

原 著

マイクロウェーブ照射による硬組織内の軟部組織固定法

—モルモット内耳形態の電子顕微鏡観察—

獨協医科大学越谷病院 耳鼻咽喉科

龍見 京良

要 旨 一般に、動物を用いた実験で、断頭後即座に取り出すことができない内耳のような組織の電子顕微鏡像を得るためには、全身灌流固定あるいは局所灌流固定のいずれかが必要である。しかし、これらの手法を用いると、血管内圧や外リンパ圧を人為的に上昇させることになり、血管内皮細胞や膜迷路の正しい形態を反映しない可能性がある。今回我々は、蝸牛にマイクロウェーブ照射固定（以下MWI固定と略す）法を用いた。モルモット断頭後蝸牛骨胞を切り出し、固定液（2%パラホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒド混合液）に入れ、出力300 Wで1分間照射を行い、照射後即座に4℃の固定液と交換した。この操作を10回繰り返して、計10分間照射した。固定液の液温は照射中30℃前後に保持し、照射後さらに1時間固定液中に浸した。固定液から取り出した蝸牛の外側壁の骨に僅かな裂隙を入れ、オスmium酸で後固定した後、エポキシ樹脂に包埋した。標本は蝸牛軸を含む面で半切し、実体顕微鏡下にて蝸牛外側壁の骨を削除した後、超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡で観察を行なった。

血管条、コルチ器の固定状態は従来の固定法と同等かそれ以上であった。MWIは手技が簡便であるばかりでなく、灌流固定の弱点を補う、すぐれた固定法であった。特に、硬組織に囲まれた軟組織の固定法として有望な方法である。

Key Words : マイクロウェーブ照射, 電子顕微鏡, 内耳形態

緒 言

電顕観察するには、組織の変性を防ぐために、出来るだけ速やかに組織を固定する必要がある。そうすることにより、より実際に近い形態を観察することが出来る。動物実験では短時間に取り出しにくい臓器や、採取する時に壊れやすい臓器の場合は灌流固定法が一般的である。しかし、一方で、全身灌流固定は動物の血管内圧が人為的に高められることにより、血管内皮細胞の形態に変化を生ずる可能性がある²⁶⁾。また、側頭骨内局所灌流固定法である正円窓窩からの固定液の灌流はライスネル膜の位置をずらす可能性がある。このジレンマを解消するために、我々はMWI固定法を用いた。

MWI固定は生物試料の固定のためにマイクロ波を照射すると、顕微鏡像が良く保たれているとMayersが1970年に述べたことに始まる¹⁾。当初はその意義が全くわからなかったが、以後Loginらの実験をはじめ^{14~23)}、様々な試行錯誤を経て、1990年MizuhiraがMWIに理論的根拠を与えるに至った^{2~5)}。このことにより、MWIは一応の完成をみた。しかし、硬組織内に存在する臓器がMWI固定法で充分満足のいく固定が可能かどうかについての報告は未だにない。そこで、硬組織に包まれた蝸牛を灌流固定ではなく、管腔内に圧力を加えないMWI固定法を用いて満足のいく電顕像が得られるかどうかを検討することにした。

方 法

15匹のモルモットを使用して実験を行った。10匹(20側)はMWIを行い、5匹(10側)はMWIを行わないコントロールとした。

平成15年7月7日受付, 平成15年11月29日受理

別刷請求先: 龍見京良

〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷2-1-50

獨協医科大学越谷病院 耳鼻咽喉科

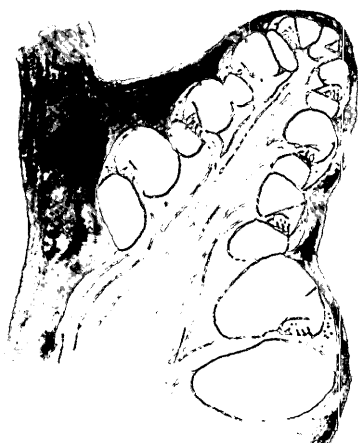


図1 蝸牛を蝸牛軸面で切断した実体顕微鏡模写

モルモットの腹腔内にペントバルビタール (30 mg/kg) を投与し、麻酔後断頭した。ただちに蝸牛骨胞を切り出し、2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 1 \text{ mM MgCl}_2 \cdot 0.1\%$ タンニン酸をそれぞれ含む2%パラホルムアルデヒド-0.5%グルタルアルデヒド混合液 (前固定液) に浸した。大型のペトリ皿に冷水を入れ、その中に蝸牛を入れた固定ビンを置いた。ペトリ皿をマイクロウエーブ装置 (MI-77, 東屋医科機械) のターンテーブル上に置き、出力300 Wで1分間照射を行った。照射後即座に固定液とペトリ皿中の水をそれぞれ4℃の固定液と冷水とに交換した。この操作を10回繰り返す、計10分間照射を行った。この方法によって固定液の液温は30℃前後に維持することが出来た。照射後さらに1時間固定液に浸漬した。固定後蝸牛外側の骨に僅かな裂隙を入れ、0.1 M カコジレート緩衝液 (pH 7.2) で15分間、3回洗浄した。後固定は1%オスミウム酸で30分間行い、脱水後、エポン812に包埋した。エポン包埋された蝸牛を蝸牛軸面で切断、実体顕微鏡下にて側壁の骨を削除し超薄切片を作製し、ウラン・鉛染色を施した後、透過型電子顕微鏡 (JEM 1200-EX, JEOL) で観察を行なった。光顕用には2~3 μm の切片を作製し、トルイジンブルー染色を行った。

頭蓋底側蝸牛骨の厚さは鼓室側蝸牛骨より厚い (図1) ので、頭蓋底側と鼓室側の骨の厚みによるMWIの固定具合の差異を調べた。また、基底回転と上部回転で固定に差があるかを調べた。

コントロールにおいては取り出した蝸牛にマイクロウエーブ照射を行わず、そのまま固定液に一時間浸漬した。

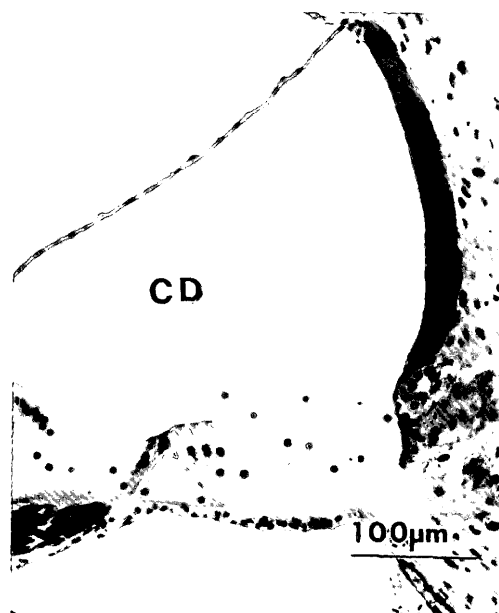


図2 MWIを施したコルチ器の光顕像。内・外有毛細胞、血管条の描出は良好である。CD: 蝸牛管

結 果

マイクロウエーブ照射時間と回数および温度条件について、さまざまな組み合わせを試みたところ、1分間照射を10回繰り返す、約30℃に維持することで最も良好な結果がコンスタントに得られた。

光顕像: 図2は蝸牛側壁の最も厚い頭蓋底側基底回転の光顕像である。コルチ器の内・外有毛細胞をはじめ他の細胞も形態上満足に行く固定状態であった。血管条の形態も固定状態は良好であった。回転別及び鼓室側・頭蓋底側の違いで固定状態による像の鮮明度に差はなかった。

電顕像: 図3 aは鼓室側基底回転の血管条である。辺縁細胞・中間細胞・基底細胞の描出は良好であり、血管内皮細胞の像も良好であった。高倍率で観察すると (図3 b)、辺縁細胞の管状構造、細胞間の閉鎖帯の描出は良好であり、ミトコンドリアの形態も鮮明であった。

頭蓋底側 (図4 a) の電顕像においても、辺縁細胞・中間細胞・基底細胞の描出は鼓室側と同様に良好であった。高倍率 (図4 b) でもミトコンドリア等の形態の保存状態は良好であった。

回転別でみると図5は上部回転 (第三回転・頭蓋底側) であるが、基底回転と同様に固定状態は良好であった。

ライスネル膜 (図6 a) も鼓室側・頭蓋底側・全回転で像の描出は良好であった。

有毛細胞は内有毛細胞 (図6 b)、外有毛細胞 (図6 c)

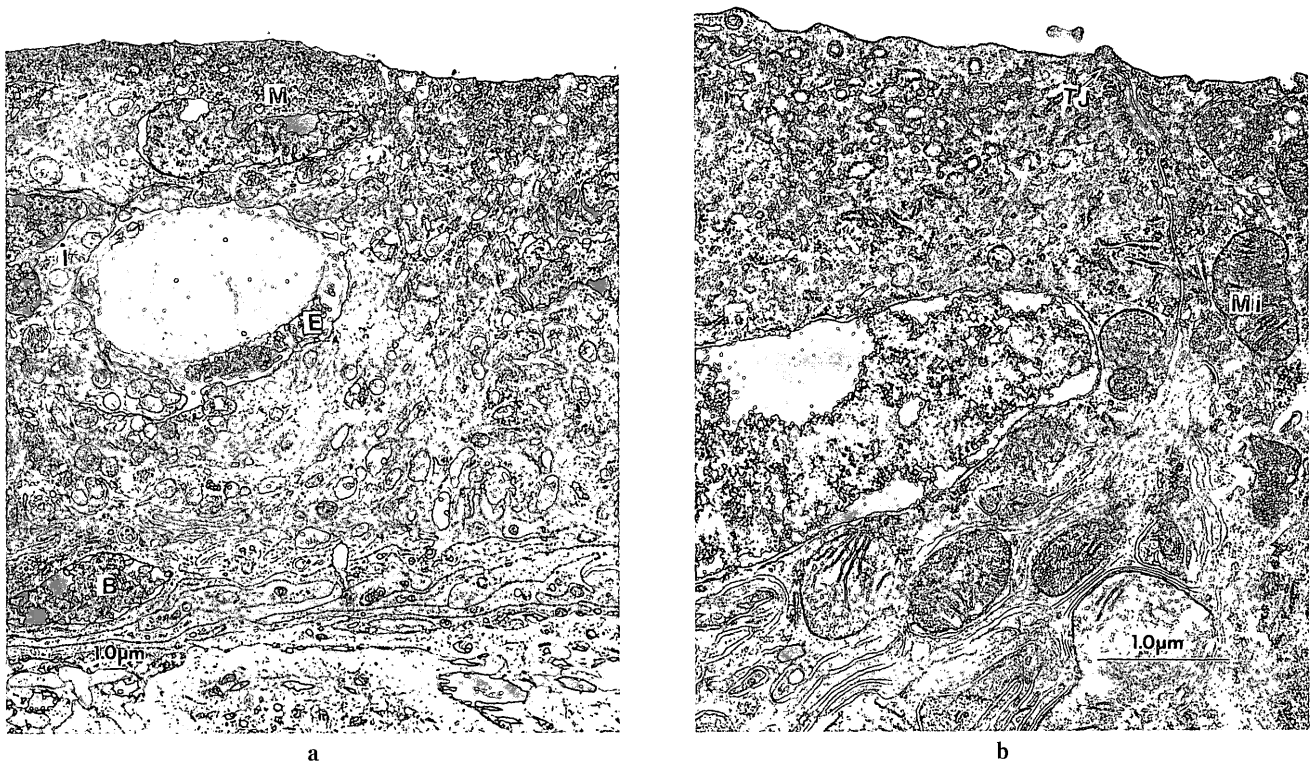


図3 a, b: MWIを施した基底回転の鼓室側血管条の低倍 (3 a) と高倍電顕像 (3 b) である. 血管条血管及び血管条を構成する各細胞内オルガネラの描出は良好である. M: 辺縁細胞 I: 中間細胞 B: 基底細胞 Tj: 細胞閉鎖帯 Mi: ミトコンドリア

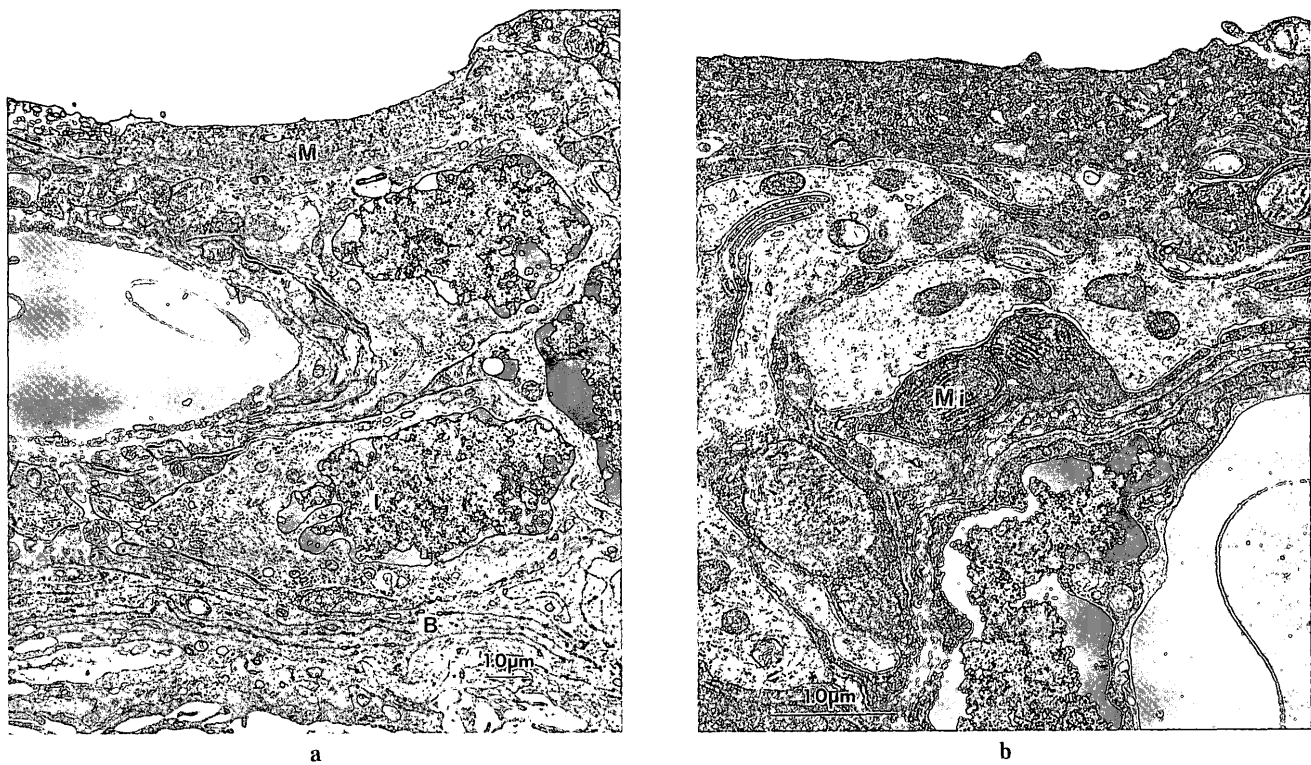


図4 a, b: MWIを施した基底回転の頭蓋底側血管条の低倍 (4 a) と高倍電顕像 (4 b) である. 図1より頭蓋底側の骨壁は鼓室側の骨壁より厚いが, 内部は充分固定されている. 低倍, 高倍像ともに血管条を構成する各種細胞及びそのオルガネラは鮮明に描出されており, 3a,3bと遜色ない. M: 辺縁細胞 I: 中間細胞 B: 基底細胞 Mi: ミトコンドリア

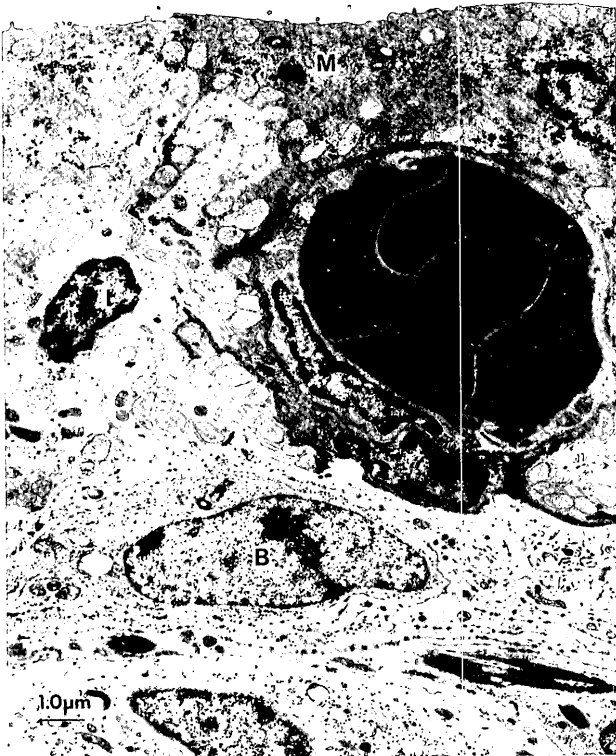


図5 MWIを施した第三回転の頭蓋底側血管条の低倍電顕像である。図1より第三回転の骨壁は基底回転の骨壁より厚いが、血管条を構成する各種細胞及び血管条血管は鮮明に描出されている。M：辺縁細胞 I：中間細胞 B：基底細胞

とも細胞内小器官は鮮明であり、像の描出は良好であった。有毛細胞の描出において蝸牛の部位による差はなかった。

MWIを施さなかった対照実験では図7に示すように、血管条辺縁細胞の膜の保存は悪く、中間細胞は空胞変性を示した。わずかに基底細胞だけが細胞質の観察には耐えられたが、核の描出は不鮮明であった。コルチ器も観察に耐えられる像ではなかった。

考 察

電子顕微鏡に用いられる生物試料の固定に関して通常最も良く行なわれている方法はアルデヒドとオスミウム酸による二重固定法であり、常に冷却しながら行うのが常法となっている。さらに、より生きている状態に近い瞬間をとらえようと、急速凍結法などが用いられられている。

第二次世界大戦中さまざまな新しい兵器の開発がなされたが、その中のひとつにマイクロ波を用いたレーダーがある。このレーダーの登場と共にマイクロ波の人体な

ど生物への影響が大きな問題となり、やがて1970年にMayersが初めて生物試料の固定のために試料にマイクロ波を照射すると、光顕像が良く保存されていることを報告した¹⁾。

以後、欧州の臨床病理学者達が中心となり、マイクロ波照射により有用な試料が得られることが多数発表されたが、KokとBoonの内容⁶⁾は必ずしも当を得たものとはいいがたく、ことに電顕レベルに関しては一部を除いて参考とはなり得なかった。1988年以来、Mizuhiraらの基本的検討・実験^{2~5)}に始まり、その方法、装置も安定化し、極めて優れた像が光顕・電顕ともに得られるようになった。

Mizuhiraらは³H-formalinを用いた実験で、20秒の照射で拇指大までの試料であれば、マイクロ波のエネルギーによって、固定液³H-formalinが組織全域へ一瞬のうちに均等に押し込まれることを確かめた。Lowryの方法⁷⁾を用いて照射群と非照射群の組織ブロックのホモジネートを作り、たんぱく質の可溶性、不溶性分画の比を時間を追って調べることで、3時間後には両者とも等しくなるもののその過程では著しい差があり、これがマイクロ波照射法の優れた像を生むにいたる理由であることを明らかにした。アルデヒドとタンパクの化学的結合が急速に起こるため、拇指等大のものであれば、固定液は照射により瞬時に組織ブロック内に浸透するので、急速凍結固定法にも匹敵するか、あるいはそれ以上の固定効果が得られると主張した^{2~5)}。凍結法では表面からわずか数μmしか良い固定像が得られないのに対し、MWIでは組織ブロック全体が同じレベルで良い固定効果が得られことを証明した^{2~5)}。そして、固定には必ずしも低温保持する必要はないという結論にも達した。

しかし、これらは軟組織においてであり、硬組織におけるMWIの固定法に関して詳細に研究した論文は少ない。Maddenら^{8,9)}はサルやマウスの側頭骨のEDTAによる脱灰にMWIを施すとその脱灰時間が短縮されると述べているが、固定法は従来の心臓からの灌流固定法である。

一般に、側頭骨の動物実験において、組織の変性を最小限にとどめ、超微細構造を保持する固定法として従来から用いられている方法は灌流固定法である。固定液を心臓から注入して固定する全身灌流固定法と断頭前または後に側頭骨を取り出し固定液を正円窓から注入する局所灌流固定法があり、いずれの方法も硬い側頭骨で囲まれている内耳の固定法には欠くことの出来ない手技である。我々が渉猟し得た範囲においても、様々な動物実験の内耳電顕像は全て、いずれかの灌流固定法が施行され



図6 a, b, c : 6 aは頭蓋底側，基底回転，ライスネル膜で，6 bは頭蓋底側，第三回転，内有毛細胞，さらに6 cは頭蓋底側，第三回転，外有毛細胞である．いずれも良好に描出されている．

ていた．しかし，前者は蝸牛の血管の研究には不向きであった．なぜなら，高圧力で血管内を洗った後に固定剤を灌流するため，血管は膨満していると考えられるからである．実際，WatanabeらによればHRPなどのトレーサーを入れて血管の透過性の変化を観察する場合には血管内より圧力をかけてHRPを押し出すため，生理的状態での透過性を観察できないと報告している^{24,25}．また，膨大な過去の電顕像の血管条血管は全て膨満しており²⁶，不自然さは否めない．

また，後者は内リンパ水腫の診断に不可欠なライスネル膜の膨隆に影響を与えるため，固定法がアーティファクトの原因となっている謗りを免れない．灌流圧が強大であれば，外リンパを通して内耳破裂に至ることも考えられる．いずれにしても，真の形態を反映しているか否かは固定の良し悪しで決定され，忠実に固定されることがあらゆる形態学的実験の前提となろう．

これらの問題をクリアーするために我々は側頭骨の標本にMWI固定法を用いた．脱灰によるアーティファクトを避けるために，脱灰液（EDTA等）は使用しなかった．従って，蝸牛骨胞内にわずかな裂隙を入れてから洗浄及び後固定を行う必要があった．前固定では蝸牛骨胞内に一切人為的操作を加えていないので，形態を損なう確率はかなり低いと考える．超微細構造は完全に保存さ



図7 MWIを施さなかった基底回転の鼓室側血管条の低倍電顕像である．辺縁細胞の膜の保存はわるく，中間細胞は空胞変性を示している．わずかに基底細胞の細胞質のみ観察に耐えうる．M：辺縁細胞 I：中間細胞 B：基底細胞

れ、内耳の形態を正確に描出した。しかも、MWIの手技は全身灌流固定法と比較しても簡便かつ迅速である。MWIは骨壁の厚い頭蓋底側と薄い鼓室側で像の保存状態に差はなく、両者とも良好であった。すなわち、今回の実験に用いた骨の厚さの差なら固定液の浸透に差がないか、最も薄い骨壁から固定液が蝸牛内に浸透し瞬時に内耳全体を固定したかのどちらかであろう。いずれにしてもMWIを施さなかったコントロール実験においては観察に耐える像ではなかったことを考えると、MWIにより短時間に蝸牛全体に固定液が浸透したものと考える。

本法は、内耳の形態を観察する様々な動物実験系において、固定に伴うアーティファクトを極力減少させる可能性があると考ええる。

さらに、MWIは側頭骨のみならず頭蓋骨に覆われたままの全脳固定や骨皮質に囲まれたままの骨髄の固定も可能かもしれない。脳や骨髄も硬組織に囲まれているがゆえにその超微細構造の観察には必然的にアーティファクトが避けられないが、MWI固定を用いれば側頭骨同様に良好な固定が得られることが予想される。これらの分野の動物実験においてもこの方法は応用できるであろう。骨髄の固定に対しMWIを用いた論文を散見するが^{10~13)}、骨髄内の細胞を採取したもので、骨皮質を含めて固定を行った論文はない。Erberらはヒトの骨髄生検で得た試料において、モノクローナル抗体を用いた組織化学実験を行なったが、凍結切片にした試料ではマスクされていた9種の抗原がMWIを施した試料では濃染されたと報告している。その理由について、MWI固定の迅速性を挙げ、抗原活性が失活する前に固定されたのであろうと推測している¹²⁾。

結 語

従来の電顕試料の固定法と比べて著しく異なる点は、①従来の固定法では固定液をピンとともに氷で冷却しながら行うことを必要条件の第一と考えて行ってきたが、MWIによる固定法では固定の際の液温が40℃より上がらなければ、組織の微細構造は保持されることが明らかとなった。ゆえに、凍結を行うよりむしろ一刻も早く試料を固定液に入れて照射することが大切である。②今までのように固定前に出来る限り小さく試料を細切する必要もない。MWIによる固定液の浸透は瞬時かつ深いので、まずMWI固定を行うことが大切である。

謝 辞 終稿に際し、御指導及び御校閲を賜りました恩師渡辺健介教授に深甚なる謝意を捧げます。

文 献

- 1) Mayer, C. P. : Histological fixation by microwave heating, *J. Clin. Pathol.*, **23** : 273-275, 1970.
- 2) Mizuhira, V., Hasegawa, H., Notoya, M. : New tissue fixation method for cytochemistry using microwave irradiation. 1. General remarks. *Acta Histochem. Cytochem.*, **23** : 499-523, 1990.
- 3) Notoya, M., Hasegawa, H., Mizuhira, V. : New tissue fixation method for cytochemistry using microwave irradiation. 2. Details. *Acta Histochem. Cytochem.*, **23** : 523-536, 1990.
- 4) Mizuhira, V., Hasegawa, H., Notoya, M. : Demonstration of membrane associated calcium ions of X-ray microanalysis after microwave fixation. *J. Clin. Electron Microsc.*, **23** : 5-6, 1990.
- 5) Hasegawa, H., Mizuhira, V., Notoya M. : A new electron staining method for ultrathin sections using microwave irradiation (MWI). *J. Clin. Electron Microsc.*, **24** : 864-865, 1990.
- 6) Kok, L.P., Boon, M.E. : *Microwave Cook Book for Microscopists*. (3rd Revised Ed.), Coulomb Press Leyden (Leyden), 1988.
- 7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275, 1951.
- 8) Madden, V. J., Henson, M. M. : Rapid decalcification of temporal bones with preservation of ultrastructure. *Hear. Res.*, **111** : 76-84, 1997.
- 9) Pace, A. J., Madden, V.J., Henson Jr, O.W., Koller, B. H., Henson, M. M. : Ultrastructure of the inner ear of NKCC1-deficient mice, *Hear. Res.*, **156** : 17-30, 2001.
- 10) Flokis A., Kwan YL., Ip F.C. : An improved method of alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase immunophenotyping using microwave irradiation. *Pathology*, Jul ; **23** (3) : 268-70, 1991.
- 11) Gerrits P. O., Suurmeijer A. J. : Glycol methacrylate embedding in diagnostic pathology. A standardized method for processing and embedding human tissue biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.*, Feb ; **95** (2) : 150-6, 1991.
- 12) Erber W. N., Gibbs T. A., Ivey J. G. Antigen retrieval by microwave oven heating for immunohistochemical analysis of bone marrow trephine biopsies. *Pathology*, Jan ; **28** (1) : 45-50, 1996.
- 13) Jamur M. C., Faraco C. D., Lunardi L. O., et al. :

- Microwave fixation improves antigenicity of glutaraldehyde-sensitive antigens while preserving ultrastructural detail. *J. Histochem Cytochem.*, Mar; **43** (3) : 307-11, 1995.
- 14) Login GR. : Microwave fixation versus formalin fixation of surgical and autopsy tissue. *Am J Med Technol.* **44** : 435, 1978.
- 15) Login GR, Dvorak AM. : Methods of microwave fixation for microscopy. *Prog Histochem Cytochem.* **27** : 1, 1992.
- 16) Login GR, Dvorak AM. : Microwave fixation : its expanding niche in morphological studies. *Scanning.* **2** (suppl II) : 56, 1992.
- 17) Login GR, Dvorak AM. : Microwave fixation provides excellent preservation of tissue, cells and antigens for light and electron microscopy. *Histochem J.* **20** : 373, 1988.
- 18) Login GR, Dvorak AM. : Microwave energy fixation for electron microscopy. *Am J Pathol.* **120** : 230, 1985.
- 19) Login GR, Galli SJ, Dvorak AM. : Immunocytochemical localization of histamine in secretory granules of rat peritoneal mast cells with conventional or rapid microwave fixation and ultrastructural post embedding immunogold technique. *J Histochem Cytochem.* **40** : 1247, 1992.
- 20) Login GR, Galli SJ, Morgan E, et al. : Rapid microwave fixation of rat mast cells. I. Localization of granule chymase with an ultrastructural postembedding immunogold technique. *Lab Invest.* **57** : 592, 1987.
- 21) Login GR, Schnitt SJ, Dvorak AM. : Microwave fixation provides rapid, primary fixation for light and electron microscopy and for immunohistochemistry and immunocytochemistry. *Eur J Morphol.* **3** : 206, 1991.
- 22) Login GR, Schnitt SJ, Dvorak AM. : Microwave fixation of human tissues for light microscopic immunoperoxidase identification of diagnostically useful antigens. *Lab Invest.* **57** : 585, 1987.
- 23) Login GR, Stavinoha WB, Dvorak AM. : Ultrafast microwave energy fixation for electron microscopy. *J Histochem Cytochem.* **34** : 381, 1986.
- 24) Watanabe K. : Change in the capillary permeability of the stria vascularis by different methods of death and fixation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **95** : 427-431, 1986.
- 25) Watanabe K, Tanaka Y. : Horseradish peroxidase permeation from the capillaries of the stria vascularis after inoculation of endotoxin into the middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **106** : 394-398, 1997.
- 26) Sakagami m, Matsunaga T, Hashimoto P, Fine structure and permeability of capillaries in stria vascularis of the inner ear of guinea pig. *Cell Tissue Res.* **226** : 511-522, 1982.

Effectiveness of Microwave Irradiation Fixation of Temporal Bone for Electronmicroscopy

Atsuyoshi Tatsumi

Department of Otolaryngology, Koshigaya Hospital Dokkyo University School of Medicine

In animal experiment, total or local irrigation fixation must be generally used for the electronmicroscopic observation of the inner ear because the inner ear cannot be taken out just after decapitation. When these methods are used, the ultrafine structure of endothelial cells and membranous labyrinth may not be correctly reflected due to artificial increase of blood pressure or perilymph one.

Now we conducted microwave irradiation (MWI) fixation of the inner ear in order to avoid these artifacts. The tympanic bullae of ten guinea pigs were fixed with MWI and those of five guinea pigs were fixed without MWI. The ultrafine structures

of the organelles were kept with MWI, but in the control inner ear (without MWI) the cell membranes collapsed and organelles were severely damaged. And the MWI fixation was methodologically easier and faster than the irrigation fixation.

In conclusion, the MWI fixation may be useful for the fixation of the soft tissue surrounded by the bone (e. g. bone marrow, whole brain in the skull).

Key Words : Microwave irradiation fixation, Electronmicroscopy, Inner ear