



K-CX AT脱灰液を用いた大腿骨及び胸骨 における標本作製方法の検討

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
勝俣桃子、金山友美、後藤一将、藤澤秀樹
2014年6月7日（土）



検討目的

- 病理組織標本作製の流れとして、硬組織標本作製は脱灰操作を経るため、一般組織標本の作製より期間を要する。そこで、硬組織標本作製において、いかに早くかつ良好な標本作製ができるかがポイントとなる。
- 今回我々は、数種類の脱灰液のうちの一つ、迅速脱灰液とされるK-CX AT脱灰液に着目し、マウス、ラット、イヌ、サルの大腿骨及び胸骨における脱灰期間の検討をカラッチヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色、特殊染色及び免疫組織化学染色を実施し確認したので報告する。



材 料

- ICR系マウス、Sprague-Dawley系ラット、ビーグル、カニクイザルの大腿骨及び胸骨
- 固定液：10%中性リン酸緩衝ホルマリン液
(3日以上浸漬固定)
- K-CX AT脱灰液 (ファルマ社製)
成分：塩酸、キレート剤、他
脱灰液量は組織の30～50倍量で使用
- 中和剤：5%硫酸ナトリウム

方法

- 脱灰は**冷蔵庫内 (4~10℃)** で実施
- 脱灰期間

マウス

0.5日	1日	2日	3日	4日	7日	8日	9日	10日	11日	12日
------	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----

ラット、イヌ、サル

1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	11日	12日
----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----

作製の流れ

低温脱灰開始

↓
切り出し

↓
脱灰終了

{ 追加脱灰

↓
5%硫酸ナトリウムによる中和処理

↓
脱脂

{ マウス・ラット：なし
イヌ・サル：あり（大腿骨）

↓
包埋、薄切、染色

切り出しのタイミング

マウス：切り出しなし

ラット：各脱灰終了1~2時間前

イヌ・サル：各脱灰終了24~48時間前

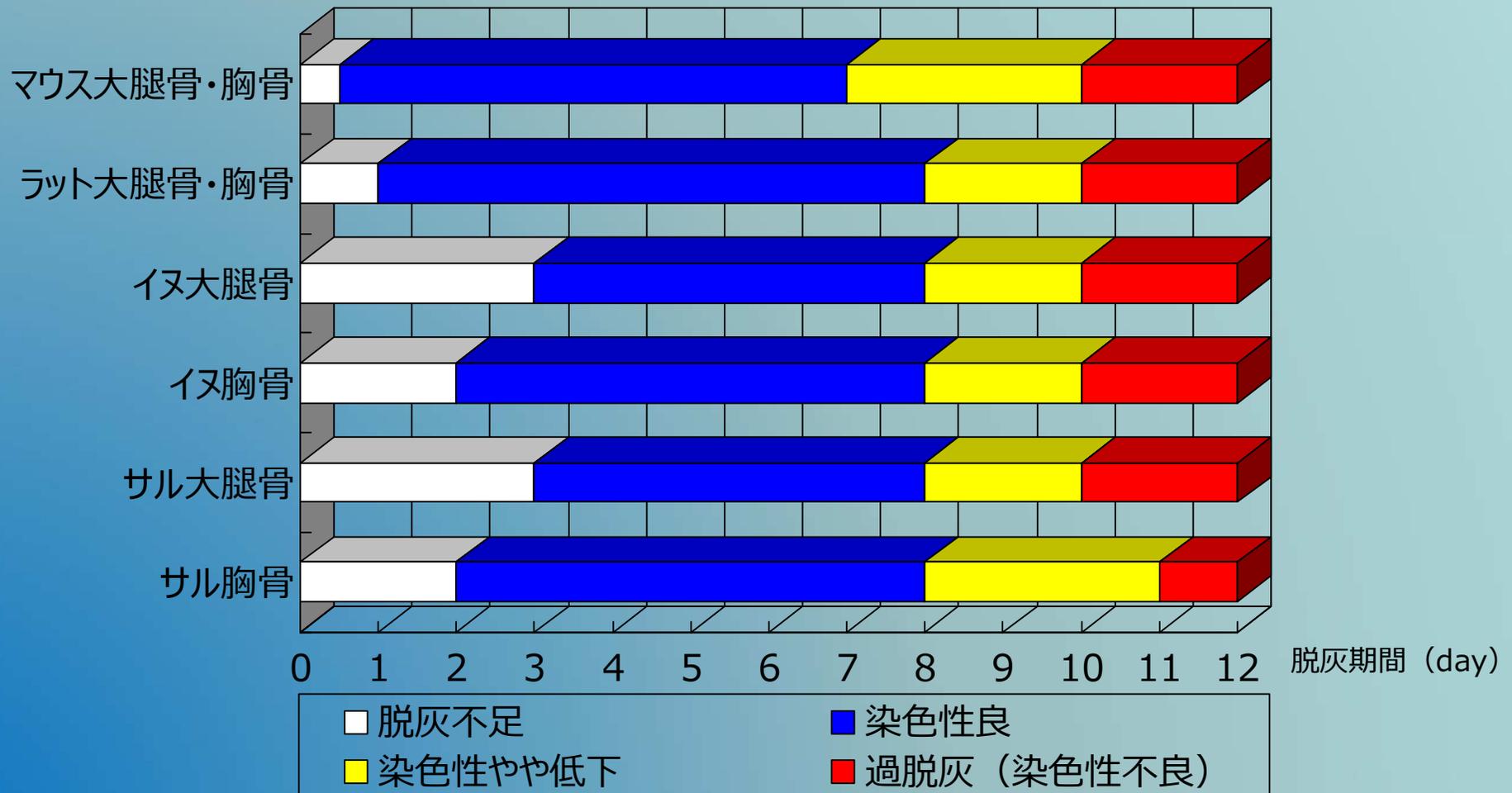


染色

- ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色
（カラッチヘマトキシリン使用）
- 特殊染色及び免疫組織化学染色
 - アルシアン青/PAS重染色（AB/PAS染色）
 - サフラニンO染色
 - 抗PCNA免疫組織化学染色
 - 抗S-100/アルシアン青重染色（マウス以外）



H・E染色結果



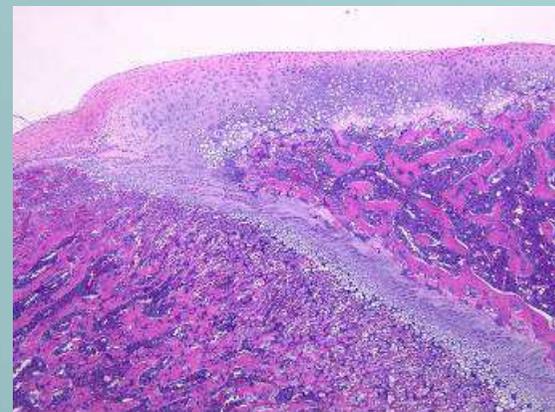


■ 最短脱灰期間のH・E結果

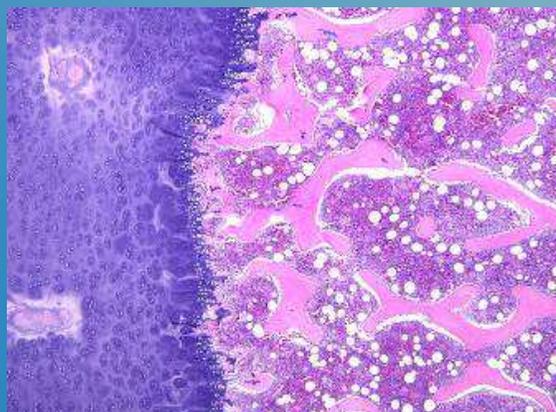
マウス 0.5日



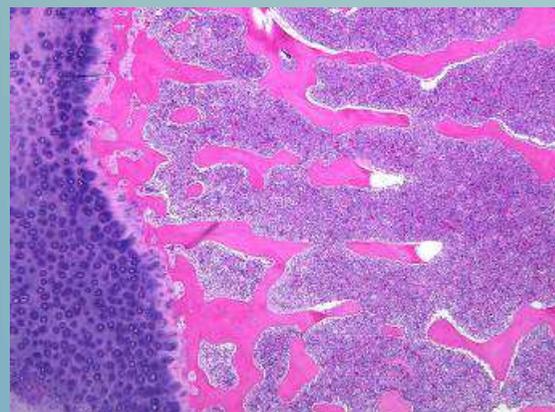
ラット 1日



イヌ胸骨 2日



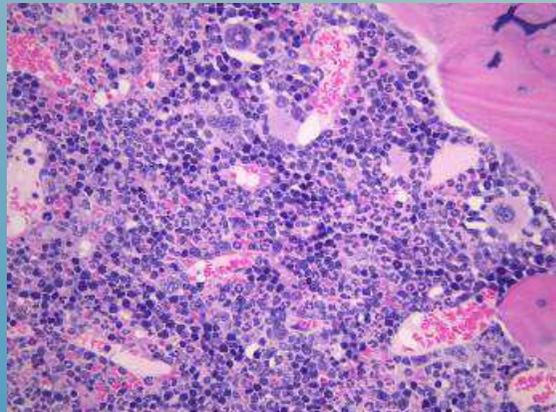
サル胸骨 2日



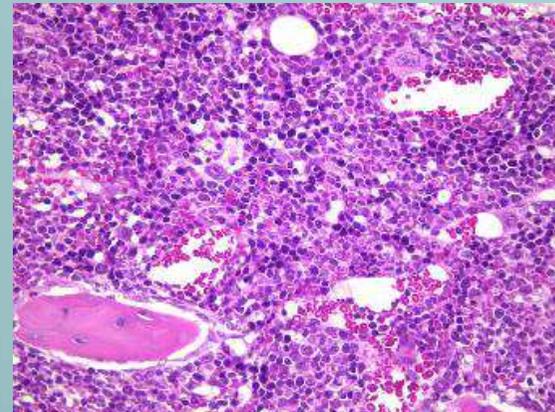


■ マウス

0.5日

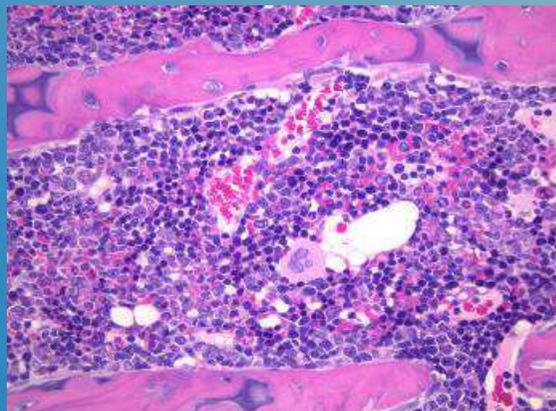


8日

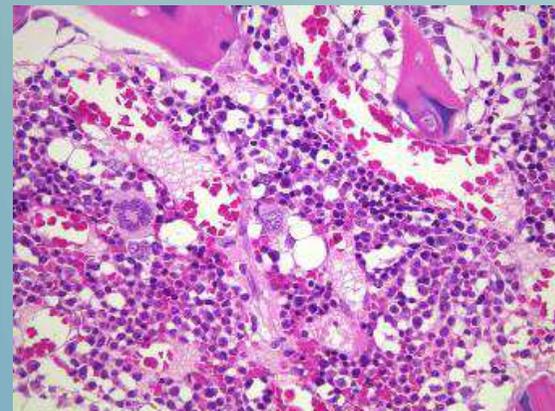


■ ラット

1日



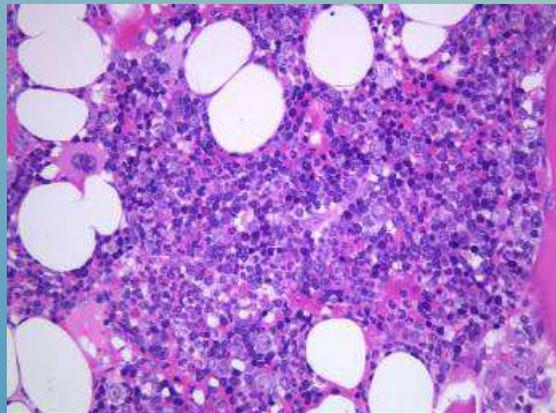
9日



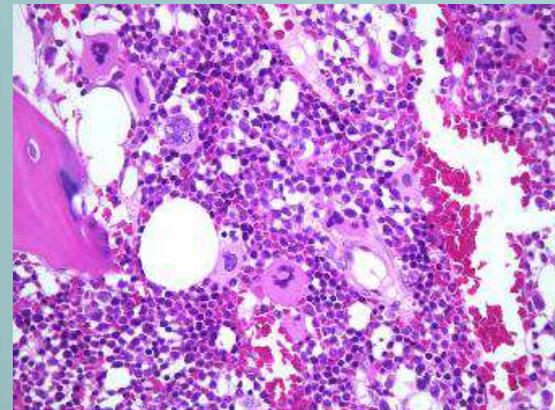


■ イヌ大腿骨

3日

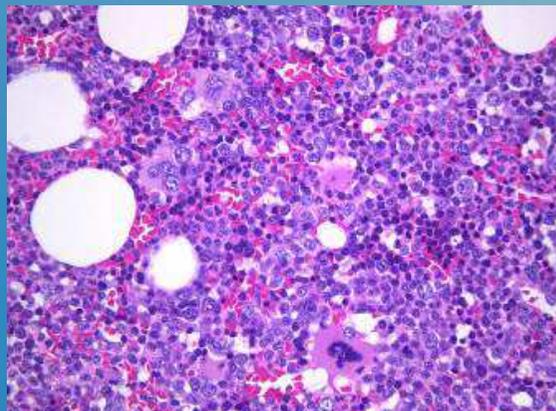


9日

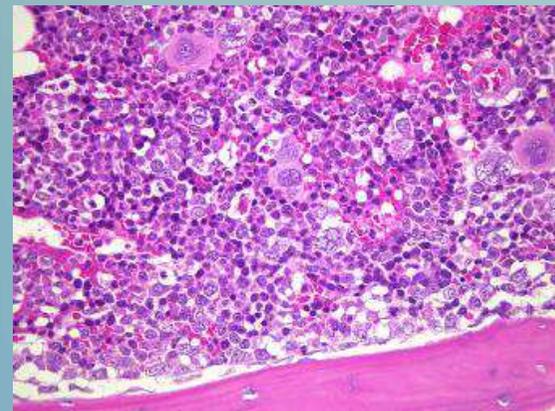


■ イヌ胸骨

2日



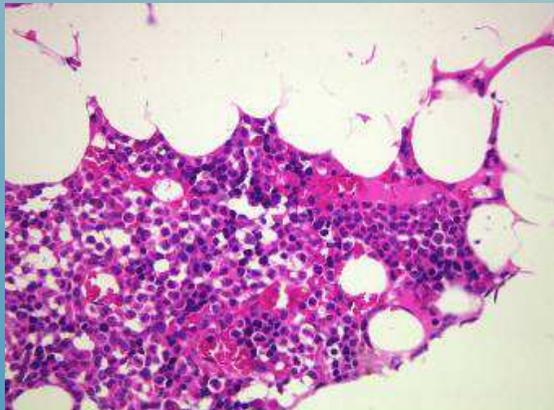
9日



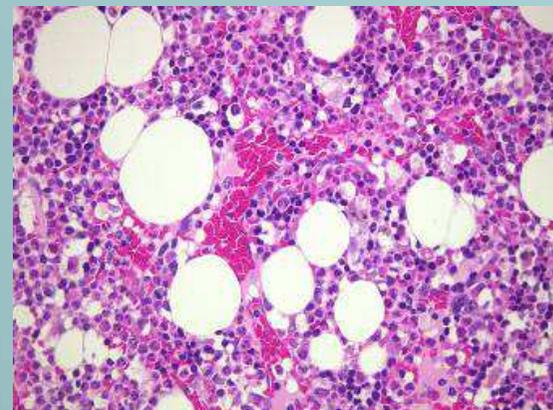


■ サル大腿骨

3日

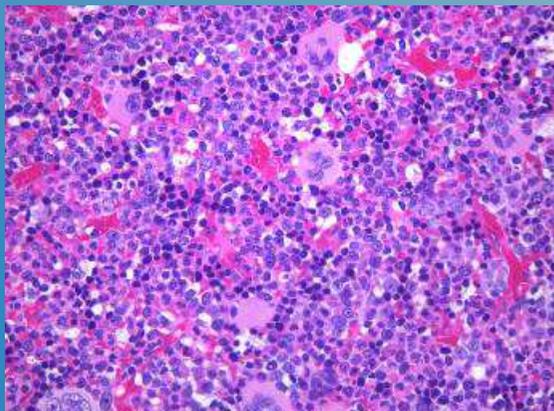


9日

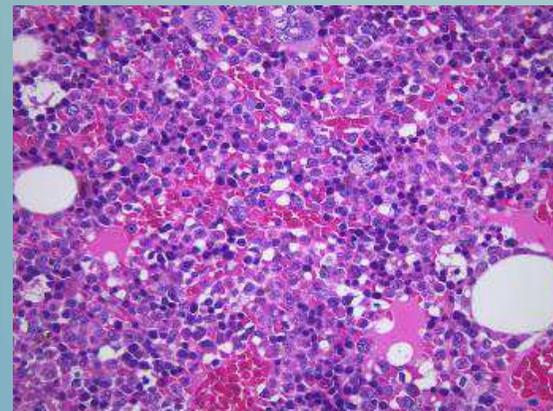


■ サル胸骨

2日



8日





結果

- 今回の検討結果より、K-CX AT低温脱灰液は蟻酸ホルマリン脱灰液と比較して、短期間の脱灰が実施できた。

蟻酸ホルマリン脱灰とK-CX AT低温脱灰の最短脱灰期間

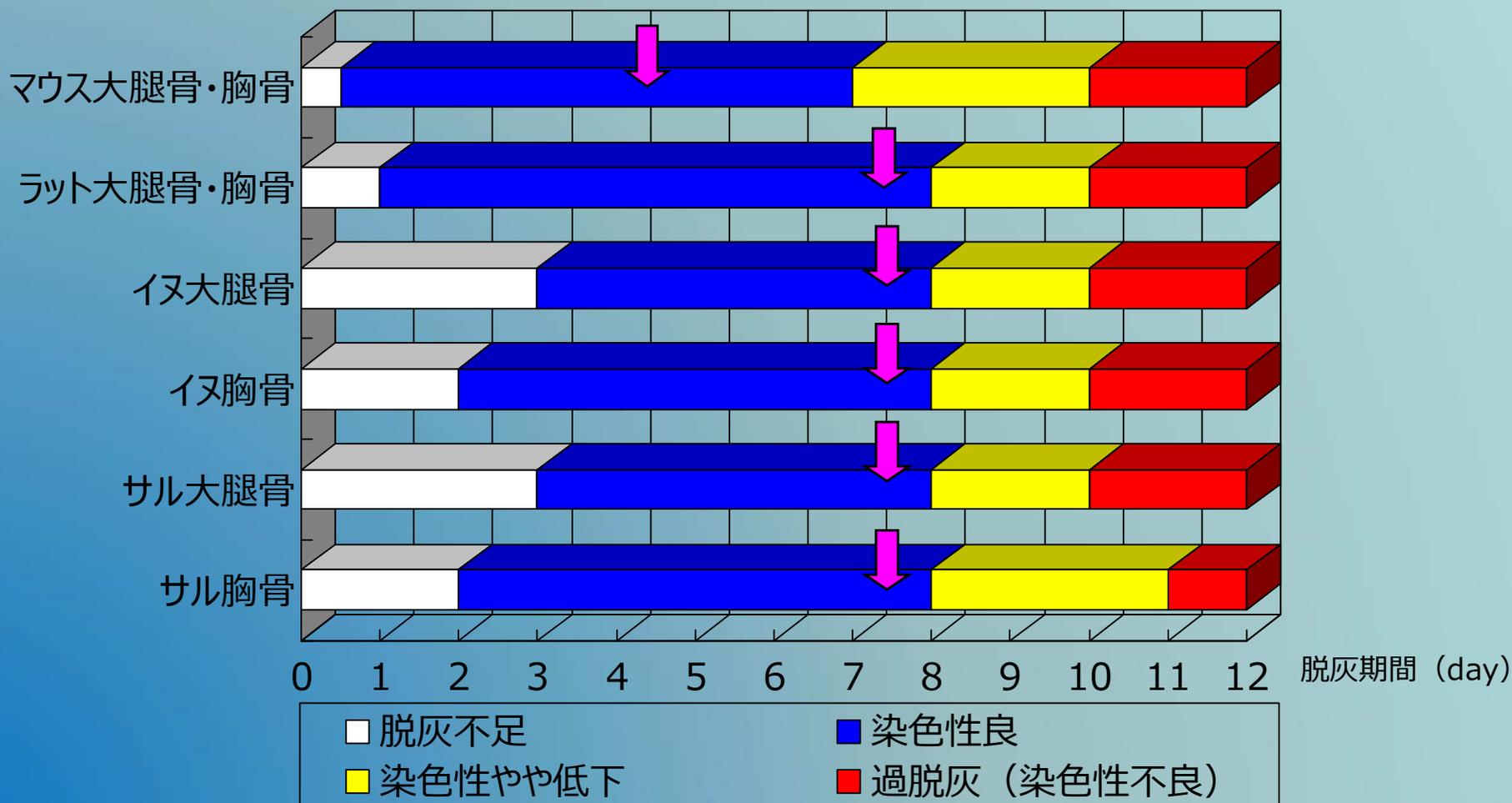
	蟻酸ホルマリン脱灰 (当施設)	K-CX AT脱灰
マウス	1日	0.5日
ラット	3日	1日
イヌ胸骨	7日	2日
イヌ大腿骨	12日	3日
サル胸骨	7日	2日
サル大腿骨	14日	3日



■ 特殊染色及び免疫組織化学染色

- ・ AB/PAS染色
- ・ サフラニンO染色
- ・ 抗PCNA免疫染色
- ・ 抗S-100/アルシアン青重染色（マウス以外）

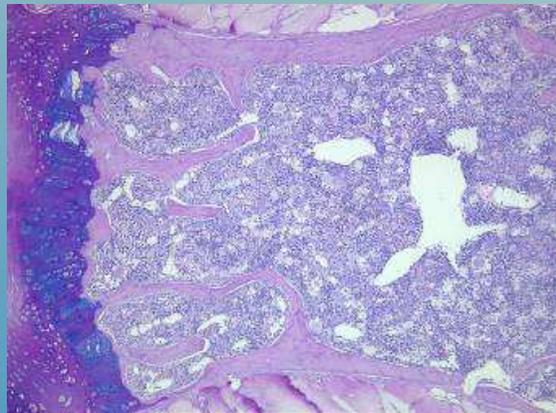
マウス: 4日
ラット・イヌ・サル: 7日



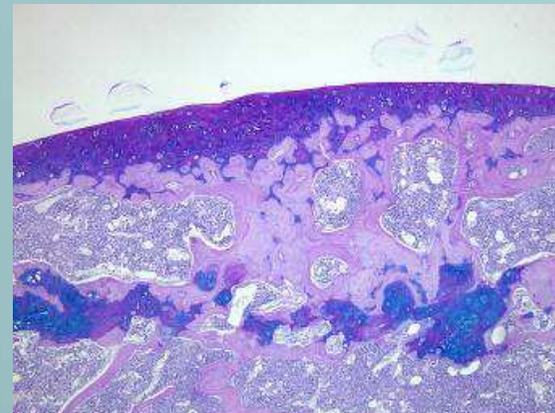


■ AB/PAS

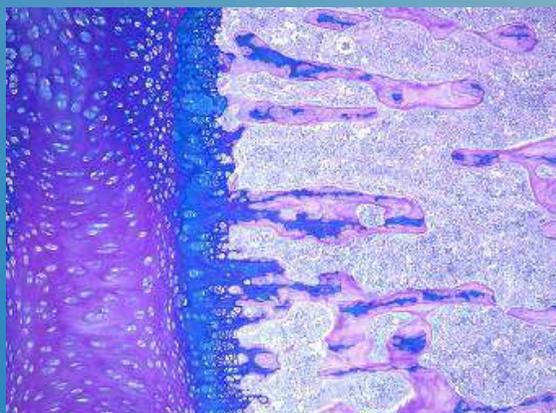
マウス胸骨



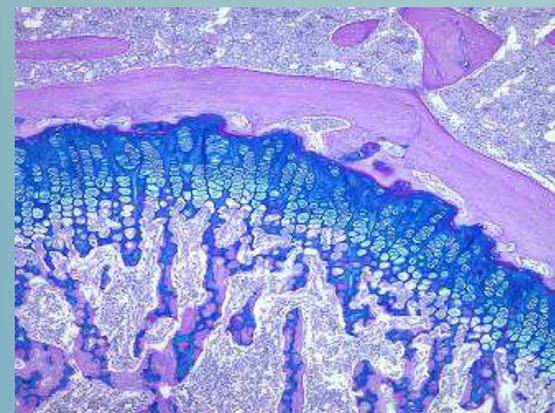
マウス大腿骨



ラット胸骨



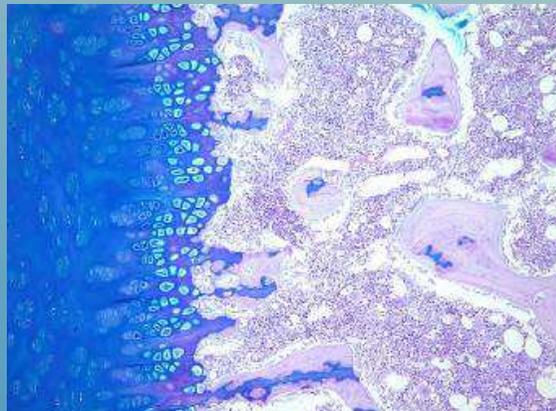
ラット大腿骨





■ AB/PAS

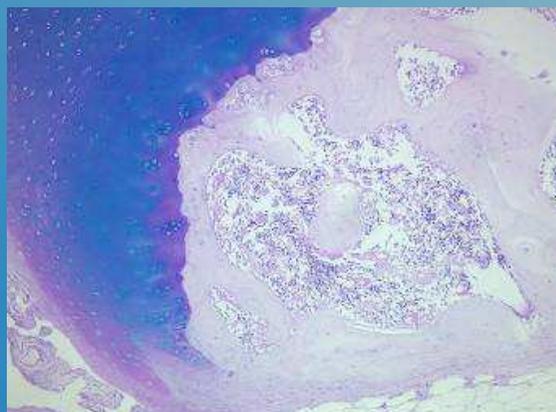
イヌ胸骨



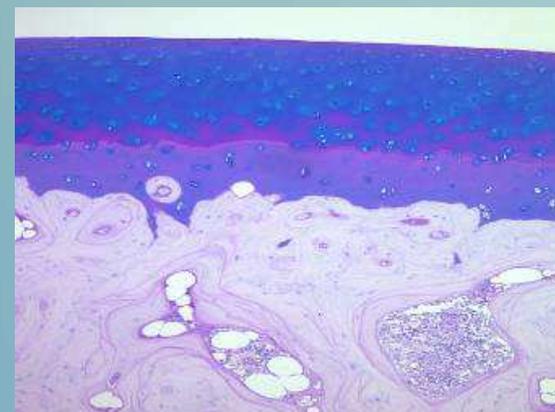
イヌ大腿骨



サル胸骨



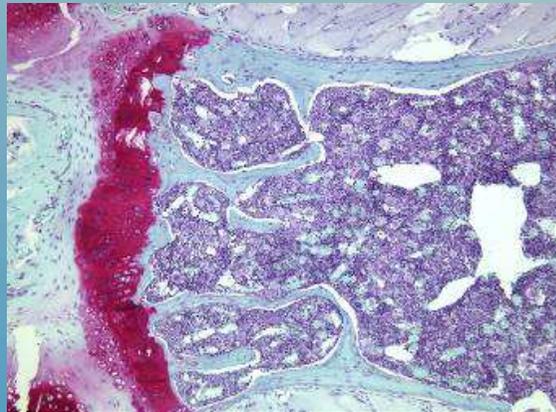
サル大腿骨



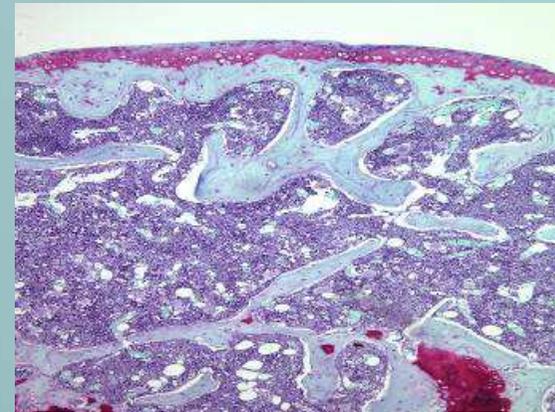


■ サフラニンO

マウス胸骨



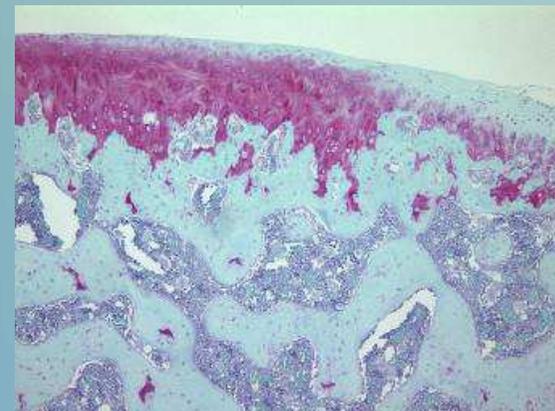
マウス大腿骨



ラット胸骨



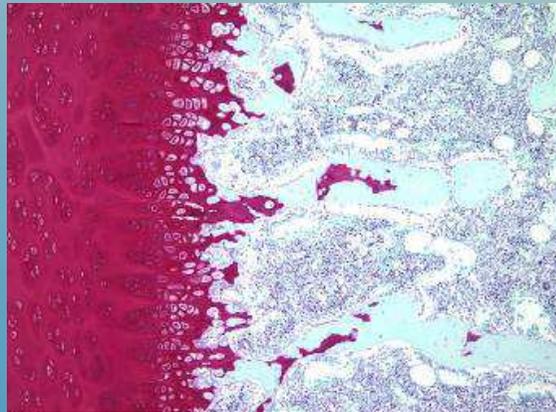
ラット大腿骨



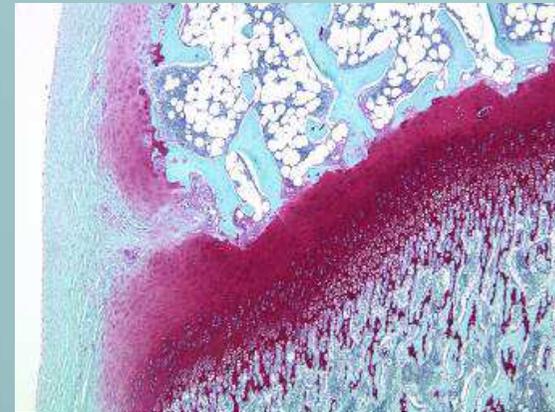


■ サフラニンO

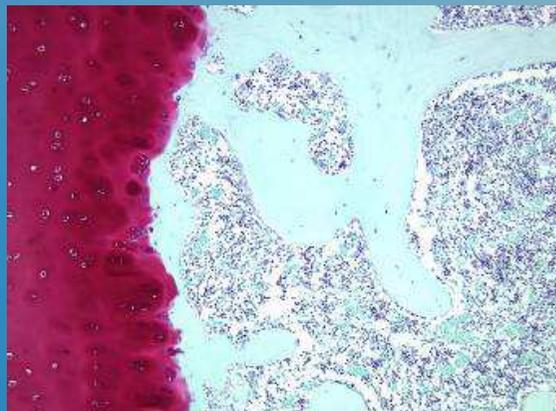
イヌ胸骨



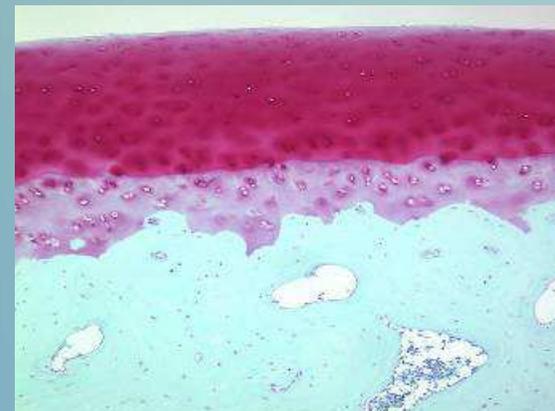
イヌ大腿骨



サル胸骨



サル大腿骨



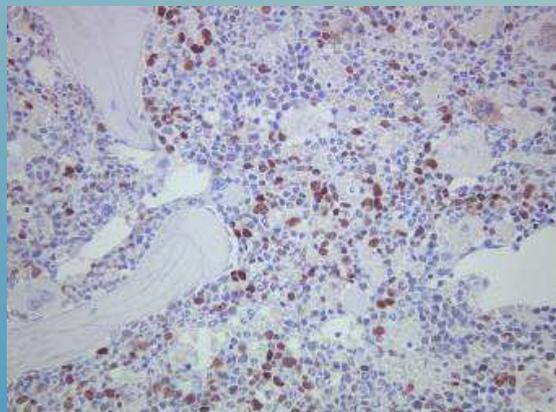


株式
会社

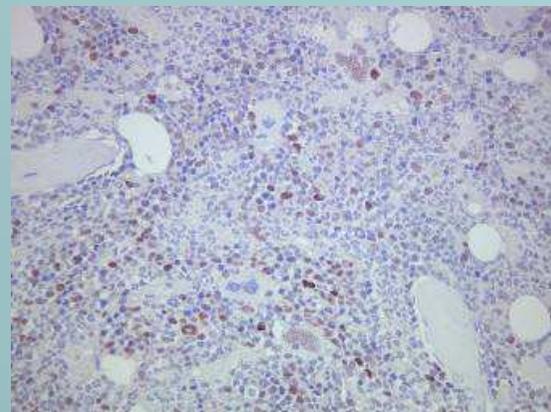
ボゾリサーチセンター

■ 抗PCNA免疫染色

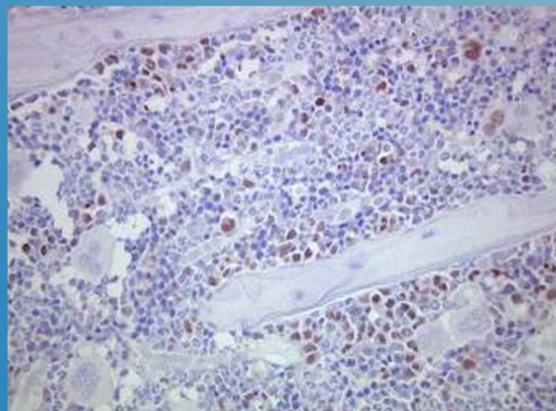
マウス胸骨



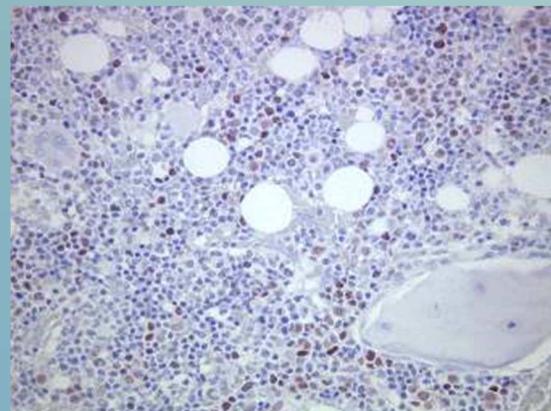
マウス大腿骨



ラット胸骨



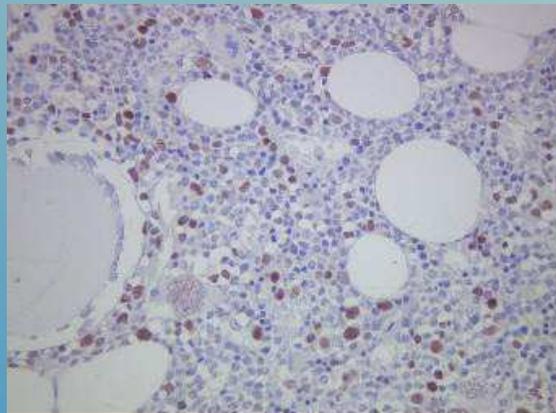
ラット大腿骨



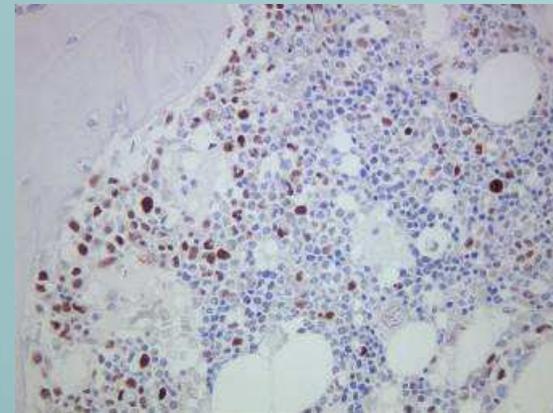


■ 抗PCNA免疫染色

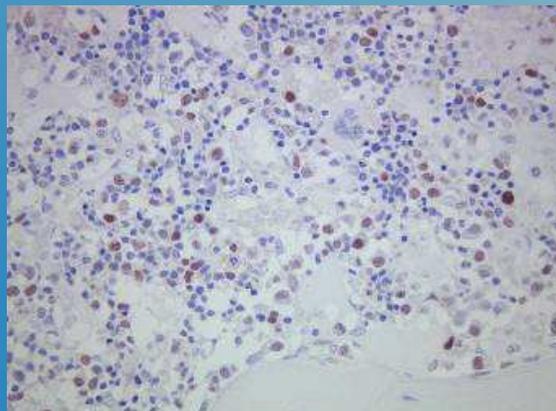
イヌ胸骨



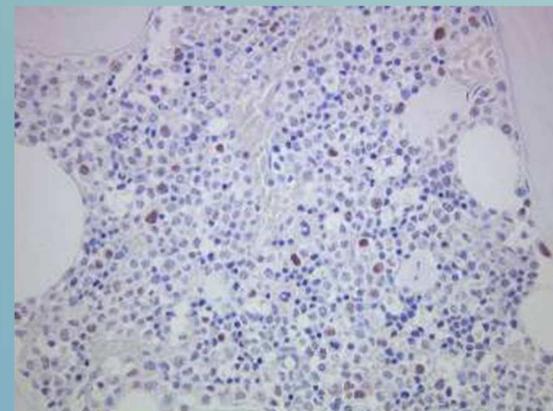
イヌ大腿骨



サル胸骨



サル大腿骨



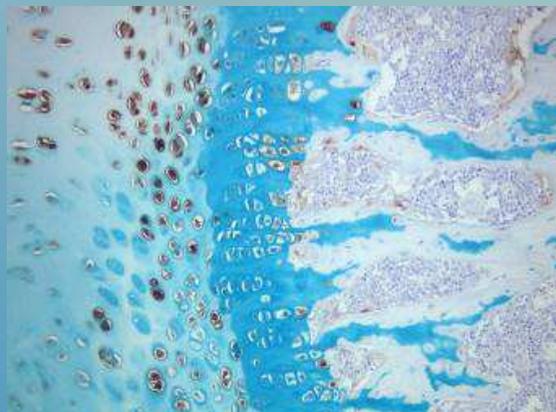


株式
会社

ボゾリサーチセンター

■ 抗S-100/アルシアン青重染色

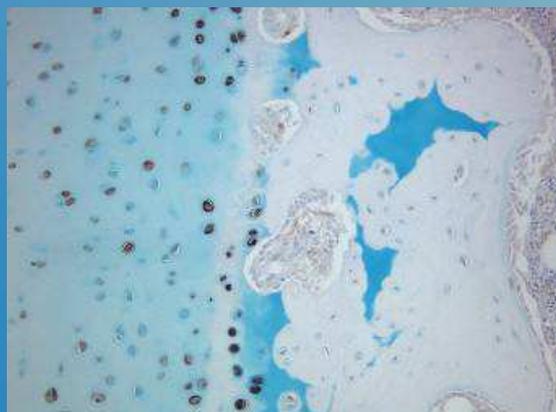
ラット胸骨



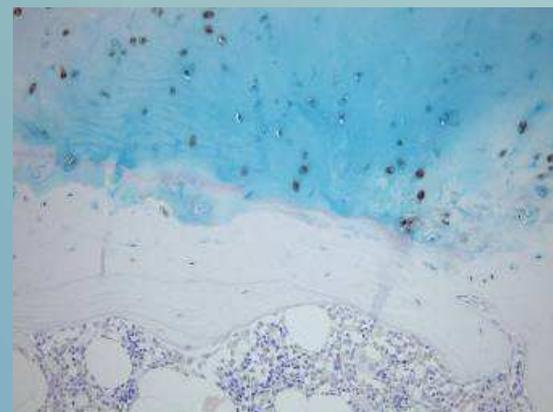
ラット大腿骨



イヌ大腿骨



サル大腿骨





結果

- アルシアン青・PAS染色、サフラニンO染色、抗PCNA免疫組織化学染色、抗S-100/アルシアン青重染色を実施した結果、K-CX AT脱灰液の影響による染色性の低下は見られず、良好な染色結果が得られた。



まとめ

- K-CX AT脱灰液による**低温脱灰**は、迅速に良質なH・E染色標本、特殊染色標本、免疫組織化学染色標本を作製できることが確認された。
- K-CX AT**室温脱灰**においても迅速脱灰は可能だが、室温は温度変動が著しく過脱灰を起こしやすいので、一定温度を保てる冷蔵庫での低温脱灰を推奨する。