

ホルマリン保存試料による元素分析の妥当性

佐藤 至¹⁾，世良耕一郎²⁾，二ツ川章二³⁾，津田修治¹⁾

¹⁾ 岩手大学農学部

020-8550 岩手県盛岡市上田三丁目18-8

²⁾ 岩手医大サイクロトロンセンター

020-0173 岩手県滝沢村字留が森348-58

³⁾ 日本アイソトープ協会

113-8941 東京都文京区本駒込2-28-45

1 はじめに

空気，水，動物，植物などにおける環境汚染物質濃度は，ヒトの暴露レベルや環境の汚染状況を評価するために重要な情報であるが，動物，特に野生動物は鳥獣保護法や技術的，倫理的問題から入手が困難である。一方各地の大学や鳥獣保護センター等には様々な野生鳥獣のホルマリン標本が保存されており，しばしば入手可能な場合がある。ホルマリン標本は組織の微細構造が固定されているため，長期間の保存の後であっても病理組織学的情報が得られるが，もし組織中の環境汚染物質濃度も変わらずに保持されているならば，病理学的情報に加えて環境汚染物質の暴露レベルに関する情報も得ることができるとであろう。

ホルマリン保存標本を用いた元素分析の妥当性についてはいすでにくつか報告されている。しかし，あるものはホルマリン保存は組織の元素濃度に影響しないと述べており，またあるものは保存組織の元素濃度は新鮮組織のものよりの有意に低いためにホルマリン標本を元素分析に用いることができないと結論している¹⁻³⁾。このような研究結果の不一致は，保存期間や試料調整方法の違いによるものと考えられるため，今回，同一の組織を用いて新鮮時の元素濃度と1年間ホルマリンに保存した後の元素濃度を比較し，ホルマリン保存試料による元素分析の妥当性を検証した。

2 材料および方法

実験には豚の肝臓と牛の腎臓を用いた。個体差の影響を排除するために，これらの臓器は単一個体のものを用いた。外科用ナイフを用いて各臓器から12個の標本（1×2×2 cm）を切り出し，その内4つは直ちに元素分析を行った。残りは100mlの10%ホルマリンまたは10%中性ホルマリン（いずれも組織固定用，和光純薬工業）に入れて室温で保存し，1年後に取りだして表面を約3mm除去した後に（腎臓の漿膜面を除く），中心部分を元素分析に供した。

元素分析には200～300mgの組織を用いた。ただし，腎臓は皮質と髄質で濃度が異なる元素があるため^{4,5)}，両組織を含むように扇型に採材した。分析試料はテフロン性耐圧容器に入れ，硝酸1 mlと内部標準としてインジウム（200 μg/g-tissue）を加え，電子レンジで加熱して湿式灰化した。元素分析は日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターにおいてPIXE法によって行い，ナトリウム，リン，カリウム，カルシウム，マンガン，鉄，銅，亜鉛およびセレンを定量した。ホルマリン溶液に始めから存在する元素と保存中に組織から溶出する元素を明らかにするため，組織を保存する前後のホルマリン溶液についても

PIXE分析を行った。統計解析はStudentの t 検定またはDunnettの方法によって行った。

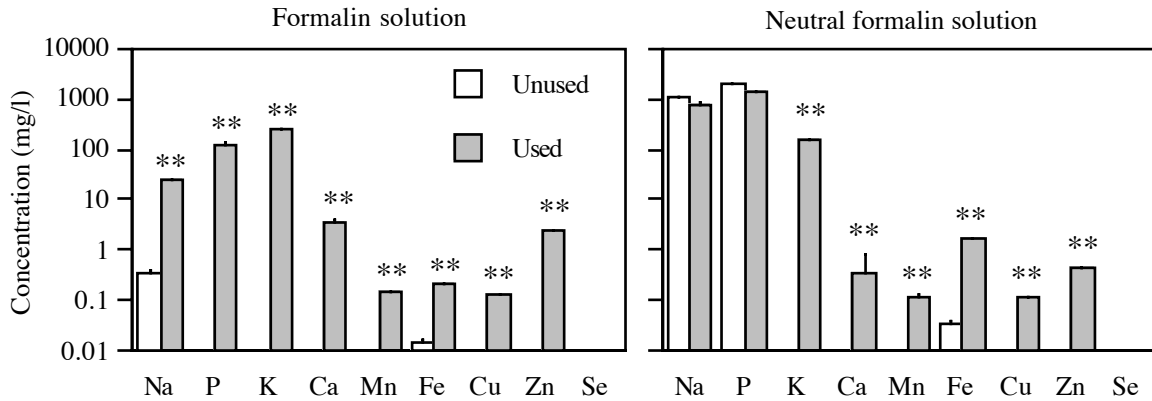


図1. 使用前および肝臓を1年間保存した後のホルマリン溶液における元素濃度

3 結果および考察

図1はホルマリンおよび中性ホルマリン溶液に含まれる測定対象9元素の濃度を示している。使用前のホルマリン溶液にはこれらの元素はほとんど含まれていなかったが、中性ホルマリンには溶液を中性化するために加えられたリン酸ナトリウムに起因するナトリウムとリンがおおよそ1,000 mg/l含まれていた。豚の肝臓を1年間保存した後の溶液では、ホルマリン、中性ホルマリンともにカリウム、カルシウム、マンガン、鉄、銅および亜鉛の濃度が有意に上昇していた。ナトリウムとリンの濃度は中性ホルマリンでは変化がなかったが、ホルマリン溶液では顕著な上昇が認められた。セレンはいずれの溶液からも検出されなかった。これらの結果は、様々な元素が保存中に組織から溶液に溶出することを示しているが、中性ホルマリンはナトリウムとリンを多量に含むので、組織を中性ホルマリンに保存した場合にはこれらの元素の溶出は起こらないかもしれないし、これらの元素の組織中濃度が溶液中濃度よりも低い場合には逆に組織への流入が起こるかもしれない。

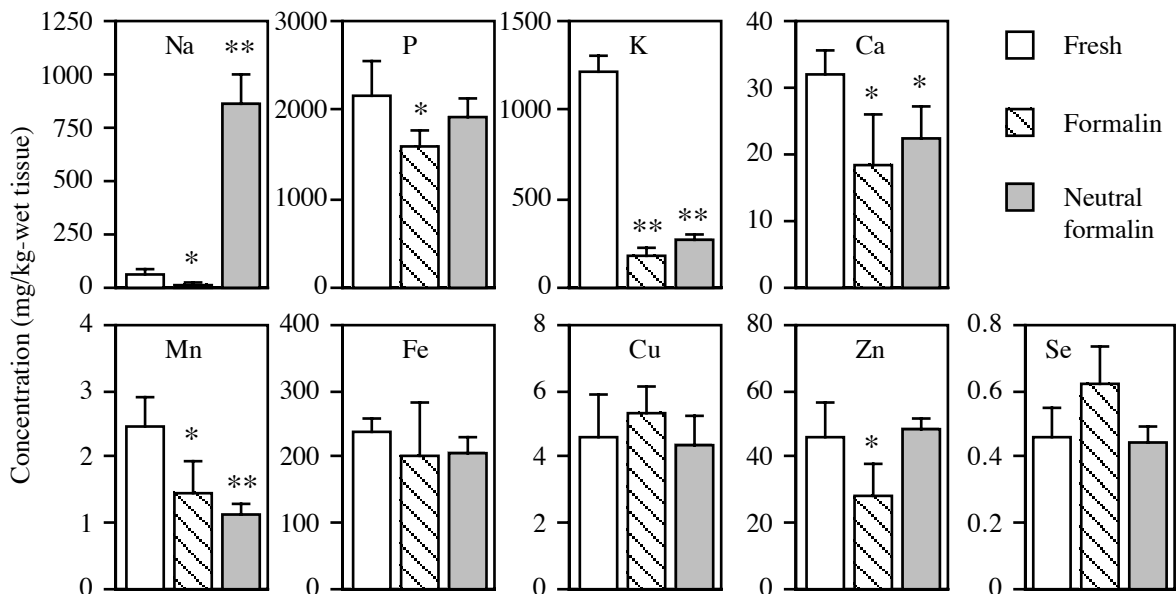


図2. ホルマリン保存前および保存後の肝臓における元素濃度

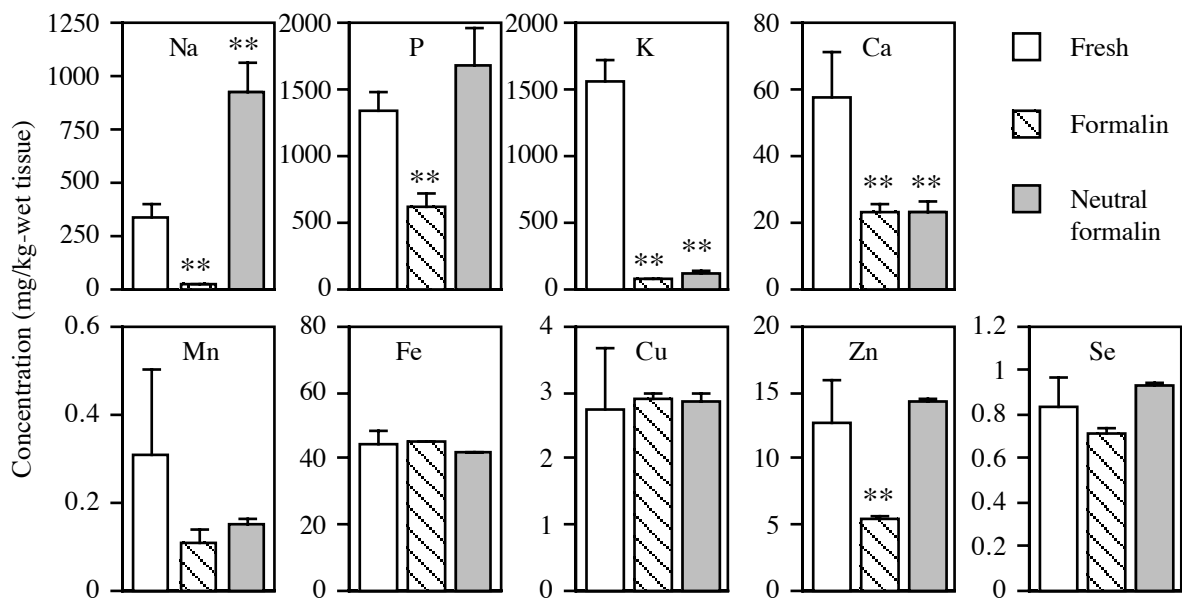


図3. ホルマリン保存前および保存後の腎臓における元素濃度

図2はホルマリン等の溶液に保存する前と保存後の豚の肝臓の元素濃度を示している。ナトリウム、リン、カリウム、カルシウム、マンガンおよび亜鉛はホルマリンでの保存によって濃度が低下したが、鉄、銅およびセレンの濃度は新鮮組織のものと変らなかった。中性ホルマリンに保存した肝臓ではカリウム、カルシウムおよびマンガンが減少したが、ナトリウムは有意に増加し、リン、鉄、銅、亜鉛およびセレンには変化が見られなかった。図3は牛の腎臓の分析結果を示している。腎臓の結果は肝臓とほとんど同じであったが、マンガン濃度の低下は統計学的には有意ではなかった。

中性ホルマリンはナトリウムをおよそ1,000 mg/l含んでいるので、この液に保存した肝臓と腎臓におけるナトリウムの増加は明らかに溶液からの侵入によるものである。1年間肝臓を保存した後は溶液のナトリウム濃度も組織のナトリウム濃度もおよそ800 mg/lであったので、この元素は保存中に組織と溶液との間で平衡に達したものと考えられた。中性ホルマリンはリンも多量に含有しているが、組織中のリン濃度には有意な変化は見られなかった。リンは組織にも多量に含まれているため、統計的に検出されるほど大きな変化には至らなかったのであろう。

保存中の組織からホルマリン溶液への元素の溶出はあらかじめ予想されたことであったが、その溶出が組織表面に限局されたものであるなら保存試料を元素分析に利用できるであろう。このため今回は保存組織の表面を除去し、中心部を分析に用いた。鉄と銅については組織から溶液への溶出が確認されたが(図1)、組織中の濃度には変化が見られなかったことから、これらの元素の溶出は組織表面に限局されたものであると考えられる。セレンについては溶出は確認されなかったものの、その挙動はも鉄や銅と同じかもしれない。なぜなら肝臓のセレン濃度は0.5mg/kg程度であったので、たとえ組織表面から溶出が起こったとしても溶液中の濃度は検出限界未満である可能性が高いからである。

組織中の亜鉛濃度は中性ホルマリンに保存したものでは変化がなかったが、ホルマリンに保存したものでは有意に低下した。ホルマリン溶液は酸性(pH 3.6)なので、亜鉛の溶出は酸性で促進され、深部からの溶出が起こるのであろう。一方、カリウム、カルシウムおよびマンガンの濃度はいずれの溶液に保存しても低下したことから、これらの元素は中性条件下でも組織の深部から溶出が起こると考えられる。

このような元素による挙動の相違は、生体における個々の元素の存在状態によってある程度説明できるかもしれない。すなわち、ナトリウムやカリウムのような易動性元素は大部分がイオン状態で存在しており、難動性元素はフェリチンやヘムタンパク(鉄)、SODやメタロチオネイン(銅、亜鉛)、グルタチオンパーオキシダーゼ(セレン)などのタンパクに強固に結合しているものが多い⁶⁾。

Bushら¹⁾は剖検の採に採取した30人の組織を用いて10元素の濃度をホルマリン固定前後で比較し、ホルマリンによる固定と保存は組織の元素濃度に影響しなかったと述べている。しかし彼らの保存期間はアルミニウムとマンガンの測定以外はわずか1週間であり、1年まで保存を延長して測定を行ったアルミニウムとマンガンでは変化が認められている。したがって彼らの結果は、長期間の保存が他の多くの元素濃度に影響する可能性を排除するものではない。

Koizumiら²⁾は鉄、銅、亜鉛およびカドミウムについて測定を行い、いずれの元素も新鮮組織よりも保存組織の方が濃度が低かったと述べている。しかし我々の実験結果では亜鉛はホルマリン保存によって減少したものの、鉄と銅については変化が認められていない。彼らの論文には分析試料の調整方法が詳細には記載されていないが、我々は保存組織の表面部分は分析には用いていない。図1の結果から鉄と銅が組織表面から溶出することは確実なので、組織表面を除去せずに測定を行えば濃度の低下が認められたであろう。

カドミウムと鉛はヒトや動物が暴露する可能性のある毒性元素として重要である。しかし今回実験に用いた豚の肝臓や牛の腎臓では、これらの元素PIXEの検出限界未満であったため、ホルマリン保存の影響を評価できなかった。一般に家畜の鉛やカドミウム濃度はきわめて低いため^{7,8)}、これらの元素に関してはより高感度な分析方法を用いる必要があるであろう。

今回の研究によって、ホルマリン保存中に様々な元素が組織から溶液に溶出する事が確認された。しかし、鉄、銅、亜鉛(中性ホルマリンの場合)およびセレンの溶出は組織表面に限局しているため、保存組織がある程度大きければ、中心部分を測定することによってこれらの元素の評価が可能であるかもしれない。一方カリウム、カルシウム、マンガン等は組織の深部からも溶出が起るので、ホルマリン保存組織を用いた評価は不可能であろう。

参考文献

- 1) Bush, V.J., Moyer, T.P., Batts, K.P. and Parisi, J.E. (1995): Essential and toxic element concentrations in fresh and formalin-fixed human autopsy tissues. *Clin. Chem.* 41, 284-294.
- 2) Koizumi, N., Hatayama, F. and Sumino, K. (1994): Problems in the analysis of cadmium in autopsied tissues. *Environ. Res.* 64, 192-198.
- 3) Theron, P.F., Rimmer, R., Nicholls, H.A. and Ehret, W.J. (1974): Causes of variation of copper, iron, manganese, zinc and magnesium levels in bovine livers. *J. S. Afr. Vet. Ass.* 45, 73-76.
- 4) Casey, C.E., Guthrie, B.E. and Robinson, M.F. (1982): Copper, manganese, zinc, and cadmium in tissues from New Zealanders. *Biol. Trace Elem. Res.* 4, 105-115.
- 5) Olsson, I.M. and Oskarsson, A. (2001): Sampling of kidneys from cattle and pigs for cadmium analysis. *Analyst* 126, 114-120.
- 6) Mertz, W. (1987). *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 5th ed., Vol. 1, pp.79-142, 301-364, Vol.2, pp.1-137, 209-279, Academic Press, San Diego.
- 7) Doganoc, D.Z. (1996): Lead and cadmium concentrations in meat, liver and kidney of Slovenian cattle and pigs from 1989 to 1993. *Food Addit. Contam.* 13, 237-241.
- 8) Jorhem, L., Slorach, S., Sundstrom, B. and Ohlin, B. (1991): Lead, cadmium, arsenic and mercury in meat, liver and kidney of Swedish pigs and cattle in 1984-88. *Food Addit. Contam.* 8, 201-211.

Effects of formalin-preservation on element concentrations in animal tissues

I. Sato¹⁾, K. Sera²⁾, S. Futatsugawa³⁾ and S. Tsuda¹⁾

¹⁾Faculty of Agriculture, Iwate University
3-18-8 Ueda, Morioka 020-8550, Japan

²⁾Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348 Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

³⁾Japan Radioisotope Association
2-28-45 Honkomagome, Bunkyo, Tokyo 113-8941, Japan

Abstract

Determination of the exposure level of environmental pollutants is essential in the studies on environmental toxicology. If the concentrations of exposed pollutants in tissues are not affected by the formalin-preservation, the preserved specimen will provide not only the histopathological information but also the exposure level of environmental pollutants. In the present study, concentrations of 9 elements in the liver and kidney were compared between fresh and formalin- or neutral formalin-preserved specimens to validate the ultimate analysis of the preserved specimens. After one year preservation, various elements had diffused from the specimens into the solutions. The concentrations of iron, copper, zinc (in the case of neutral formalin), and selenium in the central region of the specimens showed no alterations suggesting that the diffusions of these elements were limited to the surface of the specimens. Therefore, preserved specimens may be available for the determination of these elements if the specimens are large enough to remove their surface. The concentrations of other elements in the preserved specimens were different from original ones, because the diffusion or infiltration also occurred in the deep region of the specimens.