

조직표본 제작법

(주)다인바이오 연구소

1. 조직검사학(histotechnology)이란?

조직의 형태관찰을 위해 필요한 현미경적 표본제작기술(microtechnic)을 연구하는 학문이다. 조직을 연구하는데 있어서 가장 흔히 쓰는 방법은 광학현미경으로 관찰할 수 있는 조직표본을 만드는 것이다.

2. 경화방법에 따른 이용상의 특징

경화방법	이용상의 특징
Frozen-section (동결박절)	1) 수술 시 신속한 진단 2) 지방(Lipid)의 증명 3) 효소 및 면역형광 염색
Paraffin	1) 일반적인 모든 검사에 가장 많이 사용
Carbo-wax.	1) 탈수, 투명이 불필요 2) 지질, 효소의 검출
Celloidin	1) 큰 뼈조직, 안구, 뇌조직 등 2) 가운이 필요 없음 3) 투명제가 필요 없음
Gelatin	1) 동결절편 시 포매제
Plastic	1) 얇은 절편이 요구 될 때

3. 일반조직의 표본 제작법

검체의 채취 → 육안 조직검사 → Fixation (고정) → Decalcification (탈회) → Tissue capsuling (조직 교감) → washing (수세) → Dehydration (탈수) → Cleaning (투명) → Impregnation or Infiltration (침투) → Embedding (포매) → Trimming (삭정) → Microtome cutting (박절) → Stain (염색) → Mounting (봉입)

- 1) 조직검체 채취
- 2) 육안조직검사 (육안으로 장기나 조직의 이상여부를 확인하고 검경을 위한 표본제작용 검체물 채취)
- 3) 검체를 고정 (검체를 고정액에 담귀서 고정)
- 4) Tissue capsuling (라벨과 조직을 카세트에 싸는 작업)
- 5) 수세 (흐르는 물로 고정액 제거)
- 6) 자동 조직 과정 처리기 (탈수, 투명, 침투)
- 7) 포매 (Paraffin block 제작, 삭정도 포함)

- 8) 박절 (Microtome 으로 4-6micron 박절)
- 9) Slide 건조 (60°C oven 에 1 시간 동안 건조시킨다.)
- 10) 염색 (일반 H&E stain 및 Special stain)
- 11) 봉입 (봉입제로 봉입 하여 조직 표본의 손실을 방지)
- 12) 판독 (현미경으로 검경하여 판독)

4. 고정(Fixation)

1) 고정의 의미

절취된 조직을 물리, 화학적 방법을 이용하여 조직의 변화를 방지하고, 조직의 구조와 성분을 보존하고, 표본제작의 적합한 상태가 되도록 인위적으로 변형시키는 과정을 고정(fixation)이라 한다.

2) 고정의 목적

자가용해의 방지하고 조직내 화학물질의 용해 및 소실 방지, 미생물에 의한 부패 방지, 조직손상의 방지, 염색에 대한 매염작용을 하기 위해 고정을 한다.

3)고정제의 종류

① 포름알데히드 (Formaldehyde: HCHO)

- 37~40% 수용액을 formalin 이라 한다 (장시간고정 시 암갈색의 색소 침착).
- Formalin 고정용액은 formalin 10 ml에 D.W 90 ml의 비율로 희석하여 사용한다.
∴ 원래 4% formalin 이지만 혼동을 피하기 위해서 보통 10% formalin 이라 한다.

② 글루타알데히드 (Glutaraldehyde: (CH₂)₃·CHO·CHO)

- 전자 현미경의 1 차 고정액으로 사용하고, 2 차로 사산화 오스뮴(Osmium tetroxide)에 고정한다.

③ 승홍 (Mercuric chloride: HgCl₂)

- 백색의 결정체로 물에 7%로, 알콜에는 33%정도로 용해된다
- 승홍은 강력한 단백질 침전능력이 있으며, 조직의 침투가 빠르고 조직을 단단히 만든다.
- 단점: 수은 색소가 침착된다 (염색성이 결여됨).
∴ 옥도화(iodized) 과정을 거쳐야 한다.

④ 중크롬산 칼륨 (Pot.dichromate: K₂Cr₂O₇)

- 임계 pH(pH3.4~3.8)보다 약간 산성의 경우는 세포질이 일정하게 고정되고, 사립체가 잘 보존되지만, 핵 단백질은 보존 안 된다.

- ⑤ 크롬산 (Chromic acid: H_2CrO_4)
 - 강력한 산화제로 작용한다 (GMS 염색 시 산화제 역할을 함).
 - alcohol 이나 formalin 과 함께 사용하면 안 된다.
 - 반드시 수세하여야 침전물 형성을 막는다.
- ⑥ 피크린 산 (Picric acid: $C_6H_2(NO_2)_3OH$)
 - 노란색의 결정체로 폭발하는 특성이 있어서 수분상태로 취급한다.
 - 세포질의 염색성을 높이고, 당원을 고정하는데 이용된다.
 - AFB stain 시 대조염색으로 methylene blue 로 사용하지만, picric acid 을 써도 무방하다.
- ⑦ 사산화 오스뮴 (Osmium tetroxide: OsO_4)
 - 매우 고가이며, 0.5 ~ 1% 수용액으로 사용한다.
 - 전자 현미경적 2 차 고정제이다.
- ⑧ 초산 (Acetic acid: CH_3COOH)
 - 염색체는 잘 고정되지만 지방질과 탄수화물 고정은 피한다.
- ⑨ 에틸 알코올 (Ethyl alcohol)
 - 무수 알콜은 투명제인 Xylene 과 잘 섞인다, 적어도 70%이상의 것을 사용한다.
 - 효소와 lipase 검출 시 관계되는 조직화학적 방법과 면역 형광 방법에도 이용한다.
- ⑩ 아세톤 (Aceton: CH_3COCH_3)
 - 휘발성이 강한 무색의 액체로 효소증명 시 또는 면역화학적 검사 시 고정용액으로 사용.
- ⑪ 삼염화 초산 (Trichloroacetic acid: CCl_3COOH)
 - 작용은 빙초산과 비슷하다. 탈회제로도 사용한다.
- ⑫ 메틸 알코올 (Methyl alcohol: CH_3OH)
 - 골수혈액이나 말초혈액 고정 시 많이 사용한다 (혈액학적 고정 시 사용).

4) 고정법의 종류

- ① 화학적 고정 (chemical fixation)에는 침수고정 (immersion fixation), 관류고정 (perfusion fixation), 증기고정 (vapor fixation) 이 있다.
- ② 물리적 고정 (physical fixation)에는 가열고정 (heating fixation), 동결고정 (freezing fixation), 극초단파고정 (microwave fixation)이 있다.

5) 고정에 영향을 미치는 요인

고정에 영향을 미치는 요인으로는 고정제의 침투율, 조직의 크기, 고정온도, 고정시간, 고정액의 pH가 있다.

5. 포매 (Embedding)

1) 포매의 의미

특수한 매질 (embedding medium)을 사용하여 조직에 침투시켜 조직편 전체를 일정한 형태로 경화시키고 동시에 조직내 공간을 메워 조직의 구조적 변형이 발생하지 않도록 하는 과정을 말한다.

2) 포매의 종류

파라핀 포매법 (paraffin embedding), 셀로이딘 포매법 (celloidin embedding), 카보왁스 포매법 (carbowax embedding), 셀로이딘-파라핀 이중포매법 (celloidin-paraffin double embedding), 동결절편용 젤라틴 포매법 (gelatin embedding) 등이 있다.

① 탈수 (dehydration)

수용성 고정액에 고정된 조직은 보통 수세(washing)하기 때문에 조직 내 항상 물이 존재하게 되며 따라서 파라핀 침투 전에 탈수가 필요하다. 탈수는 물과 친화성이 있는 용액을 사용하여 조직내의 물을 제거한다.

② 투명 (clearing)

탈수제를 제거하는 과정으로 에탄올이 투명제 (clearing agents)와 치환되는 과정을 말한다. 탈수제와 침투제가 서로 혼합될 수 없는 경우에 거치는 중간 단계로서 탈수제 와 침투제에 모두 혼합될 수 있는 용액을 사용한다.

③ 파라핀 침투 (paraffin infiltration)

융점(melting point)에 따라 연질파라핀(soft paraffin)과 경질파라핀(hard paraffin)으로 나눈다.



Fig 1. Tissue processors : 자동 파라핀 포매장치



Fig 2. Embedding center: 파라핀 블록 제작 기기

6. 박절(Section)

1) 박절의 의미

현미경 관찰을 위해 μm 단위의 얇은 조직절편을 얻는 과정.

2) 박절기의 종류

활주식 박절기 (sliding microtome), 회전식 박절기 (rotary microtome), 동결 박절기 (freezing microtome), 초미세 박절기 (ultramicrotome) 등이 있다.



Fig 3. 회전식 박절기 (rotary microtome)

7. 염색(Staining)

1) 염색의 목적

일부 조직을 제외한 대부분의 조직은 색이 없으므로 여러 조직의 구성성분을 뚜렷하게 하고, 이들을 쉽게 구분할 수 있도록 한다.

2) 염색방법의 분류

생체염색 (vital staining), 선택적 용해에 의한 염색, 화학적 정색반응에 의한 염색, 금속침투법 (metallic impregnation), 염료 (dye)에 의한 염색 등이 있다.

8. References

- 서해대학교, 임상병리과 강의자료실, 조직병리조직
- 제주대학교 해양과환경연구소, 해양동물번식학 실험실, 2012년조직학6주차조직실험
- Clinical-immunology, 조직병리검사 표본제작과정