(4) 病原微生物不活化能の検討

細菌ではグラム陽性球菌の代表で黄色ブドウ球菌、同桿菌で芽胞形成菌である枯草菌、グラム陰性桿菌の大腸菌について in vitro の抗菌試験で不活化能を調べた。3種の細菌は接種菌液作製後、種々濃度のNVPを添加し37℃、16時間震盪培養後、抗菌能を吸光度(660nm)法で測定した。ウイルスについては1本鎖RNAでエンベロープを被っている狂犬病ウイルスに対しNVPによる不活化試験を検討した。狂犬病ウイルスをin vitroの系でマウス神経芽細胞腫株に感染させFITC標識抗狂犬病ウイルス特異抗体を使用したRapid Fluorescent Focus Inhibition Test法で解析した。

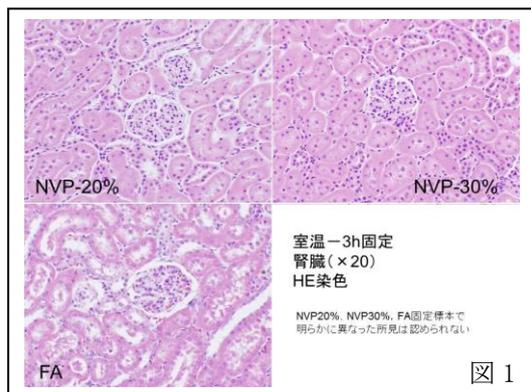
(5) 残留モノマーの定量

親水性高分子ポリマーは吸湿剤やコンタクトレンズ、手術用糸等に使用される安全な物質であるが、高分子モノマーは殺菌・毒性があるとされている。それで保存液中のモノマー濃度を調べた。ブタ腎臓を浸漬保存液として同じ重量の20~30%NVP水溶液に浸漬し、経時的に水溶液サンプルを採取し、GC-MSで浸漬液中の残留モノマーの定量を行った。

4. 研究成果

(1) 組織切片作製のための組織浸漬固定液への応用

20~30%N-vinyl-2-pyrrolidone (NVP)水溶液で組織を固定後、諸臓器のパラフィン切片にHE染色を施すとホルムアルデヒド(FA)固定と同等、あるいは同等以上のきれいな染色態度を示した(図1)。固定時間は3時間以上で十分であったが、1時間では不十分であった。固定液の温度や、架橋剤、重合阻止剤の影響は殆どなかった。種々調べた組織の中では筋肉組織の所見に少し問題が残った。

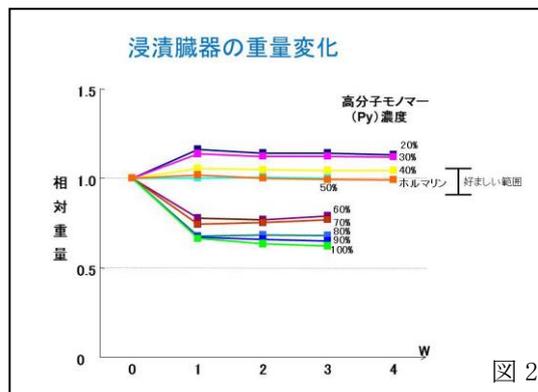


具体的には筋線維と筋内膜の間に隙間が見られたことである。それで、NVP濃度を上昇させたり、架橋剤や重合阻止剤を添加して効果を確かめた結果、50%以上のNVP濃度に浸漬固定させると良好な結果が得られたが、反

対に他の腎臓、肝臓などでは脱水が強く芳しい組織所見は得られなかった。また、抗インスリン抗体と抗グルカゴン抗体で免疫染色を施した結果ではFA固定切片では陽性を示したが、NVP固定切片では弱い陽性反応を示した程度であった。これはFAの分子量が30に対し、NVPのそれは111と大きく、抗原をマスクしている可能性が考えられ、マイクロウェーブ処置やオートクレーブ処置などを行い抗原賦活を試みているが、未だ十分な結果は得られていない。将来的には組織固定液としての商品化を目指したい。

(2) 臓器を肉眼標本として長期保存するための保存液作成

20~100%NVP水溶液にブタ腎臓を浸漬し肉眼標本として長期保存できるか調べた結果、20~30%NVP水溶液に浸漬すると十分FA代替液として使用できることが明らかになった。重量変化は固定前に比較すると少し増え、50%NVP水溶液中では殆ど変化はなかった。それ以上の濃度になると反対に脱水が認められ重量は減少した(図2)。

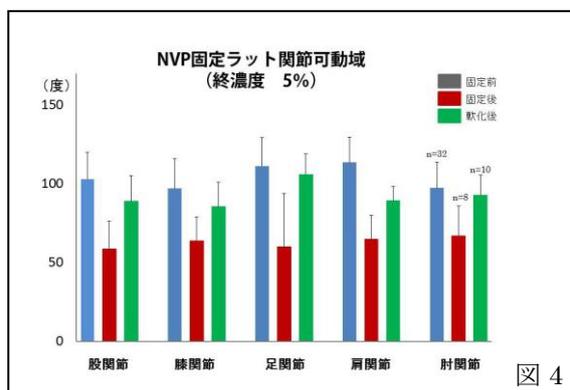


また弾力性はNVP濃度が20~30%の時に固定前と同程度の弾力性を示したが、50%以上になると硬度を増し、80%以上ではかなり硬く、FA固定の腎臓と同程度であった。色調ではFA固定腎臓は白色に変わっていたが、20~50%濃度NVP水溶液中で保存すると固定前とあまり変わらない色調を示した(図3)。

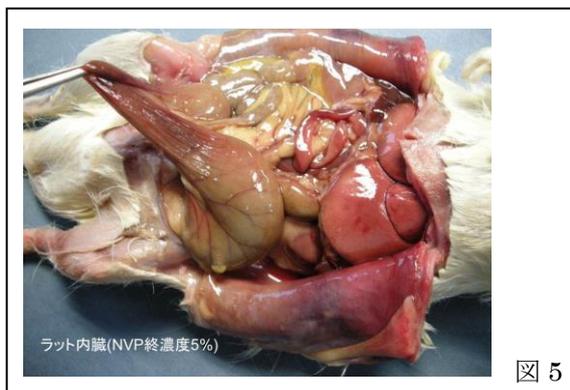


(3) 献体されたご遺体への注入固定・防腐液としての応用

関節可動域の測定結果は、注入 NVP 終濃度が 5% では、固定後制限されたが、軟化後回復した (図 4)。図では示さないが終濃度 7.5%



では、固定前と軟化後では可動性に大きな差は認められなかった。10%では、固定後大きく制限され、軟化後も十分な回復は得られなかった。解剖所見では、注入 NVP 終濃度が 5% 以上あれば防腐・固定され、臓器は軟らかく (図 5)、屠殺直後と大きな差はなかった。



少し貧血気味の色調であったが血管内に血液は凝固せずに残っていた。図では示さないが、終濃度が 2.5% では腸内にガスが発生し、腸管があちこちで鼓状に膨隆していた。これらは平成 25 年 11 月に開催された第 31 回献体実務者研修会 (広島) でシンポジストとして、「ホルマリン代替液開発の基礎的研究」という題名で発表した。他方、外科系講座より「臨床医学の教育及び研究における死体解剖のガイドライン」が策定され、献体されたご遺体で外科修練を求める声が出てきた。FA 固定されたご遺体ではほぼ全ての臓器が固くなっており外科修練には不向きである。しかし上述のように NVP 固定では関節可動性が良好で、内臓諸臓器も軟らかく固定された結果は外科修練には適していると考えている。それで平成 25 年度では献体されたご遺体の肉眼解剖実習用処置でなく、外科修練用ご遺体の処置方法について杏林大学や東京医科大学と共同研究を行った。献体されたご遺体に NVP を主成分としたプリザーブ液 (日本医化器機製作所より提供) を注入

すると、ご遺体の防腐、長期保存が可能になったことが分かった。この結果は FA を用いずに代替液で解剖実習用ご遺体の防腐処置ができることであり、今後汎用されていくことを期待している。現在、特願 2013 - 227216 「死体保存用注入液」 (出願日：平成 25 年 10 月 31 日) を特許出願中である。これの出願人は、大分大学、(株) 日本医化器機製作所及び学校法人杏林学園の三者である。そして、FA 代替液関連の 2 件の特許について大分大学は、(株) 日本医化器機製作所に独占的通常実施権 (再実施権) を許諾した。特許出願中の固定・防腐・保存液は商品名「プリザーブ」として日本医化器機製作所より販売予定である。

(4) 病原微生物不活化能の検討

① 細菌：黄色ブドウ球菌、枯草菌、大腸菌について抗菌試験で検討した結果、各々 G I 50 (50% Growth Inhibition) 値は黄色ブドウ球菌：0.69%、枯草菌：1.30%、大腸菌：0.64%であった。グラム不定性抗酸菌について NVP5%以下で不活化されることも明らかになった (私信)。

② ウイルス：狂犬病ウイルスに対し NVP 1% 濃度で完全不活化されることが明らかになった。ウイルスは変異株が多く、全てを検討することができないが、2本鎖 DNA でエンベロップを持たないアデノウイルスに対する不活化試験を行う必要があるかもしれない。

③ 他方簡便法ではあるがミカンに生えた緑カビ、黒カビの真菌に対し、5%NVP 水溶液中ではカビが増殖したが、20%NVP 水溶液では殺菌効果のあることが分かった。

全ての病原微生物を検索するわけにはいかないが、以上の結果よりかなりの細菌、ウイルスは不活化できると考えられた。

(5) 残留モノマーの定量

浸漬保存液中にブタ腎臓を浸漬し、経時的に水溶液サンプルを採取した結果、モノマー濃度は漸減し、1週間で当初の約 2/3 の濃度に低下した。臓器 (ブタ腎臓) は室温で同保存液中に静置しておくとも少なくとも 3 年間は腐敗を起こさず、色、形、弾力性、重量など入手直後のブタ腎臓と殆ど同様形態であった。

最後に

NVP を主成分としたプリザーブ液 (日本医科器機製作所) は臓器保存液、組織固定液として FA でのそれらに比べ有用な試薬であることが明らかになった。外科修練用にご遺体を防腐・固定する場合に Thiel 液を使用している施設があるが、これは低濃度ながら FA を含んでおり、根本解決策にはなっていない。また同固定では内臓に腐敗の認められる場合も報告されている (第 119 回日本解剖学会総会；宇都宮)。今後は組織固定液として抗

原性が失われる（隠される）問題を解決しなければならない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計7件）

①Yoshinobu Ishitobi, Jotaro Akiyoshi, Shuhei Honda, Taiga Ninomiya, Masayuki Kanehisa, Yoshihiro Tanaka, Jusen Tsuru, Koichi Isogawa, Hirokazu Kitamura, Yoshihisa Fujikura: Administration of antisense DNA for GPR39-1b causes anxiolytic-like responses and appetite loss in rats. *Neuroscience Research* 72(3), 257-262, 2012

②Keisuke Ina, Hirokazu Kitamura, Shuji Tatsukawa, Yoshihisa Fujikura: Significance of α SMA in myofibroblasts emerging in tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Histology and Histopathology* 26(7):855-866, 2011

③Yoshihiro Tanaka, Jotaro Akiyoshi, Yoshinari Kawahara, Yoshinobu Ishitobi, Koji Hatano, Nobuhiko Hoaki, Ayumi Mori, Shinjiro Goto, Jusen Tsuru, Hirotaka Matsushita, Hiroaki Hanada, Kensuke Kodama, Koichi Isogawa, Hirokazu Kitamura, Yoshihisa Fujikura: Infrared radiation has potential antidepressant and anxiolytic effects in animal model of depression and anxiety. *Brain Stimulation* 4(2):71-76, 2011

④Keisuke Ina, Hirokazu Kitamura, Takayuki Masaki, Shuji Tatsukawa, Hironobu Yoshimatsu, Yoshihisa Fujikura: Human skeletal muscles replaced to a high degree by white adipose tissue. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 87(4): 165-170, 2011

⑤Kazushi Ishikawa, Hideaki Sumiyoshi, Noritaka Matsuo, Naoko Takeo, Mizuki Goto, Osamu Okamoto, Shuji Tatsukawa, Hirokazu Kitamura, Yoshihisa Fujikura, Hidekatsu Yoshioka, Sakuhei Fujiwara: Epiplakin accelerates the lateral organization of keratin filaments during wound healing. *Journal of Dermatological Science* 60:95-104, 2010

⑥Hidetoshi Miyake, Hiro Kiyosue, Shuichi Tanoue, Yoshimi Goto, Hiromu Mori, Yoshihisa Fujikura: Termination of the vertebral veins: Evaluation by

multidetector row computed tomography. *Clinical Anatomy* 23:662-672, 2010

⑦Noriko Takahashi, Keiki Ogino, Kei Takemoto, Seiji Hamanishi, Da-Hong Wang, Tomoko Takigawa, Masafumi Shibamori, Hironobu Ishiyama, Yoshihisa Fujikura: Direct inhibition of arginase attenuated allergic and inflame mation in a Dermatophagoides farina-Induced NC/Nga mouse model. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 299:L17-L24, 2010

〔学会発表〕（計5件）

①灰塚嘉典、松村讓兒、高篠智、藤倉義久：ホルマリン代替液(N-Vinyl-2-pyrrolidone)注入固定遺体の解剖所見。第119回日本解剖学会総会・全国学術集会 H26.3.27 自治医科大学

②河田晋一、小山耕一、林省吾、内藤宗和、曲寧、畑山直之、藤倉義久、伊藤正裕：サージカルトレーニングに適した固定法の検討-Thiel法およびプリザー®の固定法の試み-第119回日本解剖学会総会・全国学術集会 H26.3.27 自治医科大学

③藤倉義久、松村讓兒、雉鼻一郎、松川詠梅、立川修二、北村裕和、伊奈啓輔：ホルムアルデヒド代替液（プリザー®）を用いた献体者の固定、保存、解剖所見。第11回日本予防医学会学術集会 日本科学未来館 H25.6.22

④白石恵子 藤倉義久 立川修二 北村裕和 伊奈啓輔：ホルマリン代替液の応用—外科修練に向けての基礎的研究—。第9回日本予防医学会学術総会 H23.11.19 首都大学東京荒川キャンパス

⑤藤倉義久、北村裕和、白石恵子、立川修二、伊奈啓輔：外科系医療技術修練の為の遺体固定保存方法の基礎的研究。第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 2011.3 パシフィコ横浜（東日本大震災のため学術集会中止→誌上開催）

〔図書〕（計1件）

Keisuke Ina, Hirokazu Kitamura, Shuji Tatsukawa, Yoshihisa Fujikura: The Contribution of Fibronectin ED-A Expression to Myofibroblast Transdifferentiation in Diabetic Renal Fibrosis. *Diabetic Nephropathy*. ed. by John S.D.Chan, In-Tech, pp.109-126, 2012

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：死体保存用注入液

発明者：藤倉義久、雉鼻一郎、松村讓兒

権利者：国立大学法人大分大学、株式会社

日本医化器械製作所、学校法人杏林学園

種類：特許

番号：特許願 2013-227216 号

出願年月日： 25年10月31日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤倉 義久 (FUJIKURA Yoshihisa)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：10165368

(2) 研究分担者

伊奈 啓輔 (INA Keisuke)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：20203193

北村 裕和 (KITAMURA Hirokazu)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70115559