

**病理研究用**  
**(酒石酸耐性酸性ホスファターゼ及び**  
**アルカリホスファターゼの酵素活性染色用)**  
**TRAP/ALP 染色キット**

**【はじめに】**

正常な骨代謝は骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収のバランスの上に成り立っていますが、このバランスが崩れ、破骨細胞の骨吸収が異常に亢進すると骨量が低下し、骨粗鬆症につながります。そのため、破骨細胞と骨芽細胞の代謝メカニズムを理解し、これらの疾患の治療や有効な薬剤の開発に役立てるため、様々な研究が行われております。現在、骨芽細胞のマーカー酵素としてはアルカリホスファターゼ (ALP) が、破骨細胞のマーカー酵素としては酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) が知られており、組織切片あるいは培養細胞における、骨芽細胞、破骨細胞の存在を示す一つの指標として用いられております。本キットは、骨組織切片及び培養骨細胞の ALP・TRAP 酵素活性を利用し、組織ならびに培養細胞中の骨芽細胞や破骨細胞の染色像を観察する事により、細胞の分化状態や、骨組織における分布を調べる事が可能です。

**【特長】**

- 使用時に3つの溶液を混合するだけで、酒石酸耐性酸性ホスファターゼの酵素活性染色に必要な発色基質液が調製できます。(酒石酸感受性酸性ホスファターゼを含む酸性ホスファターゼの酵素活性染色を行う場合は、酒石酸溶液を除く2液を混合します。)
- アルカリホスファターゼの酵素活性染色はプレミックス基質液を使用し、簡単に行うことができます。
- 酸性ホスファターゼの活性部位を赤紫色に、アルカリホスファターゼの活性部位を青味がかった茶色に2重染色することができます。
- 培養細胞、骨組織切片 (GMA 樹脂包埋切片) について使用することができます。

**【キット内容】**

(1)	酒石酸溶液 (× 10)	3mL	1 本
(2)	酸性ホスファターゼ基質液 A	30mL	1 本
(3)	酸性ホスファターゼ基質液 B	0.3mL	1 本
(4)	核染色試薬	10mL	1 本
(5)	アルカリホスファターゼ プレミックス基質液	30mL	1 本

- (備考) 1. 本品は培養細胞では24ウェルマルチプレート5回用、96ウェルマルチプレート6回用、骨組織スライド (1スライドあたり500 $\mu$ L使用として)で60枚用に相当します。
2. 開封前後の取り扱い注意  
 開封前は-20℃保存、開封後は下記の取り扱いをして下さい。  
 ①酒石酸溶液 (× 10)、酸性ホスファターゼ基質液 A、酸性ホスファターゼ基質液 B は開封後も必ず-20℃で保存して下さい。  
 酸性ホスファターゼ基質液 A は凍結融解を繰り返すうちに、若干の沈殿を生じる場合がありますが、そのような場合は約0.2 $\mu$ mのフィルターで、ろ過して使用して下さい。  
 ②核染色試薬とアルカリホスファターゼ プレミックス基質液は解凍後、軽く攪拌し、2~10℃で保存して下さい。

**【操作方法】**

**1. [骨組織切片の ALP 及び TRAP 酵素活性の染色]**  
**非脱灰骨 GMA 包埋薄切標本を用いた染色例**

## [標本の準備]

非脱灰骨 GMA 包埋薄切標本 (2 $\mu$ m 厚) シランコーティングスライド貼付

## [操作前の注意点]

- \* TRAP 染色と ALP 染色の2重染色を行う場合は、最初に TRAP 染色を行い、顕微鏡で観察した後、ALP 染色を行って下さい。
- \* 場合によっては核染色により TRAP 染色像、ALP 染色像が見にくくなる場合がありますので、核染色の前に一度、顕微鏡で観察することをお薦めします。

## [キット以外に準備する試薬、機材]

- ・蒸留水
- ・0.1mol/L AMPD-HCl buffer (pH 9.4) (切片で TRAP 染色の後、ALP 染色を行う場合)  
 AMPD: 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール (015-06411)
- ・キシレン
- ・封入剤 (非水溶性)
- ・光学顕微鏡
- ・湿潤箱などの容器
- ・コプリンジャー (スライド洗浄)
- ・37℃伸張器
- ・マイクロピペット
- ・メスピペット
- ・ビーカーまたはチューブなどの容器
- ・カバースリップ
- ・カバーガラス

## [操作]

- 標本を水洗します。
- TRAP 染色液を調製します。  
 \* 使用時ごとに下記の割合で調製し、調製後の溶液は保存しないで下さい。  

酒石酸溶液 (× 10)	1mL
酸性ホスファターゼ基質液 A	9mL
酸性ホスファターゼ基質液 B	0.1mL

 \* 調製した染色液に析出物が見られる場合は、軽く遠心し析出物を沈殿させ、上清を用いて下さい。
- 室温の湿潤箱で染色液を各切片に0.5mLずつ上乘せし、30分間室温で静置します。  
 \* 発色時間はサンプル中に含まれる酒石酸耐性酸性ホスファターゼの量や活性により変化します。顕微鏡で観察しながら適度な状態で、反応を停止して下さい。ただし、あまり長時間反応させると反応物の沈殿や、破骨細胞以外の細胞に対する非特異的反応が起こる可能性がありますので、ご注意下さい。
- コプリンジャー3つに切片が十分に浸る量の蒸留水を用意し、各1分間ずつ洗浄します。
- コプリンジャーに切片が十分に浸る量の、0.1mol/L AMPD-HCl buffer (pH 9.4) を用意し、10分間静置します。
- スライドの余分な水分を除去します。
- アルカリホスファターゼプレミックス基質液0.5mLを各切片に上乘せし、室温の湿潤箱で30分間静置します。  
 \* 発色時間はサンプル中に含まれるアルカリホスファターゼの量や活

性により変化します。顕微鏡で観察しながら適度な状態で、反応を停止して下さい。

- (8) コプリンジャー 3つに切片が十分に浸る量の蒸留水を用意し、各1分間ずつ洗浄します。
- (9) コプリンジャーに切片が十分に浸る量の蒸留水を用意し、核染色試薬 0.5mLを切片に上乗せします。4~5秒したら、すぐに蒸留水中にて切片を上下させ、水洗します。  
(核染色の工程は、染色液を上乗せした後、直ちに洗浄しますので、複数の切片を染色される際は、一枚ずつ、染色と洗浄の工程を繰り返すことをお勧めします。)
- (10) コプリンジャーに切片が十分に浸る量の蒸留水を用意し、洗浄します。
- (11) 37℃の伸展器上で切片を乾燥させます。
- (12) コプリンジャーに切片が十分に浸る量のキシレンを用意し、切片を浸します。
- (13) 封入剤で封入し、観察します。

染色写真および染色法の提供元：河原 元 先生

マウス 脊椎骨 非脱灰 GMA 樹脂包埋 2ミクロン切片



## 2. [培養細胞の ALP 及び TRAP 酵素活性の染色]

### 24 ウェルプレートで培養した培養細胞の染色例

#### [操作前の注意点]

- \* TRAP 染色と ALP 染色の2重染色を行う場合は、最初に TRAP 染色を行い、顕微鏡で観察した後に、ALP 染色を行って下さい。
- \* 場合によっては核染色により TRAP 染色像、ALP 染色像が見にくくなる場合がありますので、核染色の前に一度、顕微鏡で観察することをお勧めします。
- \* 細胞の固定法、透過処理はこの限りではありません。特に問題が生じなければ、ご使用中のサンプルに適した固定、透過処理を行うこともできます。

#### [キット以外に準備する試薬、機材]

- ・蒸留水
- ・D-PBS (-) (洗浄用)
- ・固定液：37%ホルムアルデヒド溶液を、2~10℃で冷した PBS で 1/10 に希釈し、氷上に置いて下さい。(※固定液は使用前に用時調製して下さい。)

- ・透過液：エタノール / アセトン (50 : 50v/v)
- ・37℃インキュベーター
- ・光学顕微鏡
- ・マイクロピペット
- ・マイクロチューブ

#### [操作]

24 穴プレートにて細胞を培養する。

#### [細胞の固定]

- (1) 培養液を取り除き、すみやかに PBS を 3mL 加え軽く細胞をリンスします。
- (2) 加えた PBS を取り除き、予め冷やしておいた固定液 500  $\mu$ L を細胞が剥がれない様に、ゆっくりと加え、氷上に 10 分間静置します。(以降の作業は室温で行って下さい。)
- (3) 固定液の入ったウェルに PBS を 2mL 加え、固定液を希釈します。
- (4) ウェルの液を取り除き、PBS を 2mL 加えます。この操作をさらに 2 度繰り返します。

#### [透過処理]

- (5) PBS を除き、透過液を 500  $\mu$ L 加え、-30℃~-20℃で 1 分間インキュベートします。
- (6) ウェルの溶液を静かに取り除き、PBS を 2mL 加えます。この操作をさらに 2 度繰り返します。

#### [TRAP 染色液の調製]

サンプルの数に合わせて、各試薬を下記の割合で、使用前に調製して下さい。

\* 使用時ごとに下記の割合で調製し、調製後の溶液は保存しないで下さい。

酒石酸溶液 (× 10)	100 $\mu$ L
酸性ホスファターゼ基質液 A	900 $\mu$ L
酸性ホスファターゼ基質液 B	10 $\mu$ L

24 ウェルマルチプレート：250  $\mu$ L/well, 96 ウェルマルチプレート：50  $\mu$ L/well, スライド 1 枚あたり 500  $\mu$ L

#### [TRAP 染色]

- (7) 調製した TRAP 染色液 250  $\mu$ L を各ウェルに加え、蓋をして乾燥を防ぎ 37℃のインキュベーターで 15分~45分間反応させます。  
\* 発色時間はサンプル中に含まれる酒石酸耐性酸性ホスファターゼの量や活性により変化します。顕微鏡で観察しながら適度な状態で、反応を停止して下さい。ただし、あまり長時間反応させると反応物の沈殿や、破骨細胞以外の細胞に対する非特異的反応が起こる可能性がありますので、ご注意下さい。
- (8) ウェルに蒸留水を 2mL 加え、反応液を希釈します。
- (9) ウェルの液を取り除き、蒸留水を 2mL 加えます。この操作をさらに 2 度繰り返します。
- (10) 必要な場合は余分な水分を除き、ALP 染色または核染色に進んで下さい。

#### [ALP 染色]

- (11) アルカリホスファターゼプレミックス基質液 250  $\mu$ L をウェルに加え、蓋をして乾燥を防ぎ 37℃のインキュベーターで 15分~45分間反応させます。  
\* 発色時間はサンプル中に含まれるアルカリホスファターゼの量や活性により変化します。顕微鏡で観察しながら適度な状態で、反応を停止します。

- (12) ウェルに蒸留水を2mL加え、反応液を希釈します。  
 (13) 溶液を取り除き、再度ウェルに蒸留水を2mL加えます。この操作をさらに3度繰り返します。  
 (14) 必要な場合は余分な水分を除き、核染色に進んで下さい。

**【核染色】**

- (15) 核染色試薬 250 $\mu$ L をウェルに加え、室温で5～15分程度染色します。(染色時間はあくまで目安です。お手持ちのサンプルに適した時間で染色を行って下さい)  
 (16) ウェルに蒸留水を2mL加え、核染色試薬液を希釈します。  
 (17) 溶液を取り除き、再度ウェルに蒸留水を2mL加えます。この操作をさらに2度繰り返します。  
 ウェルに加えた蒸留水が透明になるまで続けて下さい。

**【観察】**

- (18) サンプルが乾燥した場合はサンプルに蒸留水を滴下して観察して下さい。

**【染色結果の一例】**

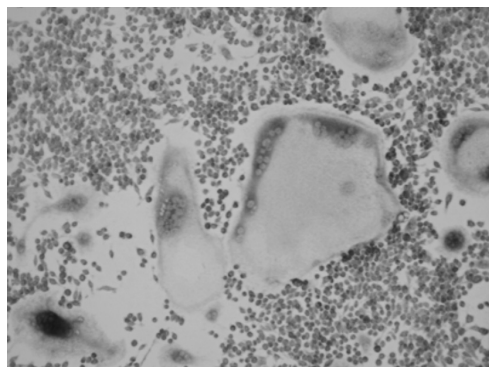


図1 RAW264細胞の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性染色

RAW264細胞 (Mouse leukemic monocyte 由来の細胞株、破骨細胞様細胞に分化する) を sRANKL 存在下で培養し、培養6日目に中性ホルマリンによる固定、エタノール/アセトン (50:50v/v) による透過処理を行った後、TRAP染色を行った。

TRAP positive で、多核の破骨細胞様細胞が観察された。

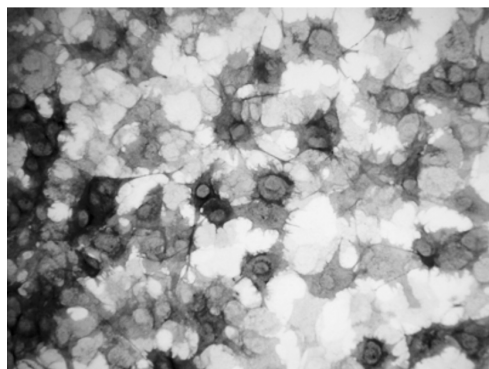


図2 MC3T3-E1細胞のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性染色

MC3T3-E1細胞 (Mouse calvaria 由来の細胞株、骨芽細胞に分化する) を BMP-2 存在下で培養し、培養7日目にエタノール/アセトン (50:50v/v) による透過処理を行った後、ALP染色を行った。

本品は培養細胞では24ウェルマルチプレート5回用、96ウェルマルチプレート6回用、骨組織スライド (1スライドあたり500 $\mu$ L使用として) で60枚用に相当します。

**【使用期限】**

製造後24ヶ月 (ラベルに記載)

**【保存条件】**

開封前 -20 $^{\circ}$ C

**【開封後の取り扱い注意】**

- ① 酒石酸溶液 ( $\times 10$ )、酸性ホスファターゼ基質液 A および酸性ホスファターゼ基質液 B は開封後も必ず -20 $^{\circ}$ C で保存して下さい。  
 \* 酸性ホスファターゼ基質液 A は凍結融解を繰り返すうちに、若干の沈殿を生じる場合がありますが、そのような場合は約 0.2 $\mu$ m のフィルターで、ろ過して使用して下さい。  
 ② 核染色試薬とアルカリホスファターゼ プレミックス基質液は解凍後、軽く搅拌し、2～10 $^{\circ}$ C で保存して下さい。

**【参考文献】**

1. 河原 元：「硬組織標本作製法」, 検査と技術, **29**, 1169 (2001).

製造発売元

**富士フイルム 和光純薬株式会社**

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741