

## 대규모 병리학적 분석 연구를 위한 조직배열 방법

김우호

서울대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2002년 5월 20일

게재승인 : 2002년 7월 24일

책임저자 : 김 우 호

우 110-799 서울시 종로구 연건동 28

서울대학교 의과대학 병리학교실

전화: 02-740-8269

Fax: 02-765-5600

E-mail: woohokim@snu.ac.kr

### Tissue Array Method for Large Scale Clinicopathologic Study

Woo Ho Kim

Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Tissue array consists of a slide containing hundreds or thousands of cases, making this method useful for rapid analysis of molecular markers in a large number of cases. The method significantly facilitates and accelerates the clinicopathologic analysis of cancer. To maximize the efficacy of the tissue array method in pathologic study, the pros and cons of this method should be understood. In this review, the history and a detailed method of tissue array production is described, emphasizing the advantage of the large core size (2.0 mm). Some methodological points, including slide storage, microtoming, core size, reliability, and data analysis, are discussed.

**Key Words** : Methods-Immunohistochemistry

조직배열은 하나의 슬라이드에 여러 환자의 조직을 함께 넣어 분석하는 방법으로 연구의 효율성을 크게 높이기 때문에<sup>1</sup> 최근 들어 병리학적 연구에 활발히 이용되기 시작하였고, 국내에서도 많은 논문이 발표되었다.<sup>2-13</sup> 그러나 이 방법으로 만족할 만한 연구 성과를 얻기 위해서는 이 방법의 장점과 단점을 파악하고, 지켜야 할 점과 피해야 할 점 등을 인식하고 있어야 할 것이다. 이 글은 병리학자가 직접 연구 재료(파리핀 블록)를 모아 조직배열 슬라이드를 제작하고 염색과 판독 과정을 거쳐 연구 결과를 얻는데 필요한 내용을 기술하였다. 또한 연구에 필요한 기자재 및 회사의 홈페이지 주소를 본문에 적어 놓아 쉽게 찾아볼 수 있도록 하였다.

#### 조직배열 방법의 발달

조직배열의 창시는 1986년의 Dr. Battifora라고 할 수 있다.<sup>14</sup> 그는 하나의 슬라이드에 백여개의 조직을 한꺼번에 담는 방법을 발표하면서, 이 방법이 면역염색의 정도관리에 대단히 유용할 것이라고 주장하였다. 이 방법이 몇몇 실험실에서는 유용하게 사용되었으나, 조직이 불규칙하게 담겨져 있어 이를 구별하려면 많은 노력이 소요되기 때문에 병리학자들에게 큰 호응을 얻지는 못하였다. 4년 후 그는 checkerboard라는 새로운 방법을 발표하였는데,<sup>15</sup> 이 방법은 조직이 가로-세로로 줄 맞추어 배열되어 있어서 판독이 쉽다는 장점이 있었으나, 조직의 크기가 너무 작고

피엠펙염 배열되므로 호응을 얻지 못하였다. 그러나 그는 이에 대한 특허를 획득하였고, 이것이 조직배열의 원형이라고 볼 수 있다. 이 방법은 널리 사용되지 않았는데, 그 이유는 아마도 기존의 블록을 완전히 망가뜨려야 만들 수 있으므로 병리학자들이 사용을 주저하였기 때문이라고 생각된다.

현재 사용되는 조직배열 방법은 1998년도 Kononen이 발표한 논문<sup>16</sup>에 기록되어 있는데, 그는 0.6 mm 크기의 조직배열을 제작할 수 있는 기계를 제작하여 이를 실험에 사용하였다. 이 방법은 원래의 블록에서 직경 0.6 mm 원주를 바늘을 이용하여 파낸 다음, 이를 새로운 블록에 같은 크기의 구멍을 만들어 옮기는 것인데, 이러한 작업을 반복하여 하나의 새로운 블록에 수백개의 증례가 포함되게 한 후에 이를 박절하여 동일한 슬라이드를 다량 제작하였고, 이 슬라이드를 대상으로 형광제자리부합화를 수행하여 논문을 발표하였다. 그 후부터 동일한 방법을 사용한 수십편의 논문이 발표되고 있으며, 이로 말미암아 병리관련 학술지에 발표되는 연구의 증례와 대상 유전자(또는 항체)의 수가 갑자기 수배-수십배 증가하는 현상을 보이고 있다.

#### 조직배열 블록의 제작

조직배열 블록을 직접 제작하려면 기계를 구입하면 쉽다. 완전 자동화된 기계가 있지만 아직 시판되지는 않으며, 현재 시중에서 판매되는 제품은 수동으로 모든 작업을 하도록 되어 있다.

두 가지 기계가 시중에 나와 있는데, 먼저 개발된 것이 Beecher instrument ([www.beecherinstruments.com](http://www.beecherinstruments.com))이다. 이 기계는 작은 크기에 비해 정교하게 제작되어 있으며, 이를 이용하는 데는 약간의 숙달이 필요하지만, 대부분의 연구자가 적응할 수 있도록 제작되어 있다. 2002년도에 기본 가격은 약 13,000,000원 정도이며, 여러 가지 선택사항을 포함시키면 두 배 가량 비싸진다. 이 기계에는 두 가지의 펀치가 있는데, 하나는 조직을 파내는 기능을, 다른 하나는 구멍을 뚫는 기능을 가지고 있으며 두 개의 펀치가 동일한 위치에 적중하도록 고안되어 있다. 제작 방법은 원래의 블록에서 조직을 파낸 후 새로운 블록에 구멍을 뚫고, 조직을 심는 3단계의 작업으로 이루어진다. 2단계와 3단계 사이의 작업 중에 블록은 이동하지 말아야 하며, 다만 펀치만 동일한 위치에서 교환되도록 되어 있어 정확한 위치에 조직을 심을 수 있다. 2002년도에 여러 가지 선택사항이 추가되어 기능이 더욱 세련되었는데, 블록의 위치를 1  $\mu\text{m}$  단위로 자동적으로 이동시키는 장치, 4개의 블록을 동시에 제작하기 위한 블록 회전장치, 0.6, 1, 1.5, 2 mm 직경의 다양한 크기의 펀치, 펀치의 이동을 제한하여 새로운 블록의 손상을 보호하는 장치 등이 추가되었다. 이 기계는 0.6 또는 1.0 mm 크기의 조직배열을 제작하는 데는 유용하나, 2.0 mm 크기의 조직배열을 제작하는 데는 상당한 어려움이 있으며, 실제로 사용설명서에서도 2.0 mm 크기의 배열 제작은 권장하지 않고 있다.

2002년도에 Beecher instrument 보다 기능이 향상된 Advanced tissue arrayer ([www.chemicon.com](http://www.chemicon.com))라는 제품이 출시되었는데, 기계에 현미경이 달려 있어서 병변을 직접 확인하면서 블록을 제작할 수 있는 장점이 있으며, 좀더 사용이 간편해진 면이 있으나, 가격이 Beecher Instrument에 비해 3배 이상 비싸서 대량으로 제작하는 곳이 아니라면 구입에 부담이 된다.

배열 블록을 제작할 때 슬라이드의 번호가 바뀌거나 조직이 180도 회전하여 슬라이드에 부착되어 있어도 이를 쉽게 적발하는 방법을 사용하는 것이 바람직하다. 이를 위해 특정한 위치에 조직 대신 검정색의 탄소를 넣어 블록 상태 및 염색되지 않은 슬라이드 상태에서 쉽게 구별되도록 하는 방법이다. 동일한 진단의 배열 블록이 여러 개인 경우에는 탄소의 위치를 서로 다르게 하여 구별하거나, 최근 외과병리에서 사용되는 다양한 색의 물감을 사용하는 방법도 있다. 이렇게 하면 실수로 슬라이드 번호를 바꾸어 적거나, 조직이 180도 회전되어도 쉽게 적발해 낼 수 있다. 탄소는 4% 아가로오스에 20% 먹물을 섞어 끓여서 식힌 후에 고정, 탈수, 봉입 등의 과정을 거쳐서 제작한다. 이와 동일한 목적으로 색소의 침착이 강한 악성흑색종 등의 조직을 사용할 수도 있다.

### 조직배열의 구입

조직배열이 연구의 효용을 올리는 것이 알려진 이후에 병리의 사 이외의 많은 연구자들이 이에 대해 관심을 가지게 되었고,

여러 생명공학 회사에서 이를 상품화하였다. 현재 Innogenex ([www.innogenex.com](http://www.innogenex.com)), Research Genetics ([www.resgen.com](http://www.resgen.com)), Novagen ([www.novagen.com](http://www.novagen.com)), Zymed ([www.zymed.com](http://www.zymed.com)), Stratagene ([www.stratagene.com](http://www.stratagene.com)) 등에서 제품화된 조직배열 슬라이드를 구입할 수 있으며, 한국에서는 고마바이오테크([www.komabiotech.com](http://www.komabiotech.com)), 진메딕([www.genemedic.co.kr](http://www.genemedic.co.kr)) 등에서 판매한다. 미국 국립암연구소에서는 연구자를 대상으로 1인당 20장 한도에서 이를 무료로(1장당 우송료 \$20 별도) 제공하였다. 위의 대부분의 회사에서는 배열 블록을 만드는 용역도 하고 있으므로 연구자는 기계를 구입하지 않고도 조직배열 슬라이드를 제작할 수도 있다.

### 블록의 박절

배열 블록은 제작한 직후에는 바닥면이 고르게 되어 있지 않은데, 제작된 블록의 면을 고르게 하기 위해서는 이를 cassette basin에 담아 45-55°C 상태에서 30분간 방치하면 된다. 이렇게 하면 원래의 파라핀과 구멍을 메운 파라핀 사이의 간격도 메워지고, 깎아야 할 바닥면도 편평해지게 되어 조직의 손실을 줄일 수 있다. 배열 블록의 박절은 그리 쉽지 않다. 서로 다르게 고정되고 제작된 조직이 섞여 있을 뿐 아니라, 여러 조각의 파라핀이 찢어지면서 개개의 조직이 날개로 흩어질 가능성이 있기 때문이다.

Beecher instrument 회사의 지침서에는 조직의 박절을 위해서는 테이프전이법([www.instrumedics.com](http://www.instrumedics.com))을 권장하고 있으며, 조직배열에 대한 처음의 논문에서부터 이 방법이 사용되었다.<sup>16</sup> 이 방법은 파라핀 블록에 특수한 양면테이프를 부착한 후에 박절하고, 박절된 조직이 붙어 있는 테이프를 슬라이드로 옮겨 슬라이드에 부착시킨 후에 자외선 조사에 의한 중합반응과 유기용매를 이용하여 테이프를 제거하는 복잡한 과정을 거쳐야 한다. 이 방법을 사용하면 경험이 적은 병리조직기사도 박절을 할 수 있는 장점이 있으므로 박절 경험이 없는 실험실에 권장되는 방법이다. 그러나 이 방법을 이용하면 박절 속도가 현저히 저하될 뿐만 아니라 조직과 슬라이드 사이에 남아 있는 중합된 접착제 성분이 면역염색 과정을 방해하기 때문에 절대적으로 불리하다. 또한 카세트에 테이프를 부착함으로써 매번 카세트가 미세하게 흔들리면서 조직의 두께가 일정하지 않게 되기도 한다. 경험이 많은 병리기사는 테이프 없이도 배열 조직 슬라이드의 박절을 큰 어려움이 없이 성공적으로 수행할 수 있으며, 조직의 크기가 크고 파라핀이 여러 조각으로 이루어진 점을 감안해서 박절 후 띄울 수조의 온도를 평소에 비해 낮게 유지하는 것이 유리하다.

### Silane 코팅 슬라이드

조직배열 블록을 일반 슬라이드를 이용하여 제작하면 면역염

색 과정에서 많은 조직이 탈락되어 쓸모가 없게 된다. 특히 항원의 노출을 위하여 극초단파, 고압멸균기 등의 과정을 거치면 조직의 탈락은 더욱 심해지며, 조직의 크기가 작은 경우에 더욱 심하므로 0.6 mm 크기의 조직은 세심한 주의가 필요하다. 앞에서 기술한 방법을 사용하면 염색과정 중의 조직의 탈락을 방지할 수 있지만, 전술한 바와 같은 여러 가지 단점 때문에 권장되지 않는다. 최근에는 양질의 silane 코팅 슬라이드가 싼 값에 공급되므로, 이를 이용하면 조직의 탈락은 거의 일어나지 않는다. 비교해 본 중에서 일본 Muto 회사의 제품(Cat No. 5116)이 가장 우수하였으며, 2.0 mm 크기의 조직은 염색 도중 탈락되는 경우는 없었다. 다만 이 제품은 모서리에 돌출부가 없어 모세관형의 염색방법에는 사용할 수 없다. 필요에 따라 모서리에 돌출부가 있는 제품(Fischer, Cat. No. 15-188-52 또는 VWR, Cat No. 48311-703)을 사용해도 되며, 탈락은 거의 일어나지 않는다.

**면역 염색**

면역염색시 조직의 가장자리 또는 시야의 가장자리는 염색이 진하게 되거나 염색이 잘 안되는 현상이 발생한다. 배열 슬라이드는 조직을 포함하는 부위가 슬라이드의 대부분을 차지하고 있으므로 이런 현상이 일어난다면 가장자리의 증례는 중심부의 증례에 비해 염색 정도가 다르게 될 우려가 있다. 이러한 현상을 방지하기 위해서는 면역염색의 과정에서 항체의 농도를 일정하게 유지할 필요가 있다. 자동면역염색기를 사용하면 이러한 문제점이 대부분 해결되나, 최근의 자동면역염색기는 병원병리에서 사용되는 항체에 대해 적정화 되어 있어 연구용 항체의 사용에는 번거로움이 있다. 면역 염색의 비균일성을 쉽게 해결하는 방법은 슬라이드위에 항체를 올려놓은 후에 크기를 잘 맞춘 커버를 올려놓아 항체가 골고루 퍼지고 동일한 농도를 유지하도록 하는 방법이며, 이 때는 슬라이드를 습윤실 안에 넣어 가장자리가 마르지 않도록 유지해야 한다. 커버는 파라필름(parafilm)을 잘라서 사용하면 되며, 유리로 된 커버슬라이드를 사용하면 무게 때문에 항체의 양이 너무 적게 남아 있어 염색이 부적절하게 될 우려가 있다. 더 바람직한 방법은 Shandon 회사의 Cadenza 염색기구를 사용하는 것이며, 이는 반자동식 염색을 가능하게 한 것으로 슬라이드와 cover plate 사이의 작은 공간을 통해 항체와 반응시킨다. 이 기계는 다른 모세관 방식의 기계와는 달리 항체 및 완충액을 위쪽에서 공급하며, 슬라이드를 동일한 위치에 고정시킨 상태에서 항체 반응과 수세를 반복적으로 수행할 수 있으므로 염색에 드는 노력을 현저히 저하시키고 염색의 일관성을 유지할 수 있을 뿐 아니라 다른 자동염색기계에 비해 50분의 1의 비용이면 구입이 가능하다는 장점이 있으며, 자동화 기계와는 달리 연구용 항체를 이용하더라도 다양한 항체의 농도를 시험할 수 있으므로 조직배열에는 적합한 염색 방법이다.

**박절한 슬라이드의 보관**

슬라이드의 보관 기간에 따라 면역염색의 강도가 저하된다는 현상이 알려진 것은 1996년도이다.<sup>17</sup> 그 이후 몇 개의 후속 논문이 이를 증명하였고 이제는 슬라이드의(박절 후) 나이를 면역염색에서 고려하는 것이 필수적이 되었다. 진단을 위해 매일매일 진행되는 면역염색은 대부분 박절 즉시 염색되나, 연구를 위한 면역염색은 여러 장을 한꺼번에 박절하게 되므로 슬라이드의 나이가 다양하게 될 기회가 많다. 슬라이드의 나이에 따라 염색이 약화되는 현상은 항체에 따라 다르기 때문에 일률적으로 말할 수 없으며, 박절 2주일 후부터 염색이 약해지는 항체가 있는 반면, 1년 후에도 염색의 정도가 유지되는 항체도 있으며, 그 차이가 무엇인지는 알려져 있지 않다. 단클론 항체와 다클론 항체 사이에 차이는 없으며, 이러한 염색상의 저하는 일반적인 항체의 unmasking 방법으로 회복되지 않는다.<sup>18</sup> 슬라이드의 시간 경과에 따른 염색 정도의 저하가 공기중의 산소에 의해 항원이 산화되는 것이라는 가정에 의거해서 슬라이드를 파라핀으로 코팅하면 보관 기간을 연장할 수 있을 것이라는 시도가 논문에 발표되었다. 그러나, 본 실험실에서 6개월간 슬라이드를 보관하면서 관찰한 바에 의하면 슬라이드를 파라핀으로 코팅하면 염색 정도는 코팅하지 않은 것보다 더욱 일찍 저하된다는 현상을 관찰할 수 있었고, 이는 공기중의 산소와의 접촉이 염색의 저하와 관련이 있다는 기존의 주장에 배치되는 현상이었다. 슬라이드를 냉장고 또는 냉동실에 보관하면 보관 기간은 연장할 수 있으나, 그 효과는 제한되어 있기 때문에, 슬라이드를 필요한 때에 새로 제작하여 염색하는 것이 가장 바람직한 방법이며, 불가피한 경우에는 냉장고에 보관하는 것이 바람직하다. 다만 이 경우에는 슬라이드를 연속절편하는 것보다 파리핀 블록의 손실이 많기 때문에 처음부터 충분한 양의 조직배열 블록을 제작할 필요가 있다. 슬라이드의 보관 기간이 대단히 중요한 반면에 파리핀 블록의 보관 기간에는 거의 영향을 받지 않아서, 40년이 지난 조직을 대상으로 염색하여도 별로 차이가 없다.<sup>19</sup> 실제로 조직의 고정제에 대해 큰 영향을 받으며, 아직까지는 10% 중성 포르말린이 가장 우수한 고정액으로 인정받고 있다. 이 고정액에 2주 동안 고정한 조직은 24시간 고정한 조직과 비교해서 염색 정도의 차이는 없었다(unpublished data). 그러므로 병원에서 처리되고 블록으로 제작된 대부분의 조직은 조직배열 방법을 통한 면역염색 방법에 적합하다고 볼 수 있다.

**조직의 크기**

현재 Beecher instrument로 제작이 가능한 한계는 0.6 mm 크기의 조직 1,000개를 하나의 슬라이드에 담는 것인데, 이는 대단히 숙련된 경우에만 가능하고, 일반적인 실험실에서는 약 300개의 증례를 담을 수 있다. 0.6 mm 크기는 400배로 관찰 시 한 시야를 채우는 크기이며, 내시경 생검보다 작은 크기이다. 중앙

을 대상으로 연구를 하는 경우에 0.6 mm 크기의 조직은 너무 작기 때문에 면역 염색 결과의 분석이 어렵고, 또한 부정확한 면이 있다. 이는 내시경 생검 조직을 대상으로 면역 염색한 경우에 결과의 판독에 흔히 어려움을 겪는 사실에 비추어 볼 때 자명하다. 또한 300 증례의 면역 염색 결과를 일관적으로 판독해야 하기 때문에 HE 염색 슬라이드와 대조하면서 판독하기가 곤란한데, 작은 조직에서는 염색된 조직이 종양인지 정상 조직인지가 불분명한 증례가 많이 발생하게 된다. 그러므로 판독 시간은 오히려 개개의 슬라이드를 판독하는 것만큼 또는 그 이상으로 소요되어 조직배열 슬라이드의 장점이 상당 부분 소실된다. 실제로 조직배열을 이용한 연구는 판독 과정이 연구 진행의 병목이 되는데, 이는 종양의 형태가 다양하기 때문에 병리의사 이외의 연구자가 판독하거나, 자동화할 수 없기 때문이다. 게다가 조직의 가장자리가 진하게 염색되는 항체의 경우에는 적절하게 염색된 부위를 찾을 수 없고, 조직의 탈락이 자주 발생해서 15-20%의 증례는 판독이 불가능하게 된다.

이상의 문제점을 극복하기 위해 2.0 mm 크기의 조직배열이 권장되는데, 이 크기는 하나의 슬라이드에 60개의 증례만 담을 수 있기 때문에 작은 크기의 조직배열에 비해서는 슬라이드의 수를 많이 제작해야 하고, 조직의 소요도 많다는 단점이 있다. 그러나 판독을 훨씬 빠릴 수 있는 장점이 있는데, 2.0 mm 크기는 100배 시야에 딱 차는 크기이기 때문에 조직의 개관을 한 눈에 파악할 수 있고, 현미경 하에서 각각의 조직의 번호를 쉽게 인식할 수 있다. 더구나 가장자리가 진하게 염색되더라도 중앙부에서는 적절한 염색을 볼 수 있으며, 탈락되는 조직이 거의 없어 판독불가능 증례가 5% 내외에 불과하다. 그러므로 병리 판독의 입장에서는 300개의 작은 조직이 담겨 있는 조직배열보다는 60개의 큰 조직이 담겨 있는 슬라이드를 더 쉽게 판독할 수 있어 연구의 진행이 가속화된다.

시중의 기계를 이용해서는 2.0 mm 크기의 배열 제작이 어렵기 때문에, 본 실험실에서는 내부 직경 2.0 mm 크기의 바늘을 제작하여 사용하고 있으며, 3.0 또는 4.0 mm 크기의 조직배열 제작에는 피부 생검용 펀치를 사용하고 있다(Fig. 1).

### 염색의 비균질성 및 신뢰도

종양은 부위에 따라 형태가 다르고 단백질 발현 양상도 다른데 극히 작은 조직을 대상으로 판독한 결과가 각각의 얼마나 증례를 잘 반영하고 있는지에 대한 점이 조직배열의 가장 큰 문제점으로 지적받고 있다. 이 문제점을 정확히 이해하기 위해 초창기의 조직배열 연구 논문은 이러한 연구에 치중되었고, 이제는 제법 많은 결과가 축적되어 있다. Nocita 등<sup>20</sup>은 2,317예의 방광암을 대상으로 Ki-67 염색 정도를 전체 슬라이드와 조직배열 슬라이드를 비교한 결과, 예후 및 임상적 연관성은 동일한 결과를 나타내었다고 하였다. Camp 등<sup>21</sup>은 판독 결과의 일치율이 채취 조직의 수(core의 수)가 증가함에 따라 증가하는데, 전체

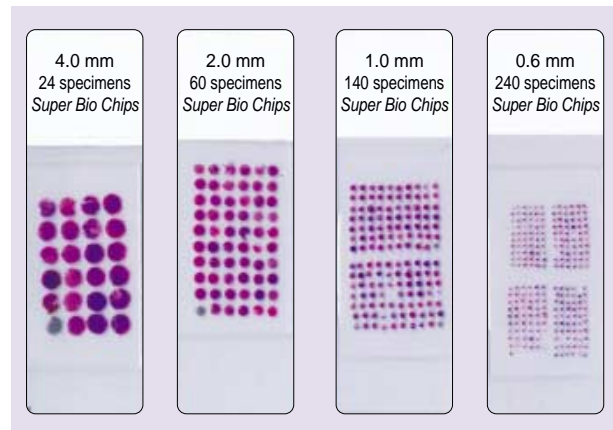


Fig. 1. Various sized tissue array slides. Among them, 2.0 mm-diametered core is the most useful for large scale clinicopathologic analysis.

조직과 비교하였을 경우에 1개를 판독하면 92%, 2개는 96%, 3개는 98%, 5개는 99.5%, 9개는 99.97%의 일치율을 보인다고 하였다. 이 등<sup>7</sup>은 4개의 core를 채취하여 서로 비교하였을 경우에 그 결과의 일치도가 kappa 값이 0.74 (MUC1) 또는 0.89 (MUC2)로서 거의 완벽하게 일치한다는 결과를 발표하였다. 특히 이러한 일치율은 결과를 두 단계(예를 들면 음성과 양성)로 나눈 경우에서 3단계나 그 이상으로 나눈 경우에 비해 더욱 높다.

종양내에서 염색의 비균질성은 존재하지만, 많은 수의 증례를 대상으로 연구를 진행하면 이러한 현상은 희석되는 경향이 있기 때문에 조직배열 슬라이드는 연구의 수단으로는 매우 적합하다고 생각된다. 다만 진단의 목적으로 각각의 증례에 대해 양성, 음성을 판단해야 한다면 조직배열 방법이 권장되지 않는다. 실제로 염색의 결과에 영향을 미치는 인자는 종양의 이질성만은 아니며, 박질 두께, 슬라이드의 나이, 염색 시간이나 수세 시간, 완충액의 조성, 항체의 농도, 염색 온도 등 여러 가지가 영향을 미친다. 전체 슬라이드를 대상으로 연구를 하는 경우에는 실험 과정의 차이를 최소화하는데 한계가 있지만, 조직배열을 이용하면 위에 언급한 인자들이 대부분 일정하게 되기 때문에 그 결과가 전체 슬라이드에 비해 오히려 더 믿을 만할 수도 있으리라고 예상된다. 실제로 전체 슬라이드를 사용한 경우에는 드러나지 않던 상관관계가 조직배열을 사용하면 뚜렷하게 나타나서 조직배열 슬라이드가 더 믿을 만하다는 논문도 있는데,<sup>22</sup> 그 근거는 동일한 실험 과정을 거치기 때문에 증례간의 차이를 최소화할 수 있었기 때문이라고 해석된다.

초기의 논문 중에는 한 증례에서 여러 개의 조직을 채취하면 정확한 결과를 얻을 수 있으며, 이러한 이유로 한 증례당 3개의 조직을 권장하였고 홀수를 채택한 이유는 서로 결과가 다른 경우에도 결과를 판정하기 쉽기 때문이었다. 최근의 논문은 대부분 하나의 조직으로도 동일한 결과를 얻을 수 있다고 보고하고 있다.<sup>23</sup> 예외적으로 Rubin 등<sup>24</sup>은 전립선암의 분석을 위해 3-5

개의 조직이 권장된다는 결과를 보고하였으나, 대부분의 조직배열 연구가 수백 내지 천 예를 대상으로<sup>19</sup> 하는 반면, Rubin 등의 연구에서는 100개 미만의 증례를 대상으로 했기 때문에 한두 개의 슬라이드로는 만족할 만한 결과를 얻지 못했기 때문이라고 판단되며, 증례가 충분한 경우에는 증례당 여러 군대를 판독하지 않아도 만족할 만한 결과를 얻을 수 있다.

**조직배열의 능률향상**

조직배열 방법이 발표된 이후, 발표되는 논문 연구의 규모가 대규모화하였으며, 고집적 cDNA microarray 방법의 개발과 인간유전체사업의 성과에 발맞추어 이들의 결과를 확인하는 연구가 수행되고 있다. Schraml 등<sup>25</sup>은 17가지 종양이 포함된 397개의 조직배열을 대상으로 *HER-2*, *myc*, *cyclin D1* 유전자의 증폭을 조사하였는데, 기존의 발표된 결과와 거의 같은 결과를 얻을 수 있었으며, 연구의 효율성이 증가한 정도를 다음과 같이 기술하였다. “기존의 방법으로 100개의 연구과제, 8,000번의 실험, 2년간의 실험에 의해 발표되었던 결과가 단 2주만에 재현되었다.” 모든 병리연구가 위의 경우와 같이 극단적으로 고효율화되지는 않더라도, 병리학적 분석을 수행하는 연구에서는 상당한 효율의 증가를 기대할 수 있다. 그러나 염색 결과의 판독, 판독 결과의 분석은 배열 방법을 이용하여도 효율이 크게 올라갈 것을 기대하기 어렵고, 연구의 병목이 되고 있는 판독 과정은 병리의사 이외에는 할 수 없기 때문에 종양 연구에서 병리의사의 역할이 더욱 중요해지고 있다.

**조직배열 결과의 분석**

조직배열 판독 결과는 기존의 전체 슬라이드를 사용하여 수행되었던 연구와 다를 것이 없다. 다만 기존의 방법에 비해 훨씬 많은 결과가 발생하기 때문에 다양한 분석 기법의 응용이 가능해졌으며, 특히 응용 프로그램의 획기적인 발달에 따라 여러 가지 시뮬레이션이 연구자의 책상에서 가능하게 되었다. 예를 들면 개개의 단백질이 예후와 관련이 있는지를 비교하던 연구에서 더욱 발전하여 여러 개의 유전자 발현의 조합이 예후와 관련이 있는지를 알아보는 것이다. 이 등<sup>26</sup>의 결과에 의하면 위암에서 발현 이상이 있는 종양억제유전자의 개수가 종양의 예후와 관련이 있으며, 이는 다변량분석에 의해서 임상병기와 독립적으로 예후와 상관관계가 있음을 증명하였다. 또한 김 등<sup>27</sup>에 결과에 의하면 위장관계 간질종양을 c-kit, S-100 단백질, smooth muscle actin 등을 포함한 9개의 항체로 염색한 결과를 hierarchical clustering 방법으로 분석하였을 때, Cajal 세포 기원, 신경 기원, 그리고 평활근 기원의 종양이 분명하게 나뉘어짐을 보여주었으며, 이는 아직까지 분류 체계가 모호한 종양에서 분류의 원칙을 정립하는 데 유용하게 사용될 수 있으리라고 기대된다.

**조직배열 슬라이드의 응용**

조직배열 슬라이드는 주로 면역염색 방법에 의해 단백질의 발현을 조사하는 데 사용되지만, 세포내 mRNA의 발현을 관찰하는 제자리부합화법, 또는 핵내의 DNA를 검출하는 형광제자리법도 적용할 수 있다. 그러나 이 방법들은 모두 조직의 질에 크게 영향을 받기 때문에 보관된 조직의 처음 고정 상태가 중요하고, 고정 상태가 서로 많이 다르다면 함께 염색하여 비교하기는 곤란하다.

고집적 배열 방법을 세포주에도 사용할 수 있는데,<sup>28</sup> 본 실험실에서는 배양세포를 아가로오즈에 함유시켜 조직과 동일한 상태로 만들고 이를 배열로 만들어 면역 염색에 사용할 수 있다. 이 방법은 많은 종류의 세포주를 대상으로 많은 항체를 검사할 경우에 도움이 될 것으로 생각된다. 실험동물을 이용한 연구에서<sup>29</sup> 활용된 논문이 발표되었으며, 조직배열 방법의 응용은 생물학 연구의 전반에 더욱 그 범위가 넓어질 것으로 예상된다.

**참고문헌**

1. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput *in situ* studies. *J Pathol* 2001; 195: 72-9.
2. Woo DK, Kim HS, Lee HS, Kang YH, Yang HK, Kim WH. Altered expression and mutation of beta-catenin gene in gastric carcinomas and cell lines. *Int J Cancer* 2001; 95: 108-13.
3. Cho YJ, Chang MS, Park SH, Kim HS, Kim WH. *In situ* hybridization of Epstein-Barr virus in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes of the gastrointestinal tract. *Hum Pathol* 2001; 32: 297-301.
4. Kim WH. Tissue array technology for translational research. From gene discovery to application. *Exp Mol Med* 2001; 33: 135-48.
5. Chang MS, Lee HS, Kim CW, Kim YI, Kim WH. Clinicopathologic characteristics of Epstein-Barr virus-incorporated gastric cancers in Korea. *Pathol Res Pract* 2001; 197: 395-400.
6. Yang HJ, Cho YJ, Kim HS, Chang MS, Sung MW, Kim WH. Association of p53 and BCL-2 expression with Epstein-Barr virus infection in the cancers of head and neck. *Head Neck* 2001; 23: 629-36.
7. Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang H-K, Kim YI, Kim WH. MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas. *Cancer* 2001; 92: 1427-34.
8. Kang YH, Bae SI, Kim WH. Comprehensive analysis of promoter methylation and altered expression of hMLH1 gene in gastric cancer cell lines with microsatellite instability. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 119-24.
9. Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82: 285-91.

10. Lee HS, Choi SI, Lee HK, *et al.* Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability. *Mod Pathol* (In Press).
11. Chang MS, Kim HS, Kim CW, Kim YI, Kim WH. Epstein-Barr Virus infection in gastric adenoma coexisting with gastric carcinoma. *Hum Pathol* (In Press).
12. Chang HJ, Jee CD, Kim WH. Mutation and altered expression of beta-catenin during gallbladder carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* (In Press).
13. Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH. Silencing of the O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase by CpG methylation in gastric cancers. *Br J Cancer* (In Press).
14. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 1986; 55: 244-8.
15. Battifora H. The checkerboard tissue block. An improved multitissue control block. *Lab Invest* 1990; 63: 722-4.
16. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-7.
17. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1054-9.
18. Van den Broek LJ, Van de Vijver MJ. Assessment of problems in diagnostic and research immunohistochemistry associated with epitope instability in stored paraffin sections. *AIMM* 2000; 8: 316-21.
19. Xie W, Mertens JC, Reiss DJ, *et al.* Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study. *Cancer Res* 2002; 62: 497-505.
20. Nocito A, Bubendorf L, Maria Tinner E, *et al.* Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 2001; 194: 349-57.
21. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000; 80: 1943-9.
22. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, *et al.* Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 2001; 159: 2249-56.
23. Gancberg D, Di Leo A, Rouas G, *et al.* Reliability of the tissue microarray based FISH for evaluation of the HER-2 oncogene in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2002; 55: 315-7.
24. Rubin MA, Dunn R, Strawderman M, Pienta KJ. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 312-9.
25. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, *et al.* Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1966-75.
26. Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kim WH. Tumor suppressor gene expressions in gastric carcinoma. *Korean J Pathol* 2001; 35 Suppl: 46.
27. Kim EJ, Shin HS, Kim WH. Immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumors. *Korean J Pathol* 2001; 35 Suppl: 45.
28. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest* 2001; 81: 1331-8.
29. Suh Y, Lee KA, Kim WH, Han BG, Vijg J, Park SC. Aging alters the apoptotic response to genotoxic stress. *Nat Med* 2002; 8: 3-4.