

신선조직표본과 고정조직표본의 시간변화에 따른 자기공명영상 소견:적출후 최적 검사 시간과 고정방법¹

최성규 · 임명관 · 조순구 · 여규동 · 서창해

목 적 : 자기공명영상술의 발전에 따라 생체 상태에서 뿐만 아니라 적출된 조직표본에서도 자기공명영상 및 분광경검사법(spectroscopy) 등에 의한 진단이 가능하게 되었다. 적출 후 여러방법으로 처리한 조직 표본의 시간변화에 따른 신호강도의 변화를 측정하여 조직표본의 자기공명영상에 가장 적당한 검사시간과 고정방법에 대하여 알아 보았다.

대상 및 방법 : 8마리의 정상 토끼의 간장과 신장조직을 대상으로 생체상태에서의 신호강도를 측정 후, 75% 에탄올, 10% 포르말린, 0.9% 생리 식염수에 고정된 고정조직과 신선조직을 30분, 1시간 30분, 3시간, 6시간, 12시간 경과후에 자기공명영상을 시행하여 신호강도 변화를 관찰하였다.

결 과 : T1 강조영상에서는 에탄올과 포르말린에 고정된 고정조직과 신선조직 모두에서 처음 30분에 시행한 영상에서 의미있는 신호강도의 증가가 있었으며 그 후에도 시간변화에 따라 신호강도가 증가하였다. T2 강조영상에서는 에탄올과 포르말린에 고정된 고정 조직표본과 신선조직에서 생체상태에서와 유사한 신호강도를 보였으며, T1 강조영상보다 시간경과에 따른 신호강도의 변화가 적었다.

결 론 : 조직표본의 자기공명영상에서는 생체상태에서와 같은 신호강도를 얻기 위해서는 가능한 짧은 시간내에 아무런 처치도 하지않은 신선 조직표본으로 자기공명영상을 시행해야 하며, 고정시에는 T2 강조영상에서 T1 강조영상보다 생체상태와 비슷한 신호강도를 얻을 수 있다.

최근 적출한 조직표본의 자기공명영상을 이용한 연구들이 많이 보고되고 있는데(1-8) 이러한 조직들의 대부분은 고정과정을 거치게되고 고정된 조직은 생체와 다른 상태에 있게되므로 고정과정이 자기공명영상에 미치는 영향에 대한 이해가 필수적이라 하겠고 몇몇 이에 대한 연구들이 있어 왔으나 발표자에 따라, 또는 연구된 장기나 조직에 따라 약간씩 다른 결과들이 발표되어 고정액이나 고정시간에 따른 신호강도의 변화에 대해 체계적인 이해가 이루어지지 않고 있다(1-5).

조직표본을 이용한 자기공명영상은 조직표본 크기에 맞는 적절한 코일의 사용이나, 충전요소(filling factor)의 개선에 의하여 생체상태에서의 자기공명영상보다 신호대 잡음비가 높고, 강력한 외부자기장 또는 자장경사를 사용함으로써 보다 높은 공간분해능을 얻을 수 있는 장점이 있다. 반면 조직을 적절한 고정액에 고정해야만 하기 때문에 고정액에 의한 신호강도의 변화가 있을 수 있는 단점이 있다(2-4).

이에 저자들은 토끼의 간장과 신장조직표본을 이용하여 아무런 고정을 하지 않은 신선조직과 고정액에 보관한 고정조직의

T1 강조영상과 T2 강조영상에서의 신호강도의 변화를 관찰하고, 생체상태의 신호강도와 비교하여 생체상태와 가장 비슷한 신호강도를 보이는 고정방법과 조직적출 후의 시간에 대하여 알아보하고자 하였다.

대상 및 방법

검사기기는 1.5 Telsa MR imaging system, GE Signa Horizon (Milwaukee, Wisconsin, USA)를 이용하여 체중이 1.8-2.5Kg 정도인(mean 2.1Kg) 정상 토끼 10마리의 간장과 신장을 대상으로 하였으며 신장은 피질과 수질을 따로 분석하였다. 귀정맥을 통하여 펜토탈(Pentotal sodium 2.5%) 0.5-1cc/Kg을 주사하여 마취시킨 후, MR을 시행하여 생체상태에서의 간장과 신장의 T1 강조영상과 T2 강조영상을 촬영하였으며(Fig. 1, 2), 곧 토끼의 간장과 신장의 조직을 적출하여 약 20-30cc의 0.9% 생리식염수, 75% 에탄올, 10% 포르말린을 담은 플라스틱통에 넣어 고정하였으며, 하나의 통에는 적출 조직만을 넣었다. 10마리 모두의 간장과 신장을 적출하여 에탄올, 포르말린에 5개씩의 조직을 고정하였으며, 5개의 생리식염

¹ 인하대학교 의과대학 방사선과학교실
이 논문은 1997년 7월 8일 접수하여 1997년 11월 3일에 채택되었음

수에 담긴 조직과 적출조직만의 신선조직표본을 대상으로 장기 적출후 30분후 부터 12시간까지 일정한 시간간격으로 T1 강조영상과 T2 강조영상을 촬영하였다(Fig. 3, 4).

T1 강조영상은 반복시간(repetition time, TR) 400msec, 에코시간(echo time, TE) 9msec로, T2 강조영상은 반복시간 (TR) 3500-3000msec, 에코시간(TE) 102-100msec로 시행 하였고, Field of view(FOV) 20-16×20-16cm, 절편두께/ 간격 4mm/1.5mm, Matrix No. 256×256, 그리고 여기횟수 (NEX)는 2회로 하였다.

조직표본의 신호강도 (signal intensity) 측정은 1mm² 크기의 관심구역(region of interest, ROI)을 설정하여, 신장 피질, 신장 수질과 간장의 다섯군데에서 신호강도를 측정하여 평균값을 구했으며, T1 강조영상과 T2 강조영상 각각에서 고정상태와 시간변화에 따른 신호강도의 변화를 조직별로 표와 그래프로 표시하여 신호강도의 변화를 분석하였고, 생체상태에서와 고정상태에 따른 신호강도의 차이는 student t-test를 이용하여, 조직 적출 후 고정상태에서의 시간변화에 따른 신호강도의 변화는

repeated measured ANOVA test를 이용하여 통계적 유의성을 알아보았으며, 95%(P<0.05)유의수준에서 판단하였다.

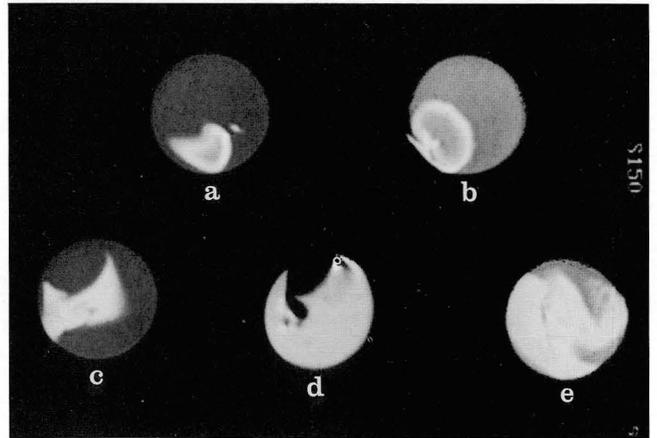


Fig. 3. Signal intensity of rabbit liver and kidney specimen was measured on T1WI at 6 hours after resection.
 a: Signal intensity of liver tissue fixed on normal saline was measured on T1WI
 b: Signal intensity of untreated liver tissue was measured on T1WI
 c: Signal intensity of liver tissue fixed on 75% ethanol was measured on T1WI
 d: Signal intensity of renal cortex and medulla fixed on 10% formalin were measured on T1WI
 e: Signal intensity of renal cortex and medulla fixed on 75% ethanol were measured on T1WI



Fig. 1. Signal intensity of renal cortex(open arrow) and medulla(arrow) of rabbit in vivo state was measured on T1WI after pentotal sodium injection on IV route.

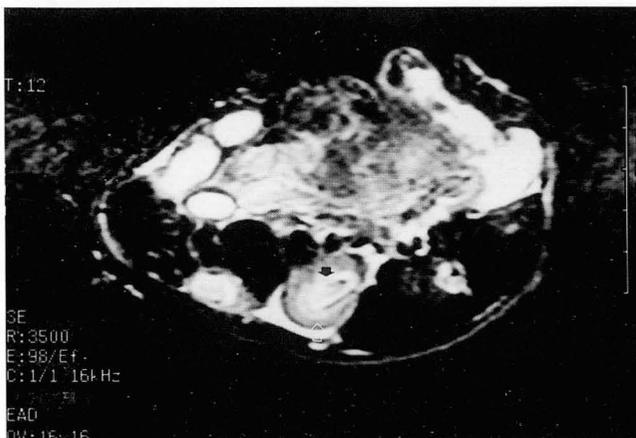


Fig. 2. Signal intensity of renal cortex(open arrow) and medulla(arrow) of rabbit in vivo state was measured on T2WI after pentotal sodium injection on IV route.

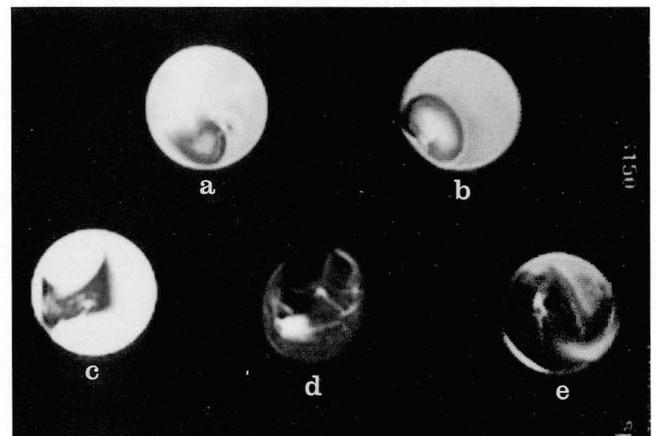


Fig. 4. Signal intensity of rabbit liver and kidney specimen was measured on T2WI at 6 hours after resection.
 a: Signal intensity of liver tissue fixed on normal saline was measured on T2WI
 b: Signal intensity of untreated liver tissue was measured on T2WI
 c: Signal intensity of liver tissue fixed on 75% ethanol was measured on T2WI
 d: Signal intensity of renal cortex and medulla fixed on 10% formalin were measured on T2WI
 e: Signal intensity of renal cortex and medulla fixed on 75% ethanol were measured on T2WI

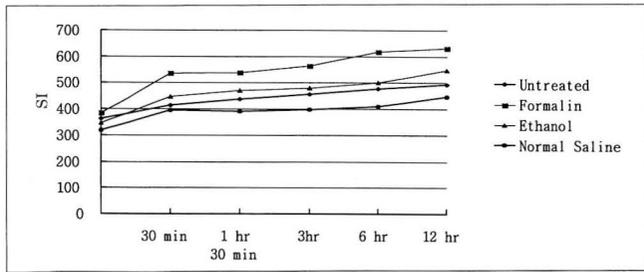


Fig. 5. Signal intensity(SI) of Liver on T1WI

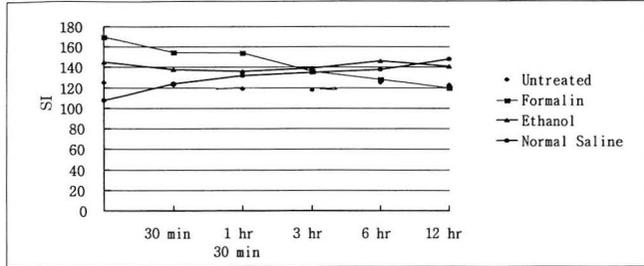


Fig. 6. Signal intensity(SI) of Liver on T2WI

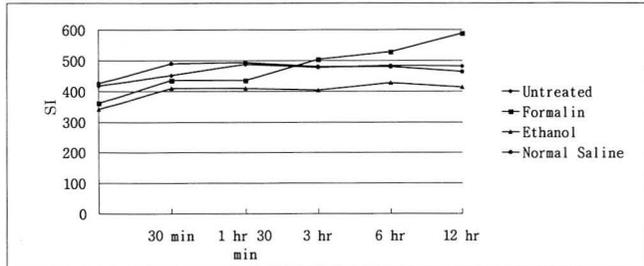


Fig. 7. Signal intensity(SI) of Renal cortex on T1WI

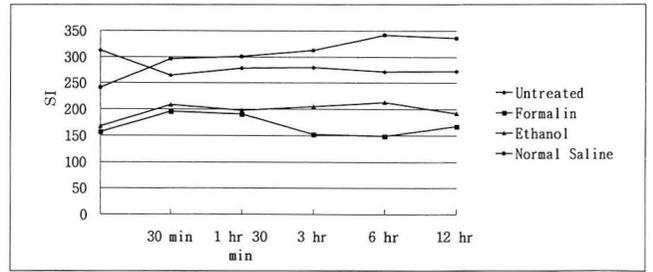


Fig. 8. Signal intensity(SI) of Renal cortex on T2WI

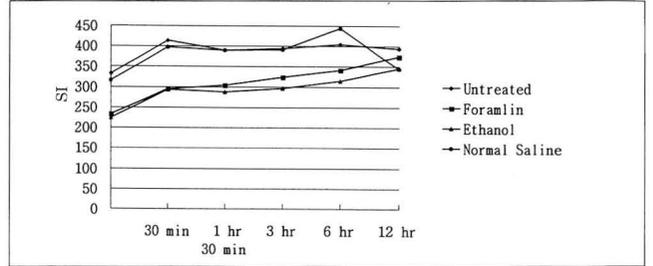


Fig. 9. Signal intensity(SI) of Renal medulla on T1WI

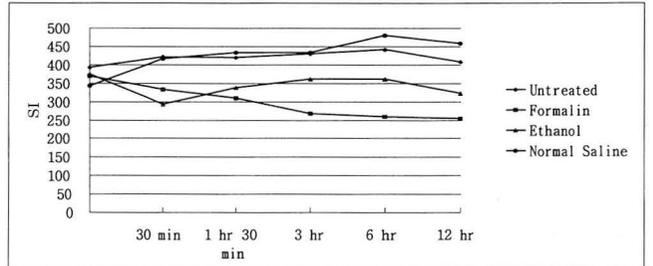


Fig. 10. Signal intensity(SI) of Renal medulla on T2WI

결 과

T1 강조영상

간장의 T1 강조영상에서는 에탄올에 고정된 조직표본에서는 생체상태에서의 신호강도와 통계적으로 의미있는 변화를 보이지 않았으나($P > 0.05$), 고정 이후에는 신호강도가 의미있는 증가를 보였으며($P < 0.05$), 포르말린에 고정된 조직표본과 생리식염수에 담긴 조직표본, 신선 조직표본에서는 고정 후에 의미있는 신호강도의 증가가 있었으며($P < 0.05$) 고정 이후에도 시간변화에 따라 계속하여 신호강도가 증가하였다($P < 0.05$, Fig. 5).

신장 피질의 T1 강조영상에서는 포르말린에 고정된 조직표본과 생리식염수에 담긴 조직표본에서 생체상태에서보다 의미있는 신호강도의 증가가 있었으나($P < 0.05$), 포르말린에 고정된 조직표본에서는 고정 후 시간변화에 따라 신호강도의 증가가 있었으며 생리식염수에 담긴 조직에서는 시간변화에 따른 신호강도의 변화가 없었다($P < 0.05$). 에탄올에 고정된 조직과 신선조직에서는 생체상태에서보다 의미있는 신호강도의 변화를 보이지 않았고, 그 후의 시간변화에 따라 의미있는 변화는 보이지 않았다($P < 0.05$, Fig. 7).

신장 수질의 T1 강조영상에서는 에탄올과 포르말린에 고정된 조직표본과 생리식염수에 담긴 조직표본, 그리고 신선조

직 모두에서 의미있는 신호강도의 증가가 있었고, 신선 조직표본에서는 적출 후 시간변화에 따라 신호강도의 증가가 있었으나 다른 고정조직들에서는 통계적으로 의미있는 신호강도의 변화는 없었다($P < 0.05$, Fig. 9).

T2 강조영상

간장의 T2 강조영상에서는 생리식염수에 담긴 조직표본에서는 생체상태에서보다 의미있는 신호강도의 증가가 있었고, 다른 에탄올과 포르말린에 고정된 표본조직과 신선 조직표본에서는 고정 후 생체상태에서보다 의미있는 신호강도의 변화는 없었다($P < 0.05$). 조직 고정 후 시간변화에 따른 통계적으로 의미있는 신호강도의 변화는 모든 조직표본에서 보이지 않았다($P < 0.05$, Fig. 6).

신장 피질의 T2 강조영상에서는 생리 식염수에 담긴 조직표본에서는 생체상태에서보다 신호강도의 증가가 있었으나, 신선 조직표본과 에탄올과 포르말린에 고정된 조직표본에서는 통계적으로 의미있는 신호강도의 변화가 없었다($P < 0.05$). 조직고정 후 시간변화에 따른 신호강도의 변화는 신선조직에서만 적출 후 6시간 이후에 의미있는 신호강도의 감소가 있었지만, 다른 조직표본들에서는 의미있는 신호강도의 변화는 없었다($P < 0.05$, Fig. 8)

신장 수질의 T2 강조영상에서는 생리식염수에 담긴 조직표

본에서만 생체상태보다 의미있는 신호강도의 증가가 있었으며, 포르말린과 에탄올에 고정된 조직표본과 신선조직에서는 신호강도의 변화를 보이지 않았다($P < 0.05$). 고정후의 시간변화에 따른 신호강도의 변화는 에탄올에 고정된 조직과 신선조직에서는 의미있는 변화가 없었으며, 생리식염수에서는 시간변화에 따라 신호강도가 증가하였고, 포르말린에 고정된 조직에서는 신호강도가 감소하였다($P < 0.05$, Fig. 10)

고 찰

이상적인 조직고정액은 액체상태로서 조직을 수축시키거나 팽창시키지 않아야 하며, 세균이나 진균을 죽이는 효과가 있고, 조직을 용해시키지 않아야 한다. 조직표본을 에탄올이나 포르말린에 고정시키면 건조가 일어나며 에탄올은 조직으로 빨리 침투하여 조직을 건조시키고 심하게 수축시킨다(10). 포르말린은 조직을 경화시키고 초기에는 조직을 수축시키지만 1시간 정도 후에는 조직을 팽창시키고, 곧 정상 크기로 돌아오며, 또한 조직의 아미노기(NH₂)와 결합하여 조직내의 수분을 떨어뜨린다(2, 10). 조직이 고정되면 조직내의 수분함량이 감소하게 되고, 이는 자기공명영상에서 T1 측정치의 감소로 나타나며, 신선조직의 경우에도 수분증발에 의한 조직의 건조가 일어나고 T1 측정치의 감소도 나타난다(1, 2). 조직표본을 건조되지 않도록 생리 식염수나 포르말린에 담가둔 경우 T1, T2 측정치가 몇시간 동안은 안정된 값을 유지한다는 보고가 있으나(1, 2), 수분증발을 적절히 막아 조직이 건조되지 않게 한 경우에도 유의한 T1 측정치의 감소가 있었고 이는 자가분해시에 세포내 미토콘드리아(mitochondria)내의 망간(Manganase)에 의한 것일 것이라는 보고도 있다(1, 11, 12). 따라서, 조직표본에서의 어느 정도의 T1 측정치의 감소는 불가피한 것이라 하겠다. 이번 연구에서도 T1 강조영상에서 대부분의 고정후 조직표본에서 신호강도의 증가가 있어 이전의 보고와 비슷한 결과를 보였다.

고정시간에 따른 신호강도의 변화에 대하여 Thickman등(2)은 포르말린에 고정된 쥐의 간장과 비장조직에서 T1 강조영상에서 처음 30분간에는 큰 변화를 보이지 않다가 1시간 30분 이후부터 변화가 뚜렷하였다고 하였고, Sandhu등(13)은 조직이 적출되자마자 매우 빠른 T1, T2값의 변화를 보이지만 T1 값은 곧 안정되어 적어도 6시간정도 유지된다고 하였다. 반면에 Kikins등(5)은 포르말린에 고정된 인두부(larynx)의 조직표본의 신호강도에 유의한 변화가 없었다고 하여 앞의 결과들과 다른 보고를 하였다. 오동(3)은 사람의 위조직표본을 10% 포르말린에 2시간 동안 고정된 조직이 고정하지 않은 신선조직표본에 비해 자기공명영상에서 점막층과 점막하층, 근육층 모두에서 T1WI, T2WI 모두에서 높은 신호강도를 보였다고 하였으며, 고정시간과는 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다고 하였다. 본 연구에서는 T1 강조영상에서는 조직표본의 종류와 고정액에 따라 다양한 결과를 보였으나, T2 강조영상에서는 대부분의 경우에 시간변화에 따라 통계적으로 의미있는 변화는 보이지 않았다.

신선조직의 T1 강조영상에서의 신호강도 변화에 대하여는,

생쥐(mice)의 간장의 신선조직표본에서 시간변화에 따라 T1 측정치가 감소하여 T1강조영상의 신호강도가 증가하였다는 Moser등(6)의 보고가 있으며, Yuji등(1)은 쥐의 간장, 췌장조직에서 시간경과에 따라 신호강도의 증가가 있었지만, 신장, 비장등에서는 신호강도의 변화가 없었다고 하였다. 또한 Thickman등(2)은 간장과 비장조직의 T1 측정치는 안정적이어서 T1 강조영상에서 신호강도가 비교적 일정하게 유지되지만, 24 시간후에는 신호강도의 증가가 있다고 하였다. 본 연구에서는 신장 피질의 신선조직에서는 시간변화에 따라 의미있는 신호강도의 변화를 보이지 않았으나, 간장과 신장 수질의 신호강도는 시간변화에 따라 통계적으로 유의하게 증가하는 양상을 보였다.

T2 측정치의 변화에 대해서는 Thickman등(2)은 신선조직에서는 48시간정도까지는 일정한 양상을 보여 안정적이었다고 하였으며, 고정조직의 경우에는 처음 30분 이내에 급격한 신호강도의 변화를 보였으며, 포르말린에 고정된 경우에는 T2 측정치가 처음에는 증가하였다가 감소하는 양상을 보였으며, 알코올에 고정된 경우에는 처음에 증가하다가 일정해지는 양상을 보여 고정조건 등에 의해 다른 변화양상을 보인다고 하였다. 본 연구에서는 간장과 신장 수질의 신선조직에서는 비교적 일정한 양상을 보였고, 신장 피질에서는 일정한 신호강도를 보이다가 6시간이후에 신호강도의 감소가 있었으며, 고정조직에서는 포르말린에 고정된 신장 수질의 신호강도가 시간변화에 따라 감소한 것 이외에는 일정한 신호강도를 보였다.

생리식염수에 담가둔 쥐의 간장조직표본에서는 Thickman등(2)의 보고에서는 T1 측정치의 상승을 보이다가 6시간정도에서부터 평형을 이루었고, T2 측정치는 24시간까지 증가하는 양상을 보였고 비장조직에서도 T1, T2 측정치의 상승을 보였다. 본연구에서는 간장, 신장조직 모두에서 T1 강조영상, T2 강조영상에서 신호강도가 증가하였으며, 조직고정후 시간변화에 따라 간장의 T1 강조영상과 신장 수질의 T2 강조영상에서 신호강도의 증가가 있었다.

이번 연구의 몇가지 문제점 또는 제한점이 있는데 우선 간장조직과 신장조직만을 대상으로 하여 다른 장기에서의 신호강도 변화에 대한 연구가 이루어지지 못하였고, 조직의 수가 적었으며, 분광경검사법(spectroscopy)을 시행하지 않고 T1 강조영상과 T2 강조영상에서의 상대적인 신호강도의 변화만을 분석하였기 때문에 절대적인 T1, T2 측정치의 변화는 알 수 없었으며, 다른 pulse sequence에서도 같은 결과를 보인다고 단정할 수 없었다. 또한 조직표본의 크기가 작고 여러개의 관심영역에서 신호강도를 측정하기 때문에 신피질과 수질에서는 Colum of Bertin과 일부 신배(Renal calyx), 간장 조직에서는 간내담도나 혈관의 신호강도가 포함되어 순수 신장과 간장의 신호강도 이외의 다른 신호강도가 포함되었을 수가 있으며, 각조직의 시간변화에 따른 신호강도 변화의 원인에 대한 분석이 이루어지지 않아 고정 후 조직표본의 건조에 의한 변화인지 세포내 미세 변화에 의한 것인지를 분석하려는 시도를 하지 못한 제한점들이 있었다.

그러나 이상의 결과에서 T1 강조영상에서는 신선조직과 고

정조직 모두에서 대부분 통계적으로 유의한 신호강도 증가를 보였으며, 시간변화에 따라 신호강도가 증가하는 경우가 많았고, 신선조직과 에탄올과 포르말린에 고정된 조직표본의 T2 강조영상에서는 T1 강조영상보다 생체상태와의 신호강도 변화가 적었으며, 시간변화에 따른 신호강도의 변화도 적었으므로, 생체상태에서와 같은 신호강도를 얻기 위해서는 신선조직을 이용하여 가장 빠른 시간안에 자기공명영상술을 시행하는 것이 좋으며, 조직고정후 12시간까지는 T2 강조영상에서 신호강도의 변화가 적어서 T1 강조영상보다 생체상태에서와 유사한 신호강도를 얻을 수 있을 것이라 생각되며, 앞으로 장기별로 또는 같은 장기안에서도 부위에 따른 신호강도의 차이가 나는 원인에 대한 좀 더 나은 연구들이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론적으로 조직표본의 자기공명영상에서 생체상태와 가장 비슷한 자기공명영상을 얻기 위해서는 가장 빠른 시간에 고정하지 않은 신선 조직표본상태에서 자기공명영상을 시행하여야 하며 에탄올과 포르말린에 고정된 고정조직과 신선조직에서는 T2 강조영상에서 T1 강조영상에서 보다 생체상태와의 신호강도의 차이와, 시간변화에 따른 신호강도의 변화도 적을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Yuji B, Markus ML, David DS. Time after excision and temperature alter ex vivo tissue relaxation time measurement. *J Magn Reson Imaging* 1994;4:647-651
2. David IT, Harold LK, Gerald W. Nuclear Magnetic Resonance characteristics of fresh and fixed tissue: the effect of elapsed time. *Radiology* 1983;148:183-185

3. Auh YH, Lim TH, Lee DH. In vitro MR imaging of the resected stomach with a 4.7-T superconducting magnet. *Radiology* 1994;191:129-134
4. Imai Y, Kressel HY, Saul SH. Colorectal tumors; an in vitro study of High-resolution MR imaging. *Radiology* 1990;177:695-701
5. Kikins R, Wolfansberger M, Boesch C. Larynx; MR imaging at 2.35-T. *Radiology* 1989;171:165-169
6. Moser E, Holzmueller P, Gomiscek G. Liver tissue characterization by in vitro NMR, Tissue handling and biological variation. *Magn Reson Med* 1992;24:213-220
7. Chatham JC, Ackerman S, Blackband SJ. High-resolution IH NMR imaging of regional ischemia in the isolated perfused rabbit heart at 4.7-T. *Magn Reson Med* 1991;21:144-150
8. Blackband SJ, Chatham JC, Odell W. Echoplanar imaging of isolated perfused rabbit heart at 4.7-T; a comparison of Langendorff and working heart preparations. *Magn Reson Med* 1990;15:240-245
9. Orel SG, Schnall MD, Livolsi VA. Suspicious breast lesions; MR imaging with radiologic-pathologic correlation. *Radiology* 1994;190:485-493
10. Saryan LA, Hollis DP, Economou JS, Eggleston JC. Nuclear magnetic resonance studies of cancer IV. correlation of water content with tissue relaxation times. *J Natl Cancer Inst* 1974;52:599-602
11. Keen CL, Lonnerdal B, Hurley LS. *Biochemistry of the essential ultratrace elements*. Newyork. NY; Plenum 1984;89-132
12. Kore M. *Manganese homeostasis in humans and its role in disease states. Essential and toxic trace elements in human health and disease*. Newyork NY; Arliss 1988;253-273
13. Sandhu HS, Friedmann GB. Proton spin lattice relaxation time study in tissue of the adult newt *Tarichia granulosa*. (*Amphibia: Urodele*) *Med Phys* 1978;5:514-517

Sequential Changes of Fresh and Fixed Specimen on MRI: Optimal Time Interval and Fixatives for Good Correlation with in Vivo State¹

Sung Kyu Choi, M.D., Myung Kwan Lim, M.D., Soon Gu Cho, M.D.
Kyu Tong Yoh, M.D., Chang Hae Suh, M.D.

¹*Department of Radiology, Inha University, College of Medicine*

Purpose: With the development of MR Imaging techniques, MRI and MR spectroscopy can be used to evaluate specimens both in vivo and in vitro. For extracted tissue specimens we wished to obtain MR images which correlated well with images obtained in vivo; the purpose of this study was to determine which fixatives and time interval best facilitated this objective.

Materials and Methods: After in vivo MR imaging, sample tissues of liver, renal cortex and renal medulla were obtained from ten healthy rabbits. Each tissue sample was placed in 75% ethanol, 10% formalin, and 0.9% normal saline and MR scans of each sample were performed at 30 minutes, 1 1/2, 3, 6, and 12 hours after resection. Signal intensities of the images were measured and their sequential changes were evaluated.

Results: On T1WI, signal intensities of both tissue specimens fixed in formalin and ethanol and untreated specimens increased significantly during the first 30 minutes. The increased signal intensity then seen for 12 hours was greater than on T2WI. On T2WI, signal intensities of tissue specimens fixed in formalin and ethanol and untreated specimens showed no significant changes within the first 30 minutes; after that, they showed less signal intensity change for 12 hours than on T1WI.

Conclusion: To obtain MR images with the same signal intensities as in vivo tissue, MRI of tissue specimens in the untreated state should be performed as soon as possible after resection. On T2WI, signal intensities of tissue specimens were more similar to in vivo tissue than on T1WI.

Index words: Magnetic Resonance(MR), tissue characterization
Specimens, MR

Address reprint requests to: Sung Kyu Choi, M.D., Department of Radiology, Inha University Hospital
Shinheung-dong 7-206, Jung-gu Incheon, 400-103 Tel. 82-32-890-2766 Fax. 82-32-890-2743