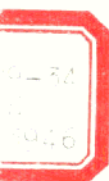


组织标本制作的 基本技术

渡 辺 恒 彦
岩 垂 司
武 石 詢
福 島 範 子

日中交流促进会



92

组织标本制作的基本技术

渡辺恒彦 岩垂 司 著
武石 詢 福島範子

*

日中交流促进会 出版

(日本国東京都千代田区富士見 2-14-23)
東京通信病院第一臨床検査科内

中国图书进出口总公司上海印刷厂 印刷

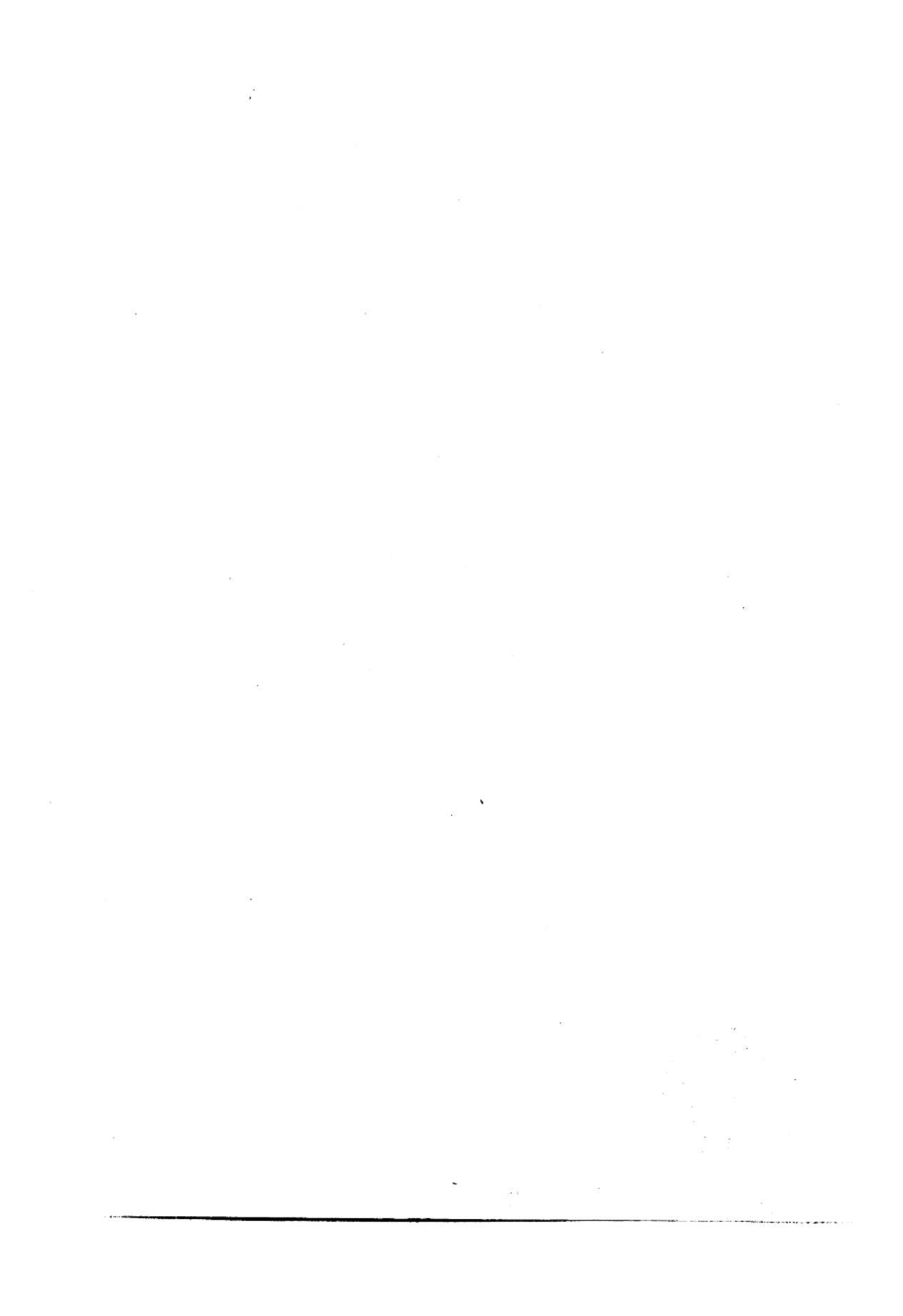
*

1985年2月第1版

©1985 渡辺恒彦 岩垂 司 武石 詢 福島範子

组织标本制作的基本技术

渡 辺 恒 彦
岩 垂 司
武 石 詢
福 島 範 子



目 录

I 组织块的取材整修与固定	渡辺恒彦..... 5
II 组织块的脱水、脱脂的理论与实际	岩垂 司.....11
III 包埋、薄切的理论与实际	武石 詢.....19
IV 常用染色方法(I)	渡辺恒彦.....29
V 常用染色方法(II)	福島範子.....47
VI 日常组织化学的实际	福島範子.....63
VII 日常的免疫组织化学	福島範子.....75

0.802

一九八七年四月十七日



I 组织块的取材整修与固定

渡 辺 恒 彦

(東京通信病院院長)

翻译: 王 嘉 伦

I. 取材整修

病理组织切片的制作是从组织块的取材整修开始的。组织块的取舍要根据病理医师对取脏器的哪一部份,为何种目地,作何种组织切片的判断来决定。这好比针刺活检,钻孔活检,刀切活检,一开始就由临床医师取材一样,手术材料,病理材料的取材整修,当然应该由病理医师来作。因此可以说,目地不明确的取材和整修是不容许的。

关于取材整修的详细步骤,在此不加叙述,但以下几点,仍需予以极大的注意。

1. 应在材料尽可能新鲜的情况下,取材整修,并刻不容缓的进入固定阶段。
2. 正确的掌握作为切片你想观察的部位,把那个部位以最适的形状和厚度取材整形。

此后的操作,当然由病理技师来进行了。

II. 固定的实际

实质上,组织切片的制作过程是从固定开始的。目地是简单明瞭的,概略如下两点:

1. 极尽可能停止组织的自溶过程。
2. 固定后的标本制作过程中,应尽可能减少由于加入药品,或加热而引起的组织变质,变形。

按上述操作一般是不会返工的。也可以认为,组织切片的良否,多由固定的好坏,以及本书别章论述的石蜡浸透的良否所决定。所以,反复强调正确固定的重要性是不过份的。

A. 为了取得更好的固定效果,对所需的各种条件,简单的探讨如下:

1. 固定液的量

一言以蔽之,要有足够的量。经验是组织块的五~十倍量。

2. 固定液的渗透性

应该知道,固定液的渗透性是因固定液的种类及组织的不同而各异。

3. 组织块的振荡

由于振荡了固定液中组织块、摇动固定液,促进固定液向组织中的渗透。市卖的振荡器用起来是很方便的。

4. 温度

除极特殊的情况,一般于室温下即可。

5. pH

pH3—4 的酸性固定液使用起来很方便,但要注意乙酸的浸入,易引起溶血。不使用中性固定液为宜。

6. 固定的时间

必须要预先知道各种固定液都有其最适固定时间,具体的在下边分别予以介绍。

B. 实际应用的各种固定液

1. 福尔马林(Formalin)

a. 10—20% 的福尔马林液(系指浓度为 37—40% 的福尔马林原液 1 加水 9—4 份)是极普通的固定液,笔者认为 20% 的福尔马林液为宜。

倘若作实验,50% 浓度固定效果最好,随着浓度的渐次降底,固定效果也随之减弱。可是太浓的固定液,因其刺激味过强,实难使用。笔者因此认为 20% 福尔马林最好。

20% 福尔马林的固定时间,大体上要限定在一周之内,3—4 天很实用。因为时间超过两周,染色性可能会减弱。固定后,脱水脱脂之前,完全不必水洗。

b. 10% 中性缓冲福尔马林液

下边是很通用的处方:

福尔马林原液	100ml
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4.0g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	6.5g
蒸馏水	900ml

近年来,此配方愈发通用。其长处 (1)组织即使较长时间的浸在固定液中,不仅不失其染色性,而且也不会有福尔马林色素沉着。(2)因其易固定细胞质,所以适用于 Giemsa 之类的染色法。(可是在剖检例中不常见使用) (3)对退回电子显微镜标本制作方法(即所谓退回电显)也显示比较好的效果等等。其缺点是可以出现轻微的溶血现象,向组织内的浸入能力稍差,核及纤维染色性与福尔马林相比,略有下降等等。结论是,把它作为日常检查用的固定液还不是一值得推荐的方法。

2. 酒精和福尔马林酒精:

市售的病理技术书写着各种各样的方法,笔者所推荐的是,由笔者本人创造的,起码可以作为日常使用的是福尔马林·甲醛固定液,其配方如下:

福尔马林原液	1
甲醛	1

此固定液的特点是 (1)渗透快 (2)有软化硬组织的作用。其不足点,与福尔马林相比,溶下来的物质似乎稍稍多了一点,然而在日常的检查工作上,还不曾有过不方便的感觉。

若是还想更快一点的充分固定的话,则可将上述处方中的水份去掉,比 50% 的福尔马林渗透的更快。经验认为后者的实用性更高。

3. Helly 固定液

处方如下:

重铬酸钾	2.5g
硫酸钠	1.0g
升汞	5.0g
水	100ml

使用前将此液九份,加福尔马林原液一份。

笔者至今还一直认为,此固定液是最理想的。但是因为此液固定时间过长,染色性减弱(常规于室温下 10 小时)、固定后的操作有些复杂,而且还怕其成份中的水银和六价铬成为公害源,所以现在一般不使用。可是,若想得到一个漂亮标本,不管何种染色,此液都是一不可缺少的固定液,因此,才敢于在此加以介绍。

4. 渡边固定液

笔者创造的这个固定液是想作 Helly 氏液的替代品,因此也能获得很不错的 Helly 氏液那样的效果。由于对肾、肝、胃粘膜这样的活检材料固定时间较短,加之能保持很好的染色性,所以把它作为日常用液加以介绍。

(第一液)

福尔马林 1 份 + 甲醛 1 份

(第二液)

重铬酸钾	4g
蒸馏水	100ml

使用时,取两液等量混合。

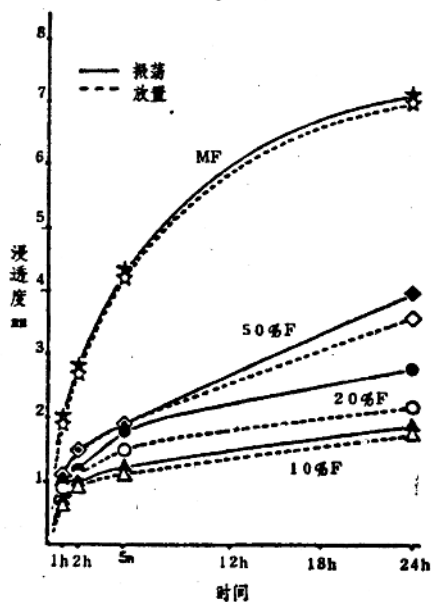
若是前述的活检材料小片,其固定时间 2—3 小时就足够了。即使是剖检材料,至多 10 个小时也就足够了。前者十分钟,后者数小时水洗,继之脱水脱脂。

5. 其它:

在一般的技术书上所叙述的包恩氏液, Carnoy 氏液等,极易使红血球产生溶血现象,所以很难说是一些适用性很大的固定液。若是没有特殊目的的话,上述 1—4 固定液,作为日常

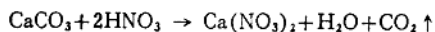
检查用液是足够的。

<表 1>



(附) 脱钙法

组织内的钙质是薄切的障碍。不管怎么说预先将其除去是必要的。以酸，络合剂 (EDTA 等)，电解，离子交换树脂等脱钙法已有报道。但就日常使用来说，酸法则更单纯更实用。其原理，例举下式加以说明：



实际上使用的脱钙液是硝酸，盐酸，蚁酸，三氯醋酸，Plank-Rychlo 液等。若了解了它们的特性，脱钙就会很充分。

1. 脱钙前的处置：

- 把组织切成较为适当的大小，厚度，和形状，固定液要充足。
- 进入脱钙液前，要充分的脱脂。

这里所说的脱脂必须是百分之百的，就是说，再一次过一遍酒精(乙醇式甲醇)到 100% 的缸，并且如将最后一缸酒精少许倒回水中，应与水均匀混合，而无脂的悬浮物存在，说明脱脂

充分。

若是实验需要使用脊椎骨海绵部骨髓的情况下，脱脂若是充分的话，5—6mm 厚的组织片，以 7.5% 的硝酸 3 小时，10% 盐酸 3 小时，5% 蚁酸 (Formic acid) 5 小时，三氯醋酸 (Trichloroacetic acid) 3 小时，Plank-Rychlo 液 1.5 小时即可完成脱灰。不管怎样，起码就 HE 来说，是可以染上漂亮的颜色。

Plank · Rychlo 处方如下：

氯化铝 (Aluminium chloride)	70g
蒸馏水	1000ml
蚁酸 (Formic acid)	50ml
浓盐酸 (37%)	85ml

总之，想推荐 Plank-Rychlo 液作为日常使用的脱钙液。

2. 脱钙后的处理

脱钙完了后，在 5% 的硫酸钠或硫酸锂 (Lithium sulfate) 液内浸泡，之后，原则上要充分的水洗，但经验认为水洗与否都无关紧要。值得提出的是，在使用含氯气多的水道水时，时间长了不好，要加以注意。

Ⅱ 组织块的脱水・脱脂的理论与实际

岩 垂 司

(樱花精机株式会社研究室室長)

翻译: 王 嘉 伦

I. 脱水条件

组织块在浸蜡之前,当然要进行脱水。所谓组织用脱水剂处理,不外是用大量的酒精把组织内的水份稀释掉而已。更何况,使组织顺序的通过数槽脱水剂,也是阶梯式的进行稀释。

现在,这里有五十片组织块,重 140g,含水份 100g,每槽的酒精相当于 1 升,在这样的条件下,处理组织的时候,各槽酒精所获得的水的含量,见下表:

表 1 组织中水份的残存量 (%)

	第一槽	第二槽	第三槽	第四槽	第五槽
酒精原浓度	70	90	95	99.5	99.5
脱水后水含量	39.09	13.55	6.23	1.07	0.60
酒精原浓度	99.5	99.5	99.5	100*	100*
脱水后水含量	9.55	1.32	0.57	0.05	0.005

* 用干燥剂处理

把表的上下作以比较,就可以看到,上面的条件,即使在最后一个槽内也有不容忽视的水份存在,相反,在下边的条件,仅残留极微量的水份。从这里边可以看到,若是没有其他障碍的话,进行高浓度的酒精脱水是有利的。

II. 脱水剂的干燥

由于市售的酒精常常带有些水份,所以若想在最终的一槽内得到无水的酒精,就必须对酒精进行干燥。为此,历来都习惯使用无水硫酸铜,但硫酸铜的变色度,极不敏感。尤其脱水力又不太强,所以近年来渐渐通用一种 Molecular sieves(分子筛)。

Molecular sieves 是一种带有小孔的人工沸石,它能把比入口孔径小的小分子吸附在空洞

内。Molecular sieves 就其孔径说来有多种多样的种类,能使酒精去水的是 3A 型(表 2)。在 18 升 99.5% 酒精内加本剂 1500g,经常的振动,一小时内即可完成脱水。使用上的注意事项以及再生法可以参考笔者的研究报告

表 2

细 孔 径	3Å
分 子 式	$\text{KNa}_3[(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{12}] \cdot 27\text{H}_2\text{O}$
可行脱水的溶媒	Methanal Ethanal Isopropyl alcohol
市 售 品	3A 型 5704 樱花脱水剂 A-3

III. 处理过程中的组织变形

组织从脱水到浸蜡,在各个阶段都可以引起收缩。收缩率在脱水阶段占 1—2%,中间剂占 2—5%,石蜡阶段占 5—8%,可以说这种收缩率并不因脱水剂的种类和浓度,中间剂的种类不同而不同。前面已经叙述了,使用高浓度的酒精进行脱水,在理论上是站得住脚的。就是形态学上的所见,也不认为以不同的酒精处理会引起形态的改变,也曾有过报告。但是,固定不充分的组织,突然以高浓度的酒精进行脱水,会使组织变形和断裂,所以固定不充分的标本仍然按以前方法处理较为安全。

IV. 脂质的溶出

组织经过脱水剂,中间剂处理时,脂质也可以溶出来。图 1 所表示的就是脂质溶到中间剂中

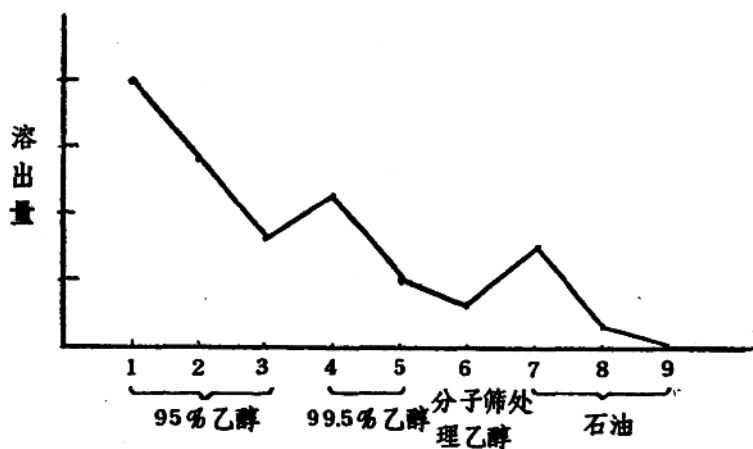


图1 脂质的溶出

的情况。关于脱脂的意义现在还不能说已经充分的了解。

V. 脱水的速度

下边我们来了解一下脱水的速度。图2所示，就是脱水速度因组织片厚度不同而各异。在最普通的切出厚度5mm的情况下，6—7小时，即可完成脱水。而且，此处使用的脱水剂是酒精。在下边的说明中，没有特殊说明的情况下，脱水剂就是酒精，组织片厚为5mm。

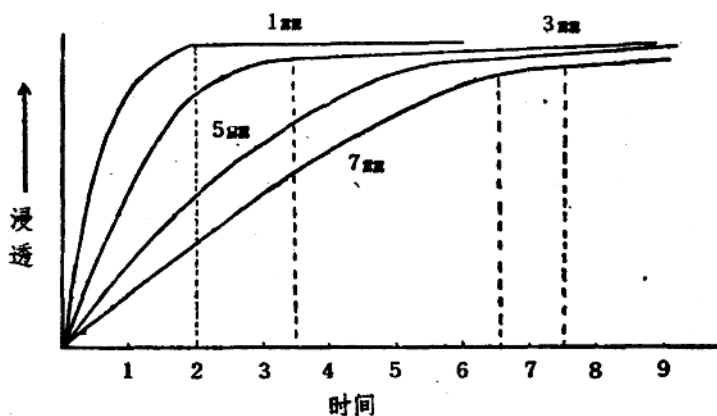


图2 组织的厚度以及浸透的速度

图 3 中,把脱水剂甲醇和乙醇作一比较。从图中可以知道,甲醇初期的脱水速度较大,4—5 小时就可以完成脱水。这就是说,它有在每槽中处理时间短的极大的优点。用甲醇脱水时,因为易引起固定不充分的组织产生裂隙,所以固定必须充分。

一般都确实的认为,加热酒精,在最初的三小时内有促进其浸透的效果(图 4)。从而可以说,只有在 3 小时以内把每一槽都加温才有效。

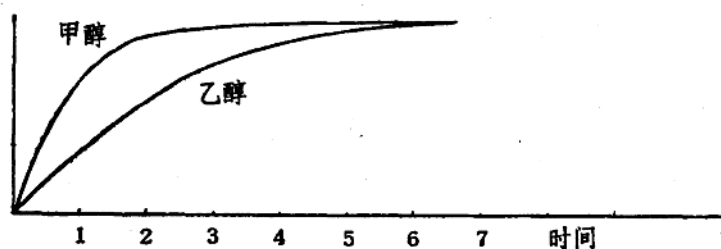


图 3 甲醇和乙醇的比较

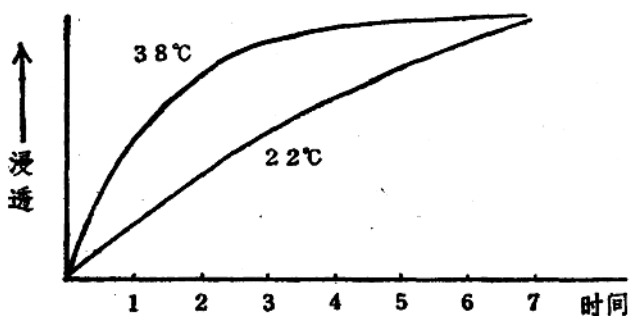


图 4 加温效果

图 5 是比较一下在常压和减压下的脱水速度。不能认为减压能促进脱水。减压的目地下一节予以探讨,