

非脱灰硬組織凍結切片標本作製技術（川本法 2008）とその応用

川本 忠文

序 言

老齢化に伴う骨粗鬆症や骨欠損部の再生等で、骨組織の研究が重要になっている。骨組織は、軟組織と異なり化学固定後、脱灰操作を行わなくては切片標本作製することができない。しかし、化学固定や脱灰操作は、生体成分の溶出や蛋白の変性を引き起こすとともに組織から多くの情報を失わせ、酵素組織化学染色、免疫組織化学染色、遺伝子組織化学染色等の結果に影響を及ぼす。切片から正確な情報を得るには、未固定非脱灰の新鮮試料から切片を作製することが望ましく、凍結切片作製法は、それに適した方法である。従来、凍結切片作製法は、軟組織から凍結切片を作製することができるが、硬組織からの凍結切片作製は極めて困難である。

著者が開発実用化した凍結切片作製法¹⁻⁴⁾は、強力な粘着フィルム（Cryofilm）を切片支持材として用い⁵⁾、薄切時の切片の損傷を回避しながら切片を作製することができる。そのため骨組織を含め、種々の試料から形が正確に保たれた凍結切片（厚さ 2 μm 程度まで）を容易に、しかも確実に作製することができる。切片は粘着フィルムに貼りついた状態で染色され、最終的に粘着フィルムとスライドガラスの間に専用封入剤を用いて永久保存される。さらにカバーガラス下に封入することもできる。本法の凍結包埋・凍結薄切・染色封入の一連の所要時間は約 20 分で、試料採取 20 分後には永久切片標本として顕微鏡で詳細に観察できる⁶⁾。

本稿では、著者が開発した非脱灰硬組織切片標本作製法の基本的手技について述べる。

材料と方法

図 1 に試料凍結から切片封入までの一連の手順を示している。本法では、専用凍結包埋剤（SCEM）、凍結切片支持用粘着フィルム（Cryofilm）、タングステンカーバイド製替刃ナイフ（TC-65）、専用水溶性封入剤（SCMM）を使用することにより硬組織凍結切片を作製する。この凍結切片作製過程には特別な技術、熟練を必要としないことから、切片標本作製で最も重要な事は、氷晶の少ない良好な凍結包埋試料を作ることである。以後に各手順を示している。

鶴見大学・歯学部・R I 研究センター
横浜市鶴見区鶴見 2-1-3
e-mail: kawamoto-t@tsurumi-u.ac.jp

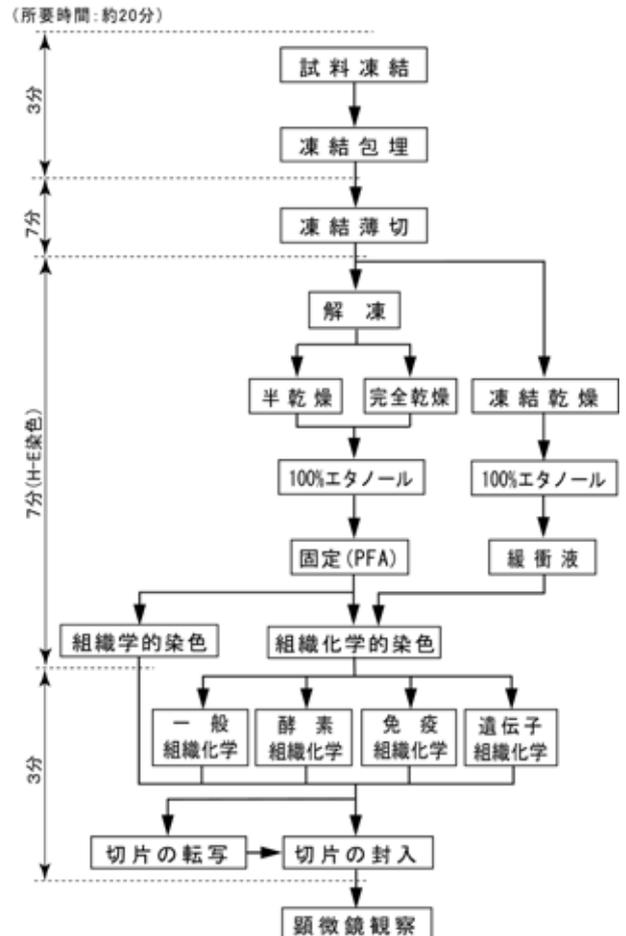


図 1 凍結切片標本作製手順

1) 凍結包埋 (図 2)

- ・試料をステンレス製凍結カゴに入れ、表 1 に示す冷却液に入れて急速凍結する (図 2 - A)。
- ・冷蔵庫で冷却した専用包埋剤 (SCEM, ライカマイクロシステム[®] (株) Section-Lab 製) をステンレス製包埋容器に入れ、少し凍結する (図 2 - B)。

(注): 試料の大きさに合った包埋容器を使用する。

- ・凍結試料表面の冷却液を拭き取り、直ちに包埋剤に入れ、包埋容器を冷却液に沈めて 5 ~ 10 秒間程凍結する。

(注): 液体窒素等の超低温冷却液は、凍結ブロックにクラックができるので包埋剤の凍結には使用しない。

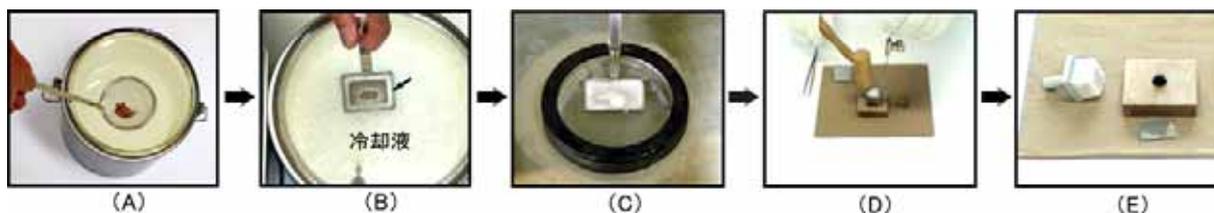


図2 凍結包埋手順 A: 試料の急速凍結、 B: 包埋剤を少し凍結する(矢印が凍結部位)、 C: 凍結包埋、 D: 凍結包埋試料の取出し、 E: 試料ホルダーへ固定

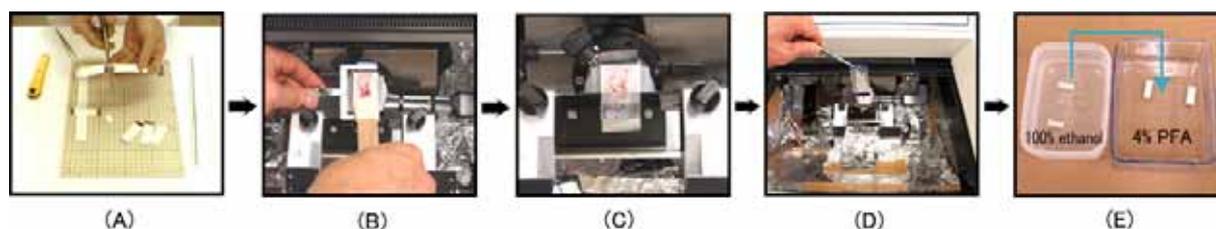


図3 凍結薄切手順 A: 粘着フィルムの準備、 B: 粘着フィルムの貼付、 C: 凍結薄切、 D: 凍結切片の解凍、 E: 切片の固定(100%エタノールに入れ、次いでPFAに入れる)

表1 試料凍結用冷却液

冷媒	沸点	融点
n-Hexane	69°C	-95°C
Pentane	36°C	-129°C
Isopentane	28°C	-160°C
Propane	-42°C	-190°C

表2 切片支持用粘着フィルム

	アセトン	耐熱	組織学的染色	組織化学的染色	蛍光免疫組織化学	遺伝子組織化学
Cryofilm type 2C(9)	◎	120°C	◎	◎	◎	◎
Cryofilm type 2C(10)	△	45°C	◎	◎	◎	△
Transfer film	切片転写用					
LMD film	LMDによる微小試料片採取用					

- ・表面の一部が凍結した時、包埋容器を液面まで引き上げ、包埋剤を完全に凍結する(図2 C)。
- ・包埋容器から凍結ブロックを取り出す(図2 D)。
- ・凍結試料の上面を試料ホルダーに押し付けて一部を解凍し、次いで冷却液に入れて凍結する(図2 E)。

2) 凍結薄切(図3)

- ・専用替刃ホルダーにタングステンカーバイド製替刃(TC-65, ライマイクロシステム[®](株))を装着し、試料をトリミングする。
- (注): 最適薄切温度は試料により異なり、硬組織薄切温度は -20 ~ -25、軟組織は -17 ~ -20 程度を目安とする。
- ・トリミング後、切片採取用の替刃に交換する。
- ・実験目的に適した粘着フィルム(Cryofilm, ライマイクロシステム[®](株) Section-Lab製)を選択する(表2)。
- ・薄切面の大きさに合わせて粘着シートを切断する(図3 A)。
- ・剥離紙を取り除き、粘着フィルムと試料面の間に空気を取り込まないように粘着フィルムを試料面に密着する(図3 B)。
- ・できるだけゆっくりと、一定速度で薄切する(図3 C)。

3) 凍結切片の処理(図5)

凍結切片は、使用目的に応じて半乾燥、完全乾燥、あるいは凍結乾燥を行う(図1)。

- A) 半乾燥 (通常の組織学的染色、免疫染色等を行う場合)
- ・凍結切片をクリオスタットから取り出して解凍する(図3 D)。
 - ・室温で10 ~ 60秒間乾燥する。
- (注): 乾燥時間は試料により決定する。
- ・乾燥後、切片面を下に向けて100%エタノールに入れる。
- ・次いで固定液(PFA等)に移して固定する(図3 E)。
- B) 完全乾燥 (染色中に切片が粘着フィルムから剥離する場合)
- ・凍結切片をクリオスタットから取り出して解凍する。
 - ・室温で数分間乾燥する。
 - ・乾燥後、切片面を下に向けて100%エタノールに入れる。
 - ・次いで固定液(PFA等)に移して固定する(図3 E)。
- C) 凍結乾燥 (未固定非脱灰状態で免疫染色する場合、水溶性物質の分布を研究する場合)
- ・凍結切片をクリオスタット内の温度の低い場所(20

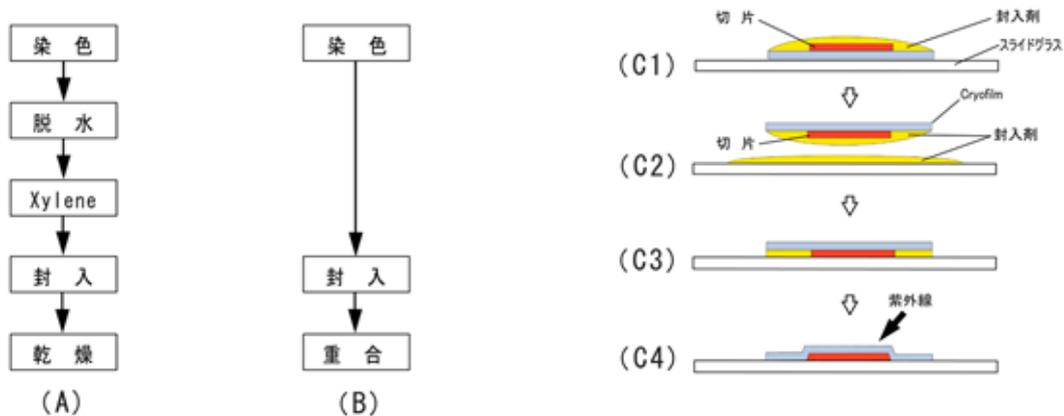


図4 切片封入手順 A: 従来の封入手順、 B: 新封入剤 (SCMM-R2, R3) による封入手順 (脱水、置換操作が不要)、

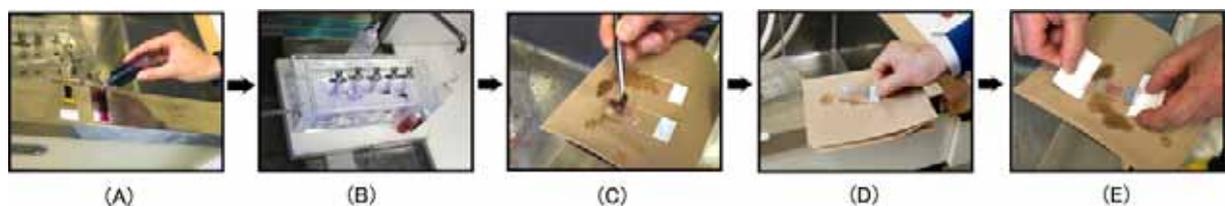


図5 染色・封入 A: H-E 染色、 B: 水洗、 C: SCMM-R2 による封入、 D: 余剰封入剤の除去 (スライドガラスを垂直に立てる)、 E: 余剰封入剤の除去 (濾紙による除去)

以下)に置く。

- ・凍結乾燥を行う。

(注): 厚さ 5 μ m 程度であれば数時間で凍結乾燥する。乾燥時間が長くなると組織にクラックが現れるので乾燥時間に注意する。

- ・乾燥後、シリカゲルを入れた密閉容器に入れて取り出す。
- ・アルコールまたはアセトンへの浸漬後、緩衝液に移し、次いで免疫染色等を行う。

4) 組織学的染色 (H-E 染色) (Cryofilm type 2C を使用)

- ・粘着フィルムの切片面を上に向け、クリップでスライドガラスに固定し、水洗する。
- ・水洗後、クリップを取り外し、切片上にヘマトキシリンを滴下して 2 ~ 4 分間染色する (図 5 A)。

(注): 大量処理の場合は、染色液を入れたタッパ等に切片面を下に向け、浮かべて染色する。

- ・染色後、切片をクリップでスライドガラスに固定し、流水中で 4 ~ 10 分間水洗する (図 5 B)。
- ・水溶性エオジンで 10 ~ 20 秒間染色する。
- ・流水でエオジンを洗い流す (10 ~ 20 秒)。
- ・100% エタノールを切片上に滴下し、粘着面に付着したエオジンを洗浄除去する (10 ~ 20 秒)。
- ・専用封入剤 (SCMM-R2, ライカマイクロシステムズ (株) Section-Lab 製) を切片上と新しいスライドガラス上に滴下する (図 4 C1)。

表 3 新封入剤

	材料	封入操作	封入時間
SCMM-G1	グリセリン系	乾燥	数日
SCMM-R1	樹脂系	乾燥	数日
SCMM-R2	樹脂系	紫外線重合	1分
SCMM-R3	樹脂系	紫外線重合	1分

(注): 切片が乾燥しないように迅速に行う。トルイジンブルー染色には SCMM-R3 を使用する。

- ・粘着フィルムの切片面をスライドガラスに向け、気泡を取り込まないようにスライドガラス上に置く (図 4 C2、5 C)。
- ・スライドガラスをキムタオル等の吸収紙上に立て、余分な封入剤を除去する (余分な封入剤が流れ出る) (図 5 D)。
- ・更に、濾紙を使って余分な封入剤を吸収除去する (図 4 C3、5 E)。
- ・専用封入装置 (UV Quick Cryosection Mounter, ライカマイクロシステムズ (株) Section-Lab 製) に切片を置き、封入剤を重合硬化する (約 1 分) (図 4 C4、6-A)。
- ・重合後、水道水でフィルム上とスライドガラス上の封入剤を洗い流す (しっかりと洗う)。
- ・粘着フィルムの余分な部分 (両端の金色部分) を切り取る (粘着フィルムがカバーガラスの代わりとなる)。
- ・必要に応じて、パラフィン用封入剤でカバーガラス下に再封入する。

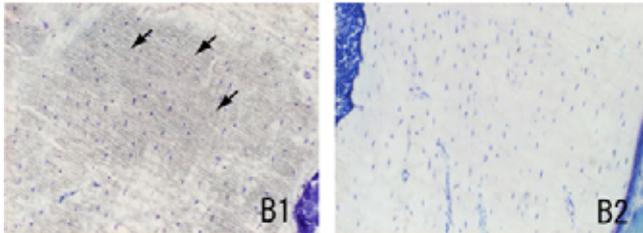
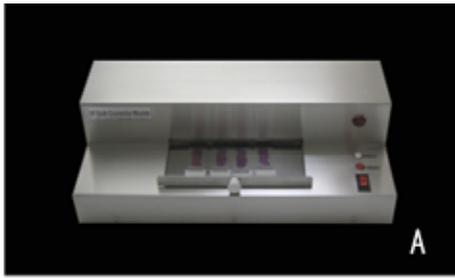


図6 迅速切片封入装置(A)と非脱灰骨切片の封入例(トルイジンブルー染色) B1:グリセリン系封入剤(SCMM-G1)使用、B2:樹脂系封入剤(SCMM-R3)使用。 B1では石灰化部位にすだれ状の模様(矢印)が現れているが、B2では骨組織を鮮明に観察できる。

5) 免疫染色(Cryofilm type 2Cを使用)

- ・染色手順は、基本的には4)(組織学的染色)と同じで、スライドグラス上に置いた切片に順次反応液を滴下し、染色する。未固定非脱灰状態で免疫染色する場合は、凍結乾燥切片を使用する。
- ・切片封入には、ABC法等で染色した場合は、樹脂系封入剤(SCMM-R1,R2,R3)を使用できる。蛍光免疫染色については、従来の市販の封入剤を使用する。試料によりSCMM-R2で封入することもできる。

6) 蛍光トレーサー、水溶性トレーサー等の観察

- ・凍結乾燥切片をシリカゲルを入れた密閉容器に入れ、クリオスタットから取り出す。
- ・3~5分間の放置後、粘着フィルム上の切片をスライドグラスに向けて置き、粘着フィルムの粘着力を利用して切片を粘着フィルムとスライドグラスの間に密閉保存する。

(注): 封入剤は用いない。

7) 遺伝子解析用試料採取

- ・LMDフィルムで凍結切片を採取する。
 - ・凍結乾燥後、図7に示すように切片面をレーザー光側に向けてLMDフィルムをスライドグラスに固定する。
- (注): スライドグラスを使用する場合は、切片とスライドグラス板の間に隙間を設ける(図7 B)。
- ・LMD装置で目的部位を切断し、切断片を採取する。

結果および考察

従来の硬組織切片標本作製法では、脱灰試料、非脱灰試料ともに切片標本作製には1週間以上を必要とするが、本

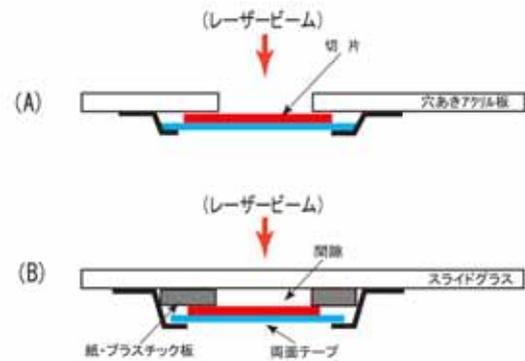


図7 LMDフィルム使用による微小試料採取(切片面をレーザー光側にする)。A:穴あきアクリル板使用、B:スライドグラス使用

法を使用することにより試料採取から20分で非脱灰永久切片標本作製することができるようになった。しかも最も難しい切片作製に専用粘着フィルム(Cryofilm)を使用するために形態が正確に保たれた切片を確実(ほぼ100%)に採取でき、厚さ2 μ mまでの切片作製ができる。

凍結包埋、凍結薄切、専用封入剤による封入等の各操作では脱水操作がないために組織収縮が殆ど起こらない。また切片が粘着フィルムに貼りついた状態で、染色、封入等の一連の操作を行うために切片の変形は起こらず、作製された切片標本は正確に生体内の形態を保っている。図8,9,10,11に本法で作製した切片標本例を示している。

図8は成熟ラットの足で、厚さ4 μ mの新鮮凍結切片標本を示している。骨、筋肉、皮膚、爪、関節軟骨等の位置関係は正確に保たれ、形態も良好で、顕微鏡により詳細に観察することができる。拡大図に示しているように切片作製で難しいとされる爪や骨の形態も良好に保たれている。関節部の軟骨の形態も良好に保たれている。

図9は同じラットの大腿骨で、厚さ4 μ m凍結切片標本を示している。骨幹部、骨端部、軟骨等がほぼ完全に保たれている。石灰化組織は、アリザリンレッドS染色が示しているように完全に保たれている(図9-B)。膝関節部の骨、軟骨、靭帯等の形態や位置関係は良好に保たれ、各細胞を明瞭に観察することができる。硬組織の石灰化描記に使用される蛍光トレーサーの分布も明瞭に観察することができる(図9-D)。図示していないが、厚さ2 μ mの切片でも鮮明な蛍光像を観察することができる。骨髄の凍結切片作製は極めて困難であるが、図9-AとCに示しているように骨髄中の各細胞は完全に保

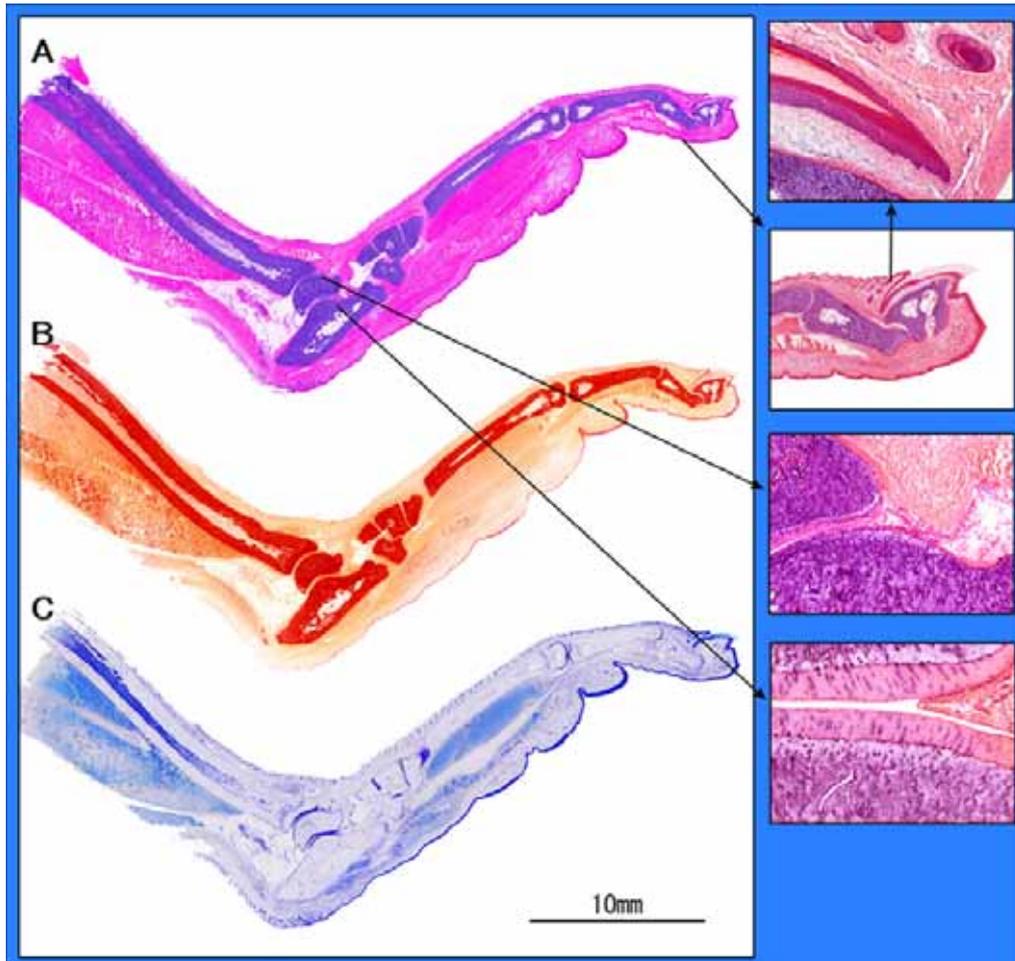


図8 7ヶ月齢ラット足(未固定非脱灰凍結切片、4 μ m) A: H-E染色、B: アリザリンレッドS染色、C: トルイジンブルー染色、右挿入図は各矢印部位の拡大図、切片採取フィルムは全てCryofilm type 2C(9)、封入剤: 図A, BはSCMM-R2、図CはSCMM-R3

たれている。

図10は生体で最も硬い成人の抜去歯で、厚さ5 μ mの凍結切片標本を示している。象牙質、エナメル質の両硬組織の形態は保たれ、象牙質の齶触状態を明瞭に観察することができる(図10-Aの矢印)。

図11は全身切片への応用例として7日齢マウスの新鮮凍結切片標本を示している。全ての臓器、組織の位置関係は正確に保たれ、組織も良好に保たれている。切片作製で難しいとされる肺胞の形態も良好に保たれている(図11-D)。

図8,9,10,11に示しているように、本法は軟組織と硬組織が混在した試料からでも全ての組織の位置関係を正確に保ち、組織収縮もなく、しかも高倍率で詳細に観察できる凍結切片を作製することができる。切片は、組織化学的染色、酵素組織化学、免疫組織化学、蛍光免疫組織化学、遺伝子組織化学等に使用することができる。免疫染色では、固定や脱灰の影響がないために従来の方法で作製した切片よりも良い結果が得られている⁷⁾。

以後、凍結包埋、凍結薄切、染色について考察する。

1) 凍結包埋

試料の凍結包埋で最も大きな問題は、氷晶形成による組織損傷である。特に未固定試料は、その損傷が顕著に現れる。組織を環流固定し、氷晶防止剤に浸漬した試料を凍結すると、光学顕微鏡レベルではほぼ完全に氷晶形成による損傷を回避することができる。しかし、化学固定は、免疫染色等に影響を与える場合があり、可能な限り短時間の固定にすべきである。氷晶形成による組織損傷は、試料の凍結速度を高めることにより小さくすることができる。液体窒素は極低温なので冷却速度が高いように思われているが、試料凍結時に生じるバブルにより熱伝導が妨げられ、冷却速度はイソペンタンよりも悪い⁸⁾。

凍結包埋用冷却液としては、表1のような液が使用される。液体窒素冷却プロパンで凍結した試料は最も美しい組織像を示すが、実用的には安全面等を含めて液体窒素冷却イソペンタンやペンタンで十分である。専用装置で冷却したヘキサン(-94 $^{\circ}$ C)でも問題なく各細胞を固定できるが、新鮮試料を凍結した場合、氷晶の影響を受

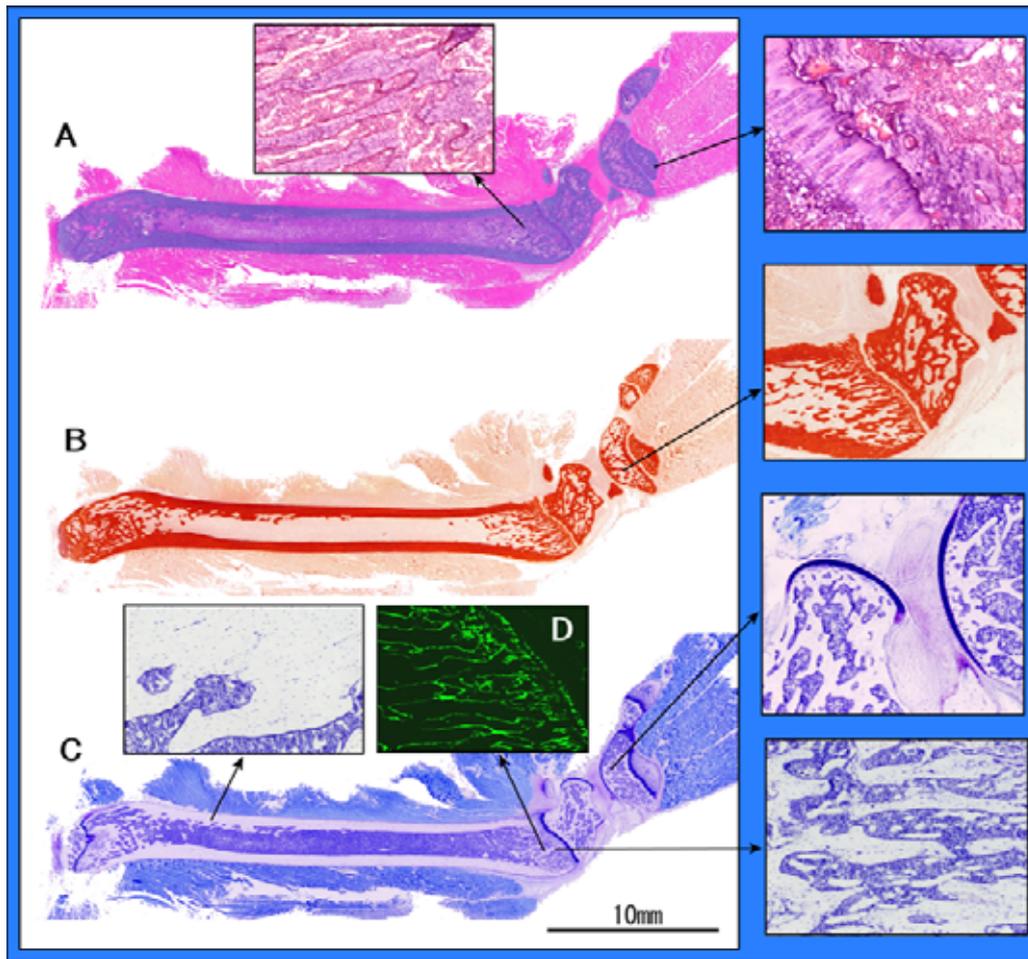


図9 7ヶ月齢ラット大腿骨(未固定非脱灰凍結切片、4 μm) A: H-E染色、B:アリザリンレッドS染色、C: トルイジンブルー染色、D: 図Cの矢印部位のカルセインの蛍光分布、各挿入図は矢印部位の拡大図、切片採取フィルムは全てCryofilm type 2C(9), 封入剤: 図A, BはSCMM-R2、図CはSCMM-R3

けやすい組織(例えば、赤血球や筋組織)に損傷が現れる。固定試料や氷晶防止剤に浸漬した試料であればドライアイスで冷却したヘキサンでも問題ない。

冷却液として冷却アセトンあるいは冷却アルコールが使用される場合があるが、それらの冷却液は凍結試料中に浸透し、粘着フィルム貼付への障害、薄切への障害となるために避けなければならない。

氷晶による組織損傷は試料を化学固定することにより小さくできる。著者の経験では、灌流固定を数分行う事により、細胞の形態は未固定試料に比べて格段に改善した。実験動物を対象とする場合は、放血しないで直接固定液を血管に注入し、数分間の放置後、目的試料を抽出して直ちに凍結しても観察に耐える試料ができる。

SCEMは硬組織試料の凍結包埋剤として開発された材料で、硬組織を十分に保持でき、しかも粘着フィルムの貼付性に優れている。この包埋剤は切片のカーリングが小さい、切削時の収縮が少ない等の利点があり、軟組織試料の凍結包埋にも適している。SCEMで凍結包埋された試料は、凍結切片採取後、薄切面を粘着フィルムで保護することにより、超低温庫(約-80℃)に長期間(1年

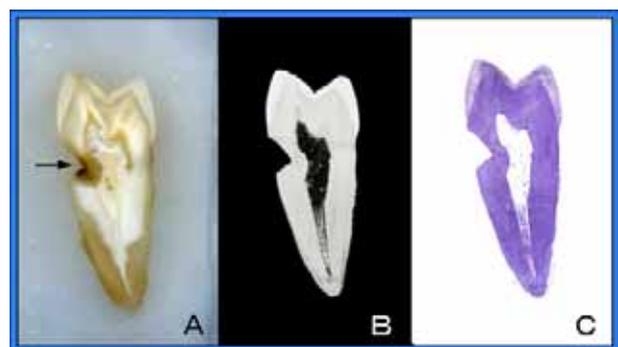


図10 成人の抜去歯、A: 薄切面(矢印は齧触部位)、B: 凍結切片(厚さ5 μm)、C: トルイジンブルー染色

以上)保存することができ、必要に応じて再薄切できる利点がある。

2) 凍結薄切

タングステンカーバイト製替刃の寿命は、試料と替刃の取扱いにより大きく影響される。成熟ラット大腿骨では、5 μm以下の厚さであれば同一部位で50枚以上の切

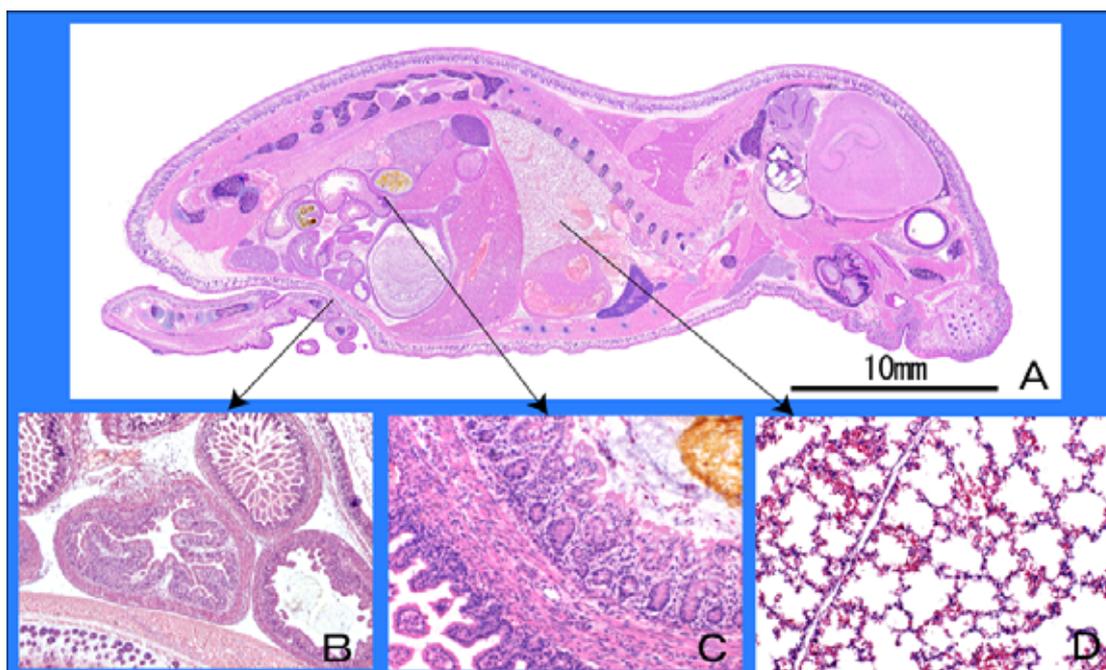


図11 7日齢マウス（未固定非脱灰凍結切片、5 μm）、H-E染色、図B、C、Dは矢印部位の拡大図、切片採取フィルムはCryofilm type 2C(9)

片を作製できる。しかし、骨組織の厚切りは一回の薄切で刃先の鋭利さを失うため、本番用替刃（切片採取用）の面合わせに細心の注意を払わなくてはならない。また、厚切りのトリミングは、硬組織を壊すことがあるのでトリミング時の切片厚には注意する。著者は、目的面近くまでは10 μm程度でトリミングし、最終段階では厚さ3～5 μmで表面をしばらく整形している。

3) 染色

粘着フィルムで支持された凍結切片は、従来の切片を用いた研究目的（組織学的染色、一般組織化学、酵素組織化学、免疫組織化学、遺伝子組織化学、LMDによる微小試料の採取、水溶性物質の分布研究等）に使用できる。更に粘着フィルムは、免疫染色で使用する蛍光色素（FITC, DAPI等）の蛍光領域に蛍光がないことから蛍光免疫染色にも使用することができる。

通常の染色には解凍切片を使用し、解凍後の乾燥時間は試料により決定する。例えば、脳等は完全に乾燥するとヒビ割れが現れる場合があり、その場合は、乾燥を10～30秒間とし、半乾燥状態の切片を使用する。半乾燥切片を直接固定液に浸漬すると、切片が粘着フィルムから剥離する場合がある。これは100%アルコールに浸漬した後、固定液に浸漬することで解決する。また、組織中に気泡が残る場合は、100%アルコールに浸漬した状態で真空容器内で脱気する。

形態観察は、H-E染色が一般的であるが、非脱灰切片をH-E染色すると石灰化部位にヘマトキシリンが沈着し、観察しづらくなる欠点がある。そのため、骨等の石灰化組織を観察する場合は、トルイジンブルー染色が適して

いる。

切片のPFA中への長時間放置は細胞成分を溶出させて染色性が低下するので、PFA中への切片の放置は数時間以内とするようにする。

酵素組織化学では、未固定非脱灰切片を用いて酵素活性の検出を行うことができるため、従来の切片よりも感度良く酵素活性を検出できる。そのため、従来の方法で検出されなかった部位に反応が現れる場合もある。解凍切片の組織像は凍結乾燥切片よりも優れているので、解凍切片を未固定の状態での酵素活性の検出に用いる場合があるが、組織により切片が粘着フィルムから剥離する場合がある。その場合、凍結乾燥切片を使用する。凍結乾燥切片の使用では、必ず凍結乾燥切片を100%エタノールに入れ、それを真空容器内に置いて組織中の気泡を除去することが必要である。また、固定液の影響が小さい場合は、短時間（数十秒）の化学固定でも切片の剥離を防ぐことができることから、切片をPFA等で固定することで解決することもできる。

免疫組織化学においても免疫反応を感度よく実施することができる。特に、固定液と脱灰液の免疫反応への影響を完全に除く事ができることから、信頼性の高い結果が得られる。また未固定非脱灰切片を用いて反応を実施できることから、固定液の種類、固定時間等の免疫反応に影響する因子を正確に評価することができる⁷⁾。解凍切片を未固定の状態での免疫染色に用いると前述のように染色操作中に切片が粘着フィルムから剥離する場合がある。この場合も上記と同様の対応をする。

病理標本等では、高温処理による抗原性賦活化処理が行われることがある。そのような試料には、表2に示し

ている粘着フィルムのCryofilm type 2C(9))を使用することにより120 による賦活処理ができる。

4) 封入

本法の封入では、表3に示す水溶性封入剤を使用するため、従来の封入操作で使用する有機溶媒(キシレン等)を使用しない。そのため組織収縮がほとんど起こらない。また、粘着フィルムがカバーガラスの役目を果たすので、大型マイクロームがあれば巨大切片標本(例えば、15cm×8cm)を容易に作製することができる。

水溶性封入剤としては、グリセリン系封入剤(SCMM-G1)と樹脂系封入剤(SCMM-R1,R2,R3)がある。グリセリン系封入剤は発色が良いが、封入剤の乾燥中あるいは保存中に水溶性色素が拡散する欠点がある。SCMM-R1は自然乾燥による封入を行うためにグリセリン系と同様に乾燥中に水溶性色素が拡散する場合があるが、乾燥後の組織像は鮮明で、しかも切片標本の保存中に色素の拡散は起こらない利点がある。SCMM-R2とR3は紫外線重合型封入剤で専用装置により1分で染色切片を永久標本にする事ができ、水溶性色素の拡散を小さくできる。SCMM-R2とR3は染色により使いわけられる。SCMM-R2は標準的な封入剤であるが、染色により封入操作中に水溶性色素の拡散が起こる場合がある。そのような場合はSCMM-R3を使用する。

硬組織切片標本を鮮明に観察するには、SCMM-R2,R3による封入が必須で、グリセリン系封入剤を使用すると図6-B1に示すように硬組織部位に回折光が現れ、石灰化部位にすだれ状の像が現れて硬組織を鮮明に観察できない。樹脂系封入剤(SCMM-R2,R3)では回折光は殆ど現れず、組織を鮮明に観察することができる(図6-B2)。

終わりに

本原稿は、第79回病理技術研究会(平成21年3月2日)の特別講演内容を中心に記載したものであるが、本テキストのみで最新手法(川本法2008)が使用できるように最新技術・材料に基づいて手法を記載している。高品質の切片が、確実に、容易に、しかも短時間で得られる本手法が研究や臨床病理の多くの人達に役立つことを願う。

参考文献

- 1) 川本忠文: 夢の切片 - まるごと2 μ m -、ミクロスコピア, 1999, 16:11-17
- 2) Kawamoto T: Light microscopic autoradiography for study of early changes in the distribution of water-soluble materials. J Histochem Cytochem, 1990, 38:1805-1814
- 3) Kawamoto T, et al.: A method for preparing 2- to 50- μ m-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. Histochem. Cell Biol, 2000, 113:331-339
- 4) Kawamoto T: Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. Arch Histol Cytol, 2003, Vol 66:123-143
- 5) Kawamoto T: Preparation of Multi-Purpose Fresh-Frozen Sections By Using a New Adhesive Film. Proceeding(abstract), 2007 Meeting of the Society for Whole-Body Autoradiography in Charleston, 2007
- 6) Kawamoto T, et al.: Preparation of Thin Undecalcified Frozen Sections from Hard Tissue. J Den Res, 2008, 84 Sp Iss Abstract(No 2074)
- 7) Hosoya A. et al.: Effects of fixation and decalcification on the immunohistochemical localization of bone matrix proteins in fresh-frozen bone sections. Histochem Cell Biol, 2005, 123:639-646
- 8) Schwabe K.G, et al.: Ultrastructural and thermocouple evaluation of rapid freezing techniques. Cryobiology, 1980, 17:571-584