

광학현미경적 관찰을 위한 경조직 표본 제작 방법

경북대학교 치과대학 구강병리학교실

교수 신 흥 인

치아와 골조직 그리고 금속을 비롯한 다양한 유·무기물의 이식체를 함유한 생체조직을 진단 및 연구 목적으로 조직학적으로 관찰하는 경우에는 단단한 구조물을 통상적인 광학현미경 슬라이드 제작용 박절기로 자를 수 없기 때문에 탈회 표본 또는 비탈회표본을 제작하게되며, 이 경우 내부구조의 변화를 최소화하고 인공산물(artifact)이 발생하지 않도록 세심한 배려와 노력이 요구된다. 본 특집에서는 병리조직학적 관찰을 위한 의뢰된 경조직을 함유한 생체조직 샘플이 어떠한 과정을 거쳐 최종적으로 광학현미경하에서 관찰할 수 있는 슬라이드로 제작되는지를 간단하게 소개하고자 한다.

1. 경조직이 함유된 조직의 전 처리 과정

경조직을 함유한 생검 조직이 병리 검사실에 의뢰되면 다음의 사항을 먼저 행한 다음, 탈회 표본 또는 비탈회 연마표본을 아래에 기술한 차례에 의해 제작하게 된다(표 1).

- 먼저 크기를 측정하고, 외형의 기술과 더불어 기록 보관을 위해 카메라 사진을 촬영해 둔다.

- 고정이 이루어지지 않았다면, 사진촬영 후, 신속히 10% 중성 포르말린용액으로 고정을 하게 된다. 비탈회 경조직 연마표본을 제작할 경우에는 70% 알콜로 고정하기도 한다.
- 일반적인 x-선 장치 또는 특수 목적으로 제작된 soft x-ray 장치를 이용하여 방사선 사진을 촬영하여 방사선적 소견을 관찰한다.
- 표본이 큰 경우에는 관찰할 부위가 포함되도록 하여 정돈용(trim 용) 절단기(사진 1)를 이용하여 적절한 크기로 절단한다. 이 경우 조직의 손상을 최소화 하기위해 마찰열이 발생하지 않도록 냉각수를 충분히 뿌려주면서 절단해야 한다.
- 절단된 표본을 경우에 따라 다시 한번 방사선 촬영을 하기도 한다.
- 절단된 표본의 수가 충분한 경우는 통상적인 탈회용 조직과 비탈회 연마표본용 조직으로 구분하여 처리하고 나머지는 추후 관찰을 위해 충분한 고정 후, PBS 용액에 넣어 냉장 보관한다.
- 투과전자현미경적 관찰을 염두에 둔 경우는 고정하기 전에 관찰부위를 두께 2mm 이내로 얇게 세절하여 2.5% glutaraldehyde 용액으로 고



사진 1. 경조직 trim 용 줄톱 절단기



사진 2. 경조직용 박절기

정한 다음, 10% EDTA 용액으로 탈회하거나 비탈회 상태로 투과전자현미경 관찰용 조직 처

리를 시행한다.

표 1. Flow chart for hard tissue sample observation

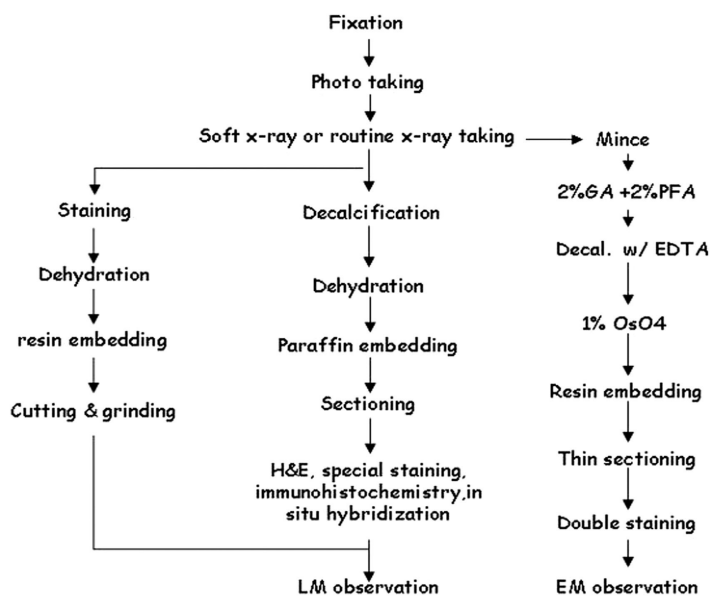




사진 3. 비탈회 경조직 절단기(Struers Accutom-50)



사진 4. 비탈회 경조직 연마기(Struers RotoPol-35)

II. 광학현미경적 관찰용 탈회슬라이드 제작 방법

1) 고 정

1. 10% 중성 포르말린 용액을 검사 조직 부피의 약 20배가 되도록 충분히 넣어 작은 조직은 1-2일 간, 큰 조직은 3-5일 간 고정한다. 일반적으로 실험용 설치류의 골조직은 2일 정도, 포유류의 골조직은 3일 정도 고정한다.
2. 보다 신속시 고정을 하고자 할 경우에는 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 넣은 상태로 전자렌지에 넣어 온도가 60°C를 넘지 않도록 확인하면서, 20초 단위로 반복 처리하여, 통상적인 고정시간을 반으로 단축하기도 한다.

2) 탈 회

1. 샘플의 크기, 탈회 시간, 면역화학적 염색 및 조직화학적 염색 시행 여부 등을 고려하여 탈회 용액을 선택하여 샘플을 침전시켜 충분히 탈회한다.

- 크기가 작은 동물실험 샘플의 경우 통상적으로 10~20% DETA용액으로 탈회를 하며, 대개 10일 전후로 탈회가 이루어진다. 이 경우 면역조직화학적 염색 및 조직화학적 효소염색 등이 가능하다.
- 샘플이 큰 경우는 절단기로 미리 적당한 두께(5mm 전후)로 절단하여 탈회를 시행하는 것이 좋다.
- 빠른 탈회를 요구하는 경우는 5~10% 질산용액으로 행하게 되나, 이 경우 염색성의 저하가 초래될 수 있으며, 면역화학적 염색 및 조직화학적 염색을 계획할 경우는 피하는 것이 좋다.
- 10% acetic acid용액으로 탈회할 경우 염색성 저하를 감소하면서 탈회시간을 줄일 수 있어 비교적 큰 샘플의 탈회에 사용될 수 있으며, 면역조직화학적 염색이 가능하다

2. 탈회 용액은 2일 마다 새로운 용액으로 교환해 준다.
 - 교반기를 활용하면 탈회 시간을 단축할 수 있다.
 - 탈회용액을 50-60°C로 가온하면 탈회 시간은 더욱 단축할 수 있다.

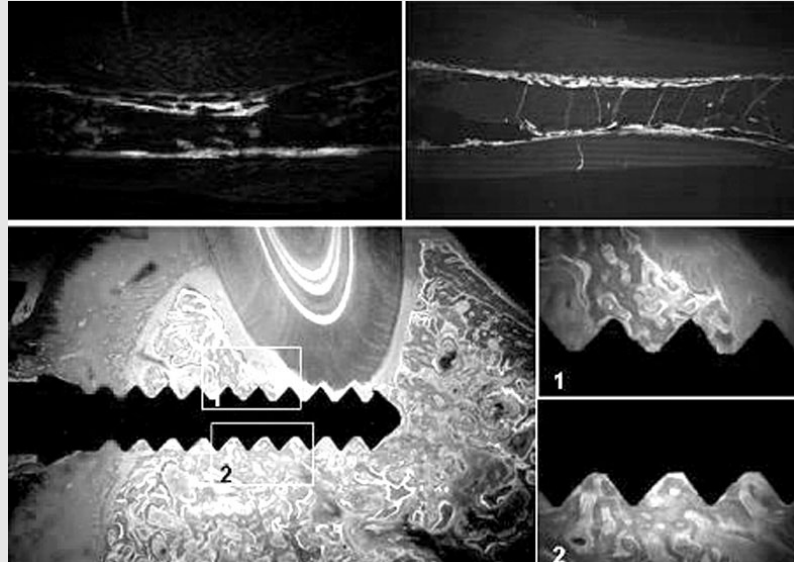


사진 5. calcein 및 tetracycline 등 형광물질을 투여한 후 비탈회 슬라이드를 형광현미경으로 관찰한 소견으로 green 및 orange 색상의 형광선이 잘 관찰된다.

3. 탈회가 충분히 되었는지는 핀으로 샘플을 찢어 보거나, 샘플의 일부를 면도날로 절단해 보거나, 방사선 사진을 촬영하여 판단한다.

- 탈회가 완전히 이루어진 경우는 핀이 저항감 없이 관통되며, 또한 쉽게 면도날로 절단된다. 그리고 방사선 사진에서 불투과상이 관찰되지 않는다.

3) 탈수 및 투명화

1. 70%, 80%, 90%, 100% 순으로 알코올의 순도를 높이면서 충분히 탈수를 시행한다.

- 시편이 작은 경우는 자동 조직처리기를 이용하여 통상적으로 각 용액에서 1시간씩 처리 한다. 시편이 큰 경우는 독립적인 용기를 이용하여 각 용액에서 3시간 간격으로 충분히 탈수 해 준다.
- 큰 조직인 경우라도 전체적인 구조를 하나의 샘플로 관찰하지 않아도 될 경우에는 탈회 후,

적절한 크기로 여러 조각으로 절단하여 자동조직처리기로 처리한다.

2. 투명화 단계는 chloroform 이나 xylene용액으로 행한다.

- 자동 조직처리기를 이용할 경우, 각 1시간 씩 3번 행하게 된다.
- 수동으로 할 경우는 각 용액에서 3시간 씩 충분히 처리한다.
- 용액이 휘발성이므로 취급에 주의해야 한다.

4) 포 매

1. 파라핀 포매를 하기 위해서는 먼저 58°C 전후 온도의 용액상 파라핀에서 3시간 정도 침투과정을 시행한다.

- 자동 조직처리기를 이용할 경우, 파라핀 용기에서 처리되므로 특별히 신경 쓸 필요가 없으

나, 수동으로 처리할 경우는 xylene과 파라핀은 3:7로 혼합한 파라핀 용액에 1시간 전처리하고, 순수 파라핀으로 1시간씩 2번 교환하여 침투과정을 시행한다.

2. 침투가 이루어지면 파라핀 포매 장치를 이용하여 파라핀 블록 형성을 mold에 파라핀을 주입하여 포매 블록을 형성한다.

- 먼저 소량의 파라핀을 mold에 주입하고, 핀셋을 이용하여 샘플의 절단면이 하방을 향하도록 위치시킨다.
- 온도를 낮춘 냉각판에 잠시 위치시켜 순간적으로 파라핀을 굳혀 조직이 움직이지 않게 한 다음, mold에 용액상 파라핀을 가득 채운다. 그리고 냉각판으로 옮겨 파라핀을 굳힌 다음, 파라핀 포매 블록을 mold로부터 분리한다.
- 조직이 큰 경우는 특별히 제작한 동판과 동으로 만든 사각형의 막대 기둥을 이용하여 조직의 크기에 맞게 적당한 크기로 파라핀을 넣을 공간을 만들어 파라핀으로 포매 한다.

5) 박 절

1. 통상적인 박절기를 이용하여 5-7um 두께의 박절편을 형성한다.

- 박절시 부분적으로 충분히 탈회가 되지 않은 부분이 있어 절편형성이 잘 이루어지지 않을 경우에는 파라핀 블록을 탈회용액을 적신 거즈로 접촉시켜 절단면 조직을 탈회시키고, 증류수로 파라핀블록을 충분히 씻은 다음, 박절하게 되면 필요한 박절편을 얻을 수 있다.

2. 박절편이 형성되면 37°C 전후로 데워진 water bath에 박절편을 띄워 절편을 잘 편다. 그리고 각각의 절편으로 분리하여, 유리 슬라이드로

떠서 적당한 위치에 위치시킨 다음, 슬라이드 건조장치(slide warmer) 위에서 말려 파라핀 포매 슬라이드를 완성하게 된다.

6) 염 색

1. 먼저 전체적인 조직학적 관찰을 위해 H&E 염색을 행하며, 필요에 따라 조골세포의 활성 확인을 위해 ALP 염색, 파골세포의 활성 확인을 위해 TRAP 염색, 그리고 조성물질의 특성을 파악하기 위해 type I collagen을 비롯 osteopontin, osteocalcin 골조직 표지자 그리고 amelogenin 등의 치아와 연관된 표지자에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한다. 또한 유전자 발현정도를 파악하기 위해 in situ hybridization을 행할 수 있다.

III. 광학현미경적 관찰용 비탈회 슬라이드 제작 방법

- 무기염의 존재와 분포, 그리고 석회화 정도를 파악하거나, 형광 표지자를 이용하여 골의 대사양상을 관찰할 경우와 임플란트와 골이식체를 함유한 골조직에서 이들의 상관성을 관찰해야 할 경우, 비탈회 슬라이드 표본제작이 필요하게 된다.
- 광학현미경적 관찰용 비탈회 슬라이드는 경조직용 박절기로 절단하여 5-7um 두께의 박편 슬라이드로 형성하거나, 절편기로 절편을 만들고 연마기로 연마하여 40um 전후 두께의 연마 표본을 제작하게 된다.
- 일반적으로 박절편 제작을 위해서는 MMA (methylmethacrylate) resin과 GMA (glycolmethacrylate) resin이 사용되며, 연마용

표본 제작에는 MMA를 비롯 Polyester-resin (Rigolac)과 epoxy-resin이 사용된다.

A. 비탈회 박절편 슬라이드 제작방법

- MMA resin인 Technovit® 9100 (Kulzer, Germany) 사용법을 중심으로 기술한다.
- 모든 과정에 사용되는 시약은 4°C에 보관된 상태로 저온에서 이루어진다.

1) 고정 : 일반적으로 10% 중성 포르말린 또는, 냉장고에 보관한 70% 에틸알콜로 고정을 한다.

2) 탈수 및 침투

1. 4°C의 70%, 80%, 90%, 95% 에타놀에서 각1 시간씩 행하고, 순수 에타놀에서 1시간 씩 3번 처리하여 탈수한다.
 2. 탈수가 끝나면 xylene용액으로 1시간씩 2번 처리한다.
 3. 냉장고에서 안정화된 basic 용액에 1시간 전처리하고, Harder-1을 첨가한 basic 용액에 1시간 처리한다.
 4. Basic 용액에 Hardner-1과 PMMA 분말을 첨가한 용액에 넣어 3일 정도 침투시킨다.
- 침투용 용액과 Solution A와 B는 사용전에 미리 만들어 냉장 보관한다.

표2. Technovit® 9100 포매 수지 조성표

Component	Basic Solution	PMMA Powder	Hardener 1	Hardener 2	Regulator	Storage
Pre Infiltration	200ml		1g			R.T
Infiltration	250ml	20g	1g			4°C
Stock solution A	500ml	80g	3g			4°C
Stock solution B	50ml			4ml	2ml	4°C

- 처리 시간은 조직의 크기나 뼈조직의 상태에 따라 차이가 있으므로 처리 시간을 조직의 부피에 비례하여 처리시간을 연장해 준다.

3) 포매 및 경화

1. 침투과정이 끝나면 샘플을 Tefron mold나 유리병에 위치시킨다.
2. 공기와 접촉하게 되면 중화가 이루어지지 않으므로 보관된 Stock A 용액과 Stock B 용액을 9:1 비율로 즉시 혼합하여 샘플이 들어 있는 용기에 가득 채우고 뚜껑으로 밀폐시킨다.
3. -8~-20°C 저온에서 2-3일간 중화시키고, 냉장고로 옮겨 1-2시간 보관한 다음, 실온으로 옮겨 중화된 포매 샘플을 분리 제거한다.

4) 박 절

1. 경조직 박절용 박절기(Leica RM2165, Leica, Germany, 그림 2)에 텅스텐 칼날을 장착하여 50% 에타놀 용액으로 수지를 살짝 녹여 절편을 형성한다.
2. 젤라틴 또는 실란(silane)으로 코팅한 슬라이드에 올려 70% 에타놀로 주름을 편 다음, 실온에서 말려 박절편 슬라이드를 완성한다.

5) 염 색

- 2-methoxyethylacetate 용액으로 10 ~ 15 분간 처리하여 포매용 수지를 제거한 다음, 통상적인 방법으로 필요한 염색을 시행한다.
- 비탈회 박절 슬라이드는 일반적 관찰을 위해 기본적으로 toluidine blue 염색을 시행하며, 골조직의 석회화 양상 관찰을 위해 von Kossa 염색을, 그리고 골양조직의 확인과 골조직의 조직형태학적 분석을 위해 Villanueva 염색 또는 Goldner trichrome 염색을 시행한다. 또한 ALP 염색과 TRAP 염색이 가능하다.

- calcein 과 tetracycline 같이 형광을 나타내는 물질을 2주 간격으로 15mg/kg 용량으로 투여하여 골대사 정도를 파악할 경우, toluidine blue 염색하여 형광현미경하에서 관찰하게 되면 골이 형성된 시기와 생성률 등을 분석할 수 있다(사진 5).

B. 비탈회 연마슬라이드 제작방법

- 임플란트와 세라믹과 같이 단단한 구조물이 골 조직에 함유되어 있는 경우와 치아 표본과 같이 강도가 아주 높은 경우는 연마슬라이드를 제작하여 관찰하게 된다.
- 연마 표본 제작을 위해 MMA resin (Technovit® 7200)과 Epoxy resin이 일반적으로 사용되나, Epoxy resin이 보다 신속히 연마용 블록을 만들 수 있어 여기에서는 Epoxy resin을 이용한 연마표본 제작 방법을 기술한다.

- 1) 고정 : 10% 중성 포르말린 용액으로 3-5일간 충분히 고정한다.
- 2) 염색 : Villanueva 염색 용액에 넣어 3-5일간 염색한다.
- 3) 탈수 : 70%, 80%, 90%, 95% 에타놀에서 6시간씩 처리하고, 순수 에타놀에서 12시간씩 2번 탈수한다.
- 4) 침투
 1. propylene oxide 용액으로 12시간씩 2번 치환한다.

2. propylene oxide와 resin을 1:1로 혼합하여 6시간 침투시킨다.
3. propylene oxide와 resin을 1:2로 혼합한 용액에서 12~24시간 침투시킨다.

5) 포매 및 경화

1. 순수 resin 용액으로 교환하여 6시간 처리한다.
2. 새로운 순수 resin 용액으로 교환한 다음, 37°C 배양기에서 12시간 동안 중합시킨다.
3. 배양기의 온도를 60°C로 올려 3일 이상 충분히 경화시킨다.

6) 세 절

- EXACT사의 EXACT BS 3000 또는 Struers사의 Accutom-50 절단기(사진 3)를 이용하여 500um 두께의 절편을 형성한다.

7) 연 마

- 절편을 Technovit 7210 용액 또는 5초 본드를 이용하여 플라스틱 슬라이드에 부착한 다음, 연마기 (EXAKT MG 4000 또는 Struers RotoPol-35, 사진 4)를 이용하여 거친 사포에서 고운 사포로 교환하여 표면이 매끄러운 40um 전후의 두께로 연마하여 연마절편을 형성한다.

8) 봉 입

- 연마가 마무리 되면 Technovit 7210를 이용하여 봉입하고 압착한 상태로 UV로 중합하여 연마표본 슬라이드를 완성한다.

참 고 문 헌

1. Tenorio D, Germain JP, Hughes FJ.: Histochemical studies of acid and alkaline phosphatases in rat tooth germs with undecalcified resin-embedded specimens. *J Histochem Cytochem* 1992; 40:1229-1233.
2. Britten KM, Howarth PH, Roche WR.: Immunohistochemistry on resin sections: a comparison of resin embedding techniques for small mucosal biopsies. *Biotech Histochem* 1993; 68:271-280.
3. Erben RG.: Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1997; 45(2):307-13.
4. Wolf E, Röser K, Hahn M, Welkerling H, Delling G.: Enzyme and immunohistochemistry on undecalcified bone and bone marrow biopsies after embedding in plastic: a new embedding method for routine application. *Virchows Arch [A]* 1992; 420:17-24.
5. Bullough PG, Bansal M, DiCarlo EF.: The tissue diagnosis of metabolic bone disease. Role of histomorphometry. *Orthop Clin North Am* 1990;21(1):65-79.
6. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR.: Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987;2(6):595-610.
7. 제갈 승주, 조직기술학;이론과 실제, 고려의학, 1988
8. 나가이 노리유키 편저, 골-치아조직의 병리검사법과 연구기술의 실제, 학제기획, 1991 (일본어판)