

PAS反応の原理とポイント

1. PAS(Periodic Acid Schiff)反応の原理

- ・過よう素酸で多糖類 α -グリコールを酸化しアルデヒドの生成
- ・Schiff's reagent(シッフ試薬)の調製とアルデヒドとの反応

2. (ボイルド)シッフ試薬とコールドシッフの違い

3. グリコーゲンとアミラーゼ消化試験

4. PAS反応の染色操作とポイント

第109回日本病理組織技術学会

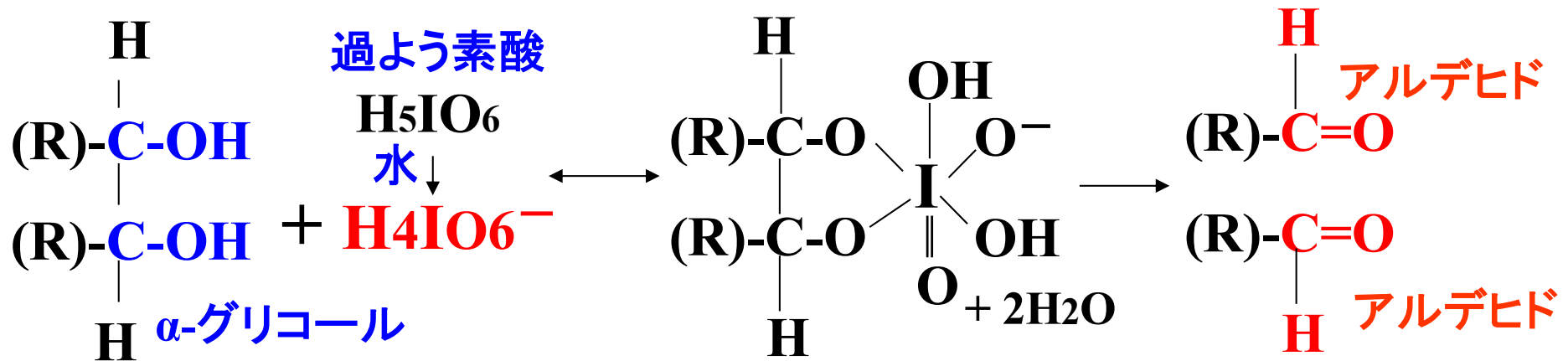
2024年 3月 3日

渡辺 明朗

PAS(Periodic Acid Schiff)反応/過よう素酸・シッフ試薬染色

①酸化剤(過よう素酸Periodic Acid)で多糖類などの α -グリコールを酸化し、**アルデヒド**を生成させる。

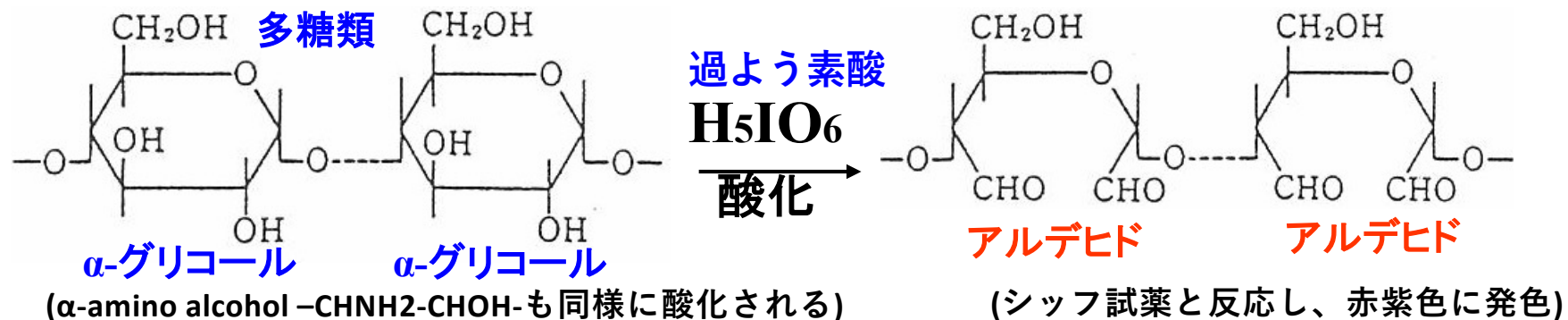
②生成した**アルデヒド**に**Schiff試薬**を反応させ、その部位を赤紫色に発色させる。



多糖類や糖タンパク中の α -グリコール(隣接する2つのOH基)

過よう素酸 H_5IO_6 は水中で**陰イオン** H_4IO_6^- の形で存在

α -グリコールが過よう素酸(水中で H_4IO_6^-)で酸化されると、 α -グリコール部分が酸化開裂し、2つの**アルデヒド-CHO**(シッフ試薬と反応する官能基)が生成する。



①酸化剤:(オルト)過よう素酸H5IO6とメタ過よう素酸HIO4(両者共PAS染色に使用可能)

過よう素酸 H5IO6 (オルト 過よう素酸)	オルト(ortho) は水化(水和)度が最も高いものを指し、オルト体が安定であり“ オルト 過よう素酸”は、単に“ 過よう素酸 ”という。 オルトリン酸も通常は、単に“ リン酸 ”という。
メタ 過よう素酸 HIO4	メタ(meta) は水化(水和)度が最も低いものをさし、このメタ過よう素酸を水に溶解すると(オルト)過よう素酸になる。 従ってメタ過よう素酸は過よう素酸と同様にPAS染色用酸化剤として使用可能。 $\text{HIO}_4(\text{メタ過よう素酸}) + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_5\text{IO}_6(\text{過よう素酸})$

②酸化力:(メタ)過よう素酸ナトリウムNaIO4 < 過よう素酸H5IO6

過よう素酸 H5IO6	pH低め	(メタ)過よう素酸ナトリウムの水溶液はpHが少し高くなり、その結果粘液の糖蛋白は負(－)荷電になり、 負(－)の過よう素酸イオンH5IO6⁻と斥力が働き、同一濃度では酸化力が少し弱くなる。
(メタ)過よう素酸ナトリウム NaIO4	pH高め	

③酸化剤 過よう素酸とクロム酸の違い

酸化剤	染 色	酸化力	酸化力の違い
過よう素酸 H5IO6	PAS、PAM	穏やか	-CHOH-CHOH- → -CHO CHO- 0.5-1%H5IO6、約10分酸化でアルデヒドで止まり、酸化反応をコントロールしやすい。
クロム酸 H2CrO4	グロコット	強い	-CHOH-CHOH- → -CHO CHO- → -COOH HOOC-(カルボン酸) 酸化時間等により、酸化の程度が変化するので、酸化条件を厳しく管理する必要がある。

グルカン多糖類

OH OH OH OH
細胞壁
真 菌

→

OH OH
他の菌体など

→

クロム酸
適切に酸化

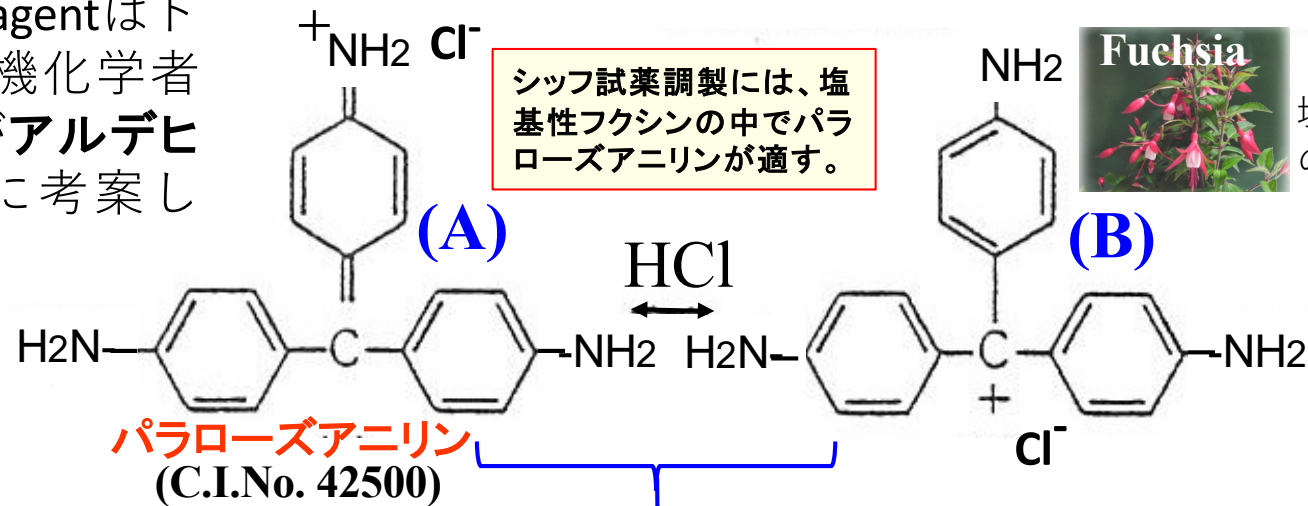
CHO CHO COOH COOH
細胞壁
真 菌

→

COOH COOH
他の菌体など

シッフ試薬(Schiff's reagent)の調製の化学

Schiff's Reagentはドイツの有機化学者H. Schiffが**アルデヒド**検出用に考案した試薬



シッフ試薬調製には、塩基性フクシンの中でパラローズアニリンが適す。

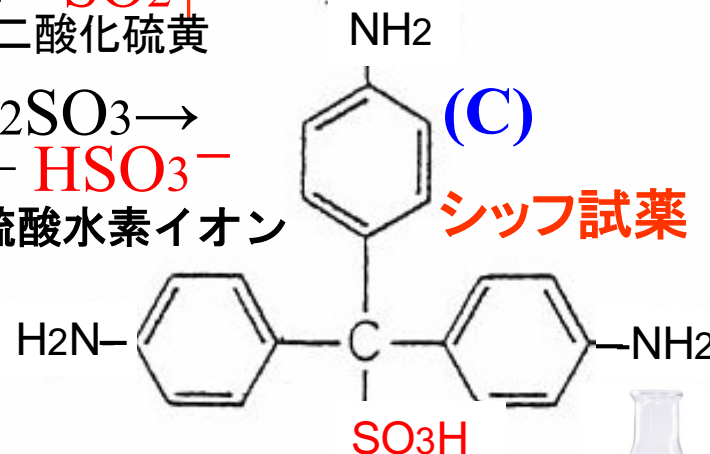
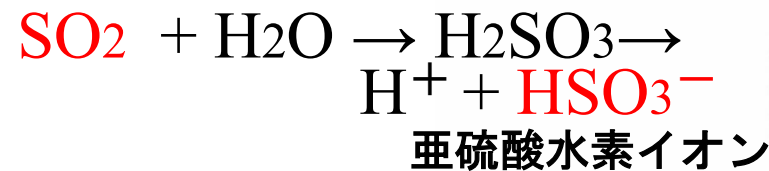
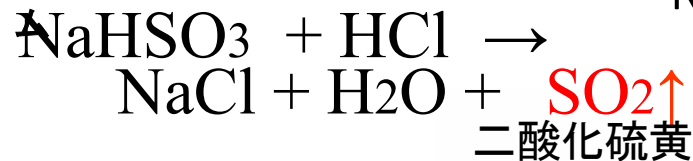


塩基性フクシン水溶液の写真はNETから引用



(赤紫色)

亜硫酸水素ナトリウム



塩酸/亜硫酸水素ナトリウム水溶液から二酸化硫黄(通称"亜硫酸ガス",SO₂)が生成し、その二酸化硫黄が水の中で亜硫酸H₂SO₃となり、イオン化した亜硫酸水素イオン(HSO₃⁻)が**パラローズアニリン**と反応し、シッフ試薬(C)が生成する。シッフ試薬は左の化学構造式のようにベンゼン環同士は二重結合が共役(一つ置きに存在)でなく、その結果無色となる。



活性炭(C)

調製したシッフ試薬が黄～橙色を呈する場合、活性炭処理し、原料色素由来の不純物を除去する。但し、活性炭の量が多すぎるとシッフ試薬の染色力弱くなる。



(無色)

シッフ試薬の保存条件と二酸化硫黄ガス蒸発による劣化と対応

1) シッフ試薬の保存条件

A) 市販品未開封品→冷所(約25℃以下)

B) 開封品、染色用容器に入れた液→密栓・冷蔵

重要: 使用時シッフ試薬は室温に戻して使用 !

(参考: 化学の通則: 温度10℃低いと、反応速度は約半減する。)



2) 二酸化硫黄ガス(亜硫酸ガス)蒸発によるシッフ試薬の劣化と対応

シッフ試薬からの二酸化硫黄ガス SO_2 (別名: 亜硫酸ガス、卵の腐った匂い)の蒸発をいかに防ぐかが重要。そのために低温(SO_2 ガスは低温ほど水に溶解やすく蒸発しにくい)また密栓保存する(使用中の液の容器はラップやパラフィルムなどで包む)。

シッフ試薬から二酸化硫黄が蒸発してくると、パラローズアニリンが生成し、液が**ピンク色**を呈して、徐々に劣化する(染色力の低下、他)。

対応↓

亜硫酸水素ナトリウム NaHSO_3 を0.1%濃度でシッフ試薬へ添加すると、シッフ試薬は無色となり、ある程度再生利用可能となる¹⁾。

参考文献1) 田口勝二: 第106回日本病理組織技術学会 “PAS反応の安定化のための提案”

<https://www.sasappa.co.jp/jsht/program106-3/>

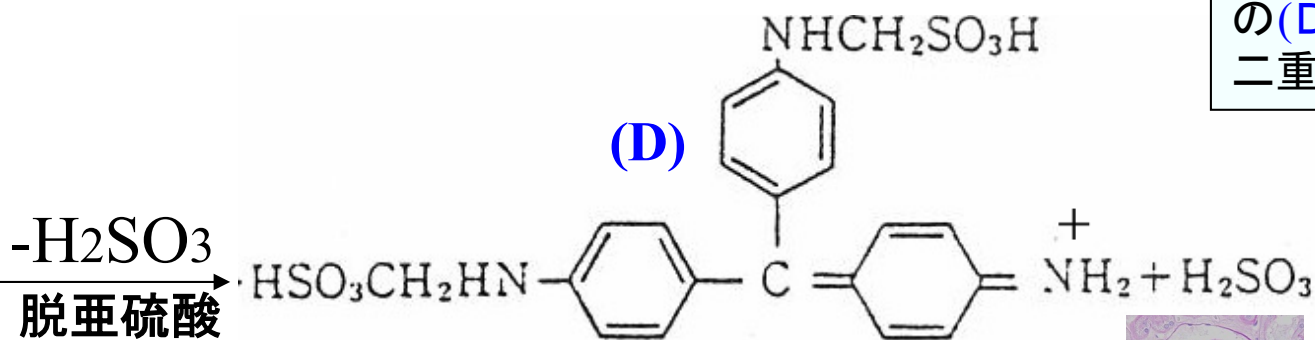
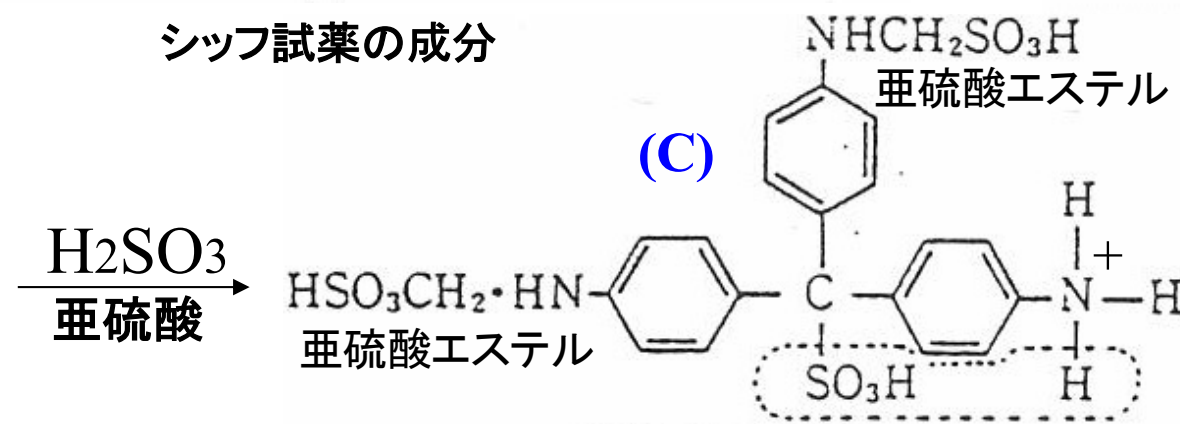
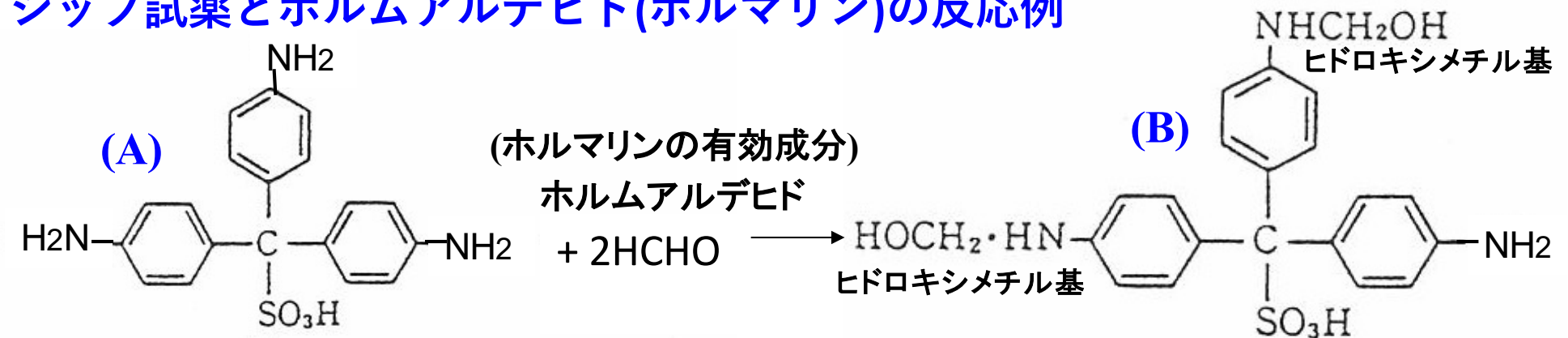
参考: Rochester大学HP上の染色液&試薬溶液の安定期間

シッフ試薬(Lillie変法): 1年 過よう素酸水溶液: 6カ月

<https://www.urmc.rochester.edu/urmc-labs/pathology/stainsmanual/index.html?LIEBCRYSTALVIOLETMETHODFORAMYLOID>

PAS反応のメカニズム(Hôrmannの考察)

シッフ試薬とホルムアルデヒド(ホルマリン)の反応例



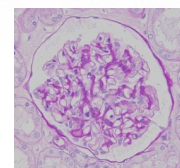
(シッフ試薬中や
水洗過程などで)

シッフ試薬とホルムアルデヒド反応生成物

赤紫色に発色

シッフ試薬(A)がアルデヒドに結合し(B)となる。この段階では未発色(切片をシッフ試薬に浸漬した直後は切片の発色はわずかである)。(B)のヒドロキシメチル基(-CH₂OH)の水酸基と亜硫酸とが反応して亜硫酸エステル(C)が生成し、水洗などで亜硫酸(H₂SO₃)が脱離して、キノイド構造の(D)が生成し、他のベンゼン環と二重結合が共役系になり発色する。

シッフ試薬はアルデヒドと反応し共有結合を形成するので、水洗やアルコールなどでPAS発色生成物は溶出・分別されない。結合の強さ: 水素結合 < イオン結合 < 共有結合



(ボイルド)シッフ試薬とコールドシッフの違い

	(ボイルド)シッフ試薬	コールドシッフ
組成	パラロースアニリン 0.5g 亜硫酸水素ナトリウム ^{注1} 0.5g 1N塩酸 10ml + 精製水 100ml	パラロースアニリン 1g 二亜硫酸ナトリウム ^{注1} 1.9g 0.15N塩酸 100ml
調製法	上記を 加熱 混合調製	上記を 室温 混合調製
染色力	(ボイルド)シッフ試薬 < コールドシッフ	
共染	(ボイルド)シッフ試薬 < コールドシッフ	
	コールドシッフは染色強度が強く、PAS陽性部位は強く発色する利点があるが、組織全体に糖成分が広く分布する組織切片では、共染も強くなる。従って、コールドシッフで共染が強い場合染色時間を短くする(PAS反応は不可逆反応で、共有結合による強い結合が関与しているので分別は不可能となる)。また切片が厚いと、PAS陽性成分濃度が高くなりその分強く発色し、共染のリスクが大きくなる。	

注1：亜硫酸水素ナトリウム(別名：重亜硫酸ナトリウム)NaHSO₃は室温で不安定で、市販の亜硫酸ナトリウムは、その水和物の二亜硫酸ナトリウム(別名：ピロ亜硫酸ナトリウム) Na₂S₂O₅が主成分である。(2NaHSO₃ - H₂O → Na₂S₂O₅)

シッフ試薬の染色強度のメーカー間差やロット間差

- ①メーカーにより色素濃度が異なり、染色強度が異なる。
- ②原料のパラロースアニリンの含有量or純度のロット間差により、シッフ試薬のメーカー間及び製造ロット間で少し染色強度が異なることも考えられる。

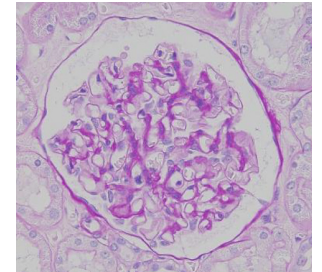
米国Biological Stain Commissionの色素規格例：Pararosanilineの含有量：min.88%

PAS反応(染色)陽性成分の代表例

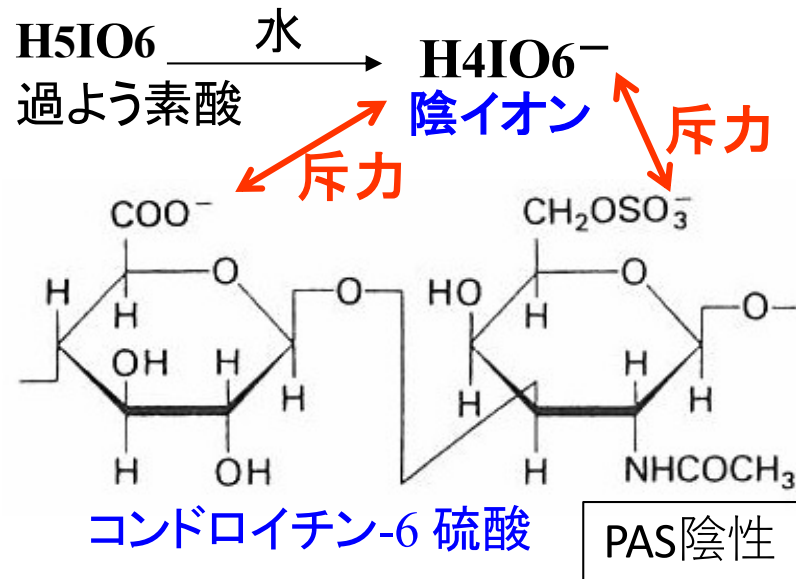
分 類		PAS反応	代表的成分
単純多糖類		+	グリコーゲン
複合多糖類	糖蛋白	+	中性ムチン (粘液)
	糖脂質	+	ガングリオシド
	酸性ムコ物質	— (+)注	コンドロイチン硫酸 ヒアルロン酸

一般的にPAS陽性成分(多糖類など)の濃度に比例して、PAS反応で強く赤紫色に発色する。

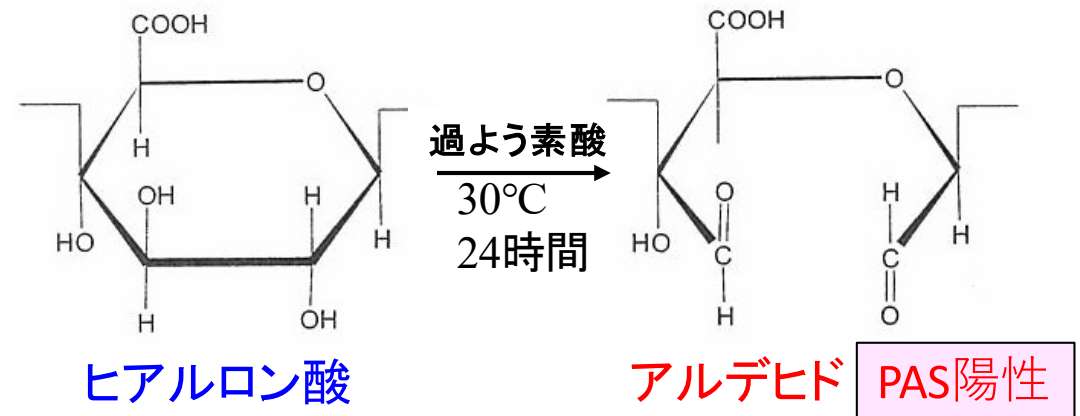
基底膜には成分としてPAS反応陽性成分の糖蛋白が含まれPAS反応で染まるが、糖成分の濃度が低いので、粘液などに比べるとPAS反応の染まりは淡くなる。



注: 負(一)荷電の酸性ムコ物質(ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸)は、同じ負(一)荷電の過よう素酸イオン H_4IO_6^- とは斥力が働き、通常の酸化条件(室温、10分)では酸化されなく、PAS陰性となる。

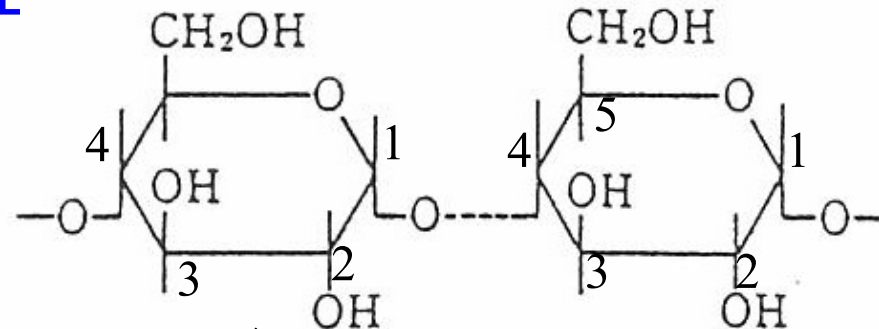


弱い陰イオン性のヒアルロン酸は、過よう素酸で加温、長時間酸化するとアルデヒドが生じ、PAS陽性となる。

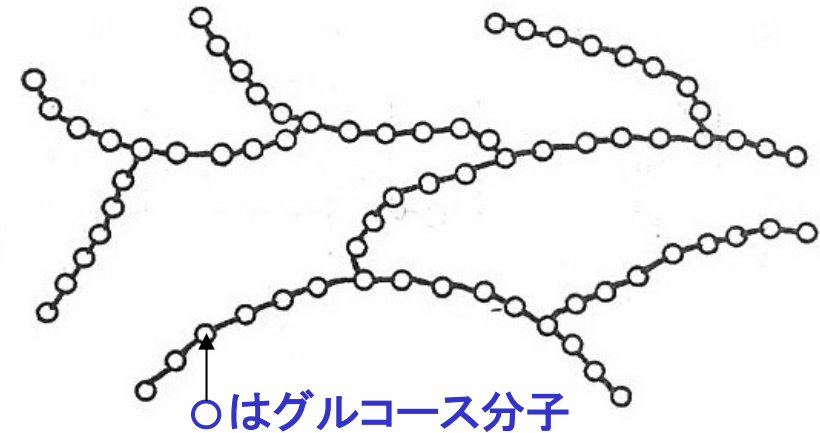


アミラーゼ消化試験(目的:種々PAS陽性物質の中からグリコーゲンの鑑別)

1) グリコーゲンの化学構造と種類及び溶解性



数字はグルコース分子構造上炭素の番号
グルコース2分子(1→4結合)



肝臓グリコーゲン 分子量: $5-10 \times 10^6$ 筋肉グリコーゲン 分子量: $1-2 \times 10^6$

グリコーゲンは種々の分子量があり、低分子グリコーゲンは水溶性のため、水を使用する標本作製過程で多くが溶出する。

低分子グリコーゲンも染める場合、“アルコール性シッフ試薬”やアルコール濃度の高い試薬溶液(例、アルコール性過よう素酸)や洗浄液を使用する染色法がある。

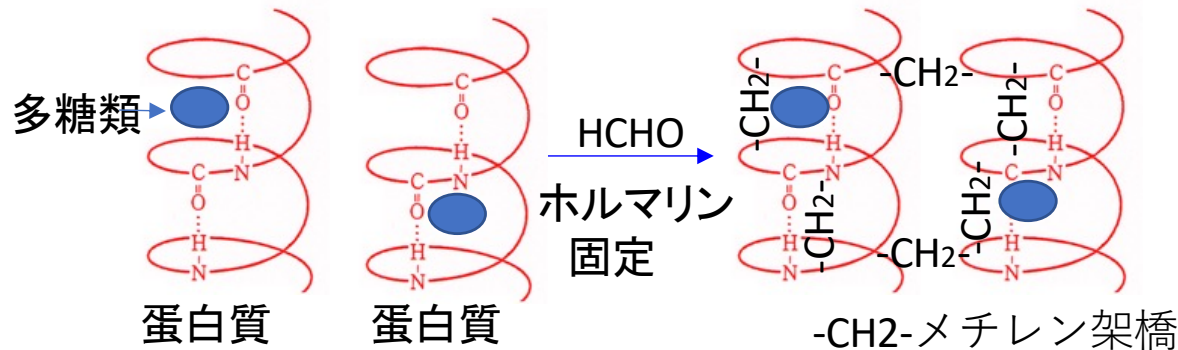
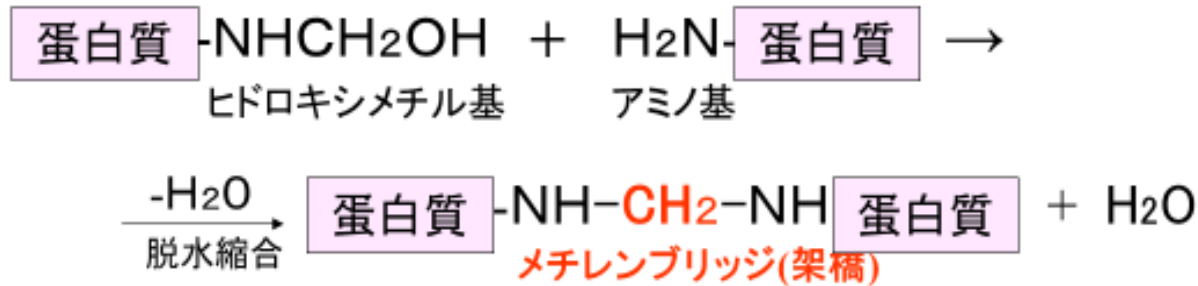
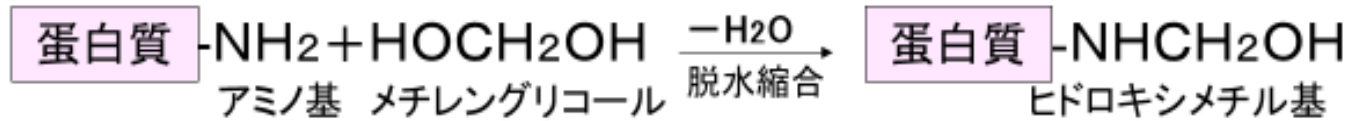
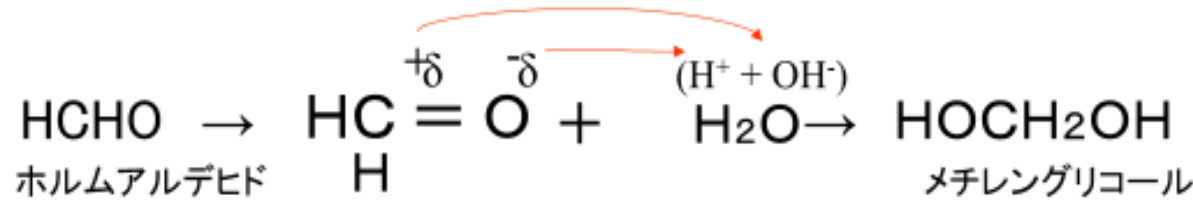
2) アミラーゼ消化試験

α -アミラーゼ(別名:ジアスターゼ)はグリコーゲンなどの $\alpha 1 \rightarrow 4$ を加水分解し、グリコーゲンを溶解する。唾液には α -アミラーゼが含まれ、アミラーゼ消化試験に使用可能。

注意: Gradeの低いアミラーゼは蛋白分解酵素を不純物として含有

不純物としての蛋白分解酵素が粘液の主成分である糖蛋白の蛋白部分を分解し、その結果粘液が溶出するので、粘液がPAS偽陰性になるリスクがある。厳密な検査には、蛋白分解酵素不含のアミラーゼを使用すべき。

ホルマリン固定の原理とPAS陽性成分多糖類



ホルマリン中の有効成分であるホルムアルデヒド(HCHO)は水溶液中では、ほとんどが1水和物のメチレングリコール(HOCH₂OH)の形で存在し、蛋白質中のアミノ基(NH₂)と反応(脱水縮合)し、ヒドロキシメチル基が生じ、これがさらに他のアミノ基(NH₂)と反応(脱水縮合)し、蛋白質分子内及び分子間でメチレン架橋(ブリッジ)が形成され、蛋白質がより高分子になり安定化し、組織を固定する。

多糖類のホルマリン固定について

- ①複合多糖類: 糖蛋白の場合、その蛋白質部分がホルマリンでメチレン架橋が形成され、固定される。
- ②単純多糖類: グリコーゲンとは反応しなく、固定・保持されない。が、組織蛋白をホルマリンで固定することにより蛋白分子内・分子間で高度にメチレン架橋されると、蛋白内部に存在するグリコーゲンはその網目内にトラップされ、溶出しにくくなる効果がある。

PAS反応(染色)操作とポイント

①脱パラ、水洗、蒸留水で軽く洗う。

水洗後、水道水中の有機物等を蒸留水水洗で除去。蒸留水水洗しないと、過よう素酸が有機物の酸化に消費され過よう素酸が早く劣化する。

また水洗過程で水溶性の多糖類(例、グリコーゲン)は溶出のリスクがある。

水道水中 不純物例	水道法上 水質基準値
有機物	max. 5mg/L

②0.5 or 1%過よう素酸水溶液に約10分浸漬し、酸化

0.5%過よう素酸は1%濃度より酸化力が早めに低下するので、早めに液を新調する。組織成分の多糖類や糖タンパク中の α -グリコールを酸化し、アルデヒドCHOにする。

酸化時間: 酸化力の穏やかな過よう素酸の酸化時間はかなり幅がある。文献上では、1%過よう素酸、30-120分酸化でも、 α -グリコールはアルデヒドCHOで留まる。

③約5分間水洗後、約5-10秒蒸留水で洗う

切片に残留する酸化剤の過よう素酸を流水水洗で完全に除去する。過よう素酸がシッフ試薬に持ち込まれるとシッフ試薬が酸化され、パラローズアニリンが生じて液がピンク色を呈するようになる。水洗後水道水由来の有機物などを除去するため軽く蒸留水水洗する。

④シッフ試薬又はコールドシッフ 室温、10～15分浸漬

染色力の強いコールドシッフの染色時間は短めでOK。シッフ試薬を冷蔵庫から出して液温が低いままだとシッフ試薬の染色強度が弱く、染色が淡くなる。

従って、冷蔵のシッフ試薬は室温に戻して染色に使用。

⑤亜硫酸水I、II、III洗浄 各3分

シッフ試薬と同じ溶媒組成である亜硫酸水(塩酸/亜硫酸水素ナトリウム水溶液)で切片上の残留シッフ試薬を洗い流す。本操作せず直接水洗に入ると、シッフ試薬が酸化されて生じる正(+)荷電の塩基性色素である赤紫色パラローズアニリンが非特異的に染色し偽陽性の原因となる。

参考: 欧米の文献・書籍では、シッフ試薬で染色後、激しく水洗(例、流水水洗5分)することにより亜硫酸水処理を省略してるPAS染色法が多く紹介されている。

⑥流水水洗 5～10分

長時間流水水洗の目的の考察

A) 推薦による反応中間体の脱亜硫酸による発色の増強

シッフ試薬がアルデヒドに結合した第一段階の反応生成物(トリフェニルメタンの中心炭素原子にスルホン酸基が結合したもの)は、まだ無色のままである。シッフ試薬への浸漬及び亜硫酸水洗浄の段階でも発色は徐々に起こるが、この水洗の段階でもその第一段階の反応物から亜硫酸が脱離して発色すると考えられる。したがってこの水洗は十分に行う必要がある。

B) 亜硫酸水由来の酸の除去による組織の好塩基性の回復

亜硫酸水由来の塩酸などが残留すると、組織の好塩基性は低下し、ヘマトキシリンの核染が弱くなるので、十分な流水水洗で酸を除去する。

(コールドシッフの0.15N塩酸のpH値→ 約0.82)

⑦マイヤーヘマトキシリンで核染

核を選択的に染め、塩酸分別不要の進行性染色液のマイヤーヘマトキシリンでHE染色時より、少し薄めに核染を行う。核が薄い染まりの方が、PAS陽性部位が観察しやすくなる。染色時間はヘマトキシリン染色液の染色強度などに依存する。

⑧水洗、色だし

⑨アルコール脱水後キシレンで透徹、封入