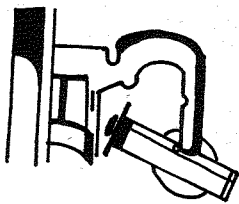




組織病理

技術簡介



溫寶香 編

病理科朱康初主任 校

一、病理室之作業：

病理學為研究疾病之學問，尤其是對引起疾病之細胞、組織與器官之構造與功能上之變化。病理學家為對正常與疾病組織之認識與診斷有高度訓練之醫師。病理學家具有多方面之任務；其一方面做為實驗室之主管並對主治醫師提供檢驗之報告與解釋報告，另外必須對醫事人員提供教育課程，並於開刀房做診斷而於解剖台則負責判斷死亡之原因。此種具多功能之任務必須具備有高度之學識、效率與判斷力。

解剖病理學家之工作主要對象為細胞與組織。細胞為所有生物之組成單位。某些功能相同細胞之集合則稱為組織 (Tissue)。正常之細胞具有固定之特徵並以一定之順序再生。受感染或腫瘤引起之疾病會導致組織之變化並破壞此順序。若發生細胞突變，怪異形狀或無法控制之不正常細胞生長，則形成良性 (Benign) 或惡性 (malignant) 之腫瘤。

若以顯微鏡研究個別之細胞則一般稱為細胞學 (cytology)。若集合專一化細胞以形成具專一功能且固定構造之組織而加以研究此組織或系統時則稱為組織學 (histology)。

病理部門需有診斷與研究性之組織病理實驗室，其技術上之步驟對實際與理論上之應用扮演重要之功能。於病理室之研究部門，則對動物、人體組織或死體加以研究，以提供診斷步驟、治療方式以及將來對疾病之預防。

於醫院之例行病理室作業，其對每天之外科與死體解剖組織加以鏡檢並由病理學家診斷。病理學家則對病人疾病做成最後診斷並決定或影響治療之方式。

組織病理技術人員則對外科或死體解剖組織切片加以處理與染色以供給病理學家之鏡檢與診斷。除了需具備學識與技術能力外，其必須對病人有強烈之責任感觀念。留意處理組織並小心操作以使獲得最佳之切片則有助於增加診斷之準確性。

例行病理實驗室之歷史，實際起源於開刀房與屍體解剖房。外科與屍體標本必須於取出後盡速送至實驗室。標本送至實驗室時必須馬上編號並仔細由病理學家加以觀察。一般之現象加以完整陳述並做成記錄後將標本加以切片並取出具代表性之組織塊，隨後則置於有孔之盒內並立即置於固定液 (fixative) 內，其可防止分解以保存組織。經過固定後，組織塊則經過一連串之溶液以沖洗、脫水，並澄清組織。隨後組織則浸潤於可使其固定之成分 (如熔解之石蜡)，其可支持細胞並使其可被切成極薄之切片。

8 組織處理步驟

大部份之例行實驗室皆以組織處理機器 (tissue processor) 自動地對組織加以沖水、脫水、澄清與浸潤。一般說，完全之步驟為先固定 18—24 小時。清晨技術人員則取出石蜡浸潤之標本加以包埋使其固化成小塊。每一小塊置於切片機 (microtome) 切片薄片。將絲帶狀之石蜡一包圍組織薄片置於玻璃片上並乾燥之。組織片置於玻片上後，將石蜡除去之並以染色液加以染色。其由於染色反應差異可幫助辨認各種不同組織成分。

表 1. 生物構造不同等級

大	小	等級	解剖	野	構造	方法
0.1 mm (100 μm) 及更大者	組	解剖	野	器官	肉眼及簡單透鏡	
100 μm 到 10 μm	組	組織	學	組織	各種不同種類之光學顯微鏡	
10 μm 到 0.2 μm (200 nm)	超	顯	顯	細胞成份	X·射線顯微鏡	
200 nm 到 1 nm	形	態	鏡	濾過性病毒	電子顯微鏡	
小於 1 nm	分	子	鏡	原子之排列	X·射線繞射	

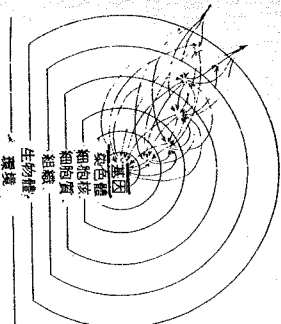


圖 1. 生物之組織等級以同心圖表示圖

染色完成後，將組織切片置於玻片下封蓋之，以做為保存。此時操作步驟已完成而可以加以鏡檢。每片切片加以適當編號後連同病人之資料送至病理專家處加以觀察。

於較小規模之醫院，組織病理技術人員亦同時操作有關細胞學之標本，如 Papanicolaou smear Chromosome study, Cell blocks 與 Membrane filter。

二、組織病理技術和細胞學的關係

細胞為生物基本構造與功能之單位。在生物體中有各種不同的組織等級，表 1 所示為研究生物體不同大小等級之分界點。各組織等級之界限係依儀器之解像力以人為賦予的。此些界限導致了解剖學、細胞學、微細構造及分子生物學之區分。所以嚴格的說來，組織病理學是細胞學的一條分支。因此組織病理學的技術和細胞學的研究技術不無關係。組織病理診斷主要是觀察已經保持形態及組成，並且經過化學以及組織化學的染色或是利用物理技術的細胞化學法處理所得到的死細胞。以下我就簡略的介紹細胞 (組織) 的固定、染色及利用物理技術的細胞化學方法，發展出來的特殊組織檢查。

三、固定 (Fixation)

組織須於循環停止後立即固定之以防止死後之分解並盡量保存生存時之構造。某些固定方法可以用來儘可能地保持細胞化學組成的完整 (例如：冷凍乾燥以及凍結置換 Freeze drying and Freeze-substitution) 或是利用加入最少量的人造物來保存活細胞構造的固定法。

適當固定法或是固定劑的選擇依所用的分析方法而定，例如，要研究細胞核和染色體，通常使用酸性固定劑 (Acid fixative) 丙酮、甲醛以及 glutaraldehyde 等，對變性的影響最小，且可以保持某些系統通常被用來作酶活性之研究。

1. 固定液之選擇：

A. 固定液之選擇主要決定於實用性而非理想性。

B. 必須作用迅速，且適用廣範圍之染色技術與適合大部份之組織。

C. 特殊細胞成分 (如粒線體或高爾基體) 或糖類、脂肪之染色，需要特殊之固定法。

D. 一般之診斷性組織病理室，通常使用 10% 福馬林來固定。

2. 固定之步驟：

A. 理想之組織塊為不超過 $2 \times 2 \times 0.4 \sim 0.5$ cm 厚，將其置於 $10 - 20 \times$ 體積之固定液。

B. 外科與解剖標本必須於取出後盡快固定。

C. 無法立即固定之組織必須立即冷藏以阻止其分解與自體溶解。

D. 所需之時間乃依組織之大小與密度、固定液之穿透速率與固定之溫度。

3. 冷凍乾燥以及凍結置換固定法及其優點：冷凍乾燥法包括將組織快速冷凍，再在低溫下進行真空脫水。凍結的開始，通常是將小塊的組織放入已用液態氮冷卻至 $-160^{\circ} \sim -190^{\circ} \text{C}$ 的槽中，亦可用液態氮，在近於絕對零度下，進行固定。此組織在 $-30 \sim -40^{\circ} \text{C}$ 下進行真空乾燥。在此種情形下，組織中的冰，直接變成氣體，完全脫水。

在凍結置換的方法中，組織被快速凍結，並在結晶的試劑中 (如：乙醇、甲醇或丙酮) 保持凍結狀態。

此法的優點相當明顯：組織不會收縮，固定為徹底均一，可溶性物不會被抽取出來，化學組成不會改變，且其構造的變化通常很小。

再者，固定的發生快到可以使細胞的功能可以在某些臨界的時候，例如：腎臟細胞在分泌有色物質的時候，被阻止下來。

四染色之一般常識：

染色一般為將組織浸於染料溶液內。某些組織成分會與染料之有色離子結合而呈顏色。一般酸性 (帶負電) 成分吸收陽離子染料，而鹼性 (帶正電) 成分則吸收陰離子染料。鹼性染料通常是與組織的細胞質成份有較強的親和力，而鹼性染料則是用來染細胞的核。

顏色的深度會到化學親和性、成分之密度與染料對成分穿透性之影響。此外染色反應亦深深受到試劑之 pH 固定之方法，氧化與還原之影響，因其會改變組織蛋白質之分子構造。

染色所需要之時間視染色方法而異，其由幾秒至 24 小時以上。固定之方法與組織本身之特性會影響染色反應，因此於大部分之場合無法指明絕對之染色時間。此外染色效力亦隨染色液置放時間而不同，因此每批染色液之染色時間亦會稍有變化。每個實驗室須依其染色之方法而建立其最適之染色時間。

五利用物理技術的細胞化學方法：

1. 螢光顯微鏡檢法 (Fluorescence Microscopy)

在此法中，組織切片利用接近可見光譜的紫外光來檢驗，以其在可見光區中放射出來的螢光來判斷其中的組成份。螢光有兩種：(1) 天然螢光 (natural fluorescence) (又叫自發的螢光 Autofluorescence)，是由在組織中所含的物質產生的。(2) 二次螢光 (Secondary fluorescence)，是由用叫 fluorochromes 的螢光染料染色以後所產生的。

某些蛋白質可以被附加上螢光染料，如：fluorescein isocyanate 或 rhodamine，而不會使其分子產生變性。這些螢光的蛋白質，可以被注射入動物體內，而出現在細胞的切片或是細胞外的空間中。

螢光顯微鏡檢法最大的優點在於其具有大的靈敏度；因為組織中的某些一般組成份具有

其特有的螢光放射性，所以螢光常常可以提供特殊的細胞化學資料。

2. 免疫細胞化學 (Immunocytochemistry)

) 一利用標示的抗體來測抗原。

細胞化學的技術已經發展到可以利用光學顯微鏡和電子顯微鏡來找出抗原 (antigens) 的所在。抗體 (Antibodies) 是由 plasmocytes 所產生，用來抵抗大多數的大分子 (抗原) 亦可以用來抵抗結合在較大分子上的小分子。抗體存在血液中的 γ -globulin 部份，其沉降係數 (Sedimentation constant) 通常為 6s。圖 2 所示為某些用到標識抗體的細胞化學技術的一般原理。

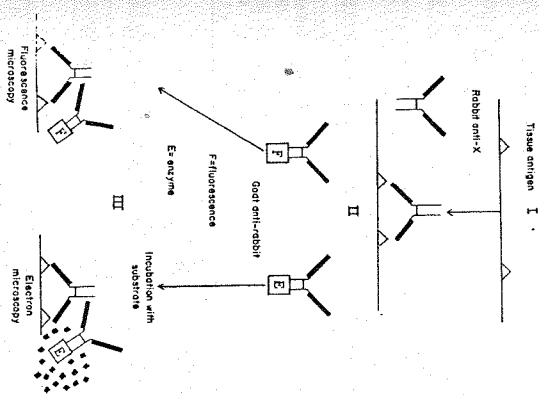


圖 2. 圖示免疫細胞化學中使用之間接法的步驟。在步驟 I 兔子抗 X 與組織抗原作用；步驟 II，羊的抗兔子抗體用螢光染料或酵素 (如過氧化酵素) 標記；步驟 III，結果用螢光顯微鏡或電子顯微鏡觀察。

在圖 1 的步驟 (I) 中，所示的為一組織抗原，以及將此抗原打入兔子體內所產生的相對的抗體 (rabbit anti-x)。假若將此抗原 (即 r-球蛋白) 標識以一螢光染料，或利用一酵素來標識則當其和基質作用的時候，產生一不透明的沈澱物，由此我們可以觀察到組織中抗原的位置。抗體亦可以和鐵蛋白 (ferritin) 相結合，鐵蛋白是一種含鐵的蛋白質對電子相當地不透明，因此可以利用電子顯微鏡來觀察。

在廣泛使用的 Coon's technique 中，抗體用 fluorescein isocyanate 加以結合。組織在冷凍切片櫃 (cryostat) 中，凍結、切片，然後再以此已結合的抗血清 (antisera) 加以染色。此種直接法廣泛地用來測定病毒以及細菌抗原所在的位置。

現在，使用最廣泛的免疫細胞化學的方法為間接法 (indirect method)，在此法中，初步的抗體—抗原反應，經由加入第二種抗原而使其更為明顯。在圖 1 的步驟 (II) 中，我們使用一螢光染料或酵素所標識的 Goat anti-rabbit γ -globulin (IgG)；在步驟 (III) 中第二次反應的結果，可以利用螢光顯微鏡檢法或光學以及電子顯微鏡檢法來觀測之。

螢光抗體技術於以前尚屬研究之工具，而目前則廣用於微生物學與醫學組織學以提供高價值之診斷方法。於腎疾病，螢光抗體之研究可用以鑑定丙球蛋白 (Gamma globulin)，特別是在於腎小球者。不同型式之腎病變具有不同之抗血清作用型式 (type)，於胰臟之疾病，單獨觀察形態無法鑑定細胞產生之荷爾蒙，但利用免疫螢光則可。由此方法可高腫瘤之鑑定，因其可對活動之腫瘤細胞加以分辨其細胞型式。器官移植，其亦可提供治療之資料。對免疫螢光檢查而言，形態方面並非是重要的；螢光標識抗血清被吸收之分佈圖形具有診斷上之意義。