

## 司法醫學應用講座系列之 2- 法醫解剖鑑定之前瞻性及趨勢 談法醫分子病理的運用\*

潘至信\*\*

### 目 次

- 壹、前言
- 貳、臺灣與世界法醫病理發展現況
- 參、法醫分子病理技術
- 肆、法醫分子病理運用實例
- 伍、總結

### 摘 要

法醫病理學廣泛運用分子病理學之診斷方法與技術，為法醫解剖鑑定重要發展趨勢之一。相較於傳統組織或細胞病理常規進行之蘇木紫-伊紅染色與特殊染色僅提供病理切片或細胞抹片之形態學上病理變化，分子病理學，包括免疫組織化學染色、原位雜交染色及免疫螢光染色等診斷方法與技術，可呈現分子層級，包括蛋白質、核酸、基因層級之病理變化與證據，供執行法醫解剖之法醫病理專科醫師診斷與判定死亡原因，可大幅提昇病理診斷的敏感度與精確度。法務部法醫研究所已於 102 年起，執行「建構國家級法醫分子病理暨微生物鑑識軸心實驗室」科技計畫，逐年

\* 本文分子病理染色技術方法建立為 102 年至 104 年法務部科技計畫「建構國家級法醫分子病理暨微生物鑑識軸心實驗室」執行之成果[研究計畫編號：102-1301-IFM(09)-03、103-1301-IFM(06)-02、104-1301-IFM(8)-02]。

\*\* 潘至信，法務部法醫研究所法醫病理組研究員、法醫師、解剖病理專科醫師、法醫病理專科醫師，Email: acpanp501361@gmail.com。

發展分子病理診斷方法與技術，並已大量實際應用於法醫解剖案件之死亡偵查。持續發展法醫分子病理診斷方法與技術，擴大應用範圍，乃解決司法重大、困難、具爭議性、或亟需鑑別診斷案件之不二法門。

**關鍵字：法醫解剖、法醫病理、分子病理、免疫組織化學染色、原位雜交染色、免疫螢光染色**

# The perspectiveness and tendency of forensic autopsy About applications of forensic molecular pathology\*

Chih-Hsin Pan\*\*

## Abstract

To utilize the diagnostic methods and techniques of molecular pathology is one of the most important tendency of forensic pathology. Routine hemotoxylin-eosin stains and special stains in traditional histopathology or cytopathology only show the morphological pathological changes on tissue or smear slides. Molecular pathology, including immunohistochemistry, *in situ* hybridization and immunofluorescence, can demonstrate the pathological changes and evidences of molecular levels, including protein, nucleic acid and gene levels. It assists forensic pathologists a lot to investigate death and to make diagnosis of cause of death, increasing sensitivity and specificity. Institute of Forensic Medicine, Ministry of Justice had performed the program “To establish national forensic molecular pathology and microbial forensics laboratory” since 2013, and developed the diagnostic methods and techniques of molecular pathology year by year, applying in forensic autopsy cases.

**Key Words: Forensic autopsy, Forensic pathology, Molecular pathology,  
Immunohistochemistry, *In situ* hybridization, Immunofluorescence**

---

\* The techniques and methods of molecular pathology in this article were established by Ministry of Justice's programs “To establish national forensic molecular pathology and microbial forensics laboratory” from 2013 to 2015. [The number of programs are 102-1301-IFM(09)-03、103-1301-IFM-(06)-02、104-1301-IFM(8)-02.]

\*\* Chih-Hsin Pan, Principal Investigator, Medical Examiner, Anatomic Pathologist, Forensic Pathologist, Department of Forensic Pathology, Institute of Forensic Medicine, Ministry of Justice, E-mail: acpanp501361@gmail.com

## 壹、前言

現代法醫解剖乃以法醫病理學 (Forensic pathology) 為基礎，大量運用解剖病理 (Anatomic pathology) 的診斷技術與方法，執行死亡原因、死亡機轉及死亡方式的偵查與判定。法醫病理學的世界發展趨勢已進展到大量運用分子病理學 (Molecular pathology)，包括免疫組織化學 (Immunohistochemistry, IHC) 染色、原位雜交 (*In situ* hybridization, ISH) 染色及免疫螢光 (Immunofluorescence, IF) 染色的診斷技術與方法，以提昇法醫死亡偵查的精確度及敏感度。美國國家科學研究委員會 2009 年出版《強化美國法庭科學之路》(Strengthening Forensic Science in the United States: A Path Forward)，建議強化法醫死亡偵查，必需運用新的診斷技術，包括分子層級的實驗診斷方法<sup>1</sup>。

## 貳、臺灣與世界法醫病理發展現況

所謂“解剖”乃翻譯自英文“autopsy”，其涵義源自於古希臘語“*autopsia*”，字根是由 *αυτος* (*autos*, "oneself") 及 *ὄψις* (*opsis*, "eye") 組成，為“to see for oneself”的意思<sup>2</sup>，亦即有“自己用眼睛看”與“看自己”的意思。現代的解剖病理學乃源自病理解剖學之父喬瓦尼·巴蒂什·莫爾加尼 (Giovanni Battista Morgagni, 1682–1771)<sup>3</sup>及現代病理學之父魯道夫·卡爾·菲爾紹 (Rudolf Carl Virchow, 1821–1902)<sup>4</sup>的開創與持續發展。在美國，由於法醫死亡偵查的必要，起初法醫解剖是由醫師 (Medical doctor, MD) 執行，後因需由疾病診斷的專業醫師執行，隨之發展到由解剖病理專科醫師 (Anatomic pathologist, AP) 執行，但法醫解剖的死亡原因 (Cause of death, COD) 偵查，需由具法醫專業的解剖病理專科醫師執行，因此，1959 年美國病理學會發出世界第一張法醫病理專科醫師證書 (Forensic pathologist, FP)。

<sup>1</sup> National Research Council. National Academy of Sciences (2009), Strengthening Forensic Science in the United States: A Path Forward, Washington, D.C.: The National Academies Press, p.267.

<sup>2</sup> <https://en.wiktionary.org/wiki/autopsy>。

<sup>3</sup> 義大利解剖學家，將病理解剖發展為一門精確的科學，發表重要著作 *De Sedibus et Causis Morborum per Anatomen Indagatis* (The Seats and Causes of Diseases Investigated by Anatomy, 1769)，首次系統地記載許多疾病的器官病理變化。[https://en.wikipedia.org/wiki/Giovanni\\_Battista\\_Morgagni](https://en.wikipedia.org/wiki/Giovanni_Battista_Morgagni)。

<sup>4</sup> 德國醫師，病理學家，運用顯微鏡觀察，研究疾病原理，建立細胞病理學、比較病理學，並且制訂一套屍體解剖標準法，[https://en.wikipedia.org/wiki/Rudolf\\_Carl\\_Virchow](https://en.wikipedia.org/wiki/Rudolf_Carl_Virchow)。

臺灣於 1988 年開始有病理科專科醫師甄審制度<sup>5</sup>，由解剖病理專科醫師執行醫學界的疾病病理診斷 (Pathological diagnosis)，進而於 2014 年 4 月由臺灣病理學會發出 29 張的法醫病理專科醫師證書<sup>6</sup>，自此，臺灣已正式進入由具有法醫病理專業的醫師運用先進病理學診斷技術與方法，執行法醫解剖死亡偵查的時代。

鑑於病理診斷為醫學之終極診斷，而分子病理技術應用可大幅提昇法醫病理鑑識能力，法務部法醫研究所已於 102 年起，執行「建構國家級法醫分子病理暨微生物鑑識軸心實驗室」科技計畫，逐年建置免疫組織化學染色、原位雜交染色及免疫螢光染色技術與方法，實際應用於法醫解剖案件死亡偵查，對於死亡原因診斷的敏感度與精準度，助益極大。

## 參、法醫分子病理技術

早在 1987 年分子生物技術即應用於法醫科學中，利用 DNA 指紋鑑定技術進行個人身分鑑別，而比對出兇手<sup>7,8</sup>。法醫分子病理學已廣泛應用於法醫科學上，包括人身鑑別、死亡原因 (疾病、傷害、中毒)、死亡方式 (自然死、意外、自殺、他殺)、及基因表現等<sup>9</sup>。病理學為探討個體疾病發生的原因、機轉及變化。分子病理學為將分子生物技術 (Molecular biology) 運用並結合於病理診斷中。

法醫病理學是運用病理學的知識與診斷方法，由屍體解剖及其所採之組織或細胞檢體之組織病理變化，以進行死亡原因診斷與判定，其中病理組織切片檢查是法醫死亡原因鑑定中極為重要的一環。法醫病理學主要診斷方法包括藉由肉眼之宏觀病理檢查後，再施以組織病理或細胞病理檢查，並佐以各種特殊染色，或分子病理學檢查以偵測蛋白質或核酸層級變化。法醫分子病理著重在調查死亡原因相關之生物分子層級，包括蛋白質、核酸、基因層級之病理變化，其目的乃直接呈現受損傷臟器組織功能與結構上的改變，使分子層級證據能夠於顯微鏡下呈現，而可做為人體死亡過程牽涉法醫議題之解釋<sup>10</sup>，法醫分子病理診斷技術，主要以病理組織切片

<sup>5</sup> 病理科專科醫師甄審原則。中華民國 77 年 10 月 20 日行政院衛生署衛署醫字第 762456 號公告訂定發布。中華民國 96 年 12 月 24 日行政院衛生署衛署醫字第 0960215497 號令修正發布第 10 點。

<sup>6</sup> 潘至信、曾柏元、蕭開平 (2015)，從世界各國法醫制度趨勢看我國法醫教考訓用制度，國家菁英季刊，11(2)：25-42。

<sup>7</sup> Merz, B. (1988). DNA fingerprints come to court. JAMA, 259(15), 2193-4.

<sup>8</sup> Zumwalt, R. E. (1989). Application of molecular biology to forensic pathology. Hum Pathol., 20(4), 303-7.

<sup>9</sup> Madea, B., Saukko, P., Oliva, A., and Musshoff, F. (2010). Molecular pathology in forensic medicine—Introduction. Forensic Sci Int., 203(1-3), 3-14.

<sup>10</sup> Maeda, H., Ishikawa, T., and Michiue, T. (2014). Forensic molecular pathology: its impacts on routine work, education and training. Leg Med (Tokyo) 16(2), 61-9.

技術為基礎，除常規進行之蘇木紫-伊紅染色(Hematoxylin and Eosin stain, H&E stain)外，佐以分子病理技術，包括免疫組織化學染色、原位雜交染色、免疫螢光染色等技術，供法醫病理專科醫師進行病理診斷。

免疫組織化學染色應用於解剖病理，可以提高疾病診斷與分類正確性<sup>11</sup>。法醫案件中，一些分子生物標記已被研究出可應用於疾病診斷、傷口癒合時間及藥物毒性等<sup>12</sup>，例如：S100蛋白可應用於腦部損傷的調查<sup>13</sup>，肌球蛋白(Myoglobin)可做為橫紋肌溶解症(Rhabdomyolysis)及急性腎損傷的診斷標記<sup>14</sup>，類似此類蛋白標記可協助暴力死亡之案件的調查。此外，亦可應用於傳染病相關或是不明原因猝死案件之調查<sup>15</sup>。

免疫組織化學染色之原理為利用抗體專一性辨識抗原結合，進而以化學反應使標記於抗體的顯色劑作用呈色，可用以確定組織細胞內抗原分布位置及表現情形。其實驗步驟大致可分為脫蠟、回水、抗原修復、抗體作用反應及呈色。呈色物質包括3,3'-diaminobenzidine, DAB(棕色)、3-amino-9-ethylcarbazole, AEC(琥珀色)及Liquid fast red(亮紅色)，各物質所呈現顏色不同，可依實驗需求進行使用。免疫組織化學染色具有特異性強、敏感度高、簡便快速及定位之優點，為生物醫學研究一大利器。

原位雜交染色的原理為利用一特定序列的探針，去偵測組織內互補之序列，藉由探針上特殊標記，進而反應呈色。原位雜交染色的探針種類可分為四類：雙股DNA、單股DNA、RNA及寡核苷酸，DNA和RNA探針多是利用分子選殖方式製備，寡核苷酸類型的探針可利用合成製備，各有其優缺點<sup>16</sup>。探針上特殊標記則可分為放射性標記，包括<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S或<sup>3</sup>H，非放射性標記，例如biotin以及diogoxigenin。放射性標記因曝光時間較長、訊號容易消失以及安全性等問題，現在較少使用。非放射性的標記包括螢光標記及化學反應呈色。

<sup>11</sup> Bromley, A. B., and Trotter, M. J. (2011). Immunohistochemistry utilization in autopsy pathology: a Canadian experience. *Pathol Res Pract.*, 207(4), 241-6.

<sup>12</sup> Maeda, H., Zhu, B. L., Ishikawa, T., and Michiue, T. (2010). Forensic molecular pathology of violent deaths. *Forensic Sci Int.*, 203(1-3), 83-92.

<sup>13</sup> Li, D. R., Zhu, B. L., Ishikawa, T., Zhao, D., Michiue, T., and Maeda, H. (2006). Immunohistochemical distribution of S-100 protein in the cerebral cortex with regard to the cause of death in forensic autopsy. *Leg Med (Tokyo)*, 8(2), 78-85.

<sup>14</sup> Premru, V., Kovac, J., and Ponikvar, R. (2013). Use of myoglobin as a marker and predictor in myoglobinuric acute kidney injury. *Ther Apher Dial.*, 17(4), 391-5.

<sup>15</sup> Gaaloul, I., Riabi, S., Harrath, R., Evans, M., Huber, S., and Aouni, M. (2011). Coxsackie B3 myocarditis in a case of sudden unexpected death in young athlete: histopathological, immunohistochemical and molecular pathological for diagnosis. *Forensic Sci Int.*, 208(1-3), e10-4.

<sup>16</sup> Kumar, A. (2010). In situ Hybridization. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technoogy*, I(2): p. 418-30.

免疫螢光染色為利用抗體抗原專一性結合之特性，而以螢光顯微鏡觀察檢測特定蛋白是否存在於組織檢體中。其是利用具結合螢光色素物質的抗體進行反應，最後以螢光顯微鏡進行觀察。依實驗方法不同可分為直接法（Direct method）與間接法（Indirect method）<sup>17</sup>。直接法為所使用的一級抗體即帶有螢光物質標記，因此一級抗體作用後即可以螢光顯微鏡進行觀察，此法優點為非特异性結合少，但必需具備已標示螢光的一級抗體。間接法則是在一級抗體作用後，利用帶有螢光物質標記的二級抗體與一級抗體結合反應，此法應用範圍廣。常用的螢光標記物質包括FITC（fluorescein isothiocyanate）、TRITC（tetramethyl rhodamine isothiocyanate）、PE（phycoerythrin）及PerCP（peridinin chlorophyll protein complex）等。免疫螢光染色法其特性包含專一性、迅速性及敏感性，其與免疫組織化學染色差異點在於檢體處理及呈色方式不同。免疫螢光染色一般是利用新鮮組織為檢體，進行冷凍切片，這樣的方式可互補於一些因福馬林固定造成蛋白變性而無法被抗體偵測到的抗原。

免疫組織化學染色與免疫螢光染色皆是利用特定的抗體，於病理組織切片上作用反應偵測蛋白質表現，而原位雜交染色是利用特定之DNA或RNA序列設計的探針，於病理組織切片上作用反應偵測核酸表現之情形，此三項技術之結果皆可作為確立診斷之直接證據，於組織切片上呈現蛋白質或核酸分布及表現存在之情形，亦可應用於微生物病原鑑定。免疫螢光染色因利用螢光方式呈現，其靈敏度較免疫組織化學染色高。而病毒於組織上的診斷，會因病毒的特性不同，免疫組織化學染色及原位雜交染色之靈敏度不同，免疫組織化學染色主要可偵測細胞質中的病毒蛋白，而原位雜交染色可偵測到細胞核中病毒的核酸，兩種技術是有互補性的，對於診斷上有極大助益。

## 肆、法醫分子病理運用實例

由於社會的進步與大眾知識程度的提升，目前法醫解剖案件，對於致命原因或疾病的致病原，常需要做更為精確無誤的鑑定。傳統顯微鏡病理切片檢查中，蘇木紫-伊紅染色為常規性染色，然而，有許多疾病診斷無法或不易從傳統蘇木紫-伊紅染色病理切片中觀察及判讀，必須進一步藉由其他特殊染色或是分子病理技術的方式，提供明顯、直接且精確的證據，例如疑似疫苗傷害致死案件中病原體的偵查，感染症中的病毒或細菌種類、心臟疾病中是否有遺傳性的疾病、外傷中隱而不顯的

<sup>17</sup> 林榮培、楊揚輝。獸醫科技資訊網參考手冊：動物傳染病實驗室檢驗方法總論，第十四章螢光顯微鏡檢查法。<http://vettech.nvri.gov.tw/Articles/institute/429.html>

早期致命性腦髓及腎臟病理變化等，以下針對法醫分子病理運用於法醫實務案例進行說明。

## 一、鈍力傷案件<sup>18</sup>

18歲男性，遭多人虐打軟禁，全身（包括臀部、四肢、軀幹及頭部）多處鈍力傷，最後昏迷送醫不治。經傳統法醫解剖鑑定腎臟急性腎小管壞死，並且可觀察到腎小管內有大量棕色、顆粒狀沉積物質（圖 1-2）；解剖所採尿液呈濃茶色（圖 1-1）並含大量沉澱物。將腎臟組織切片以及尿液沉澱物製作成抹片進行肌球蛋白免疫組織化學染色，可證實腎小管內沉積物質為橫紋肌破壞釋出之肌球蛋白（圖 1-3），尿液沉澱物中也含有肌球蛋白（圖 1-4），符合肌球蛋白尿症（Myoglobinuria），此外，腎臟內的血管中亦含有肌球蛋白，符合肌球蛋白血症（Myoglobinemia）。因為肌球蛋白於人體中只存在於橫紋肌，意即肌球蛋白來自崩解的橫紋肌，故診斷為橫紋肌溶解症。

橫紋肌溶解症為骨骼肌（橫紋肌）受損，導致肌肉壞死及細胞膜破壞，造成肌肉內的一些蛋白質或肌球蛋白滲漏至血液中，隨後會進入尿中。在尿液中出現肌球蛋白，則稱為肌球蛋白尿。若尿中肌球蛋白濃度太高，則會導致腎臟機能受損，最後造成急性腎衰竭<sup>19</sup>。臨床上可檢查肌氨酸激酶（Creatine kinase），肌肉中的酵素，也會因肌肉遭受破壞釋放至血液中，橫紋肌溶解症發生，肌氨酸激酶的量可高達數千甚至上萬。然而，司法解剖案例，經常可能是到院前死亡，並無臨床生化檢驗數值可供參考，使得在死因鑑定上遭遇困難。本案可觀察到死者身上多處鈍力傷且有急性腎小管壞死情形，經由免疫組織化學染色，可於死者腎臟組織以及尿液中偵測到大量肌球蛋白，因有免疫組織化學染色的證據，綜合其他發現，可精確證實為橫紋肌溶解症。肌球蛋白免疫組織化學染色可做為司法案件有關虐死、運動過量或藥物等可能造成橫紋肌溶解症等原因之診斷參考依據。

<sup>18</sup> 潘至信、胡瑄耘、曾柏元、蕭開平。免疫組織化學染色技術於法醫解剖橫紋肌溶解症案例之應用。2014年鑑識科學研討會（TAFS）2014；227-231。

<sup>19</sup> Zimmerman, J. L., and Shen, M. C. (2013). Rhabdomyolysis. *Chest*, 144(3), 1058-65.





圖 1-1 死者尿液檢體，呈濃茶色

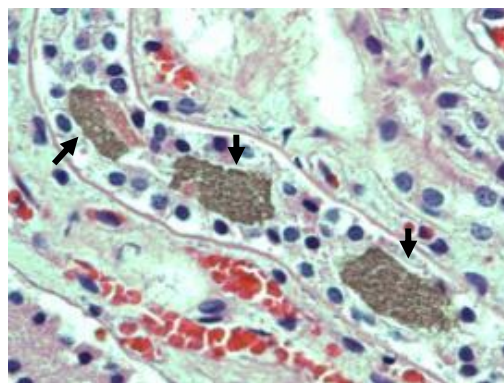


圖 1-2 腎小管內有大量棕色、顆粒狀沉積物質（蘇木紫-伊紅染色）

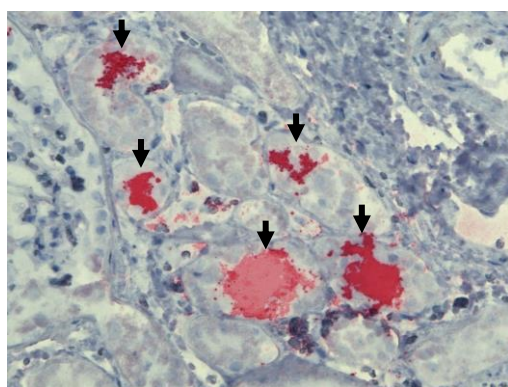


圖 1-3 腎臟組織肌球蛋白陽性（免疫組織化學染色，Fast red）

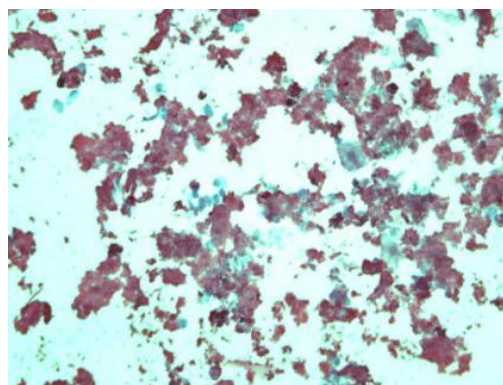


圖 1-4 尿液沉澱物抹片肌球蛋白陽性（免疫組織化學染色，Fast red）

## 二、瀰漫性外傷性軸突損傷案件

瀰漫性軸突損傷（Diffuse Axonal Injury, DAI）是外傷性腦損傷常見的損傷表現之一，其造成原因是因為於加速或減速過程中對腦造成的剪切力而損傷軸突，經常發生在頭部創傷案件。DAI 的診斷可藉由常規性蘇木紫-伊紅染色（圖 2-1）及銀染色（圖 2-2）觀察軸突損傷之病理變化。然而在早期發生 DAI 的案件，其病理變化不易觀察，研究指出乙型-類澱粉前驅蛋白（ $\beta$ -amyloid precursor protein,  $\beta$ -APP）免疫組織化學染色可做為診斷 DAI 的工具<sup>20</sup>，文獻指出利用免疫組織化學染色於車禍後

<sup>20</sup> Sara S., Carlo P. C., Fiorenza Z., Alessandra A., Giancarlo Di V., Massimo F. C., (2012).  $\beta$ -App immunoreactivity as diagnostic tool of Diffuse Axonal Injury (DAI). Rom J Leg Med., 20 (2), 89-94.

35 分鐘內腦損傷案件可偵測到  $\beta$ -APP<sup>21</sup>，因此可做為診斷早期軸突損傷的標記。

51 歲男性，先摔落樓梯後又遭毆打，毆打後立即呈現昏迷，隨之送醫不治到院前死亡。本案爭議點在於摔落樓梯致死還是遭毆打致死，一為意外事件，一為他殺案件。常規性的病理染色，包括蘇木紫-伊紅染色及銀染色，約超過十二小時以上方能觀察到軸突損傷的病理變化，本案案發自死亡的時間很短，以常規性染色無法觀察到有無瀰漫性軸突損傷的病理變化，只有經由免疫組織化學染色方能呈現出軸突損傷後所形成的梭形膨脹、念珠形斷裂或波浪狀的損傷軸突（圖 2-3 及圖 2-4）。

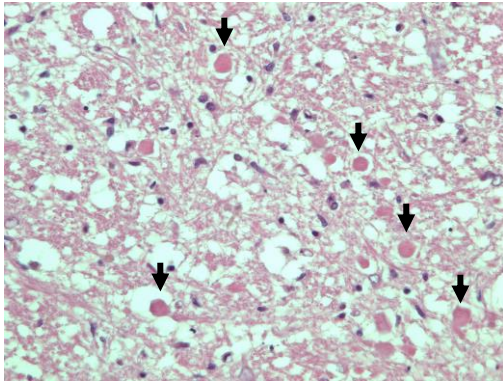


圖 2-1 DAI 案件，瀰漫性軸突損傷病理變化  
(蘇木紫-伊紅染色)

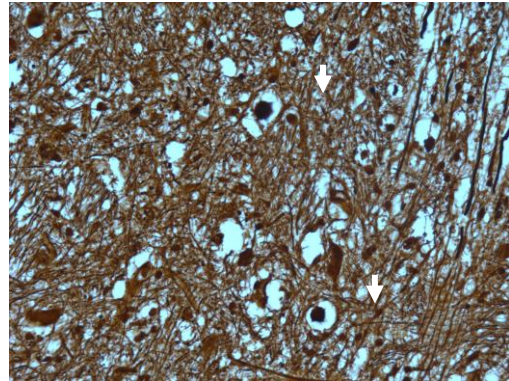


圖 2-2 DAI 案件，瀰漫性軸突損傷病理變化  
(Sevier-Munger 銀染色)

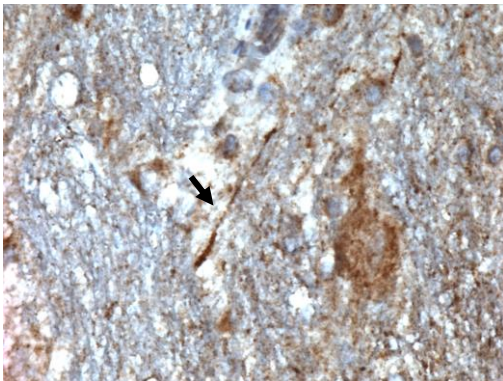


圖 2-3 DAI 案件， $\beta$ -APP 染色呈現梭形膨脹、  
念珠形斷裂的損傷軸突（免疫組織化學染  
色，DAB）

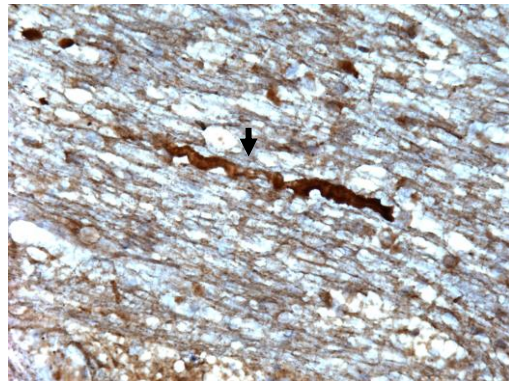


圖 2-4 DAI 案件， $\beta$ -APP 染色呈現波浪狀的損  
傷軸突（免疫組織化學染色，DAB）

<sup>21</sup> Hortobágyi T., Wise S., Hunt N., Cary N., Djurovic V., Fegan-Earl A., Shorrock K., Rouse D., Al-Sarraj S., (2007). Traumatic axonal damage in the brain can be detected using beta-APP immunohistochemistry within 35 min after head injury to human adults. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 33, 226-37.



### 三、疑似疫苗傷害致死案件

7 歲大男童，接種新型流感疫苗後，出現紅疹及發燒症狀，10 天後住院治療，31 天後不治死亡。家屬質疑死亡與疫苗接種有關，經法醫解剖鑑定，骨髓中可見噬血現象 (Hemophagocytosis)，均勻散佈許多大小不一吞噬細胞，吞噬紅血球、紅血球先前細胞及其他細胞 (圖 3-1)，理論上造成噬血現象發生的原因包括感染症、自體免疫疾病、惡性腫瘤及其他原因等<sup>22</sup>。本案解剖所採檢體，送至衛生福利部疾病管制署 (疾管署) 研究檢驗及疫苗研製中心進行微生物檢驗，於骨髓、心臟、肝臟、脾臟、肺臟、腎臟及大腦基底核檢體檢測微小病毒 b19 (Parvovirus b19) 皆為陽性，本所進一步利用原位雜交染色技術，將針對微小病毒 b19 序列之探針與骨髓組織切片進行作用後呈色，可於骨髓組織切片觀察到微小病毒 b19 陽性訊號反應 (圖 3-2)，可直接觀察及證實骨髓中噬血現象是由微小病毒 b19 感染所致。

此類疑似疫苗傷害致死案件，若以常規病理組織切片只可診斷至噬血現象，無法得知造成噬血現象的病原或原因。微生物檢驗結果可說明於多個器官組織中，有微小病毒 b19 的核酸物質存在，但無法直接說明其與噬血現象的關聯性，甚至有專家質疑是否有採檢過程中汙染到病毒的可能性。直到利用原位雜交染色於骨髓組織切片中，偵測微小病毒 b19 核酸存在於紅血球先前細胞，才可於病理切片中直接觀察並提供直接證據說明微小病毒 b19 與骨髓中噬血現象病理變化的關聯性。原位雜交染色技術的應用提昇法醫微生物鑑識能力，精確診斷有助於釐清爭議，可協助國內傳染病疫情的監控，並且有助於正確死因統計。

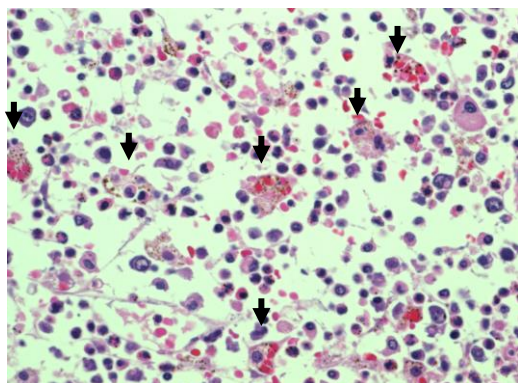


圖 3-1 骨髓中的噬血現象病理變化 (蘇木紫-伊紅染色)

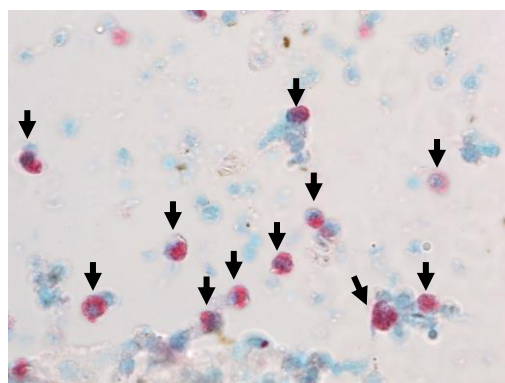


圖 3-2 骨髓組織微小病毒 b19 陽性 (原位雜交染色, Fast red)

<sup>22</sup> Rouphael, N. G., Talati, N. J., Vaughan, C., Cunningham, K., Moreira, R., and Gould, C. (2007). Infections associated with haemophagocytic syndrome. *Lancet Infect Dis.*, 7(12), 814-22.

#### 四、傳染病致死案件

在法醫實務案件上，經常遭遇可能為感染症案件，經常規性病理解剖組織切片觀察可能懷疑細菌或病毒感染，但往往可能由於解剖前無相關資訊，而未採取微生物檢驗檢體，未做進一步檢驗分析，而無法得知致病原，如間質性肺炎，大多是病毒性感染，若未進行微生物檢驗分析，則不知道致病原為何，只可鑑定為間質性肺炎。因此，對於此類案件，即可應用分子病理技術於組織檢體上進行檢測，是否有可能的致病原。此外，一些特殊的致病原，因檢驗的限制性，可能必須利用分子病理技術作為確認診斷，或是提昇診斷之靈敏度，以下對於傳染病感染症致死案件舉列說明。

##### (一) 流行性腦脊髓膜炎

流行性腦脊髓膜炎是一種突然發作的疾病，其致病原為腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis*)，會造成發燒、劇烈頭痛、噁心、嘔吐、頸部僵直、出血性皮炎、紅斑及精神學症狀(如精神錯亂)、昏迷、抽搐等臨床症狀<sup>23</sup>。其檢驗條件為臨床檢體分離並鑑定出腦膜炎雙球菌，然而此菌生長條件嚴苛，一旦遺體經由冰凍後，所採檢體即無法培養出此菌，因此對於可能懷疑為此菌感染致死的腦膜炎案件，只得依靠組織病理的方式進行診斷，利用針對腦膜炎雙球菌的抗體於組織切片上進行免疫組織化學染色，偵測是否存在腦膜炎雙球菌之抗原。本所與疾管署合作取得一例陽性個案檢體，此個案經由血液細菌培養得知死者有腦膜炎雙球菌的感染，於病理切片可直接觀察到腦膜炎雙球菌引起的心肌炎、腦膜炎及菌血症的病理變化。我們用免疫組織化學染色於心臟組織可偵測腦膜炎雙球菌抗原存在(圖4-1)，未來若遇到疑似腦膜炎雙球菌感染致死案例，可應用免疫組織化學染色方式進行診斷。

##### (二) 庫賈氏病

庫賈氏病(Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD)是一種罕見的神經性退化性疾病，其致病原為具有感染性的變性蛋白質普利昂蛋白(prion)，在腦組織中快速增加造成神經細胞死亡，使腦組織變成海綿樣，其鑑定的黃金診斷方式為病理組織切片或解剖檢體經由免疫組織化學染色及西方點墨法偵測普利昂蛋白<sup>24</sup>。本所與疾管署合作取得CJD陽性案例之檢體，利用免疫組織化學染色於腦組織可偵測普利昂蛋白之抗原存在(圖4-2)，未來疑似CJD案件可進行確認診斷，對於我國微生物鑑識能力

<sup>23</sup> 衛生福利部疾病管制署，傳染病介紹，第二類法定傳染病，流行性腦脊髓膜炎  
[http://www.cdc.gov.tw/professional/Meningococcal\\_meningitis](http://www.cdc.gov.tw/professional/Meningococcal_meningitis)

<sup>24</sup> 衛生福利部疾病管制署，傳染病介紹，第四類法定傳染病，庫賈氏病  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/CJD>

為一大提昇。

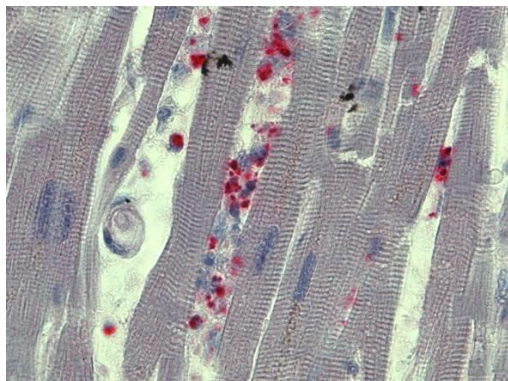


圖 4-1 流行性腦脊髓膜炎陽性個案，心臟組織切片腦膜炎雙球菌陽性（免疫組織化學染色，Fast red）

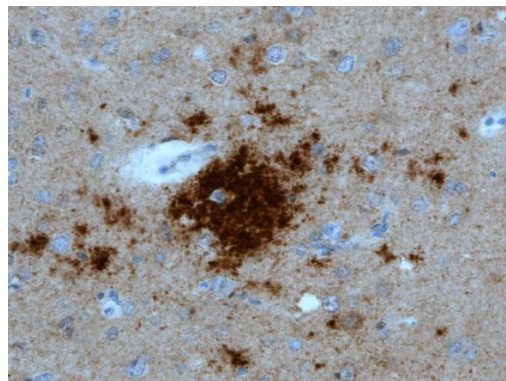


圖 4-2 庫賈氏症陽性個案，腦組織切片普利昂蛋白陽性（免疫組織化學染色，DAB）

### （三）結核病

結核病為全球重要的公共衛生議題，亦為我國重要法定傳染病之一。它是由結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染造成，此菌不易染色，一旦染上色，不易被強酸脫色，故又稱抗酸菌 (acid-fast bacilli)。大部分的人可因自身免疫力而不會發病，只有約 5% 的人會造成肺內或肺外結核。臺灣每年約有一萬多人為結核病確定病例，每年約造成 600 多人死亡<sup>25</sup>。司法解剖案件經常會遭遇肺結核病案例(圖 4-3)，法醫師可藉由組織切片觀察到典型結核病病理變化來進行診斷，進一步可利用抗酸性染色 (Acid-fast stain) 於組織切片上染出結核桿菌 (圖 4-4)，然而並非所有結核病案例皆具有大量的結核桿菌，因此利用抗酸性染色不一定容易找得到結核桿菌的存在，為了提升染色敏感度，我們利用針對結核桿菌抗原之抗體進行免疫組織化學染色，發現與抗酸性染色相比較，免疫組織化學染色其敏感度較高，呈色相對較明顯，且可於免疫組織化學染色呈現陽性訊號之相對位置，於抗酸性染色找到結核桿菌存在 (圖 4-5 及圖 4-6)。法醫分子病理的應用亦可提高染色敏感度，提升死因鑑定之精準度。

<sup>25</sup> 衛生福利部疾病管制署，傳染病介紹，第三類法定傳染病，結核病  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/Tuberculosis>





圖 4-3 肺結核陽性個案，肺臟解剖照片

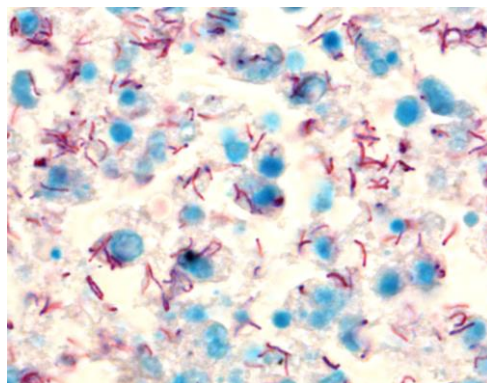


圖 4-4 肺結核陽性個案，肺臟組織結核桿菌陽性（抗酸性染色）

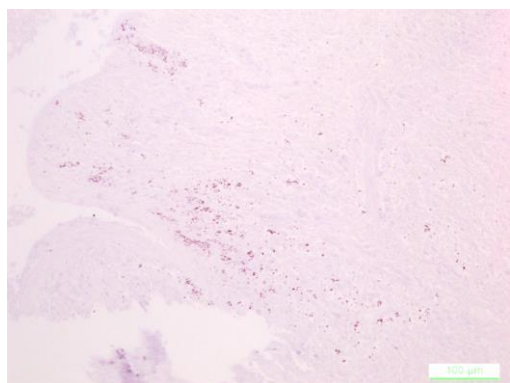


圖 4-5 肺結核陽性個案，肺臟組織結核桿菌陽性（抗酸性染色）

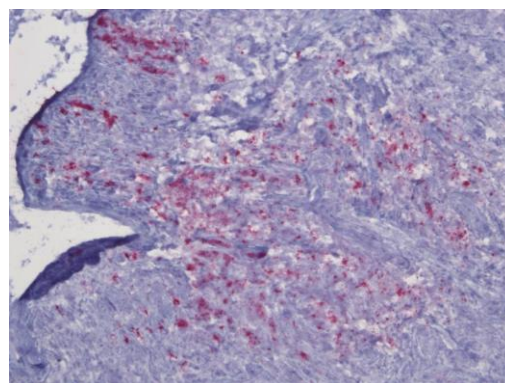


圖 4-6 肺結核陽性個案，肺臟組織結核桿菌陽性，較圖 4-5 有更強的敏感性（免疫組織化學染色，Fast red）

#### （四）登革熱案件<sup>26</sup>

41 歲男性，出現發燒（39.2°C）、頭痛、全身痠痛及全身無力等身體不適的症狀，至診所就醫，診治過程中突然猝死，診所醫師臆斷死者是 A 型流感。本案經由臺灣法醫解剖及相驗致死性傳染病通報與偵測系統（Taiwan Med-X）<sup>27</sup> 的通報，執行傳染病解剖，所採檢體經微生物檢驗流感病毒為陰性。我們利用免疫組織化學染色進行檢驗，發現登革病毒抗原陽性，通報疾管署，經微生物檢驗確認為第一型登革病毒。

<sup>26</sup> 潘至信、胡瑄耘、曾柏元、蕭開平。分子病理於法醫解剖登革熱死亡案例之應用。2015 年鑑識科學研討會(TAFS) 2015：225-230。

<sup>27</sup> 法務部法醫研究所（2011），Taiwan Med-X 臺灣法醫解剖及相驗致死性傳染病偵測系統，新北市：法務部。

登革病毒感染為病媒蚊傳播的疾病，主要發生在熱帶及亞熱帶地區，全球每年約造成 3.9 億人口感染，近十年全球登革熱發生率有急遽增加的趨勢<sup>28</sup>。臺灣於 2014 年發生嚴峻登革熱疫情，造成 1 萬五千例感染，以高雄、屏東及台南為主要疫區。2015 年本所執行法醫解剖及死因鑑定案件，共有 6 例為登革熱案件。

本案例原懷疑 A 型流感病毒感染，經疾管署檢驗為陰性。死因鑑定過程中，除了心肌細胞破壞斷裂 (Myolysis) (圖 4-7) 的情形較為嚴重，組織病理變化並無太明顯致死的發現，且於各組織也無發現嚴重的發炎反應及特殊的病理變化，因死者生前有發高燒、頭痛、全身痠痛及無力的症狀，仍高度懷疑傳染病的可能性。經免疫組織化學染色檢驗，意外發現登革病毒抗原呈陽性，且於多個器官皆偵測到登革病毒抗原的存在 (圖 4-8)，再經由疾管署檢驗後，確認為第一型登革病毒感染。本案例與先前 Taiwan Med-X 案例運作方式不同，為先以分子病理診斷技術偵測到登革病毒抗原，再通報疾管署檢驗確認。微生物檢驗若無明確懷疑之感染病原，則有如大海撈針，診斷過程耗費耗時，本所發展分子病理診斷技術，大幅提升法醫病理微生物鑑驗能力，亦可主動進行病原偵測，有利傳染病偵測及加強死因鑑定之精準度。

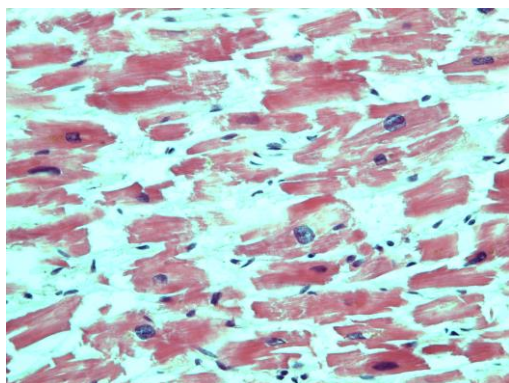


圖 4-7 登革熱陽性個案，心肌細胞破壞斷裂  
(蘇木紫-伊紅染色)

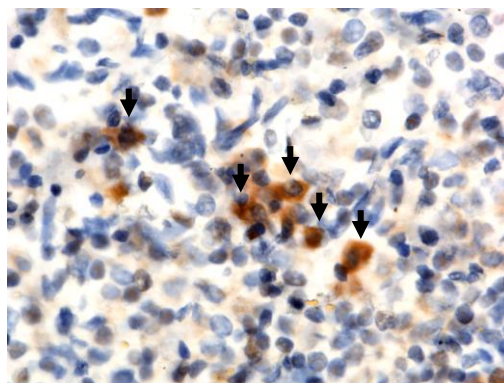


圖 4-8 登革熱陽性個案，脾臟組織登革病毒陽性 (免疫組織化學染色，DAB)

### (五) 鉤端螺旋體病案件

22 歲男性，為憲兵義務役，因身體不適，多次就醫，後送至急診，檢驗發現是鉤端螺旋體感染。解剖採集檢體經疾管署檢驗血清檢體顯微凝集試驗 (Microscopic Agglutination Test, MAT) 陽性，左肺聚合酶連鎖反應鉤端螺旋體陽性。將解剖所採集肋膜液、肺擠出液及尿液之沉澱物做成細胞蠟塊，進行 warthin-starry 特殊染色及

<sup>28</sup> WHO. (2012), Global strategy for dengue prevention and control. Geneva: World Health Organization.

免疫螢光染色分析，發現在肋膜液沉澱物中觀察到鈎端螺旋體菌體存在（圖 4-9 及圖 4-10）。

鈎端螺旋體病致病原為致病性鈎端螺旋菌屬於 *Leptospira interrogans* 菌種，為細桿狀螺旋型，一端或兩端呈現鈎狀的螺旋體，為常見人畜共通傳染病，主要是因為食入或接觸到受感染動物之尿液或組織汙染的水、土壤或食物而遭受感染。感染造成症狀不一，輕微可能無症狀或類似感冒，出現包括發燒、頭痛、腸胃道不適、畏寒、紅眼、肌肉酸痛等症狀，有的還會以腦膜炎症狀表現，嚴重會出現腎衰竭、黃疸與出血現象，甚至死亡<sup>29</sup>。

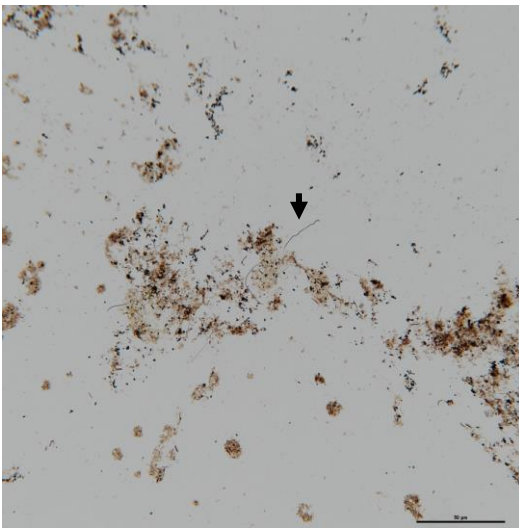


圖 4-9 鈎端螺旋體陽性個案，肋膜液沉澱物細胞蠟塊鈎端螺旋體陽性（warthin-starry 染色）

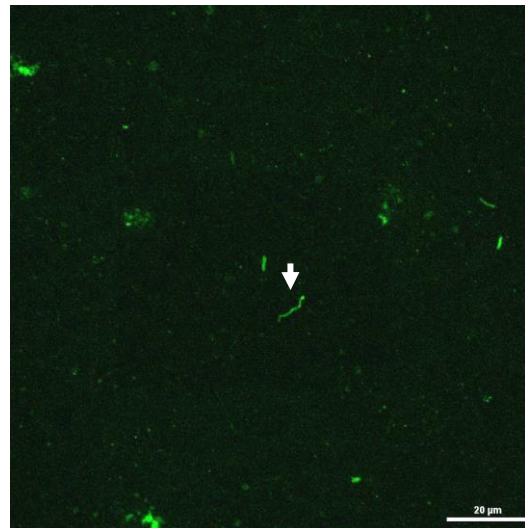


圖 4-10 鈎端螺旋體陽性個案，肋膜液沉澱物細胞蠟塊鈎端螺旋體陽性（免疫螢光染色，FITC）

#### （六）傳染病陽性對照組細胞蠟塊

傳染病分子病理檢驗上的困難之一為陽性對照片的取得，因此我們與疾管署合作，取得疫苗相關病原之生物材料，利用細胞蠟塊的技術<sup>30</sup>，將病毒感染細胞的檢體以及細菌培養檢體製作成細胞蠟塊，之後可進行多次切片，達到陽性對照片的製備。製作完成的陽性對照片，經由免疫染色法進行偵測病原體的確認，而可提供日後疑似傳染病鑑定案件或學術研究上對照使用。我們已製作完成多種病原體之細胞

<sup>29</sup> 衛生福利部疾病管制署，傳染病介紹，第四類法定傳染病，鈎端螺旋體病  
<http://www.cdc.gov.tw/professional/Leptospirosis>

<sup>30</sup> Zanoni DS, Grandi F, Rocha NS. (2012). Use of the agarose cell block technique in veterinary diagnostic cytopathology: an "old and forgotten" method. *Vet Clin Pathol.*, 41:307-8.



蠟塊，進一步利用免疫組織化學染色方式進行偵測。德國麻疹病毒（圖 4-11）、日本腦炎病毒（圖 4-12）、麻疹病毒（圖 4-13）、小兒麻痺病毒（圖 4-14）、腮腺炎病毒（圖 4-15）及水痘帶狀疱疹病毒（圖 4-16）免疫組織化學染色結果顯示可於細胞質中偵測到病毒蛋白表現，與病毒複製過程之機轉相符合。此外，這些陽性對照組細胞蠟塊亦可利用免疫螢光染色方式呈現，麻疹病毒陽性細胞蠟塊以麻疹病毒抗體偵測（圖 4-17）與未加入麻疹病毒抗體之陰性對照組（圖 4-18）比較，可於細胞質中偵測到大量病毒蛋白之陽性螢光訊號。本所亦將這些傳染病陽性對照組細胞蠟塊以及經分子病理檢驗確認後之傳染病陽性個案，建構成國家級傳染病福馬林固定組織陽性病理解剖組織蠟塊資料庫，成為國家傳染病病理重要資產。

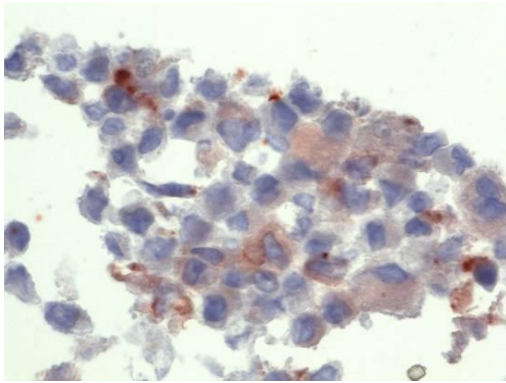


圖 4-11 德國麻疹病毒細胞蠟塊染色結果（免疫組織化學染色，AEC）

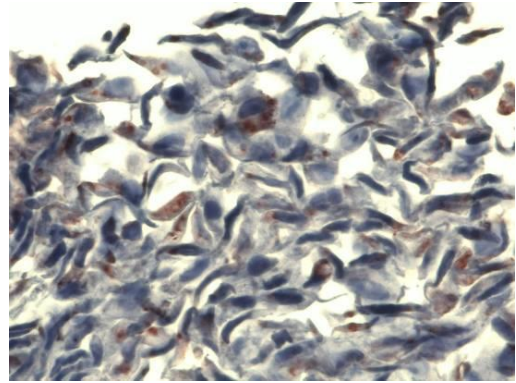


圖 4-12 日本腦炎病毒細胞蠟塊染色結果（免疫組織化學染色，DAB）

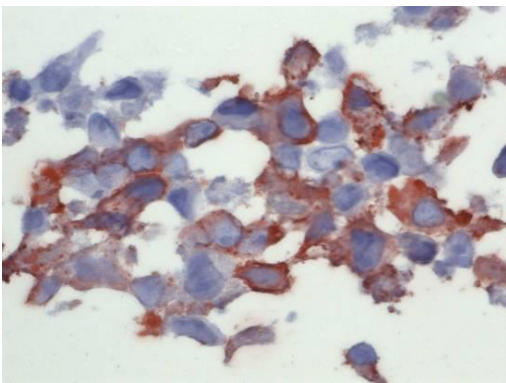


圖 4-13 麻疹病毒細胞蠟塊染色結果（免疫組織化學染色，AEC）

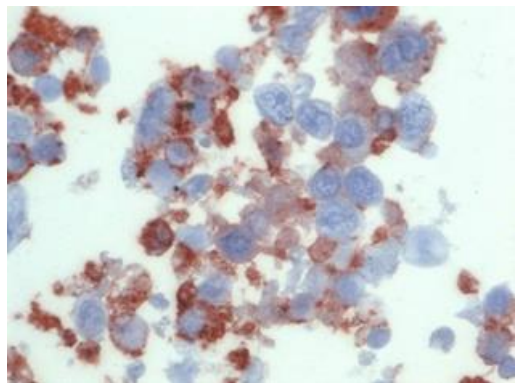


圖 4-14 小兒麻痺病毒細胞蠟塊染色結果（免疫組織化學染色，AEC）

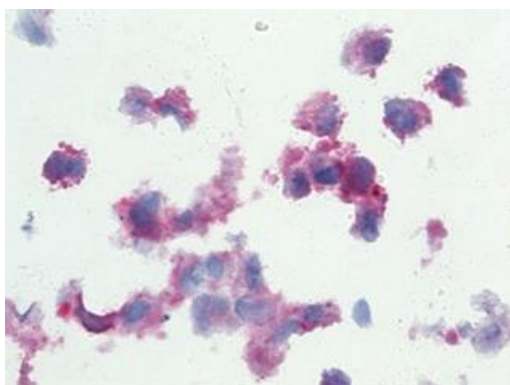


圖 4-15 腮腺炎病毒細胞蠟塊染色結果(免疫組織化學染色, Fast red)

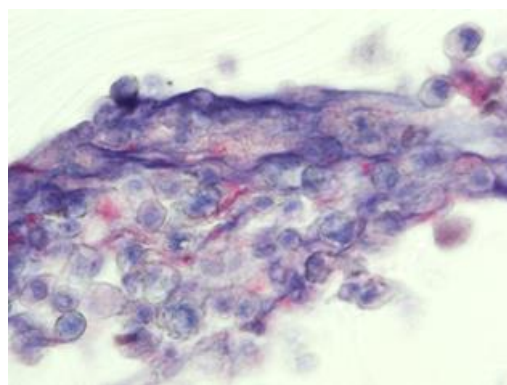


圖 4-16 水痘帶狀疱疹病毒細胞蠟塊染色結果(免疫組織化學染色, Fast red)

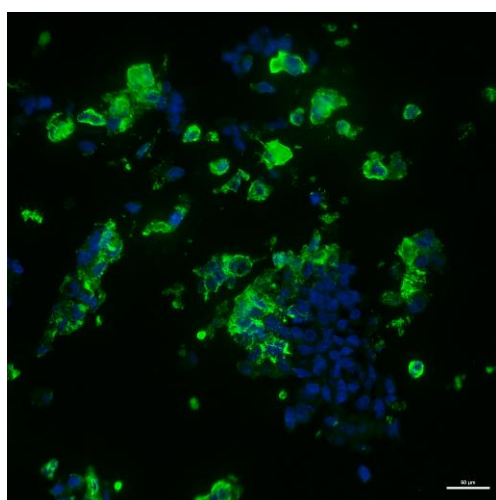


圖 4-17 麻疹病毒細胞蠟塊麻疹病毒抗體染色結果(免疫螢光染色, FITC, 共軛焦顯微鏡)

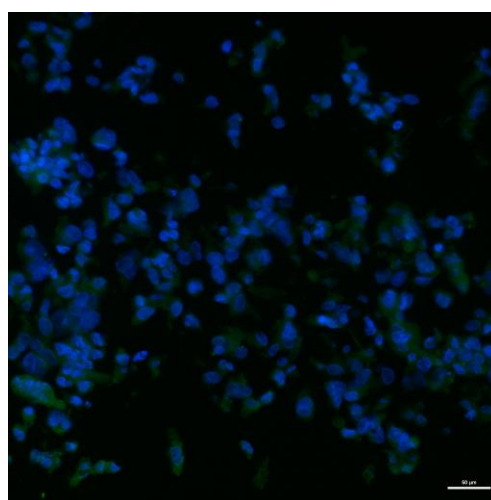


圖 4-18 麻疹病毒細胞蠟塊未加入麻疹病毒抗體染色結果(免疫螢光染色, FITC, 共軛焦顯微鏡)

## 五、促心律不整性右心室心肌病變案件

促心律不整性右心室心肌病變(Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy, ARVC) 為心肌病變疾病的一種，可能由於右心室發育相關基因或蛋白質的突變，導致脂肪及纖維細胞逐漸取代正常心肌細胞，而引起心律不整，嚴重會造成猝死。司法案件中經常發生不明原因猝死，經統計 90 年至 101 年本所法醫解剖及死因鑑定案件，死亡原因與心臟疾病相關佔 14%，101 年至 104 年共計 70 例為 ARVC 致死的案件。隨著臨床診斷技術的進步，ARVC 被診斷率逐漸提升，並且發現 ARVC 可能為家族遺傳疾病，許多突變的基因被發現與 ARVC 有相關性<sup>31</sup>，但臨床表現差異性很大，因此目前並沒有明確的標記。而解剖案件於 ARVC 的診斷依據主要可由顯微鏡下病理變化觀察到：

- (一) 心肌全壁層纖維及脂肪細胞浸潤 (Transmural fibrofatty infiltration, Transmural FFI)。
- (二) 肌肉纖維排列錯亂。
- (三) 組織結構破壞。
- (四) 細胞核變大且濃染。
- (五) 局部性淋巴細胞浸潤。
- (六) 肉眼及組織病理發現符合心臟衰竭的特徵。

其中觀察脂肪細胞及肌肉纖維排列可經由 Masson's Trichrome 染色後清楚觀察 (圖 6-1)，而組織結構則可藉由 Reticulum 染色清楚呈現 (圖 6-2)，此兩項染色技術可協助提供觀察形態學上之病理變化。由於 ARVC 已被發現與某些基因突變有關，如胞橋小體 (Desmosome) 相關連結蛋白，因此可藉由運用免疫組織化學染色或免疫螢光染色之技術研究造成 ARVC 之突變蛋白表現情形，圖 6-3 為正常心臟組織經免疫組織化學染色偵測胞橋小體上的一個連結蛋白 plakoglobin (JUP) 所表現的情形，而圖 6-4 則為 ARVC 案件心臟組織染色情形，很明顯觀察到於 ARVC 案件，plakoglobin 蛋白表現情形大幅下降，與文獻研究結果相符合<sup>32</sup>。因此藉由分子病理技術的應用，希冀可找出國人可能導致 ARVC 基因突變之標記，用以提供臨床作為診斷依據之參考。

---

<sup>31</sup> Asimaki, A., Tandri, H., Huang, H., Halushka, M. K., Gautam, S., Basso, C., Thiene, G., Tsatsopoulou, A., Protonotarios, N., McKenna, W. J., Calkins, H., and Saffitz, J. E. (2009). A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *N Engl J Med.*, 360(11), 1075-84.

<sup>32</sup> 同 31。



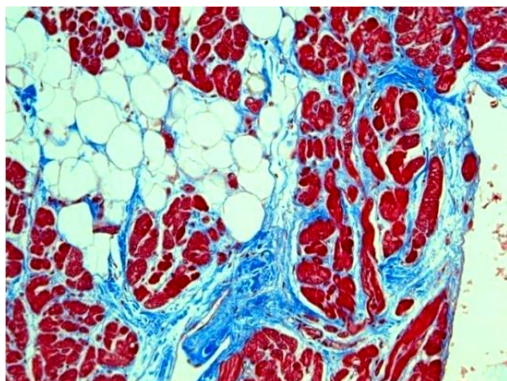


圖 6-1 ARVC，右心室心肌細胞被脂肪細胞及纖維細胞取代 (Masson's Trichrome)

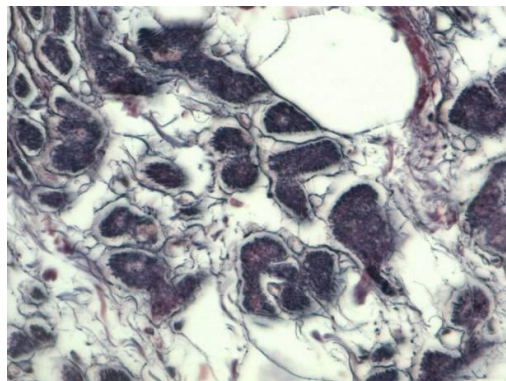


圖 6-2 ARVC，右心室心肌組織結構破壞 (Reticulum stain)

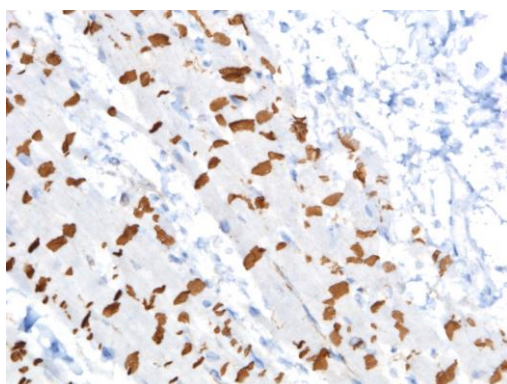


圖 6-3 正常心臟組織 plakoglobin (JUP) 蛋白表現情形 (免疫組織化學染色，DAB)

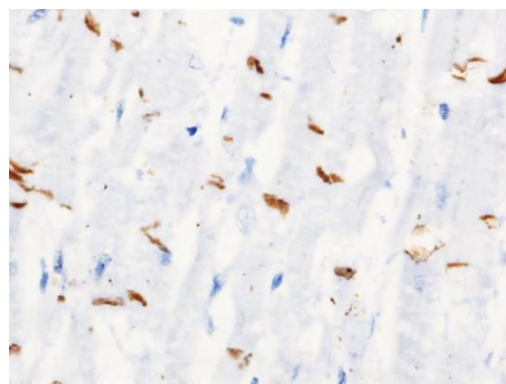


圖 6-4 ARVC 案件心臟組織 plakoglobin (JUP) 蛋白表現下降 (免疫組織化學染色，DAB)

## 六、腫瘤案件

53 歲女性，生前開車追撞好幾次，右眼視力模糊，醫院檢查發現頭部有一塊瘀血，安排準備做電腦斷層掃描檢查，但在檢查前被發現在家中死亡。解剖的宏觀病理（肉眼）發現大腦有明顯出血，但無法分辨是車禍外傷性出血或是腫瘤出血。腦組織病理切片方觀察及確認死者有腦部腫瘤（圖 7-1），但無法得知是哪一類型的腫瘤，本案進行膠質纖維酸性蛋白（Glial fibrillary acidic protein, GFAP）免疫組織化學染色為陽性（圖 7-2），得以證實為分化不良星細胞瘤（Anaplastic astrocytoma）。

此類腫瘤案件，若以常規性病理解剖組織切片只可診斷至腦腫瘤，但無法得知是何

種腦腫瘤。在臨床上，會藉由分子病理技術，利用腫瘤標記進行診斷，以協助治療並且提供治療方向，雖然司法案件，已無須提供治療參考依據，但經由免疫組織化學染色偵測特殊標記，可進一步區分為何種腦腫瘤，有助於正確死因統計，對於疾病的流行病學有很大參考價值。

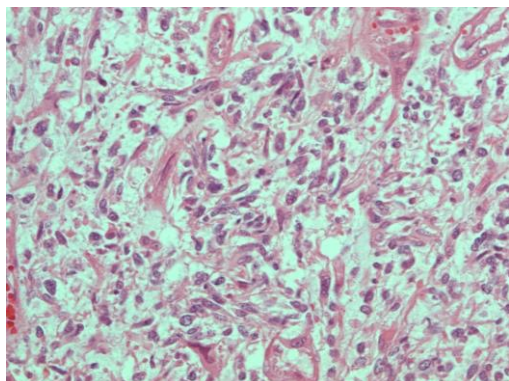


圖 7-1 腦組織切片腫瘤細胞（蘇木紫-伊紅染色）

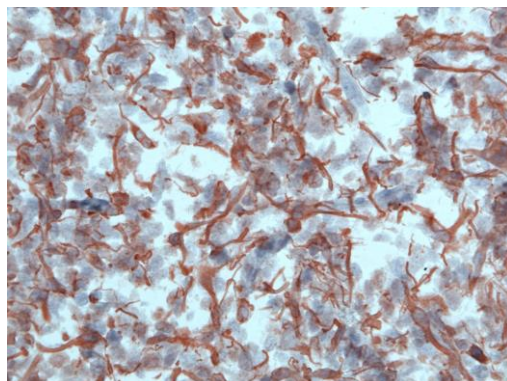


圖 7-2 腦組織切片 GFAP 陽性（免疫組織化學染色，AEC）

## 伍、總結

法醫病理學廣泛運用分子病理學之診斷方法與技術，為法醫解剖鑑定重要發展趨勢之一。相較於傳統組織或細胞病理常規進行之蘇木紫-伊紅染色與特殊染色僅提供病理切片或細胞抹片之形態學上病理變化，分子病理學，包括免疫組織化學染色、原位雜交染色及免疫螢光染色等診斷方法與技術，可呈現分子層級，包括蛋白質、核酸、基因層級之病理變化與證據，供執行法醫解剖之法醫病理專科醫師診斷與判定死亡原因，可大幅提昇病理診斷的敏感度與精確度。持續發展法醫分子病理診斷方法與技術，擴大應用範圍，乃解決司法重大、困難、具爭議性、或亟需鑑別診斷案件之不二法門。

