

## 방사선 치료에서 광학적 생검의 유용성에 관한 연구

\*G.R.Harrison Spectroscopy Lab, Massachusetts Institute of Technology.

아주대학교 <sup>†</sup>시스템공학과, <sup>‡</sup>치료방사선과, <sup>§</sup>진단방사선과

한승희<sup>\*,†</sup>, Müller M.G.<sup>\*</sup>, Feld M.S.<sup>\*</sup>, 강승희<sup>‡,§</sup>, 강해진<sup>||</sup>

본 논문의 목적은 조직(Tissue)에서의 광학적 특성(Optical Properties)을 이용한 광학적 생검(Optical Biopsy)방법을 소개하고, 방사선 치료에서 치료 반응 결과를 확인하는데 적당한 도구인가를 확인하고자 한다. 본 연구는 구강(Oral Cavity) 내부조직을 샘플로, 건강한 사람 4명과 구강 암 환자 4명의 자원을 받았다. 연구실에서 제작한 FastEEM(Excitation Emission Matrix) 장비를 이용하여 생체 내(in vivo)상태에서 측정하였다. 건강한 구강의 정상조직(Normal Tissue)과 병이 있는 구강의 비정상조직에서 기존의 생검과 동시에 새로운 광학적 생검을 하였다. 광학적 생검 결과와 기존의 생검 결과를 비교 확인하고, 암 조직으로 진단 받은 환자들에게 2차 광학적 생검을 실시하였다. 암 조직에 대한 1차 광학적 생검과 2차 측정 결과에 대한 형광스펙트럼을 비교 분석하였고, 자료분석은 Gillenwater가 개발한 337nm에 근거한 진단 알고리즘을 이용하였다. 광학적 생검 방법은 암 조직을 정상조직과 확실하게 구분시키는 장비임을 확인하였다. 건강한 구강조직과 악성 종양 조직의 측정 형광세기를 비교하면 정상조직인 경우 암 조직의 형광세기보다 모든 환자에 대해서 크게 나타났다. 암 조직의 구성이 시간에 따라 변화했을 때(7일) 광학적 생검을 하면 측정된 4명의 환자의 형광의 세기에 변화가 있었다. 7일간 시간이 지난 암 조직이 형광세기가 더 작은 값을 갖는다. 광학적 생검은 조직을 인체에서 분리하지 않는 생체 내, 실시간, 비침습성(noninvasive)생검 방법이다. 본 연구에서는 구강의 정상조직과, 암 조직, 그리고 암 조직의 진화에 따른 구성의 변화를 형광스펙트럼으로 확인하였다. 형광분광법을 이용한 FastEEM장치는 암 조직의 변화를 확인함으로써 방사선 치료 후 발생하는 암 조직 구성의 화학적, 생물학적, 형태학적 변화를 실시간으로 정확하게 측정이 가능한 장치임을 확인하였다.

**중심단어:** 광학적 생검, 실시간, 방사선치료.

### 서론

최근 미국을 포함 한 유럽의 각 나라에 있는 의사들은 환자의 병을 진단하는 새로운 방법을 추구하고 있는데, 기존의 방법보다 정교하고 정확하며 무엇보다 진단 과정에서 발생하는 오차원인을 없이는 비침습성(Non-invasive)방법을<sup>1)</sup> 개발하고 있다. 환자의 신체에서 검사의 대상이 되는 조직(Tissue)의 일부분을 제거하는 기존의 생검(Biopsy) 방법과는 다르게 환자의 몸에서 조직을 떼어 내지 않고 진단을 하는 새로운 방식의 광학적 생검(Optical Biopsy)

방법은<sup>2)</sup> 생체조직의 광학적 특성(Optical Properties)을<sup>3)</sup> 분석하여 얻은 자료에 근거를 두고 있다. 검사하고자 하는 대상의 조직에 빛을 조사하면 조직이 발산(Emission)하는 빛의 색과, 들뜬(Excited)광원에 대한 산란 현상(Scattering effect)을 분석하여 조직이 현재 정상(Normal)상태나 악성종양(Benign)상태인지 또는 전암(Precancerous)이나 암(Cancerous)상황인지를 구분 가능하게 하여 준다. 이방법의 궁극적인 목적은 조직을 인체로부터 떼어 내는 과정을 생략하는 실시간(Real time)측정을 하여서 진단 정보를 얻는데 소요되는 경비와 시간을 단축하고 정확도를 높이는데 있다.

광학적 특성의 주요 부분은 빛의 산란(Scattering),

<sup>§</sup> 대표저자

반사(Reflectance), 그리고 흡수 (Absorption)로 구분하는데, Fig. 1을 보면 조직에 빛을 조사하였을 때 나타나는 광학적 특성을 보여주고 있다. 본 연구에서 설명하고자 하는 방법은 조직이 빛을 흡수하여서 나타나는 형광 (Fluorescence)현상을 이용하는 형광 분광학(Fluorescence Spectroscopy)방법으로<sup>4)</sup> 산란 특성을 이용하는 라만산란(Raman Scattering)분광법과<sup>5)</sup> 함께 현재 이 분야에서는 다른 분광학적 방법에 비해 잠재력이 많고, 활발하게 연구되고 있다. 본 연구실에서는 형광분광법을 이용한 FastEEM(Fast Excited Emission Matrix)형광장치<sup>6)</sup> 제작하였고 조기 암 진단을 위한 연구에 활용을 하고 있다.

형광분광법의 원리를 보면, 조직의 형광은 단일 분자(Molecule)의 광자(Photon)흡수와 형광성 광자의 연속적인 발산을 포함하며, 조직에서 크로모포(Chromophores)같이 형광빛을 발산하여 잉여 에너지를 방출하는 흡수 분자들을 플루로포(Fluorophores)라 한다. Fig. 2는 단일분자의 전기적 상태를 묘사하는 그림으로 한 개의 광자(Photon)가 조직에 흡수되면, 들뜬상태의 분자는 방사선(Radiation)을 방출하면서 바닥상태로 전이하려고 한다. 이때 흡수현상은 입사하는 광자의 에너지가 들뜬상태와 바닥상태(Ground state)의 에너지 차이에 대응될 때 발생하는데, 에너지의 회전레벨(rotational level) 때문에 조직에 있는 대부분 분자들의 흡수밴드는 매우 넓다(Broad). Fig.2와 같이 입사한 광자 에너지는 분자를 높은 에너지 상태의  $S_1^*$  밴드로 여기시키고, 여기된 분자는 다시 신속하게 보다 낮은  $S_1$  밴드로 내적 전이를 하는데 이 과정을 비방사(Nonradiative)라 한다. 계속해서 바닥상태인  $S_0$  밴드로 전이를 하는데 이것을 형광이라고 한다. 비방사 과정에서 약간의 에너지 손실이 발생하는데 이런 이유로 형광은 입사 여기 광자보다 낮은 에너지를 갖고 따라서 보다 장파장을 나타낸다. 본 연구실에서 제작한 FastEEM (Excitation-Emission Matrices: EEMs) 장비의 원리는 조직에서 발생하는 형광을 이용한 장치로, 여기 스펙트럼 값은 고정된 파장에서 검출을 진행하고 여기파장을 변화시키면서 얻어내고, 발산 스펙트럼은 여기파장이 일정한 경우 몇 가지 다른 파장에서 형광을 검출한다면 얻게되는데, EEM은 다른 여기 파장에 대한 발산 스펙트럼의 측정을 반복하여 얻을 수 있다.

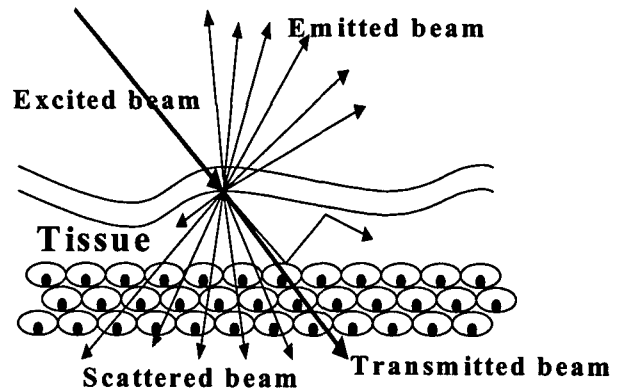


Figure 1. Laser beam in biological tissue.

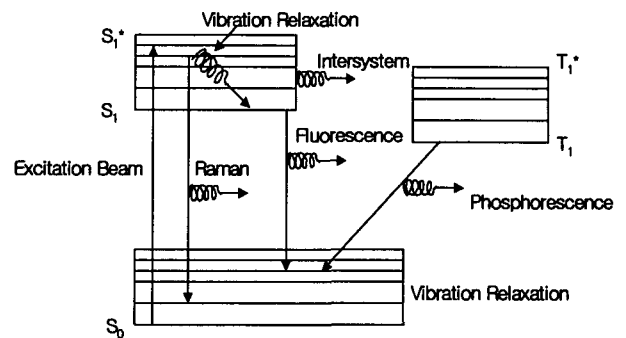


Figure 2. Energy level diagram for an organic molecule.

조직에서 빛의 스펙트럼이 갖고 있는 정보는 조직내부에서 발생하는 구조적 변화와 몇 가지 서로 다른 분자들이 포함되고 있음을 나타낸다<sup>2-4)</sup>. 정상조직에서 암 조직으로 변하면 조직의 구조와 구성이 변하기 때문에 조직이 방출하는 형광 빛과 산란된 빛의 스펙트럼도 변한다. 암 조직의 변화는 시간이 흐르면서 자연스럽게 상태가 변하거나, 방사선 치료와 화학적치료 같은 외부 요인으로 변화가 가능하다. 본 연구의 목적은 암 조직의 변화를 FastEEM장비를 이용한 형광 광학적 생검으로 실시간 측정이 가능함을 확인하려고 한다.

방사선 치료와 화학적 치료 후 암 조직의 반응 결과를 광학적 생검으로 측정이 가능하면, 현재 치료 후 암성 전이와 치료 결과를 확인하기 위하여 환자들에게 반복하는 기존의 생검을 할 필요가 없게 된다. 이것은 비침습적이고, 조직을 떼어내는 물리적 정신적 고통을 완화시켜주며, 기존의 방법보다 정확하고, 저 경비의 진단방법이 될 것이다. 또한 실시간 진단으로 환자와 의사들에게 보다 빠르게 조직의 치

료 결과에 대한 확인이 가능하므로 치료가 진행되면서 치료의 평가가 가능하며, 조기 진단으로의 광학적 생검과 일관성이 있어서 조직의 상태 변화를 확인하는데 보다 우수한 정보를 제공할 수 있는 방법이 될 것이다.

### 대상 및 방법

#### 환자

건강한 구강조직을 소유한 4명의 사람과 구강조직에 암성 조직을 소유한 4명의 자원한 환자들로 구강암 조직을 실험 대상으로 삼았다. 1차 검사에서 암성 조직을 소유한 환자들은 최종 구강암 진단을 받고 치료 시작 전, 약 7일의 시간 경과, 자원을 받아 2차 광학적 생검의 대상으로 삼았다. 실제적인 암 치료를 받은 환자를 대상으로 삼으려 하였으나 치료과정에 있는 환자는 자원하지 않아서 연구가 계속성을 고려하여 우선은 암 조직의 시간에 따른 변화를 확인하여 조직의 변화상태를 확인하는데 연구의 방향을 두고 환자들을 설정하였다.

#### 측정장비

형광분광법 원리를 이용하여 본 연구소에서는 기본적인 EEM(Excited Emission Matrix)보다 신호에 대한 정보 수집 시간이 단축된 FastEEM장비를 제작하여 사용하였다. 장비의 구성은 한 대의 질소 레이저(N<sub>2</sub> Laser), 10개의 색소 큐비트, 한 개의 발광 램프, 한 개의 광섬유 프루브(Optical Fiber Probe), 그리고 한 대의 분광기(Spectrometer)와 자료처리용 컴퓨터로 이루어졌다. 장비의 구성 기본 원리는 Fig. 3과 같다.

질소 레이저(Laser Science, Inc. USA) (여기 파장 :337nm)를 이용하여 회전판에 부착된 일련의 큐비트 안에 들어 있는 발산 파장이 다른 로다민 B(Rhodamine B)색소들을 발진시킨다. 각각의 색소는 여기 된 후 공통으로 사용하는 광 공진기(Cavity) 내부에서 전이(Transition)를 하다가 서로 다른 파장의 빛으로 발진되어 빛이 나온다. 이 빛은 한 개의 광섬유 프루브에 모아진다. 백색의 발광램프는 또 다른 여기 광원으로 회전판의 각 주기에서

### Fast EEM Instrument

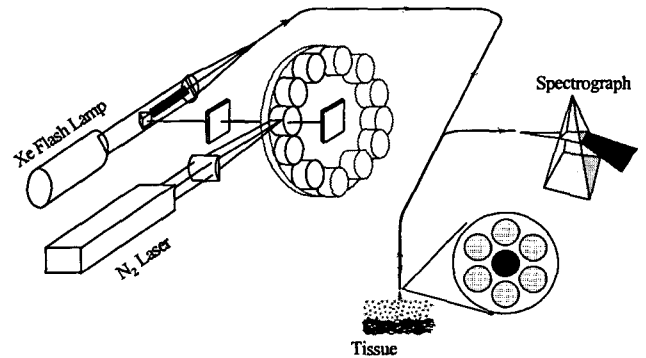


Figure 3. The FastEEM system, with Xe flash lamp, nitrogen laser, dye wheel, fiber optics and spectrograph. The fiber is brought in contact with the tissue. On the right we can see the fiber bundle, six collection fibers around one excitation fiber.

조직의 확산반사(Diffuse reflectance)에 관한 정보를 수집하는데 사용한다. 조직으로부터 되돌아온 자동형광과 확산반사는 앞서 설명한 광섬유 프루브에 의해서 모아진다. 모아진 빛은 정교한 분광분석기에 전달되어지고 게이트 다중 채널 검출기 (gated multi-channel detector)로 검출된다. 긴 통과 필터(long pass filters)는 샘플과 분광분석기(CP 200, Jobin Yvon SA, USA)와 세기가 증가된 다이오드 배열 검출기(EG&G Instruments Princeton Applied Research, USA)에서 나오는 반사된 레이저빔을 막기 위하여 사용되며 장치 전체는 개인용 컴퓨터로 조정한다. 형광과 반사스펙트럼은 'Oma Vision' (EG&G Instruments Princeton Applied Research, USA) software를 이용하여 나타낸다.

#### 장비 보정

샘플에 대한 정보를 얻기 전에 장치에 대한 보정(Calibration)을 해주었다. 스펙트라론(spectralon:24.9%)은 반사보정과, 발광-램프 스펙트럼 형태, 그리고 형광세기에 대한 보정을 하기 위하여 로다민B에 대한 흡수 스펙트럼(Fig. 4)을 FastEEM 장치를 사용하여 측정하고<sup>16)</sup>, 이미 알고 있는 로다민 B의 값은 실험적으로 얻은 Rhodamine B의 FastEEM 형광스펙트럼

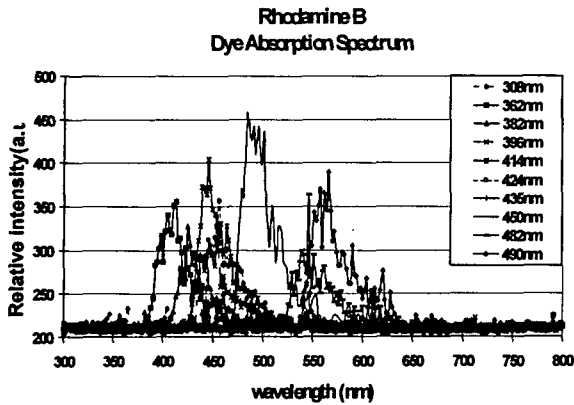


Figure 4. Rhodamin B's absorption spectrum excited by 337nm N<sub>2</sub> Laser.

비교하여서 정확한 세기 정보를 추출해 낸다. 또한 모든 여기 파장에 대한 백그라운드 스펙트럼의 값은 환자들에게서 얻은 정보 값에서 감하여 준다. 파장의 범위와 장치에 대한 스펙트럼 반응은 정규적으로 확인되고, 수은 램프와 NIST 표준 텅스텐 램프를 이용하여 보정 해 준다.

#### 자료 수집

조직에 프루브를 서서히 접촉하여서 원하는 형광 스펙트럼을 얻어낸다. 일단 점막표면(mucosal surface)과 프루브의 접촉이 좋으면 다중 방사 형광(multiple emission fluorescence)은 거의 확보된 상태와 같으며, 백색 반사 스펙트럼이 실시간으로 동시에 기록된다. 레이저 유도 형광법(LIF; Laser Induced Fluorescence)으로 신호 정보를 모으고, 반사 신호를 수집하는 과정은 0.5초 동안 지속되고 5번 반복을 하는데 각 샘플마다 연속적으로 실시된다. 수술실에서 수술 전에 임상적으로 정상부위와 비정상부위에 대한 스펙트럼들을 얻어낸다. 구강의 후두 부분(laryngeal lesions)에 병이 있는 환자들에 대해서 수술용 현미경을 사용하여 쌍안의 관찰을 하면서 고정된 후두경(laryngoscope)을 통해 프루브를 투입한다. 병이 있는 다른 부분과 임상적으로 정상적인 반대 부분에서 스펙트럼들을 받아 기록한다. 광학적 생검의 스펙트럼을 얻은 후 2mm x 2mm 크기로 기존의 생검을 같은 영역의 부위에서 샘플로 취하여 시행한다. 샘플건본은 10% 포말린(formalin)에 고정시키고, 계속해서 표준방법으로 착색한다. 그

런 다음 그 건본은 경험이 많은 병리학자에게 평가 되고 분류된다.

#### 자료 분석

11개의 색소 레이저에서 나오는 여기 파장과 백색광의 반사에 대한 환자들의 스펙트럼을 기록한다. 형광의 세기 변화와 그리고 병소와 정상부분의 사이에 스펙트럼의 선 모양의 변화를 확인하기 위한 스펙트럼 선 분석을 한다. 백색광의 반사에 대한 정보는 스펙트럼 선에 관한 자료 분석에는 사용하지 않는다. 337nm - 410 nm사이에서 발생하는 6개의 여기 파장가운데 선택해서 계속 분석을 하는데 주로 337nm에 대한 스펙트럼의 변화가 의미가 있기 때문에 337nm 여기 파장에 대한 스펙트럼을 분석한다.<sup>1)</sup> 모든 스펙트럼들은 형광 세기의 최대 값에 표준화하여서 세기 변화에 아무런 영향이 없는 스펙트럼 선 모양에서의 변화를 구분하는데 사용한다.

#### 결과

FastEEM 형광 분광 장치를 이용하여 얻은 조직의 형광 스펙트럼은 본 연구실에서 개발한 알고리즘을 형광 스펙트럼을 분석하는데 적용하였다. 개발된 알고리즘은 조직내부에 존재하는 헤모글로빈(Hemoglobin)의 흡수 현상으로<sup>13)</sup> 인한 형광스펙트럼의 왜곡 현상을 고려한 방법으로 헤모글로빈의 400nm흡수 파장을 형광 스펙트럼에서 미리 계산하여 보정하여 주었다. 11개의 여기 파장에 대한 형광 스펙트럼을 분석하는데 우리는 Gillenwater의 337nm에 기반을 둔 알고리즘을 적용하여 337nm 여기 파장에 표준화 시켜서 스펙트럼을 분석하였다.

구강내부에서 주로 씹는 동작에 관계하는, 입천장(palate), 혀(tongue) 그리고 잇몸(gingiva) 조직에 대하여 형광 스펙트럼을 분석하였다. 일반적으로 다른 해부학적 부위에 비해서( 본 실험에서는 손가락(Finger)의 정상조직 부위를 측정하였다.) 구강의 정상조직에 대한 형광스펙트럼을 비교하면, 형광세기를 기준으로 두 조직의 형광스펙트럼을 표준화 시켰을 때 확실하게 구강의 정상조직 형광 스펙트럼이 원 방향으로 이동하는 현상을 보였다.(Fig. 5) 즉, 정상조직에 대한 해부학적 비교에서 구강의 조직과 다른 부위의 조직에 대한 구분이 가능함을 보여주었다.

구강에서 잇몸부위의 조직에 병적인 증세를 갖은 환자와 정상적인 조직을 갖은 건강한 사람들의 조직에 대한 형광스펙트럼을 비교하여 보면 형광의 세기가 모두 정상조직인 경우 더 크게 나타나 보였다.(Fig. 6) 광학적 생검의 형광스펙트럼의 세기가 작게 나온 암성 조직을 소유한 환자들은 같은 부위에 대한 기존의 생검을 실시하였고 검사 결과 모두 구강 암 진단을 받았다. 광학적 생검의 형광스펙트럼 결과인 Fig. 6에서 상위 4개의 형광 스펙트럼은 모두 정상적인 구강조직에 대한 형광스펙트럼이고, 아래에 위치한 4개의 형광 스펙트럼은 모두 구강 암 판정을 받은 구강의 암 조직에 대한 형광 스펙트럼이다. 이것으로 조기 암 진단 연구에서 사용중인 FastEEM장비가 암 조직과 정상 조직을 확실하게 구분을 가능하게 하여 주는 장비임을 확인 할 수 있었다.

광학적 생검과 일반적인 생검 두 가지 결과에서 구강 암 진단을 받은 환자들은 다시 약 7일간의 시간이 경과하고 치료를 받기 직전에 2차광학적 생검을 실시하였다. 만약 시간의 경과에 따른 암 조직내부의 구성에 아무런 변화가 없다면 형광스펙트럼에 변화가 없어야 하는데, 결과를 분석하면 Fig 7에 나타난 것처럼 형광의 세기에 변화가 나타났다. Fig. 7-a가 보여주듯이 4명의 환자 모두가 처음 실시한 광학적 생검의 형광스펙트럼 세기 보다 2차 결과의 형광 스펙트럼의 세기가 더 작게 나타나고 있다. 형광스펙트럼의 세기가 조직의 구성에 따라 다른 값을 갖는다는 형광스펙트럼의 기본 원리에 따라 Fig. 7-b에 나타난 것처럼 형광 스펙트럼의 세기의 최대값을 비교하면 모두 2차 광학적 생검의 결과가 감소하는 경향을 보여주었다.

고찰

1970년 초기에 외과용 도구로 레이저의 사용이 시작된 이후부터 최근 몇 년 동안에 이러한 레이저와 광학적인 도구가 병을 진단하는 도구로 무한한 잠재력이 있다는 것을 많은 연구를 통해 알려지기 시작하였다. 본 연구에서 형광분광법의 도구로 소개한 FastEEM장비도 구강 점막과 같은 부위이외에도 소화관의 위 부위에 있는 다양한 병 증세가 있는 넓은 영역까지 형광스펙트럼을 제공 할 수 있다

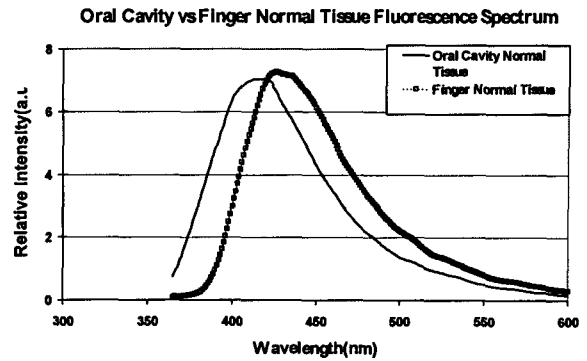


Figure 5. Oral cavity and finger normal tissue fluorescence spectrum excited by 337nm.

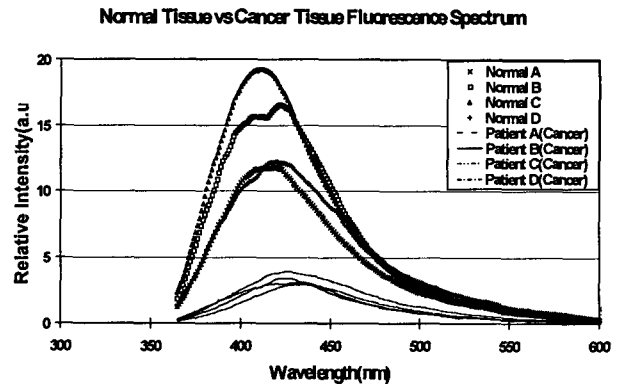


Figure 6. Oral cavity normal tissue and cancer tissue fluorescence spectrum excited by 337nm.

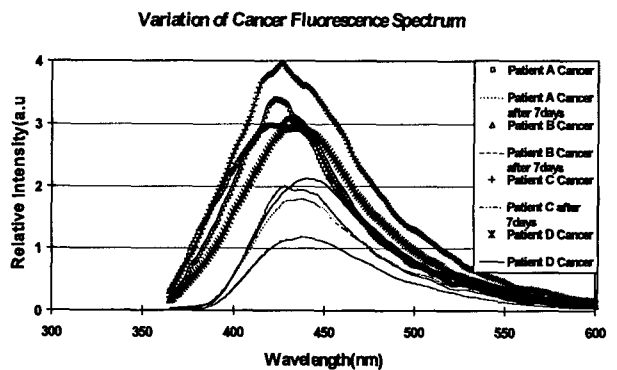


Figure 7. Variation of oral cancer fluorescence spectrum excited by 337nm. (a) All patients variation of oral cancer (b) The variation of maximum intensity in oral cancer fluorescence spectrum.

본 연구의 목적은 광학적 특성인 형광을 이용한 광학적 생검 방법을 소개하고, 방사선 치료에 있어서 치료의 반응결과 조직의 변화를 확인하는 방법<sup>7-8)</sup>으로 CT, MRI, 그리고 기존의 생검 이외에 광학적 생검이 사용 가능한 방법인가를 확인하려고 한다. 연구의 대상이 되는 구강(Oral Cavity) 조직은 조기 진단하여 병을 치료하려는 의사와 연구자들에게도 주요 연구 대상이다<sup>9)</sup>. 기존의 광학적 생검에 관한 연구는 주로 조기 암진단에 관한 것으로, 조기에 악성 종양을 진단하는 것은 의심이 가는 부분에 대한 생검과 조직병리학적(histopathological)조사를 통해서 이루어진다. 그러나, 아무리 악성(Malignant)종양과 양성(Benign)종양을 구분하는데 익숙한 전문가라고 하더라도 쉽지는 않다. 그러나, 형광분광법은 디스플라시아(dysplasia)와 카르시노마(carcinoma)부분에서 정상조직을 분별하는 것이 가능하다. 최근 여러 연구소에서 디스플라시아를 진단하는데 자동형광 autofluorescence)을 이용한다고 발표하였다. 악성 종양에서 발생하는 자동형광은 1924년 Policard가<sup>10)</sup> 처음 설명하였고, 1984년 Alfano는<sup>11)</sup> 자동형광이 효과적으로 몇 가지 형태의 정상조직과 카르시노마 조직을 분별한다고 발표하였으며, 1998년 Dhingra는<sup>12)</sup> 동물실험에서 410nm 여기파장을 갖고 조기 디스플라시아 부분을 포함한 49 구강의 부분가운데 45부위를 정확하게 구분시켰다. 보다 최근에는, 1998년 Gillenwater가<sup>13)</sup> 337nm 여기파장에 근거를 둔 진단 알고리즘을 이용하여 암성 조직을 진단하는데 88%의 민감도(sensitivity)와 100%의 특이성(specificity)을 얻었다. 본 연구에서는 먼저 일반적인 생검으로 측정이 어려운 구강 암 조직에 대하여 정상 조직과 비교 분석 구분이 가능한가를 먼저 확인하고, 방사선 치료나, 화학적치료 등의 원인으로 암 상태가 변하여 암 조직 내부의 구성이 변한 암 환자의 구강 조직을 FastEEM 장비를 이용하여 형광분광법으로 암 조직 내부 구성의 변화가 측정이 가능한가를 확인하려고 하였다. 그러나 대상이 되는 환자가운데 치료 중에 있는 환자가 자원하지 않아서 연구의 계속성을 고려하여 연구의 시작하는 단계로 본 연구에서는 우선 시간의 경과에 따른 암 조직의 변화를 측정하고 광학적 생검 방법이 암 조직의 변화를 측정할 수 있다는 것을 확인하였다.

광학적 형광분광법은 초기에는 아르곤 레이저에

서 나오는 가시파장인 488nm의 빔을 사용하여 연구를 하다가 제논(Xenon lamp)램프로 대체하면서 자외선 영역의 빔을 여기원으로 사용하기 시작하였다. 발산과 여기스펙트럼을 측정 한 주요 적용 부분은 여성의 유방, 부인병(gynecological), 결장(colon) 그리고 소화기관(aerodigestive)조직이었다. 또한 광학적 형광 접근방법은 여러 실험실에서 결장의 생체 내 진단에 적용되고 있다. 생체내 결과에 대한 광학적 방법의 정확도를 병리학적인 방법과 비교하였는데, 80%와 97%사이에서 정확도를 얻을 수 있었다. 형광분광법은 생체 내와 생체 외에서 조직을 검사하는 비침습성 진단 도구로 넓은 영역에서 사용될 수 있다. 광학적 시스템의 높은 공간 분해능 때문에 광학 파이버 프루브가 인체 내부로 검사하고자 하는 영역으로 들어가면 작은 암 부위(cancerous)나 전암(precancerous) 조건도 진단할 수 있다

광학적 생검 연구와 관련하여 형광특성 이외에도 산란이나, 반사특성을 이용하여 조기 암 진단에 대한 많은 연구를 진행하고 있는데, MIT 생체 분광학 연구소에서는 빛의 산란 특성을 이용하여 정상 조직에서 암 조직이 되면 암 조직의 조직내부에 존재하는 핵(Nuclei)의 크기가 변하여 정상적인 조직의 핵의 크기 4-7 $\mu$ m보다 훨씬 증가 한 20 $\mu$ m가 된다는 것을 산란 분광법을 이용하여 확인하였다.<sup>14)</sup> 이러한 연구 결과를 보면 실제로 암 조직은 구성에 있어서 화학적으로 생물학적으로, 그리고 구조학적으로 정상조직과 다르게 되어있음을 알 수 있다.

암을 치료하는 방사선 치료 분야에서는 방사선 치료 후 암 조직과 정상 조직의 반응 결과를 CT, MRI, 그리고 생검을 통하여 확인하려는 연구가 진행되고 있다<sup>7-8)</sup>. 생물학적 조직은 방사선이나 화학적약품 등에 의해서 조직 구성에 변화가 생긴다<sup>15)</sup>. 예를 들면, 방사선 치료에 의한 조직의 화학적 결합이 변하거나, DNA결합이 깨지는 등 몇 가지 변화가 발생한다. 조직 내부 구성의 변화는 본 연구에서 소개한 FastEEM 장비의 형광스펙트럼 방법을 이용하여 확인이 가능하다는 것을 확인하였으며, 따라서 또 다른 변화를 유도하는 방사선의 치료 후 암 조직과 정상조직의 반응 결과를 확인 할 수 있다고 생각한다. 광학적 생검은 연구의 대상이 치료 전에 암 조직의 진단에 목적이 있었기 때문에 방사선 치료나 화학적 치료 후에 암 조직의 변화를 광학적 생검을 이용하

여 확인하는 것은 본 연구가 처음이다. 광학적 생검 분야의 연구가 활발하게 진행된 것도 최근 여기 원인 레이저의 발달과 검출기인 CCD카메라의 현저한 발달이 수반된 후 이기 때문에 아직은 대다수의 연구자들이 조기 암 진단에만 연구의 초점을 두고 있는 현실이다. 따라서 광학적 생검의 방사선치료 분야에서의 적용은 본 연구가 처음 시작하는 것으로서 아직은 비교할 연구의 근거가 없다. 다만 현재 방사선 생물분야나, 방사선 화학분야에 있는 연구자들이 방사선 치료 후 반응 결과를 조직의 산화(Oxygenation)성이나, 방사선 민감도(Radiosensitivity)를 조사하여 확인하려는 연구가 많이 진행되고 있다. 광학적 생검이 시간에 의한 암 조직의 변화뿐만 아니라, 실제적으로 방사선 치료 후 반응결과도 본 연구의 결과와 동일한 결과를 얻는다면 이들에 관한 연구에도 큰 도움을 줄 수 있다고 생각한다. .

## 결론

방사선과 같은 원인으로 조직의 변화가 발생하면 조직의 내부구조와 구성 요소가 변한다. 구성요소의 변화는 여기 빛에 의한 분자의 구성을 형광 스펙트럼으로 확인하는 광학적 생검을 통하여 측정이 가능하다. 본 연구에서는 광학적 생검 가운데 형광분광법을 적용한 FastEEM장치를 개발하여 조직에 대한 형광특성을 적용하여 (외부 염료 첨가 없이) 조기 암 진단의 가능성으로 정상 조직과 악성 조직을 구분하였고, 또한 방사선원인 대신 시간의 경과에 따라 발생한 암 상태의 변화를 확인함으로써 악성 조직의 변화에 대해서도 광학적 생검으로 그 결과를 측정 할 수 있음을 알 수 있었다.

광학적 생검은 기존의 생검 보다 산뜻하고, 실시간 측정이 가능하고, 덜 인체에 상처를 남기면서 비침습성으로 조직의 상태를 진단하기 때문에 환자의 고통을 덜어줄 수 있고, 경제적이며, 치료를 하는 의사에게는 정확하고 신속한 결과를 제공할 수 있는 방법이 될 수 있다. 그러나 조기 진단을 목적으로 시작하였던 광학적 생검 방법은 현실적으로 병원에서 보다 신뢰할 수 있게 사용되기 이전에 몇 가지 해결해야 할 과제가 남아 있다. 첫 번째로, 조직의 분자 상태를 여기 시키는 여기 빛은 그 파장이 대상이 되

는 조직의 형광 스펙트럼 이외에도 조직 내에 존재하는 다른 성분들 예를 들어 혈액 같은 인자들에게도 영향을 주기 때문에 빛의 반사(reflection)와 흡수(absorption)같은 신호를 만들어낸다. 이러한 반사와 흡수 신호를 신호 분석을 할 때 고려하느냐 하지 않느냐에 따라서 조직의 사실적인 형광 스펙트럼의 세기와 모양에 영향을 주기 때문에 이들을 해결하려는 연구를 계속해서 수행해야 한다. 두 번째로, 방사선 치료 후 조직의 화학적 변화가 생긴다는 기존의 방사선 생물학적 이론을 근거로 하였기 때문에, 실제적인 방사선 치료 전에 1차 광학적 생검 이후 7일 간의 시간이 경과한 후 발생한 조직의 변화를 2차 광학적 생검을 통하여 비교 분석한 연구의 결과는 방사선치료나 그 밖의 외부 요인에 의해서 발생하는 암 조직의 변화도 측정이 가능하다고 근거를 만들어 준 것이기 때문에 본 연구를 뒷받침 할 지속적인 연구가 필요하다. 따라서 본 연구소에서는 현재 실험용 쥐를 이용한 첫 번째 문제 해결 실험을 진행 중에 있으며, 두 번째 문제 해결을 위해 보스톤 소재 병원에 의뢰하여 대상이 되는 암 치료 환자를 자원 받고 있으나 아직은 없는 현실이라 우선은 실험용 쥐를 대상으로 실험을 진행할 계획을 갖고 있다.

## 참고문헌

1. Gillenwater A, Jacob R, Ganeshappa R, et al. Noninvasive diagnosis of oral neoplasia based on fluorescence spectroscopy and native tissue autofluorescence. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 124:1251-1258 (1998)
2. Yang Y, Celmer EJ, Zurawska-Szczepaniak M, Alfano RR. Excitation spectrum of malignant and benign breast tissues: A potential optical biopsy approach. Lasers Life Sci. 7: 249-265 (1996)
3. Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. Annu. Rev. Phys. Chem. 47: 555-606 (1996)
4. Ganesan S, Sacks P.G., Yang Y, et.al. Native fluorescence spectroscopy of normal and malignant epithelial cells. Cancer Biochem.

- Biophys. 16: 365-373 (1998)
5. Puppels G.J., van Aken T, Wolthuis R, et.al. In vivo tissue characterization by raman spectroscopy. SPIE Proc. 3257: 78-83 (1998)
  6. Zangaro R.A., L.Silveria Jr, Manoharan R., et.al. Rapid multiexcitation fluorescence spectroscopy system for in vivo tissue diagnosis. Appl. Opt. 35: 5211-5219 (1996)
  7. Crook J., Malone S., Perry G., et. al. Postradiotherapy prostate biopsy: what do they really mean? results for 498 patients. Int J. Radiation Oncology Biol. Phys. 48(2): 355-367 (2000)
  8. Langendijk H.A., Bob J, Lamers S., Guul P.M., Velde T., et.al. Is the chest radiograph a reliable tool in the assessment of tumor response after radiotherapy in nonsmall cell lung carcinoma?. Int J. Radiation Oncology Biol. Phys. 1037-1065 (1998)
  9. Gupta P.K., Bhawalkar D.D.. Laser applications in medicine: studies at center for advanced technology. Current Science. 77(7): 925-933 (1999)
  10. Ploicard, Comptes-rendus, Soc. Biol. 1924; 91:1423-1424.
  11. Alfano R.R., Tata D.B., Cordero J., et.al. Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue. IEEE Quantum Electronics. 20(12):1507-1511 (1984)
  12. .Dhingra J.K., Zhang X., McMillan K., et.al. Diagnosis of head and neck precancerous lesions in an animal model using fluorescence spectroscopy. Laryngoscope.108: 471-475 (1998)
  13. Roggan A, Friebel M, Dorschel K, Hahn A, Muller G. Optical properties of circulating human. blood in the wavelength range 400-2500nm. Journal of Biomedical Optics. 4(1): 36-46 (1999)
  14. Backman V., Wallace M.B., Perelman L.T., et.al. Light scattering spectroscopy:a new technique for clinical diagnosis of precancerous and cancerous changes in human epithial. Nature. 406: 35-36 (2000)
  15. Charles L., Sanders, Ronald L. Katren. Ionizing Radiation Tumorigenic and Tumoricidal Effect, 1st ed, Columbus, Battelle press, 25-30 (1983)
  16. Ann G., Rhonda J., Rebecca Reichards-Kortum, Fluorescence spectroscopy: A technique with potential to improve the early detection of aerodigestive tract neoplasia. Head & Neck. 556-562 (1998)



## The Study of Optical Biopsy's Usefulness in Radiotherapy

Seunghee Han<sup>\*†</sup>, Markus G. Müller<sup>\*</sup>, Michael S. Feld<sup>\*</sup>,  
Seung-Hee Kang<sup>†</sup>, Haejin Kang<sup>§</sup>

*G.R.Harrison Spectroscopy Lab, Massachusetts Institute of Technology<sup>\*</sup>*  
*Department of System Engineering<sup>†</sup>, Radiation Oncology<sup>†</sup>, Radiology<sup>§</sup>,*  
*Ajuo University, Suwon, Kyungkido*

The prior purpose of this study is to introduce a optical biopsy and evaluate whether the optical biopsy, real-time, non-invasive technique, is a reliable tool to assess response to radiotherapy. Four healthy volunteers, and four patients with inflammatory conditions of the oral cavity participated on the study. was obtained from each person enrolled in the study. Using FastEEM(Excited Emission Matrix) as a optical biopsy tool, normal and tumor spectra are taken from the the normal and the tumor regions. And then second optical biopsy are taken from the tumor regions in 4 patients with time delay at 7days.. Using a diagnostic algorithm, made by Gillenwater based on spectra excited at 337nm

The Optical Biopsy turned out to be more suited for tumor diagnostic resulting in significant difference fluorescence spectra. The fluorescence intensity of cancerous tissue showed a higher position. The second fluorescence intensity of optical biopsy of cancerous oral tissue has more smaller than the first result.

I conclude that optical biopsy, which technique don't need to remove tissue sample from body, and is a real time , and non-invasive measurement is a reliable tool to access to radiotherapy because FastEEM can do measure the variation of the tissue composition chemical, biological , and morphological after radiotherapy. Based on the fluorescence spectrum are taken from the optical biopsy in normal and tumor spectra as well as tumor spectra after 7days.

**Key Words:** optical biopsy, real-time, radiotherapy