

비만세포(Mast cell)과립 염색을 위한 Giemsa염색액의 적정 pH연구

한양대학교 부속병원 조직병리과
김 성 인

Key words : Mast cell granule, Giemsa stain.

I. 서 론

비만세포(mast cell)는 정상적으로 인체의 결합 조직에 존재하는 세포이며, 주로 혈관주위에 몇 개씩 모여 있다. 이 세포는 헤파린(heparin)과 유사한 항응고물질(anti-coagulant)과 혈관을 확장시키고 모세혈관의 투과성을 증가시키는 히스타민(histamine) 등을 분비한다.

이외에도 인체에 이물질(foreign bodies)이 침입하는 경우, 일종의 방어기전을 활성화 시키는 여러 가지 활동성 증개물질(active mediators), 즉 Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis(ECF-A), Leukotriene C, Platelet-activating factor(PAF) 등을 분비한다. 이런 활동성 증개물질이 방출되면 부종, 속(shock), 동통, 과응집, 발열 등과 같은 알려지 반응이 촉진되며, 형질세포(plasma cells)의 항체생성을 자극한다³⁾.

따라서 비만세포는 일반적인 염증이나 두드러기(urticaria) 등의 질환에서 정상시 보다 세포수가 증가되며, 특히 색소성 두드러기(urticaria pigmentosa), 국소성 비만세포증, 전신성 비만세포증에서는 대단히 많은 비만세포의 증가를 특징으로 한다⁵⁾.

그러므로 조직표본상에서 비만세포의 수적증가를 확인함으로써 색소성 두드러기와 같은 질병을 진단할 수 있으나, 비만세포는 일반 염색(hematoxylin & eosin stain)으로는 결합조직 내의 다른 세포와 형태학적으로 구분되지 않으므로 비만세포를 증명하는 특수염색이 요구된다. 비만세포는 세포질 내에 많은 과립이 존재하는 형태적 특징을 가지고 있으며, 이 과립 내에 존재하는 sulfated glycosaminoglycan 성분을 이용한 여러 가지 염색법이 비만세포를 증명하는 특수염색법으로 사용되고 있다⁶⁾.

일반적으로 비만세포의 과립을 증명하기 위한

특수염색법에는 Toluidine blue 염색, PAS 염색, Giemsa 염색법 등이 사용되고 있으며 전자의 두 염색법은 특이성이 낮고, 몇 가지 단점을 갖고 있으나 염색법이 간단하여 일반적으로 많이 이용되고 있다. Giemsa 염색법은 전통적으로 혈액학에서 malaria 등의 원충을 보기 위해 개발된 염색법이나 조직 내의 비만세포 과립을 적색으로 나타낼 수 있어 일찍부터 조직학에서도 이용되어 왔다. 그러나 Giemsa 염색은 Wright 염색과 함께 대표적인 중성 염색(neutral stain)으로 분류되며, 중성 염색은 염색액의 pH가 염색결과에 많은 영향을 미치는 염색방법으로 일반적으로 혈액학에서 사용되는 Giemsa 염색방법을 그대로 이용해서는 균일한 염색결과를 얻을 수 없다¹⁾.

본 검사실에서는 Giemsa 염색법을 이용한 비만세포 과립의 염색에 균일한 염색결과를 얻을 수 있는 적절한 염색액의 pH를 조사하고, 염색결과에 영향을 미치는 여러 가지 인자를 연구하여 특이성과 민감성이 높은 염색방법을 적립하고자 이 실험을 행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험조직의 선정

실험조직은 본 검사실에 의뢰된 피부천자생검(skin punch biopsy) 조직 중 색소성 두드러기로 진단된 비만세포가 많이 존재하는 인체의 피부조직 3례를 실험조직으로 선정하였다. 이 조직들은 검체 채취 후 즉시 10% formalin에 고정하여 일반적인 파라핀 침투과정을 거쳤으며, 3군의 조직을 회전형박절기를 사용하여 4 μm 두께로 박절하여 각각 20매의 유리슬라이드에 부착하여 실험에 사

용하였다.

2. 염색액의 제조

1) Giemsa 저장액

Giemsa powder	1 gm(BDH 제품)
glycerin	40 ml
methanol	60 ml

2) 완충액(Buffer)

① Sodium acetate-acetic acid buffer :

pH 4~5 완충액은 0.2 M sodium acetate 용액과 0.2 M acetic acid를 혼합하여 만들었다.

② Phosphate buffer :

pH 6~9 완충액은 0.2 M Na₂HPO₄와 0.2 M NaH₂PO₄ 용액을 혼합하여 만들었다.

3) Giemsa 사용액

각각의 pH 완충액 30 ml에 Giemsa 저장액 1 ml를 사용직전에 혼합하였다.

각각의 pH제조에 사용된 완충액 :

pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
1	1	2	2	2	2

* 1 : Sodium acetate-acetic acid buffer
2 : Phosphate buffer

4) 염색방법

① 박절된 슬라이드를 xylene과 alcohol을 사용하여 탈파라핀, 함수시킨 후 흐르는 물에서 5분간 수세하였다.

② 각각의 pH 완충액 30 ml에 Giemsa 저장액 1 ml를 사용하기 전에 혼합한 염색액에 박절한 조직슬라이드를 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다.

③ 염색액에서 꺼낸 슬라이드를 증류수로 잠깐 염색액을 씻은 후, 100% 에탄올에서 20초간 분별하여 즉시 xylene 3단계를 각각 1분간 거쳐 canada balsam으로 봉입하여 광학현미경으로 검경하였다.

III. 결 과

① Giemsa 염색에서 비만세포의 과립은 적색으로 핵은 청색으로 염색되었다.

② pH 7.0~8.0 사이의 완충액을 사용한 염색액

에서 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

③ pH가 낮을수록 염색력이 약하고 pH가 높을수록 염색력이 강하게 나타났다.

④ Giemsa 염색액에 반응하는 시간은 pH가 높아질수록 짧게 소요되었으며(10분), 실온에서 30분 이상 장시간 반응시켜도 염색결과는 동일하였다.

⑤ 표피(epidermis)의 최외층과 결합조직의 교원섬유가 pH 6.0 이하에서는 핑크색으로, pH 7.0 이상에서는 청색으로 염색되었다.

⑥ 염색액에서 꺼낸 후 무수알콜로 분별하는 시간은 20~30초가 적당하였고, 30초 이상 반응하면 급격히 탈색되었다.

pH	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
비만세포과립(적색) 핵	1+	1+	2+	3+	3+	2+
교원섬유	blue	blue	blue	blue	blue	blue
표피 최외층	pink	pink	pink	blue	blue	blue

IV. 고 찰

Wright나 Giemsa염료와 같은 중성염료(neutral stains)는 비교적 물에 잘 용해되지 않고, 메타놀이나 에타놀에 용해되며 에타놀이나 메타놀과 글리세롤(glycerol) 동량 혼합액(equal weight mixture)에서 가장 잘 용해된다(H. J. Conn, 1977). 본 실험에서는 Giemsa 염색액 제조에 글리세롤 40 ml와 methanol 60 ml(이 비율이 무게로 동량)에 Giemsa powder 1 gm을 용해시켜 1% 용액을 저장액으로 준비하였으며, 제조 후 1주일 정도의 숙성기간이 필요하다는 보고가 있으나⁷⁾ 즉시 사용하여도 염색이 가능하였으며, 저장액의 보관은 알콜의 방부작용으로 실온에 보관이 가능하며 상당기간 염색력이 유지되었다.

사용시에는 완충액 30 ml에 저장액 1 ml의 비율로 희석하여 약 0.03% 용액을 염색에 사용하여 실험에 염료의 과작용을 배제하고자 하였다. 실제로 고농도의 염색액은 염색결과가 나쁘게 나타났다.

Sheehan(1980) 등은 Giemsa 염색액에 반응시키기 전에 메타놀로 처리하는 것을 주장하지만 이런 과정은 혈액도말표본처럼 고정이 안된 경우에 고정을 위해 필요한 과정이며, 이미 고정액으로 처리한 조직인 경우는 메타놀에 처리한 결과와 처리하지 않은 결과가 동일하게 나타나 의미가 없는 과정으로 사료된다²⁾.

실험에서 비만세포과립은 pH 4.0~9.0까지 모든

pH에서 적색으로 염색되었지만 염색의 강도는 pH가 높을수록 강하게 나타났으며, pH 7.0 이상에서는 결합조직의 교원섬유가 약한 청색으로 나타나 적색으로 염색되는 과립과 대조되어 저배율에서도 검경이 가능하였다. Conn 등은 Giemsa 염색이 염색액의 pH와 고정액의 종류에 영향을 받으므로 적혈구는 적색, 림파구의 세포질은 청색, 핵은 적청색으로 염색되는 것을 기준으로 하여, 알콜 고정인 경우는 pH 6.0~6.5, formalin 고정인 경우는 pH 4.0~4.5, 수은(mercury) 함유 고정인 경우는 pH 5.0~5.4로 각각 염색하여야 한다고 발표하였다(Conn, 1977). 그러나 단지 비만세포의 과립을 증명하기 위해서는 포르말린 고정인 경우 pH 7.0~8.0 사이가 적절한 것으로 사료된다.

완충액 대신 pH 6.8 정도의 증류수를 사용한 경우 과립은 적색으로 염색되었지만 전체적으로 염색이 깨끗치 못했으며, 매 번 동일한 결과를 얻을 수 없는 것으로 봐서 완충액이 염색 반응에 관계되는 것으로 생각된다.

Giemsa(1902) 등은 과염색한 후 약한 초산액(dilut acetic acid)으로 분별하는 것을 권했지만, 본 조사에서는 무수알콜에서 20초 정도 분별하면 핵과 교원섬유가 청색으로 나타나고 염색의 투명도가 유지되어 좋은 결과를 얻을 수 있었고, 알콜에서 30초 이상 반응시키면 탈색되기 시작하여 5분 정도 방치하면 거의 무색으로 탈색되었다. Canada balsam으로 봉입하면 염색이 수개월간 보존되었다.

지금까지 전통적으로 사용해 온 toluidine blue나 methylene blue 등의 염기성 아닐린 염료를 사용하는 염색법은 비만세포가 포함하고 있는 sulfated glycosaminoglycan 성분이 염기성 아닐린 염료와 반응하여 이 염색성(metachromasia)을 나타내는 특성을 이용한 염색법으로 염색과정이 간단하다는 장점이 있지만, 이 염색성을 나타내는 조직성분이 비만세포과립 외에도 많으며, 이 염색성은 알콜과정에서 정염색성으로 전환되므로 수용성 봉입제를

사용하므로 검경시 염색의 질(quality)이 떨어지고, 염색성이 시간이 경과할수록 퇴색되어 염색 후 2시간 이내에 검경을 완료해야 하는 등의 단점을 가지고 있다⁴⁾.

이에 비하여 Giemsa 염색법은 저장액과 완충액(pH 7.0~8.0)을 미리 준비해 놓으면 실온에서 간단히 1시간 이내에 염색을 완료할 수 있으며, 염색 결과가 수개월간 퇴색되지 않으며, 비만세포과립만 적색으로 염색되는 특이성(specificity)과 민감성(sensitivity)이 높은 염색법이라 사료된다.

V. 결 론

1. 비만세포의 과립을 증명하기 위한 가장 적절한 Giemsa 염색액의 pH는 7.8~8.0 사이에서 염색결과가 가장 좋았다.
2. 염색반응은 pH가 높아질수록 빠르고 강하며 pH 7.0 이상에서는 반응 후 10분 정도면 충분한 염색결과를 얻을 수 있었다.
3. Giemsa 염색 후 분별은 무수알콜에서 30초간 분별하는 것이 가장 결과가 좋았으며, 30초 이상 분별하면 급격히 탈색되므로 분별시간은 30초 이내로 제한해야 한다.
4. 염색된 비만세포과립은 적색으로 나타나며, 봉입 후 2~3개월간 퇴색되지 않았다.
5. 일반적으로 비만세포과립을 증명하기 위해 시행하는 변색성 염색법보다 Giemsa 염색법이 일관된 결과를 얻을 수 있으며, 염색결과도 수용성 봉입제를 사용해야 하는 변색성 염색법과는 달리 더욱 선명하고 쉽게 탈색되지 않으며 슬라이드의 보관도 용이한 것 등의 장점이 많으므로 비만세포과립을 증명하기 위해서는 pH를 7.8~8.0으로 조절한 Giemsa 염색법이 더욱 특이성이 높은 염색법이라 사료된다.

A Study on the Optimal pH of Giemsa Stain for the Mast Cell Granules

Kim, S. I., CT IAC(5660)

Dept. of Pathology, Hanyang University Hospital

ABSTRACT

This study was conducted to find out the optimal pH of Giemsa stain for the demonstration of mast cell granules. Various buffers from pH 4.0 to pH 9.0 were used. Sections were treated for 30 minutes with a mixture of buffer 30 ml and stock Giemsa solution 1 ml. After washing with distilled water, decolorization is performed with absolute ethanol

for 20 seconds and clear in xylene 3 steps, and mount in a canada balsam.

The results are that mast cell granules were stained red and nuclei were blue, collagen fibers were pink to light-blue in all pH solutions. The best results were obtained at pH 7.0~8.0 solutions and the more increased pH solution were used the more intensity stain result were obtained.

REFERENCE

1. H. J. Conn : Biological Stains. 489~502, 1976.
2. D. C. Sheehan : Theory and practice of histotechnology. 153~156, 1980.
3. C. R. Leeson : Textbook of histology. 112~114, 1985.
4. C. R. Taylor : Immunomicroscopy ; A dignostic tool for the surgical pathologist. 162, 1986.
5. 대한병리학회 : 병리학. 1133~1165, 1990.
6. J. D. Bancroft : Theory and practice of histological techniques. 638, 1990.
7. R. A. Drury : Carleton's histological technique. 171~172, 1980.