

**An attempt to develop the pressurized microwave device  
as a versatile biological tissue preparation instrument  
— One step for the standardization of the procedure  
for biological specimen preparation for E/M technology —**

*Noriko Nemoto<sup>1)</sup>, Yoshinori Matsuda<sup>2)</sup>, Hiroshi Yamakawa<sup>3)</sup> and Shichiro Miyazawa<sup>1)</sup>*

*<sup>1)</sup>Electron Microscopy Laboratory Center, School of Medicine, Katasato University,  
Sagamihara, Kanagawa, Japan, <sup>2)</sup>Epuko Co.ltd, <sup>3)</sup>NMG Co.ltd*

**[Introduction]**

It is important that the an attempt to preserve the ultrastructure of the cells and tissue in biological tissue preparation, particularly autolytic process in the separated cells and tissues should be avoided as the distortion of the tissue frequently tend to cause misinterpretation of the pathological changes (interpretation artifact). To avoid this unfavorable process, it is necessary to make the constituents in undissolved states, preventing the link of the constituents to the extra-cellular milieu. The most ideal technique is the rapid freezing or intravascular perfusion of the fixatives. However, difficulty is encountered in applying these techniques to the human anatomical specimens. Therefore, infusional fixation technique is frequently being used.

The fixation method has disadvantage that the rapid penetration of the fixative is not observed. Since the speed of penetration in different tissues is various, although tissue piece is small, fixative difference of surface and central area of tissue occurs, and electron photo is different, too. The tissues which infiltration of resin is poor, such as bone, skin or containing air lung tissue, usually poor fixation occurs easily. If fixation, dehydration and infiltration are bad, the good figures can't be gotten.

The authors have made an assessment on the various fixation methods including depressure technique for poor fixative tissues. Based on the observations, the authors have developed simplified pressurized device using syringe tube (1994). In 1998, May, pressurized chamber with microwave generating function has developed, which is succeeded to the present model (MN-PMW-1, 1999, May).

Our observation indicates that the pressurized chamber gives better penetration of the fixatives and the detailed information will be reported in this communication.

[Basic principle and function of the device]

The cylinder is shifting up and down by the pressure of compressor. The thermal sensor is installed at the tip of cylinder and monitoring the temperature of upper port of chamber (Fig. 1). The outer wall of the chamber is engulfed in U shaped configuration by the thermal-conducting casing. In the chamber, chilled water is circulated.

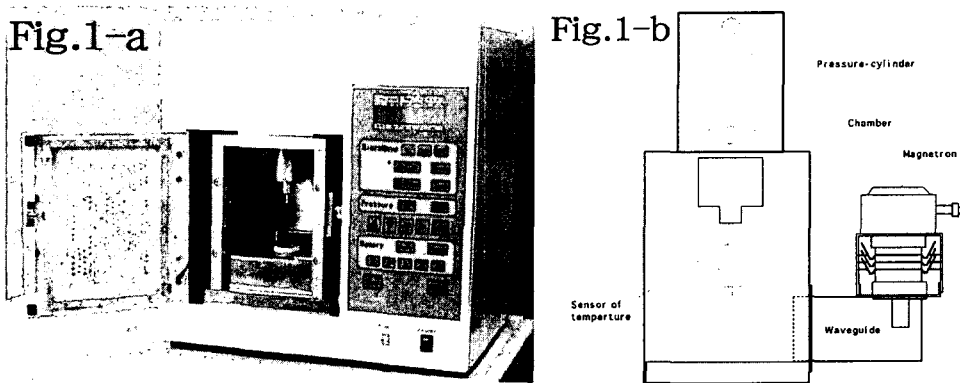


Figure 1-a. Pressurized microwave device. (Type MN-PMW1)

Figure 1-b. Microwave generation system.

The basic features of this device constitute of capability of microwave generation in pressurized circumstance. These functions are being used easily and simultaneously. The processing conditions could be memorized in 5 ways and could easily adjusted in respective requirement.

**1. On pressurized processing system**

The depressure has been attempted by the suction of vacuum pump, however, inappropriate addition of pressure may cause alteration of the cells and tissue. Therefore in this device fine adjustment of the pressure is possible by exact calibration of appropriate pressure. On the top cover, the similar hole with tip of the cylinder is located and it is sealed by the O ring at adding pressure by shifting docern. The tip of the cylinder, the air is pulled out and the oxidation of the fixative by air should be avoided. The pressure should be adjustable, varying 0.1~9.9 mg/Hg. The time duration of addicting pressure varies 0.1~999 minutes, which is suitable for Epok resin infusion for long duration.

## 2. On microwave generation system

As illustrated in the Fig. 1, the microwave generated by high waves generator, which is targeted on the opening of wave directing tube. The conventionally available MW generating device is that the MW is generated by the magnetron conductive wave tube and diffused by electron magnetic stirrer. In this method, complete diffusion of the MW observed and specified addition of MW into the specimen holder is difficult and detailed conditioning may be also difficult. Particularly reproducibility and consideration of heat absorption in temperature elevation is very difficult. However the device reported here is featured that the MW is efficiently generated and unfavorable elevation of temperature avoided by specially designed cooling system. The outer wall of holder is encircled by the U-shaped casing and MW is generated from the opening of the conductive wave tube and MW which is collided in the inner wall is also reflect in the entire vessel of holder. Eventually efficiently MW is irradiated to the specimen.

In this device, stirrer is provided to mix the solution to maintain the temperature constant. The module of MW is conditioned by the control panel and generating power is selected by choosing low or high regulating switch on the panel, also section of continuous or intermittent irradiation could be made. The maximum temperature is 123°C and irradiating time is one second to 999 seconds and module of intermittent irradiation is also able to select.

## 3. Coordinated pressure and MW conditioning function

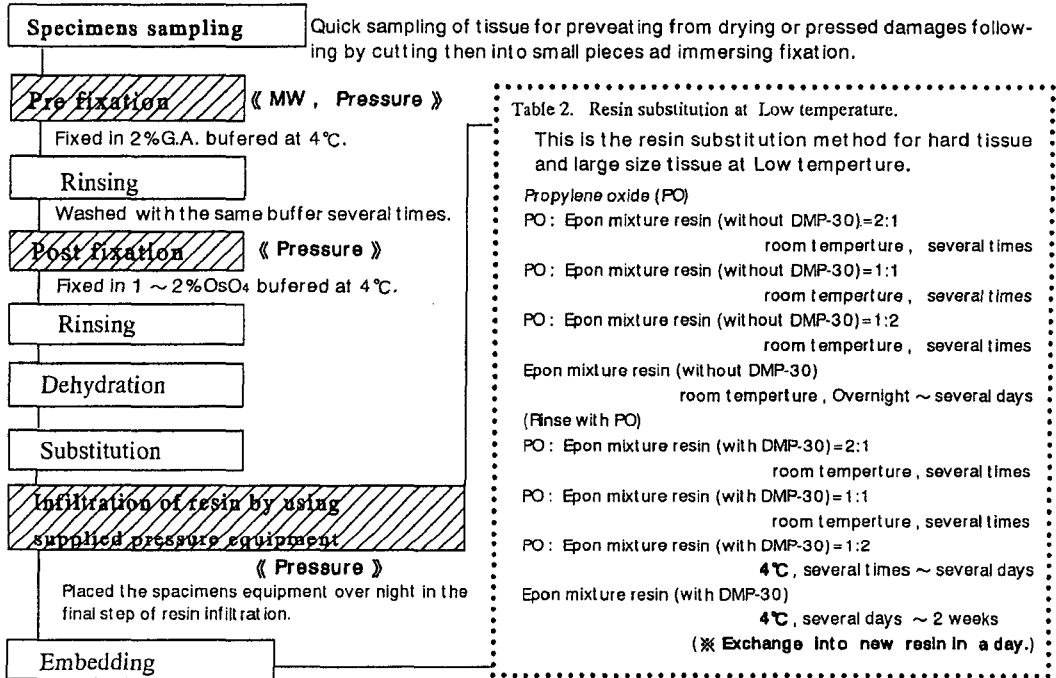
It is noted that the effectiveness of the MW irradiation to the OsO<sub>4</sub> post-fixation is equivocal as it contains heavy metal. As the content, disturb the effectiveness of the irradiation. Therefore, in the pre-fixation with glutaraldehyde, simultaneous use of MW and pressure and in post-fixation with OsO<sub>4</sub> only pressure addition is applied. It is also applicable for the activation of immuno-stain in conventional light microscope study.

### [Examples of practical application of this device and its appraisal]

The small cubic pieces of the tissue are made in pre-fixed solution and placed on each specimen cassette. The specimens with anatomical orientations are cut on longitudinal direction. The sections are placed in pre-fixed solution in each cassette. The specimens cassette of various liquid content are available, namely 4ml, 8ml, 15ml respectively. The tissues are processed following to the formula as shown in table1. Based on the observation, it is revealed that the most appropriate pressure in 3 atm. The suitable

conditions should be adjusted in quality and sizes of the tissues. Pressure set in 3-5 atm when tissue filtrates in resins. The hard tissue such as the bone tissue, low temperature substitution method as shown in Table 1 is recommended.

Table 1. Specimens preparation (Low temperature substitution method)



Practical application of the device for the biological specimens preparation which are justified as relatively difficult in processing. The device is practically applied for the biological tissue preparation, which are justified as relatively difficult in handling and processing.

1) Skin tissue

The skin is composed of epidermis, dermis, subcutaneous tissue, skin appendage. It is very complicated and different in Epon penetration. Infusion of fixatives and customary Karnosky fixative is regarded as most suitable fixative for fixation of epidermal cells, however, the contraction of cells of spinosum layer is frequently taken place. The fixative is 2010 mOsm in osmotic pressure.

The authors evaluated various fixatives and 2% glutaraldehyde 0.05M cacodylate buffered

fixative is most satisfactory fixative for this purpose. The authors have attempted to fix the skin in MW waved and pressurized conditions. As illustrated in Fig. 2, cellularity of the epidermis and dermis has been well preserved. The cellularity of the epidermis, which is relatively difficult, using conventional technique, is well preserved using this newly developed device.

Hair follicle and hair cortex are also well preserved. On the case of keratosis of skin, the use of this method and low substitution method gave the well-preserved ultrastructure of the horny layer perse.

In the field of dermatopathological visualization of the Langerhans cell, it may offer the further clarification of the pathogenesis of the diseases.

## 2) Lens of eye of mouse

The lens of the eye, the thickness in adjusted frequently also contains protein, mucopolysaccharide. The epithelial cells and lens fibers are quite different in biochemical constituent and biophysical property and a caution should be excised in tissue preparation.

The authors have made incision to the cornea after nucleation of the eye and pre-fixed in 2.5% glutaraldehyde/0.1M phosphate buffer and pressurized MW waved fixation for 2 hours. Namely, pressurized post-fixation by 2% OsO<sub>4</sub> for 60 minutes and infusion in Epok resin in pressurized condition is suitable.

As the results, better preservation of lens capsule, epithelial cell and lens fiber has been obtained (Fig. 3). Soluble cristan,  $\beta$ -cristan, and insoluble albumoid, which are biosynthesized by the libosome as well as glutathione. Ascorbic acid and constituents particularly  $\beta$ -cristan tends to decrease in cataracts. It is of note-worthy that the electron dense substance in the cisterna of rough-surfaced ER in lens epithelial cells is observed which await further clarification in future. In addition, calcifying tendo-voginitis, osseous tissue, plant tissue (Pollen), insects have studied, using this device and detail results will be demonstrated elsewhere.

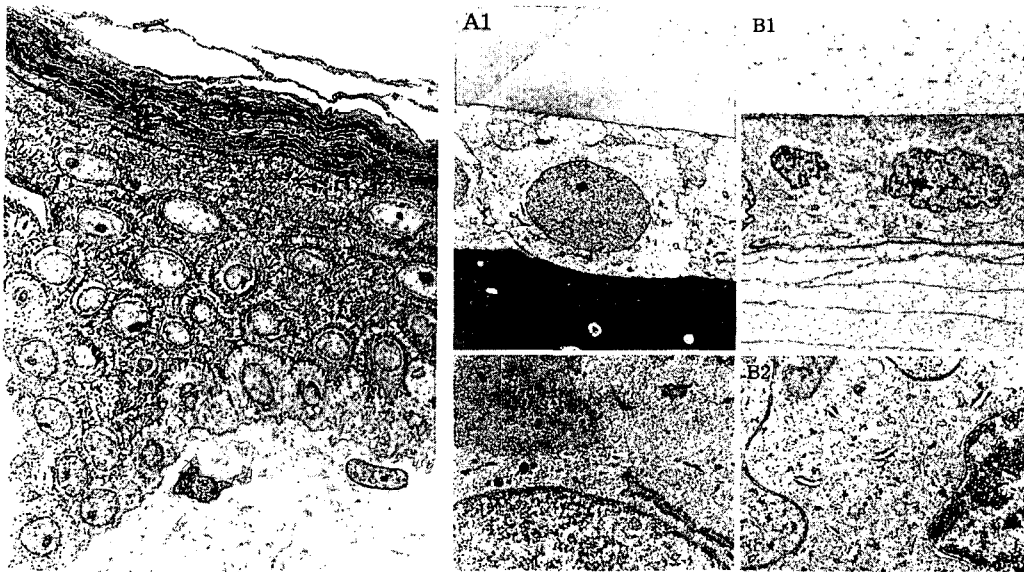


Figure 2. Ultrastructure of skin of human. Pressurized microwave fixation.

Figure 3. Ultrastructure of lens of mouse.

A1 : Pressurized microwave fixation. Acceleration of resin penetration by pressurized circumstance is characteristic.

A2 : Higher magnified figure of cytoplasm.

B1 : Conventional infusional fixation tissue.

B2 : Higher magnified figure of cytoplasm.

### [Conclusion]

It is concluded that this device may offer the capability of excellent cellular preservation as well as activating the enzymatic reaction during the immunoreaction either in light microscopy or electron microscopy. The use of this device also gives beneficial effect on dealing with the insect, plant (pollen) and microorganism, which have relatively thick cell wall. A critical re-evaluation will be possible for the conventional biological tissue preparation to lead to the formulization of the uniform and standardized procedure acceptable for the global research and diagnostic use.

(발표문 국문 번역)

## 가압마이크로파 장치의 개발과 전자현미경 시료로의 활용

네모토 노리코(根本典子), 요시노리 마즈다, 히로시 야나카와,  
미야자와 시치로(宮澤七郎)  
기다사토(北里)대학 의학부 조직표본, 전자현미경센터

생물조직을 전자현미경으로 관찰할 때 가장 중요한 것은 조직세포의 미세구조를 잘 보존하는 것이다. 특히 동물조직에 있어서는 사후변화에 의해 세포의 자가 용해가 조직세포가 생체에서 분리된 그 순간부터 진행되어 그것들의 미세구조에 변화를 가져온다. 이것을 방지하기 위해서 고정을 하는 것이다. 따라서 고정 조작을 어떻게 하느냐 하는 것은 최종 전자현미경상(electron microscopic image, 전현 상)에 크게 영향을 미친다.

조직의 “고정”은 예부터 여러 정설이 있지만 조직세포를 구성하는 성분을 신속하게 불용화(insolubilization)시켜 그것들이 세포외로 유출되지 않게 보존하는 것이 이상적인 고정이라 말할 수 있다. 현재 사용되고 있는 조직의 고정 법 중 물리적인 고정 법에서는 급속 동결(rapid freezing)이 가장 우수하고, 화학고정 중에서는 혈관관류에 의한 관류고정(perfusion fixation)이 좋은 방법이라 말하고 있다. 그러나 이들 방법을 병리조직 표본 등 인체의 적출 조직에 적용하는 것은 현실적으로 무리가 있고 또 이 방법으로 불가능한 조직도 있다. 그래서 아직도 화학 고정 제에 의한 침수고정(immersion fixation)이 널리 이용 되고 있다.

침수고정은 조작이 간편한 반면, 고정액이 조직에 도달하는 속도가 늦어 조직의 표면부와 중심부에 고정의 정도차이가 생긴다. 이 차이는 최종적인 관찰에 크게 영향을 미친다. 특히 큰 조직 편, 고정액의 침투성이 좋지 않는 조직 그리고 폐 등 공기가 들어있는 조직 등에 있어서는 고정 불량을 일으키기 쉽고 나아가서는 고정 불량에 의한 탈수불량이나 수지(resin)의 침투불량을 일으켜서 좋은 관찰결과를 얻을 수 없는 경우가 있다. 우리 전자현미경 연구자는 누구나 이러한 경험이 있었으리라 생각된다.

위와 같은 이유로, 우리들은 오랫동안 시료제작이 비교적 곤란하다고 여겨지는 조직에 대해서 그 개선책을 검토하고 압력의 변화나 마이크로파(-波, microwave)의 조사 등 여러 가지 방법을 시도하여 보았다. 그러나 그 어느 방법도 만족 할 수 있는 결과를 얻지 못하였다. 그래서 새로운 시도로서 저 압력을 이용한 시료제작법을 검토하여 보았다. 그 결과 침수고정 법에 의한 화학 고정 법에 있어서도 압력의 변화가 시료제작의 개선에 효과가 있다는 것을 알았다. 그래서 시험적으로 주사기(syringe)을 이용한 간이 가압기를 제작해서 시행해 보았던바 좋은 결과를 얻었기에 우선 그 효과를 1994

년도의 학회에 보고 하였다.

이후 제1호기로서 압축기(compressor)를 도입한 간이 장치를 개발하고, 이어서 제1호기에 마이크로파 조사기능을 장착한 제2호를 개발하고(1998년 5월) 나아가 제2호기에 가압마이크로파 장치를 부착한 제3호기를 개발하여 MN-PMW 1형이란 이름으로 1999년 4월에 특허를 얻었다. 그러나 가압마이크로파 고정이라고 해도 이것은 어디까지나 화학고정이기 때문에 가장 좋은 상태에서 조직을 보존 할 수 있는 물리고정에 필적 할 수 없는 것은 사실이다. 그러나 실패율이 높고 또한 재현성(reproducibility)이 결여된 물리고정에 비교하면 본 방법에 의한 화학고정은 재현성이 우수하고 또 화학고정 중에서는 종래의 방법으로 얻은 성적에 비교해서 매우 좋은 결과를 얻을 수 있는 장점이 있다.

조직에 압력 조작을 가하면, 지금까지의 간이 가압기의 실험 결과보다 고정조작이나 수지침투에 효과가 있다는 것이 확인되었고 또 피부조직, 뼈, 털, 수정체, 껍질(cuticle)을 가진 곤충의 조직 등에 있어서도 종래의 침수고정에 의한 조직상(image)보다도 좋은 결과를 가져왔고 그리고 광학현미경 표본의 면역염색시의 활성화 처리에도 좋은 결과를 가져왔다. 따라서 본 장치는 앞으로 형태학적 방면에 새로운 활용의 가능성을 가진 장치라고 생각한다.

본 장치의 개요를 간단히 소개하면 다음과 같다. 본 장치를 소개하기에 앞서서 현재 시판되고 있는 Bartek 회사의 동결장치와 역시 같은 동결장치인 Leica 회사의 EM-PACT는 본 장치와는 그 종류가 다르다는 것을 말해 둔다. 그것은 그것들은 2,000기압이상의 높은 압력을 가하는 동결장치이기 때문이다.

### [가압마이크로파 장치의 구조와 기능]

본 장치는 압축기의 압(pressure)에 의해 실린더가 상하로 움직여서 가압되는 구조이다. 실린더의 선단에 있는 온도 감지기가 용기 내 상부의 액체온도를 측정하게 되어 있다(그림1). 처리용기의 외벽은 열전도성이 있고 덮개가 U자형으로 둘러싸여 있고 그 내부는 냉각수가 순환하도록 되어 있다. 본 장치의 주된 기능은 마이크로파 조사(illumination)와 가압처리이며, 이 두 기능 중 한 가지만을 선택하여 사용할 수도 있다. 또 설정조건을 다섯 가지로 할 수 있기 때문에 취급하는 조직에 따라 기록된 조건을 읽어 내고 있다.

#### 1. 가압처리

조직내부로 고정액이든 수지든 침투를 촉진하는 방법이다. 지금까지는 진공펌프나 간이 감압 법으로 처리되어 왔다. 그러나 이들 방법은 과도한 감압에 의한 조직세포의



구조변화를 가져오는 경우가 있어 반드시 효과적인 침투방법이라고는 말하기 어렵다. 그렇기 때문에 본 장치는 가압량을 정확하게 조정할 수 있도록 하고 또 장시간의 가압에 있어서도 제어가 가능하도록 설계하였다. 처리용기의 위 뚜껑에는 중앙에 실린더(cylinder) 끝과 같은 지름의 구멍이 뚫려있고, 그 안 밖에는 O자 모양의 부속품을 끼워서 주위와 격리되도록 하였다. 실린더 끝이 내려와서 가압이 시작되면 그와 동시에 공기가 밀려나가는데 이것은 고정액이 공기에 의해서 산화되지 않도록 하기 위한 것이다. 가압량은 0.1~9.9기압까지 변화시킬 수 있고 가압은 압축기에 의해 정밀하게 제어된다. 가압시간은 0.1초~999분까지 설정할 수 있기 때문에 장시간의 수지침투에도 대응할 수 있다.

## 2. 마이크로파의 조사(illumination)

본 장치에 있어서 마이크로파의 조사는 고주파 발진 장치에서 발진한 마이크로파가 도파관(waveguide)의 개구부에 있는 시료처리용기와 마주보는 위치에 조사되도록 배치하였다(그림1). 종래의 것은 마그네트론(magnetron)에서 도파관을 지나 발생한 마이크로파가 전자파 교반기(stirrer)로서 레인지(range)내에 확산하는 방식이었다. 그러나 이 방식에서는 마이크로파가 레인지 내 전체에 확산되기 때문에 시료병 내에 일정량의 마이크로파를 조사하는 것은 곤란할 뿐 아니라 재현성과 마이크로파 조사로 인하여 발생하는 온도의 상승을 조절 못하는 등의 문제가 있다. 여기에 비해서 본 장치는 시료처리 용기 부근에 직접 마이크로파가 효율적으로 조사될 수 있는 구조로 되어있고 또 마이크로파 조사에 의한 온도상승도 냉각 시스템이 있기 때문에 해소시킬 수 있는 장점을 가지고 있다.

처리용기의 외벽은 U자로 된 겉 상자(casing)에 의해 둘러 싸여 있고, 그 열린 부위에 도파관 개구부에서 나온 마이크로파가 조사된다. U자로 된 겉 상자의 내벽에 충돌한 마이크로파는 반사해서 시료처리용기내로 되돌아가서 시료를 조사한다. 이 때문에 조사된 마이크로파가 손실 적게 시료에 조사되기 때문에 조사조건을 쉽게 재현할 수 있다. 또 이때 겉 상자 내부를 순환하는 냉각수가 처리 용기내의 과잉한 온도의 상승을 제어해 주고 있다.

또 마이크로파 조사를 받은 용기 내의 상부는 온도상승이 빠르고 하부는 그것 보다 저온이다. 이 때문에 고정조건을 일정하게 하려면 상하의 온도차를 적게 해야 하는데 본 장치에서는 이를 위해 교반기(stirrer)를 장치했다. 마이크로파의 조사조건은 컨트롤 패널로 출력은 low 와 high를 선택할 수 있고 간헐(intermittent)조사와 연속 조사를 설정할 수도 있다. 상한온도의 설정은 섭씨123도 까지 가능하고 조사시간은 1초~999초까지이고 간헐조사의 주기도 설정할 수 있게 되어 있다.

### 3. 가압과 마이크로파

OsO<sub>4</sub>는 중금속을 함유하고 있기 때문에 후고정(post-fixation)에 대한 마이크로파 조사의 효과가 의문시 되고 있다. 그렇기 때문에 aldehyde계 고정액에 의한 전고정(pre-fixation)에는 마이크로파와 가압을 변용해서 하고, OsO<sub>4</sub>에 의한 후고정에는 가압만을 하고, 수지 침투에 있어서는 가압만을 행하는 등 목적에 따라 사용할 수 있다. 또 단독으로 이용할 수 있기 때문에 광학현미경 표본의 면역 염색시의 활성화 처리 등에도 마이크로파를 이용할 수 있다.

#### [활용예와 결과]

적출조직을 곧바로 고정액에 적시면서 잘게 잘라 시료 카세트에 개별적으로 삽입한다. 방향성이 없는 조직은 1mm<sup>2</sup>, 방향성이 있는 조직은 두께를 얇게 해서 직방형으로 가늘게 자른다. 조직편은 건조하지 않도록 처리용기내의 고정액에 넣는다. 카세트의 수에 따라 처리용기를 선택할 수 있다(액체량 15ml, 8ml, 4ml 등). 뚜껑을 덮고 용기 내에 세팅한다. 이후의 조작은 표1에 따라 조직별로 처리 시간을 적절하게 설정, 조절한다.

지금까지의 실험결과에 의해 고정조작은 가압3기압이 적당하다는 것을 알고 있기 때문에 고정에는 3기압, 수지침투에는 조직에 따라 3 또는 5기압으로 설정하였다. 또 골조직 등 수지의 침투성이 나쁜 조직에 있어서는 저온친환법(표1)을 변용하면 더욱이 수지침투가 촉진되기 때문에 조직의 종류나 크기에 따라 이 조작을 조절한다. 고정액의 처방을 검토하고, 종래 시료제작이 어려운 여러 종류의 시료에 대해서 본 장치를 사용해서 그 효과를 검토하였다. 이들 성적을 요약하면 아래와 같다.

#### 1. 피부조직

피부는 표피, 진피, 피하조직 및 그 부속기로 되어 있기 때문에 고정액의 침투가 나쁘고, 조직을 자를 때에도 구조의 변화가 생길 수 있다. 따라서 피부를 전현 시료로 제작할 때는 이들 여러 가지 점을 고려해야한다. 종전에는 표피세포의 고정에는 Karnovsky고정액이 가장 좋다고 하였으나 실제에 있어서는 가시세포(prickle cell)사이에 수축이 일어나서 적당한 고정액이라고 말하기 어렵다. 또 이 고정액은 침투압이 2010mOs로 매우 높다. 그래서 우리들은 수종의 고정액의 처방을 검토하고 피부조직에 알맞은 조성액을 선택하여 보았다. 그 결과 그림 2와 같이 사람 생검(biopsy) 피부조직에 있어서 진피조직의 여러 구조물도 잘 보이고 또 가시세포의 수축도 볼 수 없고 세포사이의 접착 장치도 잘 보존 되어 있었다.

또 통상 쓰고 있는 수지침투 방법으로는 침투가 잘 안되어 과립층(granular layer)에서부터 각질층에 이르기까지는 관찰이 어려웠다. 하지만 가압을 함으로서 수지의 침

투가 충분하였기 때문에 이들 각 층의 세포 구조가 쉽게 전자현미경으로 관찰되었다. 또, 털에서는 털 껍질(hair cuticle)의 층상구조도 잘 보였고 멜라닌 과립을 많이 함유하는 모피질의 구조도 잘 보존되어 있었다. 수장족척 각화증(keratosis palmaris et plantaris)의 피부 조직에 본 방법 및 저온 치환법에 의한 수지 침투를 적용하였던바 비후한 껍질층의 전체 층에 걸쳐 전자현미경관찰이 잘 되었다. 또 실제로 피부과 영역에 있어서는 메르켈세포(Merkel cell)의 세포종이나 랑게르한스세포(Langerhans cell)와 관계되는 질환 등에 있어서 이 방법에 의한 전자현미경 관찰이 효과적인 경우가 많아 앞으로 임상적 응용이 기대된다.

## 2. 마우스 수정체

수정체(lens)는 생체에 있어서 그 두께가 조정된다. 그렇기 때문에 적절한 조직에 있어서 구조변화가 초래되기 쉽다. 따라서 고정조작을 하는데 있어서 급격한 침투와 변화를 피해야 한다. 그래서 일반적으로는 안구를 적출 후 각막주위의 1/4 또는 시신경 측에 칼집을 넣어 서서히 고정시킨 후 수정체를 적출한다. 그 후 수일간의 고정을 필요로 하는데 이것은 단백질이나 점액다당류가 풍부한 탄력성 있는 수정체 주머니(capsular bag)에 덮여 있는 상피세포와 매우 단단한 수정체 섬유를 보호하기 위한 조치이다. 또 수정체 섬유는 수지의 침투성이 매우 나쁘기 때문에 초박질이 곤란한 조직이기도 하다. 그래서 우리들은 안구 적출 후 각막주위 1/4에 칼집을 넣고, 약 20분간 2.5% glutaraldehyde, 0.1M phosphate buffer로 침수고정을 하고, 이후 같은 고정액으로 가압마이크로파 고정을 120분간하고 다시 2% OsO<sub>4</sub> 가압고정을 60분간하고 그리고 수지침투를 할 때에도 가압을 사용하였다.

그 결과 종래의 관찰결과와는 달리 세질시의 물리적 손상이 전혀 보이지 않고 또 수정체 주머니와 상피세포, 수정체 섬유 등이 종래의 상과 비교해서 전자밀도의 상대적 변화가 확인되었다. 수정체 단백질로서는 가용성인 alpha-crystallin, beta-crystallin, 불용성인 albuminoid가 많이 함유되어 있고, 이들은 어느 것이나 리보솜(ribosome)에서 합성되고 또한 그밖에 glutathione이나 ascorbic acid도 함유되어 있다고 알려져 있다. 특히 beta-crystallin은 노화(aging)나 백내장에서는 감소한다고 말하고 있다. 이것은 이들 물질이 불안정하기 때문이다. 그것은 이들 물질이 시료제작 과정에서 유실되기 쉽다는 것을 말한다. 이번에 수정체 상피의 조면소포체 사이에서 이들 물질로 생각되는 고전자밀도의 물질이 확인되었다. 따라서 저자들은 종전의 방법으로는 보존이 잘 되지 않았던 물질이 본 방법으로서 이들 물질이 보존되었다고 생각된다(그림 3).

그 밖에 골조직이나 식물조직, 껍질층을 가지고 있는 곤충 등에 이 방법을 적용하였던바, 모두 종래의 침수고정에 비해서 좋은 조직상을 볼 수 있었다. 특히 종래에 시료

제작이 곤란하다고한 여러 시료제작법과는 그 차가 확실하였다. 또 일반적으로 사용되고 있는 glutaraldehyde와 osmium의 2중 고정에서 보존하기 어려웠던 조직성분에 활용 하였던바, 좋은 결과가 나왔다. 또 ruthenium tetroxide의 고정에 의해 피부겍질 층 사이의 지질성분도 보존되고 겍질 층 사이의 지질성분인 세라미드(ceramide)등의 연구에도 쓸모가 있을 것으로 생각된다.

#### [맺음말]

본 장치를 개발해서 여러 가지 방법으로 지금까지 시행해 오고 있는 혼합고정법과 특수 고정제를 재평가 해보았다. 그 결과 본 장치를 사용함으로써 세포내의 성분을 보존하는데 있어서 지금까지의 방법으로 얻은 어느 결과보다도 매우 좋았다. 그러므로 본 장치는 전자현미경시료의 고정이나 수지침투에는 물론, 나아가 광학현미경 표본의 염색, 면역반응의 활성화에도 유용하다고 판단된다. 따라서 저자들은 앞으로 본 장치를 더욱 개량, 발전시켜 그 활용범위를 더욱 더 넓혀 전자현미경 시료제작법의 표준화(standardization)에 기여하고자 한다. 끝.