



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0141334
(43) 공개일자 2015년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 1/28 (2006.01) G01B 15/00 (2006.01)
G01N 23/00 (2006.01) G01N 23/225 (2006.01)
H01J 37/26 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0069883

(22) 출원일자 2014년06월10일

심사청구일자 2014년06월10일

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

(72) 발명자

권건영

대구광역시 수성구 달구벌대로 2435, 103동 1201호(두산위브더제니스아파트)

김영호

대구광역시 달서구 송현로7길 9, 2107동 602호(상인화성파크드림)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 13 항

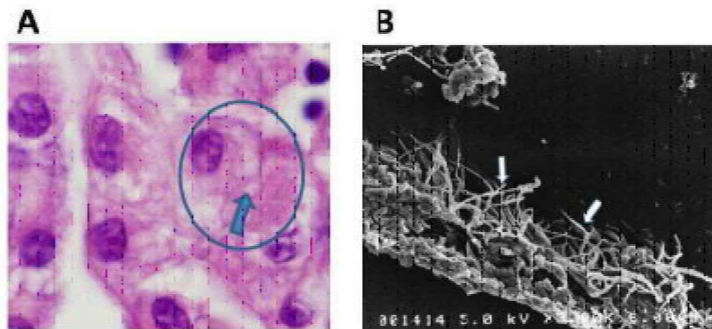
(54) 발명의 명칭 신규 악성종괴종 진단용 파라핀 조직을 포함한 병리검체의 주사전자현미경 관찰을 위한 시료 제작방법

(57) 요약

본 발명은 신규 악성종괴종 진단용 파라핀 조직을 포함한 병리검체의 주사전자현미경 관찰을 위한 시료 제작방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 종양 세포 사이에 위치하는 미세융모 관찰을 통해 악성종괴종을 정확하게 진단하기 위한 종양의 진단용 파라핀 조직을 포함한 병리검체의 주사전자현미경 관찰을 위한 시료 제작 방법에 관한 것

(뒷면에 계속)

대표도 - 도3



이다. 본 발명에 의하면, 종양 조직의 파라핀 잔여 조직을 활용하여 짧은 시간에 손쉽게 조직 검사용 시료를 제작할 수 있다. 통상적인 방법으로 제작된 파라핀 조직을 광학현미경으로 관찰하였을 때 해상력의 한계(20배~1,000배)로 종양 세포들 틈에 희미하게 관찰되는 부위를 해상력이 우수한 주사전자현미경으로 관찰(1,000배~10,000배)하면 가늘고 길다란 미세융모를 선명하게 관찰이 가능하므로, 다른 악성종양세포들과 감별이 가능하며, 특히 면역조직화학염색 결과가 모호할 경우 파라핀 잔여조직을 활용하여 주사전자현미경관찰을 위한 조직 제작과정을 거쳐서 특징적인 미세융모의 형태를 확인함으로써 악성종괴중 진단에 유용하게 활용이 가능할 것이다.

명세서

청구범위

청구항 1

- (A) 파라핀 포매 된 진단용 조직을 유리 슬라이드에 고정시킨 후 탈파라핀 하는 단계;
- (B) 상기 탈파라핀 한 조직을 에탄올을 사용하여 함수시키는 단계;
- (C) 상기 함수된 조직을 그루탈알데하이드(Glutaldehyde)를 이용하여 전고정시키는 단계;
- (D) 상기 전고정된 조직을 OsO₄를 이용하여 후고정시키는 단계;
- (E) 상기 후고정된 조직을 탈수시키는 단계;
- (F) 상기 탈수된 조직에 이소아밀 아세테이트(isoamyl acetate)를 치환시키는 단계;
- (G) 상기 이소아밀 아세테이트가 치환된 조직을 임계점에서 건조시키고, 은분을 고정시키는 단계; 및
- (H) 상기 은분이 고정된 시료 표면을 Pt-Pd로 증착시키는 단계;를 포함하는 악성종피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (C) 단계의 전고정 및 (D) 단계의 후고정 단계가 종료된 후, 각각 0.1M 인산완충액에 10분간 담구어 세척하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 악성종피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (A) 단계의 진단용 조직은 파라핀 포매 후 3~6 μ m의 절편으로 세절하여 사용하는 것을 특징으로 하는 악성종피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (A) 단계의 탈파라핀 과정은 자일렌(Xylene)에 상기 유리 슬라이드를 실온에서 2~10분씩 4회 담구어 진행되는 것을 특징으로 하는 악성종피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (B) 단계의 에탄올 함수는 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 에탄올 및 증류수에 상기 유리 슬라이드를 각각 실온에서 2~10분씩 담구어 진행되는 것을 특징으로 하는 악성종피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (E) 단계의 탈수 과정은 70%, 80%, 90% 및 95% 및 100% 에탄올(2회)에 각각 실온에서 2~10분씩 담구어 진행되는 것을 특징으로 하는 악성종피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (F) 단계의 이소아밀 아세테이트(isoamyl acetate)를 치환시키는 과정은 상온에서 5~15분간 반응시키는 것을 특징으로 하는 악성중피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (F) 단계의 이소아밀 아세테이트는 t-부틸 알코올로 대체 가능하고, 상기 t-부틸 알코올을 사용하는 경우, 상기 치환시키는 과정은 30~40℃에서 20~40분간 반응시키는 것을 특징으로 하는 악성중피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 (H) 단계의 Pt-Pd로 증착시키는 과정은 금속이온 증착기를 이용하여 5~10nm 두께로 증착시키는 것을 특징으로 하는 악성중피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 (D) 단계의 후고정 후,

(D-1) 2% 탄닌산(tannic acid)을 이용하여 실온에서 20~40분간 반응시키는 전도염색 단계; 및

(D-2) 상기 전도염색한 샘플을 1% OsO₄로 고정시키는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 악성중피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (D-1) 단계의 전도염색 및 (D-2) 단계의 고정이 종료된 후, 각각 0.1M 인산완충액에 10분간 담구어 세척하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 악성중피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항의 어느 한 항에 있어서,

상기 조직 시료는 주사전자현미경으로 관찰하기 위한 시료인 것을 특징으로 하는 악성중피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 조직 시료 제작 방법은 악성 중피종 종양 세포 사이의 미세융모를 관찰하기 위한 방법인 것을 특징으로 하는 악성중피종 진단용 조직 시료 제작 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 신규 악성중피종 진단용 파라핀 조직을 포함한 병리검체의 주사전자현미경 관찰을 위한 시료 제작 방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 종양 세포 사이에 위치하는 미세융모 관찰을 통해 악성중피종을 정확하게 진단하기 위한 종양의 진단용 파라핀 조직을 포함한 병리검체의 주사전자현미경 관찰을 위한 시료 제작 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

중피종은 주로 폐를 둘러싸고 있는 흉막, 위나 간 등을 보호하는 복막, 심장을 싸고 있는 심막 등의 표면을 덮

고 있는 중피세포에서 많이 발생한다. 흉막중피종, 복막중피종, 심막중피종 등이 있으며, 양성과 악성으로 나눌 수 있다. 모든 양성 중피종은 국소성이고, 악성 중피종은 한 곳에 덩어리를 형성하는 국소성과 흉막이나 복막을 따라서 스며들듯이 미만성으로 자라는 특징이 있다. 악성중피종은 드물지만 예후가 좋지 않으며, 그 원인의 대부분은 장기간 석면노출로 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 양성 중피종은 증세가 별로 나타나지 않는데, 드물게 종괴가 커진 경우에는 흉통·기침이 일어나거나 폐와 심장을 압박하여 호흡곤란 증세가 나타나기도 한다. 악성 중피종은 흉막에 발생하면 흉수가 고이기 때문에 호흡곤란·흉통이 일어나고, 복막에 발생하면 고인 복수 때문에 복부팽만 증세 등이 나타난다. 양성 중피종은 수술을 통해 거의 완치할 수 있지만 치료를 해도 그 예후가 좋지 않은 악성 중피종은 외과적 수술, 방사선요법, 항암제를 투여하는 화학요법, 유전자치료법 등을 이용하여 치료한다.

[0004] 악성중피종(malignant mesothelioma) 환자는 석면의 장기 노출로 발생하며, 기타 직업적 환경 또는 생활 환경 노출에 의해 야기되는데, 최근에는 정부 주관으로 석면노출에 의한 악성중피종 환자에 대해 보상하는 제도가 마련되어 환경처 환경공단에서 석면피해판정위원회, 석면피해구제위원회 등을 통해 심사를 거쳐 구제 신청된 증례들에서 악성중피종으로 인정을 하면 환자가 정부로부터 보상을 받고 있는 실정이다. 따라서 악성중피종을 정확히 진단하는 것이 중요하다. 악성중피종 진단을 위해선 통상적인 광학현미경 관찰로 소견이 비슷한 타 종류의 암들과 감별 진단이 필요하다.

[0005] 한편, 조직 검사는 진단 의학 분야에 있어서 매우 중요한 위치를 차지할 뿐 아니라 임상에서 이루어지는 질병진단의 최종적인 결정을 내리는 중요한 역할을 한다. 병리조직검사는 질병이 나타나는 인체조직을 떼어내어 광학현미경 관찰을 통해 암 등의 질병의 질환명을 결정하는 검사이다. 조직 검사는 다른 임상병리학적 방법과는 달리 조직의 형태학적 변화를 관찰하여 판단하는데 기초를 두고 있다. 오늘날에는 객관적인 데이터에 대한 필요성이 대두되어, 정확한 조직 검사 결과를 얻기 위한 많은 노력이 이루어지고 있으며, 이를 위해서, 다양한 특수한 방법들이 개발되고 있다.

[0006] 특히, 근래에는 객관적 진단의 정확성을 높이기 위해 면역조직화학 염색(immunohistochemistry), 특수 염색, 분자 병리 검사 방법들이 대거 등장하고 있다. 종양의 정확한 진단과 적절한 치료에 대한 연구를 하기 위해서는 종양 병소에서 채취한 검체의 형태학적 소견을 정확하게 관찰하는 것이 중요하다. 이러한 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 연구자들은 기본적으로 헤마톡시린-에오진 염색표본을 이용하고 있다. 그러나, 각종 종양은 점차 세분화되고, 새로운 진단 기술이 개발되고 있으며, 종양의 진단에 도움을 주는 종양표시자, 예후를 판정할 수 있는 예후인자들이 알려지고 있어서 통상적인 헤마톡시린-에오진 염색표본으로는 진단에 필요한 종합적인 정보를 얻기가 어렵다. 이러한 문제점들을 보완해주는 검사방법이 면역조직화학 염색법이다. 면역조직화학염색법은 미분화세포의 기원을 확인해 주거나, 효소, 호르몬, 종양표시자 및 예후인자의 존재 유무, 암종과 육종의 구별 및 양성종양과 악성종양의 감별, 전이암의 원발병소를 추정하는데 효율적으로 이용되고 있다. 면역조직화학염색은 민감성과 특이성이 매우 높은 검사법으로 최근 20-30년 사이 진단병리학과 형태학적 연구 등에 필수적인 검사법으로 이용되고 있다.

[0007] 악성중피종 진단을 위해서도 이와 같은 면역조직화학염색이 널리 실시되고 있으나 결과가 애매모호한 경우가 있으며, 이런 경우 악성중피종 확진이 어렵다는 문제점이 있다. 이런 환자에서 병리조직검사 중 만들어지는 파라핀 잔여 조직편을 사용하여 주사전자현미경 검사를 할 경우 악성중피종 세포표면에 존재하는 특징적인 미세융모 소견을 확인함으로써 악성중피종을 확진할 수 있다. 그러나 악성중피종 진단을 위해 파라핀블록 검체를 활용한 주사전자현미경의 진단 제작기법이나 진단 기준이 아직 보고되어 있지 않은 실정이다.

[0008] 이에 본 발명자들은, 악성중피종 확진을 위해 진단용 병리검체를 사용하여 악성중피종 종양세포들 사이의 틈새에 관찰되는 미세융모를 주사전자현미경으로 관찰하기 위한 시료제작 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제2009-97068호
(특허문헌 0002) 일본 공개특허공보 제2007-046988호
(특허문헌 0003) 대한민국 공개특허공보 제2005-46826호

(특허문헌 0004) 국제 공개특허공보 WO 08/038813호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 종양 세포들 틈에 관찰되는 미세용모의 특징적인 형태에 기초하여 종양 세포를 명확히 구분할 수 있는 악성종피종 진단용 병리검체의 주사전자현미경 관찰용 시료 제작방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, (A) 파라핀 포매 된 진단용 조직을 유리 슬라이드에 고정시킨 후 탈파라핀 하는 단계; (B) 상기 탈파라핀 한 조직을 에탄올을 사용하여 함수시키는 단계; (C) 상기 함수된 조직을 그루탈알데하이드(Glutaraldehyde)를 이용하여 전고정시키는 단계; (D) 상기 전고정된 조직을 OsO₄를 이용하여 후고정시키는 단계; (E) 상기 후고정된 조직을 탈수시키는 단계; (F) 상기 탈수된 조직에 이소아밀 아세테이트(isoamyl acetate)를 사용하여 치환시키는 단계; (G) 상기 이소아밀 아세테이트가 치환된 조직을 임계점에서 건조시키고, 은분을 고정시키는 단계; 및 (H) 상기 은분이 고정된 시료 표면을 Pt-Pd로 증착시키는 단계;를 포함하는 종양 진단용 조직 제작 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 종양 진단용 조직 제작 방법은 상기 (C) 단계의 전고정 및 (D) 단계의 후고정 단계가 종료된 후, 각각 0.1M 인산완충액에 10분간 담구어 세척하는 단계를 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (A) 단계의 진단용 조직은 파라핀 포매 후 3~6 μ m의 절편으로 세절하여 사용할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (A) 단계의 탈파라핀 과정은 자일렌(Xylene)에 상기 유리 슬라이드를 실온에서 2~10분씩 4회 담구어 진행할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (B) 단계의 에탄올 함수는 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 에탄올 및 증류수에 상기 유리 슬라이드를 각각 실온에서 2~10분씩 담구어 진행할 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (E) 단계의 탈수 과정은 70%, 80%, 90% 및 95% 및 100% 에탄올(2회)에 각각 실온에서 2~10분씩 담구어 진행할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (F) 단계의 이소아밀 아세테이트(isoamyl acetate)를 사용하여 치환시키는 과정은 실온에서 5~15분간 반응시킬 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (F) 단계의 이소아밀 아세테이트 대신 t-부틸 알코올로 치환이 가능하고, 상기 t-부틸 알코올을 사용하여 치환시키는 과정은 30~40℃에서 20~40분간 반응시킬 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (H) 단계의 Pt-Pd로 증착시키는 과정은 금속이온 증착기를 이용하여 5~10 nm 두께로 증착시키는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 종양 진단용 조직 염색 방법은 상기 (D) 단계의 후고정 후, (D-1) 2% 탄닌산(tannic acid)을 이용하여 실온에서 20~40분간 반응시키는 전도염색 단계; 및 (D-2) 상기 전도염색한 샘플을 1% OsO₄로 고정시키는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (D-1) 단계의 전도염색 및 (D-2) 단계의 고정이 종료된 후, 각각 0.1M 인산완충액에 10분간 담구어 세척하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조직 시료는 주사전자현미경으로 관찰하기 위한 시료일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조직 제작 방법은 악성 종피종의 종양 세포 사이의 미세용모를 관찰하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 의하면, 종양의 파라핀 잔여 조직을 활용하여 짧은 시간에 손쉽게 조직 검사용 시료를 제작할 수 있

고, 종래의 방법으로 조직을 광학현미경으로 관찰하였을 때 종양 세포들 틈에 존재하는 미세융모를 현미경의 해상력 한계로 분명히 관찰할 수 없으나, 주사전자현미경으로 관찰하면 선명하게 미세융모 관찰이 가능하므로, 다른 악성종양들과 감별이 가능하고, 특히 길고 가느다란 미세융모의 특징적인 형태를 확인함으로써 악성종피종을 정확히 진단하는데 이 방법을 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025]

도 1은 정상 중피세포(A)와 악성 중피종 세포(B)의 사진으로 전이성 암세포(C)와 달리 종양세포 표면의 길고 가느다란 형상의 미세융모의 존재를 잘 보여준다.

도 2는 악성 중피종 세포 사이의 틈새에 관찰되는 미세융모를 확인하기 위하여, 병리진단용으로 만든 파라핀 블록을 활용하여 세절한 조직편(A)과, 주사전자현미경 관찰을 위하여 조직편이 부착된 유리슬라이드를 유리칼로 트리밍한 유리 슬라이드(B)를 나타내는 사진이다.

도 3은 본 발명에 따른 시료를 이용하여 광학현미경에서 악성 중피종 세포 사이의 틈새(A)를 관찰하며, 주사전자현미경 관찰로 이 부위에 존재하는 많은 미세융모(B)를 확인한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026]

본 발명은 종양 진단용 병리검체의 제작 방법을 제공한다.

[0027]

본 발명에서 사용되는 "종양"이란 용어는 세포 성장의 비제어적, 비체계적 증식현상으로, 인간 또는 동물 신체의 임의의 양성 또는 악성 종양을 포함한다. 종양은 침략적이며 전이의 성질을 가질 때 악성 또는 암성이라 한다. 침략적이란 종양이 조직의 방어벽을 형성하는 기본 기저층을 뚫고 주변 조직으로 침투하여 인체의 순환계로 들어가는 경향을 말한다. 전이란 종양이 다른 영역으로 이동하여 초기 발생부위로부터 떨어져 나와 증식 영역을 형성하는 경향을 말한다.

[0028]

본 발명에서 사용되는 "진단"이라는 용어는 분자적 또는 병리학적 상태, 질환 또는 병증을 확인하는 것, 예컨대, 악성 중피종을 확인하는 것을 의미하거나, 또는 특정 치료 요법으로부터 이익을 얻을 수 있는 악성 중피종 환자를 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 한 실시 양태에서, 진단이란 종양세포 표면에 존재하는 가늘고 길다란 미세융모를 확인함으로써 악성중피종을 진단하는 것을 의미한다.

[0029]

본 발명에서 사용되는 "실온"이라는 용어는 실내의 대기온도로, 15~25℃ 전후를 의미한다.

[0030]

본 발명자들은 종양 진단을 위하여 널리 실시되고 있는 면역조직화학 염색에서 그 결과가 모호한 경우가 많아 종양 진단의 확신이 어렵다는 점에 착안하여, 병리조직검사 중 만들어지는 파라핀 잔여 조직편을 이용하여 주사전자현미경으로 관찰할 때 특정 종양에 특징적으로 나타나는 미세융모 소견을 보다 정확히 확인할 수 있는 시료 제작 기법을 연구하던 중 본 발명을 완성하였다.

[0031]

본 발명에 따른 종양 진단용 파라핀 병리검체를 제작하기 위한 방법을 상세히 살펴보면, 우선, 주사전자현미경 검사를 할 증례의 조직을 통상적인 방법으로 포르말린 고정 후 파라핀 포매하고 3~6 μ m절편으로 세절하여 유리슬라이드에 올려 염색 관독용 단일 조직 슬라이드를 제작한다. 이후, Xylene이 담겨진 Coplin jar에 상기 유리슬라이드를 넣은 후 실온에서 약 2~10분씩 3~5회, 바람직하게는 5분씩 4회 반응시키는 탈파라핀 과정을 진행한다. 다음으로, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 에탄올 및 증류수에 상기 유리 슬라이드를 각각 약 2~10분씩, 바람직하게는 5분씩 실온에서 담구어 함수시킨다. 이후 2.5% 그루탈알데하이드 용액을 이용하여 샘플을 20~40분, 바람직하게는 30분간 전고정 하고, 이후, 상기 전고정된 샘플을 0.1M 인산완충액에 5~15분, 바람직하게는 10분간 담구어 세척한다. 그 다음으로, 샘플을 1% OsO₄를 이용하여 후고정 시키는데, 20~40분, 바람직하게는 30분간 반응을 진행시킨다. 이후, 상기 후고정된 샘플을 5~15분, 바람직하게는 10분간 담구어 세척한다. 상기 세척된 샘플을 70%, 80%, 90% 및 95% 및 100% 에탄올(x 2회)에 각각 약 2~10분씩, 바람직하게는 5분씩 실온에서 담구어 탈수한다. 이후 상기 탈수된 샘플을 Isoamyl acetate를 사용하여 실온에서 약 5~15분, 바람직하게는 10분간 반응시킨다. 이 경우, 이소아밀아세테이트 대신 t-부틸 알코올을 사용할 수 있으며, 이 경우에는 30~40℃에서 20~40분간 반응시키며, 특히 37℃에서 30분간 반응시키는 것이 바람직하다. 상기 침투 단계를 마친 후, 유리슬라이드에 부착된 종양 부분을 유리칼로 트리밍하고, 임계점건조기(Critical point dryer)를 사용하여 임계점 건조시킨 후, 시료대에 은분을 사용하여 시료를 고정한다. 이 경우, 임계점건조기 대신 동결 건조기를 사용할 수 있으며, 이 경우에는 100~140분간 건조시키는 것이 바람직하고, 120분간 건조시키는 것이 특히 바람직하다. 이후 금속이

은 증착기에 Pt-Pd를 사용하여 은분이 고정된 시료 표면을 5~10 nm 두께로 이온 증착하고, 상기 이온 증착된 샘플을 주사전자현미경을 사용하여 가속전압 10KV로 관찰한다.

한편, 본 발명에 있어서, 파라핀 병리조직을 사용한 주사전자현미경 관찰용 시료는 병리검체 중 세포진 침전물을 활용한 세포 블록(cell block)에서도 동일하게 적용할 수 있다.

본 발명에 따른 종양 진단용 파라핀 병리검체의 처리 방법과 제작의 각 단계에 소요되는 시간을 간략히 요약하면 하기 표와 같다.

표 1

순서	제작과정	시간(분)
1	탈파라핀	20
2	계열 알코올로 함수(95~55%)	30
3	2.5% 그루타알데하이드 전고정	30
4	0.1M phosphate buffer 세척	10
5	1% OsO ₄ 후고정	30
6	0.1M phosphate buffer 세척	10
7	계열 알코올로 탈수(50~95%)	30
8	이소아밀 아세테이트(또는 t-부틸 알코올)로 침투	10(30)
9	임계점 건조(또는 동결건조기로 건조)	60(120)
10	Pt-Pd로 증착	30
총 소요시간		260(340)

상기 표 1에서 볼 수 있듯이 본 발명에 따른 방법으로 종양 진단용 파라핀 조직 시료를 사용하여 제작하면 총 소요시간이 260분에 불과하여, 매우 빠르고 간단하게 주사전자현미경 관찰용 시료제작 과정을 수행할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 표 1에 기재된 방법 외에도 전도염색을 추가로 수행하여 시료를 제작할 수 있는데, 이는 상기 OsO₄ 후고정 후 세척 단계를 거친 후, 하기와 같은 추가 과정을 거칠 수 있다.

전도염색을 위해서 상기 후고정 후 세척한 샘플을 2% 탄닌산(Tannic acid)을 이용하여 실온에서 20~40분, 바람직하게는 30분간 반응시킨다. 이후 상기 전도염색한 샘플을 0.1M 인산완충액으로 약 10 여분 간 세척한다. 그 다음, Osmium tetroxide (Merck 회사, 독일) 1g을 증류수 50mL에 녹인 용액과 0.1M 인산완충액과 동량으로 희석한 후 상기 용액에 상기 세척된 샘플을 20~40분, 바람직하게는 30분간 담구어 고정한다. 이후 상기 후고정된 샘플을 0.1M 인산완충액에 약 10 여분 간 담구어 세척한다.

상기와 같은 전도염색을 통하여 약 80여분의 시간이 추가로 소요되지만, 이와 같은 전도염색 과정을 거치는 경우 종양 조직의 샘플, 특히 종양 조직 세포 표면의 미세용모를 더욱 명확하게 관찰할 수 있는 장점이 있다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<실시예 1>

악성종괴종 진단을 위한 파라핀 조직 시료 제작 방법

1 단계: 슬라이드 제작

- [0043] 악성종괴종 진단을 위해 주사전자현미경검색을 할 증례의 조직을 통상적인 방법으로 포르말린 고정 후 파라핀 포매하고 4~5 μ m 절편으로 세절하여 유리슬라이드에 올려 염색 판독용 단일 조직 슬라이드를 제작하였다.
- [0044] 2 단계: 탈파라핀(20분)
- [0045] 이후, Xylene(Junsei, 일본)이 담겨진 Coplin jar에 상기 유리슬라이드를 넣은 후 실온에서 5분씩 4회 반응시키는 탈파라핀 과정을 진행한다.
- [0046] 3 단계: 계열 에탄올 함수(30분)
- [0047] Ethanol (Merck, 독일)을 사용하며, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 에탄올 및 증류수에 상기 유리 슬라이드를 각각 5분씩 실온에서 담구어 함수시킨다.
- [0048] 4 단계: 2.5% 그루탈알데하이드 전고정(30분)
- [0049] 25% Glutaraldehyde (Merck, 독일) 10mL에 0.1M 인산완충액 90mL을 넣고 희석(2.5% 그루탈알데하이드 용액)하여 샘플을 30분간 전고정 한다. 이 때, 0.1M 인산완충액(0.1M phosphate buffer, pH 7.4)은, Sodium phosphate, monobasic (Junsei, 일본) 15.6g을 증류수 1L에 녹인 A용액 190ml와 Sodium phosphate, dibasic (Junsei, 일본) 14.2g을 증류수 1L에 녹인 B용액 810mL를 섞어 제조한다.
- [0050] 5 단계: 세척(10분)
- [0051] 이후, 상기 전고정된 샘플을 0.1M 인산완충액에 10분간 담구어 세척한다.
- [0052] 6 단계: 1% OsO₄ 후고정(30분)
- [0053] Osmium tetroxide (Merck 회사, 독일) 1g을 증류수 50mL에 녹인 용액과 0.1M 인산완충액과 동량으로 희석한 후 상기 용액에 상기 세척된 샘플을 30분간 담구어 후고정한다.
- [0054] 7 단계: 세척(10분)
- [0055] 이후, 상기 후고정된 샘플을 0.1M 인산완충액에 10분간 담구어 세척한다.
- [0056] 8 단계: 계열 알코올 탈수(30분)
- [0057] 상기 세척된 샘플을 Ethanol (Merck, 독일)을 사용하며, 70%, 80%, 90% 및 95% 및 100% 에탄올(x 2회)에 각각 5분씩 실온에서 담구어 탈수한다.
- [0058] 9 단계: 이소아밀아세테이트 치환(10분)
- [0059] 상기 탈수된 샘플을 Isoamyl acetate (Junsei, 일본)를 사용하여 실온에서 10분 반응시킨다. 이 경우, 이소아밀아세테이트 대신 t-부틸 알코올(Junsei, 일본)을 사용할 수 있으나, 이는 37℃에서 30분간 반응시키는 것이 바람직하다.
- [0060] 10 단계: 트리밍

- [0061] 상기 침투 단계를 마친 후, 유리슬라이드에 부착된 중앙 부분을 유리칼로 트리밍한다.
- [0062] 11 단계: 임계점 건조(60분)
- [0063] 임계점건조기(Critical point dryer, Hitachi사, HCP-2, 일본)를 사용하여 임계점 건조 후, 시료대에 은분(Silver paste, Nissin EM Co, 일본)을 사용하여 시료를 고정한다. 이 경우, 임계점건조기 대신 동결 건조기(Hitachi사, E-2030, 일본)를 사용할 수 있으며, 이 경우에는 120분간 건조시키는 것이 바람직하다. 여기서 임계점이란 38~40℃ 상에서 HCP-2 장치의 압력계기가 110kgf/cm²를 가리키는 상태를 뜻한다.
- [0064] 12 단계: Pt-Pd로 증착(30분)
- [0065] 금속이온증착기(Ion sputter, Hitachi 회사, E-1030, 일본)를 사용하여, 금속이온 증착기에 Pt-Pd를 사용하여 은분이 고정된 시료 표면을 5-10 nm 두께로 이온 증착한다.
- [0066] 13 단계: 주사전자현미경 관찰
- [0067] 상기 이온 증착된 샘플을 주사전자현미경(Scanning electron microscope, Hitachi사, S-4200, 일본)을 사용하여 가속전압 10KV로 관찰한다.
- [0068] 상기와 같은 방법은 정확한 악성종괴종 진단을 위해 파라핀 조직을 활용하여 주사전자현미경으로 판별할 수 있도록 종래 사용하던 주사전자현미경의 조직 시료 제작 방법을 변형하고 특화한 것으로, 일반적인 주사전자현미경 관찰을 위한 시료 제작 과정에 5~7일의 시간이 소요되는 반면, 본 발명에 따르면 4~5시간 내에 악성종괴종 진단을 위한 주사전자현미경 관찰용 조직 시료를 제작할 수 있는 장점이 있다.
- [0069] **<실시예 2>**
- [0070] **전도염색을 추가로 포함하는 악성종괴종 진단을 위한 조직 시료 제작 방법**
- [0071] 한편, 상기 실시예 1에 기재된 방법에 전도염색을 추가로 수행하여 시료를 제작할 수 있다. 이를 위해서는, 상기 6단계의 후고정 및 상기 7 단계의 세척 과정을 거친 후, 하기와 같은 과정을 추가하여 진행할 수 있다.
- [0072] 7-1 단계: 전도염색 과정(30분)
- [0073] 상기 후고정 후 세척한 샘플을 2% Tannic acid (Kanto사, 일본)를 사용하여 실온에서 30분 반응시킨다.
- [0074] 7-2 단계: 세척(10분)
- [0075] 이후 상기 전도염색한 샘플을 0.1M 인산완충액으로 10분간 세척한다.
- [0076] 7-3 단계: 1% OsO₄ 으로 고정(30분)
- [0077] Osmium tetroxide (Merck 회사, 독일) 1g을 증류수 50mL에 녹인 용액과 0.1M 인산완충액과 동량으로 희석한 후 상기 용액에 상기 세척된 샘플을 30분간 담구어 고정한다.
- [0078] 7-4 단계: 세척(10분)

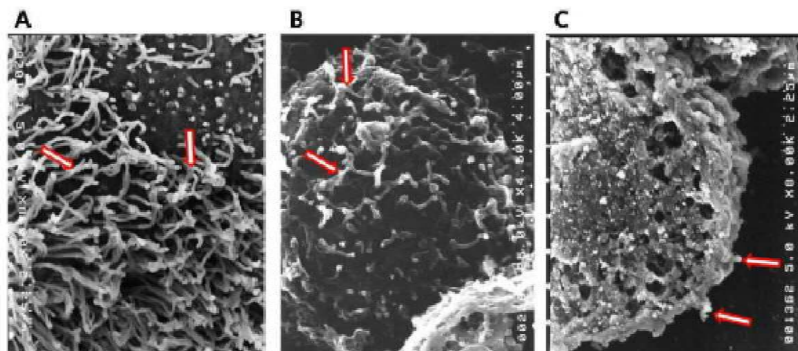
[0079] 이후, 상기 후고정된 샘플을 0.1M 인산완충액에 10분간 담구어 세척한다.

[0080] 상기와 같은 방법에 의하면 종양의 파라핀 잔여 조직의 광학현미경 관찰에서 종양 세포들 틈에 희미하게 보이는 미세용모가 주사 전자 현미경 관찰로 선명하게 관찰이 가능하여, 다른 악성종양과 확실한 감별진단이 가능하다 (도 3 참조).

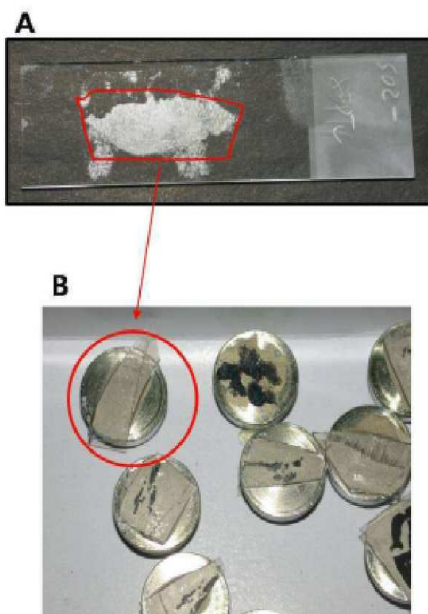
[0081] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 방법으로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

