

氷結晶生成が魚肉の細胞外マトリクスに及ぼす
 影響についての組織学的研究
 —免疫染色を用いた氷結晶痕と細胞外マトリクスの同時観察—
**Histological Study of Extracellular Matrix Influenced by Ice Crystal Formation in Fish
 Tissue**
**- Simultaneous Observation of Ice Crystal Morphology and Extracellular Matrix by
 Applying Immunohistochemical Staining-**

小南友里 渡辺学 鈴木徹[†]
 Yuri KOMINAMI Manabu WATANABE Toru SUZUKI

東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科(108-8477 東京都港区港南 4-5-7)
 Department of Food Science and Technology, Faculty of Marine Science, Tokyo University
 of Marine Science and Technology, (4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477)

Summary

The extracellular matrix (ECM) of frozen tissue has been histologically investigated by applying the cryocoating method improved by Fink (1986) as well as the immunohistochemical staining. Sections of frozen tuna tissue for light microscopy was obtained by the cryocoating method that consisted of coating the surface of the precut tissues by a coating media and drying it until a coating film was formed. Additionally, an immunohistochemical staining was attempted to stain the ECM in the section of tuna tissue prepared by the cryocoating method. The target molecular of the immunohistochemical staining was laminin that is one of the major proteins included in the ECM. As results, it was found that the cryocoating method could prepare the sections with minimal alteration of the ice crystal shapes in frozen tuna as well as Kawamoto method. By using the immunohistochemical staining combined with the cryocoating method, it was revealed that the ice crystals caused damages not only on the cytoplasm but also on the ECM. Further, image analysis told us that the area ratio of the ECM is decreased considerably from 4.8% to 1.0% during freezing, while the cytoplasm is less decreased from 95.2% to 50.0%.

Key words: Freezing, Ice Crystal, Fish, Extracellular matrix, Immunohistochemical staining

1. 緒言

緩慢に凍結された状態の魚肉組織内部を凍結置換法で観察すると、生成した粗大な氷結晶の周辺

[†] Fax:81-3-5463-0585 Email:toru@kaiyodai.ac.jp

に脱水圧迫された細胞が観察される。このため、粗大な氷結晶の生成が組織へ機械的ダメージを与えていると考えられている¹⁾。しかし適切な解凍条件のもとではそれらの細胞自体は見かけ上高い復元力を示し、ほぼ元の状態に回復する²⁾。一方で、機械的テクスチャー測定からは解凍後の肉質の劣化が示されることが多く³⁾、組織観察の結果と矛盾することが指摘されてきた。すなわち、従来法による組織観察では観察できないような組織変化が起きている可能性が示唆される。

普段我々が食している魚肉は、解剖学的には筋組織である。図1に筋組織の横断面を表す模式図を示す。筋組織において単位細胞として扱われるのは筋線維である^{4,5)}。筋線維は筋形質と筋鞘から成り^{4,5)}、筋形質が細胞質に、筋鞘が細胞膜に相当する(以降、筋線維を細胞、筋鞘を細胞膜、筋形質を細胞質と表記する)。細胞間には細胞外マトリクス(extracellular matrix: ECM)が発達している^{6,8)}。ECMは神経枝、毛細血管などと共に結合組織と呼ばれる細胞外ネットワークを構成する⁷⁾。

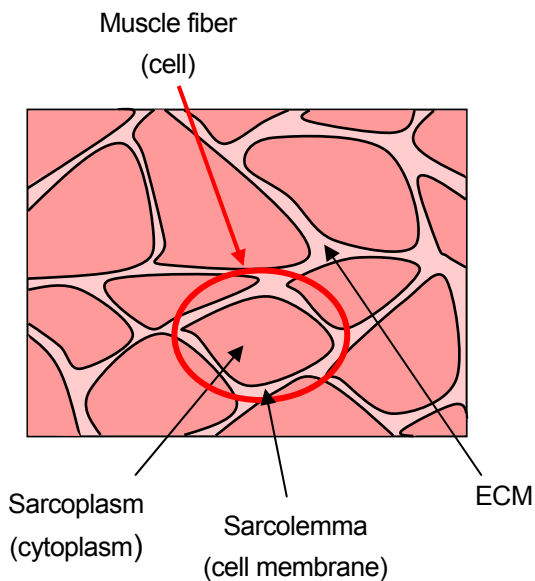


Fig. 1 Cross section of the skeletal muscle, showing location of the ECM and the cytoplasm.

哺乳類の骨格筋において近年、新しい知見が累積されてきた。すなわち、激しい運動などによる筋肉に対する機械的ダメージから細胞保護や細胞膜の安定性維持をはかり筋肉を健全に保つうえでECMが重要な役割を果たしていることが分かってきた^{6,7,9-10)}。魚肉凍結時に起こる組織軟化も従来

着目されることのなかったECMの損傷による可能性が否定できない。しかし、凍結魚肉に関するECMに着目した組織学的知見は乏しいのが現状といえる。この原因は凍結組織についての組織学的研究手法が十分に開発されていないことにあると考えられる。そこで、本稿では凍結組織観察のための組織切片作製法を改良するとともに、凍結魚肉組織中の氷結晶とECMを同時に観察する手法を確立し、凍結に伴う魚肉の組織学的変化を詳細に調べることを目的とする。

2. 凍結組織の観察手法

2.1 組織切片

既往の研究では凍結置換法の利用によって得られる組織切片を用いた凍結組織の観察が行われてきた¹¹⁻¹⁴⁾。凍結置換を利用した方法は安価であるが時間と労力を要する。この問題点を克服する方法として河野らは凍結切片作製法の一つである川本法の適用を考案した¹⁵⁾。

通常、凍結切片は凍結状態で包埋した凍結試料を低温下で薄切することにより得られる。川本法では試料の切削面にクライオフィルムと呼ばれる、低温下でも粘着性を有する特殊フィルムを貼り付けて凍結切片を得る(図2中A)¹⁶⁾。組織切片はフィルムと接着して物理的に固定されるので、軟組織(筋肉など)だけでなく崩れ易い硬組織(歯や骨など)の凍結切片も正確に且つ容易に作製することが可能となる。

河野らは、粗大な氷結晶が生成して脆弱化した凍結組織に対しても川本法が応用できることを報告した¹⁵⁾。川本法の適用は従来の凍結置換法よりも遥かに短時間で切片を得ることができ、また簡易であるといえる。しかし、条件によってはクライオフィルムの接着性が弱まり、標本作製途中で組織の剥離が起こることがある。

そこで、本研究ではクライオコーティング法の応用を検討した。クライオコーティング法は凍結切片作製法の1つとして1952年にBushらが発表し¹⁷⁾、後にFinkが改良した方法を指す¹⁸⁾。川本法が切片の支持体としてクライオフィルムを貼り付けるのに対し、Finkが改良したクライオコーティング法では低温の液体コート剤を試料組織に塗布し、乾燥させて出来る塗膜が支持体となる(図2中

B). Fink はコート剤の調合を行っていたが¹⁸⁾, 本研究では簡易法として類似組成の市販のネイルエナメルをコート剤として使用した. 表 1 に Fink の考案したコート剤の組成の例と本研究で使用したネイルエナメルの組成を記した¹⁸⁾. Fink の考案したコート剤はポリマーと溶媒から成る混合液である. ネイルエナメルには可塑剤と染料が少量含まれるが, 組成の大部分はポリマーと溶媒が占める¹⁹⁾.

本研究では先ず標準的試料であるメバチマグロの赤身肉についてクライオコーティング法による氷結晶痕観察の可能性を探索した.

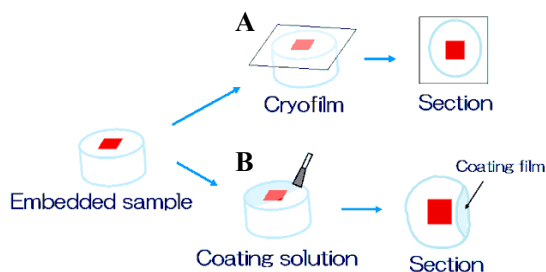


Fig. 2 The procedure of cryosectioning to observe ice crystal morphology in a tissue. A: Kawamoto method, B: The cryocoating method.

2.2 染色

これまで凍結魚肉組織の氷結晶痕をヘマトキシリン-エオシン Y 染色(H-E 染色)により観察した研究報告は数多あるが^{2,11-12)}, それ以外の染色を行った例は非常に少ない. H-E 染色は組織内物質が色素と静電的に結合することで染色される²⁰⁾. 筋肉組織については負に帯電している細胞核と正に帯電している細胞質の染め分けが可能である²⁰⁾. H-E 染色は簡便で基本的な染色法だが, 特定のタンパク質を選択的に染色することは不可能である. そこで, 本研究では ECM を選択的に染色するために免疫染色を用い, 氷結晶痕と ECM の同時観察を行い氷結晶が ECM に与える組織学的影響について調べた.

免疫染色は抗原抗体反応を利用して標的物の局在を形態学的に観察する方法である²¹⁾. 本研究では ECM 構成タンパク質の 1 つであるラミニンを標的とした免疫染色を行った^{6-8,22)}. 図 3 に骨格筋細胞における細胞膜と ECM の微細構造を表す模式図を示す^{6,7)}. ラミニンは膜貫通タンパク質複合

体と ECM 中の複合体をつなぐタンパク質である^{6,7)}. ラミニンは細胞膜付近に存在するため膜貫通型タンパク質と非常に近い局在を示すが, 脂質二重層の外にあるので抗体がアクセスしやすいと考えられる. また, かなり密に存在しているので光学顕微鏡レベルではラミニンの局在が線状に観察され, 正常なマウス骨格筋(未凍結肉)においては細胞膜の形状を反映する²³⁻²⁴⁾.

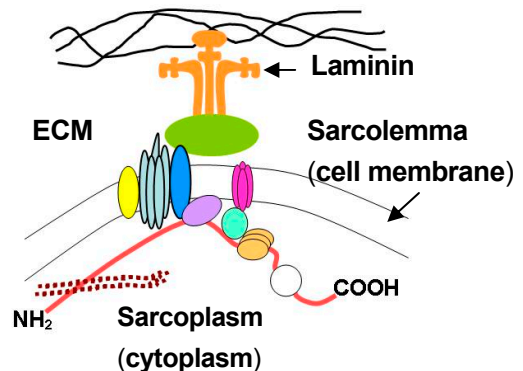


Fig. 3 Schematic representation of the ECM surrounding the cell.

3. 実験

3.1 クライオコーティング法による凍結魚肉組織観察

3.1.1 試料

市販の刺身用宮城県産メバチマグロ(*Thunnus obesus*)の赤身肉(2011年5月25日購入)を実験に供した. メスで一辺が筋線維方向に対して平行となるように10mm角の立方体状に切り出し, ジッパー付き保存袋に入れて庫内温度-20°Cのフリーザー(GS-1356HC, NIHON FREEZER)内に静置凍結し, 約24時間保管した試料を用いた.

3.1.2 方法

包埋時の氷結晶成長を抑制するために, 包埋を行う前に凍結試料をそのまま寒剤に浸漬し, 試料温度を下げた. 続いて, 凍結組織包埋剤(Surgipath FSC22, Leica MICROSYSTEMS)で包埋した. 寒剤は-75°C以下のものが一般的なので, 扱いやすいドライアイス-ヘキサン(-78°C)を用いた. これをチャンバー内雰囲気温度-23~-20°Cの低温マイクロトーム(CM-1500, Leica MICROSYSTEMS)にセットし, トリミングを行った. 露出した試料表面に, 約

Tabel 1 The composition of coating solutions

Examples of Fink's coating solution ¹⁸⁾			Nail enamel
polymer	Poly(methyl methacrylate)	Poly(methacrylonitrile)	Alkyl acrylate copolymer Nitrocellulose
solvent	Methyl formiate	Methylene chloride	Ethyl acetate Butyl acetate Isopropanol
plasticizer	-	-	Acetyl tributyl citrate Sucrose benzoate
colorant	-	-	Violet No.201 Yellow No.204

-25℃に予め冷却しておいたネイルエナメル(コーギー ドーリーウイック グロスステイ トップコート, コーギー本舗)をなるべく薄く均一に筆で塗布し, 約 20 分間乾燥させた後, 6μm の厚さで薄切した. 得られた薄切片(以下コーティング切片)はスライドガラス上で常温で十分に乾燥させ, 固定および染色を行った. コーティング切片を得た後に軽くトリミングを行い, 試料表面にクライオフィルム(Cryofilm Type II C(9), Section-lab)を貼り付けて直ぐに薄切した. 得られた薄切片(以下フィルム切片)はフィルム上で固定および染色を行った.

得られた両切片を約 90%のエタノールに浸漬させて固定した. 洗浄後, H-E 染色を行い封入剤(SCMM-G1, Section-lab)で封入した. 標本の観察及び画像の取得には正立型顕微鏡(BX51TF, OLYMPUS)に顕微鏡用デジタルカメラ(DS-Fi1-L2, Nikon)を接続したものを使用した.

3.2 免疫染色による魚肉 ECM の観察

本研究における免疫染色の反応系を整理すると次のとおりである(図 4). まず, ラミニン(標的タンパク質)にウサギ産生抗ラミニン抗体を一次抗体として反応させ, 二次抗体にビオチン修飾抗ウサギ IgG 抗体を反応させた. さらに, 標識をするためにアビジンと蛍光色素の複合体を反応させた. アビジンとビオチンは強い親和力によって結合するため²⁵⁾, 蛍光色素はアビジンを介してビオチンと結合する. 結果, ラミニン-一次抗体-二次抗体-

ビオチン-アビジン-蛍光色素という連鎖が得られるので励起光を当てると蛍光色素からの蛍光によってラミニンの局在を知ることができる.

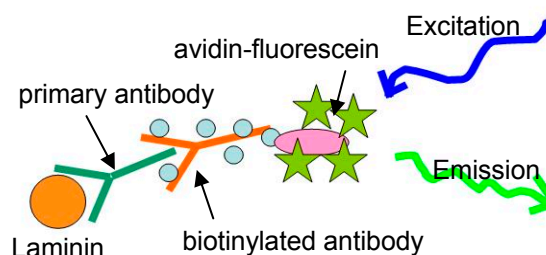


Fig. 4 The mechanism of the immunohistochemical staining targeting laminin.

3.2.1 試料

市販の刺身用宮城県産メバチマグロ(*Thunnus obesus*)の赤身肉(2011年10月28日購入)を実験に供した. メスで一辺が筋線維方向に対して平行となるように10mm角の立方体状に切り出し, ジッパー付き保存袋に入れて庫内温度-30℃のフリーザー(MEDICOOL MDF-U331, SANYO)で静置凍結し24時間後の試料を凍結肉とした. また, 切り出しただけの肉を未凍結肉とした.

3.2.2 方法

未凍結肉は切り出した後に速やかに寒剤に浸漬し, 凍結組織包埋剤(Surgipath FSC22, Leica MICROSYSTEMS)で包埋した. 冷却速度を速めるために液体窒素で冷却したイソペンタンを寒剤として使用した. 尚, この方法では生鮮肉ブロック

が小さく急激に極低温に下がるため試料内に生成する氷結晶が極めて小さく、光学顕微鏡では氷結晶は観察されず、生鮮状態と同様な観察像を得ることができる。凍結肉は凍結保管後、フリーザーから取り出して直ちに寒剤(液体窒素で冷却したイソペンタン)に浸漬し同様に包埋した。包埋したサンプルは切片作製時まで庫内温度 -80°C のフリーザー(MEDICOOL MDF-192, SANYO)で保管した。コート剤としてネイルエナメル(コージードーリーウイック グロスステイ トップコート, コージ一本舗)を用い、チャンバー内雰囲気温度 -23°C ～ -20°C の低温マイクローム(CM-1500, Leica MICROSYSTEMS)で両サンプルからコーティング切片を得た。コーティング切片はスライドガラス上に貼り付けて常温に置き乾燥させた。

乾燥後に約90%のエタノール(Wako)に浸漬させて組織の固定を行った。固定後のコーティング切片はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(Sigma)で洗浄し(5分×3回)、室温にて1%ウシ血清アルブミン加リン酸緩衝生理食塩水(1%BSA-PBS)(Sigma)で1時間ブロッキングを行った。一次抗体用希釈液(IHC Diluent RE7133, Novocastra)で25倍希釈したウサギ産生抗ラミニン抗体(L9393, Sigma-Aldrich)溶液中に 4°C で1日静置した。PBSで洗浄し(5分×3回)、PBSで250倍希釈したビオチン修飾抗ウサギIgG抗体(BA-1000, Vector Laboratories)溶液中に室温で1時間静置した。PBSで洗浄した後(5分×3回)、PBSで250倍希釈したアビジン-蛍光色素複合体(S11223, Invitrogen)溶液中に室温で1時間静置した。PBSで洗浄し(5分×3回)、封入剤(F4680, Sigma-Aldrich)で封入した。

蛍光顕微鏡(BZ-8000, KEYENCE)で緑色蛍光用フィルタ(OP-66636BZ フィルタ GFP-BP, KEYENCE)を用いて励起光照射条件が一定のもとで観察し、画像を得た。また蛍光顕微鏡で観察を行う際、露光時間を長めにし未染色細胞質部分から発される自家蛍光による弱い蛍光像も観察した。

3.2.3 画像解析

画像解析にはImageJ 1.42(NIH)を使用し、細胞質の自家蛍光が観察された露光時間0.2secの撮影画像(図6-B,C)について解析した。励起光の当たり方によって生じる輝度の差を軽減させるために観察像の左隅 $900\times 900\text{pix}$ を切り出してコンボリュ

ーションし、16bit形式に変換した後に判別分析法(大津の二値化法)によって画像の二値化を行った。

4. 結果および考察

4.1 クライオコーティング法と川本法の比較

2つの方法で得られた観察像を図5に示す。図5-A,C,Eはクライオコーティング法、図5-B,D,Fは川本法による観察像である。図5-A,Bと図5-C,Dは異なる2部位から得た切片の顕微鏡写真で、図5-C,Dと図5-E,Fはそれぞれ同一切片から得た異なる倍率での顕微鏡写真である。図より、ほぼ同一形態の組織観察像が得られることがわかる。

しかし、図中の矢印で示す部位のように氷結晶痕や細胞質の形状に僅かな差異が見られる。これは、コーティング切片切削後の試料表面にトリミングを行ったことにより生じた微小な部位差が原因の一つとして挙げられる。また、切片の染色・水洗時に組織がフィルムから剥離した可能性が考えられる。この結果から、クライオコーティング法が川本法と同様に、あるいはそれ以上の正確性を持って、氷結晶観察のための切片作製に応用可能であることがわかった。

但し、クライオコーティング法では1枚の切片を得るのに20分程度要し、川本法よりも時間を要する。しかし、従来法である凍結置換法を用いた方法よりも遥かに短時間で切片が得られる。本研究ではコート剤として市販のネイルエナメルを用いた。このコート剤は、光の透過性は高いがFinkの考案したコート剤に比べ溶媒揮発速度が遅いため切片作製速度の律速となっていると考えられる。今後、コート剤の組成を調製することでより短時間で切片作製が期待される。

4.2 ECMの観察結果

図6に未凍結肉及び凍結肉の免疫染色の結果を示す。図6-A,Bは未凍結肉の蛍光顕微鏡写真である。図6-Aは露光時間0.08sec、図6-Bは露光時間0.2secで撮影したものである。図6-Aでは緑色蛍光が網状に観察されるが、図6-Bでは全体が緑色の蛍光を呈している。また、図6-Aで観察される緑色蛍光部は図6-Bにおいて特に明るい緑色蛍光を示す部分(図中矢印)と一致している。すなわち、図6-Aで見られる緑色蛍光は抗体を介してラミニ

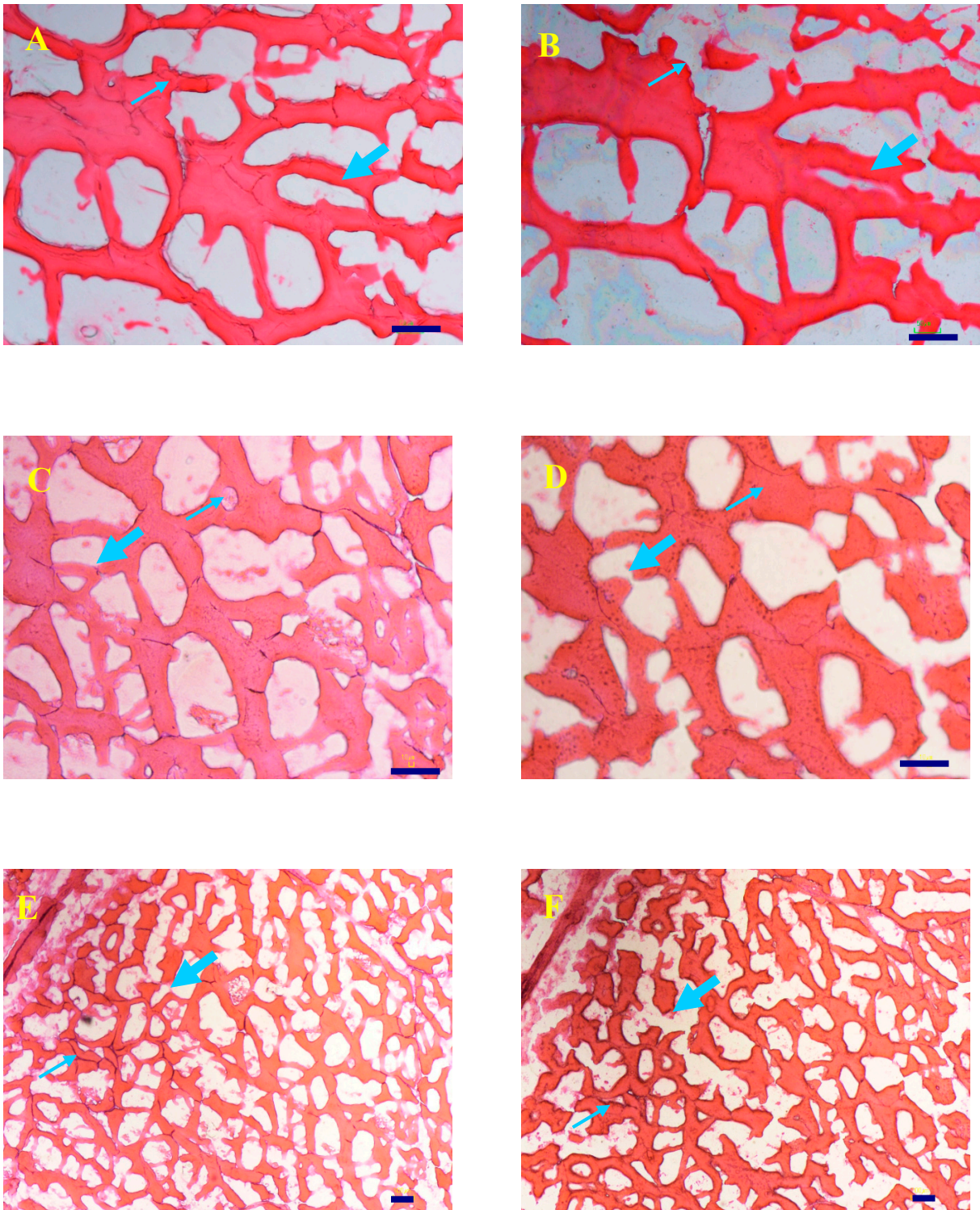


Fig. 5 Transverse sections of quadriceps in frozen tuna tissue stained with H-E staining. **A,C,E**: the cryocoating method, **B,D,F**: Kawamoto method. **A,B** and **C,D** are from same sample respectively. **E,F** are the zoom out image of **C,D**. Bar,100 μ m.

ンと結合した蛍光色素による蛍光であると考えられる。一方、図 6-B で見られる緑色蛍光には蛍光色素だけでなく、露光時間を延ばしたことによって得られた細胞質の自家蛍光も含まれている²⁶⁾。したがって、図 6-B から ECM (明るい緑色の太い線) が個々の細胞(暗い緑色の領域)の間を連続的に埋めている様子が分かる。

図 6-C に露光時間 0.2sec で撮影した凍結肉の免疫染色結果を示す。凍結肉では短く細い断片的線状に明るい緑色蛍光が見られる(図中矢印)。また、歪な円形の黒い領域の周辺に暗い緑色蛍光領域が見られる。氷結晶痕から自家蛍光はないことから、図 6-C における黒い領域は氷結晶痕と見なせる。すなわち、図 6-C では粗大化した氷結晶(黒色の領域)周辺で細胞質(暗い緑色の領域)が潰れ、ECM(明るい緑色の細い線)が圧縮されている。

凍結肉では ECM が線ではなく点状に不連続なように見えるが、本研究における凍結肉の凍結条件は試料サイズが小さいのでいわゆる急速凍結の範疇に入り、凍結過程において酵素分解によって ECM が消失した可能性は低い。むしろ、ECM が

圧縮されたことで抗体が結合しづらくなったと考える方が妥当である。したがって、ECM 自体は消失したのではなく、検出限界を超えるほど圧縮されたと考えられる。

本研究で一次抗体に使用した抗ラミニン抗体は抗原にマウス肉腫由来ラミニンを使用して産生されたものである。同品番の抗体がゴウシュウマダイ(*Sparus auratus*)の心筋で抗原抗体反応を示すといった報告は見られるが²⁷⁾、マグロの赤身肉において反応した報告はされていない。しかし本研究の結果より、マグロ肉においても反応することが分かった。また、コーティング切片を使用した場合にも塗膜による自家蛍光は見られなかったことから、蛍光顕微鏡での氷結晶痕観察にもコーティング切片を応用できることが確認された。

4.3 画像解析

まず、未凍結肉の露光時間 0.2sec における観察像について ECM と細胞質に分けるために大津の二値化を行い(図 7-A), 得られた閾値を基に凍結肉の露光時間 0.2sec における観察像についても二値

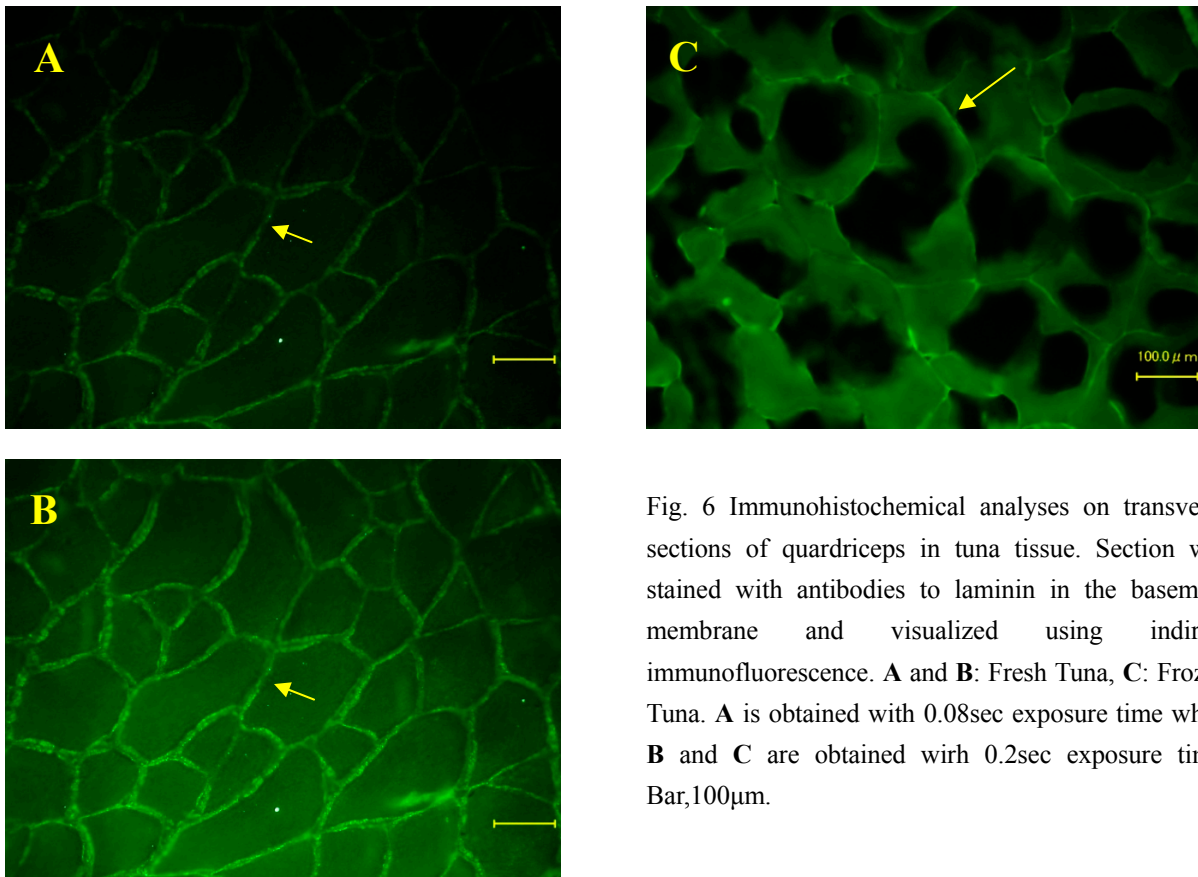


Fig. 6 Immunohistochemical analyses on transverse sections of quadriceps in tuna tissue. Section was stained with antibodies to laminin in the basement membrane and visualized using indirect immunofluorescence. A and B: Fresh Tuna, C: Frozen Tuna. A is obtained with 0.08sec exposure time while B and C are obtained with 0.2sec exposure time. Bar, 100 μ m.

化を行った(図 7-B). また, 凍結肉の観察像についても氷結晶痕と組織を識別するために大津の二値化を行った(図 7-C). 図 7-A, B 中の白色部分は組織断面中で ECM に相当し, 黒色部分は細胞質に相当する. また, 図 7-C では黒色部分は氷結晶痕, 白色部分は細胞質と ECM である.

観察画像全域を 100%として細胞質が占める面積率(%), ECM が占める面積率(%), 氷結晶痕が占める面積率(%)を求めて表にまとめた(表 2). 画像解析の結果, 未凍結肉では細胞質が組織断面の 90%以上を占めていたが, 凍結肉では 50%程度となり約 2 分の 1 に圧縮されていることが示された. 一方で ECM は約 5 分の 1 に圧縮されていることが分かる. よって面積比によるものではあるが氷結晶生成に伴う細胞質および ECM の圧縮が起こっており, 部位によって圧縮の程度に差があることが定量的に示された. すなわち, 氷結晶生成によって細胞質よりも ECM のほうが圧縮されていることが分かった.

また, 河野らは魚肉組織において, 氷結晶生成による結合組織中のコラーゲン繊維網の立体構造崩壊にともなう解凍後のテクスチャーの軟弱化を報告している²⁸⁾. ECM は結合組織中でコラーゲン繊維網によって補強されているため⁷⁾, 本研究で観察された ECM の高い圧縮率がこれに深く関わっていると推察される.

5. 結 論

クライオコーティング法を利用することで, 川本法を利用した場合と同等な氷結晶痕観察が可能であることが確かめられた. そして, コーティング切片を免疫染色に応用することも可能であることが確認できた. ラミニンを標的とした免疫染色は, 細胞質, ECM, 氷結晶痕の同時観察を可能とした. 結果, 魚肉の凍結において氷結晶が細胞質だけでなく ECM も圧縮している様子を観察することができた. 画像解析の結果, ECM のほうが細胞質よりも圧縮されていることが定量的に示された.

謝 辞

蛍光顕微鏡の使用にあたりストルスマン・カルロス・アウグスト教授(東京海洋大学海洋生物資源学科)にご協力を頂いた. ここに記して謝意を表す.

参 考 文 献

- 1) 新版 食品冷凍技術 編集委員会:「新版 食品冷凍技術」, pp.5, 日本冷凍空調学会, 東京(2009).

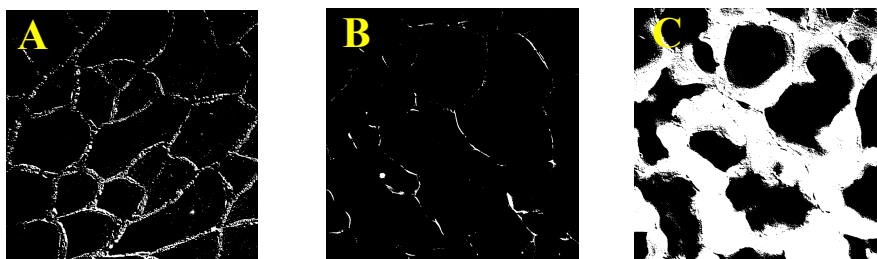


Fig. 7 Binarized images of Fig.6. A: corresponds to Fig6-B, B and C: corresponds to Fig.6-C.

Table 2 The area ratio obtained from image analysis

Constituent of fish tissue	Fresh	Frozen
Cytoplasm	95.2 %	50.0 %
ECM	4.8 %	1.0 %
Ice crystal	0 %	49.0 %

- 2) 福田裕：中央水研報, **8**, 77(1996).
- 3) 田村咲江(代表著)：「食品・調理・加工の組織学」, pp.123-125, 学窓社, 東京 (1999).
- 4) A. J. McComas, “Skeletal Muscle Form and Function” , pp.3-12, Human Kinetics Pub, Illinois, USA (1996).
- 5) W. Harder (Translated from German by Stephen Sokoloff); “Anatomy of Fishes”, pp.22-24, Lubrecht & Cramer Ltd., New York, USA (1976).
- 6) G Karpati, D. Hilton-Jones, K. Bushby, R. C. Griggs: “Disorders of Voluntary Muscle”, 8th ed., pp.37-80, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2010).
- 7) N. C. Voermans, C. G Bonnemann, P. A. Huijing, B. C. Hamel, T. H. van Kuppevelt, A. de Haan, J. Schalkwajjk, B. G van Engelen, G J. Jenniskens: Neuromuscular Disorders, **18**, 843(2008).
- 8) G Karpati, D. Hilton-Jones, R. C. Griggs: “Disorders of Voluntary Muscle” , 7th ed., pp.103-106, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2002).
- 9) E. Carmeli, M. Moas, A. Z. Reznick, R. Coleman: Muscle Nerve, **29**(2), 191(2004).
- 10) G Karpati, D. Hilton-Jones, K. Bushby, R. C. Griggs: “Disorders of Voluntary Muscle”, 8th ed., pp.4-5, Cambridge Univ. Press, Cambridge(2010).
- 11) E. Alizadeh, N. Chapleu, M. de Lamballerie, A. Le-Bail: Innovative Food Science and Emerging Technologies, **8**,493(2007).
- 12) 中澤奈穂, 大磯拓也, 名本葵, 和田律子, 福島英登, 福田裕：平成 23 年度冷空講論, pp.353-354, 東京 (2011).
- 13) 田中武夫: 冷凍,**86**(1000), 10(2011).
- 14) A. Bevilacqua, N. E. Zaritzky, A. Calvelo: J.Fd Technol. , **14**, 237(1979).
- 15) 河野晋治, 高橋朋子, 比留間直也, 篠崎聰：平成 21 年度冷空講論, pp.603-604, 東京 (2009).
- 16) T. Kawamoto: Arch Histol Cytol, **66**(2), 123(2003).
- 17) V. Bush, R. E. Hewitt: Am J Pathol., **28**, 863(1952).
- 18) S. Fink: Histochemistry, **86**, 43(1986).
- 19) <http://www.j-poison-ic.or.jp/homepage.nsf> : (2011).
- 20) 田村咲江(代表著)：「食品・調理・加工の組織学」, pp.201, 学窓社, 東京 (1999).
- 21) 渡辺陽之輔, 坂口弘, 細田康弘：「病理組織標本の作り方」, 第 6 版, pp.310, 医学書院, 東京 (2001).
- 22) H. Colognato, P. D. Yurchenco: Development Dynamics, **218**, 213 (2000).
- 23) G Karpati, D. Hilton-Jones, K. Bushby, R. C. Griggs: “Disorders of Voluntary Muscle”, 8th ed. , pp.114-115, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2010).
- 24) M. Brockington, Y. Yuva, P. Prandini, S. C. Brown, S. Torelli, M. A. Benson, R. Herrmann, L. V. B. Anderson, R. Bashir, J. M. Burgunder , S. Fallet, N. Romero, M. Fardeau, V. Straub, G Storey, C. Pollitt, I. Richard, C. A. Swery, K. Bushby, T. Voit, D. J. Blake, F. Muntoni: Human Molecular Genetics, **10**, 2851(2001).
- 25) J. L. Guesdon, T. Ternynck, S. Avrameas: J Histochem Cytochem, **27**(8),1131(1979).
- 26) K. A. Jackson, D. S. Snyder, MA. Goodell: Stem Cells, **22**, 180(2004).
- 27) J. L. Schib, J. M. Icardo, A. C. Duran, A. Guerrero, D. Lopez, E. Colvee, A. V. de Andrés, V. Sans-Coma: J. Anat. **201**, 395 (2002).
- 28) 河野晋治, 山上伸一, 篠崎聰：平成 22 年度冷空講論, pp.245-246, 金沢 (2010).