

出國報告（出國類別：出國進修）

華盛頓大學醫學中心腎臟及移植病理  
進修報告

服務機關：臺北榮民總醫院病理檢驗部

姓名職稱：張富邦醫師

派赴國家：美國

出國期間：104年9月1日至106年8月31日

報告日期：106年9月26日

## 摘要

近年來腎臟病理及移植病理之診斷相關技術及研究發展迅速，正確的病理診斷提供重要的治療及預後資訊。職於 104 年 9 月 1 日至 106 年 8 月 31 日，在美國西雅圖華盛頓大學醫學中心進修腎臟及移植病理，學習各種腎臟疾病於光學顯微鏡，螢光顯微鏡及電子顯微鏡檢查之判讀，及器官移植後的病理變化診斷。進修期間參與每日的臨床診斷工作，臨床病理討論會，學習新的診斷技術，並出席腎臟病理相關的重要國際會議，返國後將有助於提昇本院腎臟及移植病理診斷水準與未來發展。

關鍵字：腎臟病理、移植病理

## 目次

一、 目的	3
二、 過程	4
三、 心得	8
四、 建議事項	9

## 附錄

## 一、目的

近年來腎臟病理及移植病理之診斷相關技術及研究發展迅速。腎臟疾病歷年來均名列國人十大死因之一，治療慢性腎衰竭所耗費之醫療資源甚鉅，正確的病理診斷提供重要的治療及預後資訊。器官移植之病理變化繁多，正確的病理診斷對器官移植之存活率甚為重要。此行前往美國西雅圖華盛頓大學醫學中心進修腎臟及移植病理，參與進修單位的臨床診斷工作，著重於各種腎臟疾病於光學顯微鏡，螢光顯微鏡及電子顯微鏡檢查之判讀，及器官移植後的病理變化診斷，以提昇本院腎臟及移植病理診斷水準。

## 二、過程

華盛頓大學(以下簡稱華大)醫學中心(University of Washington Medical Center)位於美國華盛頓州西雅圖市，是屬於華大醫學院的其中一個教學醫院，其醫院規模約 570 床，是華盛頓州區域最著名的醫療與研究重鎮。

每年的腎臟切片案例總共約 1500 件，其中約四分之一為移植的案例，來源包含院內及相鄰各州(如蒙大拿州、愛達荷州，懷俄明州及阿拉斯加州)有合作的醫院所轉介之案例。由於腎臟切片的判讀需要綜合光學顯微鏡，螢光顯微鏡及電子顯微鏡的病理變化做出診斷，但並非每間醫院都有螢光跟電子顯微鏡相關的設備，因此在美國是將案例集中至少數的醫學中心做判讀。在台灣關於腎臟病理的現況也是類似的情形，而臺北榮總為台灣幾個能提供腎臟切片判讀醫院的其中之一，本院案例每年約 300 件，因此在華大兩年的進修期間確實得到非常多的臨床診斷經驗。

其病理部的腎臟病理團隊共有 Dr. Charles E. Alpers、Dr. Behzad Najafian、Dr. Kelly Smith、Dr. Roberto F. Nicosia 及 Dr. Shreeram Akilesh 五名專職腎臟病理醫師，各醫師皆在其研究領域有傑出貢獻，其中 Dr. Alpers 更是國際知名的學者，並撰寫多本與腎臟病理相關的教科書，目前也是華大病理部的主任。其他團隊成員包括一名臨床研究員(clinical fellow)，在組織染色及螢光染色實驗室共三名技術員，在電子顯微鏡實驗室共三名技術員。由於某些腎臟疾病及腎臟移植後的病程變化可能相當迅速，需要即時提供切片結果以引導治療，因此這裡有提供全年無休的腎臟病理判讀服務，除了每天均有安排醫師簽發報告，在晚上及假日亦提供急件的處理，而這就有賴於整個腎臟病理團隊的通力合作才能達成。

在進修期間我參與每日臨床案例的閱片過程，其作業流程簡述如下，每日十一點前簽收的案例會在當日下午四點前完成光學顯微鏡及螢光顯微鏡的染色製備，並在當天完成閱片，每個案例都以電話聯繫送檢的臨床醫師以口頭方式提供初步報告，之後再經由電子顯微鏡的檢查確認(製備過程約需三個工作天)，最後才以書面發出正式報告。其團隊非常重視與臨床醫師的溝通，這也是由於腎臟病理的判讀除了仰賴顯微鏡下的病理變化，同時也需要綜合病人的臨床表現以及相關的實驗室血液生化檢查，才能做出最適當的診斷。

訓練過程中也有參與這裡所舉辦的臨床病理討論會，總共有三種型式。一是每周進行的臨床病理切片討論會，會議中病理科醫師和腎臟科醫師會一起坐在多頭顯微鏡前閱片，並討論臨床表現及後續治療。二是每月舉行的腎臟病理 Grand Round，是在會議室中進行的案例討論，會先由腎臟科醫師報告臨床表現，再由病理科醫師報告切片結果，並有相關文獻的回顧。最後是每月舉行的期刊討論會，則會安排人員報告近期有興趣的期刊文章。參與這些會議獲得不少與臨床醫師討論溝通的經驗。

接下來介紹在華大病理部腎臟切片所使用的染色，並比較其與本院病理部所使用染色的不同。在光學顯微鏡的部分，華大每個案例會製備 H&E stain、PAS stain 及 Jones stain 各三片，以及 Masson trichrome stain 一片(總共十片)。而本院目前則是 H&E stain 三片，PAS stain、Jones stain 及 Masson trichrome stain 各一片(總共六片)。由於腎臟疾病在切片上常常是以局部(focal)病灶為表現，因此每個案例檢查的染色片數越多，可以避免檢體的抽樣誤差，以提升診斷正確性。另外值得特別提及的是，華大的 Jones stain 是以人工手染的方式製備(其他染色則以自動染色機製作)，因為 Jones stain(即 methenamine silver-Periodic acid-Schiff stain)的銀染色以人工手染更能確定其染色深淺不會過度或不足，保證每次染色的品質一致。本院礙於人力的關係全部的染色都是以自動染色機製作，因為機器無法像人一樣能對染色時間的長短做彈性調整，因此 Jones stain 的品質相比之下仍有改善空間。好的染色品質能夠讓病理醫師更容易做出正確診斷，因此其重要性不言而喻。

在螢光顯微鏡檢查的部分，華大病理部使用的抗體包括 IgG、IgA、IgM、C3、C1q、kappa、lambda、fibrinogen 及 albumin(總共九種)，若是移植的案例會再加做 C4d 染色。本院目前的螢光染色與華大相比則是少了 fibrinogen 及 albumin 兩種抗體。fibrinogen 主要是在 crescentic glomerulonephritis 中可以將 necrotizing lesions 及 crescents 標記出來，albumin 則可以幫助鑑別 tubular reabsorption droplets 的成分是否是 albumin，而非其他如 light chains 等的異常蛋白沉積，因此在診斷上仍然有其價值存在。但因為健保給付的限制，如果只能將資源用在最必要的抗體上，我認為這兩種抗體則可以取捨不做，對於診斷上的影響並不大。

而除了這幾種常規使用的螢光染色抗體，華大病理部還有另外三種螢光染色技術是在特殊情況下使用以輔助診斷。一是 phospholipase A2 receptor (PLA2R)染色用於 membranous nephropathy(MN)，可以協助鑑別是 primary MN(原發性)或是 secondary MN(因其他繼發性原因而產生，如感染、自體免疫疾病、癌症或藥物引起)，因此在臨床上有其重要性。本部目前也有使用 PLA2R 染色，但因為是使用免疫組織化學染色(immunohistochemistry, IHC)的方式呈色而非使用螢光染色，所以背景較強不易判讀，可以考慮修改染色方法為螢光染色來提升品質。二是 IgG subclass staining，需要使用 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 四種抗體，也可用來輔助鑑別 primary MN 或是 secondary MN，因為 primary MN 是以 IgG1 為主，而 secondary MN 則以 IgG4 為主。另外 IgG subclass staining 可以幫助判斷 IgG 是 monoclonal 或是 polyclonal，對於 plasma cell dyscrasia 等疾病的鑑別是很重要的。本部目前只有針對 MN 做 IgG4 的染色，而沒有 IgG1、IgG2 及 IgG3 的抗體。三是在石蠟包埋檢體上做螢光染色檢查 immunofluorescence on paraffin embedded tissue (IF-P)，一般

螢光染色檢查需使用新鮮未固定過的檢體，但 IF-P 的技術則是使用 pronase 蛋白酶先對福馬林固定石蠟包埋組織做 antigen retrieval，因此可以做後續的螢光染色。IF-P 過去是當作一種補救的技術，用於如果原本螢光檢查的新鮮組織不足時，則可以取石蠟包埋組織做代替以進行螢光染色。現在越來越多的研究發現，IF-P 技術甚至能幫助我們找出隱藏的免疫複合物沉積(masked immune complex deposits)，因此在診斷上的用途會越來越廣泛。目前本部尚未有 IF-P 的染色，是未來可以著手發展的方向。

華大病理部對於 amyloidosis 的診斷流程也可以給本院參考，常規的 kappa、lambda light chains 螢光染色可以偵測約占百分之八十的 primary amyloidosis 案例，對於懷疑是 secondary amyloidosis 的案例則使用 serum amyloid A (SAA) IHC 染色偵測，而其他較少見與家族遺傳性有關的 amyloidosis 案例則需使用 mass spectrometry 作 amyloid 蛋白的分類。雖然後者的案例非常少見，但對於臨床上則可指引臨床醫師提供病人關於家族篩檢及遺傳諮詢的資訊。

關於電子顯微鏡的部分，華大的電子顯微鏡有分為臨床跟研究用的實驗室，其所使用的機型有 JEOL 1230 穿透式電子顯微鏡(transmission electron microscopy, TEM)，配上 AMT 的數位照相系統，這個機型與本院病理部使用的電子顯微鏡是一樣的，而本院則使用 Gatan 的數位照相系統。雖然這型電子顯微鏡已經問世有十幾年的時間，但對於臨床診斷其功能已相當足夠，照相系統所獲取的影像品質也很清楚。值得一提的是，由於華大病理部的腎臟切片數量相當多，因此平日是由技術員操作電子顯微鏡將病灶處照相，再由病理醫師根據照相的結果作判讀，而在本部則是醫師自己操作電子顯微鏡閱片照相。這兩種方法各有其利弊，一是需要有訓練良好的技術員能判斷電子顯微鏡下的病灶所在，二是要有人力能應付此工作量，根據本院病理部的檢體數量與人力相比，仍然以維持現有的作業方式較適宜。另外在華大的研究用實驗室有機會使用一台 Zeiss 掃描式電子顯微鏡(scanning electron microscopy, SEM)，此機器配上 Gatan 的 3View 模組可以做 serial block-face imaging，可以獲取大量的電子顯微鏡影像並重組為三維空間的立體資訊，目前雖然只能應用於研究用途上，但能觀察到傳統二維空間影像所無法看到的立體結構。

在美國進修期間也參與當地重要的國際會議，包括：美國加拿大病理學會年會(The United States and Canadian Academy of Pathology Annual Meeting, Seattle, WA, March 12-18, 2016)，腎臟疾病病理切片研討會(39th Renal Biopsy in Medical Diseases of the Kidney at Columbia University, New York, NY, July 20-23, 2016)，以及美國腎臟醫學會年會(50th American Society of Nephrology Annual Meeting, Chicago, IL, November 15-20, 2016)，並於會議中有海報發表。其中的

腎臟疾病病理切片研討會，是在美國紐約哥倫比亞大學所舉辦的一個會議，在四天的會議中有邀請腎臟病理中有名的學者，針對各個重要且常見的疾病做一個完整且系統性的介紹，對於初入腎臟病理領域的病理科或腎臟科醫師是一個很好的課程。而美國腎臟醫學會年會則是以腎臟科醫師為主的國際會議，但其中也包含很多關於腎臟病理的演講，也很推薦想從事腎臟病理的醫師前去參加。



### 三、心得

感謝臺北榮總、陽明大學及尹書田基金會能提供此次前去進修的機會，也感謝本院病理部允許我在部內人力並不充沛的情況下進行兩年的進修。腎臟及移植病理在病理學中是比較少人從事的一個領域，一方面受限於個案數量較少，二是需要有特殊的染色及儀器設備才可以做完整的判讀。雖然住院醫師訓練期間有接觸相關的案例，但在此次出發前對於腎臟病理這個領域仍處於入門階段，因此在華盛頓大學醫學中心進修期間學習到非常多的東西。雖然每年 1500 件的腎臟切片案例跟美國其他機構相比不是最多的，但平均每天都有六至七個案例，兩年下來也累積不少臨床經驗，對於一些罕見的疾病也有機會能夠接觸。能跟華大的腎臟病理醫師學習覺得非常榮幸，一般美國住院醫師要來這裡受腎臟病理臨床研究員的訓練是非常競爭的，因為每年只有收一名訓練員額，因此甚至需要早在兩三年前就先來面試才有機會取得訓練資格。在每日的案例閱片過程中，因為光學及螢光染色的切片約下午三、四點才會製備好，因此開始閱片的時間比較晚，如果案例較多可能會到晚上七、八點才下班，但每個閱片的主治醫師仍然非常有耐心地講解，因此非常感謝華大腎臟病理團隊醫師的指導。

#### 四、建議事項

在此次進修觀察華大病理部與本院在工作流程上的不同後有幾點建議事項：

一、病理報告格式：在華大的腎臟病理報告是使用敘述性的報告格式，而本院的腎臟病理報告則是使用條列式的項目，其各有利弊。對於敘述性的報告病理醫師較有彈性，可以明白地寫出想要跟臨床醫師強調的項目，而條列式則是將所有項目列出，如果對於腎臟病理不是很熟悉的醫師，可能會不了解報告的重點在哪裡。但條列式的報告對於之後的研究取材較為方便，因為已經有條列對所有項目的評估，但敘述性的報告可能會有遺漏，且還需花時間從報告中提取所需的資訊。目前可行的作法是在本院的條列式報告另外附加敘述性的評論(comment)，如果有想要強調的發現則在此段落呈現，評論的段落最好直接接續在診斷之下，以免報告太長而被忽略掉。

二、病理報告系統的整合：在華大病理部的資訊系統可以很方便地將螢光及電子顯微鏡的影像作上傳與保存，甚至在報告內還可以附加案例的影像照片。而本部目前對於螢光跟電子顯微鏡的影像仍然各自獨立保存在檢查時使用的電腦中，因為這些影像也算是病歷的一部分，也有規定必須保存的年限，因此最好能整合入報告系統中做長期保存。

三、對於特殊案例的免疫染色：如 PLA2R、IgG subclass staining 及 immunofluorescence on paraffin embedded tissue (IF-P)，可以先以研究經費進行，如果有初步結果或許可以考慮在健保給付允許的範圍內申請使用。若排序優先等級，可以先從 PLA2R 品質的改善開始，附錄為華大病理部 PLA2R 染色的程序可做為參考。

四、螢光檢查新鮮標本的保存：在華大病理部對於螢光檢查剩餘的新鮮標本是以研究的方式申請 IRB 通過以利其他研究使用。目前本院螢光檢查剩餘的新鮮標本並無長期保存，而因為腎臟切片組織取得不易，可以考慮以此方式進行長期保存。

五、與臨床醫師的溝通：因為腎臟病理的報告需要較多的檢查項目，往往需要較多的工作天數才能有正式的報告，若有需要緊急處置的案例，則最好能及時提供初步的結果來引導臨床治療，以免耽誤病人病情。

## 附錄

### IF Protocol for PLA2R Stain

Antibodies needed for Indirect IF Method for PLA2R

1. PLA2R (Sigma-Aldrich)
2. Biotinylated Rabbit IgG (Vector Laboratories)
3. FITC Conjugated Streptavidin (Vector Laboratories)

Indirect IF method for PLA2R

1. Cut 2x 4 micron sections of the frozen tissue on positive charged slides. One labeled as "PLA2R" and one labeled as "no primary" .
2. Fix the slides in cold Acetone for 5 minutes.
3. Air dry the slides.
4. Using a diamond pencil, scribe a circle around the tissue section on the front side of the slide.
5. Rinse slides in two changes of Bond wash solution.
6. Apply 100 microliters of rabbit anti PLA2R antibody at validated dilution to all the appropriate slides except the ones labeled as "no primary" (which they can be left in bond wash). Incubate for 60 minutes at RT in a moist chamber.
7. Pick up all slides from the primary antibody incubation and wash them in three changes of Bond wash for 2-3 minutes each.
8. Apply 100 micro liters of the appropriate dilution of the biotinylated goat anti-rabbit IgG to all the slides including PLA2R and "no primary" slides. Incubate for 45 minutes at room temperature, on the covered moistened chamber.
9. Pick up all the slides from the secondary antibody incubation and wash them in three changes of bond wash for 2-3 minutes each.
10. Apply 150 micro liters of the appropriate dilution of the FITC conjugated Streptavidin to all slides including PLA2R and "no primary" slides. Incubate for 45 minutes at room temperature on a covered, dark, moist chamber. Make sure the slides are not exposed to any light at this step.
11. Pick up all the slides from the tertiary antibody incubation and rinse in three changes of bond wash for 2-3 minutes each.
12. Coverslip with IF mounting media.
13. Store the slide in closed pallets at 2-8°C.