

原著論文

ハイドロキシアパタイト沈着症の関節液診断に向けた アリザリン赤 S 染色の重染色技術の検討

蜂須賀 大輔

鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 臨床検査学科

キーワード： 関節液, ハイドロキシアパタイト, アリザリン赤 S 染色, ライト緑染色, RGB ヒストグラム

要 旨

結晶誘発性関節炎はリウマチ性疾患である痛風（尿酸ナトリウム結晶）、偽痛風（ピロリン酸カルシウム結晶）が最も多い疾患であるが、ハイドロキシアパタイト結晶（Hydroxyapatite crystal; HA 結晶）はこの病態に寄与することは稀である。HA 結晶は簡易偏光顕微鏡下で特徴的な複屈折性を持たないため、正確な評価が困難である。HA 沈着症同定法であるアリザリン赤 S 染色はびまん性に染色される傾向があるためしばしば鑑別が困難となる。本研究では、アリザリン赤 S 染色にライト緑染色、トルイジン青染色およびピクリン酸染色を追加染色し検討した。RGB ヒストグラムを用いた画像解析から、ライト緑染色の追加染色が HA 結晶、白血球、背景の間に明瞭なコントラストを与えることがわかった。このことから、アリザリン赤 S 染色にライト緑染色を追加染色することで HA 結晶の鑑別が安易になる為、有用な染色法である。

1. 目的

結晶誘発性関節炎は結晶成分が原因で引き起こす関節炎であり、特に臨床上重要とされている尿酸ナトリウム結晶 (Sodium urate crystal; MSU 結晶) やピロリン酸カルシウム結晶 (Calcium pyrophosphate dihydrate crystal; CPPD 結晶) は痛風や偽痛風の原因結晶と言われている¹⁾。稀に関節液中から出現するハイドロキシアパタイト結晶 (Hydroxyapatite crystal; HA 結晶) は、HA 沈着症や変形性関節症などを引き起こし、特に透析患者は血中カルシウムやリン酸塩のコントロールが必要となることから結晶同定の意義は高い^{2, 3)}。HA 結晶は電子顕微鏡による同定やアリザリン赤 S 染色法 (Alizarin Red S) による簡易同定が必要である^{2, 4)}。アリザリン赤 S 染色は HA 結晶と白血球の色調のコントラストが弱い為、鑑別が困難となる⁵⁾。これらの問題点を解決するために、本研究ではハイドロキシアパタイト沈着症同定染色法アリザリン赤 S 染色に追加染色を実施し最も有用な染色方法を検討した。

2. 方法

(1) 対象

HA 結晶を含有したヒト関節液検体を用い、陽性コントロールとしてマウス的大腿骨 (ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本) を使用した (実験動物承認番号: 修文大学 30)。なお、本研究は倫理委員会の審査に該当しないとされた。

(2) セルブロック作製⁶⁾

関節液 10 mL に対してヘパリンナトリウム (陽進堂) を 1 mL 混和し、綿棒チューブ (アジア器材) に分注した。25°C, 2,000 g, 5 分間遠心した後にスポイトにて上清を除去し沈渣を作製した。10% 中性緩衝ホルマリン (健栄製薬) 7 mL を重層し、25°C, 12 時間固定を行った。ホルマリン固定された検体を自動包埋装置エクセルシア ES (Thermo Scientific) にてパラフィン浸透操作を実施後、セ

ルブロックを作製した。

(3) パラフィン切片作製

作製された HA 結晶セルブロックをライカ SM2010R 滑走式マイクローム (Leica) にて 3 μ m のパラフィン切片を作製した。

(4) 染色方法

薄切標本をそれぞれ 3 槽のキシレンにて 5 分間脱パラフィンを実施し、100% エタノール, 95% エタノール, 70% エタノールにてそれぞれ 3 分間脱キシレンを行った。対比染色はアリザリン赤 S 染色を強調させる緑色, 青色及び黄色の色調をもつ染色液としてライト緑溶液, トルイジン青溶液及びピクリン酸溶液を採用した。特殊染色はアリザリン赤 S 染色, アリザリン赤 S- ライト緑染色, アリザリン赤 S- トルイジン青染色及びアリザリン赤 S- ピクリン酸染色の 4 種類を Figure 1 の手順にて実施した。また陽性コントロールとしてマウス的大腿骨のパラフィン切片も同時に染色した。

i) アリザリン赤 S 染色

標本を精製水水洗し、1% アリザリン赤 S 染色液 (武藤化学) で 5 分間染色した。精製水水洗後にカバーリングを行った。

ii) アリザリン赤 S- ライト緑染色

標本を精製水水洗し、1% アリザリン赤 S 染色液で 5 分間染色を行った後、ライトグリーン液 (富士フィルム和光純薬) で 1 分間染色した。精製水水洗し、カバーリングを行った。

iii) アリザリン赤 S- トルイジン青染色

標本を精製水で水洗し、1% アリザリン赤 S 染色液を 5 分間染色後、精製水水洗を行った。次に pH4.1 0.05% トルイジン青 (関東化学) で 10 分間染色しカバーリングを行った。

iv) アリザリン赤 S- ピクリン酸染色

標本を精製水で水洗後、1% アリザリン赤 S 染色液で 5 分間染色し、精製水水洗を行った。飽和ピクリン酸溶液（富士フィルム和光純薬）にて 5 分間染色しカバーリングを行った。

(5) 光学顕微鏡による染色陽性率

各染色法にて染色した HA 結晶標本を光学顕微鏡 BX53（OLYMPUS）にて 400 倍で全視野観察した。HA 結晶を認めた 5 視野で観察された HA 結晶の染色陽性率を算出した。

(6) RGB ヒストグラムを用いた染色性の画像解析

各染色方法にて染色した HA 結晶標本の HA 結晶、白血球及び背景を含んだ 5 視野を抽出した。HA 結晶、白血球及び背景それぞれを画像解析ソフト Fiji-win64（RGB ヒストグラム）による染色強度の比較検討を行った。

(7) 統計解析

統計解析は JMP software ver. 14.2.0(SAS Institute) を使用し、2 群間の差はフィッシャーの正確度検定で解析した。 $p<0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した。

3. 結 果

(1) 光学顕微鏡下による染色陽性率

各染色性の結果を Figure 2 に示した。陽性コントロールは各染色法にてカルシウム成分が適切に染色されていた。アリザリン赤 S 染色の 5 視野当たりの結晶成分の染色陽性率は、95.5%（233/244）であった。アリザリン赤 S- ライト緑染色は 94.6%（261/276），アリザリン赤 S- トルイジン青染色は 96.9%（277/286），アリザリン赤 S- ピクリン酸染色は 0%（0/31）となった。陽性率が最も高かった染色方法は、アリザリン赤 S- トルイジン青染色であり、最も染色率が低かった染色方法はアリザリン赤 S- ピクリン酸染色であった。アリザリン赤 S- ライト緑染色及びアリザリン赤 S- トルイジン青染色はアリザリン赤 S 染色と比較して有意差はなかった。一方、アリザリン赤 S-

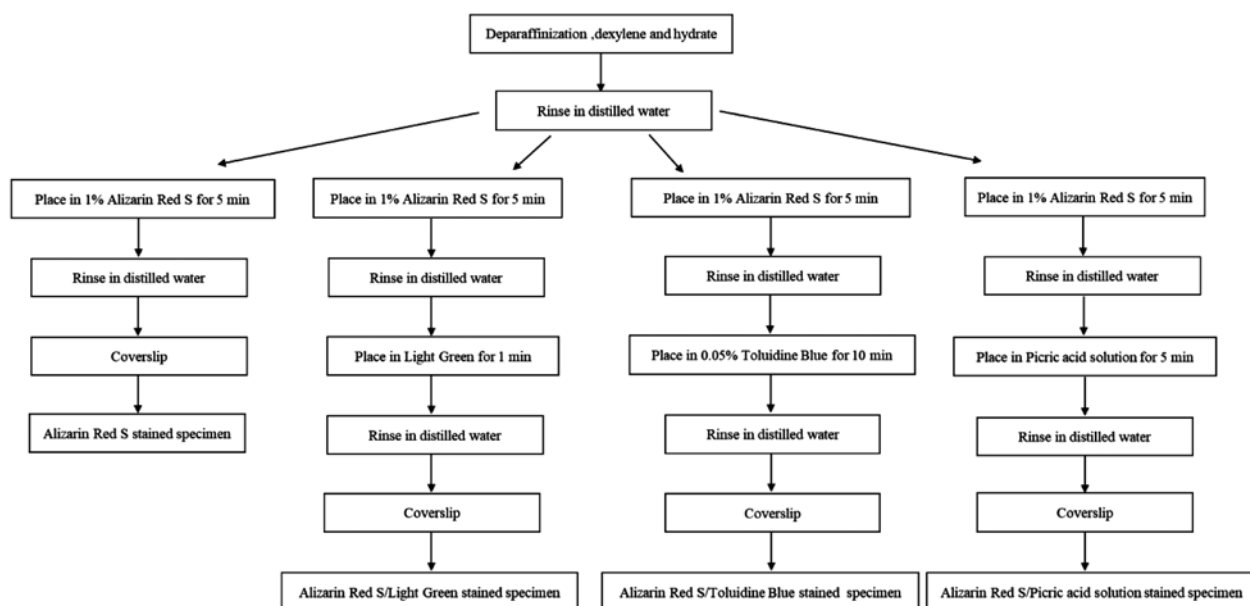


Figure 1 Staining procedures

ピクリン酸染色はアリザリン赤 S 染色と比較して、有意に低かった (Table 1)。

(2) RGB ヒストグラムによる各染色性の解析

アリザリン赤 S 染色, アリザリン赤 S- ライト緑染色, アリザリン赤 S- トルイジン青染色及びアリザリン赤 S- ピクリン酸染色の RGB ヒストグラムの画像解析結果を Figure 3 に示す。

i) アリザリン赤 S 染色

結晶成分及び白血球は赤色, 緑色, 青色の波長のピークがすべて明確に分離されていた。赤色波長の輝度 210 付近に高頻度に検出され, 緑色と青色の波長は明暗の差のみであり, 赤色を基調とする色調となった。背景はすべての波長が局在的に検出された為, 白色調となった。

ii) アリザリン赤 S- ライト緑染色

結晶成分はすべての波長のピークがすべて明確に分離

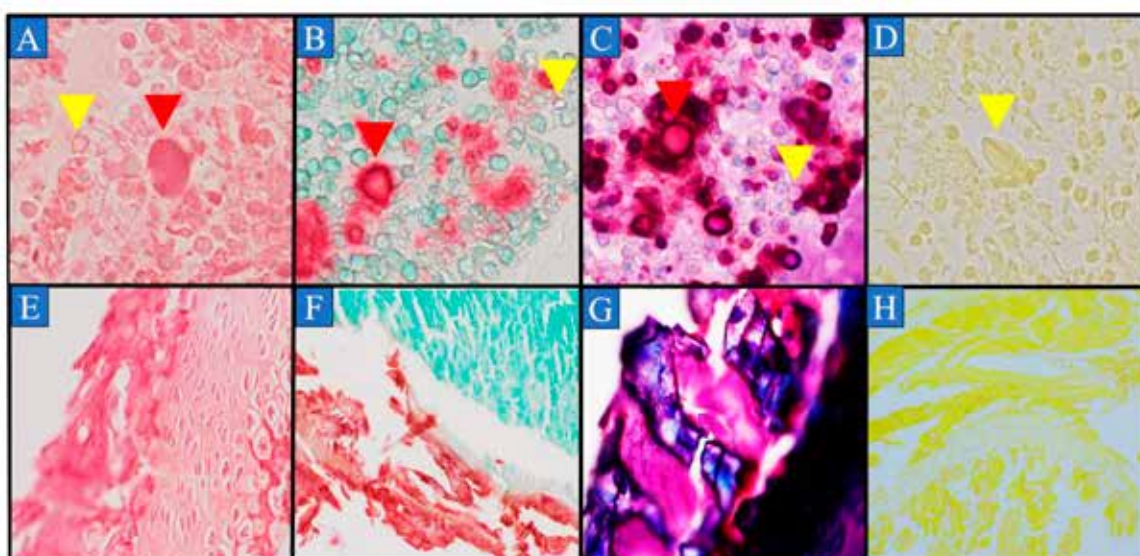


Figure2 Observation of HA crystals using a light microscope

A: Alizarin Red S stain (HA crystals)

C: Alizarin Red S/Toluidine Blue stain (HA crystals)

E: Alizarin Red S stain (Control)

G: Alizarin Red S/Toluidine Blue stain (Control)

▲ Stained crystals

▲ Unstained crystals

B: Alizarin Red S/Light Green stain (HA crystals)

D: Alizarin Red S/Picric acid solution stain (HA crystals)

F: Alizarin Red S/Light Green stain (Control)

H: Alizarin Red S/Picric acid solution stain (Control)

Table 1 Positive rate of crystal staining

		Positive	Negative	Positive/total ratio(%)			Positive	Negative	Positive/total ratio(%)
Alizarin Red S stain	1	46	3	46/49(93.9%)	Alizarin Red S/Light Green stain	1	45	0	45/45(100.0%)
	2	34	2	34/36(94.4%)		2	44	3	44/47(93.6%)
	3	33	0	33/33(100.0%)		3	67	5	67/72(93.1%)
	4	51	3	51/54(94.4%)		4	55	2	55/57(96.5%)
	5	69	3	69/72(95.8%)		5	50	5	50/55(90.9%)
	total	233	11	233/244(95.5%)		total	261	15	261/276(94.6%) [#]
Alizarin Red S/Toluidine Blue stain	1	58	0	58/58(100.0%)	Alizarin Red S/Picric acid solution stain	1	0	7	0/7(0.0%)
	2	59	1	59/60(98.3%)		2	0	3	0/3(0.0%)
	3	51	2	51/53(96.2%)		3	0	5	0/5(0.0%)
	4	48	0	48/48(100.0%)		4	0	7	0/7(0.0%)
	5	61	6	61/67(91.0%)		5	0	9	0/9(0.0%)
	total	277	9	277/286(96.9%)*		total	0	31	0/31(0.0%) [§]

[#] $p = 0.6901$, Alizarin Red S stain vs Alizarin Red S/Light Green stain

^{*} $p = 0.4950$, Alizarin Red S stain vs Alizarin Red S/Toluidine Blue stain

[§] $p < 0.05$, Alizarin Red S stain vs Alizarin Red S/Picric acid solution stain

されていた。赤色波長が輝度 210 付近に最も高頻度に検出され、緑色波長は輝度 40 付近、青色波長は輝度 80 付近にピークを認めた。よって明るい赤色と深青色が重なり鮮やかな赤色となった。白血球は輝度 190 付近に緑色と青色の波長が高頻度に検出され、赤色調は輝度 40～120 付近に満遍なく認められた為、明るい水色に暗い緑色が重なり鮮やかな赤緑色調となった。背景はすべての波長が局在的に検出された。結晶成分、白血球及び背景は色調が異なるヒストグラムであった。

iii) アリザリン赤 S- トルイジン青染色

結晶成分は緑色波長のみ分離され、赤色と青色の波長は重複傾向を示していた。緑色波長が輝度 10 付近に最も高頻度に検出されており、赤色波長と青色波長は輝

度 40～50 付近に検出された為、暗い緑色に濃い紫色が重なり暗い紫色調となった。白血球は赤色波長が輝度 230 付近に高頻度に検出され、緑色波長と青色波長は輝度 100～250 に満遍なく検出されており、薄い青紫色となった。背景は緑色波長のみ輝度 150 付近に検出され、赤色と青色の波長は輝度 210 付近に重複検出されたことから薄紫色となった。

iv) アリザリン赤 S- ピクリン酸染色

結晶成分と白血球は青色波長のみ分離されており、赤色及び緑色波長は重複傾向があった。上記の成分はほぼ同様のヒストグラムを示しており、青色波長の輝度は 120～150 であり、赤色波長は輝度 200、緑色波長は輝度 180 付近にピークを示した為、濃い青色と明るい赤色

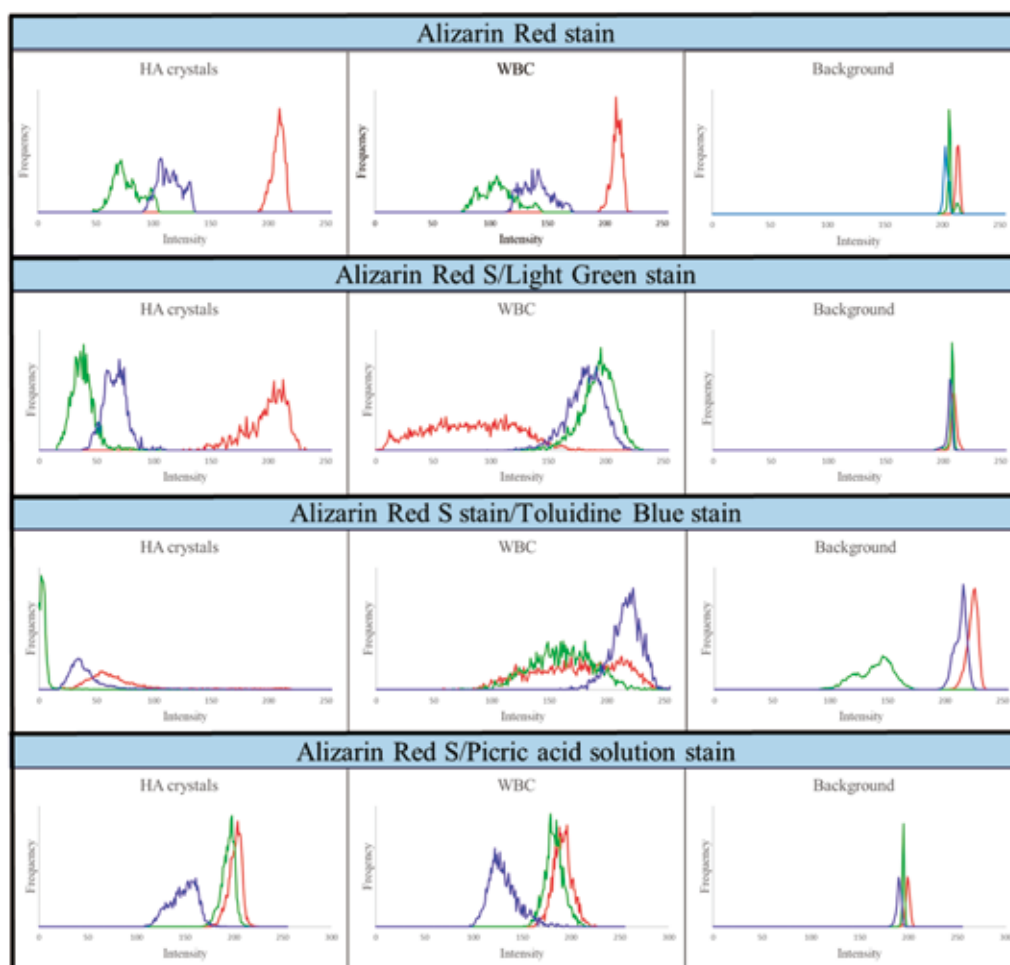


Figure3 RGB histograms of HA crystals, Leukocytes and background in the indicated stains

— Red — Blue — Green

が重なり黄緑色になった。背景はすべての波長が局在的に検出される傾向があり、白色調を示した。

4. 考 察

アリザリン赤 S 染色は、pH5～7 付近でカルシウムとレーキを作り特異的な染色性を示すことでカルシウムを直接証明する染色方法である⁷⁾。我々は HA 沈着症の関節液診断染色法としてコッサ反応による証明法を推奨しているが、コッサ反応はカルシウム結晶を間接的に証明する染色法であり、銅や鉛などが結合したリン酸塩や炭酸塩と反応し、偽陽性率を呈することや、アリザリン赤 S 染色が RGB ヒストグラム解析にて、HA 結晶と白血球の鑑別が困難であることを問題提示している⁹⁾。

本研究では、関節液中に出現した HA 結晶に対して、アリザリン赤 S 染色にライト緑溶液、トルイジン青溶液及びピクリン酸溶液を重染色し、ライト緑染色の追加染色が最も有用な染色方法であることを明らかにした。アリザリン赤 S 染色の染色陽性率とアリザリン赤 S- ライト緑染色及びアリザリン赤 S- トルイジン青染色の染色陽性率に有意差を認めないことから、ライト緑溶液及びトルイジン青溶液が HA 結晶に対して影響を与えないと考えられる。一方アリザリン赤 S- ピクリン酸染色は染色陽性率が 0% で有意差を認めることから、ピクリン酸溶液が HA 結晶に対して影響を与えていると考えられる。ピクリン酸溶液は染色液作製時に pH が強酸性に傾き、また中和処理も難しいことから HA 結晶はピクリン酸溶液によって染色時に脱灰されたと推察される^{9, 10)}。それに対して、ライト緑溶液及びトルイジン青溶液は、染色液作製時にそれぞれ酢酸、クエン酸溶液を使用するが、どちらの染色液も pH は弱酸性である。また染色時間も短時間であったことから標本中の HA 結晶を脱灰することなく染色可能となり、アリザリン赤 S 染色との間に染色陽性率に変化を生じなかったと考えられた^{11, 12)}。よって、ライト緑溶液及びトルイジン青溶液を使用する際は、染色時間を慎重に実施する必要がある。

本研究では「光の三原色」を利用した RGB ヒストグラムによる色調のコントラスト比較によって、客観的な解析

を実施した¹³⁾。アリザリン赤 S- トルイジン青染色は、HA 結晶の RGB ヒストグラムが緑色の輝度が低い波長に最も検出され暗い紫色になることに対して、アリザリン赤 S 染色の RGB ヒストグラムは赤色の輝度が高い波長となることから明るい赤色調となり異なる色調を示した。また、背景は薄紫色を示すことから、アリザリン赤 S 染色との染色性の違いが明確であった。トルイジン青染色は、酸性ムコ多糖類のカルボキシル基またはスルホ基にトルイジン青色素が結合しメタクロマジーを起こすため赤色に染色される¹²⁾。HA 結晶はトルイジン青染色陰性かつアリザリン赤 S 染色陽性の為、赤色と青色が重複染色されることで、暗紫色になったと考えられる。また、トルイジン青染色は、pH の条件によって染色態度が変化し、pH2.5 ではヒアルロン酸陰性、ムコイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸となり、pH4.1, 7.1 はヒアルロン酸、ムコイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸すべて陽性となる¹²⁾。本研究では pH2.5 にすると HA 結晶が脱灰される恐れがある為、pH4.1 トルイジン青染色を使用した。そのため関節液中のヒアルロン酸が陽性となりメタクロマジーを示し、HA 結晶と背景のコントラストが弱くなり見落としの可能性を示唆された。アリザリン赤 S- ピクリン酸染色の HA 結晶はピクリン酸溶液に脱灰されたことで、白血球と同様の RGB ヒストグラムを示し、同定効果は低いと考えられた。アリザリン赤 S- ライト緑染色は、HA 結晶の RGB ヒストグラムが赤色を基調とする波長となり、白血球は緑色と青色を基調とする波長となった。また背景は赤色、緑色及び青色の波長が同輝度に検出された為、白色調となり HA 結晶、白血球及び背景の色調のコントラストが強く同定効果は非常に高いと考えられた。ライト緑染色は大きな分子量の色素が細胞密度の疎の部分へ入り込み強く結合することで染色される¹⁴⁾。そのことから染色部位の構築が密となっている HA 結晶にライト緑が入り込まない為、アリザリン赤 S 染色と重複染色されないため RGB ヒストグラムの波長が明確に分離したと推察される。

染色陽性率及び RGB ヒストグラム解析からアリザリン赤 S- ライト緑染色が、HA 沈着症同定染色法に最も有用な染色方法であると考えられる。また、アリザリン赤 S- ト

ルイジン青染色でも HA 結晶を推定することは可能ではあるが、トルイジン青染色が HA 結晶に重染色されることや関節液中に認められるヒアルロン酸とのメタクロマジーによって鑑別が難しくなる為、経験が必要となる。HA 結晶の鑑別方法として、コッサ反応は結晶成分と白血球及び背景とのコントラストが明確で鑑別が容易であるメリットがあるが、コッサ反応の染色原理上カルシウム以外の成分も陽性になり偽陽性率が上がることや、硝酸銀水溶液の廃液処理が複雑であることがデメリットとして挙げられる。本検討で有用であったアリザリン赤 - ライト緑染色はカルシウムを直接染色するので偽陽性率が低く、また廃液処理も簡易的であるため、アリザリン赤 - ライト緑染色の方が有用と考えられた。本研究の問題点としては、アリザリン赤 S 染色に追加染色を実施する為、従来法のアリザリン赤 S 染色と比較すると染色手順が煩雑となり時間も要することが挙げられる。ライト緑染色を追加染色実施することで HA 結晶の鑑別が容易になり、関節液検査に慣れていない検査者でも同定が可能となると考えられる。本研究では HA 結晶含有セルブロックを使用した為、今後は生検体にて検討する予定である。

5. 結 語

アリザリン赤 S 染色は、結晶誘発性関節炎の原因結晶として稀に検出される HA 結晶の同定法として使用されるが、結晶以外の成分も染色される傾向にある。本研究ではアリザリン赤 S 染色の追加染色として 3 種類の染色方法を検討しライト緑染色が最も有用な染色方法であった。アリザリン赤 S 染色に追加染色することで染色手順が煩雑化し時間を要するデメリットはあるが、HA 結晶の同定は従来のアリザリン赤 S 染色よりも容易で感度及び特異度は上がることが予想される。これらにより HA 結晶の同定が容易になり、HA 沈着症の診断の精度を上げることが可能になると考えられた。現在 HA 沈着症は電子顕微鏡による同定のみであるが、アリザリン赤 S 染色との重染色により確定診断が可能と考えられた。

文 献

- 1) 保科ひづる, 羽原利幸, 小関紀之, 内田一豊, 岡田茂治, 小澤 優: 穿刺液検体の検査法—細胞数と細胞分類を中心に—胸水, 腹水, 心嚢液, CAPD 排液—, 医学検査, 2020; 69: 701-710.
- 2) 米田 操, 東 眞美: ハイドロキシアパタイト沈着症及び変形性関節症の関節液診断. 大阪教育大学紀要, 2006; 55: 55-61.
- 3) 谷口敦夫, 山中 寿: 関節炎の鑑別: 診断と治療の進歩—結晶性関節炎—. 日本内科学会, 2010; 99: 90-95.
- 4) 横川直人: 結晶性関節炎の迅速診断—医師による関節液の鏡検. 高尿酸血症と痛風, 2018; 26: 25-31.
- 5) 蜂須賀大輔, 中西豊文, 岩崎卓識, 神野雄大, 土井昭夫, 服部 聡, 他: ハイドロキシアパタイト沈着症の関節液診断染色法の検討. 医学検査, 2024; 73: 719-725.
- 6) Rigueur D, Lyons KM: "Whole-mount skeletal staining", Methods Mol Biol. 2014; 1130: 113-121.
- 7) 蜂須賀大輔, 土井昭夫, 服部 聡, 平田基裕, 岩崎卓識, 長瀧和子, 星 雅人: セルブロックを活用した関節液結晶成分の保存方法と教育への応用. 医学検査, 2023; 72: 83-89.
- 8) 津田隆洋. ダールのカルシウム染色. 月刊 Medical Technology 別冊 最新染色法のすべて (水口國雄), 医歯薬出版株式会社, 東京, p120-121, 2011.
- 9) 平澤 浩. ホール法. 月刊 Medical Technology 別冊 最新染色法のすべて (水口國雄), 医歯薬出版株式会社, 東京, p52-53, 2011.
- 10) Pang S, Su FY, Green A, Salim J, McKittrick J, Jasiuk I.: "Comparison of different protocols for demineralization of cortical bone", Sci Rep. 2021; Mar 29; 11(1): 7012.
- 11) 岩原 実, 高橋 啓. グロコット染色. 月刊 Medical Technology 別冊 最新染色法のすべて (水口國雄), 医歯薬出版株式会社, 東京, p104-105, 2011.
- 12) 岩井宗男. トルイジン青染色. 月刊 Medical Technology 別冊 最新染色法のすべて (水口國雄),

医歯薬出版株式会社，東京，p153-155，2011.

- 13) S.K. Naik and C.A. Murthy: "Hue-preserving color image enhancement without gamut problem", IEEE Trans. Image Process. 2003; 12: 1591-1598.

— プロフィール —

蜂須賀 大輔 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部臨床検査学科・助教 博士（医学）

〔経歴〕 2010 年 JA 愛知厚生連稲沢厚生病院（旧尾西病院）臨床検査科，2021 年名古屋市立大学大学院医学研究科修士課程修了（医科学），2022 年修文大学医療科学部臨床検査学科助手，2025 年名古屋市立大学大学院医学研究科博士課程修了（医学），2025 年より現職。〔専門〕腫瘍病理学，細胞診断学，生体医用画像解析学。

Evaluation of Combined Staining Techniques with Alizarin Red S for the Diagnosis of Hydroxyapatite Deposition Disease

Daisuke HACHISUKA

Department of Medical Technology, Faculty of Health Science,
Suzuka University of Medical Science

Key words: Joint fluid, Hydroxyapatite, Alizarin Red S stain, Light Green stain, RGB histogram

Abstract

Crystal-induced arthritis is most commonly associated with the monosodium urate (MSU) crystals in gout and calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystals in pseudogout. In contrast, hydroxyapatite (HA) crystals are rare contributors to this condition. HA crystals, lacking characteristic birefringence under simple polarizing microscope, pose challenges to accurate identification and assessment. Although Alizarin Red S staining is widely employed for detecting HA deposits, it tends to produce diffuse staining, which often results in low contrast between HA crystals, leukocytes, and the background, complicating differential diagnosis.

In this study, we evaluated the efficacy of three counterstaining methods—Light Green, Toluidine Blue, and Picric Acid—in combination with Alizarin Red S staining to enhance HA crystal visualization. RGB histogram-based image analysis revealed that Light Green counterstaining significantly improved contrast between HA crystals, leukocytes, and surrounding tissue. Among the staining methods tested, Alizarin Red S combined with Light Green offered the clearest color differentiation without compromising the structural integrity of HA crystals. These findings suggest that the addition of Light Green counterstaining to conventional Alizarin Red S staining is a practical and effective method for enhancing the detection and differentiation of HA crystals in synovial fluid. This technique may improve the diagnostic accuracy of HA crystal-associated arthropathies in clinical settings.