

病理組織切片技術

～切片標本製作及各種染色法～

葉 曙 校閱

國立台灣大學名譽教授

中央研究院院士

高銘都 著
黃義祿

南山堂出版社發行
弘洋圖書有限公司

病理組織切片技術

～切片標本製作及各種染色法～

葉 曙 校閱

國立台灣大學名譽教授
中央研究院院士

高銘都 著
黃義祿

南山堂出版社發行
弘洋圖書有限公司

病理組織切片技術

~切片標本製作及各種染色法~

NAN SANG TANG PUBLISHING COMPANY

Taipei, Taiwan

The Republic of China

版權所有※翻印必究

校閱者：葉 曙

著者：高 銘 都 黃 義 祿

發行人：李 仁 桂

發行所：南 山 堂 出 版 社

臺北市羅斯福路三段282號

郵政劃撥第0000999-9號

電話：321-5814, 341-2142

總經銷：弘 洋 國 書 有 限 公 司

臺北市中山北路三段53之4號二樓

郵政劃撥第1009617-8號

電話：594-7977

行政院新聞局局版臺業字第0790號

印刷所：昭美彩色印刷有限公司

中華民國七十七年九月初版

NST-No.

定價NT\$：250

序

時代變遷，實在太快，回憶五十二年前我剛從日本千葉醫科大學畢業即進入病理學研究所的時候，一切組織片的固定、脫水、包埋、薄切以至染色，皆得親自動手，一柄德製的切片刀像寶貝似的收藏起來，生怕磨得鋒利的刀被人偷用；成熟已久而用慣了的染色溶液也鎖在自己的櫃子裏，深藏不露，以免被人盜走或盜用。那個時代的情況，和現在一比，進步之神速簡直難以令人相信。不但磨刀機早在二十幾年前就已有精巧製品可用，現在乾脆連那鋒利耐磨的薄刃厚背德製切片刀都棄而不用，代之而來的，祇要將現成的刀片裝入持片器，夾在切片機上，即可自臘塊上切下又薄又完整的組織片。一枚刀片可用來切六十來個臘塊，用後隨即棄舊換新，平均計算一枚刀片值新台幣三十三元，所以切一臘塊所費不過五角五分。磨刀一次，至多亦不過六十來個臘塊而已，可是一磨就得耗費一小時的時間，以三十三元的代價，換取一小時，這點花費從現代的眼光來看，確是值得的。此外染色液已有很多種類可自市面購得；染色容器亦大有改進，很簡單地即可一染數十乃至數百片。甚至包埋、染色的自動機器，亦早已發明應市。總而言之，在分秒必爭的現代，時間就是金錢，不但專業醫師的時間不能浪費，技術員的時間亦同樣的寶貴，五十年來的變遷之大之速，若非身歷其境的人是不能想像的。

我自進入病理的時候開始，就已意識到一旦回國，事事都得從頭做起，所以我對於病理實驗室的日常工作所必需的技術，十分重視，也努力在學。民國三十二年自日返滬，第一樁事便是訓練病理技術員。三十五年應聘來台任教，到任一看，病理科已有組織切染技術員各二位，其中之一便是本書著者之一的高銘都先生，那時雖然不過二十幾歲，已為當時的日籍教授和氣巖先生訓練成一神經病理組織切染專家。另一位便是吳振雨先生（已作古多年），亦非庸手，所以我接事之後，自己想要做的病理組織切染工作，有了高、吳二位，一切都能順利進行。但是我還是墨守成規，要求我的助教、講師們，不但要親自做解剖，切取外科送檢標本，還得自己切片染色。他們倒也肯學肯做，所以人人皆可獨當一面，一旦離開台大，出任新辦大學教授，也就都能自己訓練技術人員，我深信我的大方針是正確的。民國四十二年我獲得美國醫藥助華會之資助，赴美進修一年，就在暑假期間，美援會自華盛頓來電報，要我去杜克大學醫學院，會晤該校病理科主任福勃士教授，因為他已答應美援會赴台任台大醫學院病理學科客座教授半年，希望我們二人商討在他留台期間，提供意見，供台大當局參考，並建議應興應革之處。我們談得非常融洽，他主張將病理遷入醫院，我當然同意，但他要求我能在他返國前早日回台，我却因來美不易，猶有去哥倫比亞大學之約，祇好婉拒。不

料他一抵台大，第一件改革便是叫我的助教、講師們停止病理組織的切染工作，他認為既有技術員，教學何必浪費時間去做勞而無功的事，他主張助教講師們應該把時間花費在讀書、教學與研究方面。等我於同年年底返回台北福勃士教授已期滿返美，病理也已遷入醫院。自此以後，解剖與外科標本陡增，助教們已不參與切染工作，於是二名技術員便要負擔全部切染工作，已嫌人手不足，祇好一面向醫院要求增添名額，一面開始招收訓練班學員（高中畢業生），授以實驗室工作的技術，一年結業，除了有一屆招收三名外，以後每屆祇收二名，一共辦了八屆，結業人數十七人，除了留在台大的一人外，有的去了省立台南醫院，有的去了美國海軍第二研究所，有的留在竟成病理部，有的去了台北醫學院，但大部份改行他就。因為就職機會不多，所以辦了八屆就停止招生了。本書著者之一的黃義祿先生雖非我們的訓練班的結業生，但却是馬偕醫院於民國五十年成立病理科派來台大病理與訓練班學員同時受訓的一人，一年後回馬偕醫院擔任病理切染工作，民國六十五年長庚醫院成立，醫院一開辦黃先生便隨著馬偕的正、副院長及台大畢業的醫師們一同過去了，擔任長庚病理科的主任技術員將近八年，因故又回到馬偕去了。高先生在我擔任台大病理科主任期間，由技術員拔擢升任技士，我退休之後，就在他退休之前升任技正。二年前他奉命退休，在台大一共供職四十餘年，現在仍在我的竟成病理實驗室幫我工作，他可說是台灣病理技術界的元老。黃義祿先生供職馬偕期間，一面工作，一面考人師大夜間部攻讀。他是該校夜間部第一屆畢業生，雖有資格擔任中學教師，但他仍嚴守病理崗位，為馬偕及長庚訓練了好幾名優秀技術員，他本人不但切染技術，堪稱上乘，並還能虛心求進，努力從事新技術的研究，對於組織化學、酵素染色以至螢光抗體技術，皆有獨到之處。高、黃兩位合作的這本專著，各有所長，各盡所能，經過數年的閱讀（英、美、德、日有關專著）、蒐集、撰寫、修改始成此書，取材嚴格，敘述簡明，堪稱佳作。

此書可分五個部份：第一部為病理組織切片標本製作法，包括十五章，第二部為切片標本之各種染色法，一共有二十四章，第三部為參考書籍，第四部為索引，第五部為附錄。我想特別在此一提的便是第二部的自十六章到第二十七章，凡是病理實驗室日常所必需的染色法，皆列舉無遺。自第二十八章起大部份屬於組織化學，值得特別一提的計有下列數章：第二十九章的B型肝炎表面抗原染色法；第三十二章的神經組織染色法；第三十三章的內分泌細胞鑑別染色法；第三十六章的剝脫細胞診斷抹片染色法；第三十七章的酵素組織化學染色法以及第三十九章的腎臟螢光抗體法。高先生自日治時代即已為和氣教授做了許多人體解剖及動物實驗（猴腦）的神經組織染色，而且也是火棉膠切片的高手，再加上一九五〇以後的新法，有關這方面的技術，他算得是台灣的第一人。黃先生雖是後起之秀，尚在壯年祇因肯學肯做，尤其是近三十年來發達起來的組織化學方面的新方法，他都有心得，特別是第卅七、卅八及卅九三章的新方法，皆能得心應手，凡是正在從事特殊研究的年輕病理專家常來求他幫助。現今組織化學已發展到電子顯微鏡方面去了，新的觀念，新的方法，必將層出不窮，他們二位若能繼續合作，努力不懈，貢獻於將來的新發展、新技術，我正寄以莫大希望，但願此書改版時能有更多更重要的改良和增進。二位數十年如一日，一直跟我在一起工作，此次持稿前來，要我校閱，一讀之下，欽佩之至，他們竟能在繁忙實驗室工作之餘，完成此一

著作，不但內容豐富，而且編列適宜，行文通暢，後學之人祇要能人手一本，即可應付裕如。校閱之下除術語、文字方面，稍加修飾外，實無瑕疵可舉，此書值得推薦，故樂爲之序。

國立台灣大學名譽教授

中央研究院院士

葉 曙

自序

病理組織切片品質之提高，於病理專家之病理組織學研究有莫大助益。尤其在各科綜合醫院，切片之好壞直接影響病理醫師診斷之正確性，從而左右病患之治療。因此熟習切片製作技術及提升其品質於日常醫療之重要，其理甚明。

目前坊間有關病理切片技術之譯者為數不少，但罕見為專供醫院病理診斷而作之系統性彙編成冊之著作。此書乃吾等從事病理組織切片工作數拾年所累積之經驗與收集之資料加以整理，並參考外國專書編著而成。凡病理醫師可能要求之項目，皆在本書包羅之列。本書偏重實際操作。編排明晰，一切枝蔓細節與理論，皆從略。希望本書之出版，對從事病理組織切片之工作者，有所助益。

本書費時三年，其間承蒙我國病理學泰斗，中央研究院院士葉曙教授之鼓勵與支持，提供寶貴意見，且親自校閱稿件，方得成書出版，謹此致最深之謝意。此外台大醫院病理科侯書文，莊壽洛，許輝吉及蘇益仁四位先生，本其實際工作經驗指示之處甚多，又長庚醫院病理科陳良先生於百忙中提供圖片，在此一併致誠摯的謝忱。

本書之編著雖力求審慎，然倉促付梓，疏漏難免，尚望讀者先進專家不吝指正。

高銘都 曾任國立台灣大學醫學院病理學科技正
黃義祿 曾任長庚醫院解剖病理科技術主任
現任馬階紀念醫院病理科技術主任

目 錄

(壹) 病理組織學切片標本製作法	1
1. 病理組織學切片標本製作程序.....	1
2. 切取組織.....	1
3. 固定 (Fixation)	2
A. 特殊固定法.....	2
1. 加熱固定.....	2
2. 蒸汽固定.....	2
B. 固定須知.....	2
C. 組織固定後之處理.....	2
4. 固定液之種類.....	4
5. 脫鈣 (Decalcification) 法.....	9
6. 石臘包埋 (Paraffin embedding) 法.....	11
7. 石臘塊切片法 (Paraffin Block Section)	16
8. 火棉膠切片標本製作法 (Celloidin section)	19
9. 火棉膠—石臘切片標本製作法 (Celloidin and Paraffin double Section)	21
10. 水溶性臘切片製片法 (Carbowax Section)	21
11. GMA (Glycol Methacrylate) 切片製片法.....	22
12. 明膠切片 (Gelatin Section) 製片法.....	24
13. 冰凍切片 (Frozen section) 法	25
14. 脫臘 (Deparaffinize)	28
15. 封蓋 (mount)	28
(貳) 切片標本之各種染色法	31
16. 蘇木紫與伊紅染色法 (Hematoxylin and Eosin stains)	31
17. 類澱粉蛋白染色法 (Amyloid stain)	35

A. 剛果紅 (Congo red) 染色法	35
B. 結晶紫 (Crystal violet) 染色法	37
C. Thioflavine T 染色法	37
D. 甲基紫 (Methyl Violet) 染色法	38
E. Highman & Bethesda 氏變法	39
18. 膠質纖維 (Collagen fibers) 染色法	40
A. Mallory Azan 染色法	40
B. Masson 氏 trichrome 染色法	41
C. Gomori 氏三色 (trichrome) 染色法	44
D. Schaefer 氏染色變法	44
E. Van Gieson 氏染色法	45
F. Elastica - Van Gieson (E.V.G.) 染色法	46
19. 彈性纖維 (Elastic fibers) 染色法	47
A. Weigert 氏彈性纖維染色法	48
B. Weigert 氏 Krutsary 變法	48
C. Verhoeff 氏彈性纖維染色法	49
D. 俄色因 (Orcein) 染色法	50
E. Pinkus 氏酸性俄色因—傑姆沙 (Acid orcein-Giemsa) 染色法	51
20. 網狀纖維鍍銀染色法 (Reticulum fibers silver stain)	52
A. 帕氏 (Pap) 鍍銀變法	52
B. NF-Watanabe 氏變法	54
C. Gomori 氏鍍銀染色法	56
D. Wilder 氏鍍銀染色法	57
E. 網狀纖維之鍍銀染色法	58
21. PAM 染色法	59
A. 矢島式變法	59
B. Jones 氏 PAM 染色法	61
22. 纖維蛋白染色法 (Fibrin stains)	62
A. Weigert 氏纖維蛋白染色法	62
B. PTAH 染色法	63
23. 多醣染色法 (Polysaccharides Stains)	64
A. PAS 反應 (Periodic Acid-Schiff's reaction)	64
B. Mayer 氏粘液素卡紅 (Mucicarmine) 染色法	67
C. 阿爾囊藍 (Alcian blue) 染色法	68
D. 阿爾囊藍 (pH 2.5) - PAS 雙重染色法	69
E. 膠質鐵 (Colloidal iron) 染色法	71

F. Best 氏卡紅 (Carmine) 染色法	72
G. 碘反應 (Langhans)	73
H. 多醣類法辨別消化法	73
I. 角蛋白粘液素染色法 (Dane氏方法)	75
24. 核酸染色法 (Nucleic Acids stain)	76
A. Feulgen 反應	76
B. 甲基綠派洛寧 (Methylgreen Pyronin) 染色法	77
C. 核酸辨別消化法	78
25. 傑姆沙 (Giemsa) 染色法	80
26. 脂肪與脂質 (Fats and lipids) 之染色法	81
A. 蘇丹第三 (Sudan III) 染色法	82
B. 油紅 O (Oil red O 即蘇丹第 II , Sudan II) 染色法	83
C. 蘇丹黑 B (Sudan black B) 染色法	83
D. 猩紅 R (Scarlet red , Sudan IV) 染色法	84
E. 奈耳藍 (Nile blue) 染色法	84
F. 膽固醇 (Cholesterol , Schulty 氏法) 染色法	85
G. 脂質 (Lipids) 染色法	86
27. 組織內病原體染色法	87
A. 一般細菌染色法	87
1. Löffler 氏次甲基藍 (Methylene blue) 染色法	87
2. 革蘭氏 (Gram) 染色法	88
B. 抗酸菌染色法	93
C. 真菌類染色法	97
1. PAS 染色	97
2. GMS 染色	97
3. Gridley 氏染色	98
D. 組織內螺旋體染色法	100
E. 痢疾阿米巴染色法	103
28. 特異性肺囊蟲 Pneumocystis Carinii 染色法	105
29. HBs 抗原染色法 (Hepatitis B Type surface antigen)	106
A. 俄色因染色 變法 (I)	106
B. 俄色因染色 變法 (II)	107
C. 維多利亞藍 (Victoria blue) 染色法	108
30. 金屬，無機鹽之染色法	109
A. 鐵染色法	110

B. 銅染色法.....	111
C. 鈣染色法.....	113
31. 生體內色素之染色及鑑別法.....	115
A. 黑素 (Melanin) 證明法	116
1. Fontana-Masson 鍍銀法	116
2. 漂白法 (Bleaching Method for Melanins)	117
B. 血鐵素 (Hemosiderin) 染色法	117
C. 血紅素 (Hemoglobin) 染色法	117
D. 膽汁色素 (Bile Pigment) 染色法	120
E. 脂褐質 (Lipofuscin) 染色法	122
F. 類腦黃素 (Ceroid) 染色法	123
G. 瘧原蟲染色法 (Thoma's method for malaria Parasites)	123
32. 中樞神經組織染色法.....	124
A. 神經細胞染色法.....	124
1. 尼氏Nissl 染色法, 石臘切片法	124
2. 桔花青 (Gallocyanin) 染色法.....	125
B. 髓磷脂 (髓素) 染色法.....	126
1. Luxol fast blue 染色法 (Klüver-Barrera Method, 1953 年) (附)	
L.F.B. 冰凍切片染色法.....	126
2. L.F.B. — PAS 雙重染色法.....	127
3. 巢鴨法.....	128
4. Woelcke 氏 (myelin sheath) 染色法.....	130
5. 上條氏簡易髓磷脂染色法.....	130
C. 神經膠質纖維 (Glial fiber stains) 染色法.....	131
1. Holzer 氏染色法.....	131
2. Mallory 氏PTAH 染色法.....	133
D. 膠細胞染色法 (Glial cell stains)	134
1. Cajal 氏鍍銀法.....	134
2. Cajal 氏金昇汞法 (台大變法)	135
3. Scott 氏石臘快速染色法.....	136
4. Penfield 氏染色法.....	137
E. 神經纖維染色法.....	138
1. Bielschowsky 氏染色法.....	138
2. Holmes 氏染色法.....	139
3. Bodian 氏染色法.....	141
(附) 迅速Bodian 氏染色法	
4. Glees and Marsland 氏變法	143

33. 內分泌細胞鑑別染色法.....	144
A. 銀還元性 (Argentaffin) 及好銀性 (Argyrophil) 染色法	144
B. Solcia 氏鉛—蘇木紫 (Lead-Hematoxylin) 染色法.....	149
C. Gomori 氏醛復紅 (Aldehyde-Fuchsin) 染色法	150
D. Paget 氏醛—替俄寧 (Aldehyde-Thionin) — PAS—橙 G 染色法.....	151
E. 胰島各形細胞三重染色法.....	153
F. Wilson-Ezrin 氏染色法 (腦垂染色)	153
G. Unna 氏肥大細胞染色法	154
H. Gomori 氏嗜鉻性細胞染色法.....	155
I. 傑姆沙 Giemsa 氏嗜鉻性顆粒染色法.....	156
J. 近血管球細胞顆粒 Juxtaglomerular cell granules 染色法 (Bowie)	157
34. 神經纖維針撥開 (Teasing single nerve fibers) 法.....	158
35. 含碳脫水酶 (Carbonic Anhydrase) 染色法	158
36. 剝脫細胞標本染色法.....	159
A. 材料採取法.....	159
B. 固定.....	160
C. 染色.....	160
1. 帕氏 (Papanicolaou) 染色法	160
2. 傑姆沙 (Giemsa) 染色法.....	162
3. H & E 染色法.....	162
4. PAS 染色法	162
5. Mayer 氏粘液素卡紅 (Mucicarmine) 染色法.....	163
6. Shorr (S-3) 染色法	163
7. 阿爾裏藍 (Alcian blue) 染色法	164
37. 酵素組織化學染色法.....	164
A. Naphthol-AS-D-Chloracetate-Esterase (Leder)	164
B. Naphthol-AS-Acetate-Esterase (Stutte)	166
C. α -Naphthyl-Acetate-Esterase	166
D. Acid Phosphatase 染色法	167
E. Alkaline phosphatase 染色法	168
F. ATPase (Adenosine triphosphatase) 染色法	169
G. NADH-Tetrazolium Reductase (DPNH Diaphorase) 染色法.....	170
H. Cholinesterase 染色法	170
38. 免疫過氧化酶 (Immunoperoxidase) 染色法.....	171
39. 腎螢光抗體法.....	175

(壹) 病理組織學切片標本製法

1. 病理組織學切片標本製作程序

組織切片的製作程序，依照使用的包埋介質，大致可分為：親水性和非親水性二種。利用親水性包埋介質，組織可以不經過脫水的步驟。若利用非親水性包埋介質，組織必須經過脫水過程，始可包埋成形。包埋介質的種類繁多，各種標本的作法，雖略有差異，但均不出下列過程：

①切片組織 ②固定 ③脫水 ④透明 ⑤浸潤 ⑥包埋 ⑦薄切 ⑧染色 ⑨封蓋

一般組織切片標本，除非有特殊目的，均以便捷的石臘切片為主。今以石臘為包埋介質的石臘切片為例：當切取適當大小的組織塊後，須立即投入固定液中，以防止其變化，然後經過處理，將其包埋成石臘塊（Paraffin Block），以便薄切。包埋前組織內的水份，必須先以酒精除去，再藉與石臘溶和的溶劑取代酒精，如二甲苯（Xylene）、氯仿（Chloroform）等，至此組織便呈透明狀。由石臘塊薄切的切片，經脫臘、染色、脫水、封蓋後，方可成為顯微鏡標本。

冰凍切片（Frozen section）是利用急速冷凍的低溫將組織塊凝固成硬塊，以便薄切。因此，冰凍切片不必經過固定、脫水、浸潤等步驟，便可達到薄切標本的目的。

2. 切取組織(Tissue)

組織塊的切取，正常不大於一般市販的最大蓋玻片（Cover Glass） 24×50 mm，厚度也不大於 5 mm 為宜，以免影響固定效果，及標本製作的不便。

【註】

- (1)淋巴結及球狀組織需要先行切開以免組織結成一團。諸如：子宮內膜或妊娠性組織（Gestational tissue）等，如是即可使固定脫水效果更佳。
- (2)新鮮條狀組織，經固定後或彎曲變形，或頭尾難辨，如腸管等，將影響切片的效果。為防止上述情形發生，宜將新鮮條狀組織，預先貼附於濾紙上，或紙板上固定，然後切取之。

3. 固定(Fixative)

組織由活體取得後，最大的變化就是組織發生自溶 (Autolysis)。其最初情形是形態結構逐漸消失，最後完全液化。所以當取得組織檢體時，須立即投入固定液中，以減少變化。若無法立即取得固定液，即應將其浸入生理鹽水中或 70 % 酒精，以防乾燥。

組織固定之目的在利用藥劑的性質，作用於組織使蛋白質凝固，儘量使新鮮組織保持與生前的諸成份相同狀態。組織固定之效果，由外向內漸進，其速度因固定液之種類、濃度、鮮度而各異。

切片用的組織塊用不同的固定液，在室溫下，固定的時間視其大小，稍有不同，約需 1 至 24 小時。通常在微溫或輕微振盪下，固定效果較靜置時更佳且快。

A. 特殊固定方法

1. 加熱固定

新鮮組織必須緊急固定時，將小塊組織投入裝有約 5 ml 之 10% 福馬林液試管中，以酒精燈煮沸約 1 分鐘即可完成固定。以乾冰為冷凍劑，做冰凍切片時，常利用本固定法。惟以此法固定組織，會有收縮的缺點。

2. 蒸汽固定

利用化學物質為固定液，如福馬林或鉬酸 (Osmic acid) 的蒸汽，作塗抹標本的固定。其方法在培養皿或直立染色壺內，注入約 20 ml 的固定溶液，然後將塗抹標本平放於培養皿上，或直立於染色壺內，封蓋後移入 60 °C 的保溫箱內固定之，放置 10 分鐘以上，若添加少許高錳酸鉀於福馬林溶液中，則可加速固定。

B. 固定須知

1. 選用廣口固定瓶，避免擠入太多組織，以儘量使組織在充足的固定液中游動為宜。
2. 固定前，預先確認是否有特殊目的，然後選用適當的固定液。
3. 擬作長久保存的組織材料，其固定液應每隔數月，更換一次。
4. 若組織固定不良，即可影響以後的脫水效果；切片不易或染色不佳，（因固定液兼有染色劑的作用），故組織之充分固定，甚為重要。

C. 組織固定後之處理

殘留於組織內的固定液，會影響染色效果，或破壞組織，故必須加以除去，其方法有：

1. 流水水洗：以福馬林為主的固定液，依組織塊的大小，在流水中水洗 12 ~ 24 小時，最為理想，但一般為遷就實際作業的需要，在流水中略作水洗後，直接移入酒精中脫水，如此所製成的標本，對其品質似無多大影響。
2. 脫水銀：經含水銀的固定液，如經 Zenker, Helly 或 B₃ 等固定後的組織，含有沈澱物，必須除去。

其方法如下：

①將組織從固定液中取出，經流水沖洗，約 12 ~ 24 小時。

②以下列溶液浸 12 ~ 24 小時。

水	100 ml
盧戈溶液 (Lugol solution)	約 5 滴

③流水沖洗約 30 分鐘。

④置之於 0.25 % Hypo 溶液中，1 ~ 6 小時。

⑤流水沖洗，3 ~ 6 小時，至此即可完成脫水銀操作。

〔盧戈溶液 (Lugol solution) 配製法〕

革蘭 (Gram) 氏盧戈溶液：

碘化鉀 (Potassium iodide)	2 gm
碘 (Iodine)	1 gm
水	300 ml

Weigert 氏盧戈溶液：

碘化鉀	2 gm
碘	1 gm
水	100 ml

※預先以水 5 ml 溶解碘化鉀後，再加入碘，俟其溶解，最後加以剩餘之水。本液可長久保存使用。

【註】

(1)含重鉻酸鉀的固定液若殘留於組織塊內，當脫水時與酒精接觸，會生成不易除掉之氧化物。

(2)組織作成切片後，應再做一次脫水銀的操作。其方法如下：

①切片脫臘後，置於 0.5 % Alcoholic iodine 內，5 ~ 10 分鐘。

②略為水洗後，移入 0.5 % 硫代硫酸鈉 (Sodium thiosulfate) 溶液內，5 ~ 10 分鐘。

③用流水水洗，10 ~ 15 分鐘。

〔 0.5 % Alcoholic iodine 溶液 〕

碘	1 gm
無水酒精	160 ml

碘溶解後，再加水 40 ml。

(3)使用不含重鉻酸鉀之固定液，如 B₅ 等，可留待作成切片後，於染色前再施以脫水銀法。

3. 移入酒精中：如使用無水酒精，Bouin (移入 70 % 酒精)，Carnoy (移入無水酒精

）等固定液，可直接移入酒精中脫水，中途不必水洗。

4. 固定液之種類

固定液之種類繁多，因目的之不同，使用固定液亦各異。今列舉重要者如下：

A. 10% 福馬林溶液(Formalin solution)

福馬林 原液	10 ml
水	90 ml

福馬林原液是指 35 ~ 40 之甲醛 [Formaldehyde (HCHO)] 溶液而言，為無色液體，有辛烈氣味。對組織不大發生收縮，對核及細胞質固定效果佳，又可迅速阻止酵素的活動，並適宜長期保存組織材料，更適合各種染色法，是多種目的固定液。本固定液配製簡單又便宜，故為一般實驗室所樂用。

〔固定時間〕

固定速度在靜置容器中，1 小時約進行 0.1 cm，例如：厚度 0.5 cm 大小的組織塊，約需 4 ~ 5 小時，即可完成固定。若在微溫或在振盪器中振盪，所需時間可再縮短。遇有急件時，例如 $0.3 \times 0.2 \times 0.1$ cm 般大的組織，可置之於盛有固定液的燒杯中，納入 60°C 保溫箱加溫約 20 分鐘，即可完成固定。由此方法固定的組織，或許稍有收縮，但所製成的標本，其品質對診斷似無影響。

【註】

- (1) 福馬林液溶，放置過久或經久使用後，易生蟻酸 (Formic acid) 而呈酸性，結果固定力減退影響染色效果，故經年保存的材料應該注意馬福林水溶液的鮮度。
- (2) 血液較多的組織，其血色素常與福馬林互相作用，而產生褐色顆粒狀福馬林色素 (Formalin Pigment) 影響鏡檢之效果。pH 6.0 以上的福馬林水溶液，不易產生福馬林色素。pH 3.0 以下者，則較易產生福馬林色素。

〔福馬林色素除去法〕

Kardasewitsch 法：本法的優點，不僅對組織無損壞，且不影响以後的染色效果，同時對含黑色素 (Melanin Pigment)、脂褐質 (lipofuscin) 以及血鐵素 (hemosiderin) 並無影響。其缺點雖可溶解瘧色素 (Malaria Pigment)，不過可藉此以與黑色素鑑別。

① 切片、脫臘、水洗。

② 置於下列溶液中，5 分鐘至 4 小時。

70 % 酒精	95 ~ 99 ml
28 % 氫氧化氨 (Ammonium hydroxide)	1 ~ 5 ml

③ 充分水洗。

④略以 1% 冰醋酸 (Glacial acetic acid) 溶液浸洗。

⑤流水中充分水洗。

【註】

小心處理③④及⑤的步驟，以防切片剝落。④和⑤可以省略。

B. 10% 中性福馬林溶液 (neutral formalin solution)

中性福馬林 (Neutral formalin) 原液..... 10 ml

水..... 90 ml

為避免福馬林水溶液呈酸性，影響標本的品質，可在福馬林原液中加入碳酸鎂 (Magnesium Carbonate) 或碳酸鈣 (Calcium Carbonate)，製成近中性的福馬林溶液，其方法為：福馬林原液 1000 ml 中加入碳酸鎂或碳酸鈣約 10 gm 攪拌後靜置，取其上層澄清部份，即為中性福馬林溶液。碳酸鎂可製成 pH 7.5，碳酸鈣可製成 pH 6.0 左右的中性福馬林溶液。

本固定液的用法與 10% 福馬林溶液相同，常用於特別染色，同時可防止福馬林色素發生。

C. 中性福馬林緩衝溶液 (Buffered neutral formalin Solution)

福馬林原液..... 100 ml

磷酸二氫鈉 [Sodium Phosphate, Monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)]
..... 4 gm

磷酸氫二鈉 [Sodium phosphate, disbasic (Na_2HPO_4)] 6.5 gm

蒸餾水..... 900

本液廣被採用，為多目的的理想固定液。特別對於動物肝臟所包含的肝醣 (Glycogen) 的固定，有良好的結果，亦適於血鐵素 (hemosiderin) 及血紅素 (hemoglobin) 之固定。

D. 無水酒精 (Absolute alcohol)

有脫水、脫脂作用，滲透力弱，組織硬化和收縮的程度依酒精濃度而異，濃度越高其程度越強，對核的染色效果不佳。H & E 染色，細胞質常有過染現象。對肝醣的保存，效果甚佳。冰凍切片用的組織，不可以酒精為固定液，因冷凍後，不易凝固，無法作切片。組織的厚度不超過 0.2 cm 為佳，固定的時間不要太久，以不超過 12 小時為宜，可以預防組織過度硬化，以免增加切片的困難。