

# 病理組織標本の作製～骨形態計測について

骨形態計測は、非脱灰樹脂包埋組織標本を光学および蛍光顕微鏡を用いて観察し、骨代謝状態を定量的に計測する方法です。カルセイン等の蛍光物質で処理することにより、骨の代謝回転を計測することができます。

## カルセイン投与間隔

### ◆カルセインの作製

2% 炭酸水素ナトリウム水溶液にカルセインを 16 mg/10 ml に調整します。

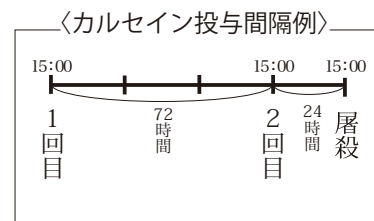
溶液は遮光し、-20℃で保存してください。(使用時は、室温で解凍して使用)

投与量は、300 μl/mouse で皮下投与してください。

(3,3'-Bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein (Calcein ): 同仁科学研究所)

### ◆カルセイン投与間隔は、通常 72 時間・投与後屠殺までは 24 時間をお願い致します。

投与間隔は 96 時間および 48 時間でも解析可能ですが、72 時間以外の方はご相談ください。



## サンプルの固定

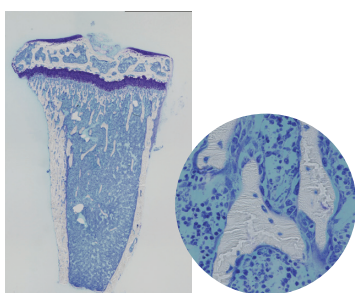
### ◆骨形態計測で用いる基本サンプルは、右胫骨の非脱灰 GMA 樹脂包埋切片です。(左側でも可能です。)

- 1) 屠殺後、筋組織および結合組織をできるだけ取り除き、速やかに 70% エタノールを満たした 15 ml チューブ内で浸漬固定をお願いします。一晚 4℃で振盪してください。(カルセイン投与のあるサンプルは遮光してください。)
- 2) 翌日、一度 70% エタノールの液交換を行ってください。固定は浸漬固定の 24 時間を含め、4℃で 1 週間です。多少過ぎても構いません。屠殺から固定期間と固定状況は、標本作製および染色状況に影響します。
- 4) 発送前に再度、70% エタノールの液交換を行った後、冷蔵便または、発泡スチロールに保冷剤を入れてサンプルをお送りください。

※ 1.5 ml・2 ml チューブは容量不足のため不可、15 ml チューブまたはそれに相当する容器での固定および運搬をお願い致します。

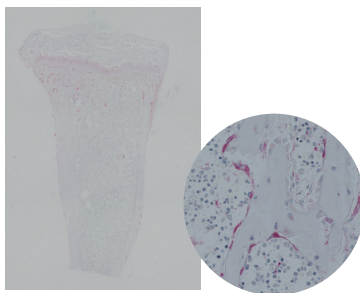
## 染色

### Toluidine Blue 染色



・青紫色：軟骨基質 ・薄紫色：類骨

### TRAP 染色



・赤色：破骨細胞

### Von Kossa 染色



・黒色：石灰化基質

Toluidine Blue 染色	全体的な骨構造を確認することができます。 カルセインを投与した場合、蛍光ラベルの確認ができます。 骨形態計測で使用します。
TRAP 染色	破骨細胞を明瞭に確認することができます。 薄切時に酢酸 buffer につけるため、蛍光ラベルの観察はできません。 骨形態計測で使用します。
von Kossa 染色	カルシウム塩を濃い茶褐色または黒色に染色するため、骨梁の確認ができます。 骨組織の詳細な観察ができないため、骨形態計測では使用しません。

※ TRAP 染色の対比染色は、ヘマトキシリンとさせていただきます。計測時に骨構造がよく観察できるためです。

現在その他の染色は行っておりません。

未染色切片も作製してお返し致しますので、もしその他の染色が必要な場合は、恐れ入りますが、そちらの切片でご対応させていただきますよう、よろしくお願い申し上げます。

## 骨形態計測

◆標本作製：1検体につき、前額断中央部を3 $\mu\text{m}$ の連続切片で5セット作製しています。

骨形態計測に用いる標本は、1セット目と5セット目です。2から4セット目は未染色でお返し致します。

※オプションのVon Kossa染色を追加される場合は、1セット目と5セット目のスライドに追加して作製致します。

例) 検体 #1

	Thuidine Blue 染色	TRAP 染色	Von Kossa 染色 <sup>*</sup>
#1-1	●骨形態計測	●骨形態計測	●
#1-2	未染色	未染色	×
#1-3	未染色	未染色	×
#1-4	未染色	未染色	×
#1-5	●骨形態計測	●骨形態計測	●

◆計測部位：脛骨二次海綿骨

他の部位の解析をご希望の方はご相談ください。

◆解析項目：以下の表をご参照ください。

その他の解析につきましてはご相談ください。

## 解析項目

骨構造 Toluidine Blue 計測値

略語	計測名	単位
BV/TV	Bone Volume/Total tissue Volume	%
Tb.Th	Trabecular Thickness	$\mu\text{m}$
Tb.N	Trabecular Number	/mm
Tb.Sp	Trabecular Separation	$\mu\text{m}$
BS/TV	Bone Surface/Total tissue Volume	$\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$
BS/BV	Bone Surface/Bone Volume	$\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$

動的パラメータ Toluidine Blue 計測値

略語	計測名	単位
ES/BS	Eroded Surface/Bone Volume	%
OS/BS	Osteoid Surface/Bone Surface	%
OV/BV	Osteoid Volume/Bone Volume	%
Ob.S/BS	Osteoblast Surface/Bone Surface	%
dLS/BS	double Labeled Surface /Bone Surface	%
sLS/BS	single Labeled Surface /Bone Surface	%
MS/BS	Mineralizing Surface/Bone Surface	%
MAR	Mineral Apposition Rate	$\mu\text{m}/\text{day}$
BFR/BS	Bone Formation Rate/Bone Surface	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$
O.Th	Osteoid Thickness	$\mu\text{m}$
Omt	Osteoid maturation time	day
Aj.AR	Adjusted Apposition Rate	$\mu\text{m}/\text{day}$
Mlt	Mineralization lag time	day
Rs.R	Resorption Rate	$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2/\text{day}$

動的パラメータ TRAP 計測値

略語	計測名	単位
Oc.S/BS	Osteoclast Surface/Bone Surface	%
N.Oc/BS	Osteoclast Number/Bone Surface	/mm

## ご返却するもの

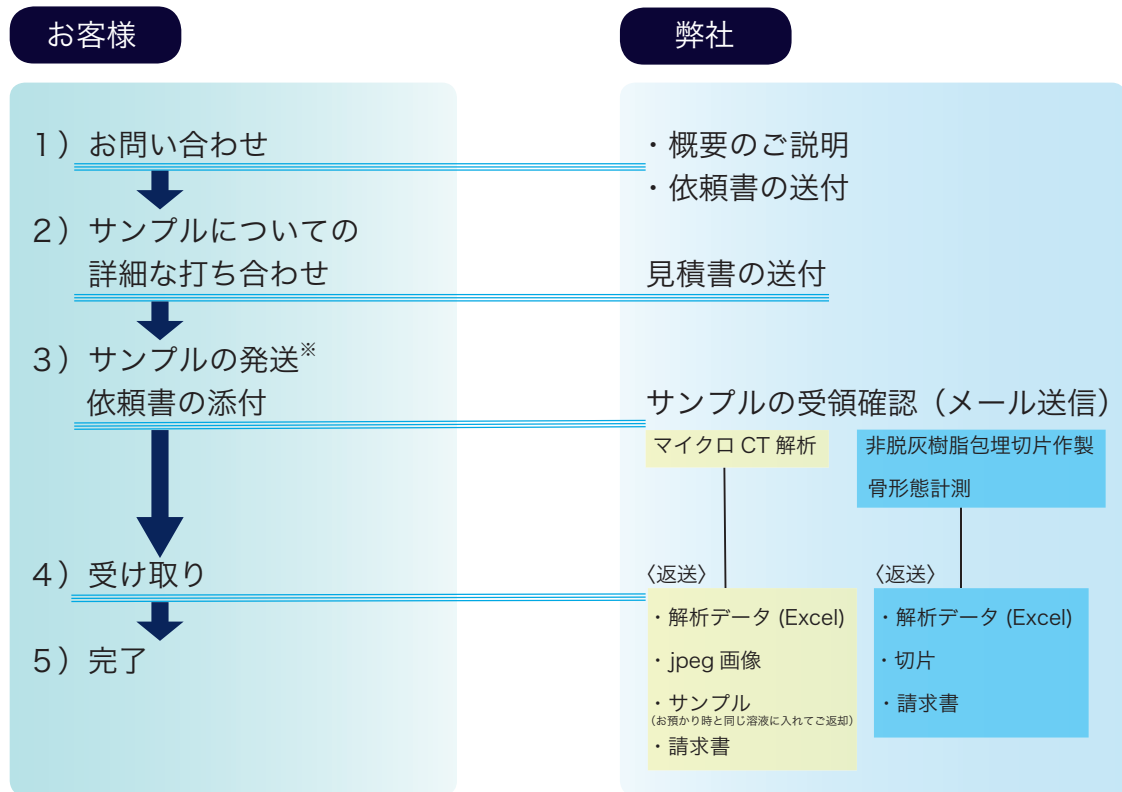
解析が終了次第、解析データ（Excel ファイル）と非脱灰樹脂包埋切片をご返却いたします。

## サンプルお預かり～ご返却までの期間

お返しに2-4か月ほどかかります。お急ぎの方はご相談ください。

また、ご発注時または、ご依頼前に納期目安をお伝え致します。

# 発注フロー (発注～結果報告)



## ※ サンプルの発送方法

- ・ 発送前に再度、70% エタノールの液交換を行った後、冷蔵便または、発泡スチロールに保冷剤を入れてサンプルをお送りください。
- ・ パラフィルムでキャップを固定すると、より溶液漏れの心配がございません。
- ・ 固定液の液量不足や、溶液漏れ等による標本作製および解析が困難な場合は、解析前にご返却させていただく場合がございますので、ご了承くださいませよう宜しくお願い申し上げます。

## ◆ サンプルの送付先

医創蔵

〒 178-0062 東京都練馬区大泉町 2-54-2

Tel : 03-3926-1299

E-mail : info@isozo.co.jp