

실험동물용 가시광선/근적외선 생체 이미징 소형 장비의 개발

엄년식¹ · 박희준² · 정진용³ · 한정현¹ · 김형경¹ · 장은윤⁴ · 이석재¹ · 강병호⁵ · 강신원^{6,+}

Development of Small System for Mobile-Based Visible/NIR Animal Imaging

Nyeon-Sik Eum¹, Hee-Joon Park², Jin Yong Jung³, Jung-Hyun Han¹, Hyung-Kyung Kim¹, Eun-Yoon Jang⁴, Suck-Jae Lee¹, Byoung-Ho Kang⁵, and Shin-Won Kang^{6,+}

Abstract

In this study, we have developed a mobile-based visible/NIR(Near InfraRed) imaging equipment for the animal testing. This equipment can provide visible, NIR and merged image through the viewer program. Especially, merged image help researcher to understand visual messages at animal in-vivo test. Also, it is available to send real-time images through the smart phone. Researcher can communicate with another researcher who is a long distance away. Also, the equipment was made with portable small size to enable it to commercialize.

Keywords : Visible/NIR Imaging, Animal Imaging, Fluorescence, Mobile-Based

1. 서론

암의 조기 진단과 치료는 많은 의학과 과학자의 중요한 관심사이다. 기존의 생체조직 분석은 CT, MRI, PET, 초음파 등 비침습적(non-invasive) 물리적 영상 진단 방법이 널리 이용되어 왔으나 대부분 사람을 대상으로 한 임상진단용으로 개발되어왔다[1].

그러나 신약과 바이오 마커 등을 개발한 경우 이를 테스트하기 위한 임상실험용 동물 이미징 장비의 개발은 현재 미흡한 실정이다.

신약후보물질의 치료효과를 판정하거나 그 효과기전의 작동을 보여줄 수 있는 바이오마커는 전임상 혹은 임상시험 단계에서 매우 중요한 역할을 한다. 특히 영상은 이론적인 설명에 비하여 다양한 정보를 한꺼번에 줄 수 있을 뿐만 아니라 더 정확한 정보를 제공할

수 있으며 이러한 영상정보는 기초의학이나 임상의학에서 큰 가치와 기여도를 가지므로 매우 중요하다고 할 수 있다[2].

임상실험용 동물을 대상으로 하는 이미징 장비의 경우에는 사람을 대상으로 한 장비에 비해 고려해야하는 몇 가지 특수성이 있다.

첫째, 사람은 병원 등에서 이미지를 찍기 위해 장비가 설치된 장소로 이동하기 쉬우나, 오히려 동물은 이동이 어려운 점이 있는데, 이는 임상실험용 동물은 규정에 정해진 한정된 곳으로만 이동할 수 있기 때문이다. 따라서 임상실험용 동물을 대상으로 하는 이미징 장비는 이동이 용이한 포터블 장비로 개발될 필요성이 높다.

둘째, 동물의 이동은 물론 실험 역시 규정을 만족시키는 곳에서 제한된 인원만이 실험에 참석 가능한데, 이는 동물실험에는 허가된 공간에서 교육을 받은 실험자만이 실험을 할 수 있기 때문이다. 따라서, 임상실험용 동물을 대상으로 하는 이미징 장비는 원격에서 실험을 지시·수행하거나, 현장의 실험자와 원격지의 관리자가 실험 결과의 이미지를 주고 받고 서로 상의할 수 있는 원격 영상전송 및 리모트 서비스 구현이 필요하다.

셋째, 임상실험용 동물을 대상으로 하는 이미징 장비를 포터블 장비로 개발하기 위해서는 기존의 사람을 대상으로 하는 CT, MRI, PET 등의 고가의 대형장치처럼 구성하기는 어렵다. 또한 초음파 이미징 장비는 작은 동물의 내부장기를 섬세하게 표시하기에는 해상도에서 충분치 못한 면이 있다. 따라서 사람을 대상으로 하는 기존 이미징 장비처럼 인체장기의 포괄적인 이미지를 취득하기 보다

¹(주)유바이오메드(U-BioMed Inc.)

²계명대학교 의과대학 의용공학과 (Dept. of Biomedical Engineering, School of Medicine, Keimyung University)

³대구가톨릭대학교 의과대학 마취통증의학교실 (Department of Anesthesiology and pain medicine, School of Medicine, Catholic university of Daegu, Daegu, Korea)

⁴경북대학교 센서 및 디스플레이공학과 (Department of Sensor and Display Engineering, Kyungpook National University)

⁵경북대학교 기능성소자융합플랫폼센터(Center for Functional Devices Fusion Platform, Kyungpook National University)

⁶경북대학교 IT대학 전자공학부 (School of Electronics Engineering, College of IT Engineering, Kyungpook National University)

⁺Corresponding author : swkang@knu.ac.kr

(Received : Dec. 23, 2012, Revised : May 14, 2012, Accepted : May 16, 2012)

는 예측되는 결과를 확인하려는 목적하에 수행되는 동물 임상실험의 특수성을 고려하여, 그 실험에 필요한 특정 이미지를 저렴하고 효율적으로 취득할 수 있는 이미징 장비로 구현할 필요가 있다.

적외선 영역의 파장은 700 nm ~ 1300 nm 로 장파장이기 때문에 인체에 무해하며, 조직 투과력이 좋고 영상의 배후 잡신호를 최소화할 수 있다는 장점을 가지고 있다[3]. 그리고 근적외선 영역에서 형광 특성을 나타내는 형광물질에 이미징 장비를 이용한다면 나노입자를 이용한 바이오센서 및 암세포 targeting 과 같은 관찰에 매우 효과적으로 적용할 수 있을 것이다[4].

본 연구에서는 임상실험용 동물 이미지를 일반적인 가시광 영역의 이미지와 암세포 추적용 형광마커에서 방출하는 근적외선 이미지를 동시에 관찰함으로써 시각적인 이해를 극대화시킬 수 있는 장치를 구현하였으며, 취득된 가시 이미지와 근적외선 이미지를 네트워크 또는 인터넷으로 연결된 원격 단말기에서 실시간으로 관찰할 수 있도록 통신시스템을 구축하였다.

2. 실험 방법

2.1 기기의 설계 및 구성

기기 설계는 가시광과 근적외선을 촬영할 수 있는 CCD 카메라 (Charge-Coupled Device camera)를 각각 사용하고, 카메라로 입사되는 광은 카메라의 특성에 맞게 IR pass filter 와 visible pass filter 를 장착하여 원하는 파장을 받아들일 수 있도록 하였다. 또한 가시광선 영역과 근적외선 영역은 Cubic 형태의 Beam splitter 를 사용하여 두 개의 이미지로 분할할 수 있도록 하였으며, Focusing lens 를 이용하여 이미징 대상의 확대와 축소가 가능하도록 설계하였다. Beam splitter 하단에는 Objective lens 를 장착하고 그 주위에 실험 대상을 밝힐 수 있는 visible light source 및 근적외선 형광물질을 발광시켜주기 위한 여기광원을 원형으로 배열되도록 하였다(Fig. 1).

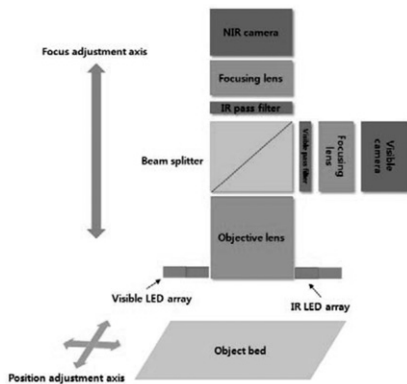


Fig. 1. System of a mobile-based portable visible/NIR image equipment.

가시 광원으로는 Fig. 2의 (a)에 나타나 있는 것처럼 Visible LED Array 를 사용하였고 적외 광원으로는 (b)에서처럼 IR LED Array 를 사용하였다. 광원은 두 가지 영역의 파장을 동시에 또는 선택적으로 조사할 수 있도록 ring guide 형태를 사용하였다.

광학부에서는 카메라, 렌즈, 필터를 포함한다. Fig. 2의 (c)는 렌즈의 사진이고, (d)와 (e)는 CCD 카메라의 칼라특성과 흑백에 대한 파장곡선을 보여주는 그래프다. CCD 카메라는 4.40 μm x 4.40 μm 의 픽셀사이즈를 가지며 이미지센서의 크기는 1/1.8" 이다. 또한 (f)는 근적외선 필터이며 (g)의 특성곡선과 같이 850 nm 의 파장을 받는 필터를 사용하였다.

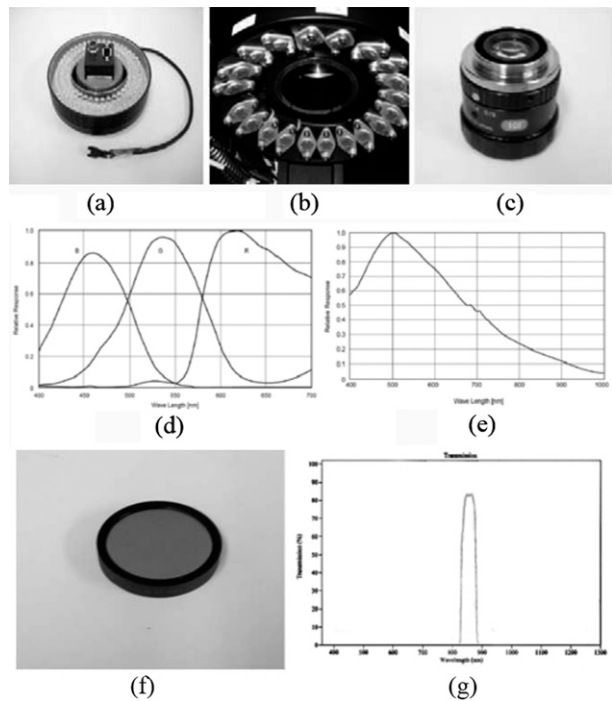


Fig. 2. (a) Visible LED array and CCD camera (b) IR LED array (c) Lens (d) Camera transmission curve(color) (e) Camera transmission curve(black and white) (f) NIR filter (g) NIR filter transmission curve.

실험동물 이미지를 확인하기 위해 Visible/NIR 이미지와 합성된 merged 이미지를 실험자가 모니터로 확인할 수 있도록 프로그램 개발을 하였다.

카메라는 Visible과 NIR 카메라를 사용하여 각각의 카메라에서 Dual 이미지를 얻어서 합성하는 방법을 사용하였고, 합성된 merged 화면구성은 visible, NIR, merged 이미지를 각각의 하나의 큰 화면으로 보도록 전체화면을 구성하였다.

광학계에서 취득된 가시 이미지와 적외 이미지를 네트워크 또는 인터넷으로 연결된 원격 단말기와 공유 또는 공유 단말기로 전송이 가능하도록 네트워크를 구축하여 실험자와 관리자가 실험상황에 대한 의사소통이 원활이 이루어질 수 있도록 하였다.

2.2 적외선 형광 나노입자 제조

본 연구에서 제작된 장비에 적외선 이미징 관찰을 위한 적외선 형광물질은 이중유화방법을 이용하여 PLGA 고분자 내부에 반감기가 짧은 근적외선(Near InfraRed, NIR) 형광 dye 인 Indocyanine Green(ICG)을 담지시켜 나노입자를 제조하였다. 이중유화방법에 관한 Scheme 은 Fig. 3과 같다[5].

실험방법은 PLGA 100 mg 을 클로로포름(chloroform) 2 ml 에 용해시켜 PLGA 유기용액을 제조하고, HSA(Human Serum Albumin) 15 mg, 5 mg/ml 의 친수성 마그네타이트 1 ml 및 친수성 ICG(IndoCynine Green) 5 mg 을 3차 증류수 250 μ l 에 순차적으로 용해시켜 혼합 수용액을 제조하였다. 상기 PLGA 유기용액에 상기 혼합 수용액을 분산 및 교반시켜 제 1 분산액을 제조하였다. 상기 제 1 분산액을 4% -PVA 용액 30 ml 에 천천히 적하시키면서 탐침형 초음파 분산기(700 W, 20 kHz)를 이용하여 95% 출력에서 5분 동안 분산 및 유기용매를 제거하기 위해 밤새 교반시켜 제 2 분산액을 제조하였다. 잔류 PVA 를 제거하기 위하여 상기 제 2 분산액을 17500 rpm 에서 20분 동안 원심분리하여 상층액은 따라내고, 증류수를 첨가하여 초음파로 재분산시킨 뒤 다시 원심분리하는 과정을 3번 반복한 다음, 상기 PLGA/마그네타이트/ICG 나노입자를 동결건조하여 4 $^{\circ}$ C 보관하였다.

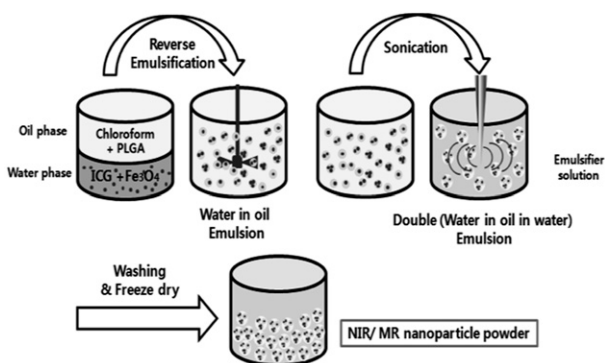


Fig. 3. Nanoparticle fabrication using double emulsion method.

2.3 형광 이미징 테스트 실험

나노입자용액의 영상관찰은 PBS buffer pH 7.4 용액 1.5 ml 를 Eppendorf tube 에 담고 여기에 나노입자분말 5 mg 을 첨가하여 재 분산시켰고, 대조군으로 PBS buffer 용액 1.5 ml 만을 Eppendorf tube 에 담아 두 용액의 근적외선 영상을 비교하였다. 동물실험은 한국생명공학연구원 에 의뢰하여 실험을 진행하였다. 8 주령 female 헤어리스 마우스(Orient Bio, Seongnam, Korea)를 동물마취제를 이용하여 마취시킨 다음 상기 형광 나노입자의 용액을 꼬리피하에 주입하여 Visible/NIR 이미지를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 실험동물 형광 이미징 장비 구축

본 연구에서는 일반적인 가시광 영역의 이미지와 암세포 추적용 형광마커에서 방출하는 근적외선 이미지를 동시에 관찰함으로써 시각적인 이해를 극대화시킬 수 있는 실험동물 형광 이미징 장비를 Fig. 4와 같이 구현하였다.

CCD 는 NIR 카메라와 Visible 카메라를 사용하여 각각의 CCD 에서 Dual 이미지를 얻어서 두 이미지를 겹치게 하여 merged 시키는 방법을 사용하였다. 이때 Visible 이미지를 100으로 두고 그 위에 게이지바(guage bar)로 파장대를 설정한 NIR 이미지를 뿌리는 방법을 택하였다.

화면 구성은 동시에 visible, NIR, merged 이미지 세 개의 화면을 한 창에서 분할해 봄과 동시에 클릭으로 각각의 이미지를 하나의 큰 화면으로 보도록 전체화면을 구성하였다.

해상도는 실험실환경과 사용자 편의를 고려하여, 노트북에 적합한 상태로 1,024 \times 768 에 맞추도록 개발하였고 프로그램 틀의 크기에 제약이 없도록 조절할 수 있게 제작하였다.

실험 중 데이터 분실 가능성을 고려하여 시간간격을 설정해주어 자동으로 저장되는 기능을 부가적으로 추가하였으며, 전송용 이미지를 자동 저장 및 삭제하는 기능을 갖추어 홈페이지 서버에 전송해 원격 모니터링이 가능하도록 하였다.

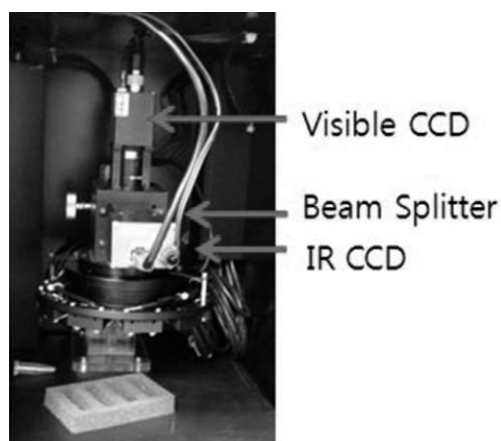


Fig. 4. Mobile-based portable visible/NIR image equipment.

3.2 적외선 형광 나노입자 제조

Fig. 5는 제조한 적외선 형광나노입자를 주사전자현미경(scanning electron microscopy)으로 관찰한 결과이며, 입도분석기로 분석한 결과 평균입경은 190 nm 의 크기를 갖는 입자임을 확인하였다.

본 나노입자를 사용하여 적외선 형광이미지를 획득하였다.

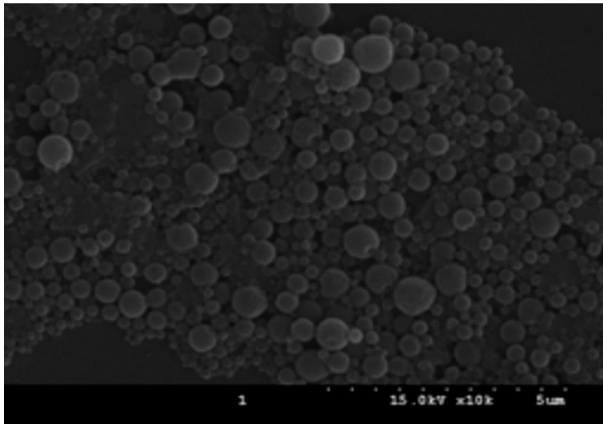


Fig. 5. SEM image of near infrared nanoparticles.

3.3 Visible과 NIR 영상의 관찰

Eppendorf tube 에 분산시킨 적외선 형광 나노입자 용액과 대조군은 Visible/NIR 이미징 프로그램을 사용하여 Fig. 6과 같이 관찰하였다. Fig. 6의 (a)는 Color 이미지이며 (b)는 NIR 이미지, (c)는 상기 두 이미지가 합성된 merged 이미지로, 그 형광의 세기를 가시화 시켜서 인식할 수 있도록 하였다.

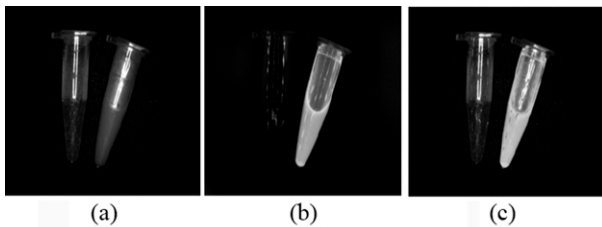


Fig. 6. Imaging of PBS buffer(left) and PLGA/magnetite/ICG nanoparticles solution(right) (a) Color imaging (b) NIR imaging (c) Merged imaging.

Fig. 7은 마우스를 Visible/NIR 이미징 프로그램을 사용하여 관찰한 것이다. 마우스 꼬리 피하 사진으로 근적외선형광의 분포를 관찰할 수 있었다. Fig. 7(a)는 Color 이미지이며 (b)는 NIR 이미지, (c)는 상기 두 이미지가 합성된(merged)이미지이다. Fig. 7의 결과와 같이 마우스 꼬리에 있는 형광 물질의 거동을 확인함으로써 암세포 등의 표적물질을 관찰할 수 있음을 확인하였다. 마지막으로 취득된 Visible 이미지와 NIR 이미지를 wifi를 통해 본 연구에서 개발한 스마트폰 어플리케이션을 이용하여 원격으로 확인하였다.

Fig. 8의 (a)는 본 연구에서 개발한 스마트폰 어플리케이션의 화면이며, (b)는 Color 이미지, NIR 이미지, merged 이미지를 한 화면에서 관찰한 사진이다.

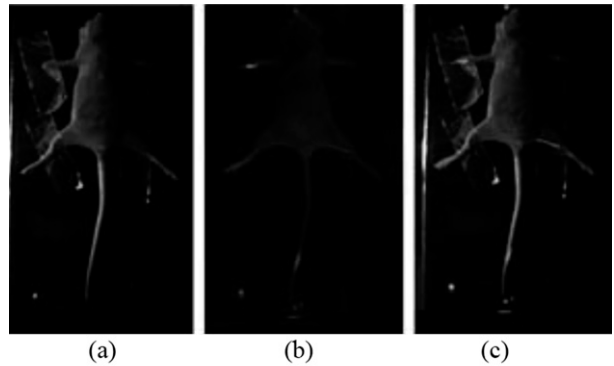


Fig. 7. Imaging of PLGA/magnetite/ICG nanoparticles by tail subcutaneous injection of hairless mouse (a) Color imaging (b) NIR imaging (c) Merged imaging.

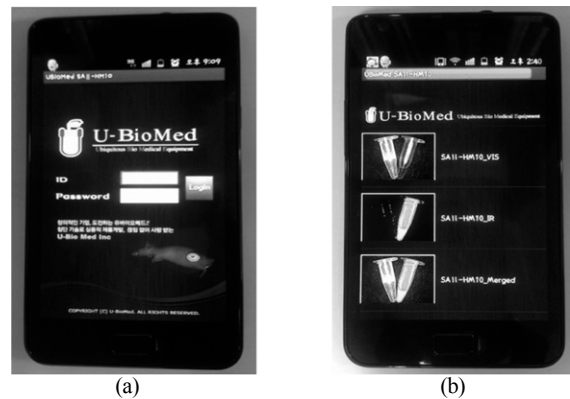


Fig. 8. Screen of the application (a) Login screen of the application (b) Screen of imaging test using the smart phone.

4. 결론

본 연구는 Visible/NIR merged 실험동물 이미징용 포터블 장비의 개발을 위하여 Visible 과 NIR 광원과 함께 visible 과 NIR pass filter 를 장착하여 원하는 파장을 선택할 수 있도록 하였다. 또한, Beam splitter 를 사용하여 상기 두 파장의 영역을 visible 카메라와 NIR 카메라로 확인할 수 있도록 구분하였으며 Focusing lens 를 통하여 확대, 축소를 가능하도록 하였다. 그리고 컴퓨터 프로그래밍을 통한 이미징 프로그램 제작 및 스마트폰 어플리케이션 개발을 완료하였다.

스마트폰 어플리케이션을 통한 실시간 모니터링 기술은 접근이 제한된 실험구역에서 취득된 임상실험용 동물의 이미지를 공간적으로 떨어진 원격지에서도 실시간으로 관찰하고 분석할 수 있도록 함으로써 실험자와 관리자 사이의 실험상황에 대한 의사소통을 원활하게 만들어 효율적인 실험이 가능하도록 하는 장점을 갖도록 하였다. 아울러 인체와 생체에 무해한 가시/근적외 광원을 이용한 이미징 장치이기 때문에 동물은 물론 사람에게도 적용 가능하여 대상 범

위도 점차 확장될 수 있어 잠재력이 클 것으로 사료된다.

감사의 글

This research was financially supported by Development of Next-Generation Technology Program of the Daegu Regional Government

Following are results of a study on the “Human Resource Development Center for Economic Region Leading Industry” Project, supported by the Ministry of Education, Science & Technology(MEST) and the National Research Foundation of Korea(NRF).

REFERENCES

[1] J. G. Jeong, “General perspectives for molecular

nuclear imaging”, *The Korean Society of Nuclear Medicine*, vol. 38, no. 2, pp. 111-114, 2004.

[2] B. C. Ahn, “Molecular imaging and drug discovery and development”, *Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology NEWS Current Issue*, vol. 31, no. 3, pp. 82-85, 2011.

[3] Y. T. Lim, “Development of nano-medical materials for theragnosis”, *News & Information for Chemical Engineers*, vol. 28, no. 1, pp. 76-81, 2010.

[4] K. S. Hwang, S. K. Kim, and T. S. Kim, “Biosensors; a review”, *J. Kor. Sensors Soc.*, vol. 18, no. 4, pp. 251-262, 2009.

[5] Y. T. Lim, Y. W. Noh, J. H. Han, Q. Y. Cai, K. H. Yoon, and B. H. Chung, “Biocompatible polymer-nanoparticle-based bimodal imaging contrast agents for the labeling and tracking of dendritic cells”, *Small*, vol. 4, no. 10, pp. 1640-1645, 2008.



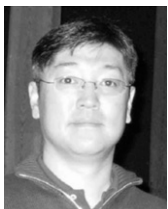
엄 년 식 (Nyeon-Sik Eum)

- 2004년 2월 경북대학교(공학박사)
- 2007년 ~ 2008년 Purdue Univ. Post-Doc
- 2008년 ~ 2009년 한국생명공학연구원 연구원
- 2009년 ~ 현재 (주) 유바이오메드 대표이사
- 주관심분야 : BioSensor & BioSystem, Drug Delivery & Micro Needle, 의료 기기, U-HealthCare



박 희 준 (Hee-Joon Park)

- 2006년 3월 경북대학교(공학박사)
- 현재 계명대학교 의용공학과 전임강사
- 주관심분야 : Biomedical Sensor, Medical Instrument, u-Healthcare System



정 진 용 (Jin Yong Jung)

- 경북대학교 의학과 (의학박사)
- 2008년 9월 ~ 2009년 12월 research fellow, multidisciplinary neuro protection laboratory, Duke university, NC, USA
- 2011년 3월 ~ 현재 대한뇌신경마취학회 대외협력이사
- 2011년 3월 ~ 현재 대한마취과학회 평의원
- 2011년 3월 ~ 현재 대구가톨릭대학교병원 마취통증의학과 주임과장, 수술실장



한 정 현 (Jung-Hyun Han)

- 2003년 한밭대학교 화학공학과 (공학석사)
- 2005년 ~ 2009년 한국생명공학연구원 바이오나노연구단 연구원
- 2009년 ~ 2010년 한밭대학교 화학소재 상용화지역혁신센터 팀장
- 2011년 ~ 현재 (주) 유바이오메드 연구개발부장
- 주관심분야 : 나노생체재료, 약물전달시스템, 바이오나노이미징, 바이오센서

**김형경 (Hyung-Kyung Kim)**

- 2011년 영남대학교 디스플레이화학공학 전공(공학사)
- 2011년 ~ 현재 (주)유바이오메드 연구원
- 주관심분야 : 약물전달시스템, 나노소자, 바이오센서

**장은윤 (Eun-Yoon Jang)**

- 2010년 영남대학교 응용미생물학과(이학사)
- 2012년 ~ 현재 경북대학교 센서 및 디스플레이공학과 재학 중
- 주관심분야 : 나노소재 및 나노소자, 광학형 바이오센서

**이석재 (Suck-Jae Lee)**

- 2012년 계명대학교 기계자동차공학과 (공학사)
- 2010년 ~ 현재 (주)유바이오메드 설계팀
- 주관심분야 : 이미징 장비

**강병호 (Byoung-Ho Kang)**

- 2012년 경북대학교 대학원 전자전기컴퓨터학부(공학박사)
- 2012년 ~ 현재 경북대학교 기능성소자 융합플랫폼센터 박사 후 연구원
- 주관심분야 : 나노소재, 양자점 기반 하이브리드 LED, 유기전자소자

**강신원 (Shin-Won Kang)**

- 1993년 일본 Keio University 의용전자 (공학박사)
- 1994년 ~ 현재 경북대학교 IT대학 전자공학부 교수
- 2009년 ~ 현재 경북대학교 기능성소자 융합플랫폼센터 소장
- 2012년 ~ 현재 한국센서학회 회장
- 주관심분야 : 광전자기능성소자, 가스센서, 바이오센서, 나노기능성소재, 유기전자소자