

마이크로파에 의한 생체물질 고정효과

손 태 호

순천향대학교 공과대학 정보통신공학과

신 길 상

순천향대학교 자연과학대학 생물학과

생물학 및 의학등의 생명과학에서는 현미경을 이용하여 생체물질 즉, 생체조직을 관찰하고 이에 대한 조직의 검사 결과를 판정하고 발표한다. 이때 필히 고정과정(fixation process)을 거쳐야 한다. 즉, 생체조직중 조직의 구조, 특정 세포나 바이러스 및 효소등을 관찰할 때 고정과정을 거쳐 조직을 절편하고 이를 염색하여 현미경으로 검사하게 된다.

고정과정이란 생체물질을 안정화시키고 자기분해 혹은 부패를 방지하여 보존이 가능하도록 변화시키는 과정으로, 조직내의 용해성 물질을 불용성 물질로 변형시키는 과정이다. 고정과정을 거친 생체조직은 구조를 보존하고 있기 때문에 조직의 훼손이 없는 상태에서 절편이 가능하고 또한 염색상태를 좋게 하며 관찰시 contrast를 증진시킨다. 만약 고정과정을 거치지 않으면 물질의 세포막이 파괴되고 단백질 등의 물질이 용해되어 조직의 변형을 일으켜 제대로 조직을 관찰할 수 없게 된다.

고정과정에는 크게 화학적 고정법과 물리적 고정법이 있다. 화학적 고정법은 생체조직을 화학용액에 처리하는 방법이며, 물리적 고정법은 직접적인 열 혹은 초음파등으로 물질을 고정시키는 방법이다. 표면과 내부의 열전도가 달라져 고정이 균일하게 되지 않는 단점을 가지고 있기 때문에 보통 2~6일의 고정시간을 요하는 화학적 고정법을 사용하고 있다. 따라서 조직에 대한 총 검사시간이 최소 6일에서 최대 12일이 요구된다. 병원등에서 조직검사의 결과가 늦게 발표되는 사유는 바로 화학적 고정법을 사용하여 생체조직을 관찰하고 그 결과를 판정하기 때문이다.

본 고에서는 마이크로파를 이용하여 약 3시간만에 조직의 상태를 관찰할 수 있는 고정법을 소개한다. 마이크로파를 이용하여 조직을 고정하는 고정방법을 기존의 고정법과 비교하여 이들의 장단점을 나 타낸다. 본 연구자에 의해 개발된 마이크로파 고정기를 소개하고, 이를 이용하여 생체물질을 고정한

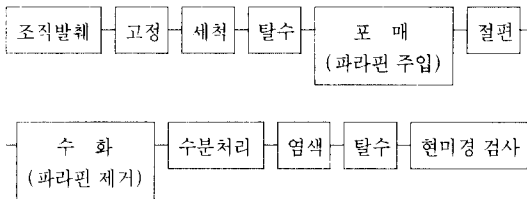
뒤 절편, 염색하여 현미경 관찰결과를 발표하여 본 연구의 방법이 기존 방법보다 우수함을 나타낸다.

II. 일반적 고정방법

일반적으로 고정방법에는 화학적 고정법과 물리적 고정법이 있다. 현재 널리 적용되고 있는 화학적 고정법은 고정하는데 장시간이 소요될 뿐만 아니라 고정시간과 동일한 시간의 화학약품 세척시간이 요구되어 전체적인 관찰과정에 많은 시간과 노력이 필요하게 된다. 더구나 고정 결과는 절편 혹은 염색후 현미경 검사시 성공 혹은 실패가 판정되기 때문에, 실패시 다시 처음 과정부터 새로이 시행하여야 하므로 검사 시간의 손실이 매우 큰 단점을 갖고 있다.

생체조직을 관찰할 때 화학적 고정과 물리적 고정 에 의한 관찰 방법을 나타내면 다음과 같다.

1. 화학적 고정법에 의한 조직의 관찰과정



[그림 1] 기존 방법에 의한 조직의 관찰과정

생체에서 발취한 조직을 포르말린, 산, 염기등의 화학물질에 최소 24시간에서 최대 72시간 담구어 고정시킨다. 고정된 조직은 화학물질이 침투되어 있으므로 이를 세척하여야 하는데, 이 과정에 소요되는 시간 역시 고정시 소요된 시간이 필요하다. 현미경으로 검사하기 위하여는 조직을 약 5~10 μ m로 자르기 위해 조직을 고체 상태로 만들어야 하므로 탈수와 파라핀 주입의 포매과정을 거쳐야 한다. 이때 일차적으로 조직이 고정이 양호하게 되어있지 않으면 절편이 잘 안되므로 고정의 성공 여부가 판정된다. 얇게 절편된 고체 상태의 조직을 다시 원래의 상태

로 복귀시키기 위해서 수화 즉, 파라핀 제거과정과 수분처리를 거친다. 염색과 탈수과정은 현미경으로 조직을 관찰할 수 있게 하는 방법과 동시에 보관이 가능하도록 하는 과정이다.

이상과 같은 [그림 1]의 생체조직 검사과정에 소요되는 시간은 최소 6.58일에서 최대 11.79일이 소요된다. 그러나 절편시 일차적으로 고정이 잘 되었다고 판정되어도 염색후 현미경 검사시 조직의 내부가 관찰하기 어려운 상태 즉, 세포막의 파괴 혹은 구조의 변형등이 발생되면 정확한 소견을 낼 수 없기 때문에 처음부터 위의 과정을 새로이 하여야 하는 장시간의 소요 단점과 큰 노력이 소요되는 단점을 갖고 있다.

[그림 1] 과정을 사용 용매 및 물질과 소요시간을 나타내면 다음 <표 1>과 같다.

<표 1> 화학적 고정법에 의한 생체조직 관찰 소요 시간

과 정	소 요 시 간	
1. 고정	24~72시간	
2. 세척	24~72	
3. 탈수	50%알콜	15~30분
30%알콜	15~30분	70%알콜
60%알콜	15~30분	90%알콜
80%알콜	15~30분	100%알콜
95%알콜	15~30분	10시간
알콜+xylene	1:1	10시간
알콜+xylene	1:2	10시간
알콜+xylene	1:3	
4. 포매(embedding)	xylene+paraffin 1:1	10시간
xylene+paraffin 1:2	10시간	
xylene+paraffin 1:3	10시간	
soft paraffin	10시간	
hard paraffin	10시간	
5. 절편제작		
6. slide 부착	24~48시간	
7. 수화(hydration)	파라핀 제거: xylene	
100%알콜	15분	30분×2
70%알콜	15분	90%알콜
30%알콜	15분	50%알콜
		증류수
		5분
8. 염색	30분~2시간	
9. 탈수	30%알콜	10분
70%알콜	10분	50%알콜
90%알콜	10분	80%알콜
xylene	5분	100%알콜
		10분
10. 현미경 mounting		
합 계	6.58일(최소)~11.79일(최대)	

2. 물리적 고정법에 의한 과정

물리적 고정법은 직접적인 가열 혹은 초음파에 의한 가열 등에 의한 열을 생체조직에 인가하여 고정하는 방법이다. 화학적인 고정에서 사용되는 <표 1>에서 1 및 2단계인 화학고정과 세척과정이 수 분으로 줄어들기 때문에 최소 2일에서 최대 6일의 생체조직 관찰시간을 줄일 수 있다. 따라서 <표 1>의 여타 과정인 3~10과정을 행할 때 총 관찰을 위한 소요시간은 최소 4.58일~최대 5.79일로 소요시간을 줄일 수 있는 방법이다.

그러나 이 방법은 시료 조직내의 열전도가 균일하게 전달되지 못하고, 조직 표면 내부의 온도차가 발생하는 고정 gradient 현상이 발생한다. 따라서 시료 조직내 물질이 대량 축출되므로써 조직의 변형이 발생되기 쉽기 때문에 고정 원래의 효과를 이루지 못하는 방법으로 현재 보편적으로 사용되지 않고 있는 방법이다.

물리적 고정법에 의한 조직 관찰 과정은 [그림 1]에서 세척 과정만 제외되고는 [그림 1]과 같은 방법으로 적용될 수 있다.

III. 마이크로파에 의한 고정법

II장에서 언급한 바와 같이 화학적 고정법은 장시간의 고정시간 및 세척시간이 소요되는 단점 이외에도 1) 시료의 크기를 작게해야 하고 2) 고정액의 선택, pH 및 온도 등이 비록 양호하게 인가되었다 할지라도 저분자 용해성 단백질이 40~50%정도 축출되는 단점을 갖고 있다.

이러한 화학적 고정법의 단점을 제거하고자 한 방법이 바로 마이크로파에 의한 고정법이다. 마이크로파 고정법은 엄격히 분류하면 물리적 고정법에 속한다. 그 이유는 마이크로파에 의해 조직의 고정 gradient 현상을 쉽게 제거할 수 있고, 또한 마이크로파의 조사에 의한 조직에 마이크로파 에너지가 전달됨에 의해 고정되기 때문이다. 전자파(electromagnetic wave)가 생체조직에 침투하는 표피깊이

(skin depth) δ 는

$$\delta = (\pi f \mu \sigma)^{-1/2} \quad (1)$$

이다. 여기서 f , μ 및 σ 는 각각 전자파의 주파수, 시료의 투자율(permeability) 및 도전율(conductivity)이다. 표피깊이 δ 는 전자파의 크기가 표면에 비해 $1/e(36.8\%)$ 로 감소하는 깊이로서 시료의 유도전류 및 발생온도를 예측하는 중요한 수치이다.

일반적으로 생체조직은 도전율이 매우 낮고 비자성체이므로 식(1)에서 비교적 낮은 마이크로파 주파수일 경우 표피깊이는 큰 값이 되므로 발체한 조직 내부 및 외부에 고루 전자파의 에너지가 전자(propagation)된다고 가정할 수 있다. 또한 마이크로파 에너지를 효율적으로 사용하기 위해서는 자유공간에 노출하여 마이크로파 복사(radiation)에 의한 고정보다 공진기를 이용한 고정이 에너지손실을 줄이며 균일하게 에너지를 공급할 수 있으므로 효과적이다.

생체조직은 전기적으로 생각할 때 일종의 손실이 있는 유전체(lossy dielectrics)로 간주될 수 있다. 이러한 조직에 마이크로파 에너지가 입사하면 열이 발생하게 되는데 이때, 발생하는 열의 관계식은 생체조직의 등가 컨덕턴스의 함수가 된다. 등가 컨덕턴스는 자유전자의 전도손실과 분자의 진동 및 회전에 의한 손실의 합으로 이루어진다. 즉, 시료에 유도된 전류와 시료의 저항에 의한 열과 분자의 운동열이 더하여져 열을 발생하게 된다. 이러한 동작을 이용하여 현재 상업적 목적으로 널리 적용되고 있는 주파수는 896M, 915M, 2.45G, 3.3G, 5.8G, 10.525 GHz 등이 있다. 특히 주파수 2.45GHz는 마이크로파 오븐(oven)의 주파수로 가정용 조리기로 널리 적용되고 있는 주파수이다.

조직에 마이크로파 에너지가 입사될 때, 조직에 발생하는 단위면적당 전력 P는 다음식과 같다.

$$P = \omega \epsilon_r' \epsilon_0 \tan \delta |E_1|^2 [W/m^2] \quad (2)$$

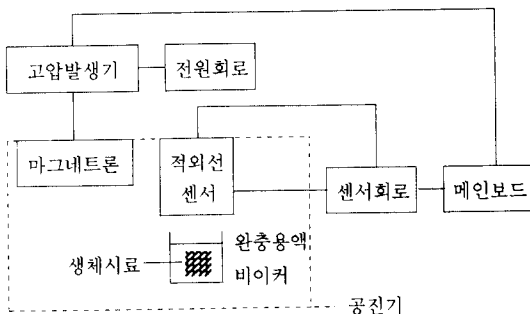
여기서 $\omega = 2\pi f$

$$\begin{aligned} \epsilon_r' &= \text{복소유전율의 실수항} \\ \epsilon_r'' &= \text{자유공간에서의 유전율} = 8.854 \times 10^{-12} \\ \tan \delta &= \epsilon_r' / \epsilon_r'' \\ |E| &= \text{조직에 침투된 전계의 세기} \end{aligned}$$

이다.

1. 마이크로파 고정기

마이크로파를 이용하여 생체조직을 고정하기 위해서는 먼저 마이크로파를 생체에 조사할 때 나타나는 고정효과를 알아야 한다. 고정효과를 위한 기준치는 마이크로파에 의해 발생하는 생체시료의 온도가 기준이 될 수 있다. 물론 마이크로파에 의한 시료의 온도발생 효과 이외 어떠한 영향이 고정작용에 첨가되는가 하는 사실은 아직껏 연구 발표되지 않고 있는 실정이다. 따라서 생체시료에 발생하는 열은 식 (1), (2)에 의해 증명되므로 고정효과는 시료가 받는 온도가 어떠한 온도일 때 가장 효과적으로 고정되는가의 문제로 집약될 수 있으므로 이 온도가 판단의 기준이 될 수 있을 것이다. 마이크로파 공진기 속에서 시료가 받는 온도는 마이크로파 발생기인 마그네트론의 출력과 파형 및 조사(illumination)시간에 의해 결정되므로 특정 출력에서 고정상태가 양호한 파형 및 조사시간의 자료가 요구된다. 이는 관찰 대상인 생체조직 시료가 마이크로파의 출력, 파형 및 조사시간에 매우 민감하므로 최적의 조건을 알아내어야 한다는 것이다.



[그림 2] 마이크로파 고정기의 블록선도

{그림 2}는 본 연구자에 의해 개발되어 특허 등록된 마이크로파 고정기의 블록선도이다.

마이크로파 고정기의 등록별 동작 형태는 다음과 같다.

- 1) 마그네트론은 메인보드에 의해 제어되며 발진 주파수 2.45GHz, 출력 550W로 50% duty cycle을 가지면서 동작한다. 정현파(CW)로 계속 동작치 않고 50% duty의 펄스파로 인가하는 이유는 생체시료에 마이크로파 에너지를 순차적으로 공급하여 조직의 파괴를 줄이기 위함이며, 또한 pulse-off 시간동안 온도를 감지하므로써 잡음을 줄이기 위해서이다.
- 2) 적외선 센서는 비접촉식 온도 센서로 접촉식 센서가 갖는 마이크로파 유기잡음을 제거하고, 반응속도가 빠르기 때문에 원하는 온도에서 시간의 지연없이 동작한다.
- 3) 센서회로는 감지된 온도전압을 증폭하고 또한 공진기내 주위온도에 대한 보상을 서미스터를 사용하여 보상하므로써 정확한 온도가 탐지되게 한다. 또한, sample & hold 회로를 추가하여 마그네트론 동작시 시료의 온도를 hold하고 동작치 않을 때 회로 출력을 메인보드로 공급하여 잡음 및 회로의 오동작을 방지한다.
- 4) 메인보드(main board)는 timing generator, level comparator 및 timing control converter로 구성되고 있다. 고정기 판넬상에 있는 고정레벨을 thumb wheel 스위치로 선택하면 선택된 디지털신호를 아나로그신호로 변환하여 level comparator에 인가한다. timing generator는 선택한 고정레벨에 의해 마그네트론의 동작시간을 제어하며, 센서회로에서 필요한 sampling pulse를 만들어낸다. 또한 비이커에 담긴 버퍼(buffer)인 생리 식염수의 양에 따라 시료의 온도가 달라지기 때문에 이를 보상하는 회로가 포함되어 있다.

따라서 적정량(보통 20ml)의 버퍼에 시료를 넣고 원하는 고정레벨 및 버퍼용량을 선택한 뒤 고정기의 동작버튼을 누르면 적정 고정상태에서 고정기의 동

작은 자동적으로 멈추게 된다.

마이크로파 에너지에 의한 고정효과에 대한 연구는 1960년대부터 연구되었으나 현재 보편화되지 못하고 있는 실정이다. 그 이유는 초기 연구시는 공진기 내에서 고정한 것이 아니라 자유공간 상태에서 마이크로파를 시료에 조사시켰으며 또한, 마이크로파 출력이 연구자별로 달라서 양호한 고정을 위한 확실성과 정량적인 수치를 얻지 못하였다. 공진기에서 고정하는 연구도 시도된 적이 있었으나 접촉식 온도센서를 사용하므로써 온도감지의 문제점이 나타나 연구의 신빙성이 결여되었었다. 그러나 반도체 소자 산업의 발전에 따라 0.1도 이내 오차를 갖는 적외선 온도센서가 개발, 생산됨에 따라 여기서 사용되는 고정기는 이러한 문제점을 해결할 수 있다.

2. 고정시간 단축효과

고정정도가 우수하다는 판정의 기준은 1) 시료의 절편 제작과정에서 시료의 경도(硬度)로 나타나는 문제 즉, 절편이 잘되어야 하는 것 2) 염색시 동질의 염색이 양호하게 되어 현미경하에서 동질 염색성을 띄어야 하며 3) 생체시료 구조의 보존상태가 양호해야 한다. 이러한 상황에서 현재 사용되고 있는 화학적 고정법은 고정시간 자체가 24~72시간이 요할 뿐 아니라 자동적으로 따라야 하는 과정인 화학액의 세척과정 역시 24~72시간이 소요되므로 고정에만 2일~6일이 소요되어 전체 시료의 관찰(검사)에 필요한 시간이 II장의 <표 1>과 같이 약 7일~12일이 요구되는 큰 단점을 갖고 있다. 또한 화학액이 쉽게 침투되게 하기 위하여 시료의 크기를 줄여야 하며, 3~5% 중성 포르말린 고정액을 사용하더라도 저분자 용해성 단백질이 40~50% 축출되어 구조의 보존력이 작아지게 된다.

여기에서는 마이크로파 고정기를 이용할 때 소요되는 고정시간 및 전체 관찰(검사)시간을 나타낸다. 마이크로파로 고정하였을 때 이후 관찰을 위한 과정은 크게 2가지로 대별될 수 있다. 첫째는 기존의 파라핀을 이용한 방법([그림 1])이고 나머지는 냉동절

편법이다.

(1) 마이크로파 고정 + 파라핀법

이 방법은 냉동절편기가 없거나 기존의 절편방법을 추구할 때 사용하는 방법으로 화학액에 의한 고정 대신 마이크로파로 고정하는 방식이다. 이때 화학적 고정법에 의한 단점인 장시간 소요, 작은 크기의 시료화 및 구조물의 보존력 약화등은 보완될 수 있으나 역시, 관찰을 위한 포매과정등이 요구되므로 전체시간이 비교적 장시간 요구된다. 이를 간단히 표시하면 다음과 같다.

<표 2> 마이크로파고정+파라핀법에 의한 생체조직 관찰 소요시간

과 정	소 요 시 간
1. 고정	수초~수십초
2. 탈수	<표 1> 과정과 동일
3. 포매(embedding)	
4. 절편제작	
5. slide 부착	
6. 수화(hydration)	
7. 염색	
8. 탈수	
9. 현미경 mounting	
합 계	

(2) 마이크로파 고정 + 냉동절편법

마이크로파 고정 + 파라핀법은 기존의 화학적 고정법의 단점을 잘 보완해 주고 있으나 역시 총관찰(검사)시간이 화학적 고정법보다 줄기는 하지만 역시 약 5~6일이 소요되는 단점을 갖고 있다. 따라서 냉동절편기를 이용한 새로운 방법을 소개하고자 한다.

이 방법은 고정된 생체시료를 냉동절편기에 넣고 냉동시킨 후 절편하는 방법이다. 시판되는 냉매는 polyvinyl alcohol 혹은 polyethylene glycol이 혼합되어 있기 때문에 시료에 강한 탈수작용을 일으켜 조직내 물질의 축출을 발생시킨다. 또한, 시료를 파라핀에 포매하면 냉동이 되지 않아 냉동절편의 의미가 없어진다. 따라서 마이크로파에 의해 고정된 시

료를 글루코스로 포화된 파라핀에 포매시켜 냉동한 뒤 절편하는 방법을 추천한다. 이 방법은 냉동이 잘 될 뿐만 아니라 절편 제작에도 용이하다.

마이크로파 고정 + 냉동절편법으로 생체시료를 고정 및 관찰하기 위한 과정을 소요시간별로 나타내면 다음과 같다.

〈표 3〉 마이크로파고정+냉동절편법에 의한 생체 조직 관찰 소요시간

과 정	소 요 시 간
1. 고정	수초~수십초
2. 포매(embedding) 및 절편	1시간
3. slide 부착	10~20분
4. 파라핀 제거: xylene	5분~2시간
5. 염색	30분~2시간
6. 탈수	
30%알콜 10분	50%알콜 10분
70%알콜 10분	80%알콜 10분
90%알콜 10분	100%알콜 10분
xylene 5분	
7. 현미경 mounting	
합 계	2.8시간~6.5시간

〈표 3〉에서 보듯이 총 관찰시간이 최소 2.8시간에서 최대 6.5시간으로 화학적 고정법에 비해 비교할 수 없을 정도로 소요시간을 줄일 수 있다. 만약 숙련 될 경우에는 이보다 훨씬 짧은 시간내 생체시료를 관찰할 수 있을 것으로 판단된다.

이상으로 나타낸 고정법별 시료 관찰(검사) 결과를 간략히 나타내면 다음 〈표 4〉와 같다.

〈표 4〉 고정법별 생체시료 특성 장단점

	화학적 고정법	마이크로파고정 + 파라핀법	마이크로파고정 + 냉동절편법
현 사용 유무	보편적 사용	거의 사용하지 않음	새로운 방법
고정시간	2일~6일	수초~수십초	수초~수십초
총 관찰시간*	6.58~11.79일	4.58~5.79일	2.8~6.5시간
저분자 용해성 단백질	40~50% 추출	추출 거의 안됨	추출 거의 안됨
시료크기	작아야 됨	무관	무관
염색성	나쁨	양호	양호
절편제작	용이함	용이함	어려움
화학반응	조직내 상온	없음	없음

* : 총 관찰시간은 조직을 관찰하기 위하여 고정에서 포매, 절편, 염색 및 현미경 mounting까지 소요되는 시간임.

3. 고정결과

본 논고에 나타낸 마이크로파 고정 + 냉동절편법의 타당성을 밝히기 위하여 약 2년에 걸친 실험에 의해 고정상태가 가장 양호한 마이크로파 고정기의 상태 즉, 출력파형, 조사시간 및 버퍼인 완충용액의 용량에 따른 고정효과 등을 관찰하였다. 실험에 사용된 생체시료는 주로 생쥐의 신장이었다. 이는 포유류의 신장이 고정의 우열을 판단하는 기준조직이기 때문이다. 현재 널리 통용되고 있는 포유류 신장의 고정우열 판단 기준은 현미경 관찰결과 다음의 사항에 의해 우열이 판단된다.

- 1) 신장선화소관 사이의 간격
- 2) 고정의 동질성
- 3) 신소관 표면의 균일성
- 4) 핵의 구조와 혈구세포의 형태
- 5) 동질 염색성 및 염색액의 확산 여부 등

이러한 고정우열 기준은 몇가지의 예외를 제외하고는 다른 여러가지 조직에도 적용될 수 있다.

여기에서는 그간 실험된 여러 데이터중 쥐의 신장을 화학적 고정법과 비교하여 그 결과를 소개하고자 한다.

3.1 화학적 고정법 결과(사진 1)

먼저 신장 조직의 대조군을 최대 5mm³ 정도의 크기로 발췌한 뒤, 3.5% 포르말린 혹은 karnovsky 고정액에 고정한뒤 〈표 1〉의 과정으로 시료를 처리하였다. 이때 사용된 염색은 1968년 Tomasi에 의한 PAS(Periodic Acid Schiff's)염색법을 사용하였고 1% fast green 수용액으로 대조 염색(counter stain)하였다. 촬영은 AO 광학 현미경 2071형에 장착된 카메라를 사용하여 촬영하였다. 이와같은 과정으로 촬영한 대조군의 사진은 〈사진 1〉과 같다.

〈사진 1〉에서 보듯이 사구체가 수축되고, 때때로 혈구세포가 파괴되어 있으며, 신소관(kidney tubules) 사이와 보우만씨 낭(Bowman's capsule)의 낭상피 사이에 형성되는 capsular space가 넓혀져 있고, 각 신소관의 내부 경계가 명확하지 않고 있다. 그러나 동질 염색성과 신소관의 표면이 균일하고,

핵이 비교적 양호하게 보존되는 등 조직 구조의 보존 상태는 적절하다고 할 수 있다. 이는 일반적인 화학적 고정법으로 나타나는 상태중 상급의 상태라 할 수 있다.

3.2 마이크로파 고정 + 냉동절편법 결과<사진 2~5>

<사진 2~5>는 마이크로파로 고정하고 냉동절편법으로 절편제작한 시료를 위 (1)과 같은 과정으로 염색 및 현미경 배율(200~400배)촬영한 것이다. 이때, 마이크로파 고정에 적용된 고정기의 상태는 고정레벨 200(펄스폭 0.5sec, duty 50%, 마이크로파 조사시간 10초)이다. 고정레벨 200상태에서 완충용액인 버퍼 20ml에 선택하면 시료가 받는 고정온도가 28±1도에서 고정기의 작동은 멈추게 된다.

<사진 2>는 신장의 피질(cortex)내 상피세포(endothelial cell: E표시)들로 구성된 수질(medullary remalis)을 촬영한 사진이다. 사진에서 보듯이 수방선(medullary ray: M표시), 단부선회소관(distal convoluted tubule, 혹은 원위곡뇨세관이라 함: D표시), 혈관(B표시)등의 기저층은 PAS염색에 양성반응이나 이들 소관을 형성하는 상피세포들은 반응하지 않고 있다. 따라서 신소관을 형성하는 상피세포를 분명하게 관찰할 수 있고 염색이 동질성을 보이며 각 신소관의 경계가 분명하게 나타나므로 고정상태가 우수하다는 것을 알 수 있다.

<사진 3>은 내피질(inner cortex)부를 관찰, 촬영한 사진이다. 기부선회소관(proximal convoluted tubule, 혹은 근위곡뇨세관이라 함: P표시)가 헨레계체(Henle's loop: H표시)등이 뚜렷이 나타나고 있다. 특히, 기부선회소관의 내부는 강한 PAS염색 양성반응을 나타내는 물질로 채워져 있다. <사진 3>에서 B, M, D는 각각 혈관, 수방선 및 단부선회소관이다.

<사진 4>는 <사진 3>과 같은 부위로 특히 신소관 내 사구체를 관찰한 사진이다. 사진에서 사구체와 수입세동맥(A), 수출세동맥(C), 기부선회소관(P)은 PAS양성반응을 단부선회소관(D), 치밀반(ma-

cular densa)등은 반응치 않고 있다. 특히, 모세혈관, 낭상피 낭공간(capsular space)내 세포(화살표 참조)등의 보우만씨 낭의 내부구조를 상세히 관찰할 수 있다.

반면 <사진 5>는 32도의 고정레벨로 다른 것도 마찬가지로이지만 특히, 세포의 핵들이 세포 밖으로 돌출하고 있는 상태(화살표 참조)로 관찰된다. 따라서 마이크로파 고정이 마이크로파의 출력, 파형 및 조사시간등에 조직이 얼마나 민감하게 반응하는가를 알 수 있기 때문에, 마이크로파 에너지는 필히 적절한 상황에서 정확하게 공급되어야 하므로 마이크로파 고정기의 필요성이 요구된다.

종합적으로 볼때 <사진 2~4>는 PAS염색결과 내피세포로 구성된 각종 신소관 사이의 경계가 분명하고 간격들이 치밀하며, 각 조직성분의 염색성이 동질성을 이루고 있고 전체적으로 조직의 구조가 우수하게 보존되므로써 이 방법의 타당성을 입증하고 있다. 더구나 화학적 고정법으로는 고정하기 어려운 혈구와 같은 자유세포까지 양호하게 고정되고 있을 뿐만 아니라 보다 양호한 고정상태를 얻을 수 있기 때문에 조직화학에도 용이하게 응용될 수 있을 것이다.

다만, 마이크로파에 의한 생체시료의 고정이 시료에 발생하는 열에 의한 것 이외에 증명할 방법이 없기 때문에 고정기의 고정레벨을 온도에 맞추고 있으나, 열효과(thermal effect)이외 다른 영향에 관한 연구는 향후에도 계속해 나가야 할 것으로 판단된다.

IV. 결 론

마이크로파 에너지를 이용하여 생체조직을 고정하는 새로운 방법을 제시하였다. 생체조직의 시료를 관찰(검사)하기 위한 과정을 기존의 화학적 고정법과 비교하여 나타내었고 마이크로파로 고정하기 위한 마이크로파 고정기의 구조를 설명하였다.

새로운 이 방법은 고정효과가 기존의 고정법과 비교해 볼때 동등 혹은 보다 우수하였음을 현미경하에

촬영한 사진으로 나타내었다. 특히, 이 방법에 의한 고정시간은 수십초에 불과하여 기존의 화학적 고정 소요시간인 2~6일을 크게 단축시키며, 현미경 관찰을 위한 총 시간은 냉동절편법을 사용하므로써 3시간이 소요되어 기존방법인 약 7~12일 소요시간을 획기적으로 줄일 수 있었다.

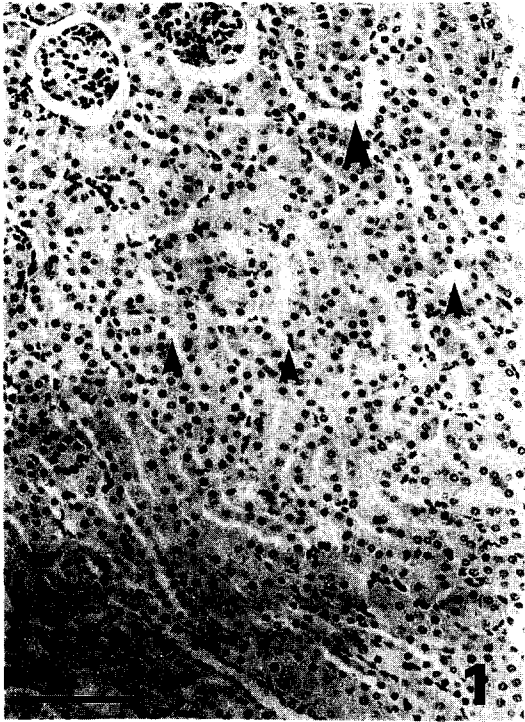
본 고에서는 지면상 고정효과를 위한 기준조직인 생쥐의 신장만을 나타내었으나 간장, 위장, 근육 및 개불과 같은 여타의 생체조직을 대상으로 실험한 결과 기존의 방법보다 우수함을 보였다. 또한, 마이크로파 고정법은 화학적 방법에 비해 시료내에서 화학 반응을 일으키지 않으므로 내장기관의 배상세포, 근육조직의 핵산 및 시료내 히스타민, 비타민 D 수용체 등 효소 활성의 관찰에도 적용되어질 수 있다. 특히, 인체에 해로운 보다 강한 유독성물질로 고정해야 하는 전자현미경 관찰에도 확대 적용하기 위하여 현재 연구중에 있으므로 향후 전자현미경 관찰에도 유용히 적용될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

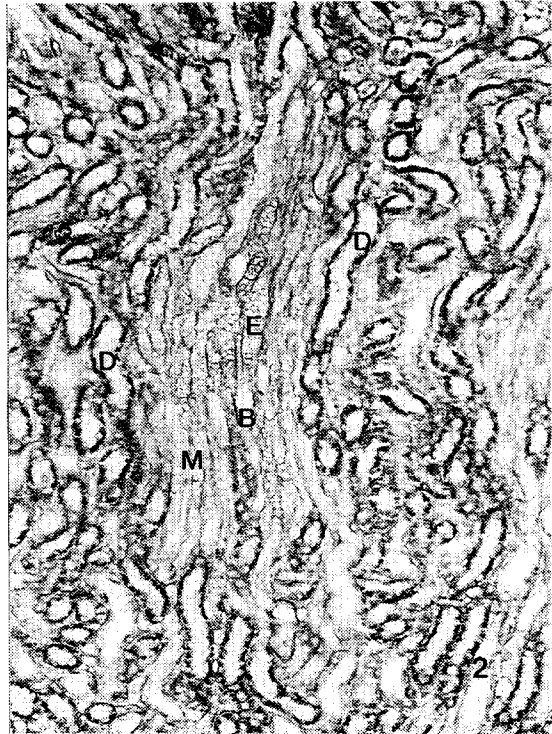
[1] D. Roddy, "Microwave Technology", Prentice-Hall, 1986.
 [2] R. J. Kimber and H. Lander, "The Effect of Heat on Red Blood Cell Morphology", Fra-

gility and Subsequent in Vivo, J. Sab. Clin. Med. Vo. 64, pp. 922~933, 1964.
 [3] M. K. Patterson and R. Bulard, "Microwave Fixation of Cells in Tissue Culture", Stain Tech., Vol. 55, pp. 71~75, 1980.
 [4] A. S. Y. Leong and J. Milios, "Rapid Immunoperoxidase Staining for Label Lymphocyte Antigens using Microwave Irradiation", J. Pathol., Vol. 148, pp. 183~187, 1986.
 [5] A. S. Y. Leong and C. G. Duncis, "A Method for Rapid Fixation of Large Biopsy Specimens using Microwave Irradiation", J. Pathol., Vol. 18, pp. 222~225, 1986.
 [6] J. R. Baker, "Principles of Biological Microtechnique", John Wiley and Sons Inc., 1958.
 [7] 신길상, "조직학, 조직화학에 있어서의 Microwave Energy를 이용한 조직 고정법에 관하여", 순천향대학교 논문집 제11권 제4호, pp. 667~677, 1988 /
 [8] 손태호, 신길상, "적외선 온도감응기를 장착한 마이크로파 고정기의 생체물질 고정효과", 경창산업 연구보고서, 순천향대학교, 1994.
 [9] 손태호, 신길상, "생체시료 관찰용 마이크로웨이브 고정기", 실용신안특허 출원번호 제17702호, 9월 1992.

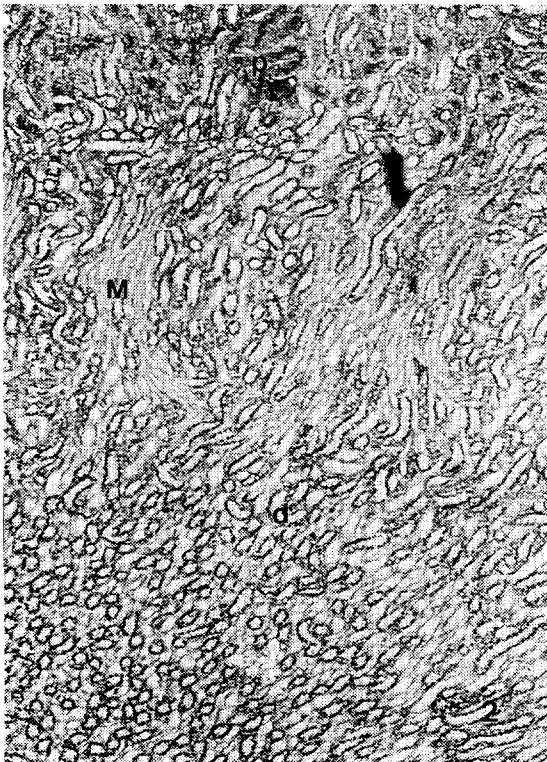
마이크로파 고정기의 개발 및 고정법에 관한 연구는 1992년부터 순천향대학교에서 시행되고 있으며, 현재 국내 및 국제(미국, 일본, 독일 프랑스등) 특허 신청중에 있다. 마이크로파 고정기의 개발은 현재 완료되었으며 (주)경창산업에서 생산 준비단계에 있다.



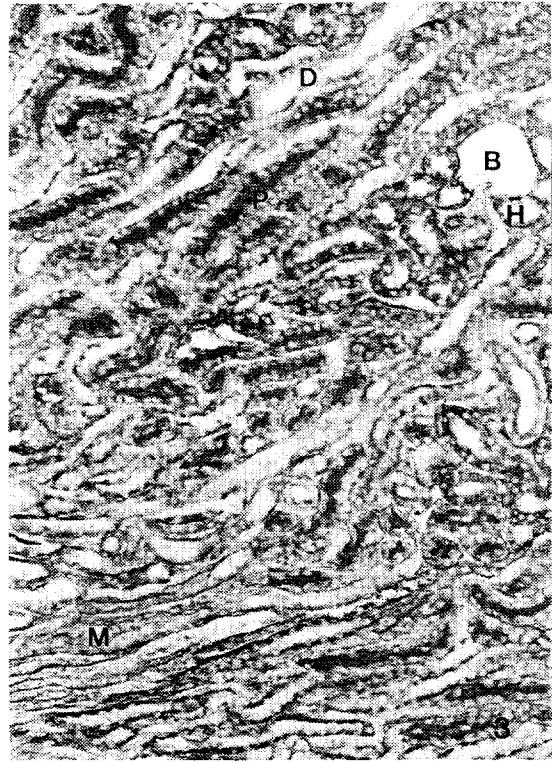
〈사진 1〉



〈사진 2〉



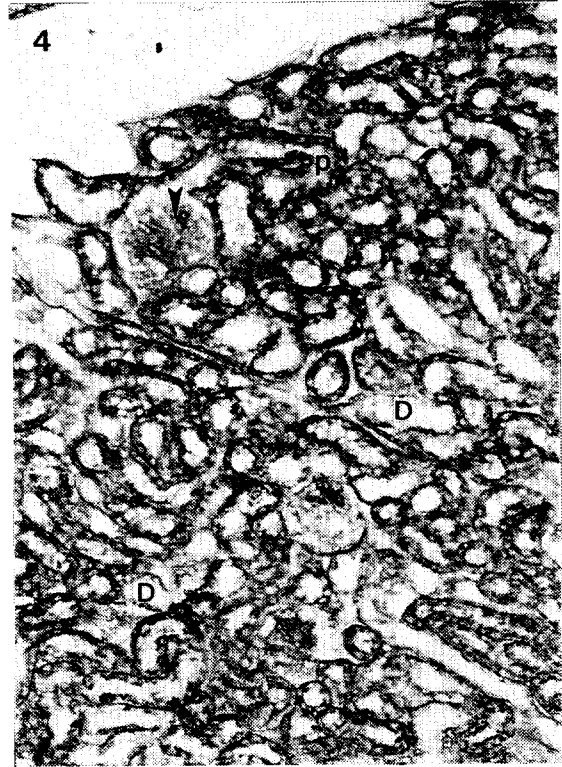
〈사진 2〉



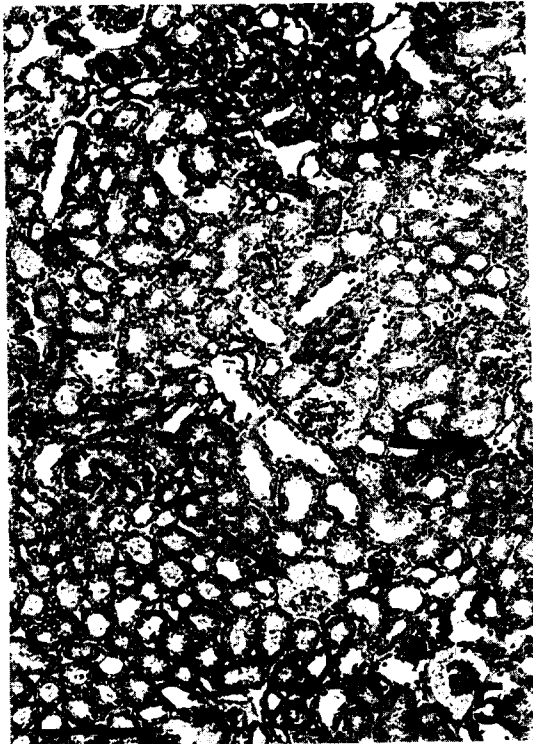
〈사진 3〉



<사진 4>



<사진 4>



<사진 5>