Nucl Med Mol Imaging
Vol. 43, No. 5, Oct 2009

Original Article

발광영상에 대한 정량화 방법 개발

화순전남대학교병원 핵의학과[1], 조선대학교 물리학과[2], 인제대학교 의료영상과학과[3], 임상백신연구센터[4]
김현식[1] · 최은서[2] · 탁윤오[3] · 최흥국[3] · 이주영[4] · 민정준[1] · 이병일[1]

Development of Quantification Method for Bioluminescence Imaging

Hyeon Sik Kim, B.S.[1], Eun Seo Choi, Ph.D.[2], Yoon-o Tak, B.S.[3], Heung Kook Choi, Ph.D.[3], Ju Young Lee, B.S.[4], Jung-Joon Min, M.D., Ph.D.[1], and Byeong-il Lee, Ph.D.[1]

[1]Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Hospital, Hwasun, Korea; [2]Department of Physics, Chosun University, Gwangju, Korea; [3]Department of Medical Image Science, Inje University, Kimhae, Korea; [4]Center for Clinical Vaccine Research, Hwasun, Jeonnam, Korea

Purpose: Optical molecular luminescence imaging is widely used for detection and imaging of bio-photons emitted by luminescent luciferase activation. The measured photons in this method provide the degree of molecular alteration or cell numbers with the advantage of high signal-to-noise ratio. To extract useful information from the measured results, the analysis based on a proper quantification method is necessary. In this research, we propose a quantification method presenting linear response of measured light signal to measurement time. **Materials and Methods:** We detected the luminescence signal by using lab-made optical imaging equipment of animal light imaging system (ALIS) and different two kinds of light sources. One is three bacterial light-emitting sources containing different number of bacteria. The other is three different non-bacterial light sources emitting very weak light. By using the concept of the candela and the flux, we could derive simplified linear quantification formula. After experimentally measuring light intensity, the data was processed with the proposed quantification function. **Results:** We could obtain linear response of photon counts to measurement time by applying the pre-determined quantification function. The ratio of the re-calculated photon counts and measurement time present a constant value although different light source was applied. **Conclusion:** The quantification function for linear response could be applicable to the standard quantification process. The proposed method could be used for the exact quantitative analysis in various light imaging equipments with presenting linear response behavior of constant light emitting sources to measurement time. (Nucl Med Mol Imaging 2009;43(5):451-458)

Key Words: Photon count, quantification, candela, flux, optical imaging, bioluminescence

서 론

비침습적인 방법으로 반복하여 분자 또는 세포 수준의 변화를 관찰하기 위한 소동물용 광학영상기기 및 분자영상 기술이 널리 사용되고 있다.[1-4] 최근 신약개발이나 암 연구 등 소동물을 이용한 영상 연구로 널리 알려져 있는 분자영상은 생체 내의 미세한 변화를 영상으로 평가 및 추적하는데 유용한 기법으로[5-9] 국내에서도 많은 분야에서 활용되고 있다. 고민감도 신호검출장치를 응용하는 광학기술이 발전됨에 따라 민감한 빛의 신호를 검출하는 연구를 위해 2000년대 초부터 산업화 장비가 소개되기 시작하였다. 특히 광학영상법을 이용하여 발광영상을 추적하는 기술은 국내에서도 이미 많이 소개된 분야이다. 발광영상법(luminescence imaging method)은 반딧불이를 비롯한 다양한 생물체의 발광효소(luciferase)유전자를 조작하여 생체 내에서 발광효소 발현에 의해 방출되는 빛의 신호를 영상화하는 기법이다. 생체 내에서 빛을 만들기 위해서는 발광효소를 사용하고 있는데[10-17], firefly (Fluc), renilla (Rluc), Gaussia (Gluc), bacterial (Lux) 발광효소 등이 현재 사용되고 있다. 발광효소마다 발광량은 다르지만, 일반적으로 발광영상은 신호 대 잡음비가 좋고 세포에서 방출하는 광량이 분자의 변화 또는 세포 수와 비례하여 정량적으로 분석이 가능하다.[18,19] 하지만 검출해야 하는 빛의 세기가 매우 낮은 경

• **Received**: 2009. 6. 25. • **Revised**: 2009. 9. 3.
• **Accepted**: 2009. 9. 4.
• Address for reprints: Byeong-il Lee, Ph.D., Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Hwasun Hospital, 160 Ilsim-ri, Hwasun, Jeonnam 519-809, Korea
Tel: 82-61-379-8482, Fax: 82-61-379-8455
E-mail: dewpapa@hanmail.net
※본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업 RTI05-01-01 지원으로 수행되었음

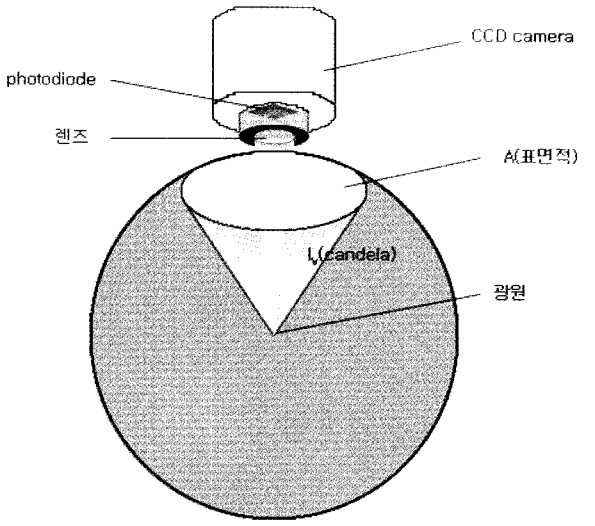


Figure 1. The figure shows that the emitted photons from a point light source arrive at a photodiode of a CCD camera. The intensity of light is correlated with the distance between the CCD camera and the light source and correlated with dimension of camera lens used.

우에는 영상을 얻어 발광량을 정량화 하는데 어려움이 있다. 발광신호를 검출하기 위해서 사용되는 전자결합소자(charged coupled device, CCD)[20-22]는 민감도가 매우 높지만 높은 민감도만큼이나 상온에서의 열적인 잡음도 많이 생기는 문제가 있다. 이러한 열적 잡음은 -80 ~ -150℃까지 냉각을 시킴으로써 최소화 한다.[23] 전자결합소자는 광원으로부터 방사된 광자들이 광전효과에 의해 광전자를 생성함으로써 신호를 획득한다. 즉 광원의 세기에 따라 전자결합소자에 도달하는 광자의 수가 다르면 전기적인 신호도 다르게 발생하게 된다.

광학영상기기의 광학 물리적 환경도 신호측정에 중요한 요인이다. 물리적으로 빛의 세기는 candela (cd)로 명명하는데 이것은 점광원으로부터 1 steradian (sr)마다 방사된 광속(flux)을 뜻한다. 그러므로 cd의 단위는 lm/sr이다.[24,25] 여기서 lm은 단위면적을 단위시간동안 흘러가는 어떤 물리량(광자)으로 정의하는 광속이며, 단위는 $P/cm^2/sec$이다. 그리고 입체각을 말하는 sr은 반지름 r인 구의 일부 표면적이 A일 때 A/r^2로 계산되며, $A=r^2$일 때 1 sr이 된다. 그러므로 cd$=P/cm^2/sec/sr$ 이다(Fig. 1). 전자결합소자는 검출되는 빛의 파장대역에 따라 양자효율(quantum efficiency)이 하드웨어적인 특성을 가지고 있어서 모든 파장대의 빛에 대해 광자를 측정한 결과가 비례적이지 않다. 그러나 동일 파장대역에 대해서는 빛의 양을 비교할 수 있다. 빛의 양이 많아지면 검출되는 광자의 수가 많아지게 되지만 검출되는 광자의 수가 일정한 비율로 증가하지는 않는다. 그러므로 서로 다른 전자결합소자 카메라에 측정된 세기가 다른 광원을 비교하기가 쉽지 않다. 따라서 광자수에 대한 정량적인 해석을 하기 위해서는 정량화에 대한 기준 및 방법이 필요하다.

현재 많이 사용되고 있는 광학영상기기에서도 각 기기의 특성에 맞는 신호검출방법을 사용하고 있으나, 공개적으로 알려져 있지는 않다. 본 연구팀에 의해 개발되어 온 광학 분자영상장비(animal light imaging system, 이하 ALIS)에서는 고민감도 전자결합소자를 사용하여 발광영상을 성공적으로 획득하였다. 하지만 발광신호의 정량화방법에는 이상에서 설명한 세 가지의 중요한 요소가 잘 반영이 되어야 하는데, 발광광원의 특성, 전자결합소자의 특성, 그리고 기기의 광학적 특성이 그것이다. 이 연구에서는 이러한 세 가지 요소를 잘 고려한 발광신호 검출 방법을 제안하였다. 그리고 빛의 세기가 다른 발광영상에서 측정된 값을 팬텀을 이용하여 분석하였다.

대상 및 방법

1. 대상

분자영상 연구를 위해 개발 중인 ALIS는 Princeton Instruments의 VersArray 1300B 모델의 전자결합소자와 Nikon 렌즈(F/#=1.2)를 사용하고 있는 광학영상기기로 국내에서 최초로 개발한 소동물 분자영상기기이다. 이 연구에서는 개발 중인 ALIS로부터 발광영상신호를 얻어 정량화 하는데 필요한 방법을 개발하여 적용하였다. 발광신호를 얻기 위해서 발광박테리아(450-500nm), 플라스틱 마우스 팬텀과 2종류의 Xenogen사 측정용 광원(485-565nm, 590-680nm)을 사용하였다.

2. 정량화 방법

전자결합소자 카메라가 광량을 측정하는 물리적 현상은 cd와 광속의 개념으로 해석함으로서 정확히 이해될 수 있다. 카메라의 노출시간을 t라 하고 렌즈의 면적이 A인 곳에서 광속(photon flux), $F=P_n/At$이 된다. 점광원에서 전자결합소자까지 거리가 d만큼 떨어진 곳에서 광자를 받아들이게 되면 sr은 A/d^2가 되므로 빛의 세기는 다음과 같다.

$$I_V = \frac{P_n d^2}{A^2 t} \quad (1)$$

세기가 일정한 광원이라면 단위 시간 동안에 전자결합소

자 카메라에 도달한 광자의 수가 일정해야 한다.

$$I_V = \frac{P_n d^2}{A^2 t} = \text{const} = c_1,\ \frac{d^2}{A^2} = \text{const} = c_2 \text{ 이므로}$$

$$\frac{P_n}{t} = \frac{c_1}{c_2} = c_3 = \text{const}$$

이다. 빛의 세기가 일정할 경우 단위시간 동안 측정된 광량은 일정한 값을 얻게 된다.

$$P_n = c_3 \times t \tag{2}$$

광자수의 측정을 위해 기본적으로 시간에 비례하는 함수가 나와야 하므로, 일정한 세기를 가진 광원의 광량을 시간에 대해 1차 함수로 생각하면, 다음과 같이 간단하게 수식을 정의 할 수 있다.

$$y_d = a_d t + v$$

여기서 y_d는 노출시간 동안 측정된 값이고, a_d는 측정된 값들이 만든 함수의 기울기이며, v는 측정된 값들이 만든 함수의 y절편이다. 노출시간을 1초로 하여 얻은 값을 k라 하였을 때, $k = a_d + v$가 된다. 그러므로 v는 a_d와 k에 의존하는 함수이다. 여기서 $v = k - a_d$이며, $y_d = a_d t + k - a_d$이 된다. 1초에 얻은 값을 기준으로 하여 정량화된 함수는 $y_c = a_c t$ 꼴이 된다. 실제 데이터 값을 정량화 함수로 만들어야 하기 때문에 다음과 같은 과정을 통하여 유도된다.

$$y_c = \gamma\, y_d + \delta$$
$$y_c = \gamma\,(a_d t + k - a_d) + \delta$$
$$y_c = \gamma\, a_d t + \gamma\, k - \gamma\, a_d + \delta = a_c t$$

$$\gamma = \frac{a_c}{a_d},\ \delta = \gamma\,(a_d - k) = \frac{a_c}{a_d}(a_d - k)$$

$$y_c = \frac{a_c}{a_d} y_d + \frac{a_c}{a_d}(a_d - k) = \frac{a_c}{a_d}(y_d + a_d - k) \tag{3}$$

$t = 1$일 때, $a_c = k$ 이므로 다음과 같이 정량화 함수를 얻을 수 있다.

$$y_c = \frac{k}{a_d}(y_d + a_d - k) \tag{4}$$

단위시간 1초를 기준으로 하여 1초에 측정된 값이 1만큼 변화할 때 기울기의 변화량을 $\frac{A}{K} = \frac{a_{\max} - a_{\min}}{k_{\max} - k_{\min}}$으로 정의하였다. 여기서 $k_{\max}$는 세기가 다른 세 개의 광원 중 세기가 가장 센 광원에서 1초에 측정된 광량이고, $k_{\min}$은 세기가 가장 약한 광원에서 1초에 측정된 광량이다. 그리고 각 광원에 대해 측정된 데이터의 기울기가 $a_{\max}$, $a_{\min}$이 된다. 그러므로 $a_d = (k - k_{\min})\left(\frac{A}{K}\right) + a_{\min}$이 된다. 그리고 초기값 k는 다음과 같은 방법으로 찾을 수 있다.

$$y_d = a_d t + k - a_d = \left\{(k - k_{\min})\left(\frac{A}{K}\right) + a_{\min}\right\}(t-1) + k$$
$$= \left(\frac{A}{K}\right)k(t-1) - \left(\frac{A}{K}\right)k_{\min}(t-1) + a_{\min}(t-1) + k$$
$$= \left\{\left(\frac{A}{K}\right)(t-1) + 1\right\}k - \left\{\left(\frac{A}{K}\right)k_{\min} - a_{\min}\right\}(t-1)$$

그러므로

$$k = \frac{y_d + \left\{\left(\frac{A}{K}\right)k_{\min} - a_{\min}\right\}(t-1)}{\left\{\left(\frac{A}{K}\right)(t-1) + 1\right\}} \tag{5}$$

이 된다. 측정한 데이터의 기울기는 다음과 같다.

$$a_d = \left[\frac{y_d + \left\{\left(\frac{A}{K}\right)k_{\min} - a_{\min}\right\}(t-1)}{\left\{\left(\frac{A}{K}\right)(t-1) + 1\right\}} - k_{\min}\right]\left(\frac{A}{K}\right) + a_{\min} \tag{6}$$

임의의 시간 t_r초 동안 측정한 결과가 y_r이라면 $t = t_r$, $y_d = y_r$을 식 (5)와 (6)에 대입하여 각각의 상수 값을 결정하고 상수 값(k, a_d)을 함수 식 (4)에 대입하면 정량화된 값 y_c를 얻을 수 있다.

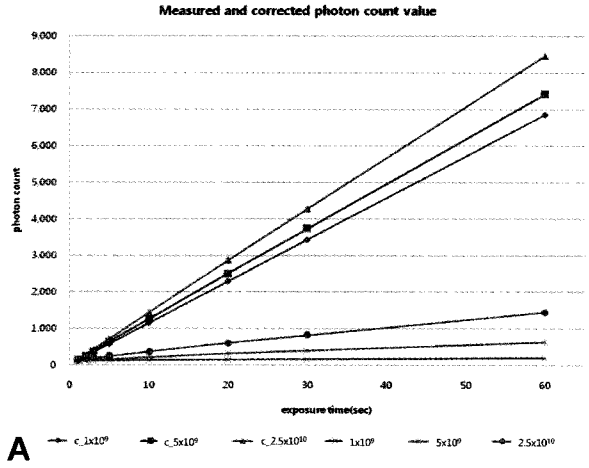
3. 실험방법

정량화 함수의 상수 값을 결정하고 적용하기 위하여 ALIS의 전자결합소자를 액화질소를 이용하여 -120℃까지 온도를 낮춘 후, Nikon 렌즈의 배율을 동일하게 설정하였다. 그리고 아래와 같은 광원을 노출시간 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 60초로 하여 영상을 얻고, 얻어진 여러 장의 영상에 관심영역(region of interest, ROI)을 같은 위치에 같은 크기로 그려 넣어 광량을 측정하였다. 모든 측정결과는 오차를 최소화하기 위해 소수점 세 자리까지 구하였다. 이와 같은 방법으로 정량화 함수의 상수 값(k, a_d)을 결정하고 제안한

Table 1. Photon Flux of Corrected Count Value

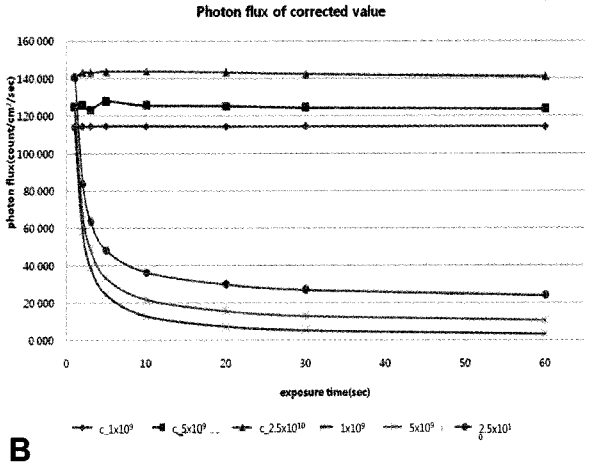
Exposure time (sec)	Count/cm^2/t		
	c_1×10^9	c_5×10^9	c_2.5×10^{10}
1	114.200	124.800	141.200
2	114.493	125.640	143.520
3	114.490	112.480	143.488
5	114.561	137.816	143.903
10	114.523	125.717	144.084
20	114.465	125.249	143.562
30	114.355	124.453	142.482
60	114.194	123.606	141.135
Standard deviation	0.144	6.806	1.180

The corrected count value indicates a consistent photon count regardless the exposure time of lens.



A

Comparison of measured and corrected value



B

Photon flux of corrected photon count

Figure 2. We measured a photon count by using bioluminescence bacteria and then applied the photon count to quantification method. (A) This graph showed the measured and corrected value, respectively. 1×109, 5×109 and 2.5×1010 is the measured value. And c_1×109, c_5×109 and c_2.5×1010 is the corrected value of the measured value. (B) The flux value (count/cm2/sec) was obtained from the corrected value divided by respective exposure time (sec). It was showed invariable value regardless of exposure time.

방법을 적용하기 위해 다음과 같이 실험을 하였다.

실험에서 사용한 총 광자 수는 관심영역에서의 얻어진 광자의 수이고, 평균 광자 수는 관심영역에서 각 픽셀 당 평균 광자 수이다. 정량화 관계식의 상수 값을 결정하기 위하여 평균 광자 수를 사용하였다.

1) 발광박테리아 실험

실험에서 얻어진 광량을 이용하여 정량화를 위한 함수의 상수 값(k, a_d)을 결정할 수 있는 값(k_{max}, k_{min}, a_{max}, a_{min})들을 얻기 위하여 발광 박테리아를 사용하였으며, 발광박테리아의 수를 각각 1×10^9, 5×10^9, 2.5×10^{10} CFU (colony forming unit) 로 빛의 세기를 달리 하여 방출된 광량을 측정하였다.

2) 세기가 다른 세 개의 광원에 대한 실험

위 실험에 의해 결정된 상수 값을 적용하여 세기가 다른 세 개의 광원에 대해 정량화 방법을 적용하여 보았다. 먼저 발광물질이 들어있는 플라스틱 마우스 팬텀과 xenogen 사에서 제공한 측정용 광원 중 2개를 이용하여 발광박테리아 실험과 같은 방법으로 신호를 얻었다. 그리고 측정된 영상에 위치와 크기가 동일한 관심 영역을 그려서 결과를 얻었다.

3) 소동물 실험을 통한 발광신호 획득

종양세포(CT26) 이식 마우스 모델(day1)을 이용하여 발광신호를 측정하였다. 같은 마우스에서 노출시간을 달리하여 5, 10, 20, 30, 60초에서 광량의 변화를 측정하고 개발한 방법을 이용하여 정량화하였다.

Table 2A. The Data Obtained from Three Difference Light Sources

Exposure time (sec)	Count			Count/cm^2/sec		
	PMouse[a)]	x-LS[b)]1	x-LS2	PMouse	x-LS1	x-LS2
1	112.200	117.200	120.400	112.200	117.200	120.400
2	113.800	122.600	129.800	56.900	61.300	64.900
3	114.800	128.300	138.900	38.267	42.767	46.300
5	117.500	140.300	157.500	23.500	28.060	31.500
10	124.200	168.700	204.300	12.420	16.870	20.430
20	137.500	226.900	297.700	6.875	11.345	14.885
30	150.400	284.500	390.300	5.013	9.483	13.010
60	187.000	458.200	668.700	3.117	7.637	11.145
Standard deviation	·	·	·	37.302	37.451	37.359

This table presented that measured photon count value was non-linearly increased to the exposure time.
[a)]PMouse : Plastic mouse phantom, [b)]LS : Light Source

Table 2B. Photon Flux of Corrected Count Value for Three Difference Light Source

Exposure time (sec)	Count/cm^2/t		
	c_PMouse[a)]	c_x-LS[b)]1	c_x-LS2
1	112.200	117.200	120.400
2	113.135	118.114	112.188
3	113.267	118.593	122.775
5	113.553	119.156	123.383
10	113.777	119.406	123.909
20	113.887	119.626	124.170
30	113.907	119.675	124.225
60	113.882	119.744	124.293
Standard deviation	0.586	0.906	4.138

After correcting photon count, the standard deviation of the flux was decreased significantly. Where "c_" represents the corrected value.
[a)]PMouse : Plastic mouse phantom, [b)]LS : Light Source

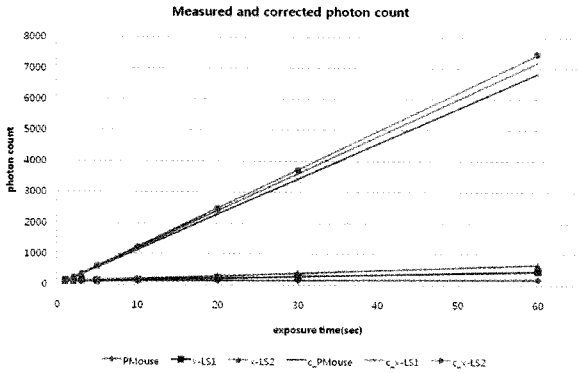


Figure 3. This graph showed the measured value and the corrected value from the measured value. We know that data modified by quantification method was the ratio to the exposure time. Where "c_" represents the corrected value.

결 과

1. 발광박테리아 실험 결과

발광박테리아를 1×10^9, 5×10^9, 2.5×10^{10} CFU로 하여 각각의 노출시간에 따라 측정한 결과, 시간에 비례하여 증가하지 않았다(Fig. 2A).

얻어진 결과로부터 1초를 기준으로 측정한 광자수의 k_{max}는 1.412×10^2였고, k_{min}은 1.142×10^2였다. 측정한 광자수를 이용하여 얻은 근사적인 선분의 기울기 a_{max}는 22.200 이고, a_{min}은 1.483 이였다. 그러므로 광원의 세기에 따른 특성 기울기 값은 개발된 장비의 특성을 반영하여 결정되었다 (A/K = 0.767). 이와 같은 결과로부터 식 (5), (6)의 상수 k 와 a_d 값을 구하였다.

$$k=\frac{y_d+\left\{\left(\frac{A}{K}\right)k_{\min}-a_{\min}\right\}(t-1)}{\left\{\left(\frac{A}{K}\right)(t-1)+1\right\}}\fallingdotseq\frac{y_d+86.142(t-1)}{0.767(t-1)+1}$$

$$a_d=(k-k_{\min})\left(\frac{A}{K}\right)+a_{\min}\fallingdotseq\frac{0.767y_d+66.097(t-1)}{0.767(t-1)+1}-86.142$$

측정한 임의의 시간과 측정값을 대입하여 정량화 함수의 상수 값을 결정하였다. 이 상수 값들을 이용하여 발광 박테

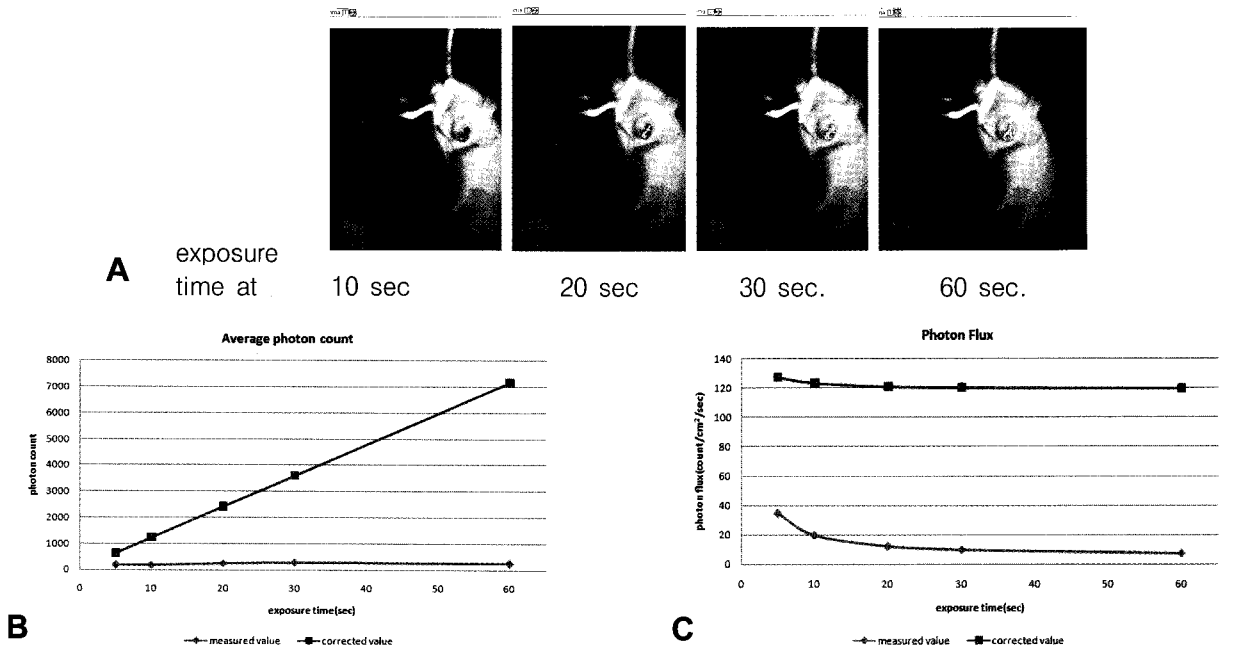


Figure 4. This graph showed modified data acquired from the animal experiment by quantification method. (A) These pictures showed luminescent images of small animal at different exposure time. Minimum scale bar is 200 count, and maximum scale bar is 800 count. (B) This graph showed the measured photon count value and the corrected value after the application of quantification method. Blue line is the measured values and red line is corrected values. (C) This graph is the photon flux of (B). Blue line is photon flux of measured values and red line is photon flux of corrected values.

Table 3. Data Obtained in Animal Experiment and Their Quantification Data

Exposure time(sec)	Before quantification		After quantification	
	Photon count	Photon flux (count/cm^2/t)	Photon count	Photon flux (count/cm^2/t)
5	172.800	34.560	635.716	127.143
10	198.600	19.860	1231.876	123.188
20	248.900	12.445	2420.755	121.038
30	297.800	9.927	3607.398	120.247
60	247.800	7.630	7184.095	119.735
Standard deviation	·	10.898	·	3.026

The photon counts obtained in experiment showed non-linear behavior and the flux was decreased on the exposure time. After applying the quantification method, the photon counts gave linear response and the flux provided improved constant behavior.

리아 실험에서 얻은 결과를 정량화하였으며 정량화 전과 후의 결과를 Fig. 2A에 나타냈다. 식 (2)로부터 일정한 세기의 광원은 렌즈의 노출시간에 비례한 광량을 얻게 됨을 알 수 있는데 개발한 방법을 적용한 이후의 정량화 결과(Table 1), 광량을 노출시간에 상관없이 일정한 값을 얻었다(Fig. 2B).

2. 세기가 다른 세 개의 광원에 대한 실험 결과

다른 팬텀에 제안한 방법을 적용하기 위해 실험한 다른 세기를 갖는 세 광원에 대해서 광량을 측정하였다(Table 2A). 측정결과를 제시한 정량화 방법을 적용하여 정량화 시키고(Fig. 3) 각각의 노출시간에 대해서 나눠준 결과는 일정한 값을 얻었다(Table 2B). 편차가 정량화하기 전보다 크게 줄었으며, cd의 의미에 부합하는 결과를 얻었다.

3. 마우스를 이용한 소동물 측정결과

Fig. 4A에서 보는 것과 같은 발광영상을 얻었으며 각각의 영상에 같은 크기와 같은 위치에 관심영역을 그려서 결과를 얻었다(Table 3). 또한 개발한 정량화 방법을 적용하여 정량화된 값을 얻었으며(Fig. 4B) 각각의 값을 노출시

간으로 나눠준 값(Fig. 4C)의 편차가 정량화 전에는 10.898이었으며, 정량화 후에는 3.026으로 보다 일정한 광량을 얻었다.

고 찰

광학분자영상연구에서 발광효소를 이용한 발광영상은 형광영상보다 신호대 잡음 비율이 높고 세포에서 방출되는 광량이 분자 변화 또는 세포 수에 비례하여 정량적인 분석이 용이하다. 이러한 분석을 위해서 민감도가 높은 냉각형 전자결합소자 카메라를 사용한다. 전자결합소자는 발광하는 빛의 신호를 시간에 비례하여 전기적 신호로 변환하지만 대부분의 하드웨어가 그렇듯이 이상적인 결과를 제공하지는 못하고 있다. 그것은 열적인 잡음과 공간적 잡음, 그리고 빛이 방사되는 입체각에 따른 것으로 같은 광원에 대하여 다른 광량 측정 장비에서의 실험 결과가 서로 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다. 또한 이외에도 여러 가지 많은 잡음 요소들이 있지만 신호에 가장 많은 영향을 미치는 열적 잡음을 극복하기 위하여 냉각형 전자결합소자를 사용한다.

본 연구에서는 전자결합소자의 특성과 기기의 광학적 특징을 반영하여 표준화된 검출신호의 표현방법을 제안하고자 한다. 개발 중인 광학영상기기 ALIS에서는 질소 냉각형 전자결합소자를 사용하고 있으며 발광영상신호의 정량화를 위해 광학적 접근 방법을 통한 정량화방법을 제안하였다.

광학적 요소로서 빛의 세기를 의미하는 candela(cd)와 광속을 뜻하는 flux가 있다. 이 개념을 이용한 정량화 방법은 빛의 세기에 따라 전자결합소자에 인식되는 광량의 변화를 정량적으로 보여주었다. 측정된 신호의 노출시간 1초를 기준으로 놓고 얻어진 신호는 일정한 비율을 가지고 획득되어 물리적, 수학적 방법을 이용하여 표준정량화를 위한 정량화식으로 유도할 수 있었다. 일정한 세기의 빛을 나타내기 위해 cd를 이용하여 신호를 표현했으며 렌즈를 통과하는 빛을 각 픽셀의 광자수로 계산하였다.

발광박테리아 수를 달리한 세 개의 광원을 사용하여 빛의 세기를 측정하고, 노출시간에 대해서 측정된 값들이 만드는 그래프의 기울기 변화율을 구하였다. 얻어진 변화율을 이용하여 표준정량화 식을 유도하였다. 그리고 유도된 식의 검증을 위해 플라스틱 마우스 팬텀, xenogen 사에서 제공한 측정용 광원 중 2개를 선택하여 신호를 획득하였다. 유도되어진 식에 측정된 값과 노출시간을 대입하여 정량화된 값이 얻어짐을 확인하였다.

제안한 방법을 적용한 결과 플라스틱 마우스 팬텀과 발광박테리아에서도 올바르게 보정된 정량화 결과를 도출 할 수 있었다. 소동물 실험에서도 광량이 선형적으로 증가하는 보정된 데이터를 얻을 수 있었다. 정량화된 값은 노출시간에 대해 비례한 값들을 제공하였으며, 노출시간으로 나눈 광속 값은 시간에 관계없는 일정한 값을 제공하였다. 그리고 노출 시간을 10초에서 20초 이상으로 하여 측정한 값들은 10초 이하에서 측정한 값보다 일정하게 보정이 되었다.

본 연구에서는 측정된 발광신호의 정량화 방법을 제안하고 제안한 방법을 통해 세기가 다른 광원에 대해서 정량적인 비교/대조가 가능하며 정량적인 분석이 가능함을 보여주었다. 이와 같은 정량화 기법은 암의 조기진단, 약제 개발과 유전자/세포치료에 대한 연구에 도움을 줄 것으로 기대된다. 또한 제안한 방법을 다른 광학적 분자영상 장비에 적용하여 광량을 얻게 된다면 빛의 세기를 표준화 시킬 수 있을 뿐만 아니라 성격이 다른 각각의 광원에 대해서도 보다 정량적인 분석을 가져다 줄 것이며, 또한 이에 더하여 하드웨어적인 광학요소를 반영하는 계속된 개발을 통해 보다 정밀한 측정결과를 제공할 것으로 생각된다.

이 연구에서는 렌즈의 크기 및 물체와의 거리에 대한 개념을 cd를 이용하여 단위 입체각을 기준으로 평가하려 하였다. 하지만 사방으로 방사되는 광원을 고려하면 단위 sr보다는 4π sr을 적용한 추가적인 연구가 진행될 필요가 있다.

요 약

목적: 광학적 분자 발광영상은 발광효소를 이용하여 발광하는 빛의 신호를 영상화하는 기법이다. 발광하는 광량이 분자 변화 또는 세포 수와 비례하고 신호 대 잡음비가 좋아서 영상을 얻고, 정략분석이 가능하다. 이 연구에서는 정량적 분석을 위해 비례적 측정 정량화기법을 개발하였다. **대상 및 방법**: 개발 중인 ALIS (animal light imaging system) 광학발광영상 카메라에서 박테리아 수를 달리한 박테리아 광원 3가지와 또 다른 3가지 광원을 이용하여 발광영상을 측정하였다. 일정한 세기의 광원에 대해서 측정 방법을 수학적으로 표현하기 위해 cd와 광속의 개념을 이용하여 간단한 수식을 유도하였다. 실험을 통해 측정시간 1초를 기준으로 얻어진 값으로 표준 정량화 함수를 얻었다. 얻어진 정량화 함수를 이용하여 박테리아를 이용한 실험에 필요한 함수의 상수 값을 구했으며, 세 가지 세기가 다른 광원을 이용하여 측정한 값을 측정시간과 함께 정량화 식에 대입하여 측정하였다. **결과**: 표준측정함수를 이용하여 측정시간에 비례하는 정량적 값을 얻을 수 있었다. 정량화결과를 측정시간으로 나눠준 값은 일정하였으며, 측정시간에 대비한 비례적 값을 얻을 수 있었다. **결론**: 측정한 결과를 정량화

함수에 대입하여 정량화시킨 값은 표준정량화 하기에 적합하였다. 이 정량화 방법은 다른 광학적 분자영상 장비에 적용하여도 빛의 세기를 표준화 시킬 수 있을 뿐 만 아니라 성격이 다른 각각의 광원에 대해서도 보다 정량적인 분석을 시행할 수 있으므로, 새로운 표준 정량화 방법으로 발전시킬 수 있을 것으로 기대한다.

References

1. Chung YH, Song TY, Choi Y. Nuclear medicine imaging instrumentations for molecular imaging. ***Korean J Nucl Med*** 2004; 38:131-9.
2. Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging, ***Nat Biotechnol*** 2001;19:316-7.
3. Choi YD. Noninvasive In vivo fluorescence molecular imaging. ***Tissue Eng Regen Med*** 2008;5:204-11.
4. Herschman HR. Molecular imaging: looking at problems, seeing solutions. ***Science*** 2003;302:605-8.
5. Sweeney TJ, Mailander V, Tucker AA, Olomu AB, Zhang W, Cao Y et al. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 1999;96:12044-9.
6. Welsh DK, Kay SA. Bioluminescence imaging in living organisms. ***Curr Opin Biotechnol*** 2005;16:73-8.
7. Shah K, Jacobs A, Breakefield XO, Weissleder R. Molecular imaging of gene therapy for cancer. ***Gene Ther*** 2004;11:1175-87.
8. Doyle TC, Burns SM, Contag CH. In vivo bioluminescence imaging for integrated studies of infection. ***Cell Microbiol*** 2004; 6:303-17.
9. Choy G, Choyke P, Libutti SK. Current advances in molecular imaging: noninvasive in vivo bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research. ***Mol imaging*** 2003;2:303-12.
10. Contag CH, Jenkins D, Contag PR, Negrin RS. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. ***Neoplasia*** 2000;2:41-52.
11. Ye JC, Webb K, Millane R, Bouman C. In vivo optical molecular imaging: principles and signal processing issues. ***ICASSP*** 2005; 849-52
12. Chung JK. General perspectives for molecular nuclear imaging. ***Nucl Med Mol Imaging*** 2004;38:111-4.
13. Contag CH, Spilman SD, Contag PR, Oshiro M, Eames B, Benaron DA et al. Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. ***Photochem Photobiol*** 1997;66: 523-31.
14. Hadjantonakis A-K, Dickinson ME, Fraser SE, Papaioannou VE. Technicolour transgenics: imaging tools for functional genomics in the mouse. ***Nat Rev Gene*** 2003;8:613-25.
15. Greer LF 3rd, Szalay AA. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms : a review. ***Luminescence*** 2002;17:43-74.
16. Blasberg RG. Molecular imaging and cancer. ***Mol Cancer Ther*** 2003;2:335-43.
17. Wilson T, Hastings JW. Bioluminescence. ***Annu Rev Cell Dev Biol*** 1998;14:197-230.
18. Roh JK, Kim DE. Optical imaging in the field of molecular imaging, ***J Korean Med Assoc*** 2004;2:127-32.
19. Dustin ML. In vivo imaging approaches in animal models of rheumatoid arthritis. ***Arthritis Res Ther*** 2003;5:165-71.
20. Contag CH, Bachmann MH. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. ***Annu Rev Biomed Eng*** 2002;4:235-60.
21. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects : seeing fundamental biological processes in a new light. ***Genes Dev*** 2003;17:545-80.
22. Mountz JD, Hsu HC, Wu Q, Liu HG, Zhang HG, Mountz JM. Molecular Imaging: new applications for biochemistry. ***J Cell Biochem*** 2002;Supplement 39:162-71.
23. Hain R, Kähler CJ, Tropea C. Comparison of CCD, CMOS and intensified cameras. ***Exp Fluids*** 2007;42:403-11.
24. Greene NR, Shedding light on the candela. ***The Physics Teacher*** 2003;41:409-14.
25. Kim HS, Choi ES, Lee BI. The quantification of photon counts using the concept of candela. ***J Chosun Nat Sci*** 2008;1:1-4.