

Immunohistochemical Staining

박 창 수

전남대학교 의과대학 병리학교실

질병의 정확한 진단과 적절한 치료 그리고 이에 대한 연구를 위해서는 병소에서 채취한 검체의 형태학적 소견을 관찰하는 것이 중요하다. 이러한 형태학적 변화를 관찰하기 위해서, 연구자들은 생검 조직으로 제작한 헤마톡실린-에오신 염색표본을 이용하고 있으며, 필요한 경우에는 세포의 미세구조를 관찰하기 위하여 전자현미경 검색을 시행하고 있다. 그러나, 각종질환은 점차 세분화되고, 새로운 진단기준이 소개되고 있으며, 종양의 진단에 도움을 주는 종양표지자, 그리고, 예후를 판정할 수 있는 예후인자들이 알려지고 있어서, 통상적인 헤마톡실린-에오신 염색표본이나 전자현미경 검색만으로는 이러한 종합적인 정보를 얻기가 어렵다. 이러한 문제점들을 보완해 주는 검사방법인 면역조직화학적 염색은 미분화 세포의 기원을 확인해주거나, 효소, 호르몬, 종양표지자 및 예후인자의 존재 유무, 암종과 육종의 구별 및 양성종양과 악성종양의 감별, 그리고 전이암의 원발소를 추정하는데 효율적으로 이용되고 있다.¹⁾ 면역조직화학적 염색은 민감성과 특이성이 매우 높은 검사법으로서 최근 20년 사이에 진단병리학과 형태학적 연구 등에 필수적인 검사법으로 이용되고 있고,²⁾ antigen retrieval (AR)법이 도입되면서 획기적인 발전을 이루게 되었다.³⁾

검체준비방법 : 고정방법에 따른 결과 차이

면역조직화학적 염색에 이용될 수 있는 검체는 냉동 조직절편, 파라핀 절편, 세포도말 표본 등이며, 이 중에서 파라핀 절편이 가장 많이 이용되고 있다. 세포나 조직의 형태학적 관찰을 원활하게 하기 위해서는 검체의 고정 과정이 제일 중요하다. 고정이 잘된 조직은 세포의 소기관이 잘 유지되지만, 고정이 부족하면 형태학적 구조가 불완전하게 되고, 고정이 너무 지나치면 항원의 소실과 비특이적인 반응이 나타날 수 있다.^{4,5)} 이상적인 고정은 세포내 소기관의 형태가 완전히 유지되면서 항원성을 잃지 않는 것인데 이 두가지를 모두 만족시키기는 쉽지 않다. 조직 고정제는 응고형 고정제와 비응고형(변성형) 고정제로 구분되며 값이 저렴하고 통상적으로 가장 많이 사용되고 있는 포르말린은 비응고형 고정제에 해당된다. 포르말린은 1시간에 1 mm 정도 조직에 침투하면서 고정이 이루어지는데, 항원결정부위(epitope)의 파괴가 적고 단백질과 펩타이드를 교차결합시키므로 세포의 형태가 잘 유지된다.⁶⁾ 포르말린 고정에 의한 항원성의 소실을 최소화하기 위하여 실험실에서는 중성 pH이며 등장성 용액인 10% 중성 완충포르말린(neutral buffered formalin)을 주로 사용한다. 조직의 고정시간은 조직

의 항원성을 잘 보존하기 위해서 적을수록 좋으며 통상적으로 6-8 시간을 권장하고 있지만 조직의 두께에 따라 조절할 수 있다. 최근에는 신속한 조직고정을 위하여 초단파 검체처리기인 HistoWave (ThermoShandon)를 이용하면 10분 이내에 고정을 마칠 수 있다. 그러나, 가장 많이 사용되고 있는 포르말린은 자극성이 있어서 실험실에서 취급하는데 어려움이 있으며, 장기간 노출될 때에는 발암성이 있을 수 있으므로 주의를 요한다. 포르말린 이외에 사용되고 있는 고정제 중 glutaraldehyde는 형태의 보존이 우수하지만, 항원결정부위를 대부분 파괴시키고, 알코올이나 아세톤은 단백질을 응고 침전하는 방법으로 고정시키므로 고분자 단백질의 항원성이 잘 유지되고, 세포내의 불용성 물질을 동정하는데 우수하지만 항원의 부동화가 불완전하고 조직의 수축이 강하다.⁷⁾ 또한 상품화되어 있는 포르말린 대체 고정제는 대부분 알코올을 포함하고 있으며 Glyo-Fixx (ThermoShandon), Histochoice (Amresco), NoTox (Earth State Technologies), Omnifix (An-Con Genetics), Statfix (STAT PATH), Streck Tissue Fixative (Streck Laboratories) 등이 있는데 이러한 고정제들은 고가이기 때문에 실험실에서 현실적으로 포르말린을 완전히 대체하기는 어렵다.⁸⁾ 단, 고정으로 인해 항원성이 소실되는 경우는 냉동조직절편을 이용해서 면역조직화학염색을 실시해야 하므로 검체를 고정시키지 않도록 주의할 기울여야 한다.

실험실에서 사용되고 있는 고정액에 따른 면역조직화학 염색의 차이는 다음과 같다.

	Histology	Immunoreactivity
Unfixed	0/+	++
Ethanol	++	++
Acetone	++	++
Formaldehyde	++	+ / ++
Glutaraldehyde	+	0
Bouin's	++	+ / ++
B-5	++	+ / ++
Osmium tetroxide	++	0

고정이 끝난 조직은 파라핀 절편의 제작을 위하여 수세, 탈수, 투명, 파라핀 침투 과정을 거쳐 파라핀 블록을 만들게 되고 일정한 두께로 박절하여 건조시킨다.

염색법/Antigen retrieval 방법 차이에 따른 차이점

면역조직화학적 검사란 항원과 항체간의 반응을 이용하여 세포나 조직내에 존재하는 물질을 확인하는 면역염색법이다. 면역조직화학적 검사를 이용하여 검출하는 항원은 단백질, 다당류, 핵산 등의 고분자 물질이며, 항원에는 항체를 식별하는 특정한 부위가 있는데, 이를 항원 결정부위(epitope)라고 부르며, 일차항체가 선택적으로 항원 결정부위와 결합한다.

일차항체(primary antibody)는 단클론 항체(monoclonal antibody)와 다클론 항체(polyclonal antibody)로 구분된다. 항원의 분자량이 크면 항원 결정부위가 많아서 여러 종류의 항체를 생성할 수 있다. 한가지의 항원에 존재하는 다수의 항원 결정부위에 각각 결합할 수 있도록 여러 종류의 항체가 혼합된 항혈청을 다클론 항체라 한다. 이에 비하여 한군대의 항원 결정부위와 결합할 수 있는 항체를 단클론 항체라 한다.

면역조직화학적 검사방법은 직접법(direct method)과 간접법(Indirect method)으로 크게 구분할 수 있다. 간접법은 표지물질을 결합시킨 항체를 사용하는 표지항체법(label conjugate antibody)과 비표지항체법(unlabelled antibody method)로 구분된다. 직접법은 일차항체에 효소를 부착시켜서 염색에 이용하는 방법이다. 간접법 가운데 가장 간단한 표지항체법은 일차항체에 효소를 부착하지 않고, 일차항체의 Fc부분에 특이성을 갖는 이차항체에 효소를 부착하여 사용하는 방법이다. 비표지항체법은 일차 혹은 이차항체에 표지물질을 부착시키지 않는 방법으로 민감성이 매우 높은 방법이다. 여기에 해당하는 방법은 PAP(peroxidase-anti-peroxidase)법, ABC(avidin-biotin complex)법, 그리고 protein법 등이 있다. 일반적으로 직접법은 간접법에 비하여 비특이적인 염색이나 배경염색 (background staining)이 적지만 각각의 항체마다 효소를 부착해야 되는 어려움이 있다. 이에 비하여 간접법은 각각의 항원에 대한 일차항체를 제조한 동물이 동일한 경우에는 이차항체를 공통적으로 사용할 수 있고, 여러과정을 거치면서 반응의 강도를 증가시킬 수 있다. 간접법은 시간이 많이 소요되고 검사과정이 복잡하며, 비특이적인 반응이나 배경이 염색되는 단점이 있으나, 최근 자동 및 반자동 염색기의 개발 등으로 시간이 단축되었고, 민감성을 갖는 시약의 개발 등으로 비특이적인 염색이 개선되었다.⁹⁻¹¹⁾

연구자들은 실험목적이나 선호도에 따라 염색방법을 선택하고 있는데, 병원이나 실험실에서 주로 사용되고 있는 면역조직화학적 검사방법은 초기에는 Sternberger 등¹²⁾이 개발한 PAP법이었으나, 지금은 Hsu 등¹³⁾이 개발한 ABC법이 활발하게 이용되고 있다.

1. PAP법

과산화효소에 대한 항체를 만들고, 이 항체와 과산화효소를 면역화학적으로 결합시켜 형성된 면역복합체인 PAP를 사용하는 방법이다. 이 방법은 먼저 표본내의 항원을 일차항체 및 이차항체와 반응시킨 후에 일차항체와 같은 동물에서 만든 PAP를 이차항체와 결합시켜 양성반응을 관찰하는 것이다. PAP법은 하나의 항원-항체 반응물에 3개의 과산화효소가 결합되어 있어서 면역반응물을 확인하는데 민감성이 증가된다.

2. ABC법

ABC법은 당단백인 avidin이 저분자량 비타민인 biotin에 친화력이 매우 강한 원리를 이용한 방법이다. Avidin은 계란 흰자위에 존재하는 당단백으로서 4개의 biotin과 결합할 수 있는 입체구조를 갖고 있다. Biotin (vitamin-H)은 쉽게 항체의 Fc 부분에 부착되므로 이차항체에 부착시켜서 사용하고

있다 (biotinylated antibody). ABC 방법의 처리과정은 먼저 일차항체를 조직표면에 존재하는 항원에 결합시킨 후 biotin이 부착된 이차항체(biotinylated antibody)를 반응시킨다. 그리고 avidin과 효소가 결합된 검출계(detection system)를 이차항체에 부착된 biotin과 결합하게 한다. 이 방법은 하나의 항원에 여러개의 효소가 부착될 수 있으므로 민감도가 매우 높은 방법이므로 현재 가장 많이 이용하고 있는 방법이다. 이 방법에 사용되는 avidin에는 탄수화물이 존재하여 lectin과 같은 물질에 친화력을 나타내므로 비특이적인 결합을 할 수 있다. streptomyces avidinii라는 세균의 배양액으로부터 추출되는 streptavidin은 avidin과 유사한 특성을 갖고 있으면서 탄수화물을 포함하고 있지 않기 때문에 avidin의 결점을 보완할 수 있다. 따라서 최근에는 검출계에 avidin 대신 streptavidin을 부착시켜 염색에 이용하고 있다.

실험실에서 가장 흔히 이용하는 염색법은 ABC법으로서 염색과정은 다음과 같다.

- 1) 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 박절하여 건조시켜 파라핀 절편을 제작한다.
- 2) 탈파라핀(DeParaffinization) : Xylene, Hemo De(Fisher Scientific), HistoClear (National Diagnostics), HistoSolve(ThermoShandon), Autodewaxer(Reserach Genetics) 등의 유기용제를 사용하여 파라핀을 제거한다.
- 3) 내재성 효소의 억제(Blocking of Endogenous Enzyme) : 조직내에 존재하는 내재성 과산화효소는 에탄올에 과산화수소를 첨가한 시약으로 억제시키고, 내재성 알칼리성 포스파타아제는 산성 알코올로 억제시킨다.
- 4) 효소전처리(Enzyme Predigestion) : 단백분해효소인 pepsin, proteinase K, ficin, trypsin, protease 등을 사용하여 포르말린 고정에 의하여 형성된 교차결합을 원상태로 되돌린다.
- 5) 비특이적인 단백질 억제(Protein blocking solution) : 일차항체와 비특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 억제하기 위하여 사용한다.
- 6) 일차항체(Primary Antibody) : 단클론 항체나 다클론 항체를 사용한다.
- 7) 이차항체(Secondary Antibody) : 만능 이차항체(Universal Secondary Antibody)를 사용한다
- 8) 검출계(Detection System) : 이차항체에 부착되어 있는 biotin과 결합할 수 있는 streptavidin이 부착된 streptavidin horseradish peroxidase, streptavidin alkaline phosphatase를 사용한다.
- 9) 발색제(Chromogen) : 발색제는 horseradish peroxidase를 부착시킨 검출계를 이용한 경우 3,3'-diamino-benzidine(DAB), 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)를, glucose oxidase는 tetrazolium을 alkaline phosphatase는 BCIP/NBT, BCIP/INT, new fuchsin, fast red TR salt(FRT)등을 사용한다.
- 10) 대조염색(Counterstain) : 수은이 함유되지 않은 헤마톡실린을 사용한다. 헤마톡시린-에오신 염색에 사용하는 헤마톡실린과 다른 면역염색용 헤마톡실린을 사용하여 양성반응이 핵에서 관찰되는 경우 양성반응의 관찰을 용이하게 한다.
- 11) 봉입(Mount) : 봉입은 염색이 완료된 조직표본에 봉입제를 묻혀서 바로 건조시키거나 cover glass를 씌워서 현미경 검경이 용이하도록 하는 과정이다. 알코올이나 xylene에 용해되는 발색제인 AEC, BCIP/INT, FRT 등은 수용성 봉입제만 사용이 가능하고, DAB나 BCIP/NBT는 수용성이나 비수

용성 봉입제 모두가 사용이 가능하다. 수용성 봉입제는 Universal Mount(Research Genetics), Immu-Mount(ThermoShandon) 등이 있고 비수용성 봉입제는 Canada balsam, Permount 등이 있다.

이러한 면역조직화학적 염색방법은 일정한 온도를 유지함으로써 1시간 이내에 결과를 판독할 수가 있으며, 최근에는 초단파 검체처리기를 이용하여 30분 이내에 면역염색이 가능하게 되었다. 그리고 실온에서 면역염색을 시행하려면 상기한 염색방법을 기준으로 하여 부치시간(incubation time)만 조금씩 늘리면 가능하다.

최근에는 포르말린에 고정한 후 제작한 파라핀 절편에서는 항원결정부위와 다른 단백질사이에 교차결합(cross-link)이 발생하여 면역염색이 잘 되지 않는 경우가 있다. 이러한 경우에는 단백분해효소인 pepsin, protease, proteinase K, ficin, trypsin 등을 전처리 함으로써, 항원이 잘 검출될 수 있도록 한다.¹⁴⁾ 효소의 전처리가 필요한 항체는 Alpha-1 -Antichymotrypsin, Alpha-1-Antitrypsin, Carcinoembryonic Antigen, Collagen type IV, Cytokeratin, Cytomegalovirus, Epithelial Membrane Antigen, Epidermal Growth Factor Receptor, Factor VIII RAg, Beta-HCG, Kappa Chain, Hepatitis B virus Surface Antigen, Hepatitis B Core Antigen, Immunoglobulin, Lambda Chain, Ki-67, Lysozyme, Myoglobin, 등이다.

Immunohistochemistry Protocol

Reagent	Time	Temperature
Dewaxing agent	1 min	60 °C
Dewaxing agent	1 min	60 °C
Dewaxing agent	1 min	60 °C
Dewaxing agent	1 min	RT
Absolute alcohol	2 Washes	RT
Absolute alcohol	2 Washes	RT
Blocking solution of enzyme	2 min	40 °C
Buffer	1 wash	RT
Pepsin(Optional)	4 min	40 °C
Buffer	1 wash	RT
Primary blocking solution	1 min	40 °C
Primary antibody	10 min	40 °C
Buffer	1 wash	RT
Secondary antibody	10 min	40 °C
Buffer	1 wash	RT
Detection system	7 min	40 °C
Buffer	1 wash	RT
Chromogen	7 min	40 °C
Distilled Water	1 wash	RT
Hematoxylin	0.5 min	RT
Distilled Water	2 washes	RT
Buffer	1 wash	RT
Distilled Water	1 washes	RT
Mount		RT

Shi 등³⁾은 포르말린에 고정한 후 제작한 파라핀 절편을 100℃ 이상의 열을 가한 후 면역조직화학적 염색을 시행한 결과 민감성이 증가되는 heat induced antigen retrieval (AR)법을 보고하였다. AR법은 초단파 검체처리기(Microwave), 고압멸균기(Autoclave), 압력솥(Pressure Cooker) 등을 이용한다. AR법은 효소전처치 과정이 필요없고, 일차항체의 부치시간을 현저하게 감소시킬 수 있으며, 장기간 포르말린에 고정한 검체에서도 필요한 항원을 검출해 낼 수 있고, 통상적으로 파라핀 절편에서는 검출되지 않는 항원의 면역염색이 가능하다. AR에 사용하는 용액은 citrate buffer, EDTA, phosphate buffer, tris buffer, urea 등을 이용할 수 있는데 검출하려고 하는 항원의 종류에 따라 완충액을 선택하지만 가장 많이 사용되고 있는 완충액은 citrate buffer 이다. 실험실에 AR을 위하여 고온으로 가열시키는 장비가 구비되어 있지 않은 경우에는 저온에서 AR을 시행하는 low temperature antigen retrieval(LTAR) 법¹⁵⁾이 소개되어 80℃ 에서 2시간 이상 조직절편을 가온한 후에 면역염색을 시행하여 유의한 성적을 얻을 수 있었다. 그러나, AR법은 가온하는 방법, 가온시간, 사용하는 완충액에 따라 결과가 다양하게 나타나므로 방법의 표준화가 절실하다.¹⁶⁾

Correlation of heating temperature and heating time in the high temperature heating antigen retrieval

Heating time (min)	100℃	90℃	80℃	70℃	60℃
5	++	+	-	-	-
5 x 2	+++	++	-	-	-
5 x 3	+++	++	-	-	-
5 x 4	++++	+++	±	-	-
5 x 6	++++	++++	++	+	-
5 x 8	NT	NT	+++	+	±
5 x 10	NT	NT	++++	+	±
5 x 12	NT	NT	NT	++	+
5 x 14	NT	NT	NT	++	+
5 h	NT	NT	NT	+++	+
10 h	NT	NT	NT	++++	++

NT : no test Citrated from Appl Immunohistochem 6(2): 89-96, 1998

일차/이차 항체 사용농도조절에 따른 결과 차이

면역조직화학적 염색에서 항체의 최적 희석농도는 염색상 양성반응을 나타내는 부위와 음성반응을 나타내는 주변부위와의 최상의 대조를 이루는 농도라고 할 수 있다. 직접법에서는 일차항체의 희석농도에 따라 영향을 받게 되지만, 간접법에서는 각각 일차항체와 이차항체의 희석농도에 독립적인 영향을 받게 되므로, Checkboard 형식으로 가장 적절한 희석농도를 결정하는 것이 좋다.

관찰하고자 하는 부위의 양성반응과 주변부위의 반응의 정도를 파악하여 최적의 대조를 이루는 경우를 찾아야 하며 위 예의 경우는 Slide 9번에서 최적의 대조를 이루고 있고 이에 해당되는 항체의 희석농도를 사용해야한다.¹⁷⁾ 그러나, 일차 및 이차항체의 농도에 따라 양성반응이 차이가 있는 것은 알려진 사실이지만, 검출계나 발색제가 민감성을 갖고 있으면 일차 및 이차항체의 희석 비율은 더욱 증가한다.

		<i>Dilutions of Primary antibody</i>					<i>Negative control</i>
		<i>1/5</i>	<i>1/20</i>	<i>1/80</i>	<i>1/320</i>	<i>1/1280</i>	
		<i>Slide 1</i>	<i>Slide 2</i>	<i>Slide 3</i>	<i>Slide 4</i>	<i>Slide 5</i>	<i>Slide 6</i>
<i>Dilutions of Secondary antibody</i>	<i>1/10</i>	+++ (++)	+++ (++)	+++ (++)	++ (++)	+ (++)	± (++)
	<i>1/40</i>	+++ (+)	+++ (+)	++++ (+)	++++ (±)	++ (±)	- (±)
		<i>Slide 7</i>	<i>Slide 8</i>	<i>Slide 9</i>	<i>Slide 10</i>	<i>Slide 11</i>	<i>Slide 12</i>
	<i>1/160</i>	++ (+)	++ (±)	+ (±)	± (-)	± (-)	
		<i>Slide 13</i>	<i>Slide 14</i>	<i>Slide 15</i>	<i>Slide 16</i>	<i>Slide 17</i>	

Staining intensity : 0 ~ +++, () : Background staining intensity

발색제의 종류와 해석상 차이, 장단점

조직절편 내에서는 면역반응을 통하여 형성된 항원-항체 결합체는 항체가 면역글로불린이기 때문에 현미경을 이용한 관찰이 불가능하다. 따라서 어떤 표지물질을 항체에 부착시켜 항원-항체 반응의 존재유무를 확인할 수 있어야 한다. 이러한 표지물질에는 형광색소나 horseradish peroxidase, glucose oxidase, alkaline phosphatase 등의 효소가 이용된다. 표지물질로 이용하는 형광색소는 fluorescein isothiocyanate (FITC; 황녹색형광)와 tetramethyl -rhodamine isothiocyanate (TRITC; 적등색 형광)가 있다. 효소를 표지물질로 이용하는 방법은 형광색소나 방사선 동위원소에 비하여 여러 가지 장점을 가지고 있다. 즉, 효소의 반응이 반복되므로 민감성이 높고 방사선 동위원소와 같이 사용상의 규제와 특별한 시설을 필요로 하지 않으며, 형광물질이나 중금속은 형광현미경이나 전자현미경검색에만 사용할 수 있지만 효소는 광학현미경이나 전자현미경에 이용할 수 있다. 양성반응을 관찰하기 위한 발색 과정은 부착시킨 효소의 종류에 따라 선택할 수 있다. 발색제는 horseradish peroxidase를 부착시킨 검출계를 이용한 경우는 DAB, AEC를, glucose oxidase는 tetrazolium을, alkaline phosphatase는 BCIP/NBT, BCIP/INT, new fuchsin, FRT 등을 사용한다.¹⁸⁾

대조염색으로 사용하는 헤마톡실린의 색깔과 비교가 되는 발색제가 판독시에 도움이 된다. 헤모시 데린이나 멜라닌 등의 갈색의 색소가 존재하는 조직절편의 염색은 FRT나 new fuchsin과 같은 적색

의 발색제를 사용하는 것이 유리하다. 고배율로 검경할 필요가 있는 경우는 비수용성 봉입제를 사용할 수 있는 DAB, BCIP/NBT를 발색제로 사용하는 것이 좋다. 발색제는 민감성과 안정성이 있어야 한다. 처음에는 실험 때마다 발색제를 새롭게 제조하였고, 사용하고 나면 역가가 없어지기 때문에 전량 폐기하였다. 그러나, 지금은 바로 사용할 수 있도록 간편한 발색제가 상품화되어 있고, 사용한 후에도 안정성이 있어서 다음 실험에 사용할 수가 있다.

판독시의 문제점

면역조직화학적 염색이 끝난 슬라이드는 대조염색을 시행한 후 현미경을 이용하여 결과를 판독하게 된다. 판독 시 가능하면 헤마톡실린-에오신 염색표본을 함께 비교하면서 결과를 판정하는 것이 좋다. 양성반응은 발색제의 종류에 따라 갈색, 적갈색, 적색, 검정색 등으로 나타나며 주로 헤마톡실린으로 대조염색을 시행하므로 청색과 대조가 되어서 쉽게 판정할 수 있다. 조직절편의 중앙부위에 비하여 주변부가 강하게 염색되었을 때는 비특이적 염색(edge artefact)으로 처리한다. 양성 반응이 매우 약하게 관찰될 경우에는 결과의 판정을 주의 해야한다. 즉, 전반적으로 배경염색이 되어 있으면서 약한 양성반응을 보였다면 조직절편에 존재하는 내부 대조군(internal control)의 염색양상을 기준으로 하여 양성여부를 판단한다. 조직고정 시간의 적정성은 Vimentin의 염색강도로 판단하여 약하게 관찰될 경우는 포르말린에 고정시간이 길었을 경우에 해당되므로 다른 일차항체에 대한 염색반응을 판독할 때 이러한 인자를 고려해야 한다.¹⁹⁾

동일한 질환으로 진단된 파라핀 절편을 대상으로 하여 한가지 항원의 발현양상을 관찰할 경우에는 상호간의 염색강도를 비교할 필요가 있다. 이때에는 동등한 조건에서 염색을 시행한 후에 염색강도에 따라 등급을 정할 수 있다. 면역조직화학적 염색검사를 판정할 경우에 가장 유의해야 할 점은 위양성과 위음성 여부를 확인하는 것이다.

면역조직화학적 염색상 위음성이 나타날 수 있는 경우들은 다음과 같다.

- 1) 부적절한 고정에 의한 조직항원의 소실
- 2) 냉동 조직절편에만 이용이 가능한 일차항체를 파라핀 절편에 사용
- 3) 일차항체와 결합능이 없는 이차항체의 사용
- 4) 내재성 효소를 억제할 목적으로 사용하는 억제용액을 검출계 다음 과정에 사용
- 5) 검출계에 부착된 효소와 발색제의 불일치
- 6) 유효기간이 지난 항체나 시약의 사용
- 7) 포르말린에 고정한 후 제작한 파라핀 절편에서 cytokeratin, epithelial membrane antigen, factor VIII related antigen 등에 의한 염색시 단백분해효소로 전처치를 하지 않는 경우
- 8) 탈회과정을 거친 후 제작된 파라핀 절편

면역조직화학적 염색상 위양성이나 배경염색이 나타날 수 있는 경우들은 다음과 같다.

- 1) 농도가 높은 일차항체의 사용
- 2) 완충액을 이용한 세척과정이 불충분한 경우
- 3) 내재성 효소를 억제시키지 않고 염색을 시행한 경우
- 4) ABC 법에서 biotin이 존재하는 신장, 간장, 근육 조직등을 염색하는 경우
- 5) 혈장에 항원이 고농도로 존재할 경우
- 6) 자가용해에 의한 괴사부위가 있는 경우
- 7) 단백 분해효소의 과도한 처리
- 8) 이차항체의 교차반응(cross-reactivity)
- 9) 과도한 AR에 의한 비특이적인 염색

면역염색의 장·단점

면역조직화학적 염색은 양성종양과 악성종양의 감별 및 암종과 육종을 감별하는데 사용할 수 있으며, 효소, 종양표지자 및 예후인자를 확인하는데도 이용될 수 있다. 또한, 후향적인 연구에 사용될 수 있도록 파라핀 절편의 이용이 가능하므로, 연구자들은 파라핀 블록만 보관되어 있으면 필요한 경우에는 언제든지 파라핀 절편을 제작한 후, 면역염색을 시행하여 유의한 정보를 얻을 수가 있다. 항원을 검출할 수 있는 검사방법 중에서 면역조직화학 염색법은 형태학적인 구조가 유지되므로 민감성과 특이성이 높은 방법이며, 검사방법의 발달로 1시간 이내에 결과를 얻을 수 있으므로 진단 및 치료에 신속한 정보를 제공하고 있다. 예후인자로 이용되고 있는 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Ki-67, Topoisomerase 등의 양성신호는 핵에서 관찰되므로 양성세포들의 산정이 가능하다.²⁰⁾ 위암종 등 소화기계 암종이나 유방암종에서 원발소 주변부의 림프절에 암세포의 전이 유무는 Cytokeratin에 대한 면역염색을 시행하여 헤마톡실린-에오신 염색상 확인이 어려운 전이암세포들을 쉽게 판독할 수 있다.²¹⁾ 또한 세포의 기원과 종양표지자, 예후인자들을 동일한 절편에서 동시에 발현할 수 있는 이중면역염색(double immunostaining), 삼중면역염색(triple immunostaining)을 할 수 있는 장점이 있다.²²⁾ 유전자 및 단백질수준의 정보를 함께 얻기 위하여 면역조직화학적 염색과 *in situ* hybridization을 동일한 절편에서 함께 시행하는 hybridohistochemistry가 가능하다. 아울러 염색과정의 자동화가 이루어져 대형병원에서는 많은 양의 면역염색을 신속하게 시행하고 있다. 자동화의 장점은 적은양의 시약으로도 염색이 가능하고, 재현성이 있으며, 시간을 절약할 수 있고, 수가의 절약이 가능하다. 면역조직화학적 염색이 처음으로 도입될 당시에는 검사기간이 하루이상 걸리고 비특이적인 양성반응 등으로 진단 및 연구에 널리 이용되지 못하였다. 그러나 이러한 단점은 시약의 개발과 방법의 개선을 통하여 해결이 되었다. 일차항체가 개발되어 있지 않은 조직항원에 대한 염색은 시행할 수가 없으며, 양성반응의 정량적인 검사(quantitation of positive reaction)는 정확한 성적보다는 간접적인

판정에 국한된다.

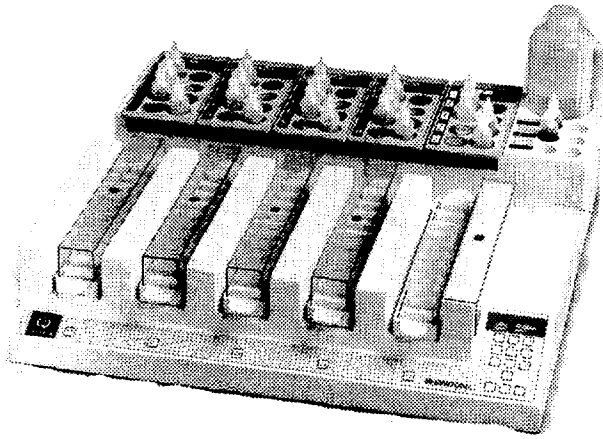
연구경비와 필요장비

연구경비는 연구에 이용할 조직절편의 제작비용과 면역조직화학적 염색에 필요한 장비 및 시약의 구입경비를 포함한다. 면역조직화학적 염색에 필요한 장비는 수기법(manual method)을 이용한 경우에는 장비가 필요하지 않아서 어느 실험실에서나 쉽게 시행할 수가 있다. 그러나 수기법은 각각의 파라핀 절편에 도포하는 시약의 양이나 반응시간 등이 일정 하지 않으므로 동일한 질병에 대한 조직절편들에서 한가지 항체에 대한 면역반응의 강도(immunostaining intensity)를 비교하는데 어려움이 있다. 이에 비하여 슬라이드 10장씩을 동시에 시행한다면 이러한 오차를 줄일 수가 있다. 수기법보다 간편하게 염색을 시행할 수 있는 염색장비로서 10장의 슬라이드를 동일한 조건에서 염색할 수 있는 MicroProbe Immuno/DNA Stainer (Fisher Scientific)와 CoverPlate를 이용한 Sequenza Immunostaining Center (ThermoShandon) 등이 있다. MicroProbe Immuno/DNA Stainer (Fisher Scientific)는 오븐내의 온도조절이 가능하고, capillary gap을 이용하기 때문에 Probe on Plus (Fisher Scientific) 슬라이드만이 이용이 가능하다.¹¹⁾ 그러나 CoverPlate (ThermoShandon)를 이용하는 Sequenza Immunostaining Center (ThermoShandon)는 실온에서 염색을 하며, 일반 슬라이드를 이용할 수 있으므로 비용이 저렴한 편이다. Sequenza Immunostaining Center는 5개의 Sequenza Rack으로 구성되어 있는데, 1개의 Rack으로 10장의 슬라이드를 염색할 수 있다. 실험실의 사정에 따라서 Rack만 따로 구입할 수도 있어서 경비를 절약할 수 있다. 그리고, 많은 양의 슬라이드를 신속하게 처리하기 위해서는 자동면역염색기(Autoimmunostainer)가 이용되고 있다. Brigati등⁹⁾은 Code-On Immunostainer(Fisher Scientific)를 이용하여 면역조직화학 염색에 처음으로 자동화를 도입하였다. 국내에 도입되어 사용하고 있는 자동면역염색기는 NexES(Ventana), TechMate(Dako), OptiMax(Biogenex), Lab Vision Autostainer(Lab Vision) 등이다. 실험실에서 면역조직화학적 염색을 시작하기 위하여 필요한 장비나 시약을 각각 구입하게 되면, 실험경비가 많이 지출될 수 있다. 면역염색을 새롭게 시작하는 연구자들을 위하여 면역염색용 package가 저렴한 가격으로 공급되고 있다. 이 package 내에는 면역염색장비, 일차항체, 이차항체, 검출계, 발색제, 봉입제, 완충액 등이 전부 포함되어 있어서 면역염색을 쉽게 시작할 수가 있다.

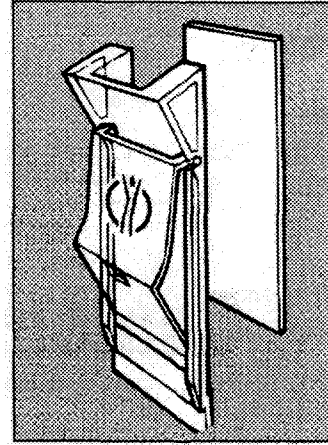
Starter/Low Volume User Package

- 1) Sequenza Slide Rack
- 2) Cadenza buffer (30 ml x 6 = 6 L)
- 3) Disposable Coverplate
- 4) 1 Detection Kit (80 slides 염색용, 발색제, 봉입제 등 전부 포함)
- 5) 3 Primary Antibodies, 3 ml each

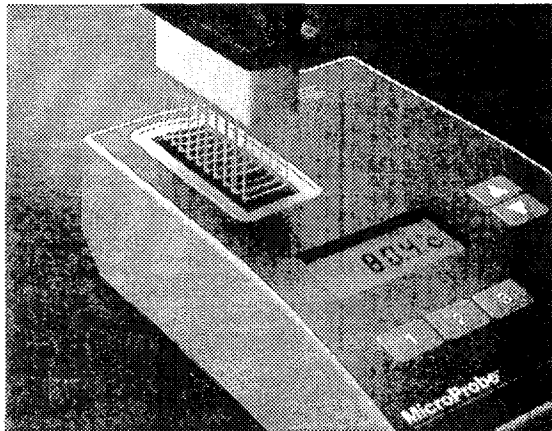
(B Cell, Chromogranin, Cytokeratin, Desmin, EMA, GFAP, LCA, Neurofilament, PSA, S-100, T Cell, Vimentin 항체 중 필요한 항체를 3개 선택)



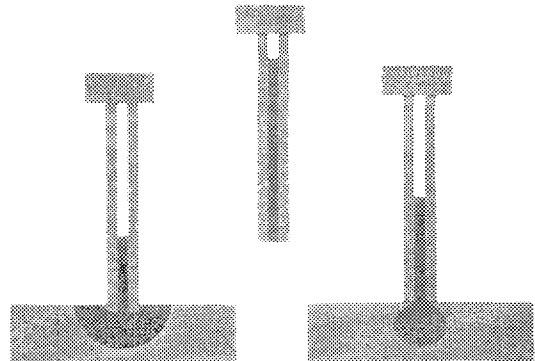
Sequenza Immunostaining Center



CoverPlate



MicroProbe Incubator



Capillary Action Gap

이상과 같이 면역조직화학적 염색법은 질병의 진단 및 연구에 많은 도움을 줄 수 있는 유익한 검사방법으로서, 연구자들이 면역조직화학적 염색의 원리와 검사방법, 그리고 판독요령 등에 대해 이해하고 있다면 어느 실험실에서나 쉽게 이용할 수 있는 검사방법이 될 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Kim YJ, Ghu HD, Kim DY, Kim HJ, Kim SK, Park CS. Expression of cellular oncogenes in human

- gastric carcinoma: c-myc, c-erbB-2 and c-Ha-ras. *J Sur Oncol* 1993;54:167-170.
2. Taylor CR, Cote RJ, eds. *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist*. 2nd ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1994
 3. Shi S-R, Key ME, Kara KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem* 1991;39:742-748
 4. Jacobson M, Clausen PP, Smith S. The effect of fixation time on immunohistochemical demonstration in paraffin embedded materials. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1980;88A:369-375
 5. Battifora H, Fopinski MI. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. *J Histochem Cytochem* 1986;34:1095-1100
 6. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, et al. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 1985;33:845-857
 7. Hopwood D. Cell and tissue fixation. *J Histochem* 1985;17:389-401
 8. Preto P, Lyon H. Commercial formalin substitutes for histopathology. *Biotech Histochem* 1997; 72:273-282
 9. Brigati DJ, Budgeon LR, Unger ER, et al. Immunocytochemistry is automated, the development of a robotic workstation based upon the capillary action principle. *J Histotechnol* 1988;11:165-83.
 10. Iezzoni JC, Manahan LJ, Park CS, Brigati DJ. Recent advances in automated immunocytochemistry. *J Histotechnol* 1993;16:39-50.
 11. Reed JA, Manahan LJ, Park CS, Brigati DJ. Complete one-hour immunocytochemistry based on capillary action. *Biotechnology* 1992;13:434-443.
 12. Sternberger LA, et al. The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase). *J Histochem Cytochem* 1970;18:315-333.
 13. Hsu SM, et al. The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody PAP procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
 14. Mepham BL, Frater W, Mitchell BS. The use of proteolytic enzymes to improve immunoglobulin staining by the PAP technique. *Histochem J* 1979;11:345-349
 15. Frost AR, Sparks D, Grizzle WE. Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2000;8:236-243
 16. Shi S-R, Cote RJ, Chaiwun B, Taylor CR. Standardization of immunohistochemistry based on antigen retrieval technique for routine formalin-fixed tissue sections. *Appl Immunohistochem* 1998;6:89-96
 17. Taylor CR, Cote RJ. *Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist*. 2nd ed. W. B. Saunders, 1994.
 18. Tubbs RR, Sheibani K. Chromogens for immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 1982;106:205-211
 19. Battifora H. Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *Am J Clin Pathol* 1991;4:446-454

20. True LD. Quantitative immunohistochemistry: A new tool for surgical pathology?. *Am J Clin Pathol.* 1988;90:324-325.
21. Gabbiani G, Kapanci Y, Barazzone P et al. Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells: A diagnostic aid for the surgical pathologist. *Am J Pathol.* 1981;104:206-216.
22. Kolodziejczyk E, Baertschi AJ. Multiple immunolabelling in histology: A new method using thermo-inactivation of immunoglobulins. *J Histochem Cytochem* 1986;34:1725-1729.