

골조직의 신속한 진단을 위한 탈회방법의 비교 연구

한양대학교 구리병원¹, 서울보건대학 임상병리과²

김성철¹ · 백운철¹ · 김태전² · 배형준² · 강희규²

Comparative Research of Decalcification Methods for Quick Diagnosis on Bone Tissue

Sung-Chul Kim¹, Oun-Chul Back¹, Tai-Jeon Kim², Hyung-Joon Bae², and Hee-Gyoo Kang²

Department of Pathology, Hanyang University Guri Hospital, Guri 471-020, Korea¹

Department of Biomedical Laboratory Science, Seoul Health College, Sungnam 471-701, Korea²

These studies were done to know decalcification methods to reduce the time of decalcification for quick bone tissue diagnosis. When bone tissue was decalcified with 10 % formic acid at room temperature, decalcification and hematoxylin & eosin (H&E) stains were complete and satisfactory after 12 hours, but some of the tissue sections fell off during staining. In this way, decalcification, H&E stains were complete and satisfactory after 24 hours, 36 hours and 48 hours, tissue sections didn't fall off during staining. When bone tissue was decalcified with 10 % formic acid in a 60 °C paraffin oven, decalcification and H&E stains were complete and satisfactory after 6 hours, but some tissue sections fell off during staining. In this way, decalcification and tissue sections were complete, with no falling off during staining after 8 hours, 10 hours, 12 hours, 14 hours, 24 hours, or H&E stains were satisfactory from 8 hours to 12 hours, but H&E stains appeared to reddish nucleus after 14 hours and 24 hours. Bone tissue was decalcified with 10 % formic acid for 6 hours, 12 hours and 24 hours at DECAL machine frequencies of 15 Hz and 45 Hz, and for 6 hours, 12 hours and 24 hours at a DECAL machine frequency of 90 Hz. Decalcification and H&E stains were complete and satisfactory after 6 hours at the 15 Hz and 45 Hz DECAL settings. Some of the tissue sections fell off during staining at the 15 Hz DECAL machine setting. At the 90 Hz setting, decalcification, H&E stains, and tissue sections were complete and satisfactory with no falling off during staining after 4 hours. In this way, decalcification, H&E stains, and tissue section were complete and satisfactory with no falling off during staining after 12 hours, 24 hours at all machine settings. Bone tissue was decalcified with 10 % formic acid for 6 hours, 12 hours and 24 hours at 37 °C 3 hours, 6 hours and 12 hours at 45 °C and 1 hours, 5 hours and 10 hours at 60 °C with the RHS-1 machine setting at 60Hz. At the temperatures of 37 °C, 45 °C, and 60 °C decalcification, H&E stains, and tissue sections were complete and satisfactory, with no falling off during staining except for after 6 hours at 37 °C. 3 hours, 1 hours, or decalcification, H&E stains, and tissue sections were complete and satisfactory with no falling off during staining after 12 hours and 24 hours at 37 °C, 6 hours and 12 hours at 45 °C, and 5 hours at 60 °C. But H&E stains appeared to reddish nucleus after 10 hours at 60 °C. From the above results, the authors were able to deduce that decalcification is accelerated by heat and frequency. We therefore think that it is necessary for machines which are similar to the RHS-1 machine to be maintained at the temperature evenly with agitation effect for quick decalcification.

Key Words : Decalcification, Formic acid, Decal machine, RHS-1 machine

I. 서 론

의료계를 둘러싼 외부환경이 급격히 변화하고 의료시장내 경쟁이 심화되면서 많은 병원들에서 양질의 서비스를 제공하기 위한 노력들을 경주하고 있다 (이, 2003). 노력의 일환으로 타업종보다 업무의 복잡성과 보수성으로 인해 전산화를 꺼렸던 병원이 환자의 신속, 정확한 진료를 통해 고객 서비스의 질적인 개선을 꾀하고, 의료개방시대를 맞아 경쟁력을 확보하기 위한 일환으로 전산화에 경쟁적으로 나서고 있다. 또한 양질의 서비스를 제공하기 위해서 모든 검사들이 신속성을 가장 중요한 요소로 생각하기 때문에 병리과에서는 탈회시간의 단축을 위한 시도를 많이 하고 있으나 만족할만한 결과를 얻지 못하고 있다 (장 등, 2002).

육안해부학적으로 골격은 치밀골 (cortical or compact bone)과 해면골 (cancellous or spongy bone)의 2가지로 구분된다. 치밀골은 장골의 골간과 많은 편평골의 외층을 형성하는 골로서, 단단하고 매우 강한 고형조직이다. 이에 비해 해면골은 장골두, 장골의 골수강, 척추 및 편평골의 중심부에 출현하며, 약 1 mm 두께의 그물모양의 소주 (trabecular)를 형성하고 있다. 이 골은 치밀골에 비해 경도는 뒤지지만, 특히 대퇴골두와 척추 등에서 골소주의 배열상태는 몸무게를 지탱하는 데 매우 이상적인 구조를 하고 있다. 탈회 (decalcification)은 정상 또는 비정상 골조직, 치아, 결핵 석회화병소, 석회화된 죽종, 골조직이 포함된 기형종, 주사후에 발생한 농양 등의 조직에는 칼슘이 침착되어 있기 때문에 일반적인 방법 (paraffin절편)으로 박절하기가 쉽지 않다. 따라서 이들 조직으로부터 표본제작을 하려면 칼슘을 제거하여 조직을 박절하기에 적합한 정도로 연화시키는 탈회과정을 실시해야만 한다 (Matthews와 Mason, 1984; Mulliink 등, 1985; Mukai 등, 1986; von der Valk 등, 1989).

대부분의 탈회에는 산 탈회법을 사용하며 산 중에 대표적인 것은 강산에 속하는 질산이다. 이는 빠르게 탈회가 되나, 탈회가 끝나는 시점을 주의깊게 관찰하여야 하는 어려움이 있다. 이 시점을 놓치면 조직의 파괴가 심각하고, 면역염색에도 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Lynch 등, 1969). 그 밖에 산 탈회법에는 trichloroacetic acid, plank-rychlo 용액, disodium ethylenediamine tetraacetate, formic acid, 마그네슘·구연산염 등을 사용하는 방법들이 있다. 이외의 탈회법에는 이온교환수지 탈회법, 전기분해탈회법 (Witter 등, 2000), 초음파 탈회법

(Tortel 등, 1988) 등이 있다. 드문 경우이기는 하나 고정액을 이용하여 고정과 탈회를 동시에 할 수 있게 하는 방법으로 picric acid, trichloroacetic acid, glacial acetic acid, chromic acid 등이 함유된 고정액인 Bouin 용액, Flemming 용액, Susa 용액 등을 사용하기도 한다.

본 연구는 골조직검사를 시행할 때 장시간 소요되는 탈회과정을 조직손상없이 보다 신속히 처리하여 빠른 진단에 도움이 될 수 있는 자료들을 얻고자 실시하였다. 탈회과정을 단축할 수 있는 방법으로는 첫째 실온에서 10 % formic acid에 처리하는 방법 (Roncaroli 등, 1991), 둘째 산 탈회액을 60 °C paraffin oven (JISICO)에서 가온 탈회시키는 방법, 셋째 탈회기 (Biotech, USA)을 이용하여 Hz (진동수)을 조정 (0 Hz~99 Hz)하여 탈회시키는 방법 (Glockner 등, 1983), 넷째 RHS-1 machine (Milestone srl, Italy)에서 60 Hz의 기본설정에서 탈회액을 교반시키면서 온도를 설정 (37°C~60°C)하여 탈회시키는 방법 (Glockner 등, 1983; Sanderson 등, 1995) 등을 이용하여 탈회시간에 따른 탈회정도, 염색시 절편의 상태, hematoxylin과 eosin (H & E) 염색상태, 세포충실도, 조직구조의 보존상태 등을 비교분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험 검체는 일반 인체 뼈조직을 대신하여 특정한 질병이 발생되지 않은 신선한 돼지 족뼈를 이용하였으며, 10 % formalin (HCOOH, MW; 46.03, Yakuri pure chemical, Japan) 용액에 24시간 고정하고 수세한 후 뼈절단기를 이용하여 1×2×0.5 cm 크기로 절단하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 탈회 방법

(1) 10 % formic acid 용액 사용법

뼈조직을 10 % formic acid (Yakuri pure chemical, Japan) 용액에 넣어 12시간, 24시간, 36시간, 48시간 동안 각각 탈회시켰다.

(2) 10 % formic acid 용액과 60 °C paraffin oven 사용법
 뼈조직을 10 % formic acid 용액에 넣고, 60 °C paraffin oven 넣어 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 14시간, 24시간 동안 각각 탈회시켰다.

(3) 10 % formic acid 용액과 초음파 탈회기인 DECAL 기 사용법
 뼈조직을 10 % formic acid 용액에 넣어 초음파 탈회기인 DECAL기에 넣고 진동수를 15 Hz, 45 Hz, 90 Hz로 각각 조절하여 15 Hz와 45 Hz에서 6시간, 12시간, 24시간 동안, 90 Hz에서 4시간, 12시간, 24시간 동안 각각 탈회시켰다.

(4) 10 % formic acid 용액과 RHS-1기 사용법
 뼈조직을 10 % formic acid 용액에 넣어 RHS-1기에 넣고 진동수를 60 Hz로 조절한 다음 37 °C에서 6시간, 12시간, 24시간, 45 °C에서 3시간, 6시간, 12시간, 60 °C에서 1시간, 5시간, 10시간 동안 각각 탈회시켰다.

2) 탈회 완료 확인법

탈회 완료의 확인방법은 칼로 조직의 끝을 잘라보거나 바늘로 조직을 찔러보는 것으로 조직의 탈회상태를 확인하였다.

3) 표본 제작법

탈회가 완성된 골조직은 일반 조직처리 과정을 거친 후 파라핀 포매를 한 후 회전식 박절기 (Microtome, Leica Germany)를 이용하여 조직절편을 4-5 μm 두께로 박절하였다. 염색과정에서 조직표본의 탈락을 방지하기 위하여

3-aminopropyl-triethoxy-silane (Sigma chemical, Germany) 용액으로 처리된 coating slide에 절편을 부착시킨 후, 일반 H & E 염색을 실시하고, canada balsam (Yakuri pure chemicals, Japan)으로 봉입 후 광학현미경으로 관찰하였다.

위와 같은 방법으로 표본을 만들어 탈회에 걸리는 시간과 탈회상태, 염색시 절편상태, 염색상태를 비교 관찰하였다.

III. 결 과

1. 10 % formic acid 용액 사용법의 결과

고정된 뼈를 10 % formic acid에 넣어 12시간 동안 탈회를 실시하여 탈회정도, 염색시 절편상태, 염색상태를 비교 관찰한 결과 탈회가 완료된 시점은 12시간이었으나 염색시 절편의 상태는 고르지 못하였다. 반면 염색상태는 양호하게 나타났다 (Table 1). 또한 24시간, 36시간, 48시간 동안 각각 탈회를 실시하여 탈회정도, 염색시 절편상태, 염색상태를 비교 관찰한 결과 모두가 양호한 것으로 나타났다 (Table 1, Fig. 1, 2).

Table 1. Results of sections and stains in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid according to times at the room temperature

Time	12 hrs*	24 hrs	36 hrs	48 hrs
Section	Bad	Good	Good	Good
Stain	Good	Good	Good	Good

* hrs : Hours

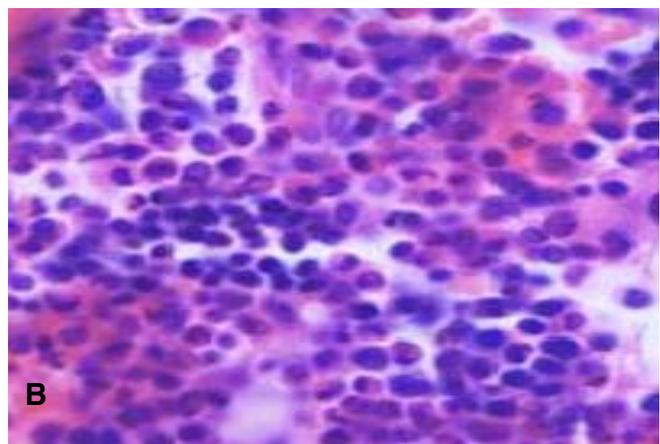


Fig. 1. Hematoxylin and eosin stainings in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid for 12 hours at the room temperature (H & E, A: ×100, B: ×400).

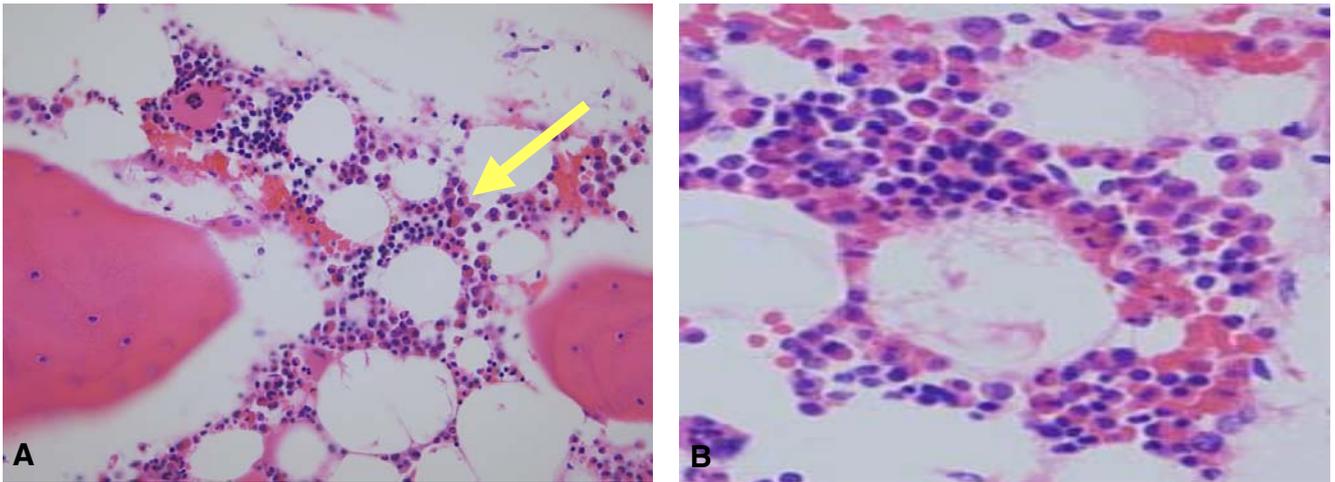


Fig. 2. Hematoxylin and eosin stainings in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid for 24 hours at the room temperature (H & E, A: $\times 100$, B: $\times 400$).

2. 10 % formic acid 용액과 60 °C paraffin oven 사용법의 결과

고정된 뼈를 10 % formic acid에 넣고 60 °C paraffin oven 에서 6시간 동안 탈회를 실시하여 탈회정도, 염색시 절편상태, 염색상태를 비교 관찰한 결과, 탈회가 완료된 시점은 6시간이었으나, 염색시 절편의 상태는 고르지 못하였다. 반면 염색상태는 양호하게 나타났다(Table 2). 또한 8시간, 10시간, 12시간, 14시간, 24시간 동안 각각 탈회를 실시하여 탈회정도, 염색시 절편상태, 염색상태를 비교 관찰한 결과 탈회정도와 염색시 절편상태는 모두 양호하였으나, 염색상태에 있어서는 8시간, 10시간, 12시간까지는 양호한 결과를 나타냈지만 14시간 이후부터는 핵의 염색이 정상적인 청색을 나타내지 못하고 붉은 색을 띄기 시작하였다(Table 2, Fig. 3, 4).

3. 10 % Formic acid 용액과 초음파 탈회기인 DECAL기 사용법의 결과

고정된 뼈를 10 % formic acid에 담근 채 초음파 탈회기에 넣고 15 Hz, 45 Hz에서는 각각 6시간, 12시간, 24시

간 동안 탈회를 시키고, 90 Hz에서 4시간, 12시간, 24시간 동안 탈회를 시켜 탈회정도, 염색시 절편상태, 염색상태를 비교 관찰한 결과, 15 Hz에서는 6시간, 45 Hz에서는 6시간, 90 Hz에서는 4시간만에 탈회가 완료된 것으로 나타났다. 그리고 염색시 절편상태를 관찰한 결과 15 Hz의 경우 6시간만에 절편을 만들 수는 있었지만 절편상태가 양호하지는 않았으나, 염색상태는 양호한 것으로 나타났다. 그 이후 12시간, 24시간 동안 탈회시킨 경우에서는 탈회정도, 염색시 절편상태, 염색상태 모두가 양호한 것으로 나타났다(Table 3). 그리고 45 Hz와 90 Hz에서는 설정된 각 탈회시간별로 탈회정도, 염색시 절편상태, 염색상태 모두가 양호한 것으로 나타났다(Table 3, Fig. 5, 6).

4. 10 % formic acid 용액과 RHS-1기 사용법의 결과

고정된 뼈를 10 % formic acid에 담근 채 RHS -1기에 넣고, 진동수를 60 Hz로 조절한 다음, 온도를 37 °C, 45 °C, 60 °C로 설정하여 37 °C에서는 6시간, 12시간, 24시간 동안, 45 °C에서는 3시간, 6시간, 12시간 동안, 60 °C에서는 1시간, 5시간, 10시간 동안 탈회를 시켜 탈회정도, 염색시 절편상태, 염색상태를 비교 관찰한 결과, 37 °C에서

Table 2. Results of sections and stains in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid according to times in 60 °C paraffin oven

Time	6 hrs	8 hrs	10 hrs	12 hrs	14 hrs	24 hrs
Section	Bad	Good	Good	Good	Good	Good
Stain	Good	Good	Good	Good	Bad	Bad

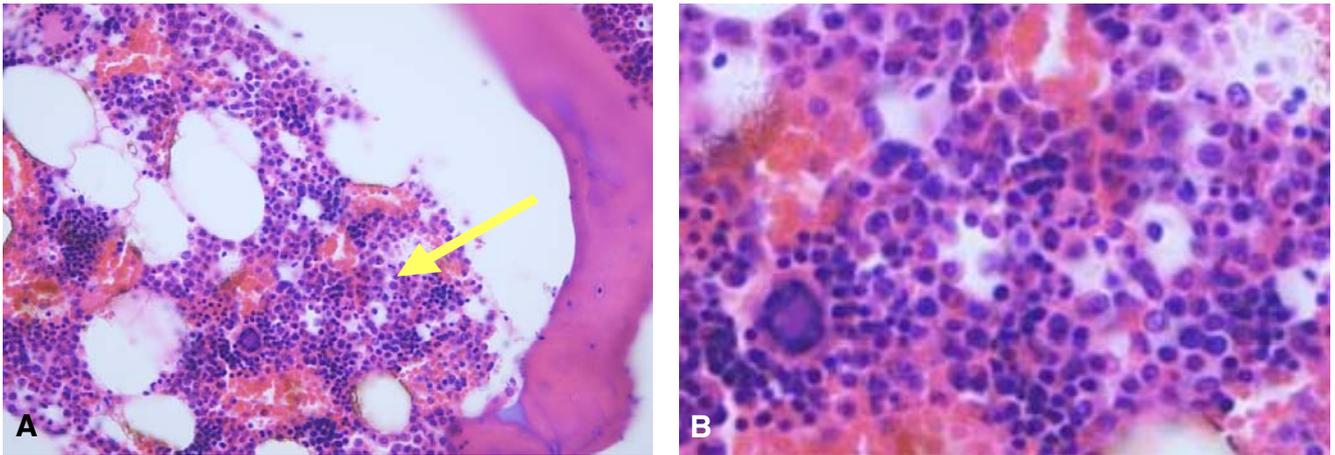


Fig. 3. Hematoxylin and eosin stainings in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid for 6 hours in 60 °C paraffin oven (H & E, A: × 100, B: × 400).

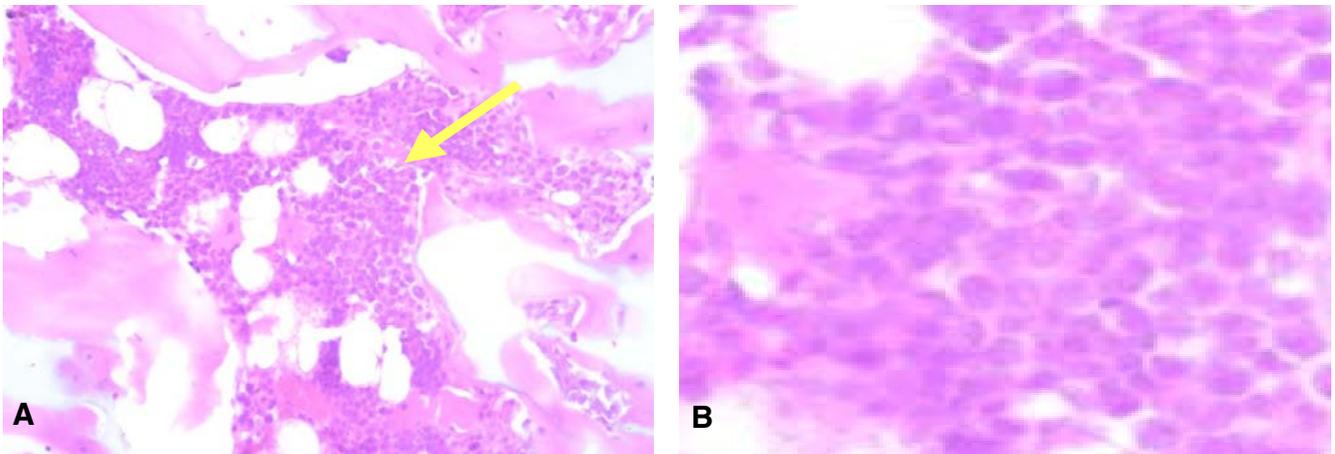


Fig. 4. Hematoxylin and eosin stainings in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid for 14 hours in 60 °C paraffin oven (H & E, A : ×100, B : ×400).

는 6시간만에, 45 °C에서는 3시간만에, 60 °C에서는 1시간만에 빠른 탈회가 이루어졌다. 37 °C의 경우 염색시 절편상태, 염색상태를 탈회 시간별로 비교 관찰한 결과, 6시간만에 탈회는 완료되었지만 염색시 절편상태는 좋지 않았다. 반면 염색상태는 양호한 것으로 나타났다. 그 이후 12시간, 24시간 동안 탈회를 시킨 경우에는 염색시 절편상태와 염색상태가 모두 양호한 것으로 나타났다 (Table 4). 45 °C로 설정된 경우 정해진 각각의 탈회 시간대별로 염색시 절편상태와 염색상태가 모두 양호한 것으로 나타났다 (Table 4). 그리고 60 °C로 설정된 경우 정해진 각각의 탈회 시간대별로 염색시 절편상태는 모두 양호하나 염색상태는 1시간에서 5시간까지는 양호하나 10시간부터는 핵의 염색성이 붉은색으로 나타나기 시작하였다 (Table 4, Fig. 7. 8).

IV. 고 찰

탈회 (decalcification)는 칼슘이 침착된 조직을 대상으로 칼슘을 제거하여 박절하기에 적합하도록 처리하는 과정으로 탈회액 (decalcifying fluid)이라 부르는 용액이 사용된다. 탈회액은 보통 산성용액이나 EDTA가 사용되는데 산은 조직내 칼슘과 반응하여 용해성 칼슘 형태로 바뀌며, EDTA는 칼슘이온과 선택적으로 결합하여 칼슘을 제거한다. 그리고 탈회액은 진단의 신속성, 칼슘의 침착 정도, 조사범위 및 사용될 염색법 등을 고려하여 적절하게 선택해야 한다 (제갈 등, 1998).

탈회제는 일반적으로 조직형태학적 관찰을 위한 산 탈회제 (acid decalcifier)와 조직화학적 관찰을 위한 탈회제로 분류한다. 산탈회제의 경우 근래 상품화하여 시판하고

Table 3. Results of section and stain in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid according to frequency and times in decal machine

Hz	15 Hz			45 Hz			90 Hz		
Time	6 hrs	12 hrs	24 hrs	6 hrs	12 hrs	24 hrs	4 hrs	12 hrs	24 hrs
Section	Bad	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good
Stain	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good

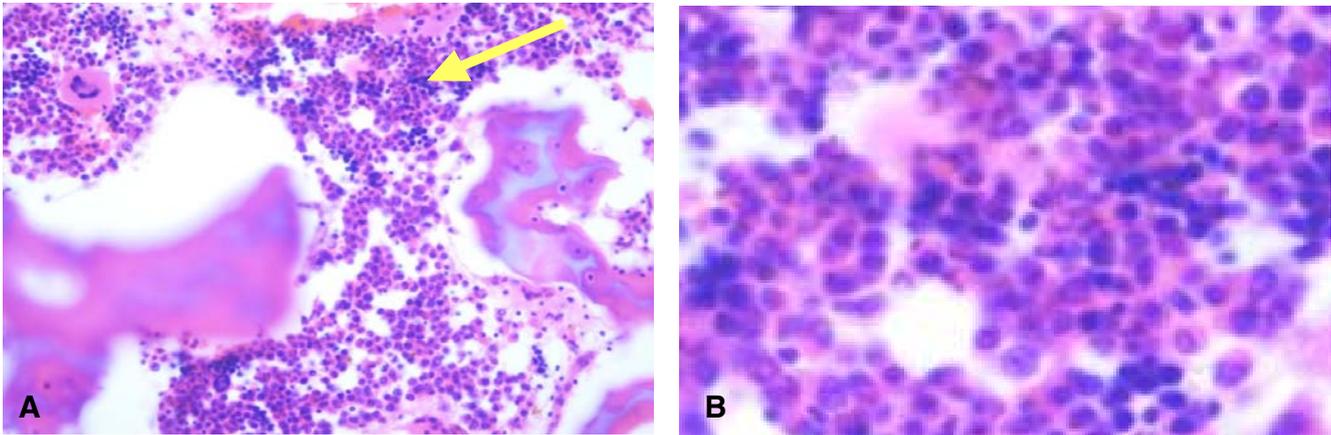


Fig. 5. Hematoxylin and eosin stainings in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid during to 6 hours in 45 Hz of decal machine (H & E, A: $\times 100$, B: $\times 400$).

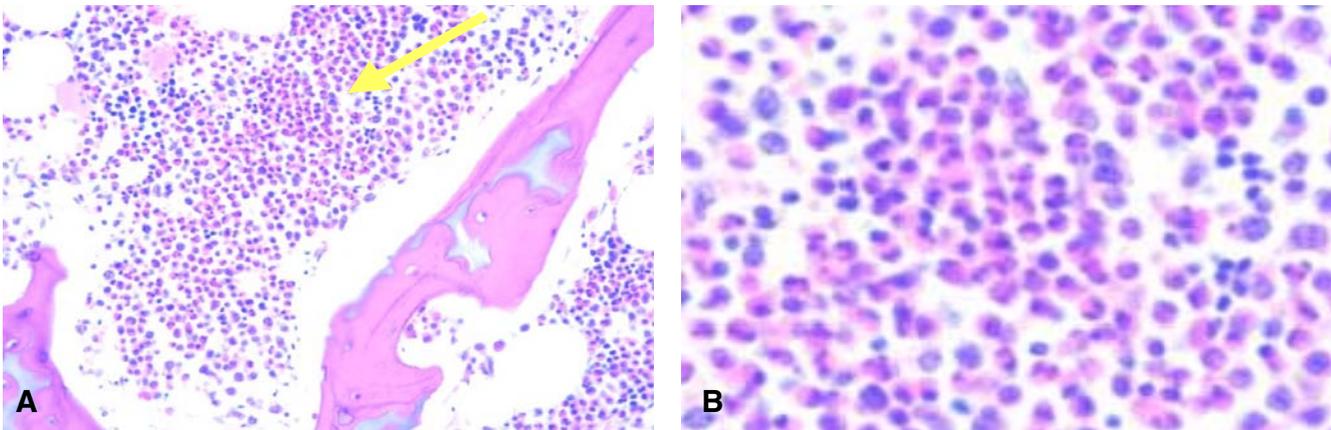


Fig. 6. Hematoxylin and eosin stainings in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid during to 4 hours in 90Hz of decal machine (H & E, A: $\times 100$, B: $\times 400$).

Table 4. Results of section and stain in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid according to temperature and times in RHS-1 machine

Temp.*	37 °C			45 °C			60 °C		
Time	6 hrs	12 hrs	24 hrs	3 hrs	6 hrs	12 hrs	1 hrs	5 hrs	10 hrs
Section	Bad	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good
Stain	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Bad

* Temp. : Temperature

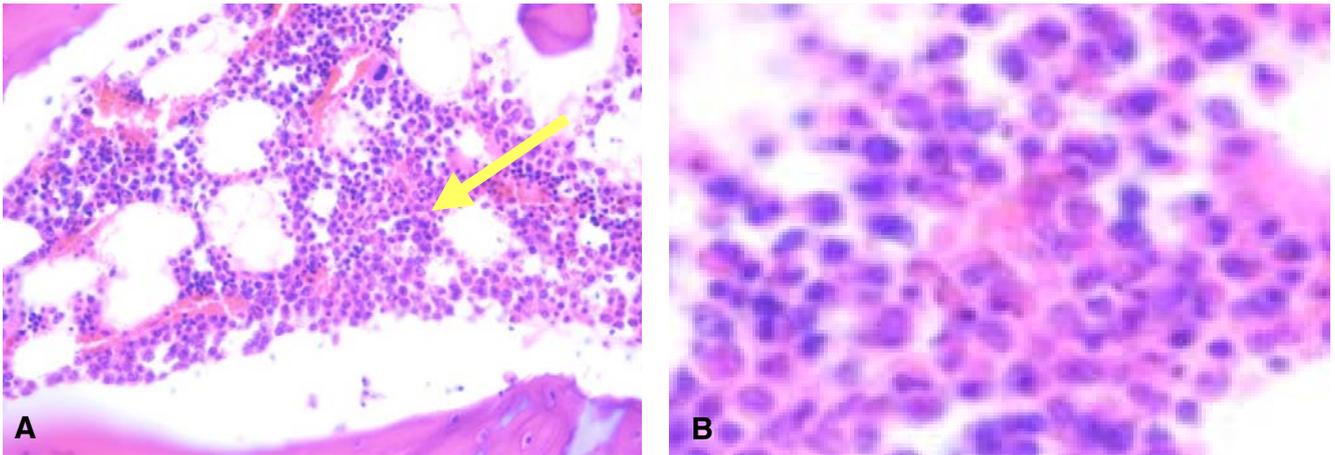


Fig. 7. Hematoxylin and eosin stainings in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid during to 1 hours in RSH-1 machine at 60 °C(H & E, A: × 100, B: × 400).

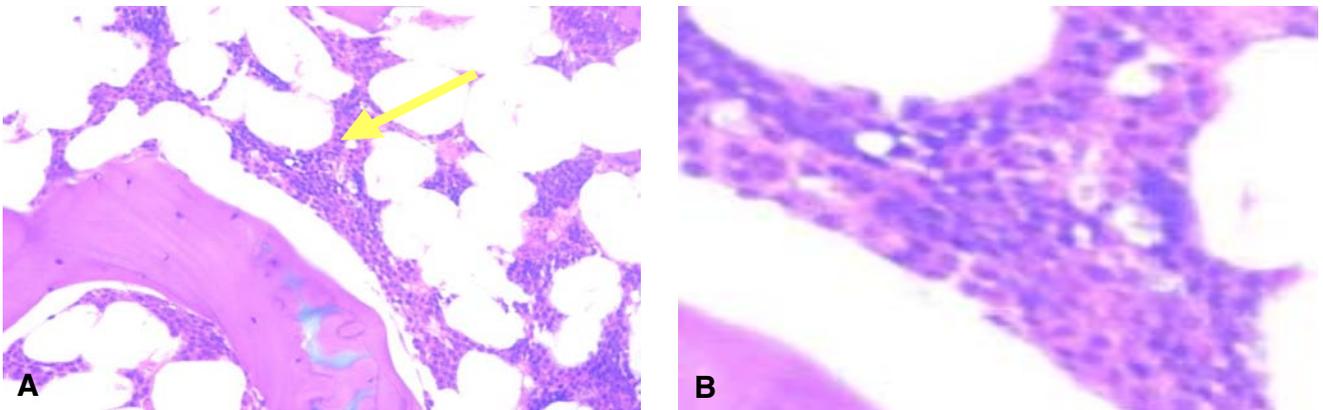


Fig. 8. Hematoxylin and eosin stainings in bone tissue to be decalcified by 10 % formic acid for 10 hours in RSH-1 machine at 60 °C (H & E, A: × 100, B: × 400).

있어서 사용이 편리하나 처방은 회사 비밀로 되어 있는 실정이다. 또한 조직화학적 목적에 사용되는 탈회제는 탈회 시간이 오래 걸리므로 신속한 진단에는 적합치 않다 (제갈 등, 1998).

뼈조직내 인산 또는 탄산 등의 음이온과 결합되어 있는 칼슘은 산과 반응하여 용해성 칼슘염을 형성하므로써 조직으로부터 제거된다. 한 예로 염산 탈회의 경우 뼈조직을 염산에 담그면 칼슘이 염소이온과 결합하여 용해성 염화칼슘으로 전환되어 탈회액내로 녹아 나오는 원리를 이용한 것이다 (이 등, 1995 ; 제갈 등, 1998).

본 실험은 산탈회제에 속하면서 조직손상이 가장 적은 것으로 알려진 10 % formic acid를 이용한 탈회법에 온도와 진탕의 일종인 진동의 조건을 달리하여 얼마나 빠른 시간 안에 조직의 손상 없이 탈회과정을 거쳐 빠른 진단에 활용할 수 있는지를 조사한 결과, 첫째, 실온에서 10

% formic acid 용액을 사용한 경우 탈회정도, 염색시 절편상태, 염색상태 등 모두가 양호한 결과를 얻으려면 적어도 12-24시간 이상 걸리는 것으로 나타나 10 % formic acid 용액을 실온에서 단독으로 사용하기는 너무 느려 합당치 않은 것으로 사료된다. 둘째, 60 °C의 열을 가해 10 % formic acid 용액으로 탈회를 실시한 경우 탈회정도, 염색시 절편상태, 염색상태 등 모두가 양호한 결과를 얻으려면 적어도 8-12시간 정도 걸리는 것으로 나타났으나, 14시간 이상에서는 염색상태가 나빠지는 것으로 나타났다. 이런 결과들은 첫째보다는 열을 가하면 탈회 시간을 많이 줄일 수 있는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과들은 산 탈회액에 의한 탈회속도는 온도가 높아지면 빨라지고 낮아질수록 지연되어 0 °C에서는 탈회가 잘 일어나지 않는 것으로 알려졌다. 이와 같이 온도에 따라 탈회가 영향을 받는 것은 온도가 조직의 이완 수축에 영향을 주기 때

문이라고 본다. 온도가 높을수록 조직이 이완되어 느슨해 지므로서 탈회액의 많은 양이 조직속으로 침투되어 탈회 반응이 신속하게 일어날 수 있고, 한편으로는 산과 칼슘의 화학반응이 열에 의해 가속화 될 수 있기 때문이라 하겠다. 탈회속도가 빨라지기는 하지만, 14시간 이상에서는 염색성이 나빠지는 것으로 나타났다. 그 이유는 온도 상승에 따라 조직의 구조변화와 더불어 염색성이 악화되는 일반적인 산 탈회법들의 단점, 예컨대, "산 탈회제의 경우 염기성염료의 염색성에 큰 장애를 초래하므로 methyl green-pyronin 염색과 같은 핵산 염색에 사용할 수 없고, H&E염색의 경우도 핵 염색성이 지나치게 붉게 나타나는 경향이 있으며, 매염을 위한 2차고정의 고정능을 저하시키는 요인이 되기도 한다"는 것과 대동소이한 결과라 하겠다 (제갈 등, 1998).

셋째, 10% formic acid 용액과 초음파 탈회기인 DECAL기를 사용한 경우 45 Hz와 90 Hz에서는 각각 6시간과 4시간만에 탈회정도, 염색시 절편상태, 염색상태 모두가 양호한 것으로 나타났다 (Table 3). 이는 탈회 속도가 온도보다는 진탕에 더 많은 영향을 받고 있음을 시사하는 것이라 여겨진다. 이는 초음파 발생기 (ultrasonic generator)에서 발생한 진동에 의한 교반현상에 의해 탈회액이 빠조속내로 보다 빠르고, 고르게 침투되어 탈회작용이 빨라지는 것이라 생각된다. 특히 microwave를 가한 탈회방법에서 nitric acid를 사용하면 조직의 심한 변성이 생기지만 formic acid를 사용하면 조직의 변성을 줄일 수 있고, 쥐의 와우각 (cochleas)에 microwave를 이용한 탈회를 실시하면 14개월 걸리던 탈회기간을 2-6주로 단축할 수 있다는 보고도 있다 (Hellstrom와 Nillson 등, 1992). 더구나 면역조직화학염색을 실시할 때 microwave oven에 넣고 탈회를 실시하면 결과가 양호하게 나타나는 것으로 알려져 있다 (Keithley 등, 2000).

넷째, 10% formic acid 용액과 magnetic bar을 이용해 60 Hz로 조절된 RHS-1기 (Milestone srl, Italy)를 사용한 경우 탈회는 37 °C에서는 6시간만에, 45 °C에서는 3시간만에, 60 °C에서는 1시간만에 빠른 탈회가 이루어졌다. 염색시 절편상태와 염색상태에 있어서는 37 °C의 경우 6시간만에 탈회는 완료되었지만 염색시 절편상태는 좋지 않았으나, 염색상태는 양호한 것으로 나타났다 (Table 4.). 45 °C의 경우 3시간, 6시간, 12시간 탈회시간대 별로 염색시 절편상태와 염색상태가 모두 양호하였다. 60 °C의 경우 염색시 절편상태는 1시간, 5시간, 10시간 탈회시간대 별로 모두 양호하지만 염색상태는 10시간대에 있어서는

핵의 염색성이 붉은색으로 나타나기 시작하였다 (Table 4, Fig. 7, 8).

위와 같은 결과에서 보면 온도와 진탕 (진동)을 함께 가하면 탈회 시간을 상당히 줄일 수 있어 신속한 진단에 매우 유용하게 활용할 수 있을 것으로 본다. 그리고 이와 같은 현상은 위에서 언급한 바와 같이 탈회액의 교반현상으로 인해 골표면에 탈회액의 접촉 증가와 동시에 조직내로의 침투촉진에 의한 것이고, 또한 온도에 의한 조직이완과 탈회화학 반응 촉진에 의한 것이라 생각된다.

본 실험을 통해 막연한 탈회 촉진을 위한 가온이나 진탕이 아니라 정확한 온도와 진동수를 알 수 있게 되었고, 나아가 RHS-1을 이용함이 신속한 진단을 환자에게 알려 주고, 치료할 수 있게 하는 신속한 의료서비스 차원에 한 방법이라 여겨진다.

V. 결 론

본 실험의 네가지 방법을 통해 60 °C와 60 Hz로 가온 진탕하면 탈회 시간을 1시간으로 줄일 수 있을 뿐만 아니라 박절시 절편의 상태와 염색상태도 양호한 표본을 얻을 수 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서 탈회기로는 가온과 진탕을 동시에 할 수 있는 RHS-1기와 같은 탈회기를 사용하는 것이 신속한 임상진단에 도움이 되리라 여겨진다.

참 고 문 헌

1. Glockner R, Pleul J. Decalcification by ultrasound and acid in a histological routine laboratory. *Zentralbl Allg Pathol* 127(1-2):51-5, 1983
2. Lynch MJ, Raphael SS, Mellor LD, Spare PD, Inwood MJH. Medical laboratory technology and clinical pathology 2nd ed. p1052-1054, WB Saunders Co., Philadelphia, 1969
3. Matthews JB. Influence of decalcification on immunohistochemical stain of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Clin Path* 35:1392, 1982
4. Matthew JB, Mason G. Influence of decalcifying agents on immunoreactivity of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Histochem J* 16: 771, 1984

5. Mukai K, Yoshimura S, Anzai M. Effect of decalcification immunoperoxidase staining. *The Am J Surg Path* 10(6):413, 1986
6. Mullink H, Henzen -Logmans SC, Tadema TM, Mol JJ, Meijer CJL. Influence of fixation and decalcification on the immunohistochemical staining of cell-specific markers in paraffin-embedded human bone biopies. *J Histochem Cytochem* 33:1103, 1985
7. Roncaroli F, Mussa B, Bussolati G. Microwave oven for improved tissue fixation and decalcification. *Pathologica* 83(1085):307-10, 1991
8. Sanderson C, Radley K, Mayton L. Ethylenediaminetetraacetic acid in ammonium hydroxide for reducing decalcification time. *Biotech Histochem* 70(1):12-8, 1995
9. Tortel MC, Casiraghi O, Krzisch S, Straub P. Decalcification of bone specimens by ultrasound in histopathology. *Arch Anat Cytol Pathol* 36(4):178-80, 1988
10. Von der Valk P, Mullink H, Huijgens PC, Tadema TM, Vos W, Meijer CJLM. Immunohistochemistry in bone marrow dignosis. *Am J Sur Patho* 13(2):97, 1989
11. Witter K, Matulova P, Misek I. The effects of two different decalcification procedures on size and structure of embryonic epithelial tissue in objects prepared for light microscopy. *Anat Histol Embryol*, 29(6):351-355, 2000
12. 이선희. 질향상 활동의 성공요인. *대한병원협회지* 7: 51-57, 2003
13. 이재택, 김수성, 박기화, 이진숙, 장순철. 병리조직검 사학. p11-18, 고문사, 서울, 1995
14. 장진영, 여진영, 김철홍, 양경숙. Histo wave를 이용한 골조직 탈회시간 단축. *조직세포검사학회지* 99:2-6. 2002
15. 제갈승주, 민병운, 김성민, 이명환, 임형선, 장병수, 광성규, 심재환, 김태전, 김홍두, 신용칠, 김주성. *조직 검사학* 제1판. p192-195, 고려의학, 서울, 1998