

血液塗抹標本のための PAS 染色改良法の検討

小 穴 こそ枝*
伊 藤 実枝子**
小田切 恵 子***
庄 村 公 江****

はじめに

PAS 反応は過ヨウ素酸シッフ (Periodic Acid-Schiff) 反応の略で, McManus (1946 年)¹⁾により粘液質の組織化学的証明法として考案され, その後 Hotchkiss (1948年)²⁾らにより各種多糖類にも陽性を示すことが明らかにされ, さらに Wislocki ら (1949年)³⁾によって本法が血球の多糖体証明法として応用されるようになった。

単球系細胞並びに顆粒球系細胞とリンパ球系細胞との間では PAS 反応陽性物質の現れ方に著しい差異が認められるので, 本反応はペルオキシダーゼ反応と並び, 白血病細胞を鑑別する方法として意義がある。また, 白血病以外のリンパ系増殖疾患や, PAS 反応陽性赤芽球を認める疾患に対しても診断の補助としての役割を持っている。これら診断手段としての使用以外に, 最近ではリンパ球の PAS 反応は免疫反応に関連していることが多いと推論し^{4,5)}, 血液疾患にとどまらずそれ以外の各種疾患について臨床経過, 治療及び予後に関連した成績も報告されている^{6,7,8)}。

PAS 反応の染色方法は McManus の報告以来, 本邦でも小黒ら^{9,11,13)}, 糸賀ら¹⁰⁾, 川越ら¹²⁾により数種の変法が報告されているが, いずれの方法も煩雑な手順と比較的長時間を要するという難点を有している。従来, PAS 染色ではシッフ試薬浸漬後, 水洗する前に標本を亜硫酸水に通していた。これは, 水洗だけを行った場合はシッフ試薬の除去が完全とはいえず, シッフ試薬は塩基または緩衝能を持つ物質を加えて中性にすると, フクシンが再生されてバックグラウンドが赤色を帯び良好な標本とはいえなくなるからである。ところが, シッフ試薬浸漬後, 亜硫酸水に通すことなく, 直接流水水洗を行うという PAS 染色キット「アスカ・シグマ」がアスカ純薬から発売された。そこで今回, このキットによる染色 (以下キット法と略す) と, 自家製試薬による従来より行われている染色 (以下従来法と略す) との染色性の比較を行った。さらに, 自家製試薬を用いてキット法と同じ染色操作法の染色性を検討した。

* 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

** 社会保険中京病院

*** 小林内科病院

**** 長野県公衆衛生協会

材料及び方法

I キット法と従来法との染色性の検討

シッフ試薬浸漬後亜硫酸水を通さないキット法と、従来より行われている亜硫酸水を通す方法として糸賀らの方法¹⁰⁾について、それぞれの染色性の比較を行った。さらに、唾液消化試験を行った。

1. 対象血液塗抹標本

血液塗抹標本は健常人(20歳代女性)3名の EDTA・2K 加静脈血を用い、EDTA の影響¹⁴⁾を考慮し、採血後直ちに作成し、30分間乾燥後、固定を行った。

2. 試薬

キットには過ヨウ素酸液、シッフ液及びギル No.3 ヘマトキシリン液が含まれており、キット法の染色にはこれらを使用し、固定液は従来法と同じものを用い後述のように調製した。従来法の試薬は以下のように調製した。なお、従来法の後染色はキットのギル No.3 ヘマトキシリン液を用いた。

- 1) 固定液：アセトン・ホルマリン・氷酢酸を6：3：1の割に混合した。
- 2) 1%過ヨウ素酸液：過ヨウ素酸1gを蒸留水100mlに溶解した。
- 3) シッフ試薬：クロマ製パラフクシン1gを200mlの沸騰水に溶かし、完全に溶解後50°Cまで放冷し、ろ過して1N塩酸15mlを加え、さらに25°Cに冷却後重亜硫酸ナトリウム1gを加えた。混和後、栓をして一夜冷暗所に放置した。これに活性炭末0.5~1.0gを入れ、よく混和しながらろ過すると無色透明の液が得られ、その液をpH2.4に調整した。
- 4) 亜硫酸水：重亜硫酸ナトリウム3gを30mlの蒸留水で溶解し、1N塩酸25mlを加え、さらに蒸留水を加えて500mlとした。

唾液消化試験のための消化液は人の新鮮唾液4mlにpH7.0の1/15 mol/l リン酸緩衝液1mlを加えた。

3. 操作法

キット試薬によるキット法と、自家製試薬による従来法による染色は表1に示すように行った。また、唾液消化試験は次のように行った。固定、水洗後、標本塗抹面に消化液を載せ15分間37°Cで作用させ水洗後、さらに15分間同様の操作を実施した。次いでそれぞれの過ヨウ素酸液浸漬以下の操作を施した。

II 自家製試薬によるキット法の染色性の検討

自家製試薬を用いてシッフ試薬浸漬後亜硫酸水を通さないキット法と同じ染色操作及び、従来法による染色操作のうち亜硫酸水を通す操作を削除した方法(以下変法と略す)と、従来法との染色性を比較した。シッフ試薬については3種作製して検討した。さらに、唾液消化試験を行った。

1. 対象血液塗抹標本

前項「Iの1 対象血液塗抹標本」と同様。

2. 試薬

固定液, 1%過ヨウ素酸液は前項「Iの2 試薬」と同様に調製し, 後染色はマイヤーのヘマトキシリン液を用いた。シッフ試薬は次の3種を作製した。

- 1) シッフ試薬a: 従来法の処方により調製したもの, すなわち前項「Iの2の3) シッフ試薬」と同様。
- 2) シッフ試薬b: キット中のシッフ試薬に記載されていた処方「Pararosaniline HCl, 1%, Sodium bisulfite, 4%, in HCl, 0.25 mol/l」により調製した。
- 3) シッフ試薬c: シッフ試薬bをさらに pH 2.4 に調整した。

3. 操作法

自家製試薬によるキット法及び従来法による操作は表1のとおり, 変法は従来法のうちシッフ試薬浸漬後の亜硫酸水を削除した方法で行い, 表2に示したようなシッフ試薬, 操作法の組合せについて検討した。唾液消化試験は前項「Iの3 操作法」と同様に行った。

4. 判定基準

各操作法による染色性は糸賀ら¹⁰⁾の判定基準(図1)に基づき, 好中球とリンパ球について陽性率, 陽性度を用いて比較した。

陽性率: 一種類の細胞 100 個中の陽性細胞数を%で表す。

陽性度: 一種類の細胞 100 個について各型の細胞数とその点数の積の総和。

表1 PAS染色法

操 作 法	従 来 法	キット法
固 定	10分	
水 洗	流水5分	
1%過ヨウ素酸液	5分	20分
水 洗	蒸留水5分ずつ2回	流水5分
シッフ試薬	15分	20分
亜硫酸水	5分ずつ2回	
水 洗	流水10分	
後 染 色	ギル No.3 ヘマトキシリン液10分	
水 洗	流水15~30秒	
乾 燥		
封 入		
鏡 検		

表2 自家製シッフ試薬による検討

シッフ試薬	操 作 法
a	従 来 法 変 法 キ ャ ッ ト 法
b	変 法 キ ャ ッ ト 法
c	キ ャ ッ ト 法

図1 PAS反応陽性型の判定基準¹⁰⁾

結 果

I キット法と従来法との染色性の検討

キット法による方法(図2)は従来法と変りなく染色され、キット法の方が染まりがやや強かった。唾液消化試験は両者ともほぼ同様に消化されていた。

II 自家製試薬によるキット法の染色性の検討

各種操作法における好中球、リンパ球の染色性を図3、4に示した。

シッフ試薬aを用いた場合(図5)、好中球の染色性をみると、変法とキット法は従来法と同様あるいはそれ以上に陽性率、陽性度が高値を示した。リンパ球の染色性をみると、キット法は従来法以上に陽性率、陽性度が高値を示し良好であったが、変法による染色性は不良であった。また、キット法では血小板もかなり強く染色されていた。

シッフ試薬bを用いた場合(図6)、好中球については変法、キット法ともにシッフ試薬aによる従来法と比べほぼ同様の染色性を示したが、リンパ球の染色性は不良であった。

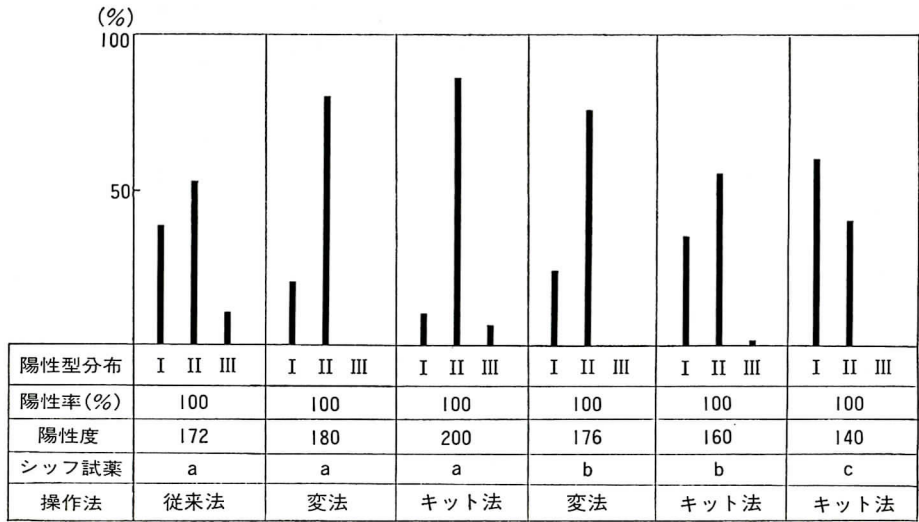


図3 各種操作法における好中球の染色法

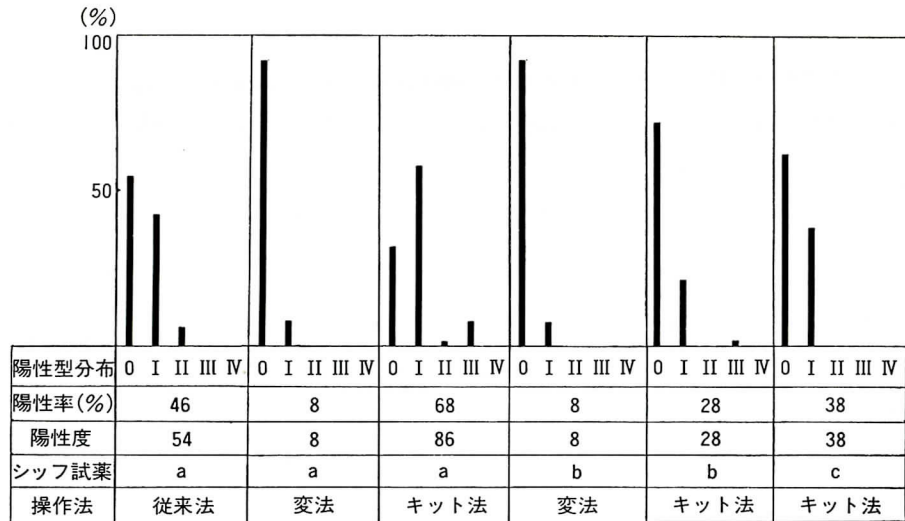


図4 各種操作法におけるリンパ球の染色法

さらに、変法、キット法ともにバックに桃色がかなり残っており、キット法では血小板の染まりがかなり弱かった。

シッフ試薬cを用いた場合、リンパ球の染色性は不良で、好中球についても染色性が低下していた。

唾液消化試験の結果は、いずれも同程度に消化されていた。

考 察

PAS染色の原理は、過ヨウ素酸が多糖類の1, 2-グリコール基群を酸化し、アルデヒドを生じ、次にシッフ試薬と作用させるとシッフ試薬の塩基性フクシン（亜硫酸と塩酸により無色フクシンとなっている）がアルデヒドと作用し、赤色または紫赤色の物質が形成されるという二つの過程からなる呈色反応であると要約される¹⁵⁾。この際、シッフ試薬浸漬後、水洗する前に亜硫酸水に通していた。これは、水洗だけではシッフ試薬の除去が完全とはいえず、フクシンが再生されて、バックグランドが赤味を帯びて、良好な標本とはいえなくなるからである。ところが今回、シッフ試薬浸漬後、亜硫酸水に通さずに、直接流水水洗を行うPAS染色キット「アスカ・シグマ」を用いて染色を行ったところ、従来法よりもPAS陽性物質の染色性は強く、バックグランドもきれいな標本が得られた。

どのような原因で亜硫酸水を通さなくても良好な標本が得られたのか、従来法とキット法の操作法の違いは亜硫酸水を通すか否かの他に、大きな違いは表1に示すように過ヨウ素酸液による処理時間とシッフ試薬の反応時間が上げられる。過ヨウ素酸液による酸化は、低温でかつ短時間内に行われた条件のもとでは高度の特異性を示すが、高温で作用させたり、その作用時間が長くなると、この酸化反応はもはや特異的とはならず種々の物質が酸化され、アルデヒド以外の生成物を生ずる¹⁵⁾。また、酸化時間が長いために反応が進み、アルデヒド基がさらにカルボキシル基にまで酸化され、シッフ試薬による呈色反応を失うことになる¹⁶⁾。従って、処理時間は15分を越えてはいけなるといわれており、従来法でも5分となっているが、キット法では20分となっていた。さらに、シッフ試薬による反応時間も長時間となると、アルデヒド基とシッフ試薬との呈色反応ばかりでなく、1, 2-グリコール基以外の近縁基との反応及び弱い活性基との反応も生じ、さらに非特異的呈色反応（シッフ試薬の酸化による再呈色色素との物理的結合）が出現する、すなわち過染、共染が起る¹⁶⁾。従来法では15分、キット法では多少長く20分となっていた。このようなキット法による操作を行うと非特異的の反応が起ってもおかしくないのだが、実際には起っていない。本染色により組織化学的に陽性を呈する物質は単純多糖類（キチン、胃粘液、真菌被膜）、酸性粘液多糖類の一部（モノ硫酸ヘパリン）、粘液蛋白（サイログロブリン、ゴナドトロピン、顎下腺ムコイド）、糖蛋白、糖脂質、アミロイド、その他をあげることができるが、血球内のPAS可染物質がいずれに属するかは各種の方法を用いて同定しなくてはならないが、多くはグリコゲンであるとされる。グリコゲンを他の粘液多糖類、粘液蛋白、糖蛋白から区別するために唾液消化試験がある。グリコゲンは唾液中のアミラーゼにより水解を受け、この操作後にPAS染色をした場合は不染となる。キット法について唾液消化試験を施した結果、従来法とほぼ同様に消化されており、非特異的の反応もないと証明された。

従来より使用されてきたシッフ試薬aを用いても、キット法による操作で染色を行うと従来法と同様の染色性を示し、キット中のシッフ試薬でなくても充分染色可能であった。

また、従来法の操作法のうち亜硫酸水を通す過程だけ削除した変法では染色不良であり、キット法の操作法で亜硫酸水を通さなくても良好な標本が得られたことは、第一には過ヨウ素酸液による処理時間及びシッフ試薬の反応時間など操作法の違いが大きく影響していると思われた。

その他にシッフ試薬についてみると、キット中のシッフ試薬による染色が最も良好であったが、その処方を見ると、従来のシッフ試薬に比べ全般的に高濃度であった。このシッフ試薬の pH は測定できなかったが、その処方に準じ調整してみたところ（シッフ試薬 b）pH 1.4 であったが、シッフ試薬 b 及び、pH 2.4 に修正したシッフ試薬 c を用いたキット法による染色は不良で、キット中のシッフ試薬とは同一のものとは考えられず、今のところキットのような良好なシッフ試薬は得られていないが、キットが高価であることより今後の検討課題であると思われる。

結 語

血液塗抹標本の PAS 染色において、シッフ試薬浸漬後、亜硫酸水に通すことなく、直接流水水洗を行う PAS 染色キット「アスカ・シグマ」による染色は、非特異的反応もなく従来法以上に良好な染色性を示した。また、従来より処方されてきたシッフ試薬を用いた場合でもキットと同様の操作法により染色を行うと従来法と同様の染色性を示し、充分染色可能であった。

参 考 文 献

- 1) McManus, J. F. A. : Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 158, 202, 1946.
- 2) Hotchkiss, R. D. : A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.*, 16, 131-141, 1948.
- 3) Wislocki, G. B., et al. : The occurrence of the periodic acid-Schiff reaction in various normal cell of blood and connective tissue. *Blood*, 4, 562-568, 1949.
- 4) 松岡松三, 速水一雄 : PAS 陽性リンパ球および異型リンパ球の臨床的意義. *臨床免疫*, 1, 149-154, 1969.
- 5) 速水一雄 : リンパ球のPAS 反応に関する臨床的研究. *新潟医学会誌*, 84, 174-187, 1970.
- 6) 小黒昌夫, 他 : リンパ球の PAS 反応に関する臨床的研究. 第 2 報 感染症における PAS 陽性リンパ球. *臨床血液*, 6, 72-73, 1965.
- 7) 小黒昌夫 : PAS 陽性淋巴球に関する臨床的研究. 第 3 報 肝炎におけるその臨床的意義. *日血会誌*, 30, 644-645, 1967.
- 8) 小黒昌夫 : PAS 陽性淋巴球に関する臨床的研究. *日血会誌*, 31, 435-436, 1968.
- 9) 小黒昌夫, 速水一雄 : 血液塗抹標本（ギムザ染色標本を含む）における PAS 反応の方法とその臨床的意義. *臨床病理*, 13, 7-13, 1965.
- 10) 糸賀 敬, 他 : 多糖類 PAS 染色法（簡便法を含めて）. *臨床病理*, 特集13, 55-64, 1967.
- 11) 小黒昌夫, 他 : 血液塗抹標本における PAS 反応の簡便法—リンパ球を中心として—. *臨床病理*

- 16, 846-848, 1968.
- 12) 川越裕也, 他: 塗抹標本の迅速 PAS 染色法. 臨床病理, 17, 735-738, 1969.
 - 13) 小黒昌夫, 笠原 脩: 血球 PAS 反応の評価に関する二, 三の基礎的問題. 臨床病理, 19, 477-480, 1971.
 - 14) 山田久子, 他: リンパ球 PAS 反応に影響をおよぼす諸条件. 衛生検査, 19, 67-68, 1970.
 - 15) 小黒昌夫: PAS 反応. 臨床病理, 特集48, 43-71, 1982.
 - 16) 須藤嘉子, 他: PAS 染色と PAM 染色. 臨床検査, 24, 1103-1106, 1980.

(1986年9月30日 受付)