

## 大腸癌における PB/KOH/PAS 染色の意義

川崎医科大学 人体病理学Ⅱ教室

山成 憲子, 真鍋 俊明, 山下 貢司

(昭和58年7月21日受付)

### PB/KOH/PAS Staining in Colonic Cancer

Noriko Yamanari, Toshiaki Manabe  
and Koshi Yamashita

Department of Human Pathology II  
Kawasaki Medical School

(Accepted on July 21, 1983)

**Periodate borohydride/potassium hydroxide/periodic acid-Schiff (PB/KOH/PAS) 染色を種々の腺癌組織に応用し、大腸癌同定におけるその有用性について検討した。PB/KOH/PAS 染色は、糖鎖の非還元末端に位置する sialic acid の種類を組織化学的に識別できる方法で、O-acylated sialic acid を多量に含む大腸粘液をほぼ特異的に染め出すことが可能である。盲腸部腺癌では78%に、結腸癌では35%に、直腸癌では33%に陽性であったが、未分化になればなるほど陰性となることが多かった。偽陽性例として、卵巣癌10例中1例の癌細胞内および胃癌11例中1例に管腔内粘液陽性を認めた。これらの結果より、本法は陰性例、偽陽性例も多少みられることを考慮に入れば、大腸癌同定の補助手段としてある程度まで利用できるといえると考えた。**

また、粘液についても一般的に概説を加えた。

Periodate borohydride/potassium hydroxide/periodic acid-Schiff (PB/KOH/PAS) has been utilized in order to identify primary adenocarcinoma of the large intestine. PB/KOH/PAS can histochemically demonstrate a certain type of sialic acids located at non-reducing end of the sugar, thereby specifically staining O-acylated sialic acid in the large intestine. In our study, PB/KOH/PAS was positive in 78% of caecal adenocarcinomas, 35% of colonic adenocarcinomas, and 33% of rectal adenocarcinomas. The more poorly differentiated the carcinomas were, the weaker the positivity tended to be with a large number of negative cases. Ovarian cancer (one out of ten cases) and gastric cancer (one out of eleven cases) showed positive intracellular and intraluminal materials, respectively. These results indicate that PB/KOH/PAS is useful to some extent as an adjunct in identifying adenocarcinomas of the large intestine. It is important, however, to realize that small number of gastric and ovarian cancers may give a positive reaction.

In addition, we summarize the nature of the mucin in general.

Key Words ① PB/KOH/PAS ② colonic cancer

## I 緒 言

粘液は、体内に広く存在するムコ多糖—タンパク複合体や糖タンパクである<sup>1)</sup>。概念的には上皮性粘液と非上皮性粘液に分けるのが習慣であるが、組織化学的には中性粘液と酸性粘液に大別され、酸性粘液はさらに sulphated mucin と carboxylated mucin に分けることができる。

Culling らは一連の研究で<sup>2)~8)</sup>、糖鎖の非還元末端に位置する sialic acid の種類を組織化学的に識別できるとし、ヒトの胃腸管系、特に回腸末端と大腸に存在する粘液には、特異的に O-acylated sialic acid を多量に含んでいることを明らかにした。これは、carboxylated mucin 中の O-acylated sialic acid を periodate borohydride/potassium hydroxide/periodic acid-Schiff (PB/KOH/PAS) 染色<sup>9)</sup>により特異的に染め出し、また本法を改良した periodic acid-thionin Schiff/potassium hydroxide/periodic acid-Schiff (PAT/KOH/PAS) 染色<sup>7)</sup>や、PANFOPAS 染色<sup>8)</sup>で、他の粘液と対比染色することができることによる。彼らはこれらの染色法を諸々の癌組織に応用し、大腸型腸上皮化生から発生すると考えられた少数の胃癌例を除けば、陽性細胞は大腸癌に特異的であったと報告した<sup>5)</sup>。

この報告が正しいとすれば、原発不明癌のうち、大腸を原発とするものだけを特異的に染め分け同定することができ、外科病理日常検査に重要な一手段を与えることになる。PANFOPAS 染色に必要な 3-hydroxy-2-naphthoic acid hydrazide は本邦では入手困難であり、染色中に切片の剝離をきたし易いため、我々は PB/KOH/PAS 染色のみを種々の正常組織、腫瘍組織に応用し、その有用性を再検討した。

本報告ではこの結果に加え、mucin (粘液)とは何かについても言及したい。

## II 材料及び方法

### 1) 材 料

ホルマリン固定、パラフィン包埋した人体外科材料(正常組織 69例、腺癌組織 122例)を 5 $\mu$ で薄切し使用した。用いた臓器組織、癌組織は以下の如くである。

#### 正常組織

胃 (9例) 空腸 (1例) 回腸末端 (1例) 盲腸 (2例) 結腸 (35例) 直腸 (8例) 肺 (4例) 脾臓 (2例) 胆嚢 (3例) 子宮内膜 (1例) 子宮頸部 (2例) 前立腺 (1例)

#### 腺癌組織

胃癌 (11例) 盲腸部癌 (9例) 結腸癌 (34例) 直腸癌 (9例) 肺癌 (8例) 脾臓癌 (10例) 胆嚢癌 (9例) 子宮内膜癌 (3例) 子宮頸部癌 (5例) 前立腺癌 (7例) 食道癌 (1例) 唾液腺腫瘍 (6例) 卵巣癌 (10例)

腺癌症例選択に関しては分化の程度を考慮しなかったが、いずれの組織にも未分化なものから高分化なものまで含まれている。

### 2) 染色方法

Culling らの方法<sup>5)</sup>により染色を行った。あまり知られていない方法なので、少し詳しく書くこと次の如くである。

1) 脱パラ、脱キン、水洗。

2) 1%過ヨウ素酸水溶液 60分。

3) 流水水洗 10分。

4) 水素酸ホウ素ナトリウムで還元。

solution A: 2.45% 水素酸水溶液 (冷蔵庫保存)

solution B: 水素酸ホウ素ナトリウム 1.89 g を蒸留水 167 ml に溶解 (使用時作製)

ドーズ: solution A 100 ml を入れた時点で切片が完全に浸り、最終的に solution B 167ml を加えられるもの。

縦×横×高さ = 3.5×8.5×12.5 (cm)  
のものをアクリル板で作製。

操作： ドーゼはあらかじめ水中で冷やしておき、次の操作も水中かつドラフト内で行う。solution A 100 ml を入れたドーゼに切片を浸し、その後30分かけて solution B 167ml を加え、さらにそのまま1時間放置。

- 5) 流水水洗 10分.
- 6) 70% エタノール.
- 7) 0.5%水酸化カリウム 70%エタノール溶液 30分.
- 8) 70% エタノール, 水洗.
- 9) 1% 過ヨウ素酸水溶液 10分.
- 10) 流水水洗後, 蒸留水を通す.
- 11) Schiff 試薬 30分.
- 12) 還元.
- 13) 流水水洗.
- 14) ヘマトキシリンで核染.
- 15) 脱水, 透徹, 封入.

### 3) 結果判定

赤く染色されたものを陽性とし、その程度により次の5段階に分類した。

(-)： 陰性

(±)： 陽性部分が散見される (×100)

(+)： 薄く全体的に、または部分的に陽性

(++)： 全体的に陽性

(+++): 濃く全体的に陽性

(+)~(+++)と判定したものは、すべて全体的に染まっていた。

## III 結 果

### 1) 正常組織

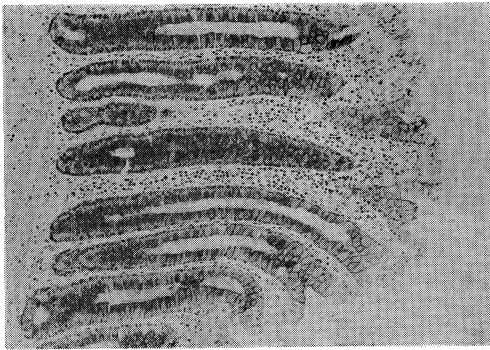
染色結果は **Table 1** の通りである。結腸 35 例中 34 例 (97%) で goblet cell, foveolar cell が陽性を示し (**Fig. 1**)、染色程度はそのほとんどが ++~+++ であった。15 例では管腔内粘液も陽性であった。直腸 8 例と盲腸 2 例 (100%) の goblet cell, foveolar cell も陽性で、染色程度はやはり ++~+++ であった。直腸例中 2 例は管腔も染まっていた。以上の様に、正常大腸粘液にはかなり特異的であった。胃は 9 例中 5 例が陽性を示し、陽性部はすべて腸上皮化生の場所で goblet cell が染まっていた (±~+)。

子宮頸部では 1 例の扁平上皮が ± の陽性を示したが、ジアスターゼ消化処理を行ったところ消化されたので、グリコーゲンが水素酸ホウ素ナトリウムでブロックされずに染め出されたこと

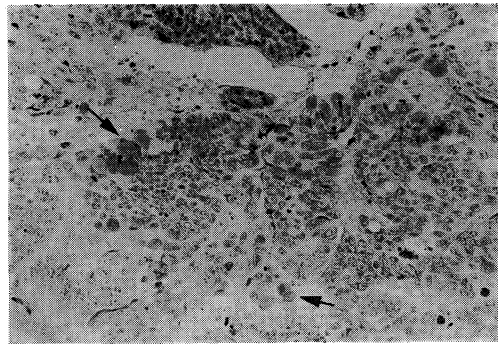
**Table 1.** Result of PB/KOH/PAS staining

(1) Normal tissue

organ	case number	positive		negative		positivity (%)	
		cytoplasm	lumen	cytoplasm	lumen	cytoplasm	lumen
stomach	9	5	0	4	9	56	0
jejunum	1	0	0	1	1	0	0
terminal ileum	1	1	0	0	1	100	0
caecum	2	2	0	0	2	100	0
colon	35	34	15	1	20	97	43
rectum	8	8	2	0	6	100	25
lung	4	0	0	4	4	0	0
pancreas	2	0	0	2	2	0	0
gall bladder	3	0	0	3	3	0	0
endometrium	1	0	0	1	1	0	0
cervix	2	0	0	2	2	0	0
prostate	1	0	0	1	1	0	0
total	69	50	17	19	52		



**Fig. 1.** Normal colonic mucosa. Goblet cells are stained purplish red in this method. (PB/KOH/PAS stain,  $\times 40$ )



**Fig. 2.** Moderately differentiated adenocarcinoma. Positive cells are scattered (arrows). (PB/KOH/PAS stain,  $\times 200$ )

思われた。

上記以外の組織は細胞、腺管内腔ともすべて陰性であった。

2) 腺癌組織

染色結果は **Table 2** の通りである。結腸癌 34 例中, goblet cell, foveolar cell が陽性を示したのは 12 例 (35%) で, 直腸癌では 9 例中 3 例 (33%), 盲腸部癌では 9 例中 7 例 (78%) であった (**Fig. 2**)。染色程度は, +~卅 と正常組織よりは多様化していた。管腔内に陽性物

質がみられたものは, 結腸癌, 直腸癌にそれぞれ 4 例ずつであった。胃癌の場合は, 管腔内に ± の陽性例 1 例を除きすべて陰性であった。また他の組織も, 卵巣癌の一例を除きすべて陰性であった。

IV 考 察

粘液とは, 結合組織や粘膜組織に広く分布しているムコ多糖-タンパク複合体や糖タンパクである<sup>1)</sup>。

**Table 2.** Result of PB/KOH/PAS staining  
(2) Cancer tissue

organ	case number	positive		negative		positivity (%)	
		cytoplasm	lumen	cytoplasm	lumen	cytoplasm	lumen
stomach	11	0	1	11	10	0	9
caecum	9	7	0	2	9	78	0
colon	34	12	4	22	30	35	12
rectum	9	3	4	6	5	33	34
lung	8	0	0	8	8	0	0
pancreas	10	0	0	10	10	0	0
gall bladder	9	0	0	9	9	0	0
endometrium	3	0	0	3	3	0	0
cervix	5	0	0	5	5	0	0
prostate	7	0	0	7	7	0	0
esophagus	1	0	0	1	1	0	0
salivary gland	6	0	0	6	6	0	0
ovary	10	1	0	9	10	10	0
total	122	23	9	99	113		

概念的には上皮性粘液と非上皮性粘液に分けられ、前者はムチン、後者はムコイドと呼ばれる。上皮性粘液とは上皮細胞が産生する粘液物質であり、非上皮性粘液は間葉系細胞により産生され、広く結合織の基質に存在するものである<sup>9)</sup>。

組織化学的には中性粘液と酸性粘液に大別され、酸性粘液はさらに sulphated mucin と carboxylated mucin に分けられる。非上皮性粘液はほとんどすべてが酸性粘液で、一般に酸性ムコ多糖類(ムコ多糖-タンパク複合体)と呼ばれているものである。一方、上皮性粘液は中性粘液と酸性粘液からなり、糖タンパクといわれているものである<sup>1),10)</sup> (Fig. 3)。

酸性ムコ多糖類にはヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ケラト硫酸などが含まれる。ヒアルロン酸は carboxylated group (-COOH) をもつ carboxylated mucin であり、残りは sulphated group (-OSO<sub>3</sub>H) をもつ sulphated mucin である。しかし、コンドロイチン硫酸とヘパリンは sulphated group と同時に carboxylated group も含んでいる

(Fig. 4)。

上皮性粘液の酸性粘液のうち carboxylated mucin は carboxylated group を含む糖が sialic acid (Fig. 5) であることから sialomucin と呼ばれる。また、sulphated group を含む sulphated mucin も存在するが、その多くは同時に sialic acid を含むことが知られており、実際には sulphated sialomucin として存在している。

上記の粘液を組織切片上で鑑別するには、periodic acid-Schiff (PAS), alcian blue (AB), Hale's colloidal iron, high iron diamine (H. I. D.) などの染色法を組み合わせる必要がある<sup>10)</sup>。(Table 3)。上皮性粘液と非上皮性粘液は PAS 染色で染め分けることができる。つまり、上皮性粘液は PAS 反応陽性であり、非上皮性粘液は PAS 反応陰性となる。また、酸性粘液の sulphated mucin と carboxylated mucin の区別は、pH の異なる AB や Hale 染色、H. I. D. 染色の組み合わせなどにより染め分けることができる。例えば、PAS 反応陽性で pH 2.5, pH 1.0 の AB ある

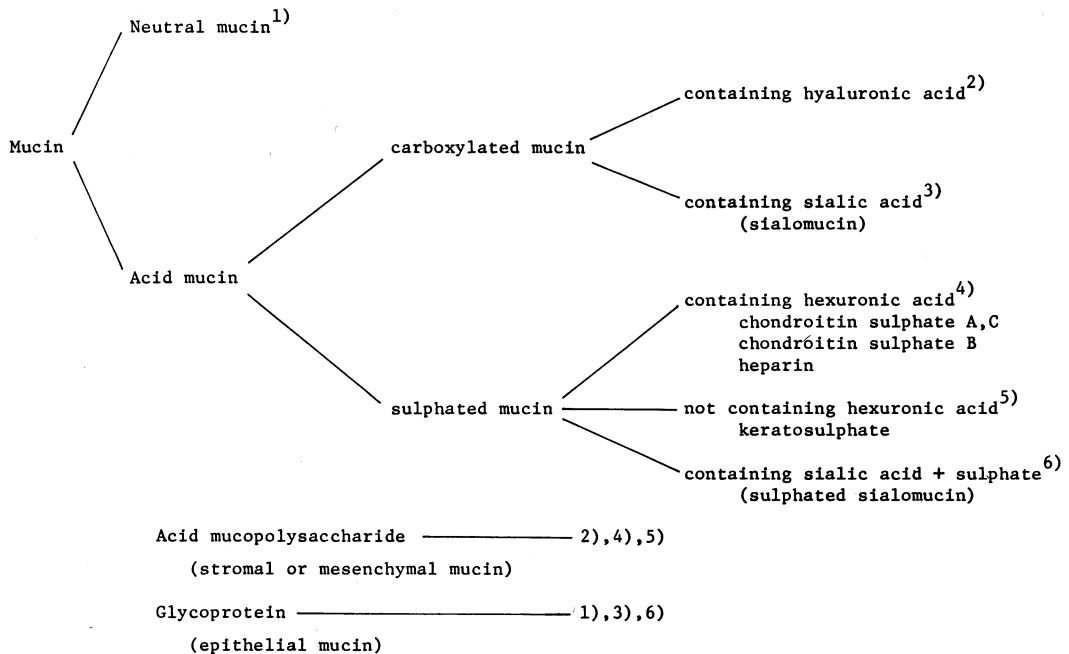


Fig. 3. Classification of the mucin.

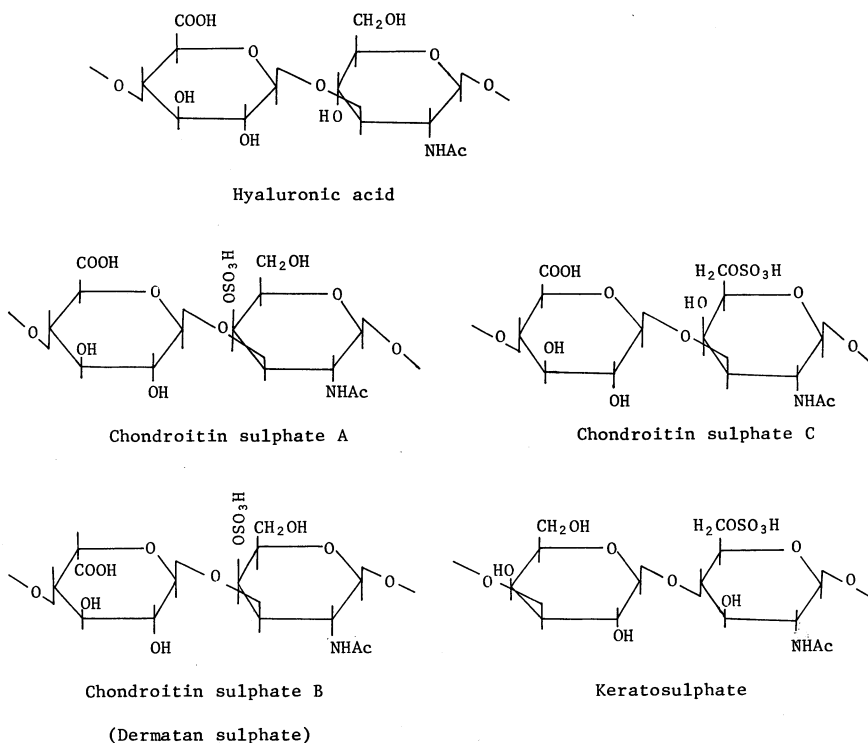


Fig. 4. Chemical structure of mucin components.

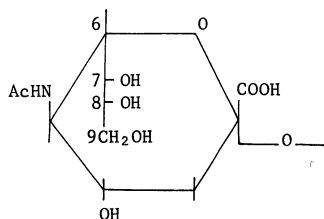


Fig. 5. Structure of sialic acid. (N-Acetyl neuraminic acid)

いは H. I. D. がともに陽性であれば、それは上皮性の sulphated mucin であり、PAS 反応陽性、pH 2.5 の AB 陽性、pH 1.0 の AB または H. I. D. が陰性であれば、それは上皮性の carboxylated mucin と同定できる。

しかし、これらの染色法は糖鎖に存在する近接水酸基や酸性基を染色に利用しているため、特定の組織や特定の細胞の粘液を特徴づけることができなかった。

Culling らは一連の研究で<sup>2)-8)</sup>、糖鎖の非還元末端に位置する sialic acid の種類を組織化

学的に識別できるようにし、またヒトの胃腸管系、特に回腸末端と大腸には、特異的に O-acylated sialic acid を多量に含んでいることを明らかにした。PB/KOH/PAS 染色は、C-7, 8, 9 位に近接水酸基をもたない O-acylated sialic acid を特異的に染め出す方法である<sup>2), 4)</sup>。Periodate-borohydride で既存の近接水酸基の染色性を排除し、その後 potassium hydroxide を作用させることにより、C-7, 8, 9 位に近接水酸基をもたない O-acylated sialic acid (C<sub>7</sub>-substituted O-acylated sialic acid は例外) のみを PAS 反応陽性にさせる (Fig. 6)。

この染色法を用いた今回の検索で陽性を示した正常組織は、大半が大腸で、胃の 9 例中 5 例においても少数の陽性細胞が散見されたが、陽性細胞はすべて腸上皮化生を示した goblet cell であった。大腸正常組織の goblet cell, foveolar cell の陽性率はほぼ 100% であり、腺癌組織では、管腔内陽性の胃癌例、卵巣癌例の計

**Table 3.** Staining methods for varieties of the mucin (modified from Culling's<sup>10)</sup>)

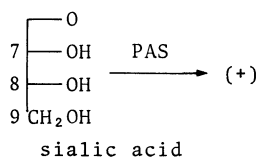
Mucin		Staining method					
		PAS	A.B. pH 2.5	Hale	A.B. pH 1.0	H. I. D.	
Acid mucopolysaccharide	carboxylated (-COOH)	hyaluronic acid	-	+	+	-	-
	sulphated (-COOH & -OSO <sub>3</sub> H)	chondroitin sulphate A&C	-	+	+	+	+
		chondroitin sulphate B	-	+	+	+	+
		heparin	-	+	+	+	+
sulphated (-OSO <sub>3</sub> H)	keratosulphate	-	+	+	+	+	
Glycoprotein	neutral (1:2 glycol)	mucins	+	-	-	-	-
	carboxylated (1:2 glycol & -COOH)	sialomucins	+	+	+	-	-
	sulphated (1:2 glycol & -COOH & -OSO <sub>3</sub> H)	sulphated sialomucin	+	+	+	+	+
		glycogen	+	-	-	-	-

PAS: Periodic acid -Schiff

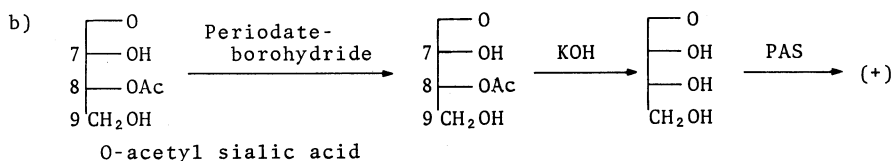
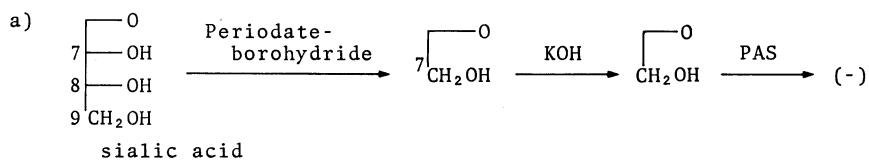
A. B.: Alcian blue

H. I. D.: High iron diamine

## 1) PAS reaction



## 2) PB/KOH/PAS reaction

**Fig. 6.** Principle of the staining reaction.

2例を除いては大腸癌にのみ陽性で、盲腸部癌、結腸癌、直腸癌に分けると、陽性率はそれぞれで78%、35%、33%であった。Cullingらは盲腸、直腸の primary adenocarcinoma の陽性率は100%、結腸のそれは70%であったと

報告しているが<sup>5)</sup>、我々の結果は、彼らの結果に比べ低かった。いずれにせよ、胃、卵巣癌例2例を除けば、大腸癌にかなり特異的であるといえる。

注意すべき点は、染色性が不確実なことがあ

るという事実である。例えば、子宮頸部の扁平上皮が陽性となった例があった場合で、ジアスターゼ消化後の染色で陰性化していることを考えると、グリコーゲンが水素酸ホウ素ナトリウムでブロックされない場合は、偽陽性を示すことがあり得ることを示している。

以前、我々は、H-E 染色標本の組織像のみから、どの程度正確に原発部位推定ができるかを検討し報告した事がある<sup>11)</sup>。組織像のみからの原発部位推定には限界があり、臨床からの情報が重要であることを強調した。また原発巣推定の補助手段として、peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法による prostate-specific antigen の同定法を検討し紹介した<sup>12)</sup>。

本報告は、原発巣推定補助手段検索の一環として用いた組織化学手段について述べたものである。我々の結果は、PB/KOH/PAS 染色が大腸癌にある程度特異的であり、補助手段として利用できることを示しているが、欠点がないわけではない。大腸癌でも、軽度の未分化癌ですら陰性になることが多く、また胃癌でも陽性癌例があり得ること、未分化癌でグリコーゲンを

多量に含むものでは陽性となるものが出得ることが推測された。

最近、大腸特異抗原 p (colonic-specific antigen-p ;CSAp) が抽出され、血清中、組織中でそれを証明することによって、大腸癌患者を同定できることが報告されている<sup>13),14)</sup>。PAP 法を用いた CSAp の同定は、ある程度まで未分化な癌をも同定しうる有用な手段となり得る。しかし、いくつかの研究<sup>15),16)</sup> から、CSAp は脾臓癌、胃癌、卵巣癌にも存在することが知られる様になってきており、組織化学的検索法である PB/KOH/PAS 染色と免疫組織化学検索法である CSAp の PAP 法には、一長一短があるといわざるを得ない。

今回、我々は PB/KOH/PAS 染色を種々の正常組織、腫瘍組織に応用し、大腸癌同定への有用性について検討し、限界はあるものの、補助手段として利用できることを示した。

稿を終えるにあたり、技術的援助及び助言をいただいた川崎医療短大検査科学生高橋良子氏、ならびに病院病理部島栄氏に深謝致します。

## 文 献

- 1) リンズ, L. 組織化学および細胞化学：理論と方法。1960, 今泉正訳, 東京, 白水社 pp. 361—409
- 2) Culling, C. F. A., Ried, P. E. and Dunn, W. L.: The effect of saponification upon certain histochemical reactions of the epithelial mucins of the gastrointestinal tract. *J. Histochem. Cytochem.* 19: 654—663, 1971
- 3) Reid, P. E., Culling, C. F. A. and Dunn, W. L.: Saponification-induced increase in the periodic acid-Schiff reaction in the gastrointestinal tract—Mechanism and distribution of the reactive substance. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 473—482, 1973
- 4) Culling, C. F. A., Reid, P. E., Clay, M. G. and Dunn, W. L.: The histochemical demonstration of O-acylated sialic acid in gastrointestinal mucins—Their association with the potassium hydroxide-periodic acid-Schiff effect. *J. Histochem. Cytochem.* 22: 826—831, 1974
- 5) Culling, C. F. A., Reid, P. E., Burton, J. D. and Dunn, W. L.: A histochemical method of differentiating lower gastrointestinal tract mucin from other mucins in primary or metastatic tumors. *J. Clin. Path.* 28: 656—658, 1975
- 6) Culling, C. F. A., Reid, P. E. and Dunn, W. L.: A new histochemical method for the identification and visualization of both side chain acylated and nonacylated sialic acid. *J. Histochem. Cytochem.* 24: 1225—1230, 1976
- 7) Culling, C. F. A., Reid, P. E., Worth, A. J. and Dunn, W. L.: A new histochemical technique of use in the interpretation and diagnosis of adenocarcinoma and villous lesions in the



- large intestine. *J. Clin. Path.* 30:1056—1062, 1977
- 8) Cooper, J. H. and Durning, R. G.: An improved histochemical method for distinguishing colonic acetylsialomucin from other epithelial mucins. *J. Histochem. Cytochem.* 29:1445—1447, 1981
  - 9) 武田勝男: 新病理学総論, 東京, 南山堂 1972, pp. 37—40
  - 10) Culling, C. F. A.: *Handbook of histopathological and histochemical techniques* 3rd ed. London, Butterworth. 1974. pp. 259—314
  - 11) 真鍋俊明, 田坂佳千, 山下貢司: 転移癌の組織像から原発部位がわかるか. *川崎医学会誌* 8:246—251, 1982
  - 12) Manabe, T., Tsukayama, C., Yamaguchi, M. and Yamashita, K.: Prostate-specific antigen; A clue for the prostatic origin of metastasis. *Kawasaki Med. J.* Vol. 9 No. 3, 1983. (in press)
  - 13) Pant, K. D., Dahlman, H. L. and Goldenberg, D. M.: A putatively new antigen (CSAp) associated with gastrointestinal and ovarian neoplasia. *Immunol. Commun.* 6:411—421, 1977
  - 14) Pant, K. D., Shochat, D., Nelson, M. O. and Goldenberg, D. M.: Colon-specific antigen-p (CSAp) I. Initial clinical evaluation as a marker for colorectal cancer. *Cancer* 50:919—926, 1982
  - 15) Pant, K. D., Dahlman, H. L. and Goldenberg, D. M.: Further characterization of CSAp, an antigen associated with gastrointestinal and ovarian tumors. *Cancer* 42:230—238, 1978
  - 16) Shochat, D., Pant, K. D. and Goldenberg, D. M.: Colon-specific antigen-p (CSAp) II. Further characterization in colorectal and pancreatic cancer. *Cancer* 50:927—931, 1982