

## 骨組織形態計測における骨標識の方法

### ■ はじめに

骨組織形態計測は、非脱灰硬組織標本の作製においても、実際の形態計測においても手間・時間・経験を必要とする評価方法です。それでも、この骨形態計測が必要とされる最大の理由は、予め骨標識剤を 2 回投与しておくことにより、一定時間内に骨芽細胞が骨を産生する「速度」という時間のファクターが導入できることにあります。骨石灰化速度、骨形成率といった骨の動的パラメータ群が求められることは、骨の代謝や病態を研究するために非常に有用かつ特徴的な手段となっています。

ここでは、この骨形態計測において動的パラメータを求めるために必要な骨標識について、動物への投与方法や骨標識剤の調製方法など、私たちの経験を中心にご紹介いたします。

### ■ 骨標識剤について

骨形態計測を目的とした骨標識剤は、カルシウムとキレート結合をし、紫外線などエネルギー光をあてると蛍光を発する化合物の性質を利用します。動物に投与された骨標識剤は、カルシウムと共に骨芽細胞に取り込まれ、蛍光色素が血中に存在した時間内に産生（石灰化）された新生骨は標識されます。数日後に摘出した骨から非脱灰標本を作製し蛍光顕微鏡で見ると、新生した石灰化骨が、骨標識剤に固有の蛍光を発する「線」（実際は面）として観察できます。この性質を利用して、骨標識剤を数日間あけて 2 回投与し、蛍光顕微鏡下で非脱灰骨組織標本中の蛍光標識の長さや、二重標識された幅を計測します。

代表的な骨標識剤は、カルセインとテトラサイクリンです。特にカルセインは、骨標識剤として褪色も少なく、20 年以上経った薄切標本でも十分蛍光を観察することができます。カルセインブルーやオキシテトラサイクリンといった構造の似た誘導体類も使えますが、蛍光顕微鏡のフィルターとの「相性」を確認しておく必要があります。

### ■ 投与間隔について

前述しましたが、骨形態計測の最大の特徴は、骨標識剤を 2 回投与し、新生骨に見られる 2 本の蛍光線の幅を投与間隔（時間）で割り返すことによって骨の形成「速度」が求められることです。そのために、骨標識剤の投与間隔と 2 回目投与以降の骨の摘出までの時間は適切でなければなりません。

成長期の動物は、骨形成も骨吸収も高いので、投与間隔を短めにします。また、病態モデル動物では、骨代謝回転が高いと予想される場合は投与間隔を短めに、逆に低いと予想される場合は長めの間隔にします。後半の各項では、私たちの経験から正常動物における投与間隔を挙げてありますが、病態モデル動物の場合は悩ましいものです。そんな時は、お気軽に私どもクレハ分析センターにご相談ください。

### ■ 投与方法について

投与方法は、骨標識線がシャープに観察される投与方法が望ましいので、短時間に血中濃度のピークをもたらす静脈内＞腹腔内＞（≒）筋肉内＞皮下の順と考えます。しかし、実験動物への投与のしやすさを考えると、とりわけ小動物では腹腔内(ip)投与か皮下(sc)投与でよいと思います。

（追記） マウスにカルセインを腹腔内投与した時に、骨標識されていなかったケースが過去にありました。これは腸管や膀胱に誤投与されたと推察されています。腹腔内投与のご経験がない場合は、皮下投与をお勧めしています。

### ■ 蛍光顕微鏡について

鏡検する際には、骨標識剤に適した励起フィルター・ダイクロイックミラー・蛍光フィルターを確認し、蛍光顕微鏡の蛍光ミラーユニットを選択する必要があります。カルセインとテトラサイクリンでしたら、お使いの顕微鏡メーカーに相談をすれば、最適のミラーユニットを紹介してくれます。ただし同じ標本で見ると、メーカーによって蛍光ミラーユニットに若干の差があるように思います。

現在、KSL の骨形態計測用システムは、カルセインとテトラサイクリンの蛍光ミラーユニットを用意しております。

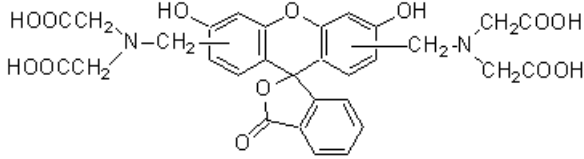
この2つ以外の骨標識剤を予定され、弊社に骨形態計測の依頼をお考えの場合は、事前の問い合わせをお願いします。

以降に、代表的な骨標識剤である、カルセインと塩酸テトラサイクリンの調製法と動物に投与する際の注意についてまとめておきました。もっと高濃度の骨標識剤を投与する報告もあります。投与量、投与間隔、投与方法はあくまで参考としてご利用ください。

## 1 カルセイン(calcein)

### 【試薬の情報】

カルセインは、非脱灰標本作製後も蛍光が強く褪色しにくいいため、骨形態計測を実施する点では大変有用です。動物実験では、2回標識のうち1回もしくは2回ともカルセインを用いることが殆どです。なお、ヒトに対しては安全性が確認されていないため用いることができません。カルセインは緑色の蛍光色として観察できます。

一般名	カルセイン(calcein)	
化学名:	Bis[ <i>N,N</i> -bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein	
CAS 番号:	1461-15-0	
分子式:	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	
分子量:	622.53	
国内メーカー	同仁化学研究所、東京化成、関東化学、ナカライテスク	

### 【カルセイン調製時の注意】

投与量は体重に比例させるので、動物種に応じ投与しやすい量を考慮して、調製濃度を決めています。カルセインは、水にはほとんど溶けず、アルカリによく溶けます。そのため、2%-炭酸水素ナトリウム(重曹)でアルカリ溶液を先に調製してから溶解させます。動物の体重から必要ボリュームを求め、そこから調製しやすい溶液量とカルセイン量を計算してください。

KSL では、作りやすい量で調製後、遮光(褐色)スクリーバイアルに分注し、凍結保存しています。投与時に解凍し、室温に戻してから使用します。当社では通常滅菌調製はしておりませんが、必要ならばフィルタ一滅菌で対応します。

### 【カルセイン投与時の注意】

2%重曹といえどもアルカリ溶液なので、筋肉内または皮下投与は動物に負荷がかかります。ラットに筋肉内 or 皮下投与した際には、穿刺部位を脚で掻き毟ろうとすることがあります。注入をゆっくりし過ぎると、もがき出して注射針が外れたこともありました。同じ部位に2回投与すると、解剖時その部位に炎症の後が見られたことがあります。もし皮膚を採取する予定がある場合は、その部位をはずしてカルセインの投与を行ってください。

皮下投与時、注射針を抜く際に、針をひねるように回しながら抜針すると、薬液漏れを防ぐことができます。

なお、カルセイン投与後は、動物の尿が着色します(オレンジ色蛍光色)。動物の採尿が必要な場合、カルセイン投与後は分析に影響を与える可能性がありますのでご注意ください。

【マウス用カルセインの調製】

	KSL 実施例	目安
調製濃度	8 mg/kg (bw)	0.8mg/mL 溶液を調製 例) : 2%炭酸水素ナトリウム水溶液 10mL にカルセイン 8mg を溶解。
投与量	マウス体重 10g 当り 0.1mL を sc または ip	25g のマウスなら、0.25mL を投与。
投与間隔	生後 3 ヶ月齢程度までは、 屠殺の 4 日前と 1 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 72 時間、 2 回目は屠殺前 24 時間
	生後 6 ヶ月以降は、 サンプリング 8 日前と 2 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 144 時間、 2 回目は屠殺前 48 時間

【ラット用カルセインの調製】

	KSL 実施例	目安
調製濃度	8 mg/kg (bw)	8 mg/mL 溶液を調製 例) : 2%炭酸水素ナトリウム水溶液 10mL にカルセイン 80mg を溶解。
投与量	ラット体重 100g 当り 0.1mL を sc または ip	300g のラットなら、0.3mL を投与。
投与間隔	生後 3 ヶ月齢程度までは、 屠殺の 5 日前と 1 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 96 時間、 2 回目は屠殺前 24 時間
	生後 6 ヶ月以降は、 サンプリング 10 日前と 3 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 168 時間、 2 回目は屠殺前 72 時間

【ウサギ用カルセインの調製】

	KSL 実施例	目安
調製濃度	8 mg/kg (bw)	8 mg/mL 溶液を調製 例) : 2%炭酸水素ナトリウム水溶液 100mL にカルセイン 800mg を溶解。
投与量	ウサギ体重 1kg 当り 1mL を sc	4kg のウサギなら、4.0mL を投与。
投与間隔 (ラットに準ずる)	生後 3 ヶ月齢程度までは、 屠殺の 5 日前と 1 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 96 時間、 2 回目は屠殺前 24 時間
	生後 6 ヶ月以降は、 サンプリング 10 日前と 3 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 168 時間、 2 回目は屠殺前 72 時間

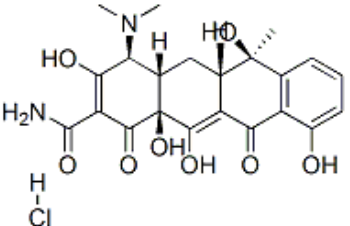
【イヌ用カルセインの調製】

	KSL 実施例	目安
調製濃度	8 mg/kg (bw)	16mg/mL 溶液を調製 例) : 2%炭酸水素ナトリウム水溶液 100mL にカルセイン 1,600~2,000mg を溶解。
投与量	イヌ体重 1kg 当り 0.5mL を sc	10kg のイヌなら、5.0mL を投与。
投与間隔	生後 3 ヶ月齢程度までは、 屠殺の 10 日前と 3 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 168 時間、 2 回目は屠殺前 72 時間
	生後 6 ヶ月以降は、 サンプリング 14 日前と 7 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 168 時間、 2 回目は屠殺前 168 時間

## 2 テトラサイクリン(tetracycline)

### 【試薬の情報】

テトラサイクリンの蛍光色は黄色のため、動物の骨形態計測ではカルセインと組み合わせて、1 回目と 2 回目の骨標識を識別することができます。(ヒトにはカルセインは使えません。)

一般名	テトラサイクリン塩酸塩 (Tetracycline Hydrochloride)	
化学名:	(4S,4aS,5aS,6S,12aS) -4-Dimethylamino-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydrotetracene-2-carboxamide monohydrochloride	
CAS 番号:	64-75-5	
分子式:	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ·HCl	
分子量:	480.90	
国内メーカー	関東化学、和光純薬、ナカライテスク	

テトラサイクリンは試薬として購入できますが、動物用医薬品のオキシテトラサイクリン注射液を使うこともできます。現在、医療用医薬品として、テトラサイクリンやオキシテトラサイクリンの注射剤は販売されていない模様です。

(参考: ヒトでは骨生検をする前に医薬品のテトラサイクリン系抗生物質を標識 1 回につき、1 日 750-1000mg(3-4cap.分服) × 2 日経口で服用とすることが多い。)

### 【テトラサイクリン調製時の注意】

カルセインと異なり、生理食塩水か蒸留水に溶解させます。用時調製で扱い、必要量を調製してください。(できれば遮光瓶で)。凍結保存はしていません。

次表の投与量が 20~30 mg/kg(bw)と幅を持たせているのは、テトラサイクリンは褪色しやすいことを考慮しています。特に薄切標本の場合、厚みが薄いほど褪色が早いため、薄い標本の場合はご注意ください。

また、ここでは塩酸テトラサイクリンで記載しておりますが、類縁のテトラサイクリン系抗生物質も骨標識剤として利用可能です。ただし、蛍光観察時の色が異なりますのでご利用の際は、文献等でご確認の上、ご利用ください。

### 【テトラサイクリン投与時の注意】

テトラサイクリンは抗生物質のため、多量の投与によって下痢をきたすことがあります。

【マウス用テトラサイクリンの調製】

	KSL 実施例	目安
調製濃度	20~30 mg/kg (bw)	2~3 mg/mL 溶液を調製 例) : 生理食塩水 10mL に 塩酸テトラサイクリン 20~30mg を溶解。
投与量	マウス体重 10g 当り 0.1mL を sc または ip	25g のマウスなら、0.25mL を投与。
投与間隔	生後 3 ヶ月齢程度までは、 屠殺の 4 日前と 1 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 72 時間、 2 回目は屠殺前 24 時間
	生後 6 ヶ月以降は、 サンプリング 8 日前と 2 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 144 時間、 2 回目は屠殺前 48 時間

【ラット用テトラサイクリンの調製】

	KSL 実施例	目安
調製濃度	20~30 mg/kg (bw)	20~30 mg/mL 溶液を調製 例) : 生理食塩水 10mL に 塩酸テトラサイクリン 200~300mg を溶解。
投与量	ラット体重 100g 当り 0.1mL を sc または ip	300g のラットなら、0.3mL を投与。
投与間隔	生後 3 ヶ月齢程度までは、 屠殺の 5 日前と 1 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 96 時間、 2 回目は屠殺前 24 時間
	生後 6 ヶ月以降は、 サンプリング 10 日前と 3 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 168 時間、 2 回目は屠殺前 72 時間

【ウサギ用テトラサイクリンの調製】

	KSL 実施例	目安
調製濃度	20~30 mg/kg (bw)	20~30 mg/mL 溶液を調製 例) : 生理食塩水 100mL に 塩酸テトラサイクリン 2,000~3,000mg を溶解。
投与量	ウサギ体重 1kg 当り 1mL を sc	4kg のウサギなら、4.0mL を投与。
投与間隔 (ラットに準ずる)	生後 3 ヶ月齢程度までは、 屠殺の 5 日前と 1 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 96 時間、 2 回目は屠殺前 24 時間
	生後 6 ヶ月以降は、 サンプリング 10 日前と 3 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 168 時間、 2 回目は屠殺前 72 時間

【イヌ用テトラサイクリンの調製】

	KSL 実施例	目安
調製濃度	20~30 mg/kg (bw)	40~60mg/mL 溶液を調製 例) : 生理食塩水 100mL に 塩酸テトラサイクリン 4,000~6,000mg を溶解。
投与量	イヌ体重 1kg 当り 0.5mL を sc	10kg のイヌなら、5.0mL を投与。
投与間隔	生後 3 ヶ月齢程度までは、 屠殺の 10 日前と 3 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 168 時間、 2 回目は屠殺前 72 時間
	生後 6 ヶ月以降は、 サンプリング 14 日前と 7 日前に投与。	1 回目と 2 回目の間隔は 168 時間、 2 回目は屠殺前 168 時間

2012 年 8 月作成