

マウス腎近位尿細管における
マイクロウェーブ照射固定像の検討

鳥取大学医学部解剖学第二教室 (主任 井上貴央教授)

福留初子, 井上貴央

An investigation on microwave fixation
methods for the proximal tubule of
the mouse kidney.

Hatsuko FUKUDOME and Takao INOUÉ

*Department of Anatomy,
Faculty of Medicine, Tottori University,
Yonago 683, Japan*

ABSTRACT

Several microwave (MW) fixation methods were investigated for light and electron microscopy in comparison with the conventional fixation methods. Proximal tubules of the mouse kidney were used as materials. Three kinds of MW irradiation were tested to clarify the best condition for MW fixation. As conventional methods, the kidney was fixed by immersion or by perfusion. In MW fixation, the most excellent result was obtained in the specimen prepared under the condition of continuous irradiation in the buffer solution from 0°C to 15°C at 150W, followed by interrupted irradiation in a mixture of 2% formaldehyde and 0.5% glutaraldehyde up to 17°C at the same power. Damages due to MW irradiation was less in the whole kidney than in minced specimens. The epithelial cells showed shrinkage and the basal interdigitations were dilated in the latter. Furthermore, the mitochondria and endoplasmic reticulum were poorly defined. In the specimens fixed by immersion, the electron density of epithelial cells was ununiform and swelling of the microvilli was evident. The perfusion-fixed specimen showed the dilation in the cavity of the proximal tubules. The excellent image of the fixation was obtained in the immersion-fixed whole kidney with renal capsule. At this moment, the MW fixation method is not widely applicable.

(Accepted on September 14, 1995)

Key words : Microwave fixation, Kidney, Proximal tubule, TEM, Preservation of ultrastructure

こない、引き続き上記の固定液による間欠照射(3秒照射/3秒休止)を上限温度(17もしくは35℃)に達するまでおこなった。固定容器は内径8.3cm、深さ1.8cmのガラスシャーレを使用した。緩衝液および固定液の液量は50mlとし、シャーレを装置内の回転式ステージ中央に設置してMW照射した。各試料の作製法は以下のとおりである。

試料Ⅰ：腎臓の血流および尿流を止めるために腎門で尿管と尿管を束ねて結紮し、腎臓を被膜ごと素早く摘出した。摘出した腎臓はそのまま4℃に冷却した緩衝液を入れたシャーレに入れ、液温が30℃になるまで300Wの出力で約2分30秒間にわたってMW連続照射をおこなった。ついで、腎臓を30℃に温めた固定液の入ったシャーレに移し、出力200Wで35℃になるまで間欠照射を約5分間行った。その後、試料はシャーレに入れたまま室温で2時間浸漬固定を施し細切した。

試料Ⅱ：試料Ⅰと同じく腎門部の尿管と尿管を結紮して腎臓を摘出した。MW照射出力150Wで、液温0℃から始めて15℃まで緩衝液による連続照射を約10分間にわたっておこない、次いで固定液に移して同じく出力150Wで液温16℃から17℃まで30分間、間欠照射をおこなった。その後、試料はシャーレに入れたまま室温で2時間浸漬固定を施し細切した。

試料Ⅲ：腎門部の尿管や尿管は結紮しないで腎臓を摘出した。摘出後直ちに腎臓を細切(約2×2×5mm)し、被膜を取り除いて試料Ⅱと同じ条件でMW照射をおこなった。その後、試料はシャーレに入れたまま室温で2時間浸漬固定を施し細切した。

2. 浸漬固定・灌流固定試料

試料Ⅳ：腎門部の尿管と尿管を結紮し被膜ごと採取した腎臓全体を、MW照射固定に用いた固定液に浸漬し、室温で2時間固定をおこなった。

試料Ⅴ：腎臓を摘出後固定液の中で手早く細切(約1×1×3mm)し、冷蔵庫(約4℃)内で約2時間浸漬固定をおこなった。

試料Ⅵ：経心的に0.1Mカコシル酸ナトリウム緩衝液(6.8%ショ糖添加, pH7.4)を灌流して脱血した後、固定液を約40ml灌流して固定をおこなった。その後、固定された腎臓を摘出し細切した。

3. 固定後の試料作製と観察

以上のⅠ～Ⅵの試料は1%四酸化オスミウムに

よる後固定を2時間施し、脱水の後、エポキシ樹脂に包埋して樹脂を重合させた。ウルトラミクロトームを用いて準超薄切片(厚さ1μm)と超薄切片(厚さ70nm)を作製し、準超薄切片には塩基性フクシン・メチレンブルー染色もしくはトルイジンブルー染色を、超薄切片には酢酸ウラニルとクエン酸鉛による電子染色の後、観察した。

準超薄切片の観察および撮影には光学顕微鏡撮影装置(オリンパスBHB および全自動撮影装置PM-10AD)を、超薄切片の観察・撮影にはJEM-100CX-II型透過電子顕微鏡を使用し、加速電圧100kVで観察した。

結 果

1. 準超薄切片像

試料Ⅰでは、大部分の近位尿細管の内腔は閉鎖し、尿細管周囲の毛細血管内には赤血球が詰まっていた。尿細管の上皮細胞は比較的均一に染色されている部位(図1.写真左側)と濃染された部位(図1.写真右側)が混在しており、後者では同一の尿細管に多数の“暗調細胞 dark cell”が認められた。

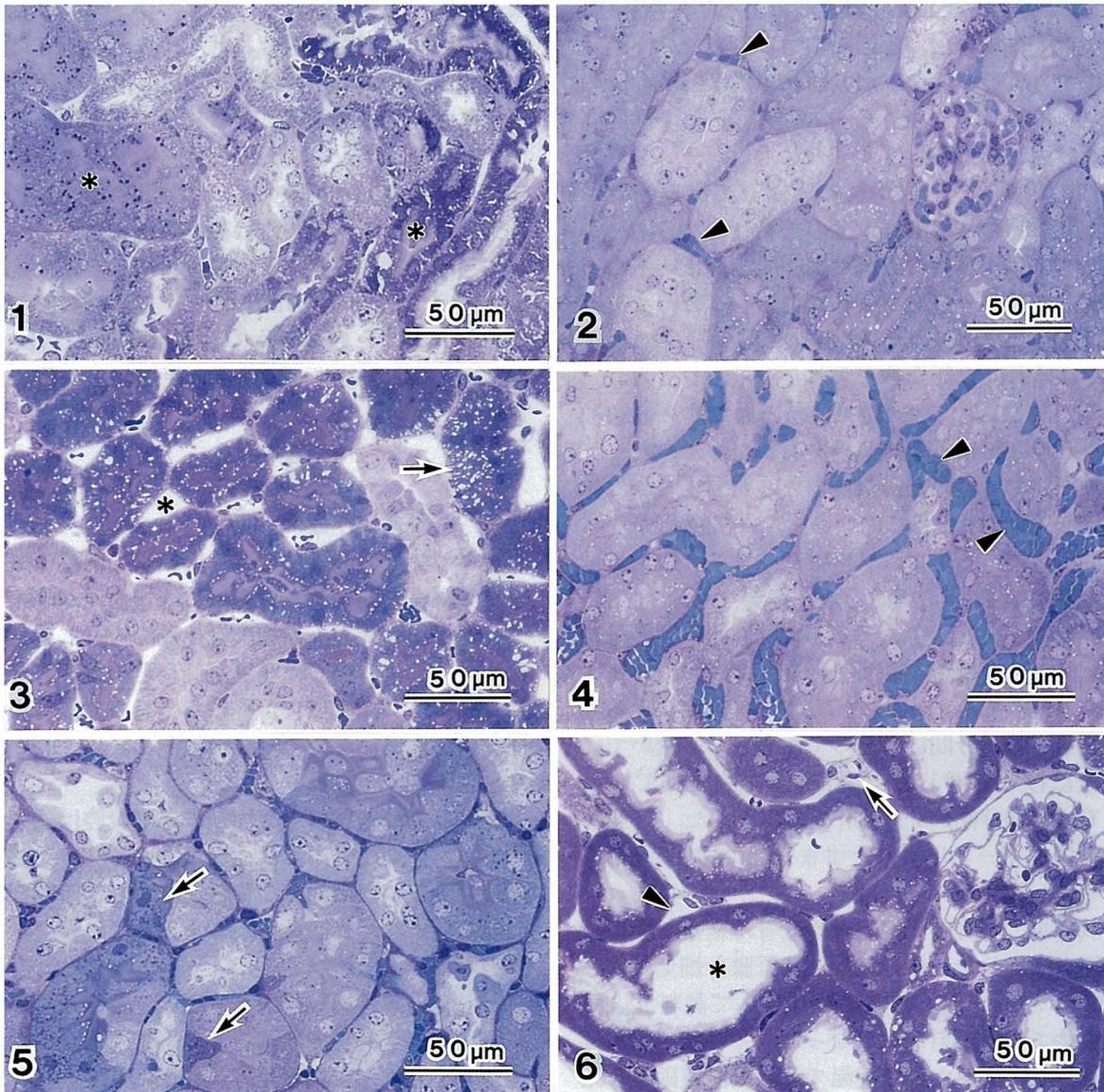
試料Ⅱでは、試料Ⅰと同様、尿細管腔は閉鎖しており、毛細血管内には血球が詰まっていたが、尿細管上皮はほぼ均一な染色性を示し、暗調細胞は認められず、良好な組織像を得ることができた(図2)。

試料Ⅱと同じMW照射条件でも、腎臓を細切して照射した試料Ⅲでは試料Ⅱと著しく異なった組織像を呈した。尿細管腔は試料Ⅰ、Ⅱと同様に閉鎖していたが、尿細管と尿細管との間の間質が開大し、毛細血管内に認められる赤血球は試料Ⅰ、Ⅱに比して数が減少していた。上皮細胞内には多数の空胞が認められ、微細形態の保存性は試料Ⅱと比べて劣るように思われた(図3)。

腎臓全体を浸漬固定した試料Ⅳでは、毛細血管内に多数の赤血球が残存しており、尿細管上皮細胞の固定は試料Ⅱと同様に良好であった(図4)。

細切して浸漬固定した試料Ⅴでは毛細血管内に赤血球が詰まっていたが、血管腔の大きさは試料Ⅳよりも小さくなっていた。間質の開大は認められず、尿細管上皮の微細形態の保存性は良好であった(図5)。

灌流固定をおこなった試料Ⅵでは、尿細管腔が著しく開大していた。また、血球成分は洗い流さ



- 図1. MW照射固定試料(試料Ⅰ)の準超薄切片像。
尿細管上皮細胞の染色性が均一な部位(左側)と不均一な部位(右側)が見られ、後者では上皮細胞は不規則な形を呈するものが多い。近位尿細管の内腔は閉鎖している(*)。
- 図2. MW照射固定試料(試料Ⅱ)の準超薄切片像。
尿細管上皮細胞は均一に染色され、核も明瞭である。毛細血管には血球(矢頭)が詰まっており、近位尿細管腔は閉じている。
- 図3. MW照射固定試料(試料Ⅲ)の準超薄切片像。
一部の近位尿細管上皮には多数の空泡が認められ、蜂巢状を呈している(矢印)。間質部(*)が解離し、血管腔も開大して中に存在する血球も少ない。尿細管内腔は閉鎖している。
- 図4. 浸漬固定試料(試料Ⅳ)の準超薄切片像。
尿細管上皮はほぼ均一に染色されており、核も明瞭である。血管腔には血球が充満(矢頭)しており、ほとんどの尿細管腔は閉鎖している。
- 図5. 浸漬固定試料(試料Ⅴ)の準超薄切片像。
組織像は試料Ⅱに最も類似しているが、同一の尿細管に染色性の異なる上皮細胞が観察される(矢印)。
- 図6. 灌流固定試料(試料Ⅵ)の準超薄切片像。
上皮の核は染色質や核小体が明瞭で、細胞質は均一な染色性を呈している。近位尿細管の内腔は大きく広がり(*), 毛細血管腔(矢頭)の血球は流出している。間質(矢印)は拡大している。

れて血管腔はすべて空となっており，間質はやや拡大しているように見受けられた．尿細管上皮は濃染されており，微細形態の保存は良好であった（図6）．

2. 超薄切片像

試料Iの光顕像で濃染された暗調細胞が認めら

れた部位では，暗調細胞は細胞質，核ともに凝縮して全体として星状を呈し，暗調細胞に隣接した明調細胞は膨化して細胞質が明るく抜けた像として観察された（図7a）．暗調細胞のミトコンドリアや粗面小胞体などの細胞内小器官は細胞の凝縮にともなってお互いに近接しており，ミトコンド

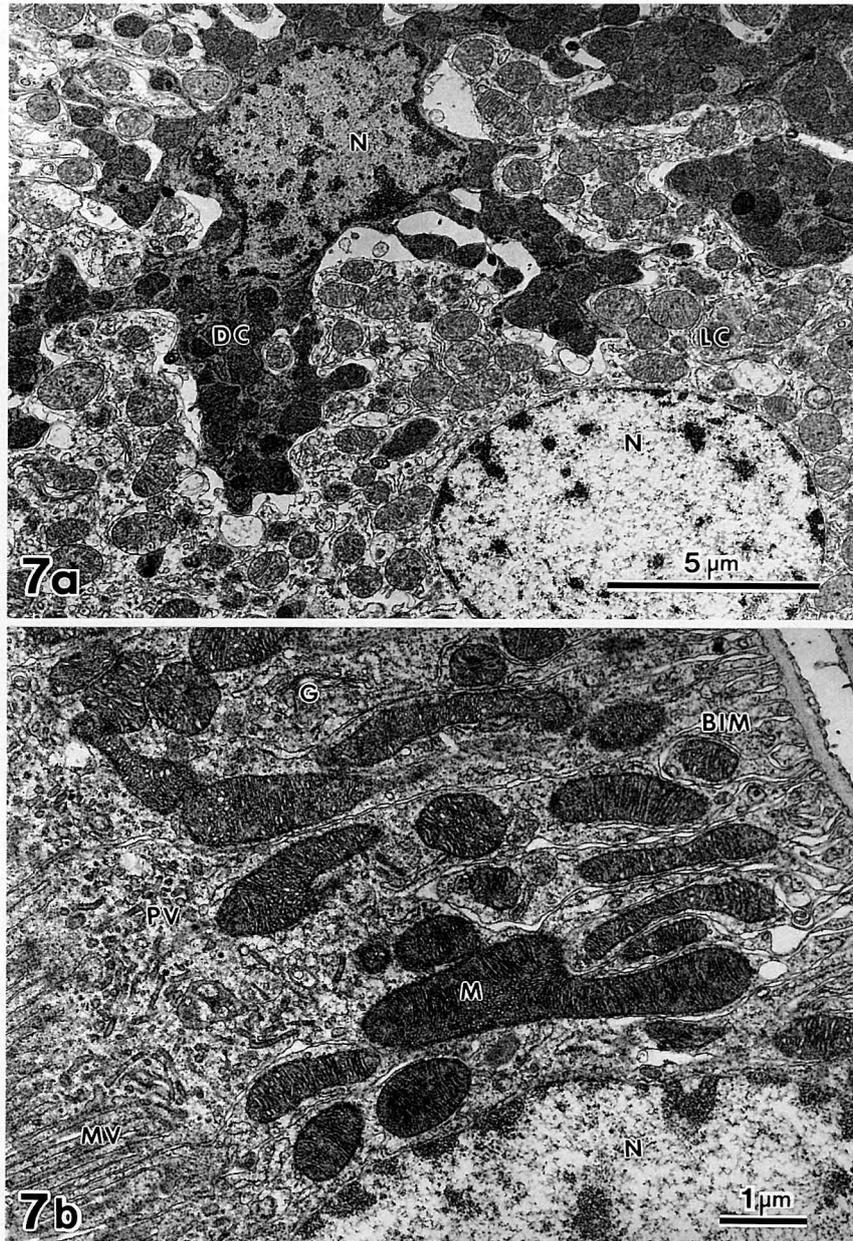


図7. MW照射固定試料（試料I）の超薄切片像．

a：準超薄切片で不均一な染色性を呈した部分の弱拡大像．暗調細胞（DC）と明調細胞（LC）とが混在している．暗調細胞は細胞質，核（N）ともに凝縮して星状を呈している．明調細胞は丸く明るい核（N）を有し，暗調細胞の間を埋めるように細胞質が広がっている． b：準超薄切片で均一な染色性を呈した部分の強拡大像．核（N），ミトコンドリア（M），ゴルジ装置（G），微絨毛（MV）頂部飲み込み小胞（PV），基底膜細胞膜の陥入・咬合によるヒダ状構造（BIM）などの微細形態の保存はほぼ良好である．

リアの輪郭は不規則な形を呈し、クリステも不明瞭なものが多かった。明調細胞では、細胞基質は明るく多数の小胞構造が認められ、ミトコンドリアやゴルジ装置は膨化していた。この細胞の微絨毛の太さは不均一で内部のフィラメント構造は不明瞭であった。暗調な上皮の側部や基底咬合部では細胞間隙が拡大していることが多かった。しかしながら、光顕像で比較的均一に染色された部位の超薄切片像では、近位尿細管上皮の核、細胞質の細胞内小器官、頂部の飲み込み小胞、基底部の陥入が明瞭に観察され、微細形態はほぼ良く保たれていた (図 7 b)。

試料Ⅱの尿細管上皮細胞を観察すると、尿細管腔は閉じていたが微絨毛は太さが一定しており、互いに密着して整然とした配列を示し、細胞頂部の飲み込み小胞などの構造も良く保たれていた (図 8 a, b)。細胞内小器官に関しては、ミトコンドリアは電子密度が高く、クリステは明瞭で、粗面小胞体、ゴルジ装置および核の保存状態も良好であった (図 8 c)。また、上皮細胞の基底部の微細形態もよく保存されていた。

試料Ⅲは、あらかじめ腎臓を細切した以外は試料Ⅱと同一のMW照射条件で固定したものであるが、微細形態の保存性は不良であった (図 9)。

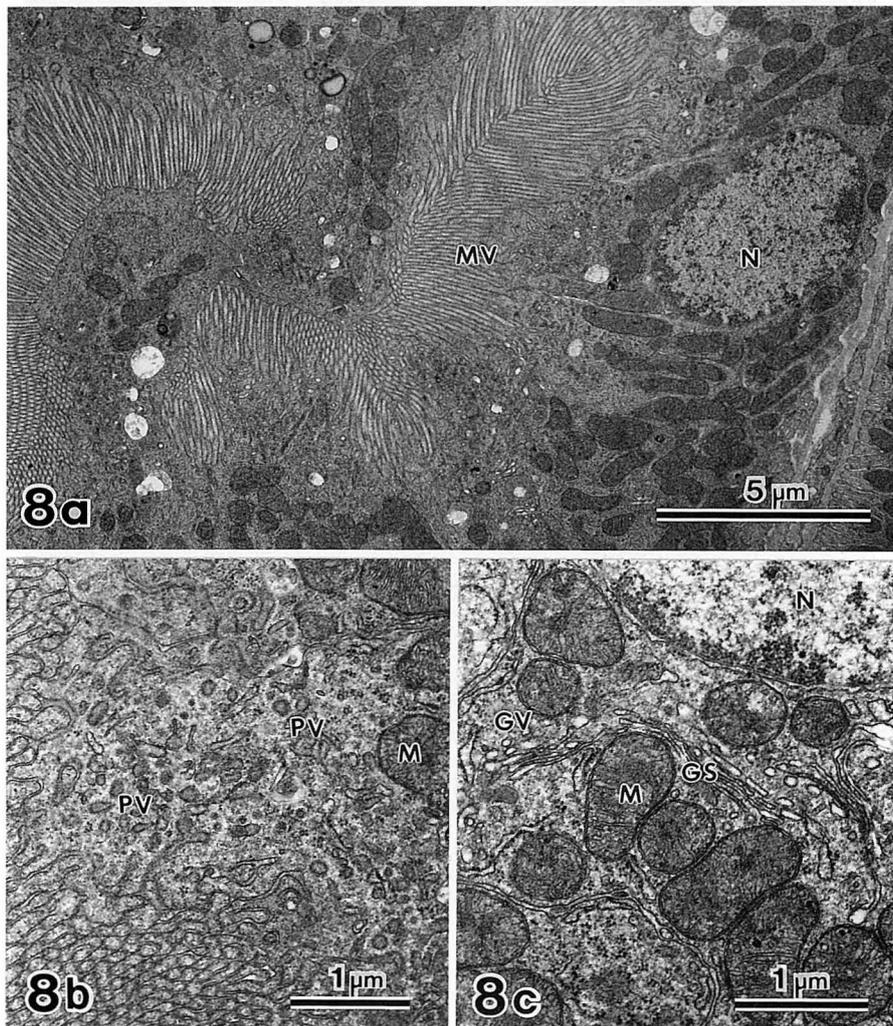


図 8. MW照射固定試料 (試料Ⅱ) の超薄切片像。

a : 近位尿細管の弱拡大像。微絨毛 (MV) の太さは一定で、互いに密着して規則正しく配列している。N : 核。 b : 上皮細胞頂部の拡大像。飲み込み小胞 (PV) が明瞭に観察できる。M : ミトコンドリア。 c : 核周辺のゴルジ装置。ゴルジ層板 (GS), ゴルジ小胞 (GV), ミトコンドリア (M) などの細胞内小器官が明瞭に認められる。N : 核。

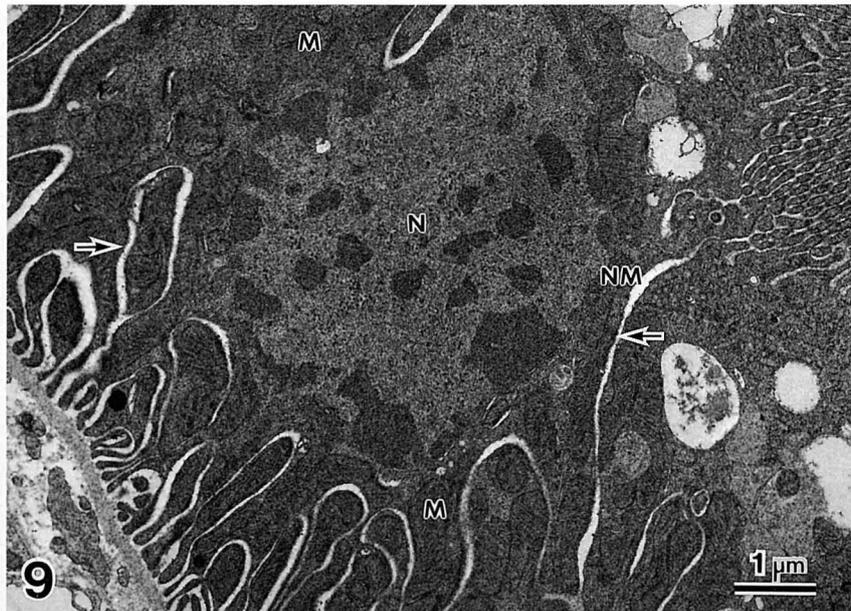


図9. MW照射固定試料（試料Ⅲ）の超薄切片像。

細胞基質は暗調を呈し、核（N）はよく保存されているが、核膜（NM）やミトコンドリア（M）の輪郭は不明瞭である。基底部や側部の細胞間隙（矢印）が広がっている。

尿細管上皮細胞の基底部や側部の細胞間隙が広がり、細胞は収縮して全体に電子密度が高く、核膜や小器官の輪郭は不明瞭であった（図9）。細胞小器官を拡大して観察しても、ゴルジ装置は判別しがたく、ミトコンドリアのクリステも明瞭に認めることはできなかった。微絨毛の太さは一定で互いに近接して配列していたが、小胞体や頂部の飲み込み小胞は明瞭に観察できなかった。

MW照射をおこなわず、浸漬固定のみによって作製した試料Ⅳでは試料Ⅱと同様に上皮細胞の微細形態が良く保たれ、核、ミトコンドリア、ゴルジ装置、粗面小胞体、リボゾームなどの細胞内小器官が明瞭に観察できた（図10a）。頂部では微絨毛や飲み込み小胞、基底部では陥入膜や咬合部のミトコンドリア、粗面小胞体などの構造物の固定は良好であり、ミトコンドリアの基質は高い電子密度を呈し、クリステは明瞭に観察された（図10b, c）。

腎臓を細切してから浸漬固定をおこなった試料Ⅴでは上皮細胞に暗調細胞と明調細胞とが認められ、暗調細胞では核や細胞内小器官が凝集しているものが多かった。明調細胞の微絨毛は著しく膨化をきたして太くなっており、細胞内基質の保存性は不良であった（図11）。

灌流固定をおこなった試料Ⅵでは尿細管腔が拡

大していたが、これに伴って微絨毛間に空隙が生じていた。また、内腔に向かう大きな細胞質突起が観察された（図12a）。細胞内微細形態は良く保存されており各種の細胞内小器官が明瞭に識別できた。ミトコンドリアは内部にミトコンドリア顆粒が認められ、また網状をなす粗面小胞体や水解小体も明瞭に観察できた（図12b）。

以上の6種類の試料について近位尿細管上皮細胞の固定の優劣を表2に示した。核、微絨毛、細胞内小器官などの膜構造物については膜の波打ちや断裂の有無、構造全体の膨化・収縮の度合いを判断基準とした。細胞頂部では刷子縁を構成する微絨毛内のフィラメントの存否や微絨毛下の飲み込み小胞・空隙などの保存性を、また基底部では基底咬合や基底陥入による細胞膜およびミトコンドリアや小胞体の保存性、咬合部の開離度を判定の基準とした。被膜のついた腎臓を丸ごとMW照射した試料Ⅱでは、良好な固定像が得られ、MW照射試料群のなかでは最も良い結果を示した。しかし、MWの出力を上げて固定液の温度が35℃に達するまで照射をおこなった場合には、上皮細胞は凝縮し、これに伴って核の変形などが著明になった。出力を150Wにおさえ、試料の温度上昇を制御しても、腎を細切した後にMW照射をおこなうと毛細血管から血球が流れ出て、間質も広がっ

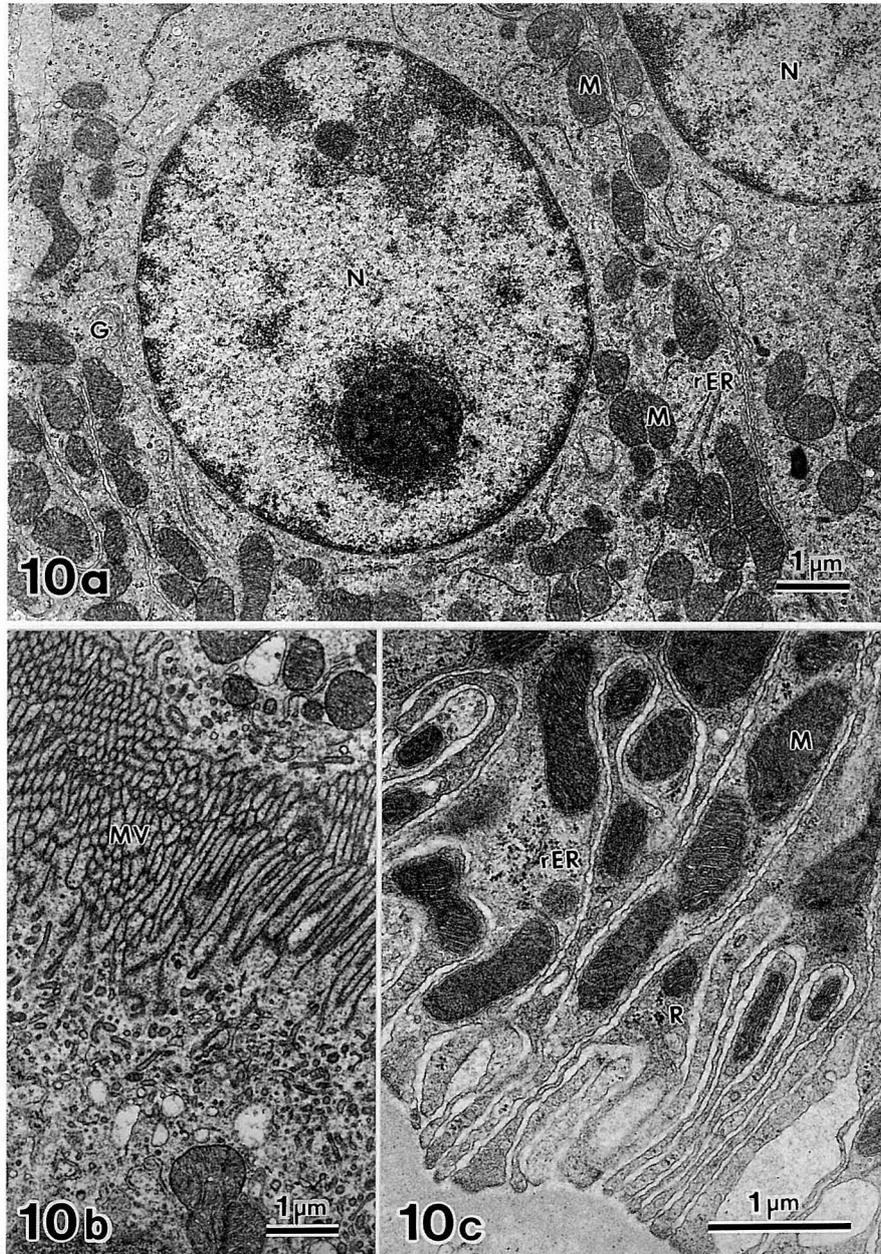


図10. 浸漬固定試料（試料Ⅳ）の超薄切片像。

a : 近位尿管上皮細胞の核と細胞質。核 (N), 核小体, ミトコンドリア (M), 粗面小胞体 (rER), ゴルジ装置 (G), などの微細構造が明瞭である。

b : 細胞頂部の拡大像。頂部細管と飲み込み小胞が明瞭に認められる。MW: 微絨毛。c : 基底部の拡大像。基底部のミトコンドリア (M) の基質は暗調であるが, クリステは明瞭である。粗面小胞体 (rER) やリボソーム (R) も良く保存されている。

て上皮細胞は収縮ぎみとなり, 基底部の細胞間隙が拡大しミトコンドリアや小胞体など細胞内小器官の膜系が不明瞭となる傾向が認められた。従来の浸漬固定をおこなった試料Ⅴでは上皮細胞の電子密度が不均一で, 微絨毛は部分的に膨化し, 試料Ⅵの灌流固定をおこなった試料では尿管腔が

開大していた。最も障害のない像を示したのは試料Ⅳであった。従来の方で最も良好な結果が得られた試料ⅣとMW照射試料のうちで最も良好な固定像を呈した試料Ⅱとを比較すると, 像質はむしろ試料Ⅳが上回る結果となった。

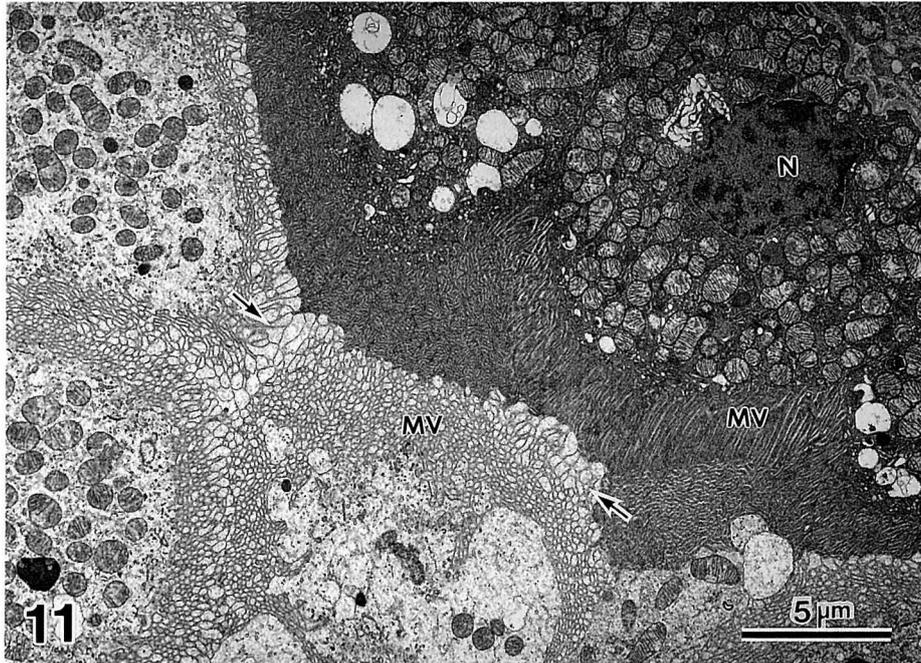


図11. 浸漬固定試料（試料V）の超薄切片像。
近位尿細管上皮には暗調細胞（右上部）と明調細胞（左下部）とが観察される。明調細胞の微絨毛（MV）は膨化して微細形態が損なわれている（矢印）。N：核。

表2. マウス腎近位尿細管の固定像比較表.

	試料I (MW)	試料II (MW)	試料III (MW)	試料IV (CI)	試料V (I)	試料VI (P)
尿細管腔	閉鎖	閉鎖	閉鎖	閉鎖	閉鎖	開大
核	△～×	○	△～×	◎	△～×	◎
微絨毛	△～×	○	△	○～△	△～×	○～△
ミトコンドリア	△～×	○	△～×	○	△	◎
小胞体	△～×	○	△	◎	△	◎
リボゾーム	△	○	△～×	◎	△	○
ゴルジ装置	△	○	△	○	△～×	○～△
基底咬合・陥入	×	◎	×	◎	△	○
良固定領域	狭	広	極狭	広	狭	極広
総合判定	×	○	×	◎	×	○

MW: マイクロウェーブ照射固定, CI: 試料I, IIに対照する浸漬固定, I:常法による浸漬固定, P:灌流固定.
固定・保存の良好なものから順に◎○△×を付す.

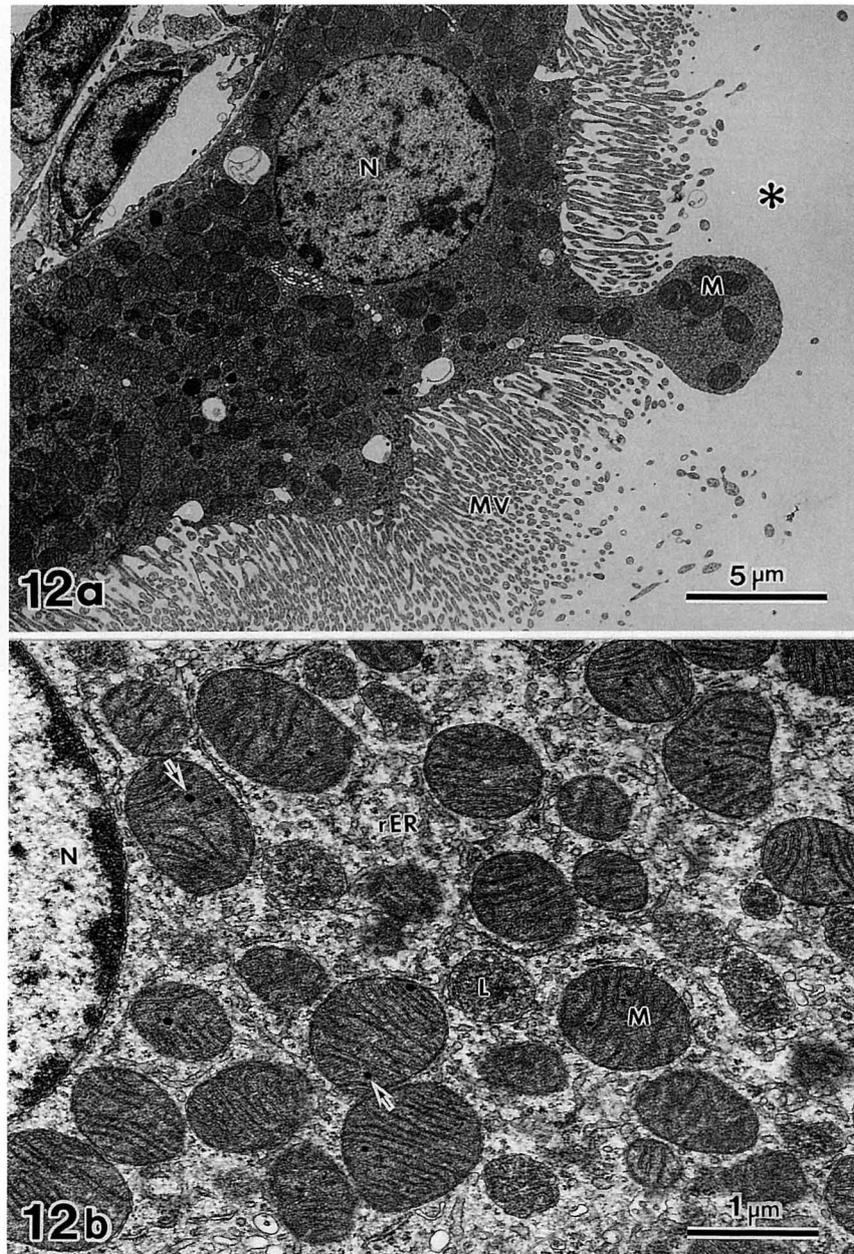


図12. 灌流固定試料（試料Ⅵ）の超薄切片像。

a : 近位尿細管上皮細胞の弱拡大像。開大した管腔 (*) に向かってミトコンドリア (M) を含んだ細胞質の突起が突出している。微絨毛 (MV) がばらばらに伸びているが細胞質や核質の保存性は良好である。N : 核。 b : 核周囲部の細胞質の拡大像。ミトコンドリア (M) のクリステやミトコンドリア果粒 (矢印) が明瞭に認められる。網状の粗面小胞体 (rER) や水解小体 (L) も良く保存されている。N : 核。

考 察

MW照射固定法は、これまでおこなわれてきた化学固定法よりすぐれた固定法であるとして脚光を浴びてきたが、至適照射条件を得るのが難しく現在は反省期に入ったといえる。その一方で、生

物試料に適したMW照射が可能な装置が開発されてきたが、一般的な試料作製法に普及するには至っていない。MW照射固定時には試料の温度上昇をいかに抑え、より効率的に試料にMWを照射するかが最も重要な因子である。MW照射時の試料の温度上昇に関する要因には次のような項目があ

げられる。1) 試料自体のもつ要因：大きさ、形状、組成、数、被膜の有無など。2) 固定液の液温、液量。3) 固定容器の形状や数。4) MWの出力。5) 回転ステージ上での固定容器の位置。

MW照射固定における時間と温度との関連性については、出力を一定にした場合、照射開始時の液温が高いほど温度上昇速度も速くなる傾向があり、室温(20℃程度)と同じ液温で照射を開始すれば出力500W、20秒間の照射で40℃を越えると言われている⁹⁾。

これまでの方法では、MWのみかけ上の出力を抑えるために、MW緩衝用水槽¹¹⁾¹²⁾を用いているが、使用する液量や容器の形状等によりどのくらい出力を制御できるかは不確定な要素が強い。今回用いた装置では照射出力を低く調整できるため(300W以下)、緩衝用水槽を用いなくてすむ利点があった。

腎臓や脾臓のような被膜を有する臓器の場合には、被膜に被われたまま照射すると、内部に発生した熱が臓器内で鬱熱し、構造の破壊を招くといわれている¹²⁾。今回の試料Iでの変形や損傷はおそらくこれに起因するものと考えられる。同じ被膜ごと照射した試料でも試料IIのように出力をおさえ、液温の低い状態では試料Iより長時間の照射であったにもかかわらず、ほとんど損傷のない固定像が得られた。このことから150W以下の低出力で液温も20℃以下に保てば、被膜の存在はMW照射固定の障害とはならないことを明らかにすることができた。また試料IIと試料IVの像質の結果から、被膜が組織内への固定液の浸透に対する障害物とならないことが示されたことになる。

熱による損傷について、一般には照射開始時の液温を室温(20-22℃)でスタートし、終了時に37-40℃以内であれば超微構造の保持に問題はないと言われてきた⁵⁾¹²⁾。しかし、図7aに示したように試料Iでは照射終了時の液温が35℃であっても損傷が起こることがわかり、試料IIで示されたようにMW照射固定時には20℃以下の液温に保つことが必要と思われる。また照射時の急激な温度上昇を防ぐために間欠照射¹¹⁾をおこなっても、液温が35℃近くになると図7aで示されたように組織の損傷が起こることが判明した。

MW照射固定法は開発当時は“MW cooking”と呼ばれ、短時間で試料作製ができるメリットがあるとされていた。しかし、MW照射固定法で

の試料作製時間は従来の方法とあまり変わらず、必ずしもMW照射によって固定時間が短縮される⁴⁾とは言い難い。水平¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾は、MW照射によってアルデヒド系固定液は瞬時に組織ブロックのあらゆる部位にまんべんなく浸透するが、これだけでは不完全で蛋白とのクロスリンクには更に時間を要するとしており、MW照射をおこなったとしても、照射後試料を固定液に浸漬したまま放置しておく必要があると報告している。マウス腎臓のように比較的小さく、被膜も薄い臓器では、MW照射固定よりもむしろ腎臓全体を固定液に浸漬した方が良い結果が得られ(図10)、試料作製も簡便であると思われる。

MW照射して得られたラットの腎尿細管のTEM像について、細胞が膨化することなく均一な高電子密度を示し、細胞内小器官の膜の連続性の保存が良くコントラストも高いとする報告²⁾がある。しかし、この報告ではあらかじめ1/2Karnovskyの固定液で10分間も灌流固定した後でMW照射をしており、また示された準超薄切片像で尿細管腔が大きく開いていることから、MW照射によって得られた固定像とは言い難く、我々が示した灌流固定像と同等の所見でしかない。

MW照射固定の有効領域に関して、逸見ら³⁾は蛋白分解酵素処理による細胞消化の程度やケラチン免疫染色を利用して、ホルマリンを用いたMW照射標本では三層性の異なる固定領域が存在することを示した。彼らによると、MW固有の固定領域は組織ブロックの内部に限られており、表層部は固定剤や脱水時のアルコールによる固定領域であるとしている。しかし、彼らの試料作製法ではMW照射後に、蛋白とアルデヒドとの架橋を完全にするための浸漬固定¹¹⁾¹²⁾を行っているとは考えられず、またTEMによる超微構造についての検討もなされていないので、今回の結果と対比し検討することは難しい。

MW照射固定の実際的な処方や設定条件は研究者ごとにまちまちで、報告されている結果を同一条件下に比較検討することは困難であるが、今回の結果も含めて考えると以下のことが言えると思われる。1) MW照射固定は低出力(150W以下)で行うのが望ましい。2) 照射終了時の液温は20℃を越えない方がよい。3) 臓器や観察対象によっては細切せず被膜ごと素早く照射した方が良い固定像を得ることもある。

今回の検討では、これまで安全とされて来た照射出力および上限温度の範囲内での試料作製をおこなったにもかかわらず、条件設定の仕方によっては著しく様相の異なった固定像を呈することが判明した。今後とも、MW照射固定法を生物試料に応用するには、観察対象や目的に応じてきめ細かな条件設定をすることに加え、従来の方法による固定像と対照しながらMW照射固定像の真の姿を捕らえる努力が必要であると思われる。

結 語

マウス腎近位尿細管を観察対象としてMW照射固定における条件設定（照射出力・照射開始時から終了時までの液温・試料の形状）を変えた3種のMW照射試料を作製し、従来の浸漬固定や灌流固定の試料とともに準超薄切片および超薄切片を作製して固定像を比較検討した。

MW照射試料で最も良好な固定像を示したのは腎臓を被膜ごと腎門部で結紮して摘出した試料で、出力150W、液温0-15℃で緩衝液中での連続照射に続いて固定液による液温17℃までの間欠照射をおこなったものであった。腎臓を細切してから照射した場合は上皮細胞の収縮や基底咬合の離開が認められ、細胞内ではミトコンドリアや小胞体などの膜構造が不明瞭となる傾向があった。

従来どおりに浸漬固定をおこなった試料では上皮細胞の電子密度が不均一で、微絨毛の膨化と核質や細胞内小器官の凝集が認められ、灌流固定の試料では尿細管腔が不自然に開大していた。従来の固定法で最も障害のない固定像を呈したのは腎臓全体をそのまま浸漬固定した試料で、これとMW照射固定で良好な結果を示した試料とを比較すると、微細形態の保存性は浸漬固定のほうがすぐれていた。

今回の観察結果から、MW照射固定は150W以下での低出力でおこなうのが望ましく、照射終了時の液温は20℃を越えない方が良い固定像が得られること、また、マウスの腎臓のような小さな臓器では、細切せず被膜ごと素早くMW照射をした方が良い固定像が得られることが判明した。

文 献

- 1) Bernard, G. R. (1974). Microwave irradiation as a generator of heat for histological fixation. *Stain Technol.* 49, 215-224.
- 2) Gokhale, J. A. and Khan, S. R. (1992). Structure of rat kidneys following microwave accelerated fixation. *Scanning Microsc.* 6, 511-519.
- 3) 逸見明博, 山口比呂美, 瀬山好美, 森 吉臣 (1990). 免疫組織学的手段によるマイクロウェーブ固定法の有用性に関する研究. *臨床病理* 38, 193-200.
- 4) 陣内睦男, 森 吉臣 (1990). 低ワット型マイクロウェーブ照射による電顕用試料作製時間の短縮化—(1) 固定, 脱水, 浸透について. *細胞* 22, 524-527.
- 5) 勝又 修, 田中館明博, 山科正平 (1990). マイクロウェーブ固定の実際. *細胞* 22, 519-523.
- 6) Leong, A. S.-Y., Daymon, M. E. and Milios, J. (1985). Microwave irradiation as a form of fixation for light and electron microscopy. *J. Pathol.* 146, 313-321.
- 7) Login, G. R. and Dvorak, A. M. (1985). Microwave Energy Fixation for Electron microscopy. *Am. J. Pathol.* 120, 230-243.
- 8) Mayers, C. P. (1970). Histological fixation by microwave heating. *J. Clin. Pathol.* 23, 273-275.
- 9) 水平敏知 (1988). マイクロウェーブ照射による生物試料固定法. *Pure Chemicals "Dai-ichi"* 19, 103-116.
- 10) 水平敏知 (1989). マイクロウェーブ照射による生物試料の固定法. *医学のあゆみ* 149, 907-911.
- 11) 水平敏知 (1990). マイクロウェーブ照射による生物試料の処理法—特に固定法とその理論的根拠の検討—. *電子顕微鏡* 25, 44-57.
- 12) 水平敏知 (1993). マイクロウェーブ照射による生物試料の固定・染色法の基本とその応用. pp.25-83, 学際企画, 東京.
- 13) Wagenaar, F., Kok, G. L., Broekhuijsen-Davies and Pol, J. M. A. (1993). Rapid cold fixation of tissue samples by microwave irradiation for use in electron microscopy. *Histochem. J.* 25, 719-725.