

의학 연구에서 조직배열 방법을 이용한 면역조직화학법

계명대학교 의과대학 병리학교실

강유나

Immunohistochemistry Using Tissue Arrays in the Medical Research

Yu Na Kang, M.D.

*Department of Pathology,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea*

Abstract : Tissue array is an analytic method of multiple tissues from many patients in one slide. Because of high effectiveness, tissue array has been actively used recently in pathology research. It is possible to collect various paraffin blocks and to make tissue array slides from human normal and tumor tissue, fetal tissue, autopsy, and experimental animal tissue as well as variable cell lines. Tissue array slide for cell lines is made for cultured cell lines after embedding in agarose like tissue paraffin block and it can be used in immunohistochemical stain. Uses of tissue array slide is variable; mostly protein expression of immunohistochemical stain, mRNA expression of in situ hybridization or nuclear DNA expression of fluorescent in situ hybridization. So, it will be very helpful to use many objects (tissue specimens, or antibodies) at one time in the medical research using experimental animals or clinical biopsy tissue. In the future, potential applications of tissue arrays will be more extensive in a number of fields of molecular biomedical research. In this review, I give a brief overview of tissue array technology, research uses including immunohistochemical stain and microscopic scoring process, and discuss potential applications of tissue arrays in the practice of pathology.

Key Words : Immunohistochemical stain, Paraffin block, Tissue array, Tissue array slide

서 론

병리학의 발달사와 함께 조직의 검사방법에 있어
서도 무수히 많은 방법이 개발되었고 또 발전되어왔

다. 특히 최근 들어 대량의 유전자검사가 가능해지면
서 보다 더 정확하고 효율적이면서 혁신적인 조직검
사방법이 절실히 요구되고 있는 것이 사실이다. 시대
적 요구와 의학 연구의 발전과 더불어 최근 각광을

받고 있는 조직배열 방법을 소개하고자 한다.

조직배열의 정의

조직배열이란 여러 환자의 조직이나 다양한 개체로부터 얻은 많은 수의 파라핀 블록으로부터 수십 개 또는 수백, 수천개의 다양한 조직들을 한 장의 슬라이드 위에 가지런히 줄을 지어 한꺼번에 담아냄으로써 기존의 여러 조직을 새로운 파라핀 블록으로 옮겨 제작, 박절하여 새로운 한 장의 슬라이드 위에 재배치하는 검사 방법을 이르는 말이다. Tissue array(TA) 또는 tissue microarray(TMA) 라고도 말한다.

조직배열의 역사

1986년 Battifora라는 병리의사가 면역염색 방법의 정도 관리를 목적으로 여러 조직들을 한 슬라이드 위에 정리하는 방법을 발표하게 되었다[1]. 일명 multitumor(sausage) 조직 블록이라고도 부르는 이 블록은 만들기도 어려울 뿐만 아니라 차례로 정리가 되지 않고 불규칙하게 배열되어 있어서 현미경으로 관독하기에도 많은 노력과 시간이 소모되어 불편한 점이 있었다. 4년 뒤 1990년 Battifora[2]는 기존 방법의 불편한 점을 개선하여 checkerboard라는 새로운 방법을 발표하였다. 조직이 가로와 세로의 줄을 맞추어 배열되어 있는 여러 조직을 포함하는 대조군 블록을 제작하기에 이르렀다. 이 방법은 규칙적으로 조직을 배열하여 관독하기는 쉬웠으나 조직의 크기가 너무 작고 띄엄띄엄 배열되어 있었다. 또 작은 조직에서 염색 정도를 관찰하여야 하여 병리학적 지식이 없는 연구자에게 적용하기는 여전히 어렵고 조직 보관의 의미도 있었던 원형 파라핀 블록을 통째로 파괴하여야 하였기에 병리학자들 사이에서도 호응을 얻지 못하였다. 그러다가 1998년 Kononen 등[3]은 파라핀 블록을 파괴하지 않고도 0.6 mm 직경의 원통모양 조직을 파라핀 블록으로부터 얻을 수 있는 기계를 고안하게 되었다. 그 시대는 의학 연구에 있어

서 연구 증례뿐만 아니라 대상 유전자, 또는 대상 항체가 수십 개 또는 수백 개로 급격히 늘어나서 보다 효율적인 검사 방법이 절실히 요구되고 있었다. 따라서 그 이후부터는 환자 질환의 진단에 이르는 여러 가지 검사, 예후인자를 밝히기 위한 연구 또는 치료 효과나 방법을 검증하는 연구에 이르는 임상적인 연구뿐만 아니라, 기초의학 연구 부분에서의 cDNA array를 통해 밝혀진 여러 biomarkers에 대한 조직에서의 검증 방법으로 이용되기까지 조직배열 방법을 이용한 연구가 활성화되어왔다.

조직배열의 종류

다양한 인간의 정상 조직들뿐만 아니라 배열한 정상 조직배열, 다른 질환 특히 다양한 종양 조직으로 구성된 종양 조직배열, 또는 여러 장기의 태아 조직으로만 구성된 태아 조직배열 그 외에도 기초의학 연구에 있어서 중요한 연구자료인 세포주들을 모아 배열한 세포주 조직배열, 동물실험 연구 중에서 실험군 동물의 다양한 장기로 구성된 동물 조직배열, 동결절편 조직을 이용하여 마찬가지로 동결절편 상태의 블록을 제작하는 동결절편 조직배열, 또는 부검 당시 다양한 조직들을 모아 구성한 부검 조직배열 등이 있다. 그 종류는 연구에서 필요한 상황과 수요에 따라 여러 가지로 구성할 수 있다.

조직배열 블록의 제작

조직배열 블록을 직접 제작하려면 기계를 구입하면 좋다. 완전 자동화된 기계가 있지만 고가이고 대부분 현재 시중에서 판매되는 제품은 수동으로 모든 작업을 하게 되어 있다. 먼저 개발된 기계는 Beecher Instrument(www.beecherinstruments.com)이다 [4]. 이 기계는 두 가지 펀치가 있는데 하나는 조직을 파내고 또 다른 하나는 구멍을 뚫는 기능을 가지고 있다. 제작 방법은 원래의 블록에서 구멍을 파낸 후 새로운 블록에 구멍을 뚫고 조직을 심는 3단계의 작업으로 이루어진다. 이때 작업 중 블록은 움직이지 않아

야 하며 두 개의 펀치가 동일한 위치에서 교환되도록 고안되어 정확한 위치에 조직을 심을 수 있다. 이를 이용하는데 약간의 숙달이 필요하며 작은 크기에 비해 정교하게 제작되어 있다. 2002년도 기본 가격이 약 1,300만원이며 블록 위치 자동이동장치, 블록 회전장치, 다양한 직경의 펀치, 펀치 이동제한 장치 등의 추가로 가격은 훨씬 더 비싸진다.

2002년도에 Beecher Instrument 보다 기능이 향상된 Advanced Tissue Arrayer(www.chemicon.com)라는 제품이 출시되었는데 기계에 현미경이 달려 있어서 병변을 직접 확인하면서 블록을 제작할 수 있고 사용이 간편한 장점이 있다. 그러나 가격이 Beecher Instrument에 비해 3배 이상 비싸서 구입에 상당한 부담이 된다.

완전 자동화기계(ATA-27 automated arrayer; Fig. 1)는 슬라이드를 검경하여 직접 파라핀 블록에 필요한 부분을 표시하고 자르는 과정을 자동화하여 소프트웨어 프로그램을 통해 파라핀 블록으로부터 새 블록에 조직을 옮겨 심을 수 있다. 한꺼번에 26개 파라핀 블록에서, 조직 크기는 0.6 mm에서 3.0 mm 직경까지 가능하며, 한 시간당 120-180 개 조직을 옮길 수 있으나 전체 시스템을 갖추기에 엄청

난 비용이 든다. 그보다 조금 경제적인 반자동화 기계(manual tissue arrayer, Fig. 2)가 개발되어 한 시간당 30-70개 조직을 옮길 수 있다. 최근에는 한 손에 쥐어지는 주사기 모양의 바늘이 달린 가볍고 작은 기구와 블록의 공간을 잡아줄 소모성 블록판 만으로 보다 손쉽고 경제적이며 누구라도 간단히 사용할 수 있는 Quick-RAY™ 방법(Fig. 3)이 인기를 얻고 있다. 일련의 조직배열 블록 제작 과정의 순서는 다음과 같다.

1. 현미경으로 조직 슬라이드를 검경한 다음 원래의 파라핀 블록에서 선택할 부위를 표시한다.
 2. 기구를 이용하여 원래의 파라핀 블록에서 표시된 부위의 조직을 채취한다.
 3. 채취된 조직은 옮길 소모성 블록판에 정렬하여 옮겨 심는다.
 4. 정렬을 마친 소모성 블록판은 포맷틀(embedding mold)에 잘려질 부위가 밑으로 향하도록 넣은 후 40-60℃ 오븐에서 30분간 둔다.
 5. 소모성 블록판이 완전 투명해지면 꺼내 새 파라핀 블록틀에 포맷하고 식으면 박절한다.
- 또한, 조직배열 블록을 제작할 때 조직이 배열된 방향이나 순서가 바뀌거나 각각의 슬라이드가 혼동



Fig. 1. ATA-27 automated arrayer.

되지 않도록 제작하는 것이 중요하다. 슬라이드의 번호가 바뀌거나 조직이 180° 회전하여 슬라이드에 부착되어 있다면 쉽게 알아볼 수 있게 하기 위해 특정한 위치에 검정색의 탄소, 외과병리에서 사용하는 다양한 색의 물감이나 색소의 침착이 강한 악성 흑색종 등의 조직을 사용하여 특정한 위치에 조직 대신 심을 수도 있다.

조직배열 블록의 구입

만일 직접 조직배열 블록 제작이 어렵다면 조직배열 블록의 주문 생산이 가능한 국내외 생명공학회사도 많이 있다. Innogenex (www.innogenex.com), Research Genetics (www.resgen.com), Novagen (www.novagen.com), Zymed (www.zymed.com), Stratagene (www.stratagene.com) 등에서 제품화된 조직배열 슬라이드를 구입할 수 있고, 한국에는 고마바이오테크 (www.komabiotech.com), 진메딕 (www.genemedic.co.kr) 등에서 판매한다. 이들 회사에서 조직배열 블록을 만드는 용역도 기능하여 연구자는 기계를 구입하지 않고도 조직배열 슬라이드를 제작할 수도 있다.



Fig. 2. Manual tissue arrayer.

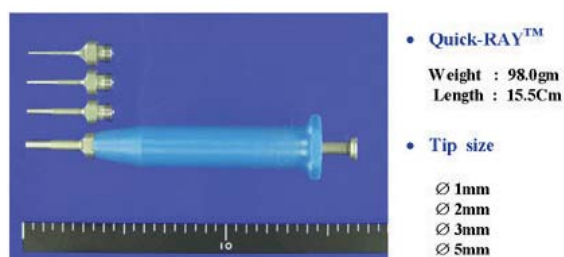


Fig. 3. Quick-RAY™.

조직배열 블록의 박절

조직배열 블록의 박절은 그리 쉽지만은 않다. 서로 다르게 고정 제작된 조직이 섞여 있어서 여러 조각으로 파라핀 블록이 찢어지면서 각각의 조직이 흩어질 가능성이 있기 때문이다. 우선 조직배열 블록을 제작한 다음에 바닥면을 고르게 하기 위해 포매틀에 담아 45–55 °C에서 30분간 방치한다. 이렇게 하면 원래의 파라핀과 구멍을 메운 파라핀 사이의 간격도 메워지고 깎아야 할 바닥면도 편평해져 조직의 손실을 줄일 수 있다.

초기에 조직배열 블록의 박절을 위해 테이프 전이법 (www.instrumedics.com) 을 권장하였다[3]. 파라핀 블록에 특수 양면테이프를 부착한 후 박절하고, 박절 조직이 붙은 테이프를 슬라이드에 부착시킨 후 자외선 조사에 의한 중합 반응과 유기용매를 이용하여 테이프를 제거하는 방법이다. 박절 경험이 없는 실험실에서 권장되기는 하나 박절속도가 저하되고 남아있는 중합된 점착 성분으로 면역 염색이 방해받기도 하고 또 테이프를 부착하면서 미세하게 흔들려 조직의 두께가 일정하지 않을 수도 있는 단점이 있다. 경험이 많은 병리기사라면 테이프 없이도 조직배열 슬라이드의 박절을 큰 어려움 없이 성공적으로 수행할 수 있다.

박절한 슬라이드의 보관

박절하고 난 후 염색하기 이전까지의 슬라이드 나이가 박절한 조직의 항원성 유지 여부에 영향을 줄 수도 있다. 그러나 그 차이는 항원에 따라 다양하여

1년이 지나도 변함이 없는 것에서부터 2주가 지나기 전에 항원성이 떨어지는 종류도 있다. 그에 반해 파라핀 블록 안에 포매된 조직은 수십 년의 세월이 지나도 항원성의 변화가 거의 없는 것으로 알려져 있다 [5]. 따라서 항원성 유지를 위한 방법으로 파라핀 블록에 파라핀 코팅을 하는 방법을 이용하기도 하지만, 가장 좋은 방법은 박절한 즉시 슬라이드로 염색을 시행하는 것이라고 생각한다. 만일 즉시 염색할 수 없다면 슬라이드를 냉장 또는 냉동 보관하는 방법이 좋다고 권하고 있다. 또한 다음 연구의 활용도나 조직의 손실이나 보관상 문제들을 생각해 볼 때 가능한 한 충분한 양의 조직배열 슬라이드를 제작하는 것을 보통 권한다.

조직의 크기

현재까지 최대한 많은 수의 조직을 담을 수 있는 조직배열 슬라이드의 한계는 Beecher Instrument

로 제작한 직경 0.6 mm 크기의 조직 1,000개를 한 슬라이드 위에 담는 것이다. 그러나 이것은 대단한 숙련된 기술이 필요하며 보통은 300개 남짓 되는 개수의 조직을 담을 수 있다. 조직의 크기가 너무 작으면 염색 결과 분석이 어렵고 판독하더라도 부정확한 결과를 얻을 확률이 크다. 또 조직을 채취하여 조직배열 슬라이드를 만드는 데 15-20% 정도의 조직이 탈락하여 판독이 전혀 불가능할 수도 있고, 조직의 크기가 너무 작다보면 조직에서 적절히 염색된 부위를 찾기도 힘들다. 이에 반해 직경 2.0 mm 크기의 조직을 조직배열 슬라이드를 만들면 슬라이드 수는 0.6 mm에 비해 다소 많아지고 조직 손실이 많을 수는 있지만 60개 정도의 조직을 모아 적당한 크기의 조직에서 관찰하게 되면 적절히 염색된 부위를 선정하거나 판독이 보다 용이한 장점이 있다. 또한 100 배 시야에서 한 눈에 관찰할 수도 있고 탈락 조직을 5% 미만으로 줄일 수도 있어서 여러 가지 면에서 효과적이라 권장한다(Fig. 4).

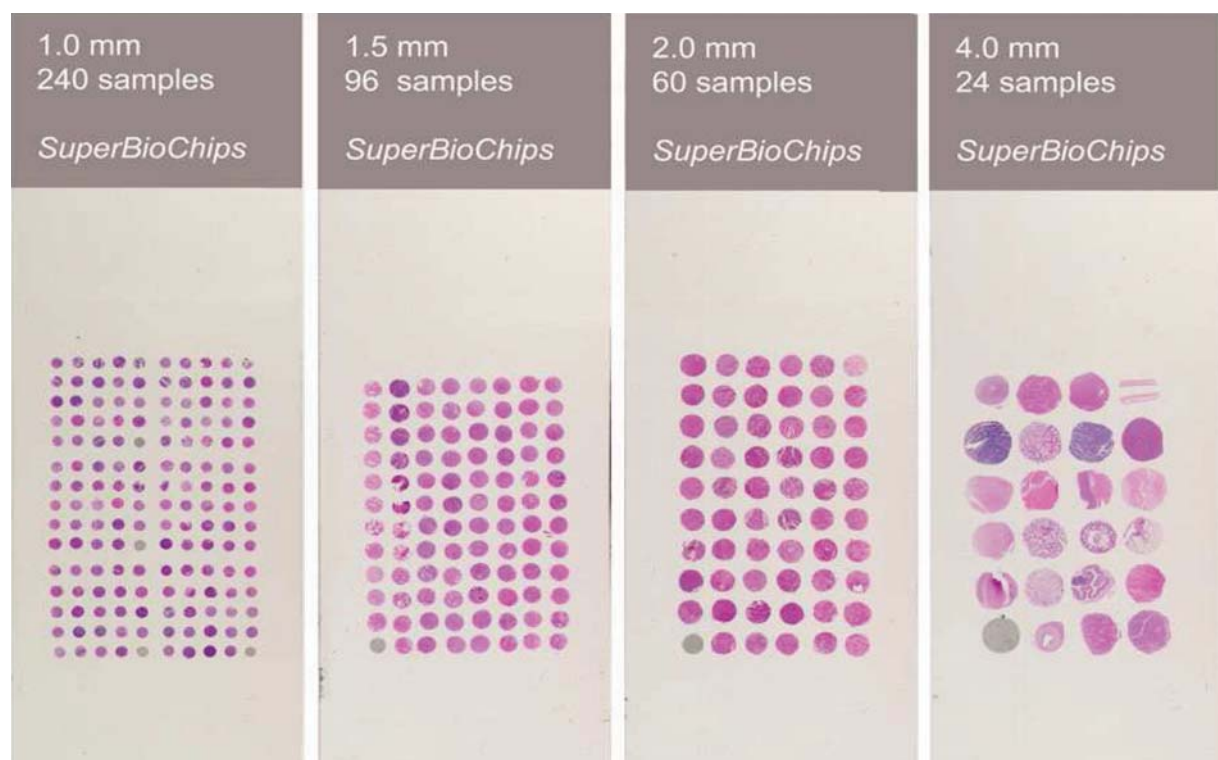


Fig. 4. Tissue array slides of various core size.

면역조직화학 염색

기존의 전체 슬라이드 대상으로 한 면역조직화학 염색에 있어서 조직의 가장자리 부분의 염색정도가 특히 강하거나 약해 변이가 심하고, 적절한 염색 부위를 찾는 데 병리전문의의 판독이 필요한 부분이 있는 등 염색의 비균질성과 관련한 문제가 가장 큰 문제점 중의 하나였다. 그러나 0.6 mm와 같은 극히 작은 조직만 아니라면 조직배열 슬라이드를 통해 실시한 면역조직화학 염색 방법에서 염색의 변이가 심하지 않고 적절한 염색 부위를 찾아 판독하는데 큰 어려움이 없어서 실험한 일반 연구자가 병리학적 전문 지식이 없어도 판독 할 수 있다.

또 한 가지는 조직배열 슬라이드를 통해 얻어진 극히 작은 조직을 대상으로 한 염색을 과연 그 조직의 대표로 인정할 수 있는가 하는 염색의 신뢰도가 문제이다. 그러나 2000년 Camp 등[6]은 38례의 유방암 조직들을 대상으로 조직의 수를 1, 2, 3, 5, 9개로 달리 했을 때 92%, 96%, 98%, 99.5%, 99.97%로 정확도가 더 높아짐을 밝혔고, 2001년 Notico 등[7]은 2,317례의 방광암을 대상으로 조직학적 등급과 증식 정도를 비교 관찰하는 실험에서 조직배열의 방법이 효과적이며 대표성을 가진다고 판단하였다. 2001년 Lee 등[8]은 MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6 발현 정도가 위암종의 예후인자로 작용하는지 여부를 관찰하는 실험에서 4개의 조직을 이용하

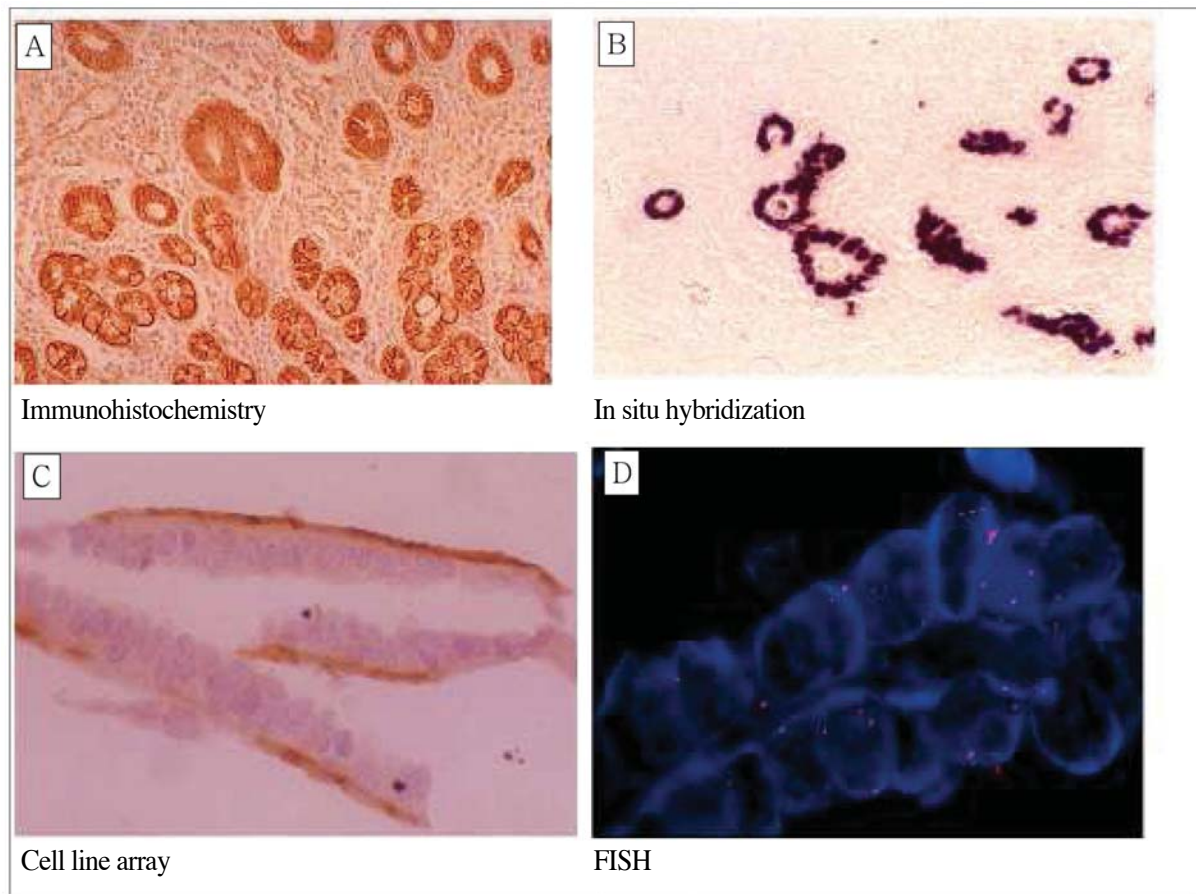


Fig. 5. Immunohistochemical stain for E-cadherin (A) and in situ hybridization for EBV (B) in the gastric adenocarcinoma. Immunohistochemical stain for CEA (C) and fluorescent in situ hybridization for c-erb B2 (D) in the cell line of gastric carcinoma.

여 조직배열 슬라이드를 제작했을 때 MUC1과 MUC2에서 각각 kappa지수가 0.74와 0.89로 의미 있는 결과를 얻었으며 또한 염색 정도를 3단계로 판독하였을 때 보다 2단계로 판독하였을 때 더 통계적 유의성이 있음을 밝혔다. 또 2001년 Torhorst 등 [9] 역시 553례의 유방암 조직을 이용한 조직배열 슬라이드 제작하여 면역염색 검사를 시행하였을 때 조직의 대표성과 염색의 신뢰도가 있음을 인정한 바 있다.

면역염색 결과에 영향을 미치는 인자는 많으나 박절두께, 염색시간, 수세시간, 완충액 조성, 항체 농도, 염색온도 등은 박절기, 완전 자동 또는 반자동 면역염색기를 통해 일정한 염색온도와 항체농도 등의 항상성을 유지할 수 있는 방법을 취하면서 해결할 수 있으리라 생각한다.

조직배열의 장점

조직배열의 방법을 이용하면 우선 수십 개 또는 수백 개의 조직을 한 슬라이드 위에 올릴 수 있기 때문에 검사할 슬라이드의 수를 줄일 수 있다. 따라서 사용되는 시약뿐만 아니라 염색을 하는데 소요되는 시간도 줄일 수 있다. 또한 수십 번 또는 수백 번 단순한 슬라이드 제작의 반복 작업을 통해서만 가능하던 종전의 방법에 비하면 작업량이 많이 감소하여 인건비의 감축 효과를 볼 수 있다. 또 많은 검체를 빠른 시간에 분석할 수 있을 뿐 아니라 동일 조직에서 여러 가지 유전자나 단백질 발현의 상태를 비교 분석도 가능하게 된다. 동일한 조건에서 염색이나 다른 검사를 시행할 수 있다는 점에서 실험적 동질성(experimental uniformity)을 추구하는 데도 도움을 줄 수 있다.

조직배열의 활용

조직배열 슬라이드를 이용하여 기본적인 hematoxylin-eosin 염색 이외에 면역조직화학염색, in situ hybridization, fluorescent in situ

hybridization (FISH), in situ PCR, TUNEL 염색 등이 가능하다(Fig. 5).

면역조직화학염색 방법은 항원-항체 반응의 원리를 이용하여 문제의 항원과 반응하는 항체에 표지자를 붙여 반응하는 부위를 관찰함으로써 조직에서 원하는 부위의 단백질 성분을 파악할 수 있어서 이미 20세기 후반부터 파라핀 블록에서 통상적으로 널리 이용되고 있는 유용한 조직 성분 검사 방법이다. 이로써 특정 유전자의 발현 여부를 최종 산물인 단백질 수준에서 확인할 수 있는데, 간혹 호르몬 분자와 같이 세포에서 합성된 후 저자, 분비, 수용을 통해 변형이 심하거나 생성이 활발하여 빠르게 분비되는 단백질일 경우에는 세포내 농도로 검출 감도 이하인 경우가 있을 수 있으므로 필요에 따라 in situ hybridization 방법에 의한 재확인 작업이 필요하다.

In situ hybridization 방법은 핵산에 잡종 형성 반응(hybridization)을 일으키고 그 결과 특정 염기 서열이 있는 핵산 분자를 가시화하는 분자 세포 화학적 방법론이다. 세포배열 표본 혹은 조직배열 표본에서 특정한 mRNA나 DNA를 검증할 목적으로 시행하거나 바이러스의 감염 및 감염 부위를 찾는 데도 이용할 수 있다. 형광물질을 표지자로 선택하여 FISH 방법을 시행할 수도 있고, in situ PCR이나 TUNEL 염색 등을 통해 조직배열 슬라이드를 활용하여 조직 내에서 원하는 유전자 물질의 존재뿐만 아니라 세포의 증식, 분화, 사멸 등과 같은 현상을 개별 세포 수준에서 해석할 수 있다는 점에서 유용하다. 따라서 최근 cDNA array를 통해 빠르게 얻어진 대량의 유전자 정보나 분자 생물학적 수준에서 의미 있는 biomarkers의 조직에서의 발현 여부나 위치를 손쉽게 효과적으로 파악할 수 있어 각광받고 있는 검사 방법이다.

참고 문헌

1. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 1986;55:244-8.
2. Battifora H. The checkerboard tissue block. An

- improved multitissue control block. *Lab Invest* 1990;**63**:722-4.
3. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;**4**:844-7.
 4. Kim WH. Tissue array method for large scale clinicopathologic study. *Korean J Pathol* 2002; **36**:199-204.
 5. Xie W, Mertens JC, Reiss DJ, Rimm DL, Camp RL, Haffty BG, *et al.* Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study. *Cancer Res* 2002;**62**:497-505.
 6. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000;**80**:1943-9.
 7. Nocito A, Bubendorf L, Maria Tinner EM, Suess K, Wagner U, Forster T, *et al.* Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 2001;**194**:349-57.
 8. Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kim YI, Kim WH. MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas. *Cancer* 2001; **92**:1427-34.
 9. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, *et al.* Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 2001;**159**:2249-56.