

광학 현미경적 수준에서의 면역조직화학적 방법의 원리 및 실제

대구대학교 재활과학대학 물리치료학과
김진상

ABSTRACT

The Principles and Practices of Immunocytochemical method in Light
Microscopic Level
Jin-Sang, Kim
Department of Physical Therapy
College of Rehabilitation Science
Taegu University

The study was carried out to investigate and review the principles and practices of immunocytochemical method in light microscopic level.

The results were as follows.

1. Immunocytochemistry is the method to search out the intracellular position of the specific materials using antigen-antibody reaction.
2. The chief items in immunocytochemistry are antigen, antibody and chromogen.
3. The identical fixation is cardiac perfusion fixation.
4. The tissue slides must be prepared by vibratome.
5. All stainings are carried out with free floating staining method.
6. There are polyclonal and monoclonal antibodies used in immunocytochemistry

key words : Microscopic Level ; Immunocy to chemical

I. 서론

Bacteria, virus antigen, tissue antigen 또는 hormone, enzyme 등 생물학적 활성 (biological activity) 이 있는 물질들이 생체 조직내에 어떻게 존재하느냐 또는 이물

질들의 분질이 무엇인가 하는 의문을 의학이나 생물학을 연구하는 학자들에 의하여 오래전 부터 점색반응에 의한 분별염색이 행해져 왔으나 이런 조직화학적 염색 방법은 연구 목적 마다 각각 특수 염색법을 적용해야만 하는 단점과 또한 그 특이성에

있어서도 많은 단점이 있다.

면역세포화학법은 바로 이와 같은 특정 물질의 세포내 소재를 검색함으로써 세포의 기능과 활성을 형태화적인 측면에서 추정하는 연구 방법이다(Bullock 과 Petrusez, 1983). 여기에는 항체와 형광물질을 결합시키는 형광항체법 (immunofluorescence), ferritin (Fe) 을 항체와 결합시키는 ferritin 항체법, 효소를 항체에 표지한 enzyme labelled antibody technique 등이 있다(Mason 등, 1969a).

먼저 형광항체법은 1941년 Coons에 의해 창안된 방법으로서 특이성이 높고 감도가 예민하므로 일반세포화학적 방법을 능가하는 우수성을 지니고 있어 의학이나 생물학분야에 광범위하게 응용되어 왔다. 그러나 광학현미경적 수준을 벗어나지 못하며 형광의 소실이 빨라서 연구표본을 얻을 수 없다는 점, 조직의 형태와 보존상태가 불량하다는 단점과 항상 신선한 조직의 절편을 필요로 한다는 점의 여러가지 결점을 가지고 있다. 이러한 형광항체법의 결점을 보충하기 위하여 ferritin 항체법이 고안되었는데 기본 원리는 형광항체법과 대동소이하지만 표지물질로 ferritin을 사용하므로써 분석 한계를 전자현미경 수준까지 올린 면역전자현미경법이나 이 방법도 ferritin 입자가 너무 거대분자이기 때문에 표지된 항체가 세포 및 조직 내부로 침투하기 어려운 단점을 지니고 있다. 이런 방법으로써 1967년 Nakene와 Kawaoi가 ferritin 입자보다 작은 분자인 효소를 표지 물질로 하여 효소표지항체법을 발전시켰다. 즉 효소를 표지한 항체를 1차적으로 항원이 있

는 재료에 반응시킨 다음 2차적으로 효소의 소재부위를 탐색함으로써 항원을 추적하는 방법이다. 현재 많이 이용되는 효소 표지에는 acid phosphatase, adenosine triphosphatase, alkaline phosphatase, esterase, dehydrogenase, peroxidase 등이 있으나 가장 많이 쓰이는 것은 식물성 효소인 양고추냉이 과산화효소 (horseradish peroxidase)이다(Boorsma, 1975). 이 효소의 장점은 적혈구, 백혈구 등 혈구세포 외에는 다른 조직세포에서 거의 발견하기 어려우며, 이것을 외부로부터 동물체내에 투여했을 경우에도 이미 조직내에 있던 peroxidase와 구별하기가 매우 용이하며 분자량이 40,000 정도이므로 세포내 침투가 높고 효소조직반응의 최종산물과 정색반응을 띄고 있기 때문에 광학현미경 하에서 관찰이 가능하며 형광항체법에 비해 그 염색성의 소실이 적어 장기보관이 가능하다는 점이다.

이러한 horseradish peroxidase가 표지된 항체를 이용하여 조직이나 세포를 염색하는 방법을 면역과산화효소법 (immunoperoxidase technique) 이라 하며 이 방법은 특정한 항원이 세포내에 존재할 때 peroxidase가 표지된 항체를 반응시킨 후 H_2O_2 와 함께 diaminobenzidine과 같은 발색원(chromogen)을 반응시키면 그 발색원에 고유한 색깔이 나타나므로 항원의 존재를 현미경하에서 감별할 수 있는 방법이다(Graham 등, 1966). 이런 면역과산화효소법은 효소의 표지 방법에 따라 크게 2가지로 분류할 수 있는데 첫째는 conjugated or enzyme labelled antibody method (direct, indirect)이고 (Clyne, 1973), 둘째

는 nonconjugated or enzyme unlabelled antibody method (enzyme bridge method, peroxidase-antiperoxidase method) 이다 (Burna, 1975).

Conjugated or enzyme labelled antibody method 에서 직접법은 peroxidase와 1차항체를 화학적으로 결합시켜 이 표지항체를 조직에 반응시킨 뒤 H_2O_2 와 diaminobenzidine을 반응시키는 방법이고(Nakane 과 Pierce, 1967), 간접법은 2개의 항체가 필요한데 우선 1차항체 (비표지항체)를 조직에 반응시키고, 1차항체를 만드는데 사용한 것과 같은 종의 동물의 immunoglobulin 에 특이성을 가진 2차항체를 적용하는 방법이다(Boorsma, 1976). 그러나 이 방법은 과산화효소와 항체를 결합하기 위하여 화학적인 반응을 거쳐야 하기 때문에 peroxidase 나 항체분자에 손상을 줄 우려가 많아 항체변성과 활성도를 저하시켜 특이성을 떨어뜨린다. 또한 효소가 항체에 100% 결합하는 것이 아니기 때문에 효소가 결합되지 않은 항체는 이미 결합된 항체와 결합함으로써 감수성을 더욱 낮추게되어 비특이성 배경염색을 증가시켜 정확한 판독을 하기가 어렵다(Sternberger 등, 1970).

Nonconjugated or enzyme unlabelled antibody method 는 화학과정이 필요없기 때문에 효소의 활성도가 잘 보존되어 감수성이 훨씬 높으므로 소량의 항원이 존재하는 세포나 조직의 검사에 적합하다(Petrali 등, 1974). Enzyme bridge method 는 검사하고자 하는 항원에 대해 특이성을 가진 1차항체를 반응시킨 후 1차항체를 만드는데 이용한 동물의 면역글로불린에 대한 항

체를 반응시키고 1차항체를 만든 동물과 같은 종의 동물에서 만든 항과산화효소항체를 반응시킨 후 최종적으로 peroxidase를 반응시키는 방법이다. Peroxidase-antiperoxidase complex(PAP) 방법은 1970년 Sternberger 에 의해 개발되었는데 위의 방법보다 한 단계가 적기 때문에 시간을 절약할 수 있고 더 감수성이 높기 때문에 현재 가장 널리 이용되고 있다(Cuello, 1984; Tougard 등, 1979).

위와같은 면역조직화학법은 특정물질의 세포내 소재를 검색함으로써 세포의 기능과 활성을 형태학적인 측면에서 추정하는 연구방법인데 근래 endocrine-paracrine cell들의 기능과 형태학적 특징을 명확히 동정하기 위하여 광학현미경에서의 면역세포화학적 방법과 전자현미경에서의 면역세포화학적 방법들이 개발되어 이용되고 있다.

또한 면역조직화학법은 특수 연구분야 뿐만 아니라 진단병리학적인 측면에서도 그 이용이 급속히 증가되고 있는데 (deLellis 등, 1979) 주로 이용되는 분야는 림프세망조직 종양에서 면역글로불린의 염색, 내분비종양의 polypeptide 호르몬의 염색, 종양성 혹은 전구 종양성 세포의 tumor marker 의 검출에 주로 이용되며 그 밖에 virus 성 항원의 검출과 사구체 신염등의 진단에도 이용된다(강과 김, 1981; 양, 1982; Robert 와 Robert, 1974).

면역세포화학을 적용함에 있어서 유의해야 할 점은 조직 및 세포의구조의 보존성, 나타내고자 하는 항원(tissue antigen)의 보존성 및 면역반응의 특이성

(specificity)을 유지시켜주어야 하는데 조직 및 세포의 구조의 보존성 및 항원의 보존성은 고정 및 포매과정에서 면역반응의 특이성은 염색과정에서 세심하게 고려되어야 한다(Petrusz 등, 1976, 1980).

면역세포화학법에는 상기한 바와 같이 immunofluorescence, immunoperoxidase 외에 avidin-biotin, protein A-gold labelling, immunoautoradiographic method (Cowan, 1972) 등이 개발되어 특수연구분야 뿐만 아니라 전문적인 연구실이 아니라도 병리조직검사 시설만 갖추어 있는 곳이면 이 염색을 실시할 수 있는데 본 연구에서는 PAP 기법과 avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 기법을 중심으로 광학현미경 수준에서의 면역조직화학법의 원리 및 실제에 관하여 고찰해 보고자 한다.

II. 결과 및 고찰

PAP 법은 3 개의 항체 즉 1차항체, 2차항체 및 PAP complex 를 이용한다(Sternberger, 1979). 1차항체는 항원에 특이한 항체이며 2차항체는 link antibody 라고도 하며 1차항체와 PAP complex를 결합하는 항체이다. PAP complex 는 효소인 peroxidase와 1차항체를 생산한 동물과 같은 종에서 얻은 antiperoxidase 를 결합하여 만든 항체를 이용하는 방법이다(fig. 1). PAP 법의 일반적 과정을 요약하면 고정, 조직처리, 항체반응 및 발색 등으로 요약할 수 있는데 각 단계별 원리 및 유의할 사항은 다음과 같다.

1. 항원의 보존 (antigen preservation)

1) 고정 (fixation)

면역조직화학법의 목적은 세포내 항원의 검출에 있으므로 항원항체반응이 잘 일어나려면 우선 세포내에 존재하는 항원(특정물질)이 잘 보존되어야 한다. 항원의 성분은 그 종류에 따라 매우 다양하나 대개 단백질로 되어 있어 쉽게 변성된다. 따라서 항체의 변성과 유실을 막고 동시에 세포의 구조를 잘 보존하기 위하여는 고정을 하거나 또는 확산되는 것을 막아야하며 고정액이 항원 자체를 파괴하지 말아야 하고 세포의 형태를 잘 보존하고 값이 싸고 구하기가 쉬운 것이어야 한다. 그러므로 최적의 고정 즉 staining artifacts를 막기 위하여 주의해야 할 점은 조직은 건조하면 안되며 가능한 빨리 고정액에 놓아야 한다. 두께가 4-6 mm 보다 작은 Block은 최소한 200ml의 고정액이 필요하다. Block이 크면 고정액의 완전한 침투를 막아 nonspecific staining을 초래한다. 고정 후 과잉 고정액을 철저히 수세하여 staining artifacts가 일어나지 않게 한다. 고정액의 침투를 용이하게 하고 시간을 단축시키기 위하여는 고정액이 생체의 혈관을 따라 유입되어 확산작용에 의하여 고정액이 원하는 조직내로 침투되어 고정시키는 관류법(perfusion)이 효과적이다.

고정액은 항원과 조직세포의 종류, 그리고 실험실 나름대로의 경험에 따라 선택하여야 할 것이나 aldehyde 계통의 고정제가 가장 흔히 사용되는데 10% neutral buffered formalin, Zenker' solution, Bouin's

solution, glutaraldehyde 및 paraformaldehyde 등이 이용된다.

2) 조직처리

면역세포화학반응의 최종결과는 현미경하에서 관찰되므로 고정이 끝난 조직은 소정의 조직표본 제작과정을 거쳐야 한다. Paraffin 포매법은 가장 흔히 이용되며 조직의 구조도 비교적 잘 보존되지만 조직이 비교적 높은 열(58-60°C)을 거치고 알코올 등

의 유기용매를 지나면서 호르몬이 누출되므로 세포표면 항원이나 열에 쉽게 파괴되는 효소등에는 사용할 수 없다. 동결절편법은 항원의 보존은 잘 되지만 세포의 구조는 Paraffin포매법에 미치지 못한다.

3) 생체조직절편제작(vibratome)

항원항체반응이 일어나려면 항체가 항원이 있는 조직(세포) 내로 쉽게 접근할 수 있도록 조직을 적절한 두께의 절편으로 만들

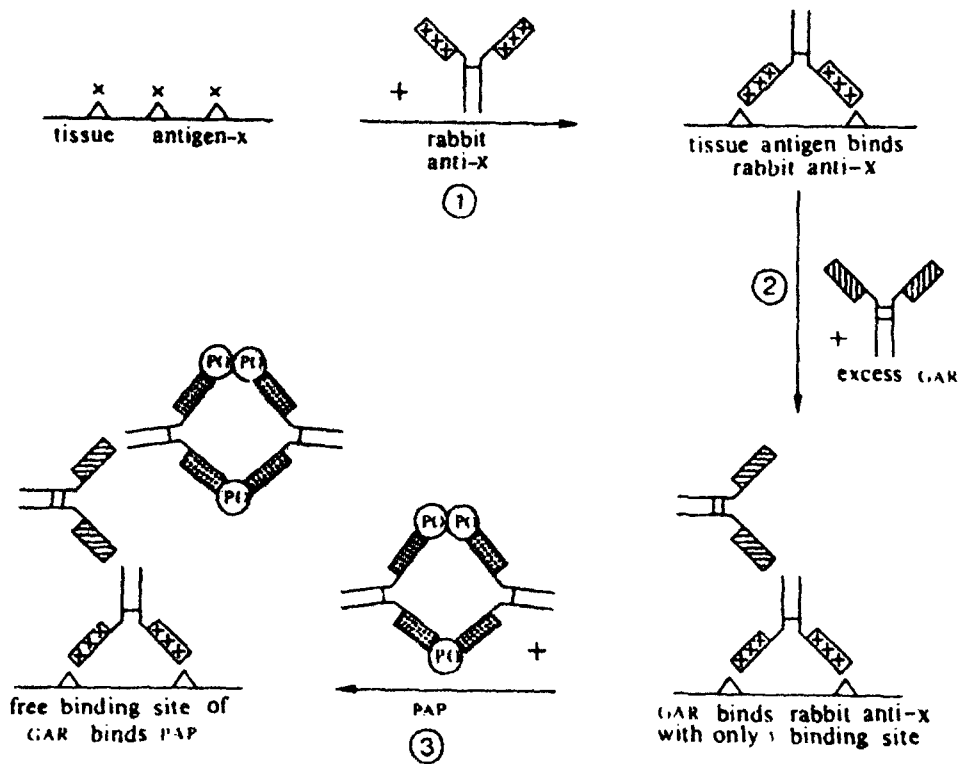


Fig.1. Staining sequence in the PAP method.

GAR : goat anti rabbit immunoglobulin

PO : horse radish peroxidase

어야 한다. 절편제작은 조직절편기(microtome), 동결절편기(cryo-cut), 생체절편기(vibratome) 등이 이용되나 이 중에서 생체절편기는 high frequency vibration을 이용하여 조직을 절단하기 때문에 조직의 손상을 최소한으로 줄일 수 있을 뿐만 아니라 절단에서 항체염색까지의 일련의 과정을 buffer 내에서 시행하므로 (free floating staining method) 호르몬의 유출 및 조직변성을 최소화할 수 있어 항원성 유지에 최적의 방법이며 생체조직절편법은 항원과 구조를 동시에 잘 보존할 수 있을 뿐만 아니라 면역세포화학반응 결과를 광학현미경으로 확인한 다음 전자현미경 표본으로 만들 수 있는 장점이 있다.

2. 항 체(antibody)

항체는 종래부터 흔히 사용하는 항혈청과 세포융합술에 의해 개발된 단세포군항체가 있다. 또한 좋은 결과를 얻기 위하여 항체는 최적으로 희석해 사용한다. 항체를 희석할 때 유의해야 할 사항은 다음과 같다. 용액내의 특이항체의 농도를 항체역가적정량이라 하며 1ml 내 항체분자가 많을수록 적정량이 높아진다(Lutz 등, 1979). 용액내에는 특이항체와 다른 물질이 존재하며 높은 수준의 오염된 단백질은 비특이 배경염색을 막기 위하여 고도로 희석해야 하고 일반적으로 반응시간(incubation time)이 길수록 항체를 더 희석해야 하는데 보통 20 분으로 일정하게 해야 한다. 만일 1시간으로 늘릴 경우 희석배율은 높여야 한다. 항체를 희석할 때는 1-20 μ l, 100-1000 μ l 의 범위를 가진 micropipet을 이용해야 한다. 항체는 buffer로 희석하는데 0.

05M tris (pH 7.6), phosphate buffered saline (PBS), tris buffered saline 등이 있다. Buffer 선택시 주의해야 할 점은 고농도의 antibacterial agent 인 sodium azide NaN_3 가 함유되어 있지 않아야 하는데 이것은 peroxidase와 발색원 사이의 결합을 막아 발색을 억제한다. 항체의 표지는 항체에 직접 표지하는 것과 peroxidase - antiperoxidase complex (PAP), avidin-biotin complex (ABC) 기법 등이 있는데 avidin-biotin의 결합력이 PAP 기법보다 8-40 배 예민하게 반응한다. 항체에 직접하는 경우 1차항체의 결합력을 높여주기 위하여 대개 2차항체에 표지시키며 PAP 이나 ABC의 경우 항원항체 반응에서 표지된 HRP의 양을 극대화시켜 조직내의 항원이 미량이고 보존이 어려운 표본에서 염색 반응의 효율을 높일 수 있다.

1) 항혈청

항혈청은 특정물질을 항원으로 삼아 이를 동물에 반복 주사하여 면역시킴으로써 얻어지는 것으로 이 때 항원의 순도가 높아야 좋은 항체를 얻을 수 있으며 항원의 크기가 작은 것은 큰 단백질 분자를 결합하여 항원성(antigenic determinants)을 높여 주어야 항체를 용이하게 얻을 수 있다. 얻어진 항체는 항원과의 특이결합(specific binding)이 인정되면 일련의 정제과정을 거쳐야 면역세포화학 반응에 이용할 수 있다. 이와같은 과정은 매우 번거롭고 노력이 많이 들 뿐만 아니라 일련의 항체특이성(specificity) 검정장치가 마련된 실험실이 아니면 시행하기 어렵다. 따라서 면역조직 화학에 큰 경험이 없으면 다른 실험실에서

만든 항체를 대여 받거나 상품으로 시판되는 것을 구입하여 시작하는 것이 바람직하다.

항체의 종류는 연구자 마다 어느 물질에 관심이 있느냐에 따라 다르며 항체를 만드는데 이용되는 동물도 rabbit, sheep, goat, swine 등 몇몇 종류가 있어 항체구입시 이런 점들을 고려해야 한다. 가령 "A"라고 하는 물질에 대한 면역세포화합염색을 하고자 rabbit anti-A 항체를 구입하였다면 2차 항체는 rabbit을 제외한 어느 동물의 것도 무방하나 반드시 anti-rabbit IgG를 구입해야 한다.

간접적으로 하려면 HRP (horseradish peroxidase)가 2차항체에 직접 표지된 anti-rabbit IgG-peroxidase를, ABC (avidin-biotin peroxidase complex)법으로 하려면 anti-rabbit-biotin과 avidin-biotin peroxidase를 그리고 PAP (peroxidase-antiperoxidase complex) 법으로 하려면 표지하지 않은 anti-rabbit과 rabbit PAP 를 각각 구입하여야 한다.

2) 단세포군 항체(monoclonal antibody)

면역세포화합의 장점은 지금까지 알려진 세포 또는 조직염색법 중에서 그 특이성 (specificity)이 가장 높다는 것이다. 그러나 이 뛰어난 특이성을 인정받으려면 염색 반응에 사용하는 항체가 세포속에 들어 있는 해당 항원에만 선택적으로 결합할 수 있는 특이성을 지녀야 한다(Cuello 등, 1982a)

동물체에 해당 항원을 반복주사(면역)하여 얻은 항혈청은 원하는 항체외에도 불필

요한 항체들이 함께 섞여 있는 다가혈청 (polyclonal antibody) 으로서 이들이 조직속에 들어 있는 물질들과 비특이반응 (non-specific reaction)을 일으켜 염색성이 떨어지는 문제가 있다. 가령 항체를 얻기 위하여 항원을 동물에 면역하면 혈청내에는 원하는 항체인 Ab1 외에도 Ab2, 3, 4, n 등의 불필요한 항체들이 함께 형성된다. 왜냐하면 동물체에 항원이 들어오면 면역에 관여하는 여러 종류의 세포를 동원하여 일련의 협동과정을 거친 다음 최종적으로 항체를 분비하는 형질세포를 만들어 내는데 이때 항원이 여러 개의 항원결정기 (antigenic determinant)를 가진 다가 항원이므로 Ab1을 분비하는 세포외에도 Ab2, 3, 4, n 을 분비하는 세포도 함께 생기기 때문에 항혈청 내에는 이들이 분비한 이질적인 항체들이 뒤섞여 있게 된다(fig.2). 이 불필요한 항체 성분을 제거하기 위하여 물리학적 또는 면역학적 정제 과정을 거치면 어느 정도 순수한 항체를 얻게되지만 이 과정 중에 상당량이 소실되고 재현성이 없기 때문에 동질의 항체를 만들 수 없는 한계성을 안고 있다.

a) 단세포군 항체 생성의 원리

항혈청이 갖고 있는 한계를 해결하기 위해서는 위에서 언급한 형질세포들을 시험관내에서 배양하여 선별적으로 가려낸다면 해결될 수 있을 것이며, 단세포군 항체 생성의 원리는 바로 이 점을 이용한 것이다. 그런데 형질세포는 고도로 분화된 세포이기 때문에 생체를 떠나 생존할 수 없다. 따라서 시험관내에서 왕성한 증식력을 보이는 일종의 형질세포종(plasmacytoma)과

의 세포 융합을 하면 이로부터 탄생된 잡종세포는 두 모세포의 특성 즉 항체를 분비하는 성질과 시험관내에서 증식 생존할 수 있는 성질을 모두 갖게되므로 언제든지 배양만 하면 필요한 항체를 얻을 수 있고 세포를 잘 보존하면 동질의 항체를 영구히 공급할 수 있는 길이 열리게 된다.

b) 세포융합술의 개요

형질세포들이 모여 있는 비장으로부터 세포를 분리하여 형질세포종과 시험관내에서 혼합 배양하면 일부의 세포는 세포막이 서로 맞붙어서 융합이 일어나는데 이 때 융합 빈도를 높이기 위해 polyethyleneglycol (PEG)이 이용된다. 융합된 세포는 이른바

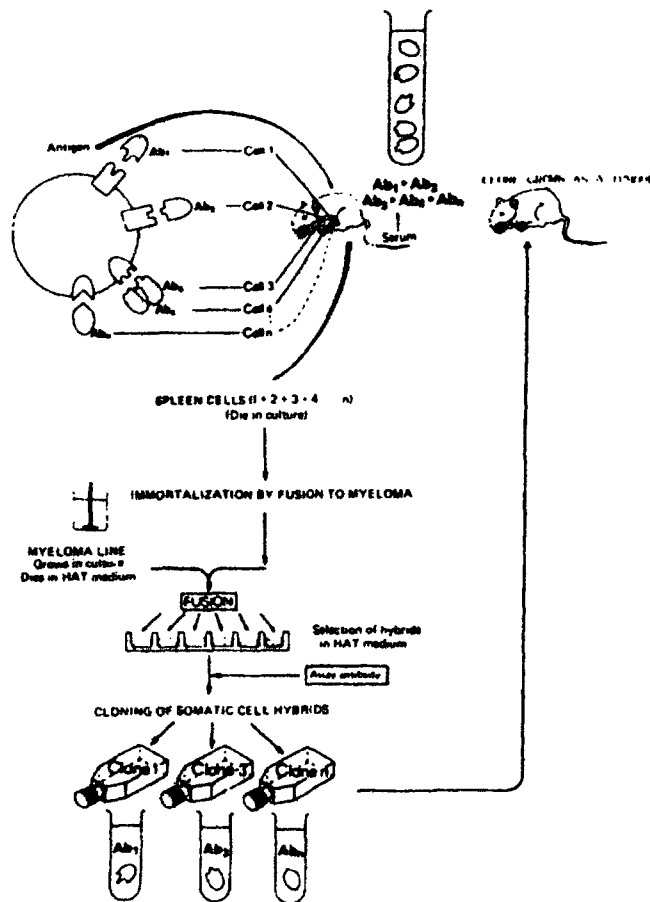


Fig.2. Scheme of the hybridoma technology as originally developed by Kohler and Milstein(1975).

HAT 배양액에 의하여 선별적으로 살아남게 되는데 이는 hypoxanthine, aminopterin, thymidine 이 적당한 농도로 첨가된 배양액으로 aminopterin은 세포의 nucleotide 생합성을 억제시킨다. 이 배양에서 변이세포인 형질세포종은 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT)라는 효소가 없어 hypoxanthine과 thymidine을 이용하여 nucleotide를 생합성할 수 있는 구제경로가 막히게 되므로 생존할 수 없고, 잡종세포는 이 구제경로를 통하여 살아남게 된다. 잡종세포는 증식이 왕성하여 곧 세포집락을 이루게 되는데 이 때부터 배양액을 거두어 항체분비 여부를 검색한다. 항체분비가 확인된 세포 집락은 작은 microwell 배양관 내에서 세포 하나씩 재배양하는 cloning 과정을 거쳐 다시 항체 분비가 확인되면 이를 단세포군 항체(monoclonal antibody)라고 할 수 있다(fig. 2). 새로운 단세포군 항체가 만들어지면 이 항체가 과연 해당 항원에만 선택적으로 결합하는 이상적인 항체인지를 검정해야 한다. 검정방법은 항체의 개발 목적이나 실험실 사정에 따라 달라질 수 있으나, 그 원리는 항원을 이용하여 해당 항체를 찾아내는 것이다(Hurrell, 1982; Kennett 등, 1988). 방사면역검정(radioimmunoassay)이나 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)는 다수의 표본을 다루기에 적합하기 때문에 흔히 1차 검정에 이용되고 있다(Engvall과 Perlmann, 1971).

c) 단세포군 항체의 장단점

단세포군 항체는 그 생성과정이 항혈청에

비하여 경비와 시간이 걸리는 어려움이 있지만 일단 성공하면 세포배양상에서 영구히 분열증식하여 항체를 생산하므로 특이성이 높은 동질의 항체를 무한정 공급할 수 있는 장점이 있다. 그러나 인공적인 조작인 세포융합으로 만들어진 세포이므로 과다한 염색체를 소지하고 있어 배양을 계속하는 도중 immunoglobulin 유전자의 손실을 초래할 경우도 있고 유전자의 간섭 또는 재활성이 일어나 이질적인 세포로 변하는 경우도 있다. 또한 단세포군 항체는 거대한 항원 분자 중에 있는 다양한 항원 결정기 중에서 특정항원결정기 하나에만 결합하므로 항혈청에서와 같이 이차적 항원항체에 의한 현상이 나타나지 않는 경우가 있어 연구목적에 따라 실험실 나름대로의 검색방법을 개발하여야 한다.

4. 발색원(chromogen)

면역세포화학의 최종결과는 현미경을 통하여 눈으로 볼 수 있는 산물을 만드는 것이다. 그런데 항원항체는 모두 분자(macromolecule) 수준의 물질들이므로 이들이 서로 결합반응을 했어도 현미경 수준에서 보이지 않는다. 따라서 면역세포화학 염색은 항체에 미리 발색원을 표지하여 항원항체반응이 일어난 부위를 알아볼 수 있도록 하는 것이다. 조직처리가 끝나면 1차항체를 반응시키고 다시 2차항체의 적용과 발색과정이 뒤따르는데 발색원은 몇몇 종류가 있으나 이들 발색원은 과산화효소에 특이해야 하며 오래두어도 변색되지 않고 광학현미경하에서 색이 선명한 것이라야 한다. 가장 널리 사용되는 발색원은 diaminobenzidine 인데 갈색을 나타내고 hematoxylin

대조염색과 좋은 대조를 이루지만 발암물질이기 때문에 세심한 주의를 요한다. 2종 이상의 항원의 소재를 동시에 밝히기 위하여 여러 발색원이 사용되는데 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)은 붉은색을 나타내며 alcohol에 녹고 발색 후 오래가지 않는다. p-penylelenediamine은 흑청색 반응을 하고 alcohol에 녹지 않는다. 그외 α -naphthol 등이 발색원(chromogen)으로 사용된다.

5. 비특이반응 (non-specific reaction)

면역세포화학에서 흔히 문제가 되는 것은 비특이반응이다. 비특이반응을 일으킬 수 있는 요인은 항체의 순도 및 특이성 등 항체 자체에 문제가 있을 경우도 있지만, 염색의 시행 과정에서 일어난 경우가 많다. 즉 조직내에 HRP 와 유사한 내인성 과산화효소(endogeneous peroxidase)가 들어 있을 경우 염색전에 이 내인성 과산화효소를 제거하지 않으면 이들이 diaminobenzidine에 반응하여 비특이반응을 나타내어 내인성과산화효소를 특이항원으로 오인할 수가 있다. 이 때 methanol에 희석된 과산화수소(0.5% H_2O_2)로 일정시간 조직을 처리하면 효과를 볼 수 있다. (Strauss, 1971; Streefkerk, 1972). 또한 항혈청내에는 immunoglobulin 외에도 수 많은 물질들이 함께 들어 있어 항원항체의 특이반응 이외에 혈청내의 성분과 세포내의 구성 물질이 결합할 수도 있다. 이런 경우 2차 항체를 만든 동물의 정상혈청(normal serum)으로 조직을 미리 처리하여 주면 비특이결합을 어느 정도 방지할 수 있다. 그리고 항체를 가능한한 최대한으로 희석하

여 사용할수록 이와같은 비특이결합을 최대한으로 줄일 수 있으나 이 때 반드시 항체의 검출 한계(titer)를 고려해야 한다. PAP법, ABC법 등은 항원항체반응이 일어난 정도를 최대한으로 증폭시켜 주는 방법이므로 1차항체의 희석도를 높이는데 매우 효과적이다.

또한 조직을 염색할 때 마다 특정한 항원에 대해 이미 양성이나 음성으로 확정되어 있는 조직을 동시에 염색하여 염색과정의 적합성 여부를 확인하거나, 1차항체를 생략하거나, 1차항체를 생략하고 대신 같은 종의 면역복합체를 제거한 후 조직에 반응시켰을 때 염색이 약화되거나 소실되어 지는 점도 이용하여 비특이반응을 규명해서 처리할 수 있다(Vandesande, 1979).

6. 면역조직화학법의 실제 이용

1) 심장관류(cardiac perfusion)

원하는 조직을 얻기 위하여는 고정을 하여야 하는데 이 방법중에는 심장으로 직접 고정액을 유입시키는 방법이 가장 이상적인데 그 방법(protocol)은 다음과 같다. 먼저 복강을 통해 마취를 한다 (흰쥐의 경우 pentobarbital sodium (Somnopenyle)을 체중 kg당 50 mg). 흉곽을 열고 좌심실로 cannula 를 삽입하고 우심이를 절제한다. 그 후 0.9% saline solution 을 심장관류하여 세척시키고 고정액을 관류시켜 고정시킨다. 관류고정된 해당 조직을 절제하여 동일 고정액에 12-16 시간 더 침윤고정 (immersion fixation)시킨다.

2) 생체조직절편제작(vibratome)

생체절편기는 razor blade를 진동 진전시켜 고정된 block을 buffer 내에서 절단하는 기구로서 뇌의 경우 cutting speed 1.5-2, frequency 8-9가 적합하다. 고정된 조직은 생체절편기를 이용하여 50 μ m 두께의 횡단 및 시상 연속절편을 제작하고 section된 절편은 미세한 붓을 이용하여 buffer를 채운 직경 1.5cm 정도의 well을 지닌 plastic jar에 순서대로 띄운다. Buffer로는 phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 4°C 에서 2시간 수세하는데 항체의 조직 투과성을 높여 조직내로의 침투력을 강하게 하기 위해 Triton X-100을 0.05% 가 되게 희석하여 사용한다. 완성된 연속절편 (serial section)은 간격을 두어 추출하여 cresyl violet 등의 염색을 함으로써 관찰하고자 하는 구조가 포함된 절편의 부위를 선정한다. 선정된 절편을 dissecting microscope 하에서 1차 삭정 (trimming)하면 항체 (antibody reagent)의 양을 절약할 수 있다.

3) 면역세포화학적 염색 (immunocytochemical staining)

제작된 조직절편은 PBS buffer로 10분씩 3번 수세하고 비특이반응을 없애기 위해 normal serum 에 10분간 반응시킨 뒤 조직내의 여분의 normal serum을 spoid로 뽑아낸 후 1차항체를 실온에서 12시간 반응시킨다. buffer로 수세하고 2차항체 (link antibody or biotinylated antibody)를 실온에서 1시간 반응시킨 뒤 buffer로 수세한다. PAP complex 또는 avidin-biotin peroxidase complex를 실온에서 1시간 동안 반응시킨다. buffer로 수세하고 3.3-

diaminobenzidine tetrachloride를 실온에서 5-10분간 반응시키고 증류수로 10분간 수세한다. 발색반응이 완료된 조직은 gelatin을 입힌 슬라이드에 얹어 실온에서 건조시킨 후 통상의 방법대로 투명화과정을 거쳐 permount로 봉입하여 광학현미경하에서 관찰한다.

III. 결론

광학현미경 수준에서의 면역조직화학법의 원리와 실제에 관하여 고찰하여 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 면역세포화학은 항원항체반응의 원리를 이용하여 특정물질의 세포내 소재를 검색하는 방법이다.
2. 면역세포화학법에서 중요한 요소는 항원, 항체, 발색원이다.
3. 고정은 심장관류고정이 이상적이다.
4. 조직절편은 생체절편기를 이용하여 제작한다.
5. 모든 염색반응은 자유부유법으로 한다.
6. 항체는 다가항혈청과 단클론 항체가 있다.

References

1. Boorsma, D.M and Kalsbeek, G.L : A comparative study of horseradish peroxidase conjugates prepared with a one-step and a two-step method. J. Histochem. Cytochem., 23 : 200-207, 1975.
2. Boorsma, D.M., Streefkerk, D.F. and Kors, N. : Peroxidase and fluorescein isothiocyanate as antibody

- markers. A quantitative comparison of two peroxidase conjugates prepared with glutaraldehyde or periodate and a fluorescein conjugate. *J. Histochem. Cytochem.*, 24 : 1017-1025, 1976.
3. Bullock, G. and Petrusz, P. : Techniques in immunohistochemistry. Vol. 2, Academic press, 1983.
 4. Burna, J. : Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. *Histochemistry*, 43 : 291-294, 1975.
 5. Clyne, D.H., Norris, S.H., Modesto, R.R., Pesce, A.J. and Pollak, V. E. : Antibody enzyme conjugates. The preparation of intermolecular conjugates of horseradish peroxidase and antibody and their use in immunohistology of renal cortex. *J.Histochem.Cytochem.*, 21 : 233-240, 1973.
 6. Coons, A.M. Creech, M.J. and Jones, R.N. : Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc.Soc.Exp.Biol.*, 47 : 200, 1941.
 7. Cowan, W.M., Gottlieb, D.I., Hendrickson, A.E., Price, J.L. and Woolsey, T.A. : The autoradiographic demonstration of axonal connections in the central nervous system. *Brain Res.*, 37 : 25-71, 1972.
 8. Cuello, A.C. : *Immunohistochemistry*. Vol. 3, John Wiley & Sons, 1984.
 9. Cuello, A.C., Priestley, J.V. and Milstein, C. : Immunohistochemistry with internally labelled monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 79 : 665-669, 1982a.
 10. deLellis, R.A., Sternberger, L.A., Mann, R.B., Banks, P.M. and Nakane, P.K. : Immunoperoxidase techniques in diagnostic pathology. *Am.J.Clin.Pathol.*, 71 : 483, 1979.
 11. Engvall, E. and Perlmann, P. : Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitative assay of immunoglobulin. *Immunohistochemistry*, 8 : 871-880, 1971.
 12. Graham, R.C and Karnovsky, M. J. : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique, *J.Histochem. Cytochem.*, 14 : 291, 1966.
 13. Hurrell, J.G.R. : Monoclonal hybridoma antibodies ; Techniques and applications. CRC Press, 1982.
 14. Kennett, R.H., McKean, T.J. and Bechtol, K.B. : Monoclonal antibodies hybridomas : A new dimension in biological analyses. Plenum Press, 1988.
 15. Lutz, H., Higgins, J., Pederson, N.C and Theilen, G.H. : The demonstration of antibody specificity by a

- new technique. *J.Histochem.Cytochem.*, 27 : 1216-1220, 1979.
16. Mason, T.E., Phifer, R.F., Spicer, S.S., Swallow, R.A. and Dreskin, R. B : New immunochemical technique for localizing intracellular tissue antigen. *J.Histochem.Cytochem.*, 17 : 190, 1969a.
 17. Nakane, P.K. and Kawaoi, A. : Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. *J.Histochem. Cytochem.*, 22 : 1084-1091, 1974.
 18. Nakane P.K. and Pierce, G.B. : Enzyme-labelled antibodies for the light and microscopic localization of tissue antigens. *J.Cell Biol.*, 33 : 307, 1967.
 19. Petrali, J.P., Milton, D.W., Moriarty, G.C and Sternberger, L. A. : The unlabelled antibody enzyme method of immunocytochemistry. Quantitative comparison of sensitivities with and without peroxidase-antiperoxidase complex., *J.Histochem.Cytochem.*, 22 : 782-801, 1974.
 20. Petrusz, P., Ordronneau, P. and Finley, J.C.W. : Criteria for reliability for light microscopic immunocytochemical staining. *Histochem. J.*, 12 : 333-348, 1980.
 21. Petrusz, P., Sar, M., Ordronneau, P. and DiMeo, P. : Specificity in immunocytochemical staining. *J.Histochem.Cytochem.*, 24 : 1110-1115, 1976.
 22. Robert, J.L. and Robert, D.C. : Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*, 34 : 1488-1503, 1974.
 23. Sternberger, L.A. : *Immunocytochemistry*, 2nd. ed., John Wiley & Sons, New York, 1979.
 24. Sternberger, L.A., Hardy, P.H.Jr., Cuulis, J.J. and Meyer, H.G. : The unlabelled antibody- enzyme method of immunohistochemistry preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase -antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J.Histochem. Cytochem.*, 18 : 715, 1970.
 25. Strauss, W. : Inhibition of peroxidase by methanol -nitroferricyanide for use in immunoperoxidase procedures. *J. Histochem.Cytochem.*, 19 : 682-688, 1971.
 26. Streefkerk J.G. : Inhibition pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J.Histochem.Cytochem.*, 20 : 829-931, 1972.
 27. Vandesande, F. : A critical review of immunocytochemical methods for light microscopy. *J.Neurosci.Meth.*, 1 : 3-23, 1979.
 28. Tougard, C., Tixier-Vidal, A. and Avrameas, S. : Comparison between peroxidase-conjugated antigen or antibody and peroxidase-antiperoxidase complex in a postembedding procedure. *J.Histochem.Cytoche.*, 27 : 1630-1633, 1979.

29. 강종명, 김기홍 : 면역과산화효소법을 이용한 면역조직학적 염색방법.
대한병리학회지, 1 : 1-7, 1981.
30. 양문호 : peroxidase-antiperoxidase 염

색에 의한 각종 악성 임파종의 비교관찰.
경희의대 논문집. 7.1) : 31-38.

부 록

THI 健康調査票

이 조사표는 당신의 건강상태를 알기 위해서 만들어진 것이오니 사실대로 기입하여 주십시오. 이 표에 대해서는 절대 비밀이 보장되도록 하겠습니다.

기입년월일 :

성명 : 성별 : 남 여
 연령 : 만 세 직업(자세하게) :
 근무년수(현재의 직업) : 년 개월
 결혼상태 : 미혼 기혼 이혼 사별 기타
 현거주지 :

다음 질문에 대해서 가장 맞는 답에 ○표를 해 주십시오. 확실하지 않은 경우에도 잘 생각하여 어느 하나에 ○표를 해 주십시오.

- 1.F 탄 것을 좋아 합니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 2.G 월척자고 일찍 일어나는 편입니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 3.D 입안이 부르튼 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 4.I 머리(頭)가 아픈 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 5.A 요즈음 기침을 합니까?
자주 가끔 아니오

- 6.B 피부(皮膚)가 약한 편입니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 7.C 소화가 안되는 경우가 있습니까?
자주 어느쪽도 아님 아니오
- 8.H 안절부절 하는 경우가 있습니까?
예 어느쪽아님 아니오
- 9.J 얼굴이 빨개집니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 10.E 신경이 예민한 편입니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 11.K 요즈음 원기가 있습니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 12.L 부자를 부러워 한다고 생각합니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 13.I 현기증이 일어나는 경우가 있습니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 14.F 추위를 타는 편입니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 15.G 간식(間食)을 합니까?
자주 가끔 아니오
- 16.D 혀(舌)가 부러트는 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 17.I 머리가 멍한 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 18.A 재채기가 나는 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 19.B 눈이 쉽게 피로해집니까?
자주 가끔 아니오
- 20.C 트림이 나는 경우가 있습니까?
예 가끔 아니오
- 21.H 사람을 기다리는 동안 안절부절 합니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 22.J 지나간 일을 일부러 생각 합니까?
예 어느쪽도 아님 아니오

- 23.E 행동을 하기전에 잘 생각합니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 24.I 손발에 힘이 빠진 경우가 있습니까?
예 가끔 아니오
- 25.J 자신이 다른 사람에게 오해받기 쉬운 성격이라고 생각합니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
26. 항상 침착하고 좀처럼 당황하지 않습니까?
예 조금 아니오
- 27.D 잇몸의 색깔이 나쁠까?
꽤 조금 아니오
- 28.G 주위사람들로 부터 얼굴색이 안 좋다는 말을 들습니까?
자주 가끔 아니오
- 29.H 하던 일이 자기 마음에 안들면 그만 둡니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 30.A 목이 쉼직한 느낌이 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 31.B 부스럼이 잘 생깁니까?
자주 가끔 아니오
- 32.K 인생(人生)이 허전하고 희망(希望)이 없다고 생각합니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 33.C 명치부분(膺)이 아픈 경우가 있습니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 34.F 자신의 체중(體重)에 관해 어떻게 생각합니까?
너무살이찼다 보통이다 말랐다
- 35.I 온 몸의 구석구석이 아픈 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 36.L 아는 사람중에 싫어하는 사람이 있습니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 37.K 항상 재미없고 기분이 우울합니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 38.L 청중앞에서 자연스럽게 의견을 발표할 수 있습니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 39.I 머리(頭)가 무겁다고 생각하는 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오

- 40.J 주위사람들이 자신을 어떻게 생각하는가에 신경이 쓰입니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 41.E 모든 일에 열성적이라고 생각하십니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 42.D 입에서 나쁜 냄새가 납니까?
꽤 조금 아니오
- 43.G 식욕(食慾)이 없는 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 44.HL 무례(無禮)한 사람에게 상냥하게 대하지 않습니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 45.F 일어설때 어지러운 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 46.K 모임에 참가해도 항상 외로움을 느낌니까?
자주 가끔 아니오
- 47.L 종교서적이나 철학서적을 읽습니까?
자주 가끔 아니오
- 48.A 가래(·)가 끓는 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 49.B 눈이 충혈되어 새빨갳게 되는 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 50.I 군침을 삼키는 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 51.C 설사를 하는 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 52.I 어깨가 결리고 아픈 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 53.J 식은땀을 흘리는 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 54.E 옷이나 손에 묻은 때가 마음에 걸립니까?
자주 가끔 아니오
- 55.I 눈이 어렴풋이 희미하게 보이는 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
- 56.D 잇몸에서 피가 나오는 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오

- 57.G 의사가 혈압(血壓)에 관하여 당신에게 말한 경우가 무어라고 말했습니까?
 고혈압 어느쪽도 아님 저혈압
- 58.H. 불평불만이 많은 편이라고 생각하십니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
59. 매일 50개피 이상의 담배를 피웁니까?
 예 가끔 아니오
- 60.K 세상에서 혼자뿐이라고 느낄때가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 61.L 탐의 소문을 얘기합니까?
 자주 가끔 아니오
- 62.A 콧물이 나는 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 63.B 두드러기가 나는 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 64.C 이를 닦을 때 구역질이 나는 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 65.I 허리가 아픈 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 66.J 정신적으로 피곤한 편입니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 67.I 몸이 뜨겁거나 미열이 있거나 합니까?
 자주 가끔 아니오
- 68.L 그날에 할 일을 꼭 끝마칩니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 69.I 등이나 등뼈가 아픈 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 70.D 변비(便秘)가 있는 편입니까?
 자주 가끔 아니오
- 71.G 하는 일이 힘들다고 느낍니까?
 자주 가끔 아니오
- 72.H 깊이 생각하지 않고 행동하는때가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 73.F 술을 많이 마십니까?
 자주 가끔 아니오

- 74.K 사람을 만나고 싶지 않은 때가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 75.E 모든일에 민감한 편입니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 76.I 빨리 걸으면 숨이 가빠집니까?
 자주 가끔 아니오
- 77.J 시험을 볼 때 시험관이 앞에서 질문하면 땀이 납니까?
 예 가끔 아니오
- 78.F 몸이 약한 편입니까?
 예 조금 아니오
- 79.J 낮선 장소에서는 당황합니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 80.D 대변을 볼 때 흥문(門)이 아픈니까?
 자주 가끔 아니오
- 81.J 기분에 너무 좌우 된다고 생각합니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 82.GI 요즈음 몸이 나른합니까?
 항상 가끔 아니오
- 83.J 하찮은 일에도 걱정이 됩니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 84.A 감기에 쉽게 걸립니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 85.BI 눈이 쓰리고 아픈 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 86.C 위장(胃臟) 상태가 나쁜 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 87.J 높은 사람이 가까이 오면 떨리게 됩니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 88.B 눈꺼풀이 무겁다고 느낀 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 89.AI 코가 막히는 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 90.K 열등감을 느낍니까?
 자주 가끔 아니오

- 91.G 요즈음 일찍 일어나는 것이 힘듭니까?
 항상 가끔 아니오
92. J 야단을 맞으면 몸이 움추러듭니까?
 자주 가끔 아니오
- 93.I 속상한 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 94.D 치질로 인해 출혈(出血) 합니까?
 자주 가끔 아니오
- 95.G 아침을 먹지 않습니까?
 항상 가끔 아니오
- 96.H 하찮은 일에 버럭 화를 냅니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 97.A 숨을 쉴 때 쉬-소리가 납니까?
 자주 가끔 아니오
98. 매우 화가 난 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 99.B 빨갡게 부스럼(發疹)이 생깁니까?
 자주 가끔 아니오
- 100.K 우울한 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 101.C 위(胃)가 무겁거나 채한 경우를 느낍니까?
 자주 가끔 아니오
- 102.L 신문사설을 매일 읽습니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 103.I 편하게 쉬고 싶을 때가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 104.D 입이 부풀어 오르거나 열이 나는 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 105.J 밤중에 갑작스러운 소리에 떠는 경우가 있습니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 106.AI 목이 아프거나 아릿한 느낌을 갖습니까?
 자주 가끔 아니오
- 107.E 자신이 신경질적 이라고 생각합니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오

- 108.B 눈썹이 많이 꺾니까?
 많이 보통 아니오
- 109.K 자신의 생활방식이 틀렸다고 생각합니까?
 자주 가끔 아니오
- 110.L 다른 사람에게 자신을 잘 보이고 싶습니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 111.C 식후에 위(胃)가 아픈 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 112.E 걱정을 잘하는 편입니까?
 예 가끔 아니오
- 113.G 요즈음 수면 부족입니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 114.D 잇몸이 부은 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 115.H 누구에게 명령을 받으면 싫습니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 116.F 자신의 마음이 좁다고 생각하십니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 117.A 가래가 나옵니까?
 자주 가끔 아니오
- 118.B 피부가 가려운 경우가 있습니까?
 자주 가끔 아니오
- 119.K 요즈음 무슨 일로 인해 자신이 없어 졌습니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 120.I 얼굴이 화끈거리거나 머리가 지끈거립니까?
 자주 가끔 아니오
- 121.J 다른 사람이 보고 있으면 일이 손에 안 잡힙니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 122.G 식사가 불규칙적 입니까?
 자주 가끔 아니오
123. 세상을 깜짝 놀라게 해 보고 싶습니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오
- 124.E 자신의 성격이 까다로운 편입니까?
 예 어느쪽도 아님 아니오

- 125.H 다른 사람 옆에서 서두르면 화를 냅니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 126.L 짧은 시간(短時間) 내에 많은 일을 해낼 자신이 있습니까?
예 어느쪽도 아님 아니오
- 127.C 공복시(空腹時)에 위(胃)가 아픈 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
128. 아랫 배가 아픈 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
129. 계단을 오르내리기가 힘든 경우가 있습니까?
자주 가끔 아니오
130. 걸음을 급히 하면 숨이 막힐 때가 있습니까?
자주 가끔 아니오