2007년도 대한전기학회 전기물성·응용부문회 추계학술대회 논문집 (2007. 11. 2 - 3)

Hyper spectral imaging 기법을 이용한 전임상 영상장비에 대한 연구

이경희, 최영욱
한국전기연구원

Development of Pre-Clinical Imaging System Using Hyper Spectral Imaging Technology

Kyeong-Hee Lee, Young-Wook Choi
Korea Electrotechnology Research Institute

Abstract - 본 연구에서는 고분해능 및 고감도화된 시스템 개발을 위하여 AOTF를 이용하여 하이퍼스펙트럼 영상기법을 활용한 전임상 영상장비에 대한 연구를 수행하였다. 제작된 고감도 하이퍼스펙트럼 분자영상 시스템의 생물학적 적용을 위하여, AOTF의 파장 또는 진동수를 변화시키면서 GFP가 발현된 HEK 293 세포의 이미지를 촬영하였다. 또한, 제작된 실험 대상물 이미지화 시스템을 이용해서 실험용 쥐의 이미지를 촬영하였다. 실험용 쥐를 크세논 아크 램프 사용 전 후 이미지를 촬영한 결과 크세논 아크 램프 사용 후에는 청색의 선명한 영상을 얻을 수 있었다.

1. 서 론

일반적으로 신약이 개발되어 시장에 나오기 위해서는 여러 가지 과정을 거쳐야 한다. 어떤 신약이 발견이 되면 물질이 어떤 작용을 하고 있고 어느 치료에 사용될 수 있는지에 대해 생물학적으로 연구를 하고, 물리, 화학적 특성을 가지고 있는지 예비 처방 연구(preformulation studies)를 하게 된다. 그리고 이를 바탕으로 전임상 실험, 임상 1상의 임상 연구과정을 거쳐서 제 2상, 3상 시험을 실시한다.

이 모든 과정을 거쳐서 신약이 출시되기까지 일반적으로 10년 이상의 기간과 약 10억불까지도 소모되는 등 신약 개발에 막대한 시간과 비용이 소모되고 있다. 게놈 프로젝트 이후 게놈 서열분석이 완료가 되면서, 인간의 질병에 대한 퇴치를 목표로 지속되고 있던 신약개발 분야에 제약업계뿐만 아니라 바이오테크 관련 기업들 또한 신약 개발시장에 적극적으로 가세하기 시작하였다. 신약개발을 위한 속도 또한 가속화시키고자 하였는데, 신약개발 과정 중에서 개발비용이 적게 들어가는 초기 과정에 초점을 맞추기 시작하여 스크리닝 시스템을 가속화시키기 시작하였다.

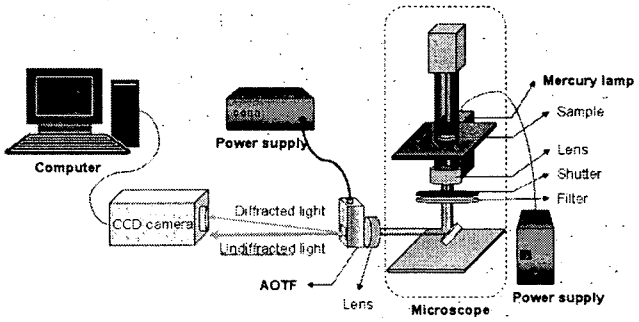
신약 스크리닝 기술로 형광물질을 사용해서 관찰하는 광학적 분석을 많이 사용하는데, 분자 영상법은 현재 질병 진단, 생체 조직의 분자 수준에서의 이해 및 질병 치료를 하는데 있어서 매우 중요한 도구로 이용되고 있다. 신약이 in vivo에서 발생하는 약의 효능과 약효를 발휘하는 정확한 장소를 아는 데 중요한 역할을 하는 이 기술은, 분석하고자 하는 시료에 접합되어있는 형광체가 빛을 흡수해서 정량화 시키고 영상화 시키는 것이 중요하다.

따라서 본 연구에서는 체내로 주입 가능한 라벨링 형광체 및 보고단백질 (reporter protein)을 이용하여 고분해능 및 고감도화를 실현시킬 수 있는 광학적 영상법의 시스템에 대한 연구를 수행하였다.

2. 본 론

2.1 실험장비 Set-up

세포에 발현된 GFP를 효과적으로 이미지화하기 위하여 제작한 고감도 하이퍼스펙트럼 분자영상 시스템은 그림 1과 같다. 그림 1의 microscope는 Olympus IX71을 이용하였다. 형광 특성 실험을 위하여 현미경에 수은 램프와 필터를 장착시켰다. 수은 램프의 여기파장의 범위는 약 300~500nm으로, 이 범위는 실험에 사용될 형광물질을 들뜬 상태로 만들 수 있는 파장대를 포함한다. 수은 램프는 현미경의 뒤편에 장착시키고 전원공급장치에 연결시켰다. 샘플을 놓는 실험단 아래에는 빛을 모을 수 있도록 렌즈가 장착되어 있으며, 렌즈는 세포판 (cell plate) 위에서 자라고 있는 세포의 전체 이미지를 찍는지 하나의 세포 이미지만을 찍는지에 따라서 배율을 달리한다. 렌즈 아래에는 수은 램프에 의해서 녹색 플루오레세인의 방출 파장만을 선택적으로 여과시킬 수 있도록 필터를 설치하여, 녹색 플루오레세인 이외의 파장을 걸러내도록 설계하였다. 현미경 내부에는 거울이 장착되어 있어 필터를 통해서 통과된 특정 파장의 빛이 현미경 왼편으로 방출될 수 있게 반사를 시켜주고, 빛이 방출되는 현미경 왼편에는 렌즈를 장착하여 빛이 통과하면서 모아지도록 해준다. AOTF는 렌즈에서 1 mm 떨어진 곳에 장착한다. 이때 렌즈를 통해서 나오는 빛이 AOTF의 중심으로 들어가도록 조절하도록 한다. AOTF를 실행시키지 않은 상태에서는 빛이 한 방향으로 나아가게 된다. 그러나 AOTF의 파장 또는 진동수를 변화시키게 되면 회절된 빛이 발생하게 되는데, 이 회절된 빛의 이용이 고감도 하이퍼스펙트럼 분자영상 시스템을 제작하는 이유이다. AOTF에서 나온 회절된 빛은 중심축에서 6°로 벌어져 형광 빛과 다른 각도로 이동하므로 Beam Stop을 이용하여 막고 형광만이 CCD에 들어가게 할 수 있다. 형광과 함께 들어올 수 있는 레이저 빔을 Notch 필터를 이용하여 막고 CCD를 통해 영상을 얻을 수 있으며 AOTF는 1-nm씩 주사되어 투과되는 형광 빔의 파장을 바꿀 수 있다. 회절된 빛이 CCD 카메라에 들어가서 컴퓨터에 세포가 이미지화되기 위해서는 초점을 맞추는 것이 중요하다. 초점을 맞추기 위하여 우선 AOTF에 연결되어있는 전원공급장치의 전원을 켜고, 컴퓨터에 있는 프로그램을 실행시킨다. 그리고 프로그램에서 적절한 파장 또는 진동수를 선택한다. AOTF에서 회절된 빛과 회절되지 않은 빛을 구별하기 위하여 샘플로 1×10^{-4}M 플루오레세인 용액을 사용하였다. 플루오레세인의 방출 파장을 AOTF 실행 프로그램에 입력을 하면 AOTF를 통과한 빛이 나누어지는 것을 발견할 수 있다. 가운데로 통과하는 빛이 회절되지 않은 빛이고 그 위에 있는 빛이 회절된 빛이 된다. CCD 카메라는 대부분의 회절된 빛이 CCD 카메라 렌즈에 들어가고, 회절되지 않은 빛은 CCD 카메라 렌즈에 들어가지 않도록 조절하여 설치한다.



<그림 1> 고감도 하이퍼스펙트럼 분자영상 시스템 개략도

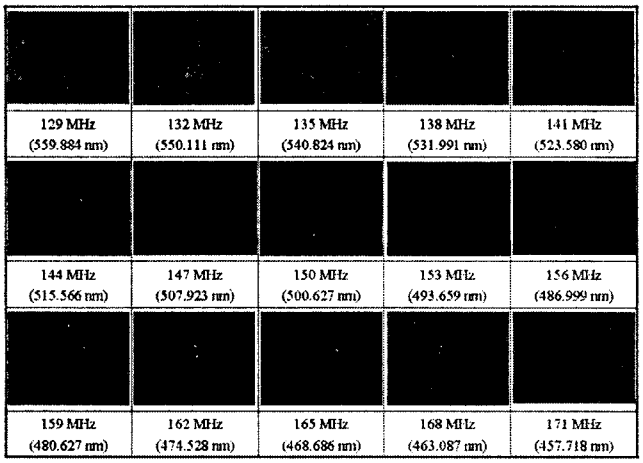
2.2 HSI 분자영상 시스템을 이용한 GFP 발현 세포 이미지화

그림 1에서 설계한 고감도 하이퍼스펙트럼 분자영상 시스템을 이용하여 GFP가 발현된 세포를 이미지화 시키고자 하였다. GFP 발현 세포로는 HEK 293 세포를 사용하였다. AOTF의 진동수 및 파장 control 시스템을 실행시키고 진동수를 150 MHz로 맞춘다. 이때, 150 MHz는 플루오레세인의 방출 파장을 기준으로 선정된 값이다. 먼저 GFP가 발현된 HEK 293 세포를 사용하기 전에, 회절된 빛이 정확하게 CCD 카메라 안으로 들어가는지 알아보기 위해서 1×10^{-4}M 플루오레세인 용액을 이용해서 초점을 확인한다. 확인할 때 셔터를 열고서 실시한다. 이 때 사용한 렌즈는 10X를 사용하였다. 초점을 다 맞추고 난 후, 셔터가 닫쳐진 상태에서 12-well plate에서 자란 GFP 발현 HEK 293 세포를 현미경 실험단 위에 놓는다. CCD 카메라를 통해서 나오는 이미지를 관찰할 수 있게 프로그램을 Live 이미지로 작동시킨다. 셔터를 열고서 먼저 눈으로 초점을 맞춘다. 그 후에 컴퓨터에 나오는 이미지를 보면서 선명한 순간이 올

때까지 다시 초점을 맞춘다. 시간이 지남에 따라서 광표백(photobleaching)이 발생하기 때문에 될 수 있으면 이 과정을 빨리 해야 한다. 초점을 다 맞췄으면 셔터를 다시 닫는다. 라이브 이미지를 닫고, 셔터를 열면서 동시에 achieve를 클릭해서 이미지를 받는다. 150 MHz 진동수에서 이미지를 받고 동일한 위치에 대해서 위와 동일한 방법으로 3 MHz 간격으로 이미지를 받도록 한다.

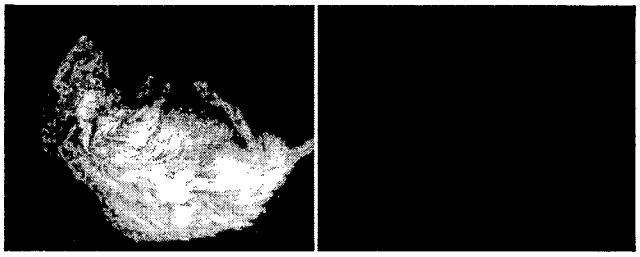
2.3 영상측정 결과 및 고찰

HEK 293 세포를 이용하여 GFP를 발현을 시키고, 그것을 이용하여 고감도 하이퍼스펙트럼 분자영상 시스템을 이용하여 측정하였다. 렌즈 배율은 10X로 하였기 때문에 GFP 발현된 하나의 세포가 아닌 많은 양의 세포를 관찰할 수 있었다. 광표백 현상을 피하기 위하여 셔터의 개폐를 통제하였다. 그리고 15개의 점을 모두 촬영한 후 150 MHz를 다시 촬영하여 광표백을 확인하였는데, 동일 지점에서 강도를 비교해본 결과 강도의 차이가 0.5% 이내로 그 차이가 미약하였다. 즉, 광표백이 거의 일어나지 않았다고 볼 수 있다. 150 MHz를 기준으로 3 MHz 간격으로 129 MHz부터 171 MHz까지 총 15의 점 이미지를 얻을 수 있었고, 그 영상은 그림 2와 같다. 녹색 플루오레세인의 방출 파장과 비슷한 500 nm 근처에서는 가장 높은 강도가 발생함을 볼 수 있고 500 nm에서 멀어질수록 강도가 줄어드는 것을 관찰할 수 있다.



<그림 2> AOTF의 진동수 및 파장 변화에 따른 세포 이미지 변화

그림 3은 크세논 아크 램프를 사용하여 측정된 실험용 마우스의 영상 이미지이다. 왼쪽에 위치하고 있는 것이 크세논 아크 램프를 사용하기 전으로써 단색으로 보이고 있다. 그리고 동일한 위치에서 크세논 아크 램프를 사용하여 촬영한 것이 오른쪽에 있는 것으로 푸른색을 띄고 있다. 이 실험에서는 일반 쥐를 사용하여 이미지를 촬영한 것으로 쥐의 형상이 그대로 나타났다. 향후 GFP 발현시킨 종양이 존재하는 실험용 쥐를 대상으로 실험을 실시하면 종양에 있는 녹색 플루오레세인이 크세논 아크 램프에 의해서 발현되어 관찰할 수 있을 것으로 예상된다.



<그림 3> Xe 램프를 이용한 마우스의 영상 이미지

3. 결 론

하이퍼스펙트럼 기법을 이용한 영상장비에 대한 연구를 통하여 세포레벨 및 동물의 whole body를 측정할 수 있는 영상장비를 구성하였으며 그 특성 실험을 수행하였다. 하이퍼스펙트럼 기법을 이용함으로써 세포에서 발현되는 형광 특성에 대한 측정을 할 수 있었으며, Xe 램프를 활용하여 실험용 마우스에 대한 영상을 얻을 수 있었다. 향후 GFP 발현 암세포를 주입시킨 마우스를 이용한 실험을 통하여 암세포 및 신약 스크리닝에 활용할 수 있는 효율적인 전임상 장비의 개발이 가능함을 확인하였다.

[참 고 문 헌]

[1] T. Vo-Dinh, M. Panjehpour, B.F. Overholt, and P. Buckley III, Applied Spectroscopy, vol. 51, no. 1, 1997, pp. 58-63.
[2] K. Chao, P. Mehl, and Y. R. Chen, Applied Engineering in Agriculture, vol. 18, no. 1, 2002, pp. 113-119.
[3] D. Landgrebe, IEEE Signal Processing Magazine, vol. 19, no. 1, 2002, pp. 17-28.
[4] C. Chang, Q. Du, T. Sun, and M. Althouse, IEEE Trans. Geoscience and Remote Sensing, vol. 37, no. 6, Nov. 1999, pp. 2631-2641.
[5] S.G. Kong, Y.R. Chen, I. Kim, and M.S. Kim, Applied Optics, vol. 43, no. 4, Feb. 2004, pp. 824-833.