การย้อมสีออร์ซีนเพื่อตรวจหาออสเตรเลียแอนติเจนในชิ้นเนื้อตับ*

พงษ์พีระ สุวรรณกูล**

จากการย้อมสีออร์ซีนของชิ้นเนื้อตับ เพื่อตรวจหาออสเตรเลียแอนติเจนในผู้ป่วย 203 ราย ปรากฏว่าตรวจพบออสเตรเลียแอนติเจน 12 ราย คิดได้ร้อยละ 5.9 ในจำนวน 12 รายนี้เป็นโรคมะเร็งเซลล์ตับ 4 ราย (9.5%) จากจำนวน 42 ราย โรคตับอักเสบเรื้อรัง 2 ราย (15.38%) จากจำนวน 13 ราย โรคตับแข็ง 5 ราย (13.5%) จากจำนวน 37 รายและกลุ่มโรคเบ็ดเตล็ด 1 ราย (3.2%) จากผู้ป่วย 31 ราย อุบัติการของออสเตรเลียแอนติเจนในชิ้นเนื้อตับใกล้เคียงกับอุบัติการของซีรั่มออสเตรเลียแอนติเจนในผู้บริจาคเลือด ผู้ป่วยโรคตับอักเสบ โรคตับแข็ง และโรคมะเร็งเซลล์ตับของผู้รายงานอื่น ๆ ในประเทศไทย

ออสเตรเลียแอนติเจนถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในซีรั่มโดย Blumberg และคณะ[6] ในปี ค.ศ. 1965 ปัจจุบันนี้เชื่อว่าออสเตรเลียแอนติเจนเป็นสาเหตุของโรคไวรัสตับอักเสบชนิดที่มีระยะฟักตัวนาน[23] นอกจากนี้ออสเตรเลียแอนติเจนยังมีส่วนในการเกิดโรคไวรัสตับอักเสบเรื้อรัง[7,17,28,34,39] โรคตับแข็ง[8,10,20,25] และมะเร็งเซลล์ตับอีกด้วย[11,21,24,30,33,36-38]

ในปี ค.ศ. 1974 Shikata และคณะ[31] ได้ค้นพบวิธีการย้อมสีออสเตรเลียแอนติเจนในชิ้นเนื้อตับจากแท่งพาราฟินด้วยสีออร์ซีน ผลการย้อมหาออสเตียแอนติเจนของ Shikata ได้ผลดี และผลที่ได้สอดคล้องกับวิธีการศึกษาจาก immunofluorescent และ electron microscopy การย้อมสีออสเตรเลียแอนติเจนด้วยออร์ซีนจึงแพร่หลายออกไปทั่วโลก เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่ายสะดวก ผลเชื่อถือได้ และวิธีการนี้สามารถนำไปปฏิบัติในห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยาทั่วไปได้

อุบัติการของออสเตรเลียแอนติเจนในซีรั่มของประชาชนทั่วไป[14] ในผู้บริจาคโลหิต[1,2,3,29] และในผู้ป่วยโรคตับ[8,27] ของประเทศไทยนับว่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับอุบัติการของประเทศในภาคพื้นยุโรปและอเมริกา[24]

จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาอุบัติการ

*ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยไซน่าเมดิคัลบอร์ด พ.ศ. 2520

**แผนกพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของออสเตรเลียแอนติเจนในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยโรคตับชนิดต่าง ๆ กัน และหาความสัมพันธ์ระหว่างออสเตรเลียแอนติเจน และโรคตับชนิดนั้น ๆ ด้วย

วัสดุและวิธีการ

1. วัสดุการวิจัย ใช้ชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยที่ส่งไปตรวจหาพยาธิสภาพที่แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตลอดปี พ.ศ. 2520 จำนวน 206 ชิ้นในจำนวน 206 ชิ้นมีเพียง 203 ชิ้นเท่านั้นที่ได้ย้อมสีออร์ซีนตามวิธีของ Shikata เพื่อตรวจหาออสเตรเลียแอนติเจนด้วยกล้องจุลทรรศน์ ธรรมดาเนื่องจากชิ้นเนื้อตับ 3 ชิ้นมีขนาดไม่เพียงพอสำหรับการศึกษาจึงได้ตัดออกไป ชิ้นเนื้อตับทั้ง 203 ชิ้นนี้เป็นชิ้นเนื้อขนาดใหญ่ได้มาโดย surgical biopsy จำนวน 53 รายและเป็นชิ้นเนื้อขนาดเล็กได้มาโดย needle biopsy จำนวน 150 ราย

ชิ้นเนื้อตับทั้ง 203 ชิ้นนี้จะถูกแช่เก็บในน้ำยาฟอร์มาลินก่อนที่จะผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ ของการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อตรวจหาพยาธิสภาพ การศึกษาพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อตับอาศัยการย้อมสีธรรมดา (hematoxylin-eosin) เป็นหลัก ชิ้นเนื้อตับบางรายก็อาศัยการย้อมสีพิเศษอื่น ๆ เช่น reticulin, Masson-trichrome, iron.

2. วัสดุเปรียบเทียบการวิจัย ใช้ชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยที่ทราบผลซีรั่มออสเตรเลียแอนติเจนแล้ว จำนวน 75 ราย ในจำนวนนี้เป็นโรคตับอักเสบเฉียบพลัน 20 ราย ตับอักเสบเรื้อรัง 30 รายและเป็นพาหนะของเชื้อ (carrier) ที่ไม่มีอาการแสดง 25 ราย ชิ้นเนื้อทั้ง 75 รายนี้รวบรวมได้จากผู้ป่วยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2515–2521

ตารางที่ 1 แสดงพยาธิสภาพของโรคตับชนิดต่าง ๆ

กลุ่มโรค	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
มะเร็งของตับและอวัยวะอื่น	58	28.2
กลุ่มโรคตับอักเสบ และกลุ่มโรคใกล้เคียง	52	25.2
กลุ่มโรคตับแข็ง ไขมันในตับ และโรคใกล้เคียง	51	24.8
กลุ่มโรคน้ำดีคั่งในตับ	11	5.3
อื่น ๆ	34	16.5
รวม	206	100.0

ผลการศึกษา

1. ผลการตรวจหาพยาธิสภาพในโรคตับชนิดต่าง ๆ จากชิ้นเนื้อตับจำนวน 206 ราย ปรากฏพยาธิสภาพต่าง ๆ กันดังตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าอุบัติการของโรคตับมีความคล้ายคลึงกับอุบัติการในโรงพยาบาลศิริราชที่มีผู้ศึกษาไว้ก่อนแล้ว[5] โรคมะเร็งเซลล์ตับ โรคตับอักเสบ และโรคตับแข็งมีอุบัติการสูงกว่ากลุ่มโรคอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด

2. ผลการย้อมหาออสเตรเลียแอนติเจนในโรคตับชนิดต่าง ๆ ผลของวัสดุการวิจัยจากชิ้นเนื้อตับจำนวน 203 ชิ้น ปรากฏผลบวกดังแสดงในตารางที่ 2

กลุ่มโรคอื่น ๆ ที่ให้ผลบวก 1 ราย ในจำนวน 31 รายนั้นมีพยาธิสภาพเป็น cysts และเซลล์ตับ

ตารางที่ 2 แสดงผลบวกของการย้อมสีออร์ซีนในโรคตับชนิดต่าง ๆ

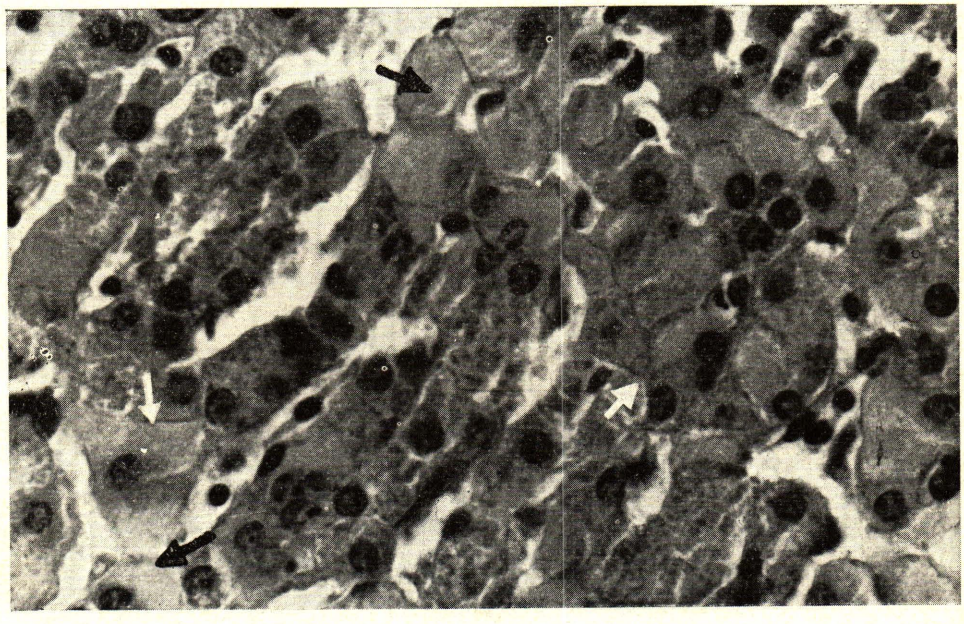
กลุ่มโรค	จำนวน (ราย)	ผลการย้อมสีออร์ซีน		ผลบวก ร้อยละ
		+	−	
มะเร็งของตับและอวัยวะอื่น (58 ราย)				
มะเร็งเซลล์ตับ	42	4	38	9.5
มะเร็งท่อน้ำดีในตับ	6	−	6	−
มะเร็งจากอวัยวะอื่น	10	−	10	−
ตับอักเสบและกลุ่มโรคใกล้เคียง (52 ราย)				
ไวรัสตับอักเสบเฉียบพลัน	12	−	12	−
ไวรัสตับอักเสบเรื้อรัง	13	2	11	15.3
เนื้อตับและท่อน้ำดีอักเสบจากสาเหตุอื่น ผีในตับ	27	−	27	−
ตับแข็ง ไขมันในตับ และโรคใกล้เคียง (51 ราย)				
ตับแข็ง	37	5	32	13.5
ไขมันในตับ fibrosis	14	−	14	−
น้ำดีคั่งในตับ	11	−	11	−
อื่น ๆ	31	1	30	3.2
รวม	203	12	191	5.9
เปรียบเทียบในผู้ป่วยที่ทราบผลซีรัม HB_sAg				
ไม่มีอาการแต่เป็นพาหะของโรค	25	14	11	56
ไวรัสตับอักเสบเรื้อรัง	30	5	25	16.7
ไวรัสตับอักเสบเฉียบพลัน	20	0	20	0

ในรายที่มีลักษณะของ ground glass appearance ซึ่งพบได้เสมอในผู้ที่เป็น HB_s A_g carriers[16] ที่ไม่มีอาการ (ภาพที่ 1)

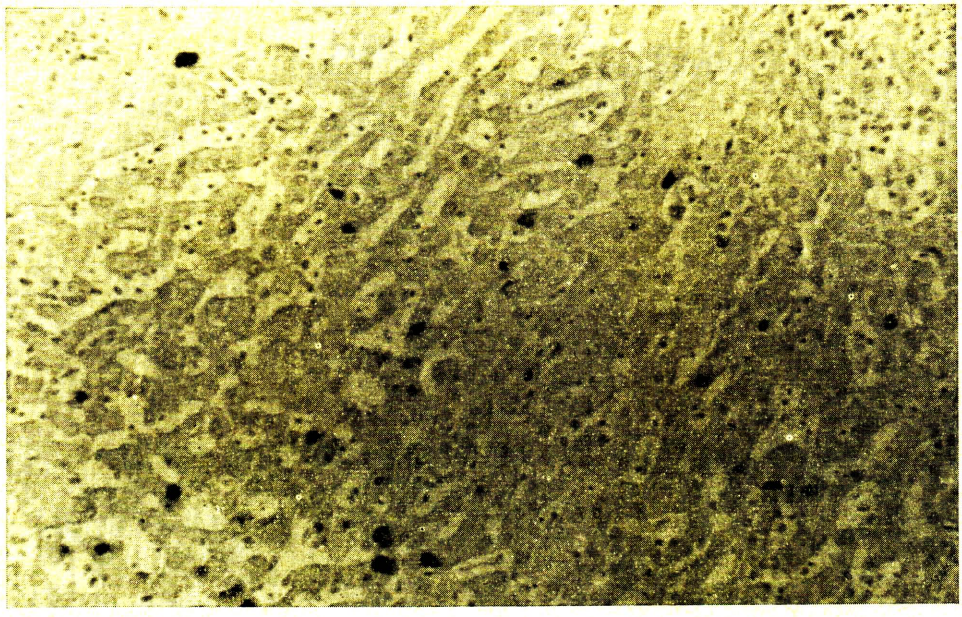
ออสเตรเลียแอนติเจนจะถูกสีออร์ซีนย้อมปรากฏให้เห็นเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีม่วงแดงอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ตับโดยจะอยู่กระจัดกระจายกันหรือรวมกลุ่มกันก็ได้ (ภาพที่ 2,3) นอกจากในเซลล์ตับแล้ว ออสเตรเลียแอนติเจนที่ถูกย้อมสี อาจปรากฏอยู่ใน Kupffer cells ใน liver sinusoid ก็ได้ ในเซลล์ที่ถูกทำลายหรือมีการเปลี่ยนแปลงมากจนเป็นเซลล์มะเร็ง จะไม่ปรากฏการย้อมสีของออสเตรเลียแอนติเจนเลย กลไกของการย้อมสีแอนติเจนนี้ไม่ทราบแน่ แต่เชื่อว่า เนื่องจากปฏิกริยาระหว่างสีออร์ซีนกับไดซัลไฟด์บอนด์ของออสเตรเลียแอนติเจน

วิจารณ์

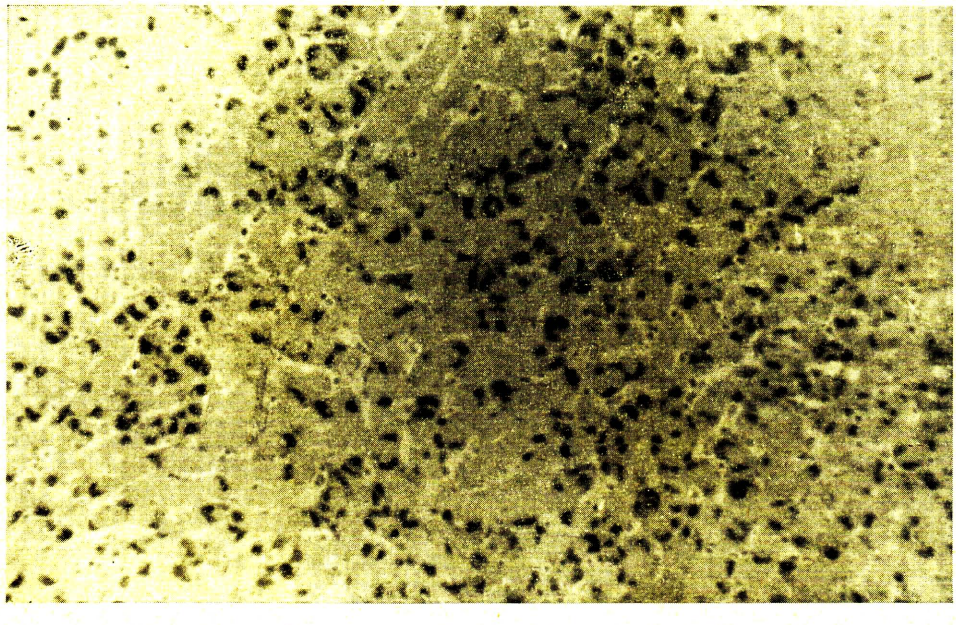
ผลการตรวจพบออสเตรเลียแอนติเจนในชั้น



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะ Ground glass appearance เซลล์ตับ (ลูกศรชี้) พบได้ใน Asymptomatic HB_s A_g carrier (H & E ×400)



ภาพที่ 2 แสดงการติดสีออร์ซีนชนิดกระจัดกระจายของออสเตรเลียแอนติเจนในเซลล์ตับ (Orcein × 100)



ภาพที่ 3 แสดงการติดสีออร์ซีนชนิดรวมกลุ่มกันของออสเตรเลียแอนติเจนในเซลล์ตับ (Orcein × 100)

เนื้อตับของผู้ป่วยในกลุ่มโรคตับอักเสบเรื้อรัง โรคตับแข็ง และมะเร็งเซลล์ตับคิดเป็นร้อยละ 15.3 13.5 และ 9.5 ตามลำดับนั้น ใกล้เคียงกับผลการศึกษาซีรั่มออสเตรเลียแอนติเจนในผู้ป่วยโรคตับอักเสบ โรคตับแข็งและมะเร็งเซลล์ตับของผู้รายงานอื่นที่ได้ทำไว้แล้ว[8,27] ชิ้นเนื้อตับที่ให้ผลบวกออร์ซีนจำนวน 12 ราย จากผู้ป่วย 203 คนคิดเป็นร้อยละ 5.9 นั้นก็ใกล้เคียงกับอุบัติการของออสเตรเลียแอนติเจนในซีรั่มของผู้บริจาคโลหิตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์[3] และโรงพยาบาลศิริราช[1,2] ซึ่งอาจนับได้ว่าเป็นอุบัติการของออสเตรเลียแอนติเจนในประชาชนทั่วไปได้

จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาอุบัติการของออสเตรเลียแอนติเจนในชิ้นเนื้อตับในโรคตับชนิดต่าง ๆ กัน การศึกษานี้ไม่ได้มุ่งเฉพาะไปในกลุ่มโรคตับอักเสบเรื้อรัง กลุ่มโรคตับแข็งและมะเร็งเซลล์ตับเท่านั้น ฉะนั้นผลบวกของการย้อมสีออร์ซีนจึงออกมาต่ำ เมื่อเทียบกับรายงานของนักวิจัยอื่น[12,19,26] ซึ่งมุ่งเฉพาะแต่ในกลุ่มโรคตับอักเสบและกลุ่มที่เป็น carriers

เหตุผลประการหนึ่งที่ทำให้ผลบวกออร์ซีนในกลุ่มโรคตับทั้ง 3 ต่ำ เนื่องจากขนาดของชิ้นเนื้อตับมีขนาดเล็ก (ส่วนใหญ่ชิ้นเนื้อตับได้จาก needle biopsy) ดังจะเห็นได้ว่าในจำนวน 12 ราย ที่ให้ผลบวกต่อออร์ซีนนั้น 7 ราย เป็นชิ้นเนื้อตับที่ได้จาก surgical biopsy ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าชิ้นเนื้อที่ได้จาก needle biopsy มาก

ในรายงานเบื้องต้นเรื่องการย้อมหาออสเตรเลียแอนติเจนในโรคตับแข็งและมะเร็งของตับด้วยสีออร์ซีน โดยอาศัยชิ้นเนื้อที่ได้จากการตรวจศพ (กำลังศึกษาอยู่ในโรคตับแข็งและโรคมะเร็งของตับ ซึ่งจะได้เสนอรายงานนี้ในโอกาสต่อไป) ปรากฏว่าได้ผลบวกออร์ซีนสูงกว่าการศึกษานี้คือ

1. ในกลุ่มโรคตับแข็งให้ผลบวก 13 ราย ในจำนวน 42 รายคิดเป็นร้อยละ 30.95

2. ในกลุ่มโรคมะเร็งเซลล์ตับให้ผลบวก 14 รายในจำนวน 28 รายคิดเป็นร้อยละ 48.27

ดังนี้จะเห็นได้ว่าขนาดของชิ้นเนื้อและปริมาณของเนื้อตับมีส่วนสำคัญในการให้ผลบวกต่อการย้อมสีออร์ซีน (โดยปกติแล้วชิ้นเนื้อที่ได้จากการตรวจศพ มีจำนวน 1–4 ชิ้น ในแต่ละราย) เพราะฉะนั้นชิ้นเนื้อที่ได้จากการตรวจศพ จึงมีโอกาสที่จะให้ผลบวกต่อการย้อมสีออร์ซีนมากกว่าชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วย

เหตุผลอีกประการหนึ่งคือ วิธีการย้อมออสเตรเลียแอนติเจนอาจไม่มีความไวเพียงพอเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ เช่น immunoperoxidase, immunofluorescent[9,16,22] และ electron microscopy[13,18,31,35] ซึ่งอาจจำเป็นต้องใช้วิธีการเหล่านี้ศึกษาหาอุบัติการของออสเตรเลียแอนติเจนในโรคตับต่าง ๆ ต่อไป แต่อย่างไรก็ดีวิธีการเหล่านี้แม้ว่าจะให้ผลบวกสูงกว่า แต่ก็สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและวิธีการยุ่งยากมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการย้อมสีออร์ซีนและไม่เหมาะที่จะนำไปปฏิบัติการทางพยาธิวิทยาทั่ว ๆ ไป นอกจากในสถาบันวิจัยต่าง ๆ และในคณะแพทยศาสตร์เท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

1. ทัศน์ยานี จันทนยืงยง ร่มไทร สุวรรณิก ราดิโออิมมูโนแอสเส์ของออสเตรเลียแอนติเจนในผู้บริจาคเลือด สารศิริราช 27 : 117-119, 2518
2. ดิเรก พงศ์พิพัฒน์ วินัย สุวัตถี อมรา รัตนวงศ์ การศึกษาแอนติเจนออสเตรเลียและแอนติบอดีในเลือดผู้บริจาคที่โรงพยาบาลศิริราช จดหมายเหตุทางแพทย์ 53 : 569-573, 2514
3. สดใส เวชชาชีวะ ฤทัย สกุลแรมรุ่ง อำนาจ ศรีรัตนบัลล์และคณะ เอช เอ เอ ในผู้บริจาคเลือดของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จดหมายเหตุทางแพทย์ 54 : 546-567, 2514
4. Afroundakis AP Liew CT, Peters RL : An immunoperoxidase technic for the demonstration of the hepatitis B surface antigen in human livers. Am J Clin Pathol 65 : 533-539, 76
5. Bhamarapravati N, Virranuvatti V, Liver diseases in Thailand—An analysis of liver biopsies. Amer J Gastrcenterology 45 : 267-275, 66
6. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S : A "New" antigen in leukemic sera JAMA 191 : 541-546, 65
7. Blumberg BS, Sutnick AL, London WT, et al : Australia antigen and hepatitis, N Eng J Med 283 : 349-354, 70
8. Chainuvati, T, Viranuvatti V, Pongipat D : Relationship of hepatitis B antigen in cirrhosis and hepatoma in Thailand
9. Coyne VE et al : The localization of Australia antigen by immunofluorescence Millman I J Exp Med 131 : 307-319, 70
10. Dermirel N, Pirnar A, Telatar H, et al : Australia antigen in cirrhosis : a study of 45 patients in Turkey : Am J Gastroenterol 59 : 332-335, 73
11. Denison EK, Peters RL, Reynolds TB : Familial hepatoma with hepatitis-associated antigen. Ann Intern Med 74 : 391-394, 71
12. Deodhar KP, Tapp E, Scheuer PJ, Orcein staining of hepatitis B antigen in paraffin sections of liver biopsies. J Clin Path 28 ; 66-70, 75
13. Gerber MA, Schaffner F, Paronetto F : Immuno electron microscopy of hepatitis B antigen in liver : Proc Soc Exp Biol Med 140 : 1334-1339, 72
14. Grossman RA, Benenson MW, Scott RM et al : An epidmiologic study of hepatitis B virus in Bangkok Thailand
15. Hadziyannis S, Gerbar MA, Vissoulis C, et al : Cytoplasmic hepasitis B antigen in "ground glass", hepatocytes of carriers : Arch Path, 96 : 327-330, 73
16. Hadziyannis ST Vissoulis CH moussouros A et al : Cytoplasmic localization of australia antigen in the liver. Lancet 1 : 976-979, 72
17. Hirayama C, Tominaga K, Irisa T, et al : Serum gamma-globulins and hepatitis-associated antigen in blood donors, chronic liver diseases and primary hepatoma : Digestion 7 : 257-265, 72
18. Huang SN, Millan I, O'Connell A et al : Virus-like particles in australia antigen associated hepatitis : An immunoelectron microscopic study of human liver. Am J Clinical Path, 67 : 453-470, 70
19. Kostich ND, Inpham CD : Detection of hepatitis B surface antigen by means of orcein staining of liver. Amer J Clinical Path, 67 : 20-30, 77
20. Maynard EP, III, Sadikali F, Anthony P, et al : Hepatitis-associated antigen and cirrhosis in Uganda. Lancet 2 : 1326-1328, 70
21. Tong MJ Sun, SC S, Schaffer BT et al : Hepatitis-associated antigen and hepaticellular carcinoma in Taiwan. Ann Intern Med 75 : 687-691, 71
22. Nowslawski A, Brzosko WJ et al : Callular localization of australia antigen in the liver of patients with lymphoproliferative disorders. Lancet 1 : 494-498, 70
23. Giles JP, McCollum RW, Berndtson LW et al : Relation of Australia SH Antigen to the Willow brook MS-2 strain. N Eng J Med 281 : 119-122, 69
24. Peters RL, Afroudakis AP, Tatter D : The changing incidence of Association of Hepatitis B with HCC in California. Am J Clin Pathol 68 : 1-7, 77
25. Ohbayashi A, Mayumi M, Okochi K : Australia antigen in familial cirrhosis Lancet 1 : 244, 71
26. Portmann B, Galbraith RM, Eddleston WF, et al : Detection of HBsAg in fixed liver tissue-use of a modified immunofluorscent technique and comparison with histochemical methods. Gut, 17, 1-9, 16
27. Prasert Thongcharoen Panpatana Wasi Ch et al : The incidence of hepatitis B surface antigen in Tropical Infections and liver diseases in Thailand
28. Prince AM, Leblanc L, Kroln K, et al : SH antigen in Chronic liver diseases. Lancet 2 : 717-718, 70
29. Punyagupta S, Olson LC, Harinasuta U, et al : The epidemiology of hepatitis B antigen in a high prevalence area. Am J Epidemiol 97 : 349-354, 73
30. Sherlock S, Fox, RA, Miazi SP, et al : Chronic liver disease and primary liver-cell cancer with hepatitis-associated (Australia) antigen in serum. Lancet 1 : 1243-1247, 70
31. Shikata T, Uzawa T, Yoshiwora N, et al : Staining methods of australia antigen in paraffin section-datection of cytoplasmic inclusion bodies, Jap J Exp Med 44 : 25-36, 74

32. Shikata T : Australia Antigen in liver tissue : an immunofluorescent and immunoelectron microscopic study

33. Simons MJ : Australia antigen in Hepatocellular Carcinoma. Lancet 2 : 1089-1090, 72

34. Smith JB : Blumberg BS : Viral hepatitis Post-necrotic cirrhosis and Hepatocellular carcinoma (letter) Lancet 2 : 953, 69

35. Stein O, Fainaru M, Stein Y : Visualization of virus-like particles in endoplasmic reticulum of hepatocytes of australia antigen carriers. Lab Invest 26 : 262-269, 72

36. Tan AYO Law CH Lee YS : Hepatitis B antigen in the liver cells in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Pathology 9 : 57-64, 77

37. Vogel CL, Authony PP, Mody N, et al : Hepatitis-sssociated antigen in Ugadda patients with hepatocellular carcinoma. Lancet 2 : 621-624, 70

38. Welsh JD, Brown JD, Arnold K et al : Hepatitis B_s Antigen, Malaria titers and Primary liver cell carcinoma in South Vietnam Gastroenterology 70 : 392-396, 76

39. Wright R, McCollum RW, Klatskin G : Australia antigen in acute and chronic liver disease, Lancet 2 : 117-121, 69

Orcein staining for detection of Australia antigen (HB_sAg) in paraffin sections of liver biopsy*

Pongsepeera Suwangool M.D.**

By using orcein staining on liver biopsy specimen in 203 patients it was found that HB_sAg was positive in 12 cases (5.9%), of these 12 cases 4 (9.5%) were primary liver cell cancer (total number of primary liver cell cancer were 42 cases) 2 cases (15.38%) were chronic hepatitis (total number of chronic hepatitis were 13 cases), 5 cases (13.5%) were cirrhosis (total cirrhosis were 37 cases) and one case (3.2%) from other cases (total number of cases in this group were 31 cases). The incidence of HB_sAg in the liver cells is therefore quite similar to those in the serum of blood donors, viral hepatitis, cirrhosis and primary liver cell cancer reported by others from Thailand.

*Supported by the China Medical Board Research Grant 1977.

**Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.