

# 파라핀 기반의 조직회수도구를 사용한 채취 조직의 진단 프로토콜 개발

정효영<sup>1,2</sup>, 구교인<sup>1</sup>, 이상민<sup>1</sup>, 박호수<sup>1</sup>, 홍석준<sup>1</sup>, 방승민<sup>3</sup>, 송시영<sup>3</sup>, 조동일<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 공과대학 전기컴퓨터공학부 자동화시스템연구소 / 반도체연구소

<sup>2</sup>서울대학교 공과대학협동과정 바이오엔지니어링 전공

<sup>3</sup>연세대학교 의과대학 소화기내과

## Development of Diagnosis Protocol for Micro-spike Biopsy Using Paraffin-based Tissue Collecting tool

Hyo-young Jeong<sup>1,2</sup>, Kyo-in Koo<sup>1</sup>, Sangmin Lee<sup>1</sup>, Hosoo Park<sup>1</sup>, Suk-jun Hong<sup>1</sup>, Seoung-Min Bang<sup>3</sup>, Si-young Song<sup>3</sup>, Dong-Il "Dan" Cho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ASRI / ISRC, School of Electrical Engineering and Computer Sciences, Seoul National University, Seoul, Korea

<sup>2</sup>Interdisciplinary Program of Bioengineering, Seoul National University, Seoul, Korea

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

(Received November 18, 2009. Accepted April 4, 2010)

### Abstract

We have developed and reported several micro-spikes for minimally invasive biopsy. This paper presents a diagnosis protocol for micro-spike biopsy using paraffin-based tissue collecting tool. Using the proposed tissue collecting tool, which has a negative micro-spike structure in a porous chamber, the biopsied tissue in a micro-spike is effectively detached. The proposed diagnosis protocol prevents the loss of tissues in a paraffin embedding and sectioning process. Hence, it is compatible with conventional histopathology without additional reagents and processes. The gastro-intestinal tissue of a pig is biopsied in an *in vivo* environment, and then it is detached from a micro-spike using the paraffin-based tissue collecting tool. A histopathological photomicrograph of the detached tissue is acquired with the proposed diagnosis protocol. The acquired image offers clinical quality. This result shows that the paraffin-based tissue collecting tool is applicable to the medical practice.

Key words : micro-spike, paraffin-based tissue collecting tool, detaching tool, biopsy, diagnosis

## 1. 서론

**일** 반적으로 소화기 암이 의심되는 경우, 조직 채취 도구를 이용하여 환자의 위장관 벽에서 병변 조직을 채취하여 조직 검사를 시행한다[1]. 기존의 조직 채취 도구는 집게 모양의 도구로 병변 조직을 잡아서 뜯어내는 형태로써[2], 이 과정에서 천공사고를 비롯한 의료사고가 발생할 수 있다[3]. 이러한 기존의 집게 모양 조직 채취 도구의 문제를 해결하고자 본 연구진은 최소침습적 생검이 가능한 마이크로 스파이크를 이용한 조직 채취 도구를 개

발하였다[4-9]. 개발된 마이크로 스파이크로 채취된 조직을 관찰하는 과정에서 기존의 조직병리검사 표본제작과정에 사용되는 장비들에 적용 가능한 조직 회수 방법의 필요성이 제시되었다. 이에 본 연구진은 PDMS 재질의 조직회수도구를 개발하였었고[10], 본 논문에서는 PDMS 재질의 조직회수도구를 개선한 파라핀 기반의 조직회수도구에 관해 기술하고자 한다.

본 연구진이 개발한 마이크로 스파이크는 몸통과 돌기(barb)가 달려 있는 축(shank)으로 구성된다. 마이크로 스파이크를 사용한 생검은 그림 1과 같이 마이크로 스파이크로 점막을 찌르게 될 때 돌기(barb)가 달려 있는 축(shank) 사이에 조직이 채취 되는 원리로, 최소침습적으로 조직을 채취하기 때문에 천공의 위험을 줄일 수 있다. 이전 연구들에서는, 핀셋을 사용하여 스파이크의 축(shank) 사이에 채취된 조직을 끊어서 분리하였다. 이와 같이 핀셋

**Corresponding Author :** 조동일  
(151-744) 서울대학교 관악구 신림동 56-1 서울대학교 전기컴퓨터공학부  
Tel : +82-2-880-8371 / Fax : +82-2-882-4658  
E-mail : dich@snu.ac.kr  
본 연구는 지식경제부의 21세기 프론티어 기술개발사업인 지능형마이크로시스템개발사업(<http://www.microsystem.re.kr>)의 연구비 지원 및 포항가속기연구소(Pohang accelerator laboratory)의 실험지원을 받아 수행되었습니다.

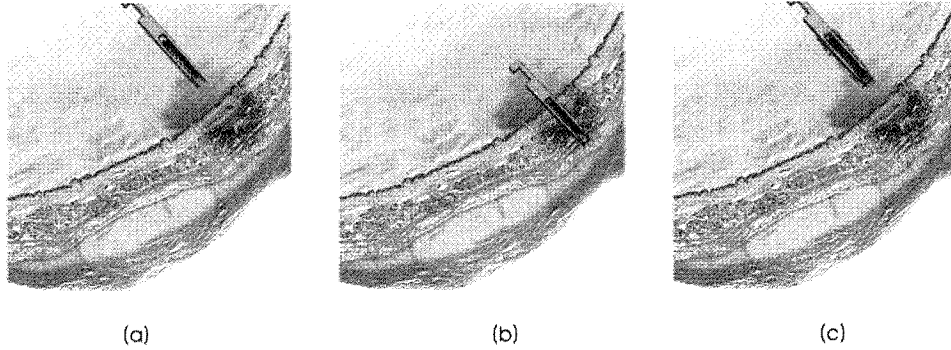


그림 1. 마이크로 스파이크 생검 원리 (a), (b) 목표 지점에 마이크로 스파이크 삽입 (c) 마이크로 스파이크를 빼면서 조직 획득  
 Fig. 1. Tissue extracting mechanism with micro-spike (a), (b) Inserting the micro-spike into target spot (c) Retracting the tissue by pulling out the micro-spike

을 사용하여 분리할 경우 돌기(barb) 사이에 있는 조직을 분리하는 것이 어렵고 채취한 조직을 분리하더라도 염색 과정에서 조직을 분실할 수 있는 문제점이 있다.

이와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 마이크로 스파이크의 역상 구조물을 포함하는 PDMS 도구를 제작하여, 역상 구조물에 채취된 조직을 회수하는 조직회수도구를 개발하여 발표하였다[10]. 채취 조직의 관찰을 위하여 채취, 고정, 탈회, 수세, 탈수, 투명, 침투, 포매, 절편, 염색, 봉입의 조직병리검사 표본제작과정을 거친다[11]. 본 연구진이 발표한 PDMS 조직회수도구는, 파라핀 절편 과정에서 파라핀과의 물성차이로 인해 자동화 절편기의 칼날에 걸리는 문제가 있었다. 이는 절편을 불균일하게 생성하며 결과적으로 조직사인의 해상도에 한계를 가져온다. 이를 해결하기 위하여 수작업을 통한 절편과정이 추가적으로 요구되었다. 하지만 추가적인 수작업의 절편과정은 자동화 기기를 사용하는 조직병리검사 표

본제작과정에서 시간 및 비용 상승의 문제점을 초래한다.

이러한 문제를 해결하기 위하여 본 논문에서는 파라핀 재질의 조직회수도구를 고안하여 기존의 조직병리검사 표본제작과정에 적용하였다. 그리하여 추가적인 수작업의 절편과정을 배제시켜 과정을 단순화하였고, 전 과정을 기존의 조직병리검사 표본제작과정과 호환되도록 하여 효율을 높일 수 있었다. 결과적으로 본 논문에서 제시한 파라핀 조직회수도구를 생체 내 실험에 적용하여 마이크로 스파이크로 채취한 돼지 위장 조직의 세포관찰에 성공하였다.

## II. 파라핀 조직회수도구의 구조 및 동작방법

파라핀 조직회수도구는 채취된 조직을 분리하는 챔버와 분리된 조직의 유실을 막는 커버로 구성된다. 챔버의 크기는 가로 11.5 mm, 세로 7.25 mm, 높이는 4 mm 이고, 커버의 크기는 가로 11.5

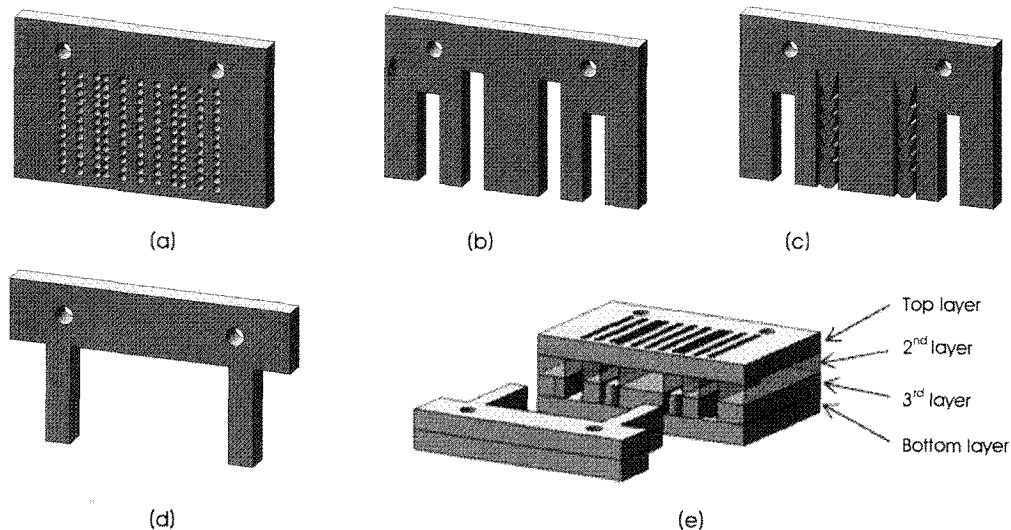


그림 2. 조직회수도구의 4개 층 구성 (a) 챔버- 첫 번째, 네 번째 층 (b) 챔버- 두 번째 층 (c) 챔버- 세 번째 층 (d) 커버 (e) 접착 완료된 조직회수도구  
 Fig. 2. 4 layers composition of micro-tissue collecting tool (a) chamber - 1<sup>st</sup> layer, 4<sup>th</sup> layer (b) chamber - 2<sup>nd</sup> layer (c) chamber - 3<sup>rd</sup> layer (d) cover (e) schematic of the bonded paraffin micro-tissue collecting tool

mm, 세로 4.5 mm, 높이는 2 mm 이다.

그림 2에서 보는 것과 같이 조직회수도구의 챔버는 총 4개의 층으로 구성된다. 첫 번째와 네 번째 층에는 직경 0.3 mm의 구멍이 가로, 세로로 배열되어 있어 파라핀 블록 제작 과정에서 챔버 안으로의 용액 침투를 원활하게 한다. 두 번째 층은 채취된 조직을 가진 마이크로 스파이크가 조직회수도구 내로 들어가기 위한 층이다. 입구의 폭은 마이크로 스파이크의 폭과 같은 크기로, 마이크로 스파이크가 조직회수도구로 들어갈 때, 마이크로 스파이크를 인도해 주는 역할을 한다. 세 번째 층은 마이크로 스파이크와 마이크로 스파이크로 채취된 조직을 분리하는 층이다. 두 번째 층에서 세 번째 층으로 마이크로 스파이크를 내리면서 조직은 마이크로 스파이크와 분리되고 역상의 상단 부에 놓여지게 된다.

그림 3은 본 논문에서 제시한 파라핀 조직회수도구를 사용하여 마이크로 스파이크로 채취한 조직을 마이크로 스파이크로부터 분리하는 과정의 개념도이다. 채취된 조직을 가진 마이크로 스파이크를 파라핀 조직회수도구에 밀어 넣고 마이크로 스파이크를 아래로 내리면서 마이크로 스파이크와 조직을 분리한다. 그 후 조직이 분리된 마이크로 스파이크를 파라핀 조직회수도구에서 제거하고 분리된 조직의 유실을 막기 위하여 챔버의 양 끝 음각 레일을 따라서 커버를 끼우게 된다.

### III. 공정과정

파라핀 조직회수도구를 제작하기 위하여 고종형비의 주형 제작에 적합한 LiGA (Lithographie, Galvanoformung, Abformung) 공법을 사용하였다[12]. 먼저, 파라핀 레이어 제작을 위한 PMMA (Poly(methyl methacrylate)) 주형을 제작하였다. 그 후, 주형에 파라핀을 부어서 파라핀 층을 제작하였고, 각각의 파라핀 층을 접착하여 파라핀 조직회수도구를 제작하였다. 그림 4는 LiGA 공법을 사용한 파라핀 조직회수도구의 공정도이다. 먼저, titanium sheet 위에 liquid PMMA(950 PMMA C9, Microchem)를 도포 후 180℃에서 3시간 동안 경화시킨다. 경화된 PMMA 위에 MMA(methylmethacrylate) 용액을 도포 후 1 mm 두께의 PMMA sheet를 접착하였다. 준비된 PMMA sheet에 gold 마스크를 사용하여 x-ray 노광 (포항가속기 연구소 9C1 X-ray Nano/Micro Machining beam line) 공정을 진행하였다. 이때 PMMA sheet의 bottom energy가 4 KJ/cm<sup>3</sup>이 되도록 노광 시간을 조절하였다. X-ray 가 조사된 PMMA 영역의 현상을 위하여 GG developer solution (2-(2-butoxy-ethoxy)ethanol 60%, Morpholine 20%, Ethanolamine 5%, DI water 15%)을 사용하였다. 현상이 완료된 PMMA 주형 위에 액상의 파라핀을 도포 후 파라핀을 경화시켰다. 그 후, 아세톤 용액에서 PMMA 주형을 릴리즈하였다. PMMA 주형을 릴리즈 후 제작된 각각의 파라핀 층이

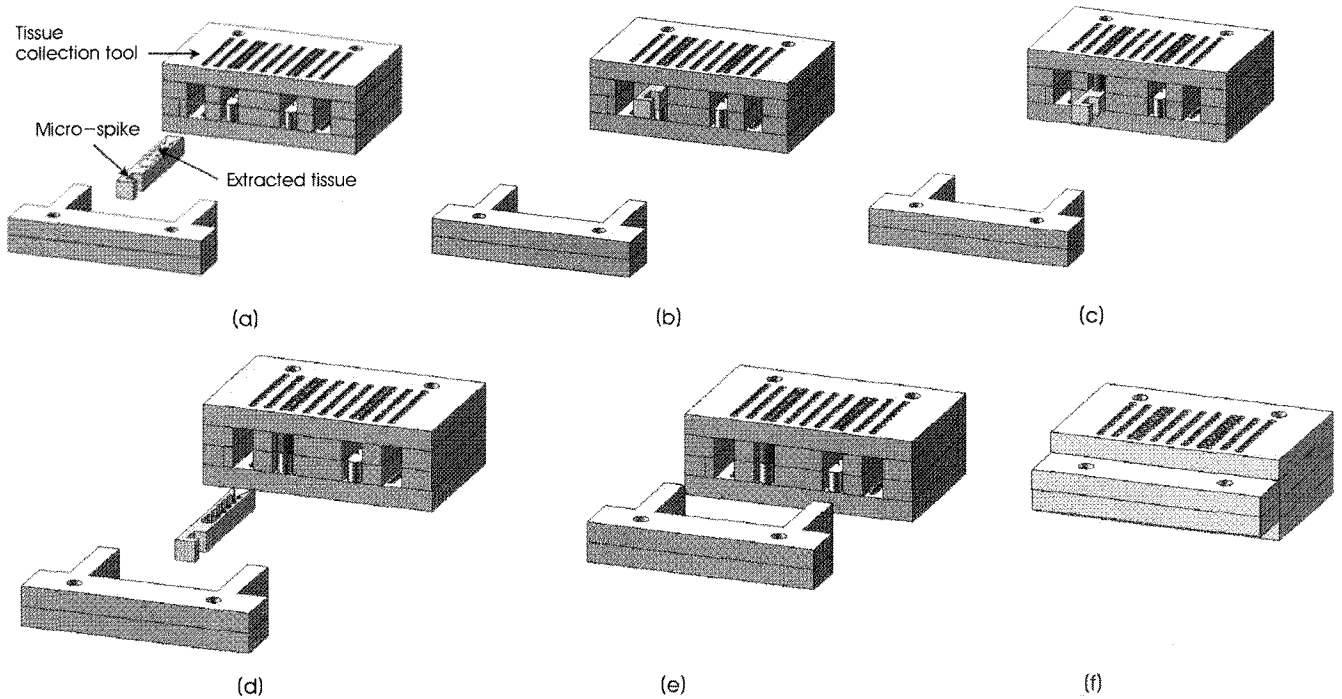


그림 3. 조직회수도구의 동작 개념도 (a), (b) 조직을 채취한 마이크로 스파이크 삽입 (c) 마이크로 스파이크를 내리면서 조직 분리 (d) 마이크로 스파이크 제거 (e) 커버 삽입 (f) 조직을 보유한 조직회수도구

Fig. 3. Schematic of operation of the proposed tissue collecting tool (a), (b) Inserting the micro-spike into chamber (c) Detaching the tissue by pushing down the micro-spike (d) Pulling the micro-spike out (e) Inserting the cover (f) Retaining the tissue in the tissue collecting tool

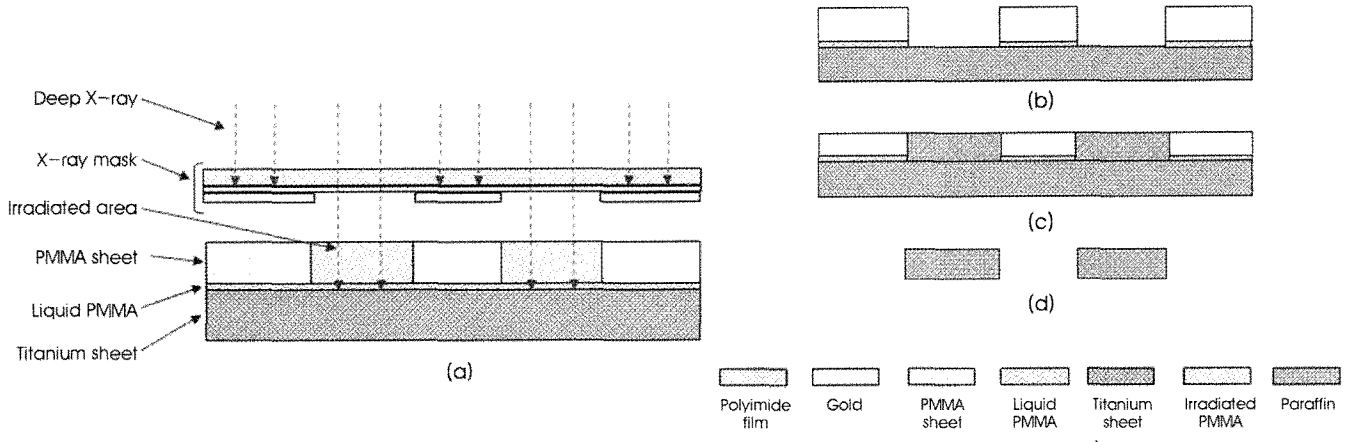


그림 4. 파라핀 조직회수도구 LIGA 공정도 (a) X-ray 노광 (b) X-ray가 조사된 PMMA 현상 (c) 파라핀 도포 (d) PMMA 릴리즈  
 Fig. 4. LIGA process for paraffin-based tissue collection tool (a) X-ray lithography, (b) Development of irradiated area (c) Paraffin pouring (d) PMMA release

그림 5와 같다. 각 파라핀 층의 상단에 있는 구멍에 핀을 삽입하여 각각의 파라핀 층을 정렬한다. 정렬된 파라핀 층의 옆면을 도포된 액상의 파라핀에 찍어서 접착한다. 그림 6은 파라핀 층을 정렬하여 접착한 파라핀 조직회수도구를 보여준다.

#### IV. 실험결과

그림 7은 마이크로 스파이크로 조직을 채취하고 최종적으로 채

취된 조직의 세포사진을 얻는 진단 프로토콜을 보여준다. 우선, 돼지 위장까지 내시경을 삽입 후 마이크로 스파이크가 장착된 와이어로 돼지 위장 조직을 채취하였다. 그 후, 마이크로 스파이크를 분리하고 4% paraformaldehyde에 24시간 이상 넣어 채취된 조직이 고정되도록 한 후, 30분간 PBS 용액에서 세척(washing)을 2번 하였다. 고정된 채취조직을 분리하기 위한 과정으로 파라핀 조직회수도구를 사용하여 마이크로 스파이크에서 채취 조직을 분리한다. 이후, 파라핀 침투과정을 거쳐 파라핀 블록으로 제작하였다. 파라핀 조직회수도구는 파라핀 블록 제작과정에서 녹아 없어지고 파라핀 조직회수도구에 보관된 채취조직은 파라핀 블록 안에서 고정된다. 자동 절편기에 파라핀 블록을 끼워서 파라핀 블록을 5 μm로 절편 후 Hematoxylin & Eosin 염색 방법(Hematoxylin 5분, DI water 5분 3번, Eosin 1분, DI water 5분 2번)으로 염색하였다. PDMS 재질의 조직회수도구를 사용할 시 파라핀 절편 과정에서 PDMS 조각이 자동화 절편기의 날에 걸리는 문제점이 있었다. 그래서 수작업을 통한 절편과정이 추가적으로 요구되었다. 하지만 본 논문에서 제시한 파라핀 조직회수도구를 사용하여 추가적인 수작업의 절편과정을 배제시켜 과정을 단순화 할 수 있었고, 전 과정을 기존의 면역조직 화학적 염색법과 호환되도록 하여 효율을 높

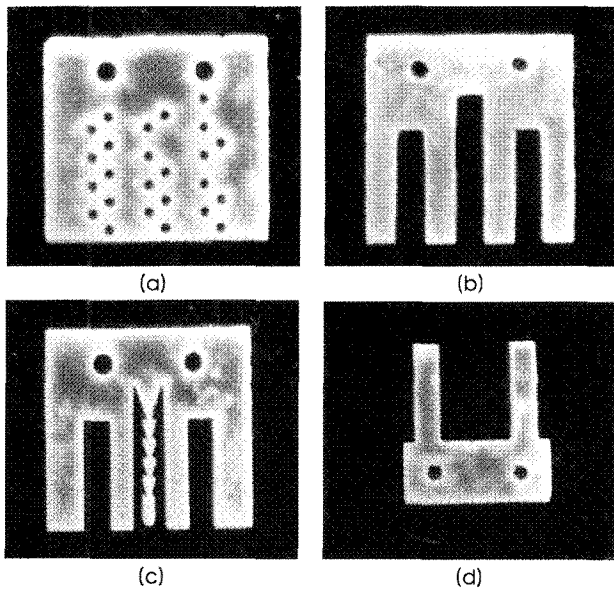


그림 5. 공정 완료된 파라핀 조직회수도구의 4개 층  
 (a) 챔버- 첫 번째, 네 번째 층 (b) 챔버- 두 번째 층 (c) 챔버- 세 번째 층 (d) 커버  
 Fig. 5. 4 layers of paraffin-based tissue collecting tool  
 (a) chamber - 1<sup>st</sup> layer, 4<sup>th</sup> layer (b) chamber - 2<sup>nd</sup> layer (c) chamber - 3<sup>rd</sup> layer (d) cover

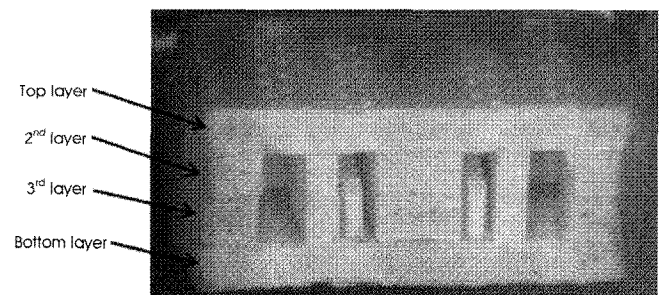


그림 6. 접착된 파라핀 조직회수도구 사진  
 Fig. 6. Completely bonded paraffin-based tissue collecting tool

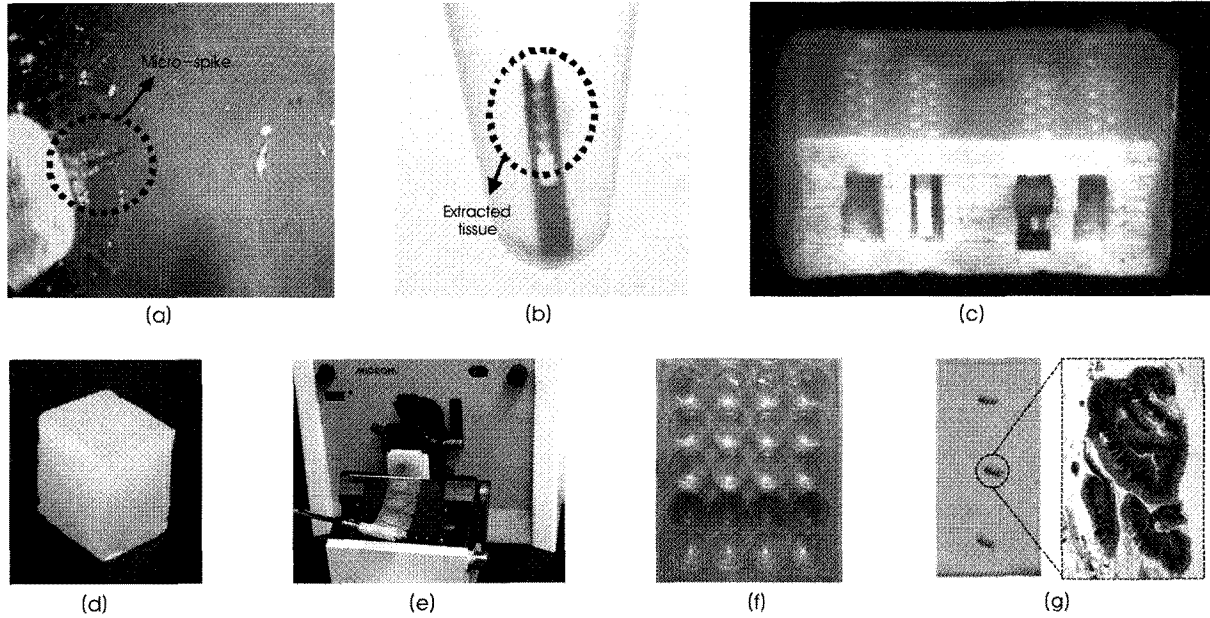


그림 7. 조직회수도구를 사용한, 마이크로 스파이크 생검의 진단 과정 (a) 마이크로 스파이크로 조직 채취 (b) 조직 고정 (c) 조직 분리 (d) 파라핀 블록 제작 (e) 조직 절편 (f) H&E 염색 (g) 조직 봉입 및 조직관찰

Fig. 7. Diagnosis protocol for micro-spike biopsy using paraffin-based tissue collecting tool (a) extracting tissue using micro-spike catheter (b) tissue fixation (c) tissue detaching (d) paraffin embedding (e) sectioning (f) H&E staining (g) mounting and microscope observation

일 수 있었다. 그림 8은 본 논문에서 제시한 진단 프로토콜을 사용하여 얻은 돼지 위장 조직의 위장 실험의 조직 사진을 보여준다.

## V. 결론

본 논문에서 제시한 파라핀 조직회수도구는 마이크로 스파이크로 채취한 조직의 분리와 후속 조직관찰을 가능하게 한다. 파라핀 조직회수도구는 마이크로 스파이크를 사용한 생검 시 채취조직 분리 문제, 조직의 유실 문제, 파라핀 블록 슬라이싱 문제에 대한 해결 방법을 제시하였다. 그리하여 PDMS 조직회수도구에서 필수

적이었던 수작업의 절편과정을 배제시켜 과정을 단순화 하였고, 전 과정을 기존의 조직병리검사 표본제작과정과 호환되도록 하였다. 결과적으로 기존 조직병리검사 표본제작과정에서 자동화로 사용하는 시료와 장비를 추가적인 과정 없이 그대로 사용할 수 있게 되었다. 동물 생체 내에서 채취한 조직으로 획득한 세포 사진은 파라핀 조직회수도구의 임상 적용 가능성을 보여주고 있다. 이러한 사실들에 비추어 볼 때, 본 연구에서 제안한 파라핀 조직회수도구는 마이크로 스파이크 생검의 임상적 응용 및 상품화에 크게 기여할 것으로 예상된다.

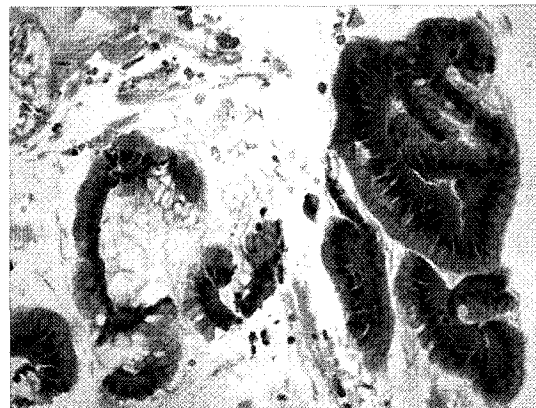


그림 8. 본 논문에서 제시한 진단 프로토콜을 사용하여 얻은 돼지 위장 조직의 광학현미경 사진, 400배  
Fig. 8. Optical micrograph of gastro-intestine tissue of a pig using the proposed diagnosis protocol, X400

## 참고문헌

- [1] Donald C. Zavola, "Diagnostic fiberoptic bronchoscopy: Techniques and results of biopsy in 600 patients," *Chest*, vol. 68, no. 1, pp. 12-19, 1975.
- [2] K. L. Woods, B. S. Anand, R. A. Cole, M. S. Osato, Robert, M. Genta, H. Malaty, I. E. Gurer, and D. De Rossi, "Influence of endoscopic biopsy forceps characteristics on tissue specimens : results of a prospective randomized study," *Gastrointestinal endoscopy*, vol. 49, no. 2, pp. 177-183, 1999.
- [3] DD. Wadas, and RA. Sanowski, "Complications of the hot biopsy forceps technique," *Gastrointestinal endoscopy*, vol. 34, no.1, pp. 32-39, 1988.
- [4] A. R. Lee, S. J. Paik, K. I. Koo, S. G. Park, B. D. Choi, M. J. Jeong, H. M. Choi, J. M. Lim, J. M. Seo, K. A. Kim, H. Chung, D. Y. Jeon, S. S. Lee, and D. I. Cho, "A Novel Microbiopsy Tool for Microsurgery," in *Proc. of the Korean Sensors Society Conference*, Cheju, Korea, Nov. 12-13, 2004, pp. 154-155.
- [5] S. Byun, J. M. Lim, S. J. Paik, A. Lee, K. Koo, S. Park, J. Park, B. D. Choi, J. M. Seo, K. Kim, H. Chung, S. Y. Song, D. Jeon, and D. "Dan" Cho, "Barbed micro-spikes for micro-scale biopsy," *J. Micromech. Microeng.*, vol. 15, no. 6, pp. 1279-1284, 2005.
- [6] A. R. Lee, S. J. Paik, S. G. Park, M. J. Jeong, K. I. Koo, H. M. Choi, J. M. Seo, K. A. Kim, H. , Chung, S. Y. Song, S. M. Bang, D. Y. Jeon, J. M. Lim, and D. I. Cho, "3D Silicon-micromachined Microbiopsy Tool and In-vivo Experiment," *The 13th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems*, Seoul, Korea, Jun. 2005. pp. 1199-1202.
- [7] S. K. Park, A. R. Lee, M. J. Jeong, H. M. Choi, S. Y. Song, S. M. Bang, S. J. Paik, J. M. Lim, D. Y. Jeon, S. K. Lee, C. N. Chu, and D. I. Cho, "A Disposable MEMS-Based Micro-Biopsy Catheter for the Minimally Invasive Tissue Sampling," *IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*, Alberta, Canada, Aug. 2005.
- [8] G. S. Kim, S. K. Park, K. I. , Koo, H. M. Choi, M. J. Jung, S. Y. Song, S. M. Bang, and D. I. Cho, "Nickel Micro-spike for Micro-scale Biopsy Using LiGA Process," *The 9th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation*, Daegu, Korea, May. 2006, pp. 1449-1502.
- [9] G. S. Kim, S. Park, K. Koo, M. Jeong, H. Choi, S. Paik, S. M. Bang, S. Y. Song, and D. "Dan" Cho, "Micro spike for endoscopic gastro biopsy," *Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nono Technology*, Singapore, Singapore, Jun. 2006
- [10] H.Y. Jeong, K. I. Kyo, S. M. Lee, J. W. Ban, H. S. Park, S. M. Bang, S.Y. Song, and D. I. Cho, " Micro-tissue Collecting Tool for Diagnosis of Micro-spike Biopsy," *Journal of the Korean Sensors Society*, vol. 18, no. 2, pp. 122-127, 2009.
- [11] S.I. Kim, Y.C. Shin, Y. S. Yang, G. Y. Oh, *Histopathology*, Seoul, Daehakseorim, Press, 1995, pp. 41-48, pp. 155-164.
- [12] Becker E. W., Ehrfeld W., Hagmann P., Maner A., and Münchmeyer D., "Fabrication of microstructures with high aspect ratios and great structural heights by synchrotron radiation lithography, galvanofarming, and plastic moulding (LIGA process)", *Microelectronic Eng.*, vol.4, no. 1, pp. 35-56, 1986.