

# 소형동물 전임상실험을 위한 하이퍼스펙트럼 영상장비 연구

論 文  
56-12-24

## Research about Hyperspectral Imaging System for Pre-Clinical testing of Small Animal

李 庚 熙<sup>†</sup> · 崔 永 旭<sup>\*</sup>  
(Kyeong-Hee Lee · Young-Wook Choi)

**Abstract** - In this study we have developed a hyperspectrum imaging system for highly sensitive and effective imaging analysis. An optical setup was designed using acoustic optical tunable filter (AOTF) for high sensitive hyperspectrum imaging. Light emitted by mercury lamp gets split in to diffracted and undiffracted beams while passing through AOTF. GFP transfected HEK-293 cell line was used as a model for in vitro imaging analysis. Cells were first, analyzed by fluorescence microscope followed by flow cytometric analysis. Flow cytometric analysis showed 66.31% transfection yield in GFP transfected HEK-293 cells. Various images of GFP transfected HEK-293 cell were grabbed by collecting the diffracted light using a CCD over a dynamic range of frequency of 129-171 MHz with an interval of 3 MHz. Subsequently, for in vivo image analysis of GFP transfected cells in mouse, a whole-body-imaging system was constructed. The blue light of 488 nm wavelength was obtained from a Xenon arc lamp using an appropriate filter and transmitted through an optical cable to a ring illuminator. To check the efficacy of the newly developed whole-body-imaging system, a comparative imaging analysis was performed on a normal mouse in presence and absence of Xenon arc irradiation. The developed hyperspectrum imaging analysis with AOTF showed the highest intensity of green fluorescent protein at 153 MHz of frequency and 494 nm of wavelength. However, the fluorescence intensity remained same as that of the background below 138 MHz (475 nm) and above 162 MHz (532 nm). The mouse images captured using the constructed whole-body-imaging system appeared monochromatic in absence of Xenon arc irradiation and blue when irradiated with Xenon arc lamp. Nevertheless, in either case mouse images appeared clearly.

**Key Words** : hyperspectrum imaging, molecular imaging, preclinical system

### 1. 서 론

최근 등장한 분자영상은 살아있는 유기물의 세포 또는 분자 단위에서의 생명현상을 비 침습적 방법으로 영상화하는 것으로 생체내의 특정 분자들을 영상대조도의 근원으로 하며 그 정보를 영상화하는 것이다. 특히, 루시페라제(Luciferase), 녹색형광단백질(green fluorescence protein, GFP)등 보고 유전자(reporter gene)의 출현에 의해서 생체 분자 영상 분야에서 활용의 중요성이 크게 증가하였다. 보고 유전자를 이용하는 광학 영상법은 기존 영상법이 형태적인 영상을 측정할 수 있는 반면에 신호전달의 중간 매개물질, 여러 단백질의 동적인 움직임, 유전자의 활동 등을 생체 내에서 실시간으로 측정될 수 있는 장점을 가지고 있다. 이러한 장점은 신약개발과정(그림 1)에서 많은 시간과 비용이 소요되는 전임상 실험에 응용되어 신약 스크리닝을 효율을 높이기 위한 연구가 많이 수행되고 있다[1]. 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 예비처방연구(preformulation studies)를 하게 된다. 이를 바탕으로 전임상 실험, 임상 1상의 임상화 연구과정을 거쳐서 제 2상, 3상 시험을 실시하며, 이 모든 과정을 거쳐서 신약이 출시되기까지 일반적으로 10년 이상의 기간과 약 10억불까지도 소모되는 등 신약 개발에 막대한 시간과 비용이 소모되고 있다.

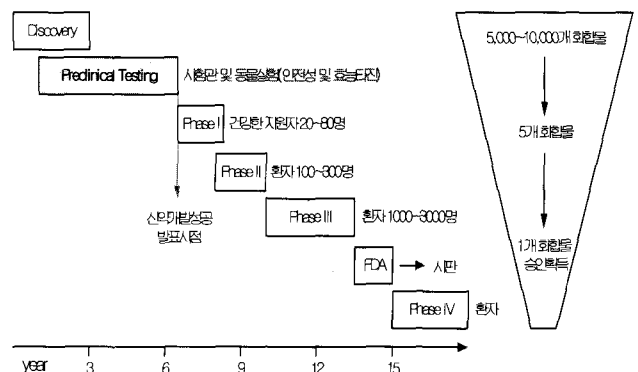


그림 1 신약 개발 단계  
Fig. 1 Processing step for drug screening

<sup>†</sup> 교신저자, 正會員 : 韓國電氣研究院 先任研究員 · 理博  
E-mail : khlee@keri.re.kr

<sup>\*</sup> 正會員 : 韓國電氣研究院 責任研究員 · 工博  
接受日字 : 2007年 10月 25日  
最終完了 : 2007年 11月 14日

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.

## 2. 본 론

### 2.1 하이퍼스펙트럼 영상시스템의 원리

하이퍼스펙트럼 영상 시스템은 근래 크게 주목받는 새로운 광학적 영상법 중에 하나로써, acousto-optical tunable filter (AOTF)라는 일종의 회절격자를 이용하여 다양한 파장에서 광학적 영상을 얻을 수 있는 방법이다[5~10]. 즉, 하이퍼스펙트럼 영상 시스템 기술을 이용하여 기존 시스템이 제공하는 영상 정보이외에도 일정범위 각각의 파장에서 제공되는 영상을 얻게 되고, 이는 특정 생체조직에서 일어나는 현상을 추적하고 이해하는데 기여한다. 예를 들면, 레이저 유발 형광 검출에 기초해서 약물이 표적 기관 및 종양 등에 성공적으로 도달하는 것을 실시간으로 관찰할 수 있게 하여 항암제의 치유 효능을 이해하는데 매우 효과적이다. 신약의 전임상 시험(Pre-clinical testing) 과정에 매우 효과적으로 이용될 수 있는 이 기술은 신약 개발 시 소요되는 막대한 비용을 줄이는데 크게 기여할 수 있는 새로운 신약 선별법(Drug Screening)으로 크게 주목을 받고 있다. 하이퍼스펙트럼 영상시스템에서 얻어지는 data는 그림 3 에서와 같이 2차원적인 영상 이미지와 이미지의 각 점에서 깊이방향으로 분광특성을 동시에 얻을 수 있으며, 측정범위 영역에서 수십초 정도의 짧은 시간에 이루어지고 파장 선택을 위한 필터의 교환, 회절격자의 구동 등이 요구되지 않기 때문에 안정된 상태에서 빠른 시간에 원하는 결과를 얻을 수 있다.[11]

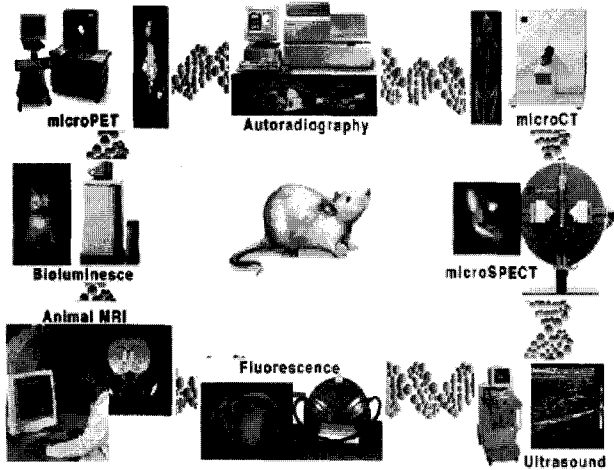


그림 2 소동물 전임상 실험을 위한 multimodal 영상장비  
 Fig. 2 Multimodal imaging systems for pre-clinical testing of small animal

### 2.2. 하이퍼스펙트럼 영상시스템 구성

신약 스크리닝 이외에도 종양 등 질병 발현 및 치유, 약물의 작용 메카니즘 등을 위한 전임상, 단백질 및 유전자 상호작용 메카니즘 규명 등 다양한 생리/병리학적 연구를 위하여 일반적으로 마우스 등의 소형 동물을 많이 이용한다. 이들 연구의 방향이 생체 내에서의 작용에 대한 in-vivo 상태에서의 실시간 측정에 대한 중요도가 증가하면서, 실험대상체 내에서의 발현 특성 등에 대한 연구를 효과적으로 수행하기 위해서 whole body 영상 장비에 대한 연구가 다양하게 수행중이며, 이를 위한 실험 장비들도 다양하게 개발되어 활용되고 있다[2~4].

하지만, 이들 장비들은 대부분 고가이며 방사능 표지인자 사용, 관리 및 유지의 어려움 등의 문제점을 가지고 있다. 광학적인 방법을 이용하는 bioluminescence, fluorescence system 등이 개발되기는 하였지만 대부분 영상이미지만을 제공하거나 특정 파장에 대한 정보만을 측정하는 제한이 있다.

본 연구에서는 Hyper spectral imaging 기법을 이용하여 마우스 또는 물모트 등 소형 동물의 전임상 실험에 이용될 수 있는 영상 시스템에 대한 연구를 수행하였으며, 이를 이용하여 GFP가 발현된 세포에서의 하이퍼스펙트럼 특성과 마우스의 whole-body 영상을 얻기위한 실험을 수행하였다.

세포에 발현된 GFP를 효과적으로 이미지화하기 위하여 그림 4와 같은 구조로 시스템을 구성하였다. 세포의 영상 측정을 위한 광학계는 Olympus IX71 현미경을 사용하였으며, 수은 램프와 여기용 필터를 장착시켜 300~500nm의 파장을 활용할 수 있도록 하였다. 샘플에서 발생하는 GFP의 방출 파장에 대한 하이퍼스펙트럼 영상데이터를 얻기 위하여 현미경의 CCD 카메라 앞부분에 AOTF(Acousto Optical Tunable Filter)를 장착하여 인가되는 진동수의 변화에 따라 CCD에 측정되는 영상의 파장을 변화시킬 수 있도록 하였다. AOTF에서 나온 회절된 빛은 중심축에서 6°로 벌어져 형광 빛과 다른 각도로 이동하므로 Beam Stop을 이용하여 막고 형광만이 CCD에 입사 되도록 하였으며, 이 때 AOTF는 1-nm씩 주사되어 투과되는 형광 빛의 파장을 바꿀 수 있다. AOTF에서 회절된 빛과 회절되지 않은 빛을 구별하기 위하여 샘플로  $1 \times 10^{-4}M$  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 설치하였다.

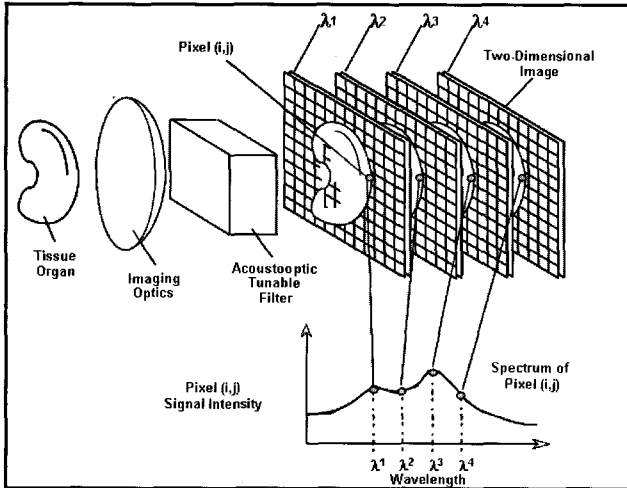


그림 3 하이퍼스펙트럼 광 영상 측정법 개략도 및 Data 형태  
 Fig. 3 Schematic drawing of hyper spectral imaging system and data

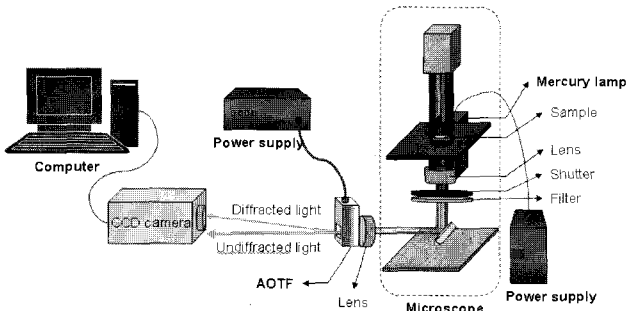


그림 4 하이퍼스펙트럼 분자영상 시스템 구성도  
 Fig. 4 Construction of hyper spectral imaging system

동물 실험을 위한 전임상 영상장비의 구성은 그림 4에서 제작된 시스템의 구성을 바탕으로 마우스 등 소형 동물의 whole-body 영상을 얻을 수 있도록 구성하였으며, 그 구조는 그림 5와 같다. 여기용 광원으로는 Xe 램프를 이용하였으며, 발현된 형광 신호를 CCD 카메라를 통하여 영상 데이터를 얻을 수 있도록 하였으며, 실험용 마우스를 위치할 수 있는 실험대를 설치하였다. 또한, AOTF를 CCD 카메라의 앞부분 filter 위치에 설치하여 효율적인 스펙트럼 영상 데이터를 얻을 수 있도록 배치하였다.

2.3 하이퍼스펙트럼 영상시스템 특성실험

하이퍼스펙트럼 시스템을 이용한 영상 특성에 대한 실험을 위하여 DH5 $\alpha$  수용성 세포와 상업용 GFP 플라스미드 매개체 (DNA)를 이용하여 형질전환 시킨 후 얻은 GFP 플라스미드 매개체를 세포에 주입하고 세포내에서 GFP를 발현시킨 인간 정상세포인 HEK 293 세포를 사용하였다. GFP 발현 여부를 확인하기 위하여 수은 램프 광원을 조사하여 HEK 293 세포에서 발현된 GFP를 여기시킨 후 발생한 형광신호를 제작된 시스템을 이용하여 확인하였으며, 그림 6과 같이 세포내에서 발현된 GFP의 형광 신호를 얻을

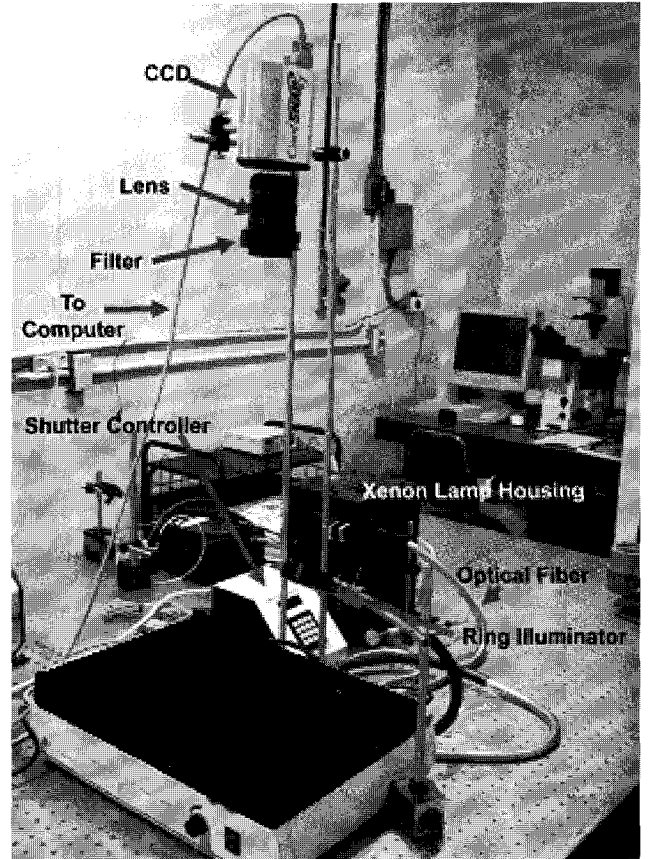


그림 5 소형 동물용 하이퍼스펙트럼 영상시스템  
 Fig. 5 Hyper spectral imaging system for whole body image of small animal

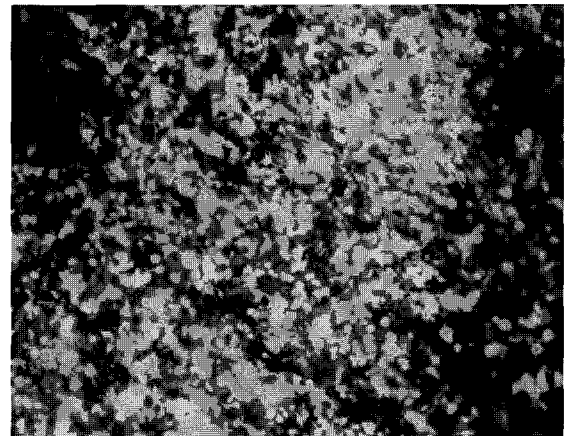


그림 6 HEK293 세포에서 발현된 GFP의 형광 이미지  
 Fig. 6 GFP fluorescence image of HEK 293 cell

수 있었다. 세포내에서 발현된 GFP의 발현 효율을 측정하기 위하여 GFP가 발현된 세포들을 PI 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 GFP의 발현률을 확인하였다. 이 때 FL1-H파장은 GFP가 발현된 세포의 강도를 확인하기 위하여, FL2-H파장은 PI 염색된 세포의 강도를 확인하기 위해 이용하며, 본 실험에서의 발현율은 약 66.31%이었다.(그림 7)

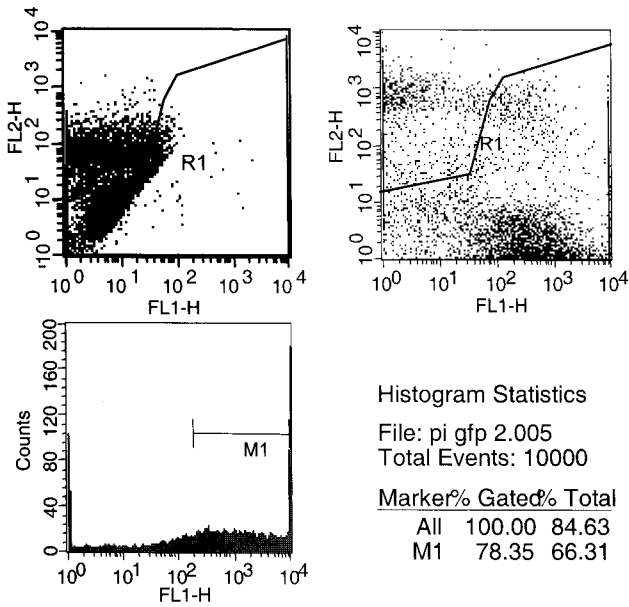


그림 7 Flow cytometry를 이용한 GFP 발현률 결과  
Fig. 7 GFP transfection rate measured by flow cytometry

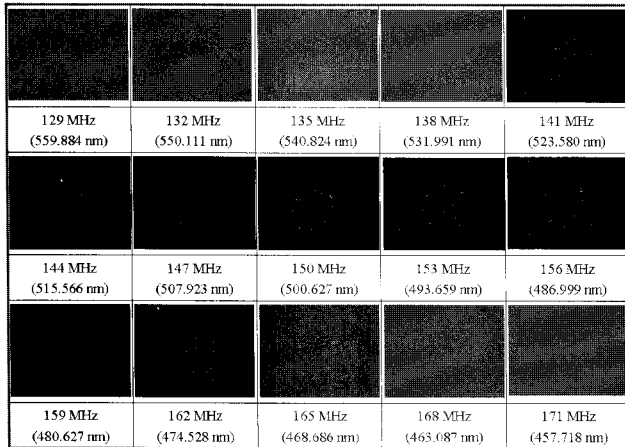


그림 8 AOTF의 진동수 및 파장 변화에 따른 형광 이미지 변화  
Fig. 8 Fluorescence images according to change of frequency and wavelength

GFP가 발현된 HEK 293 세포를 이용하여 제작된 하이퍼스펙트럼 분자영상 시스템을 이용하여 파장에 따른 영상 측정을 위한 실험을 실시하였다. AOTF에 여기되는 주파수를 129MHz~171MHz 영역에서 3MHz 간격으로 조절함으로써 457~560nm 영역에서 15개 파장에서의 스펙트럼 영상 데이터를 얻었다. 제작된 시스템의 광포백 특성을 측정하기 위하여 150 MHz를 기준으로 실험 전후의 광포백 특성을 측정하였는데, 강도의 차이가 0.5% 이내로 그 차이가 미약하였다. 즉, 광포백이 거의 일어나지 않았다고 볼 수 있다. 실험을 통하여 얻어진 HEK293 세포의 영상 데이터는 그림 8과 같다. GFP의 방출 파장과 비슷한 500nm 근처에서는 가장 높은 강도와 선명한 영상이 얻어지는 것을 볼 수 있고 500 nm에서 멀어질수록 강도가 줄어드는 것을 관찰할 수 있다.

이를 좀 더 수치화 시켜서 그래프로 나타낸 것이 그림 9와 그림 10이다.

그림 9는 그림 8에서 촬영한 이미지의 동일점을 잡아 그 점에서 진동수 변화에 따른 강도 변화를 그래프로 나타낸 것이고, 그림 10은 동일점에서 AOTF의 파장 변화에 따른 강도의 변화를 나타낸 것이다. 녹색 플루오레세인의 강도는 153 MHz의 진동수와 494 nm의 파장에서 가장 높았다. 반면, 진동수는 138 MHz 이하 162 MHz 이상에서, 파장은 475 nm 이하 532 nm 이상에서는 강도가 100 정도로 백그라운드와 같았다.

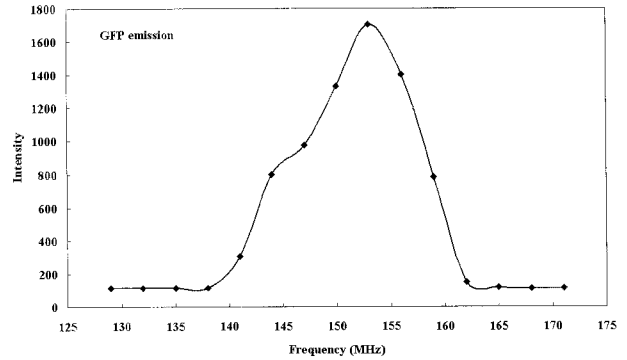


그림 9 AOTF의 진동수에 따른 GFP 발현 형광의 강도 변화  
Fig. 9 Intensity characteristics of GFP fluorescence by frequency of AOTF

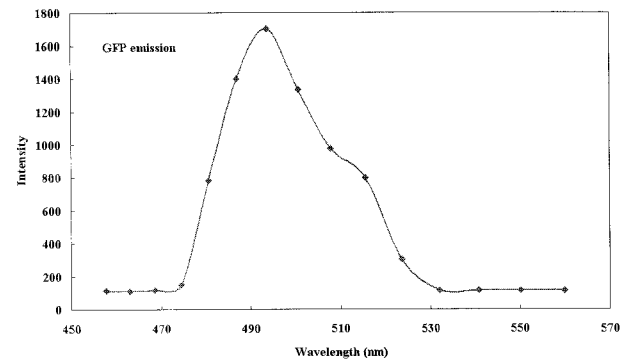


그림 10 파장에 따른 GFP 발현 형광의 강도 변화  
Fig. 10 Intensity characteristics of GFP fluorescence by wavelength

실험용 마우스의 whole-body 영상 측정을 위하여 사용된 광원은 Xe 아크 램프(Shutter Instruments, Novato, USA)를 사용하였다. 사용된 Xe 램프는 340~700 nm의 파장을 방출하기 때문에 넓은 범위의 파장을 들뜬 상태로 만들 수 있으며, Xe 램프 앞에 GFP 여기를 위한 필터를 장착시켜 원하는 특정 파장의 빛만을 조사할 수 있도록 하였다. 크세논 아크 램프에서 방출이 된 빛은 필터를 통과하여 광섬유를 통해서 고리형 조명기로 전달이 되어 방출되도록 하였으며, 검은색 plate 위에 놓여진 실험용 마우스에 조사하여 마우스에 발현되어있는 형광물질을 여기 상태로 만든다. 형광물질에서 나온 형광이미지는 CCD 카메라에 도달하게 되는데 형

광과 함께 들어올 수 있는 레이저 빔을 Notch 필터를 이용하여 막고 CCD를 통해 영상을 얻을 수 있도록 하였다. 또한 마우스에서 발견되는 형광 이미지의 스펙트럼이미지를 얻기 위하여 CCD 앞에 AOTF를 배치하여 파장에 따른 영상신호를 측정할 수 있도록 함으로써 실험용 마우스의 whole-body 이미지에 대한 하이퍼스펙트럼 영상 신호를 감도의 검출을 할 수 있도록 하였다. 이상의 시스템을 바탕으로 마우스 팬텀(Xenogen Co) 및 실험용 마우스를 이용하여 whole-body 이미지 획득을 위한 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 마우스는 오리엔트바이오 (Seoul, Korea)에서 구입하여 이용하였다. 본 실험에서는 GFP에 대한 실험만을 수행하였기 때문에 GFP가 발현된 세포에 대한 관측을 위하여 GFP의 여기파장인 488 nm의 필터를 사용하였다.

그림 11은 마우스팬텀 및 실험용 마우스에 대하여 얻어진 whole-body 영상 결과이다. 마우스 팬텀은 내부에 미세 발광을 하는 LED를 장착하여 세포에서 발생하는 autofluorescence 신호에 대한 검출실험을 위한 것으로, 마우스 팬텀에서 발생하는 미세 광신호에 대한 영상을 획득함으로써 본 연구에서 제작된 시스템의 검출 감도가 매우 민감한 것을 확인할 수 있었다. 그림 11(b)는 실험용 마우스를 이용하여 얻어진 영상으로, Xe 램프 사용 전후의 실험용 마우스의 이미지를 촬영한 것이다. 사진 내부의 작은 사진은 Xe 아크 램프를 사용하기 전에 획득된 영상이며 단색으로 보이고 있다. 그리고 동일한 위치에서 Xe 아크 램프를 사용하여 촬영한 것은 푸른색을 나타내고 있다. 얻어진 마우스의 whole-body 영상은 실험용 마우스의 미세형상까지 구분할 수 있는 충분한 해상도를 나타내었으며, 무광원상태에서 마우스에서 발생하는 형광신호뿐 아니라 미세한 autofluorescence 까지 측정할 수 있는 높은 민감도를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 whole-body 영상과 함께 AOTF의 장착으로 하이퍼스펙트럼 영상의 측정이 가능하므로, GFP를 발현시킨 세포를 마우스에 주입하여 마우스 내에서의 종양 성장과정, 약리작용 등 다양한 전임상 실험 및 역학 실험에 이용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

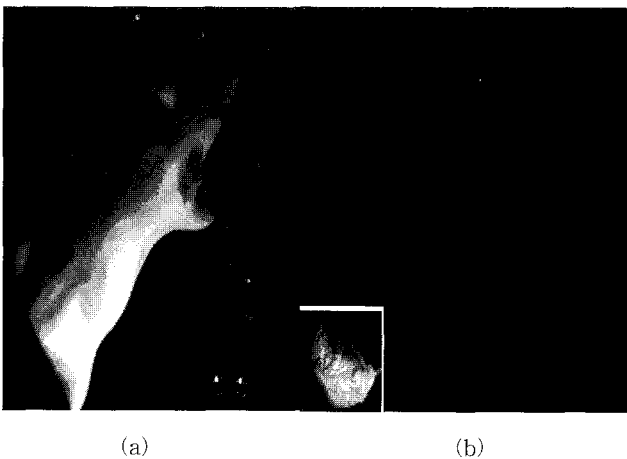


그림 11 마우스팬텀(a) 및 실험용 마우스(b)를 이용한 Whole-body image

Fig. 11 Whole-body image of mouse phantom(a) and test mouse(b)

### 3. 결 론

본 연구에서는 하이퍼스펙트럼 영상시스템에 대한 연구를 수행하여 AOTF를 이용하여 가시광 영역에서 영상데이터와 스펙트럼 특성을 동시에 얻을 수 있는 영상시스템을 제작할 수 있었으며, 이를 이용하여 GFP가 발현된 HEK 293 세포에서의 영상 스펙트럼 데이터와 실험용 마우스에 대한 whole-body 영상을 얻을 수 있었다. 본 연구에서 제작된 고감도 하이퍼스펙트럼 분자영상 시스템은 전임상 실험단계에 활용하여 약물 스크리닝 등 다양한 생화학 실험에 활용될 수 있을 것이다.

### 참 고 문 헌

- [1] 이우길, 분자세포생물학뉴스, “신약개발에서 최근 스크리닝 기술”, 17권, 4호, pp. 36-49, 2005.
- [2] 민정준, 분자세포생물학뉴스, “생체 분자 광 영상”, 17권, 3호, pp. 21-35, 2005.
- [3] Arion F. Chatzioannou, Proc. “Instrumentation for Molecular Imaging in Preclinical Research: Micro-PET and Micro-SPECT” Am. Thorac. Soc. Vol 2. pp. 533-536, 2005.
- [4] Weissleder, R. and Mahmood, U. “Molecular imaging”, Radiology 219, pp. 316-333, 2001.
- [5] K. Chao, P. Mehl, and Y. R. Chen, “Use of hyper- and multi-spectral imaging for detection of chicken skin. tumors”, Applied Engineering in Agriculture, Vol. 18(1), pp. 113-119, 2002.
- [6] MediSpectra Inc., <http://www.medispectra.com/news/news.html>, 2006.
- [7] G. Shaw and D. Manolakis, “Signal Processing for Hyperspectral. Image Exploitation”, IEEE Signal Processing Magazine, Vol. 19(1), pp. 12-16, 2002.
- [8] D. Landgrebe, “Hyperspectral Image Data Analysis as a High Dimensional Signal Processing Problem”, IEEE Signal Processing Magazine, Vol. 19(1), pp. 17-28, 2002.
- [9] C. Chang, Q. Du, T. Sun, and M. Althouse, “A joint band prioritization and band decorrelation approach to band selection for hyperspectral image classification”, IEEE Trans. Geoscience and Remote Sensing, Vol. 37(6), pp. 2631-2641, 1999.
- [10] S.G. Kong, Y.R. Chen, I. Kim, and M.S. Kim, “Analysis of Hyperspectral Fluorescence Images for Poultry Skin Tumor. Inspection”, Applied Optics, Vol. 43(4), pp. 824-833, 2004.
- [11] T. Dinh, B. Cullum and P. Kasili, “Development of a multispectral imaging system for medical applications”, J. Phys. D: Appl. Phys. 36, pp1663-1668, 2003.

저 자 소 개



**이 경 희 (李 庚 熙)**

1968년 10월 20일생.  
1991년 서강대학교 화학과 졸업  
1993년 서강대학교 화학과 졸업 (석사)  
2004년 Saint Petersburg State  
University of Information Technologies,  
Mechanics and Optics 졸업 (박사)

1993년 9월 - 현재 한국전기연구원 융합기술연구단 선임  
연구원

1999년 3월 - 2004년 7월 러시아 St. Petersburg 소재  
'한·러 광학기술협력센터' 파견근무

주관심분야 : 바이오센서, 생체 광영상 시스템, 광 간섭  
및 회절 응용 계측기술

Tel : (031) 8040-4168

Fax : (031) 8040-4109

E-mail : khlee@keri.re.kr



**최 영 옥 (崔 永 旭)**

1960년 6월 26일생.  
1984년 한양대 공대 전기공학과 졸업  
1994년 九州大學大學院 總合理工學研究  
科 에너지변환공학과 졸업 (석사)  
1997년 동대학원 졸업 (박사)  
1984년 3월 - 1991년 10월 한국전기연구

소 연구원

1997년 4월 - 현재, 한국전기연구원 책임연구원

주관심분야 : 생체질병 바이오센서 개발, 레이저·광 응용  
계측 (LIF), 전자빔/플라즈마응용, PDP MgO박막 제조장  
비, 고전압 전원기술

Tel : (031) 8040-4167

Fax : (031) 8040-4109

E-mail : ywchoi@keri.re.kr