

脱灰の原理とポイント

1. 脱灰と骨基質の成分組成
2. 各種脱灰液の特徴と脱灰の原理
3. 脱灰の染色、免染、核酸DNAへの影響
4. 脱灰前の処理と脱灰操作のポイント、他

第105回日本病理組織技術学会

2022年 3月 6日

渡辺 明朗

脱灰 (Decalcification)

→骨、歯、石灰化した部位から主にカルシウム塩（石灰分）
の除去操作

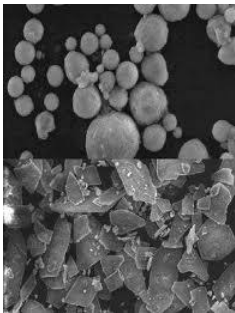
参考：石灰→生石灰CaO、消石灰Ca(OH)₂、炭酸カルシウムCaCO₃などを指す

1.骨基質の成分組成（％は水分以外の成分を100％とした場合の比率）

有機成分	約35％	コラーゲン線維 線維間に存在する蛋白多糖類		
無機成分 (脱灰対象成分)	約65％	リン酸カルシウム ^注	Ca ₃ (PO ₄) ₂	85 %
		炭酸カルシウム	CaCO ₃	10 %
		リン酸マグネシウム	Mg ₃ (PO ₄) ₂	1.5%
		その他		3.5%

注：リン酸カルシウム→主にヒドロキシアパタイトの結晶の形で存在
ヒドロキシアパタイト (Hydroxyapatite)

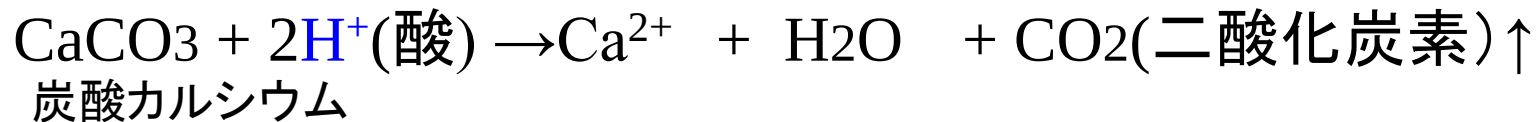
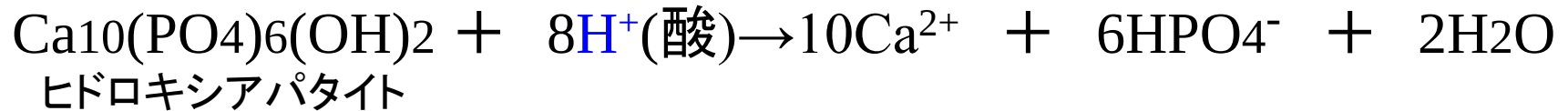
化学名：水酸化リン酸カルシウム [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]
水に不溶。歯周組織への親和性が高いことから、
人口歯として利用される。



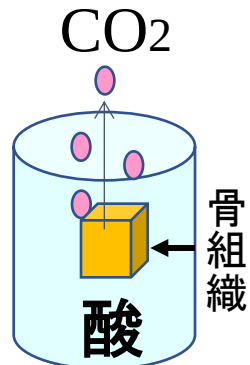
2. 各種脱灰液の特徴(pHと脱灰力)と脱灰の原理

強酸性			弱酸性	中性	
硝酸	塩酸	プランク・リュクロ液	トリクロロ酢酸	ギ酸	EDTA
HNO ₃	HCl		CCl ₃ COOH	HCOOH	
強い	←		脱灰力	→	弱い
速い	←		脱灰速度	→	遅い
大	←	組織の障害・染色への影響	→		小

酸性脱灰液は、酸(H^+)($HCl \rightarrow H^+ + Cl^-$)により骨の主成分であるヒドロキシアパタイトや炭酸カルシウムを溶出させる。



脱灰に酸を使用すると、二酸化炭素ガスが生じ、実際組織の表面に小さな気泡が形成される。従って、発生する二酸化炭素ガスの逃げ道として容器の口はガーゼなどで覆い、密栓はしない。



硫酸は脱灰に不適→溶出した Ca^{2+} と非水溶性の硫酸カルシウム(石膏)生成

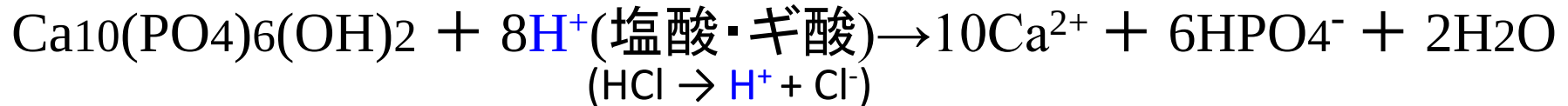
強酸性脱灰液/プランク・リュクロ液

プランク・リュクロ液の処方

塩化アルミニウム・6H ₂ O(注)	70 g
ギ酸	50ml
塩酸(37%)	85ml
蒸留水	1,000ml

注) 無水物は塩酸臭が強く、水に入れると発煙したり発熱するので、6水和物を使用する。

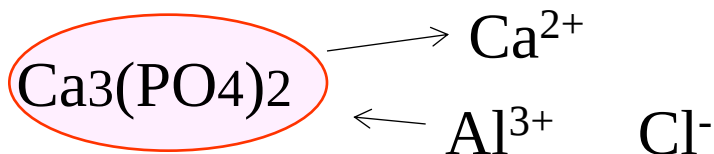
塩酸とギ酸が骨基質中ヒドロキシアパタイトなどを溶解・溶出させる。



塩化アルミニウムAlCl₃の効果(考察)

- ①浸透圧の増大→組織の障害の低減化
- ②脱灰作用の補助効果

強	←	イオン化傾向	→	弱
K >	Ca	>	Na >	Al > Mg

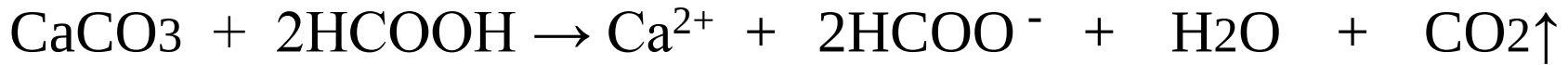


CaはAlよりイオン化傾向が強い。塩化アルミニウム水溶液の中にリン酸カルシウム等を含む骨組織を浸漬すると、Alよりイオン化傾向の強いCaが骨組織からCa²⁺として溶解。一方、生成するAlPO₄は本来水に難溶であるが、プランク・リュクロ液には塩酸HClが濃度高く存在するので、Al³⁺の形で溶液中に存在するようになると考察される。

弱酸性脱灰液/ギ酸脱灰液の種類と特徴

1) 5～10%ギ酸水溶液 (ギ酸 $\text{HCOOH} \leftrightarrow \text{HCOO}^- + \text{H}^+$)

組織の障害や染色性への影響も少ないので、特に実験動物の分野ではラットやマウスの脱灰によく利用される。



2) ギ酸・ホルマリン

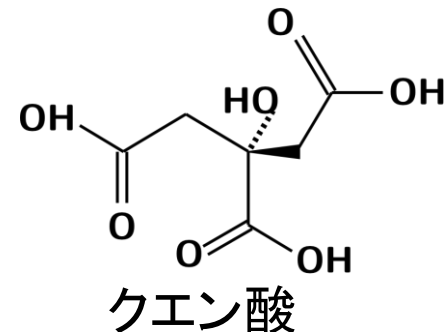
ギ酸による脱灰とホルマリンによる固定が同時にされる効果が得られ、固定が不十分な組織に有用である。が、基本的には脱灰の前に組織を十分に固定しておくことが望ましい。

3) ギ酸・エタノール・水混合液

エタノールは脂肪の多い組織へのギ酸の浸透を促進させるが、カルシウムCaのイオン化 Ca^{2+} が低下し溶出しにくくなるので、エタノールが入った脱灰液は脱灰力が弱い。脱灰の前に、エタノール等で脱脂した方がベター。

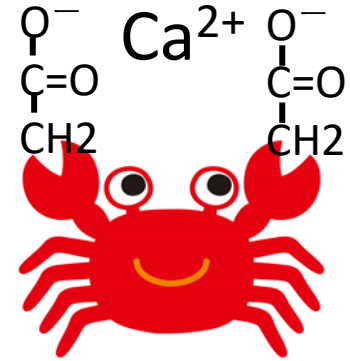
4) ギ酸・クエン酸

Ca^{2+} と水溶性の錯体を形成するクエン酸やクエン酸ナトリウムを加えたギ酸・クエン酸脱灰液は、ギ酸単独の脱灰液に比べ組織の障害が少ないが、クエン酸ナトリウムの場合pHが少し高くなり、脱灰時間を少し長めにする必要がある。



中性脱灰液/**EDTA**(Ethylenediaminetetraacetic acid)

EDTAはカルシウムイオン Ca^{2+} などとキレート(ギリシャ語でカニのハサミの意)を形成して水溶性の錯体を形成する。

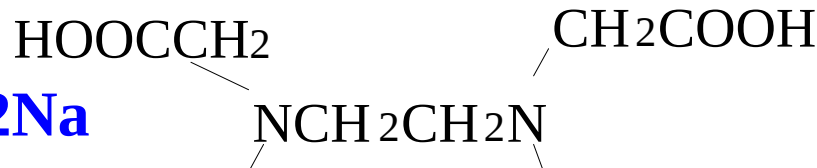


EDTA脱灰液の脱灰力は下記に依存

①**EDTA濃度** (通常10%濃度で使用)

②**pH値**

EDTA-2Na



pHが低いほど、 COOH のイオン化が抑制され、また窒素Nが正(+)荷電になり、 Ca^{2+} と斥力が働き、 Ca^{2+} とキレート形成困難。

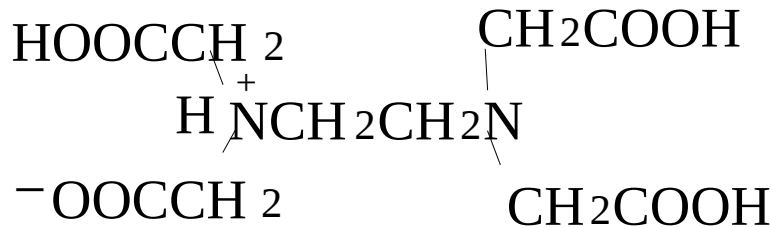
低いpH



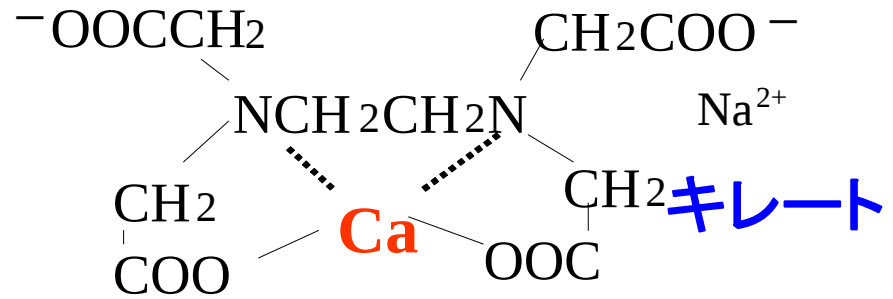
高いpH



pHが高くなると、 COOH のイオン化が容易になり(COO^-)、 Ca^{2+} とキレート形成しやすく、脱灰力が強くなる。



Ca^{2+} と錯体形成困難



Ca^{2+} と錯体形成容易

キレート

弱

脱灰力

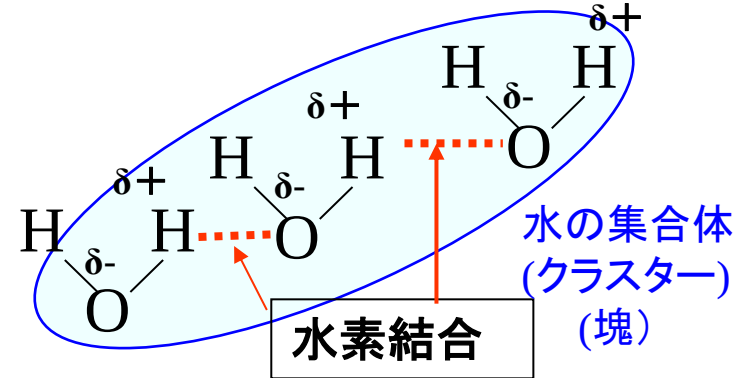
強

EDTAの種類/ナトリウムNaの数による溶解度とpH値

EDTAのNaの数が多いほど水に溶解しやすく、またpH値が上昇。



イオン化することにより、水素結合している水分子同士の間へEDTAが入り込んでEDTAが溶解する。

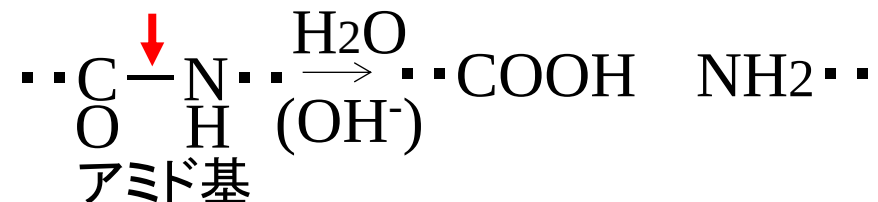


EDTA	水への溶解度	pH値
EDTA	小 (0.05g/100ml)	低
EDTA-2Na	↑ (10g/100ml)	↑ pH 5.3
EDTA-3Na	↓	↓ pH 9.3 (1% 溶液)
EDTA-4Na	大 (103g/100ml)	高pH 11.3(0.1% 溶液)

通常はEDTA-2Naを水へ加え、トリス緩衝剤、さらにNaOH溶液を滴下して溶解させ、pHを中性に調節。

EDTAはpHが高いほど脱灰力は強くなるが、アルカリ性が強くなるほど、蛋白質のアミド基CONHが加水分解し、組織の損傷また切片剥離のリスクが大きくなる。

蛋白質はアルカリ下で加水分解し、開裂



組織蛋白質は酸には比較的強いが、アルカリに弱い(分解する)！

脱灰液の種類と特徴

	脱 灰 液	主 成 分	特 徴	取扱い会社
強酸性	プランク・リュクロ液	塩酸、ギ酸	短 ↑ 大 要 組 脱 織・ 灰 染 色 時 へ の 間 ↓ 影 響 長 ↓ 小 強 ↑ 脱 灰 力 ↓ 弱	和光純薬、他
	オステオモル	10%塩酸、ホルマリン		メルク
	K-CX	塩酸、EDTA		ファルマ
	カルキトックス	塩酸、EDTA		和光純薬
弱酸性	5～10%ギ酸			
中 性	オステオソフト	17.7%EDTA		メルク
	EDTA中性脱灰液	10%EDTA		

(注：強酸性脱灰液の脱灰力の順番は、上表とは異なることがある。)

- ①各脱灰液の特徴(脱灰力、染色への影響等)を理解し、適切な処理条件(脱灰時間など)で使用し、特に強酸性脱灰液を使用した場合、組織は超好酸性化また好塩基性が超低下するので染色条件の工夫が望まれる。
- ②強酸性脱灰液でEDTAを含む液があるが、強酸性条件下ではEDTAは Ca^{2+} とキレートを形成しにくいので、EDTAの脱灰への寄与は小さいと考えられる。

3. (強)酸性脱灰液の染色への影響/超好酸性化&好塩基性の低下

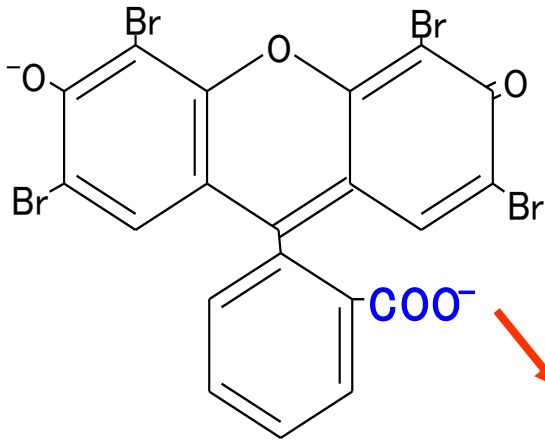
プランク・リュクロ液
のpH値: < 1

組織蛋白質
-NH₂

細胞核
DNA-PO₄⁻

ヘマトキシリン
(ヘマテイン・Al錯体)

エオジン



A) 組織蛋白質の**超好酸性化**

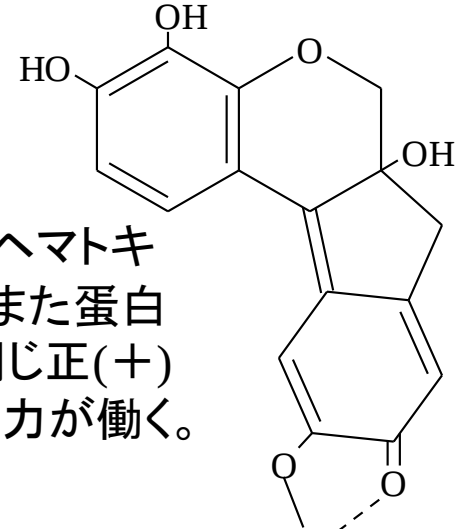
蛋白質
-⁺NH₃

H⁺ (強)酸性脱灰液

B) **好塩基性の低下**

リン酸基がPO₄Hとなりヘマトキシリンが親和しにくい。また蛋白質の正(+)化により、同じ正(+)のヘマトキシリンとは斥力が働く。

細胞核
DNA-PO₄H



Al⁺⁺



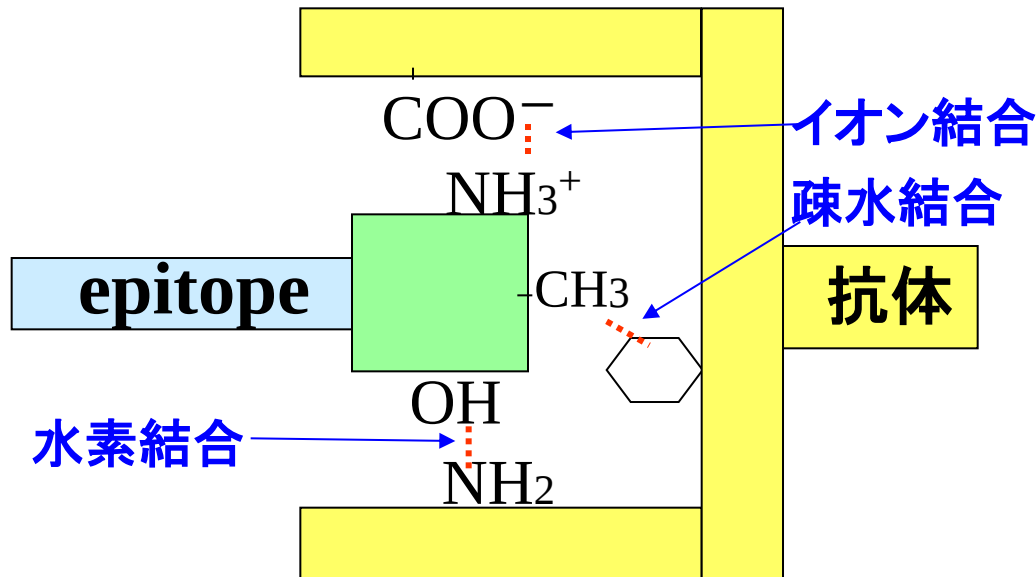
対応

- ①エオジンの染色時間をかなり短くする。
- ②エオジン染色液を希釈して、染色強度を弱くして使用。

- ①染色強度の強いヘマトキシリン染色液の使用
(例、2倍カラッチ、ヘマトキシリン3G)
 - ②染色時間の延長(例、30~60分)
 - ③脱灰組織切片の好塩基性化
(例、弱アルカリ性4~5%炭酸水素ナトリウム水溶液で切片を約5分処理してから核染に入る。)
- 但し、酸により断片化したDNAが溶出すると、上記の対応しても核の染まりは弱くなると考えられる。

強酸性脱灰液の免染、酵素染色等への影響

抗原抗体反応: エピトープと抗体間で、イオン結合、疎水結合、水素結合等の組み合わせによる親和→ 鍵と鍵穴の関係



強酸性脱灰液→

- ① 抗原の種類により抗原エピトープの荷電状態の変化による立体構造の変化
→ 抗原性の低下のリスク
- ② 酵素蛋白の荷電状態の変化による立体構造の変化
→ 酵素活性低下のリスク

参考: 中性EDTAによるアルカリホスファターゼALPの酵素活性の低下

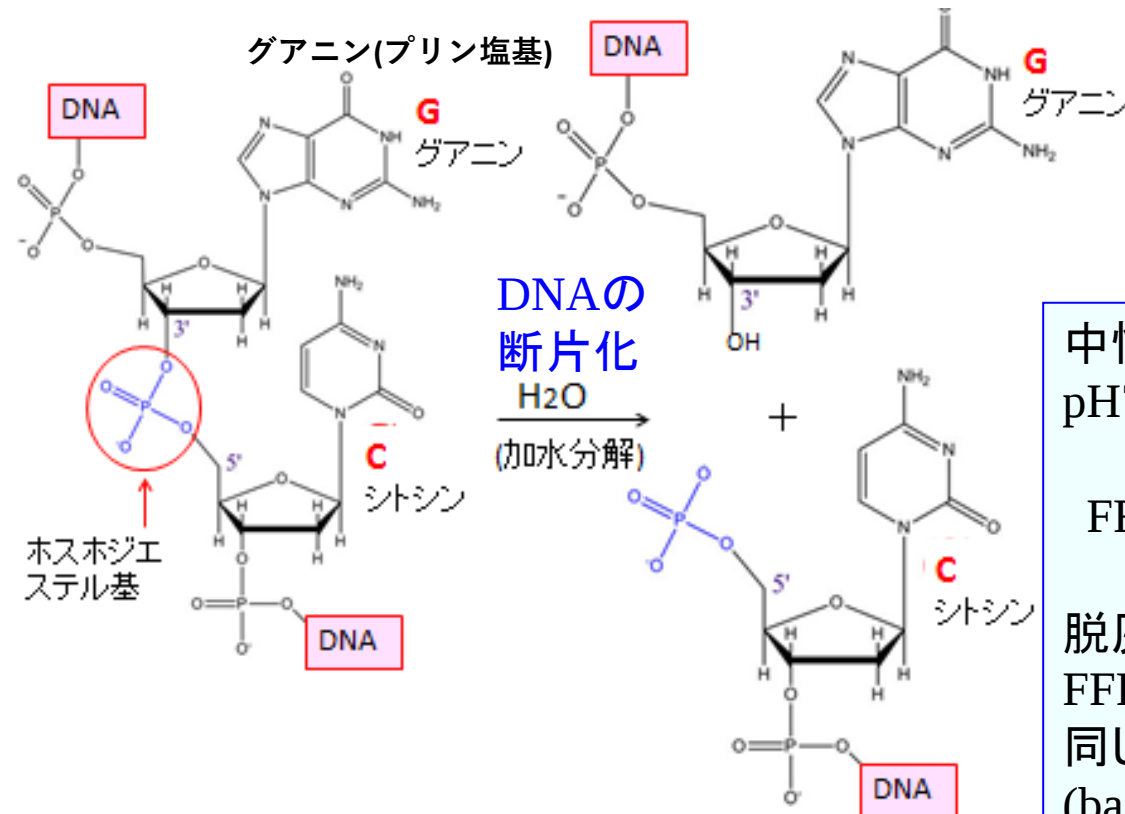
ALP酵素はその分子内に亜鉛Znを有し、EDTAで脱灰すると、ALPからZnが離脱し、その結果ALP酵素活性が徐々に低下。



酸(酸性脱灰液)の核酸DNAへの影響⇒脱プリン&DNAの断片化

脱灰液のpH: プランク・リュクロ液→pH < 1 5%ギ酸→ pH 約1.9

酸性条件で、DNAは脱プリンのリスクがある。また特に低いpH条件(pH 3以下)ではDNAのホスホジエステル基が加水分解して、DNAの断片化が起こる。



参考文献: 芹澤昭彦、他: 医学検査学会誌、脱灰処理FFPE標本を用いたPCRの検討 15, 2015

(A)

中性10% EDTA
pH7.2脱灰組織
↓
FFPE標本
PCR ↓
脱灰なしの組織
FFPE検体とほぼ
同じ100-400bp
(base pair塩基対)
で増幅

(B)

強酸性脱灰液KC-
Xやプランクリュ
クロ液脱灰組織
↓
FFPE標本
PCR ↓
浸漬1日の検体か
らは100bpの低サ
イズの増幅
⇒DNA断片化

参考: 胃液の強酸性と細菌の死滅

塩酸を含む胃液のpHは約1-1.5であり、その低いpH状況下では多くの細菌が死滅することになるが、その強酸が細菌のDNAに影響を与えるためと考えられている。

4. 脱灰前の処理とポイント

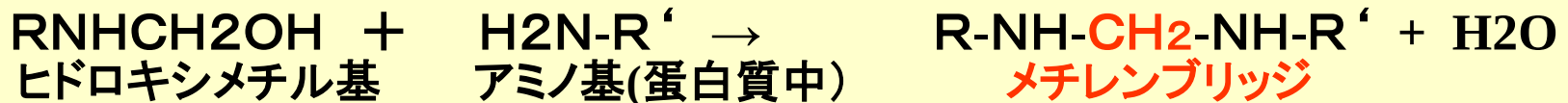
①組織片の大きさ

脱灰速度は、組織の大きさ、特に厚さに大きく依存（脱灰液の浸透速度が、組織内部へ行くほどかなり遅くなるため）。組織の厚さは5mm以下にする。また縦横サイズは15mm×30mm位までにとどめたい。

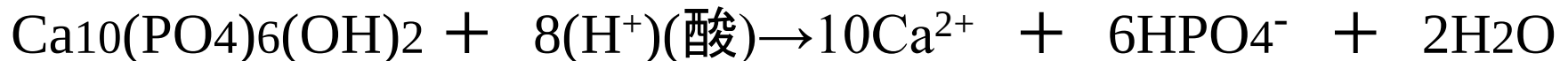
②十分な固定（固定の効果の一つ：組織の機械的強度の増大）

固定が不十分だと、脱灰過程及び脱灰後の処理過程で、組織の変性ないし結合組織の膨化が生じる。**浸透圧の変化に耐えられるよう、固定を十分に行う。**

ホルマリン固定により蛋白質が分子内・分子間で架橋（メチレンブリッジ）されより大きな分子となり溶出しにくくなり、また外的環境の変化（浸透圧の変化など）に影響されにくくなる（プロセッシングのアルコール脱水過程でも重要となる）。



注：中性緩衝ホルマリン固定組織から、残留のリン酸緩衝剤を洗浄除去の必要性
リン酸緩衝液中の HPO_4 などが存在すると、下記反応式で、右への反応が進みにくく、骨成分のリン酸カルシウムは溶解・溶出しにくくなる（酸性脱灰液の脱灰力が少し阻害される）（質量作用の法則）。



③脱脂 脂肪の多い組織は、脱灰液の浸透をよくするため前もって脱脂する。

4. 脱灰操作のポイント

①脱灰液は指定濃度で使用

脱灰の再現性のため。
また組織や染色への影響の小さい
EDTAは高濃度で 사용되는場合あり。

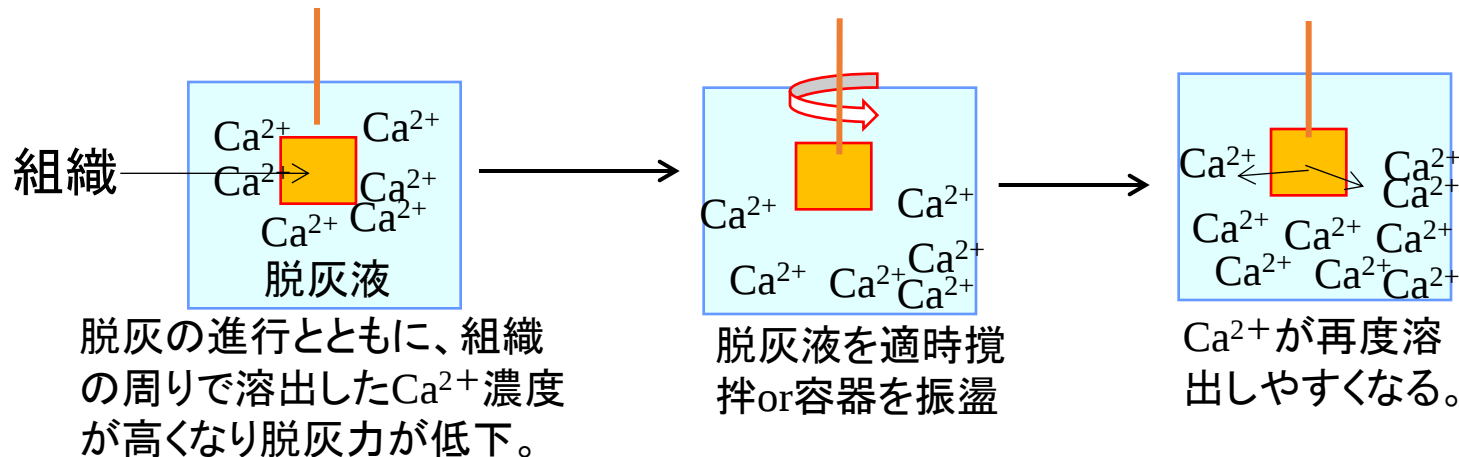
低い	← 脱灰液の濃度 →	高い
遅い	← 脱灰速度 →	速い
小	← 組織と染色への影響 →	大

②十分な量の脱灰液また脱灰液の交換

組織片1gに対して約50～100mlの脱灰液の使用。
脱灰の経過とともに、脱灰液中に Ca^{2+} の濃度が上昇し、脱灰能力が低下するので、脱灰液は適宜交換(例、1回/日)。

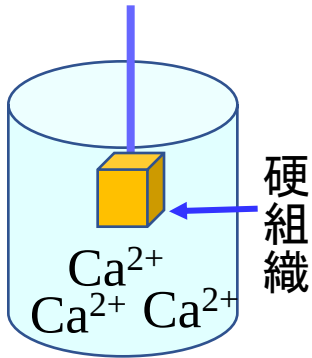
③脱灰液の攪拌

硬組織の面が新しい脱灰液に接するよう脱灰液を攪拌ないし振盪する。
毎日2～3回脱灰容器を手で振って脱灰液を攪拌する程度でよい。



④組織片を脱灰液の上層～中層におく

硬組織から溶出した重いカルシウム分は脱灰液の下層に集積する。カルシウム濃度が上昇すると脱灰力が低下。そこで組織は脱灰液中に糸で吊り下げたりして脱灰液の上層ないし中層に置く。



⑤脱灰温度と脱灰時間

低い	←	脱灰温度	→	高い
弱い	←	脱灰力	→	強い
遅い	←	脱灰速度	→	速い
長い	←	要脱灰時間	→	短い
小	←	組織と染色への影響	→	大

通常は室温で脱灰操作を実施。中性脱灰液のEDTAは、脱灰温度が多少高くても組織の障害及び染色への影響は小さい。

注：低温脱灰

組織化学染色などでは、組織の障害や染色への影響が少ない低温脱灰(例、4℃)が利用されるが、長い脱灰時間が必要。

参考)化学の通則：温度が10℃低くなると、一般的に反応速度は約1/2倍になる。

⑥脱灰終了の判定

適時脱灰の進行状況を検査。脱灰組織に針を刺し、抵抗がなくなれば脱灰は終了。

⑦過脱灰(Overdecalcification)を避ける

脱灰の進行状況を検査し、過脱灰にならないよう注意。特に、強酸性脱灰液で過度に脱灰すると組織の障害や染色への影響が大きい。

⑧強酸性脱灰液脱灰組織の後処理(5%硫酸ナトリウム水溶液、他)

強酸性脱灰液で脱灰した組織は下記のいずれかで処理し、酸を除去する。

1. 流水水洗

組織へダメージを与えないよう、穏やかな流水で水洗。流水時間は組織の大きさに依存。小さな検体は数時間、大腿骨のような大きな検体は数時間～半日流水水洗する。

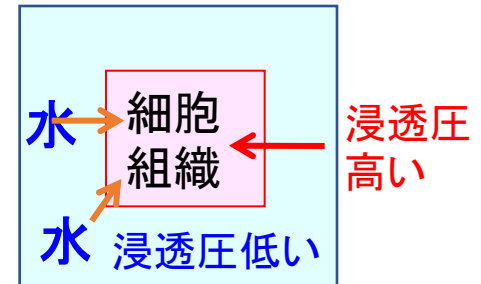
参考①ヘマトキシリン染色液pH2.5 3 μ m厚切片 流水水洗色出しによる酸の除去 5-10分

②プランク・リュクロ液 pH<1 4mm厚組織 水洗所要時間 約数時間～半日

2. 5%硫酸ナトリウム液で“中和処理”+流水水洗

5%硫酸ナトリウム液に脱灰組織を12～24時間浸漬し、その後水洗し酸及び硫酸ナトリウムを除去する。

強酸性脱灰液で脱灰、骨基質からカルシウム分が多く溶出すると組織はスカスカの状態、組織が脆弱になり、脱灰後直接浸透圧



の低い水による水洗を行うと結合組織が膨化し、組織の損傷のリスク大である。そこで浸透圧の高い5%硫酸ナトリウム水溶液に所定時間浸漬する。さらに十分に水洗し脱灰液由来の酸及び硫酸ナトリウムを除去した後脱水操作に入る。本処理は“中和処理”と称されているが、5%硫酸ナトリウム水溶液は中性であり、本来は“中和処理”ではないことになる。

3. 弱アルカリ水溶液処理+流水水洗 (日本では実施している施設ほぼなし)

弱アルカリ性の炭酸リチウム飽和水溶液ないし5～10%炭酸水素ナトリウム水溶液に脱灰組織を数時間浸漬し、脱灰組織中の酸(塩酸、他)を中和除去する。

注意: 強酸性脱灰液処理組織の水洗不十分のままプロセッサーに組織検体の多くをセットすると、第1槽のアルコールに塩酸が持ち込まれ、その塩酸ないし加温P/V条件下蒸発する塩化水素によりプロセッサーのステンレス部に錆などのトラブルが生じると考察される。