

컬러 카메라를 이용한 측면유동 면역 어세이 정량분석 방법

박종원

경일대학교 첨단의료기학과

A Method for Quantitative Measurement of Lateral Flow Immunoassay Using Color Camera

Jongwon Park

Department of High-tech. Medical System, Kyungil University

(Manuscript received 6 December 2013; revised 22 January 2014; accepted 19 February 2014)

Abstract: Among semi-quantitative or fully quantitative lateral flow assay readers, an image sensor-based instrument has been widely used because of its simple setup, cheap sensor price, and compact equipment size. For all previous approaches, monochrome CCD or CMOS cameras were used for lateral flow assay imaging in which the overall intensities of all colors were taken into consideration to estimate the analyte content, although the analyte related color information is only limited to a narrow wavelength range. In the present work, we introduced a color CCD camera as a sensor and a color decomposition method to improve the sensitivity of the quantitative biosensor system which utilizes the lateral flow assay successfully. The proposed setup and image processing method were applied to achieve the quantification of imitatively dispensed particles on the surface of a porous membrane first, and the measurement result was then compared with that using a monochrome CCD. The compensation method was proposed in different illumination conditions. Eventually, the color decomposition method was introduced to the commercially available lateral flow immunochromatographic assay for the diagnosis of myocardial infarction. The measurement sensitivity utilizing the color image sensor is significantly improved since the slopes of the linear curve fit are enhanced from 0.0026 to 0.0040 and from 0.0802 to 0.1141 for myoglobin and creatine kinase (CK)-MB detection, respectively.

Key words: Photometric detection, Color camera, Charge-coupled device, Lateral flow immunoassay, Quantitative reader, Bayer filter

1. 서 론

측면유동 면역 크로마토그래피(lateral flow immunochromatography)라고도 불리는 측면유동 면역 어세이(lateral flow immunoassay)는 1956년 기본적인 구조와 기능이 제시된 이후로 인간, 동물 등을 대상으로 하는 다양한 의학적 진단, 혹은 비의학적 측정의 목적으로 사용되어 왔다[1-2].

Corresponding Author : Jongwon Park
Department of High-tech. Medical System, Kyungil University, Gyeongsan, Gyeongsangbuk-do 712-701, Korea
TEL: +82-53-600-5721, +82-10-7138-2895,
FAX: +82-53-600-5739, E-mail: jpark3@kiu.ac.kr
이 연구는 경일대학교 교내학술연구(신임교원연구)과제의 지원을 받아 수행하였음.

측면유동 면역 어세이를 이용한 시험을 위해 액체 샘플은 샘플 패드(sample pad)를 통해 주입되며 샘플의 필터링(filtering) 등을 위한 기능성 패드들을 거쳐 컨주게이트 패드(conjugate pad)로 유입된다. 컨주게이트 패드에는 미리 준비된 항체와 레이블링 입자(labeling particle)가 결합되어 분포되어 있고 항체는 액체 샘플 내의 측정 목표물질인 항원과 1차 결합하게 된다. 액체 샘플의 항원-항체-레이블링 입자 결합체는 모세관 현상에 의하여 다공성 멤브레인(porous membrane)을 통과하고 다공성 멤브레인의 일정 영역에 미리 뿌려진 항체가 2차로 항원과 결합하여 시험라인(test line)을 형성하게 된다[3]. 다공성 멤브레인의 항원-항체 결합영역을 지난 샘플은 흡수패드(adsorbent pad)로 유입된다. 시험라인은 사용되는 레이블링 입자의 종류에 따라 일

정한 색(color)을 띄거나, 형광(fluorescence)을 내거나[2], 자속(magnetic flux)를 형성[4]하기도 한다. 이러한 레이블링 입자로 인한 물리/화학적 변화량을 통해 항체와 결합한 측정목표물질(항원)의 유무, 혹은 그 농도를 측정할 수 있다. 인간의 눈으로 시험라인의 유무를 판단하여 질병을 진단하는 정성적 측정(qualitative measurement)은 그렇지 않지만 정량적 측정(quantitative measurement)의 경우, 측정목표물질의 농도를 전기/전자적 신호로 변환시키는 리더(reader)가 필요하다.

측면유동 면역 어세이 시스템은 많은 관련 연구들이 진행되었고 이에 따른 상품들이 출시되어 있지만 상당수의 응용분야에서 감도(sensitivity) 저하가 문제되고 있다[5-6]. 어세이 시스템의 감도저하는 주로 어세이의 항원-항체반응과 이를 정량화하는 리더의 낮은 효율에 원인이 있다. 하지만 이러한 단점을 극복하기 위한 지금까지의 노력은 효율적인 항원-항체반응을 위한 바이오마커(biomarker)의 발굴 및 각종 패드, 멤브레인의 재료적인 기능개선 등의 어세이 측면에만 치중되었으며 리더의 성능개선은 거의 이루어지지 않았다[7-9]. 그 이유는 측면유동 면역 어세이 시스템의 개발 및 상용화가 어세이 개발자에 의해 주도되어 왔으며 그들의 주된 관심사, 혹은 전공분야 밖에 있는 전기/전자 리더는 관례적으로 기존의 주문자위탁생산(original equipment manufacturing, OEM)방식으로 이들에게 공급되었기 때문이라고 볼 수 있다[10]. 하지만 측면유동 면역 어세이를 이용한 신속, 정확한 현장진단(point-of-care)시스템의 구현은 관련된 리더의 최적화와 병행되어야만 한다는 점은 자명하다.

본 연구는 측면유동 면역 어세이 정량분석장치의 성능 향상을 위한 것으로서 그 동안 관련 분석장치에서 사용되지 않던 컬러 카메라를 이용하였으며 얻어지는 컬러 이미지를 각 요소(적색(red, R), 녹색(green, G), 청색(blue, B))로 분리하고, 이 중 시험라인의 신호정보 대역을 포함하고 있지만 잡음과 대역은 포함하고 있지 않은 요소만을 이용하여 정량 분석함에 관한 것이다[11]. 대부분의 컬러 이미지 센서는 센서로 빛을 받아들여 이를 전기신호로 변환함에 앞서 이미 베이어 필터(Bayer filter)를 장착하고 있고 필터를 통과한 개별 색 요소가 별도로 저장, 이용가능하기 때문에 감도 향상을 위해 대역필터(band-pass filter) 추가 및 이를 위한 복잡한 이미지 처리과정이 필요치 않다. 베이어 필터는 포토 센서(photosensor)의 사각형 그리드(grid) 전단에 위치한 컬러 필터 어레이(array)로서 50%의 녹색, 25%의 적색, 25%의 청색 대역을 갖는 필터의 조합을 말한다[12]. 이와 같은 베이어 필터와 포토센서의 조합은 컬러 디지털 카메라에서 흔히 사용되는 구조이다. 컬러 카메라는 광학적 이미징(optical imaging)이나 기능적 이미징(functional imaging) 등에 널리 사용되는 장비[13-14]이나 측면유동 면역 진단장

치를 포함한 과학적 정량분석의 경우는 그 사용의 예를 찾아보기가 힘들다. 그 이유는 컬러 카메라에서 베이어 필터의 녹색 필터가 다른 색상보다 2배 많은 것처럼 기본적으로 사람의 눈이 색상 정보를 받아들이는 것을 모사하도록 만들어져 녹색 영역의 파장대역을 인위적으로 강조시키기 때문이다. 하나의 파장대역이 강조되어 다른 대역들과 조합 시, 자연현상을 왜곡(distortion)시킨다는 말인데 본 연구에 사용된 방법처럼 한 파장대역만을 사용한다면 이러한 문제를 피할 수 있다.

레이블링 입자를 다공성 멤브레인에 뿌려 제작된 측면유동 면역 어세이 모사(simulation)장치를 사용하여 고안된 정량분석방법을 사전 검증하였으며 급성심근경색(acute myocardial infarction, AMI)진단을 위한 상용화된 측면유동 면역 어세이를 이용하여 제안된 리더의 성능을 최종 검증하였다. 각 검증단계에 있어 컬러 이미지 센서를 이용한 정량 분석 결과를 기존의 단색 이미지 센서를 이용한 방법과 비교함으로써 성능의 향상 정도를 비교 평가하였다.

II. 재료 및 방법

그림 1은 고안된 정량 측면유동 면역 어세이 리더를 보여주고 있다. 일반 용도의 판넬 컴퓨터(panel computer, CUPC-P70, Comfile Technology Inc., Seoul, Korea)와 관련 소프트웨어가 측정의 제어를 위해 사용되었다. 전원공급장치(power circuit board, LVS-PN-2312, Cylod Inc., Daejeon, Korea)를 통해 백색 LED(light emitting diode) 조명장치와 CCD(charge-coupled device) 카메라, 판넬 컴퓨터에 전원을 공급하였다. 앞서 서술한 바와 같은 각 검증 단계에서 컬러 CCD를 이용한 정량분석결과를 기존의 단색 CCD의 결과와 비교하기 위하여 같은 리더에 컬러(CMLN-13S2C-CS, Sony ICX445AQ CCD installed, Point Grey Research, Richmond, BC, Canada), 단색(CMLN-13S2M-CS, Sony ICX445AL CCD installed, Point Grey Research, Richmond, BC, Canada) CCD를 번갈아 장착

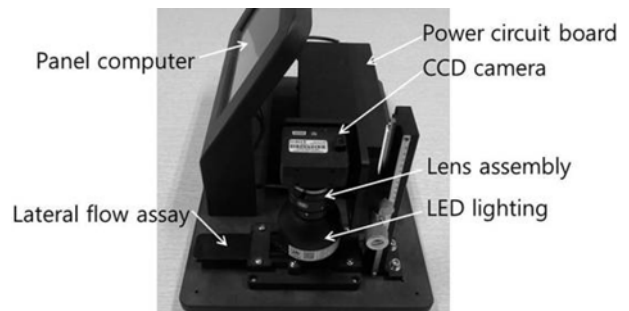


그림 1. 정량 측면유동 면역 어세이 리더.
Fig. 1. Quantitative lateral flow immunoassay reader.

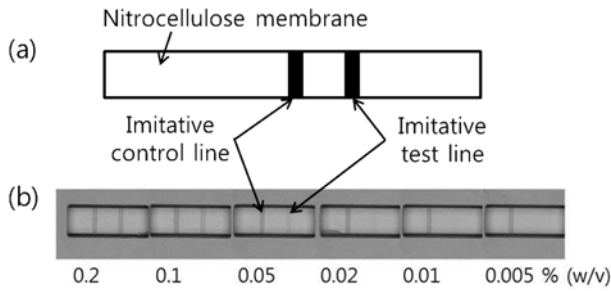


그림 2. 측면유동 면역 어세이 모사장치의 형태(a)와 농도 별 시험라인과 컨트롤라인의 이미지(b).
 Fig. 2. Layout of imitative lateral flow immunoassay (a) and images of test and control lines at different particle concentrations (b).

하여 측정하였다. 시험라인의 영상을 획득함에 있어 적절한 배율과 초점 조절을 위해 렌즈(M1214-MP2, 12 mm focal length, Computar, Tokyo, Japan) 조립체(lens assembly)를 사용하였다.

그림 2는 본 연구에서 사용된 측면유동 면역 어세이 모사장치를 보여주고 있다. 그림 2의 (a)와 같이 다공성 나이트로셀룰로우스 멤브레인(porous nitrocellulose membrane, HF13504S00, Millipore, Billerica, MA, USA)에 도포장치(dispensing module, Matrix 1600, Kinematic Automation, Sonora, CA, USA)를 이용하여 폭이 1 mm, 도포속도는 12 cm/sec, 유량은 1 ul/cm가 되도록 색을 띄고 있는 입자(particle, 0212, Carboxyl-Adembeads, Ademtech, Pessac, France) 용액을 뿌려준 후, 24시간 동안 건조시켰다. 이는 측면유동 면역 어세이의 시험라인 형성을 실제 환경을 포함한 샘플의 사용 없이 손쉽게 모사하기 위해 제작된 것이며 본 연구에서 제안된 정량분석 리더 및 분석방법을 사전 검증하기 위해 사용되었다. 그림 2의 (b)와 같이 뿌려지는 입자의 농도는 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, and 0.2% (w/v)이며 입자용액의 농도가 낮아짐에 따라 각 농도 별 영상의 우측에 위치한 시험라인이 열어지고 있다. 통상적인 측면유동 면역 어세이는 시험라인 이외에도 컨트롤라인(control line)을 형성하는데 이는 샘플의 흐름이 시험에 적합하도록 완결되었는지를 확인(go or no go)하는 목적으로 사용되며 본 연구에서는 그림 2(b)에서 각 영상의 좌측에 보이는 바와 같이 동일한 입자농도로 제조되었으나 제작 완료된 모사장치를 이용한 이미지 분석은 시험라인만을 가지고 수행되었다.

그림 3(a)는 본 연구에서 제안된 방법을 최종 검증하기 위해 사용된 급성심근경색 진단용 어세이를 보여주고 있다. 이는 상용화된 어세이로서 전혈(whole blood) 샘플에서 심근경색과 관련된 myoglobin과 CK-MB(creatinine kinase (CK)-MB)를 정량 측정하기 위한 것이다[15-17]. 본 연구를 위

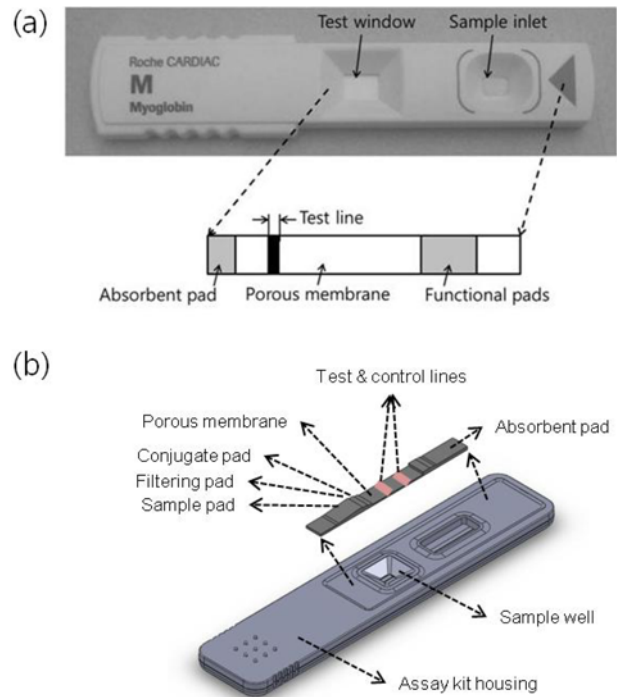


그림 3. 급성심근경색 진단을 위한 측면유동 면역 어세이(myoglobin 어세이만 보여주고 있음). (a)와 본 연구를 위해 제작된 리더에 맞게 제작된 하우징(b).
 Fig. 3. Lateral flow immunoassay for a diagnosis of acute myocardial infarction (Only the assay for myoglobin measurement is shown).

해 전혈 샘플은 가용하지 않았으므로 혈청제(serum, 22000, SeraCare Life Sciences Inc., Milford, MA, USA)에 myoglobin(8M50, HyTest Ltd., Turku, Finland)과 CK-MB(1-028, Biospecifics, Lynbrook, NY, USA)를 각각 53/107/214 ng/ml, 4/8/16 ng/ml가 되도록 제조하였다. 이와 같은 농도는 임상적인 양성(positive), 음성(negative) 판정의 기준을 반영한 것으로 심근경색과 관련하여 음성이 혈액의 myoglobin과 CK의 농도는 각각 6~85 ng/ml, 38~174 ng/ml이다. 음성이 경우, 혈액 내 CK-MB의 농도는 CK농도의 5%보다 낮은 것으로 보고되었다[18-19]. 제조된 샘플 용액은 어세이의 샘플 주입구(sample inlet)를 통해 주입되었으며 완전한 항원-항체반응을 위해 어세이 사용 설명서에 명기된 바와 같이 15분 대기 후, 원래의 하우징(housing)에서 분리하여 그림 3(b)와 같이 본 연구를 위해 제작된 리더에 맞게 설계, 제작된 하우징에 조립되어 정량분석을 수행하였다.

단색 영상의 분석 및 이를 통한 레이블링 입자의 정량화를 위해서 획득된 이미지에서 시험라인을 포함한 관심영역(region of interest, ROI)을 지정, 해당 영역의 영상을 저장한 후, 이의 각 픽셀 강도(단색의 경우, 명암 강도)를 구하고 이의 평균값을 취했다. 반면에 컬러 영상의 분석은 획득

된 이미지를 C++ 소프트웨어로 직접 코딩(coding)한 프로그램을 사용하여 각 색상요소로 분리(R, G, B color channel separation)한 후, 분리된 각 색상 요소의 이미지를 대상으로 앞서 설명한 단색 영상의 분석법을 똑같이 적용하였다.

정량분석의 감도에 영향을 줄 수 있는 또 다른 요소로서, 조명전원의 변화, LED의 효율저하 등 조명의 불균일로 인한 분석결과의 불안정성을 고려하였다. 즉 같은 농도의 샘플이라 하더라도 조명의 밝고 어두운 정도에 따라 시험라인의 픽셀 강도는 변화한다. 이를 보정해 주기 위해 본 연구에서는 다공성 멤브레인 배경의 픽셀 강도 평균값(I(b))과 시험라인의 픽셀 강도 평균값(I(t))의 비율(I(b)/I(t))을 계산하여 이를 측정목표물질의 농도로 변환하는 방식을 사용하였다. 이러한 비율 측정은 예를 들어 조명이 어두워질 경우, 픽셀 강도의 저하 정도가 배경과 시험라인에 동일한 정도로 반영되므로 비율 계산 시 서로 상쇄될 수 있어 이를 효과적으로 보정해 줄 수 있다.

III. 결 과

그림 4는 앞서 서술한 측면유동 면역 어세이 모사장치의 두 가지 입자농도에서의 예제 영상(그림 4(a))과 해당 관심 영역의 픽셀 강도(그림 4(b))를 도시하고 있다. 측정목표물질(항원)의 농도가 높으면 레이블링 입자의 농도도 높고 이로 인해 더욱 어두운 단색이 발현된다. 이는 픽셀 강도의 관점에서 볼 때, 낮은 수치로 표현된다. 본 연구에서 사용된 카메라의 경우, 픽셀 강도가 8-비트로 표현되므로 0~255사이의 범위를 가지며 수치가 높을수록 밝은 픽셀이 된다. 따라서 측정목표물질의 농도가 높은 경우, 상대적으로 낮은 값

4

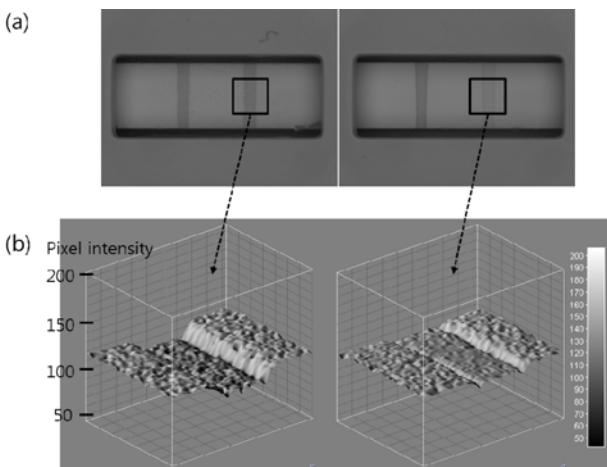


그림 4. 서로 다른 두 입자 농도를 가진 측면유동 면역 어세이 모사 장치의 예제 이미지(a)와 ROI의 3-D 픽셀 강도 그래프(b).

Fig. 4. Exemplary images of imitative lateral flow immunoassay at two different particle concentrations (a) and their 3-D pixel intensity profiles of ROI (b).

의 픽셀 강도 평균값을 얻게 된다.

그림 5는 어세이 모사장치의 시험 라인을 가로지르는 가상의 선(흰색 점선)을 설정하고 이 선을 따라 배열된 픽셀의 강도를 도시(line intensity profile)한 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 컬러 이미지를 이용한 경우, 베이어 필터의 청색(B, 약 400~500 nm) 통과 대역의 이미지가 응집된 레이블링 입자의 농도변화에 가장 민감하였다. 그림 6은 그림

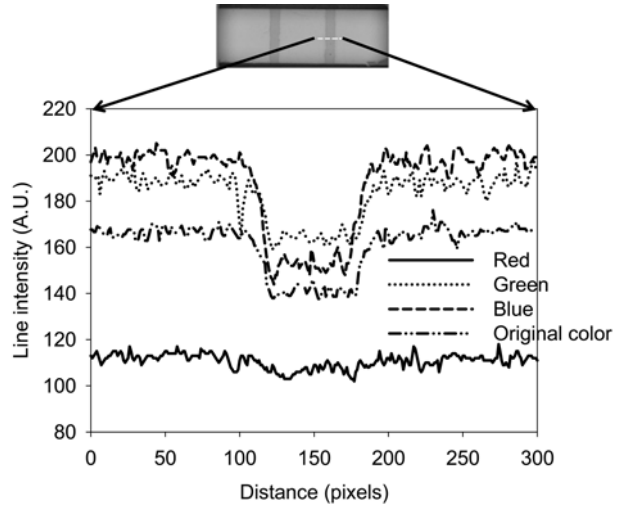


그림 5. 측면유동 면역 어세이 모사장치의 원본 컬러, 적색 분리, 녹색 분리, 청색 분리 이미지들의 픽셀 강도 프로파일 비교.

Fig. 5. Intensity profiles and their comparison of original color, red-, green-, and blue-separated images of the imitative lateral flow assay.

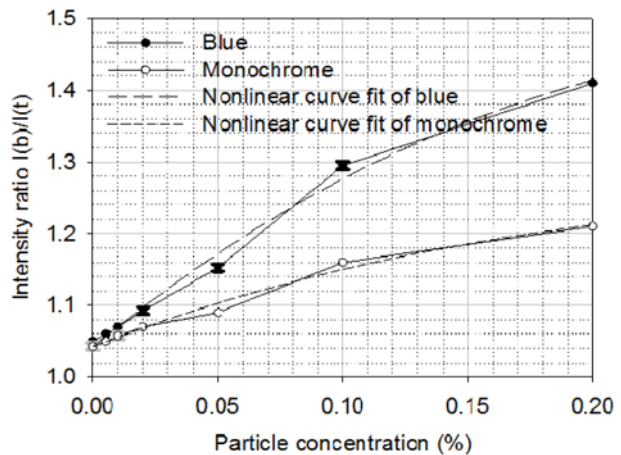


그림 6. 측면유동 면역 어세이 모사장치의 청색, 단색 이미지들을 이용한 픽셀 강도 응답곡선 (7번 측정의 평균치를 보여주고 있으며 에러 바(error bar)는 표준편차를 나타낸다. 에러 바가 없는 경우는 표준편차가 심벌보다 작음을 의미함).

Fig. 6. Pixel intensity response curves by the analysis using the blue and monochromic imitative lateral flow immunoassay images (The figures show the average value of the seven measurements and the error bar indicates the standard deviation. No error bar means SD is smaller than symbol).

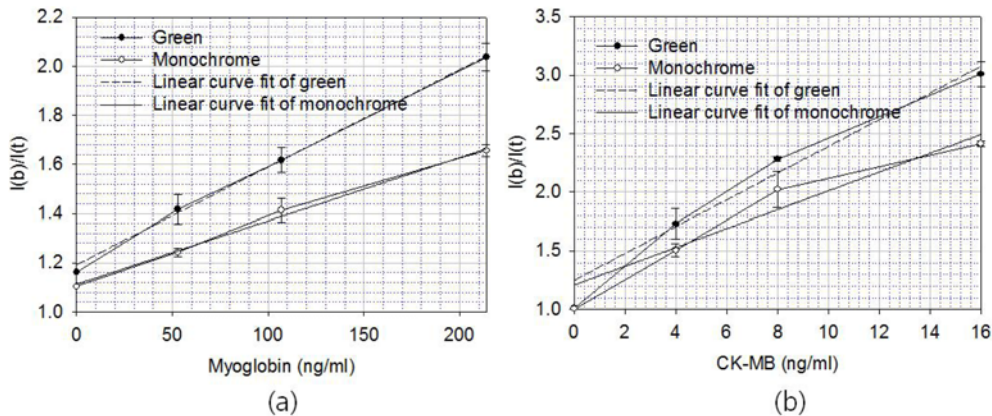


그림 7. Myoglobin(a) 과 CK-MB(b) 측정을 위한 심근경색 진단용 측면유동 면역 어세이의 녹색, 단색 이미지들을 이용한 픽셀 강도 응답 곡선 (3번 측정의 평균치를 보여주고 있으며 에러 바(error bar)는 표준편차를 나타낸다).

Fig. 7. Pixel intensity response curves by the analysis using the green and monochromic images of AMI lateral flow immunoassay for myoglobin (a) and CK-MB(b) detection (The figures show the average value of the three measurements and the error bar indicates the standard deviation).

1의 정량분석 리더와 그림 2의 측면유동 면역 어세이 모사 장치를 사용하여 단색 이미지와 컬러 이미지(이 중에서 입자의 농도변화에 가장 민감한 청색 분리 이미지)를 획득하고 각각 분석한 결과를 보여주고 있다. 또한 앞서 설명한 맵브레인의 배경과 시험라인에 대한 평균 픽셀 강도의 비율을 계산하는 방법을 적용하였다.

다음으로 그림 7은 그림 1의 정량분석 리더와 그림 3의 상용화된 심근경색진단용 측면유동 면역 어세이를 사용하여 단색 이미지와 컬러 이미지를 획득하여 각각 분석한 결과를 보여주고 있다. 이 경우, 베이어 필터의 녹색 통과 대역(500~600 nm)의 영상이 측정목표물질인 myoglobin(그림 7(a))과 CK-MB(그림 7(b))에 가장 민감하게 반응했으며 컬러 이미지 분석방법의 경우, 해당 색상 요소만 그림 7에 도시하였다.

IV. 토 의

정량 측면유동 면역 어세이 리더는 앞서 언급한 어세이에 사용되는 레이블링 입자의 종류에 따라 다음의 3가지 형태로 분류될 수 있다. 색상의 강도 변화(color intensity change)를 가져오는 입자를 사용하는 경우에는 이를 CCD, CMOS(complementary metal oxide semiconductor) 카메라로 정량화하는 형식, 형광입자를 사용하는 경우에는 여기광원(excitation light source)을 두고 형광입자의 발광(emission light)을 광검출기(photodetector) 등을 사용해 정량화하는 방법, 마지막으로 자성입자(magnetic particle)를 사용하는 경우에는 외부자기장 공급으로 인한 입자로부터의 자속의 변화율을 거대자기저항센서(giant magnetoresistive sensor)등을 이용하여 정량화하는 방법이 있다[10]. 이 중

에서 CCD, CMOS와 같은 이미지 센서를 이용한 리더는 그 구조가 간단하고 소형화가 가능하며 움직이는 기계적인 요소가 필요치 않아 가장 많이 사용되고 있다. 이는 항원-항체반응으로 생기는 레이블링 입자의 응집체인 시험라인의 이미지를 센서로 획득하고 시험라인 부분의 픽셀 강도(pixel intensity)를 분석하여 측정목표물질의 농도로 환산하는 방식이다. 하지만 이와 같은 방식은 다공성 맵브레인의 배경색이 일정치 않은 점, 조명의 불균일, 액체 샘플(혈액)의 색상 간섭 등으로 인한 잡음 신호가 획득한 이미지에 포함되어 그 정량분석의 감도가 떨어지게 된다. 지금까지 개발된 이미지 센서를 이용하는 정량 측면유동 면역 어세이 리더는 시험라인과 관련된 신호정보는 한정된 파장대역에 존재하여 특정한 색상을 가짐에도 불구하고 광대역의 통과 파장대역을 가진 단색(monochrome) 이미지 센서를 사용하고 있다.

그림 6에서 보는 바와 같이 0.1% (w/v)의 농도를 가진 측면유동 면역 어세이 모사장치에서 1.3의 비율 측정치를 얻었다. 하지만 단색 CCD의 경우, 이는 1.16에 불과했다. 이론적인 비율 측정치는 1이므로 이는 188%의 감도향상으로 볼 수 있다($100 \times (1.3 - 1) / (1.16 - 1)$). 또한 공변량분석(ANCOVA)을 이용한 실험치의 통계분석에 따르면, 픽셀강도 측정에 있어서의 청색 채널 분석법은 유의미한 영향을 주고 있음을 알 수 있었다($F(1, 53) = 37.131, p < .001$). 단색 CCD를 사용했을 때의 정량분석 감도저하는 레이블링 입자들의 색 정보는 400~500 nm의 파장대역에 분포함에도 불구하고 CCD의 응답영역이 400~700 nm의 광대역이므로 다공성 맵브레인의 배경 색상, 액체 샘플의 색상, 주변 광 등의 잡음신호가 이미지에 유입되어 발생한다. 그림 6에서 보는 바와 같이 감도의 증가 정도는 입자의 농도가 높을수록 향상되었다. 파장, 혹은 주파수 도메인(domain)에서의 광신호

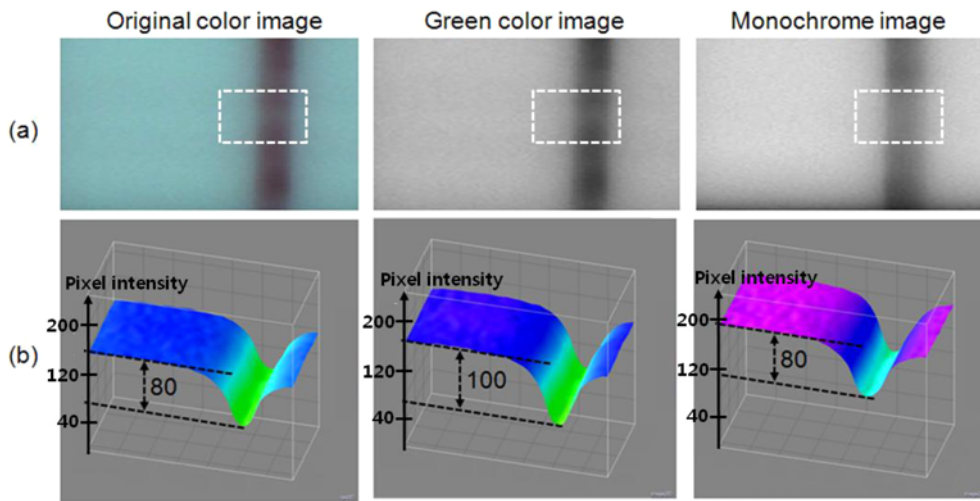


그림 8. Myoglobin 214 ng/ml 농도의 샘플을 사용한 심근경색진단용 측면유동 면역 어세이의 원본 컬러, 녹색분리, 단색 이미지들(a)과 각각의 픽셀강도 그래프(b).

Fig. 8. Original color, green-separated, and monochromatic images of AMI lateral flow immunoassay for myoglobin 214 mg/dl (a) and their intensity surface plots.

분석을 통해 정량분석의 효율을 좋게 하려면 분광계(optical spectrometer) 등을 이용하여 단일 파장에서의 측정을 하면 되겠지만 이는 관련 정량분석 리더의 고가화, 대형화를 유도할 것이며 본래 측면유동 면역 어세이 시스템이 갖는 주요 목적인 현장진단(point-of-care), 신속측정(rapid detection)의 목적에 부합하지 않을 것이다. 따라서 본 연구에서 제안된 컬러 카메라와 이의 베이어 필터링된 이미지의 이용은 최소한의 관련 기구와 분석 프로세스(process)를 이용하여 기존의 방법에서 효과적으로 감도저하의 문제를 해결하고 있음을 알 수 있다.

정량분석에 있어서의 단위 측정목표물질 당 센서출력(response per unit analyte)과 정성분석에 있어서의 검출한계(limit of detection, LOD)는 면역 어세이 시스템의 감도를 평가하는 가장 중요한 요소들이다. 따라서 센서 응답곡선에서 그 기울기는 정량적인 측면유동 면역 어세이 시스템의 감도향상을 결정하는 인자이다. 그림 7(a)에서 myoglobin 농도에 따른 응답의 선형근사화 식은 $y = 0.0040x + 1.1915$ 이다. 반면에 단색 카메라를 사용한 경우에는 $y = 0.0026x + 1.1126$ 이다. 따라서 선형근사화의 기울기가 0.0026에서 0.0040으로 향상되었음을 알 수 있다. 또한 공변량분석에 따르면, 픽셀강도 측정에 있어 사용된 녹색 채널 분석법은 유의미한 영향을 주고 있음을 알 수 있었다($F(1, 21) = 46.683, p < .001$). 같은 분석을 그림 7(b)의 CK-MB 응답곡선에 적용했을 때, 0.0802에서 0.1141로 기울기가 개선되었으며 역시 픽셀강도 측정에 있어 사용된 녹색 채널 분석법은 공변량분석에 의해 유의미한 영향을 주고 있음을 알 수 있었다($F(1, 21) = 12.369, p = .002$). 응답곡선에서 myoglobin 214 ng/ml, CK-MB 16 ng/ml의 결과를 보면 단색대비 컬러 이

미지 분석방법에서 각각 157.6%, 142.9% 센서 출력 향상을 보였다. 그림 8(a)는 myoglobin 214 ng/ml 농도의 샘플을 사용한 어세이의 원본 컬러, 녹색 채널(녹색 채널 이미지를 그레이 스케일 이미지로 변환), 단색 이미지들을 보여주고 있으며, 그림 8(b)는 이들의 시험 라인 부분(흰색 점선의 사각형)의 픽셀 강도에 대한 그래프를 보여주고 있다. 그림에서 보는 바와 같이, 녹색 채널 이미지에서 레이블링 입자의 농도에 따른 픽셀 강도의 변화량이 가장 큰 것을 알 수 있다.

베이어 필터를 적용한 컬러 이미지 센서의 경우에는 4개의 개별 픽셀이 통상적으로 각각 적색 1개, 녹색 2개, 청색 1개의 필터가 적용되어 한 지점의 색상을 표현하므로 4개의 인접한 픽셀이 서로 독립적인 같은 사양의 단색 이미지 센서와 비교하여 해상도 측면에서 성능이 저하된다고 볼 수 있으나 이러한 차이가 오히려 응답곡선의 기울기 증가에 기여했다고 보기는 어렵다. 본 연구에서 보인 감도 증가의 정도는 레이블링 입자의 최적화된 선택에 따라 더 개선될 수 있을 것으로 기대된다. 그 좋은 예는 적색, 녹색, 청색의 레이텍스(latex) 입자라고 볼 수 있으며 그 이유는 이들이 베이어 필터를 통과한 각 대역의 이미지의 최대 감도에 해당하는 색상이기 때문이다.

측면유동 면역 어세이를 이용한 체외진단기기의 상용화를 위해서는 관련 법령 등이 규제하는 바와 같이 임상시험을 통한 진단기기 시스템의 통계적 분석 및 평가가 필요하다. 본 연구는 기존에 사용되는 단색 이미지 센서 기반의 정량 분석 리더의 기술적 개선을 통해 전체 시스템의 성능향상을 위한 것이고 이를 상용화된 심근경색 진단 어세이에 적용하여 성능향상의 예를 보이고 있지만 향후 이를 이용한 상용화를 위해서는 심화된 통계적 분석이 선행되어야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 정량 측면유동면역어세이 시스템의 성능향상을 위하여 컬러 카메라의 베이어 필터링된 이미지를 사용하였다. 특정 컬러 요소의 이미지를 사용하였을 경우, 기존의 단색 카메라를 사용한 방법보다 향상된 응답곡선의 기울기를 얻었고 이는 정량분석 시스템의 감도를 향상시켜 이를 이용한 면역진단기기의 성능 문제를 개선 할 수 있음을 보였다. 향후 본 기술은 전혈 샘플을 이용함에 있어 적혈구 분리 없이 측면유동분석을 하는 분야에 응용되어 적색의 혈액 색상을 효과적으로 분리하고 전혈과는 다른 색상의 레이블링 입자를 정량화하여 전체 어세이 단가의 절감에 응용될 수 있을 것이며 형광 레이블링 입자를 사용하는 분야에 있어 입자의 발광을 여기광원으로부터 효율적으로 분리할 수 있어 이를 이용한 정량분석 성능의 향상에도 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

Reference

- [1] Plotz CM and Singer JM, "The latex fixation test. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis," *Am J Med*, vol. 21, no. 6, pp. 888-892, 1956.
- [2] Posthuma-Trumpie GA, Korf J and van Amerongen A, "Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey," *Anal Bioanal Chem*, vol. 393, no. 2, pp. 569-582, 2009.
- [3] Wong R and Tse H, *Lateral Flow Immunoassay*, New York, USA: Humana Press, 2010, pp. 3-5.
- [4] K. Taton, D. Johnson, P. Guire, E. Lange, and M. Tondra, "Lateral flow immunoassay using magnetoresistive sensor," *J Magn Mater*, vol. 321, no. 10, pp. 1679-1682, 2009.
- [5] <http://www.ivdtechnology.com/article/highly-sensitive>
- [6] <http://www.ivdtechnology.com/article/developing-highly-sensitive-more-reproducible>
- [7] Li Z, Wang Y, Wang J, Tang Z, Pounds JG and Lin Y, "Rapid and sensitive detection of protein biomarker using a portable fluorescence biosensor based on quantum dots and a lateral flow test strip," *Anal Chem*, vol. 82, no. 16, pp. 7008-7014, 2010.
- [8] Tang D, Saucedo JC, Lin Z, Ott S, Basova E, Goryacheva I, Biselli S, Lin J, Niessner R and Knopp D, "Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B2 in food," *Biosens Bioelectron*, vol. 25, no. 2, pp. 514-518, 2009.
- [9] Xu Q, Xu H, Gu H, Li J, Wang Y and Wei M, "Development of lateral flow immunoassay system based on superparamagnetic nanobeads as labels for rapid quantitative detection of cardiac troponin I," *Mat Sci Eng C-Bio S*, vol. 29, no. 3, pp. 702-707, 2009.
- [10] Wong R and Tse H, *Lateral Flow Immunoassay*, New York, USA: Humana Press, 2010, pp. 23-25.
- [11] Park J, "Diagnosis apparatus and method used in-vitro diagnostics," Rep. of Korea Patent 1011579990000, issued October 27, 2010.
- [12] Bayer BE, "Color imaging array," U.S. Patent 3,971,065, issued July 20, 1976.
- [13] Seo D, Lee M, Seo B and Park J, "Optimal illumination for maximizing the RGB distance between objects with different spectra," *J Biomed Eng Res*, vol. 30, no. 3, pp. 263-269, 2009.
- [14] Han B and Jung B, "Digital color imaging systems for quantitative evaluation of skin lesions," *J Biomed Eng Res*, vol. 28, no. 2, pp. 195-198, 2007.
- [15] Plebani M and Zaninotto M, "Cardiac markers: present and future," *Int J Clin Lab Res*, vol. 29, no. 2, pp. 56-63, 1999.
- [16] Montague C and Kircher T, "Myoglobin in the early evaluation of acute chest pain," *Am J Clin Pathol*, vol. 104, no. 4, pp. 472-476, 1995.
- [17] <http://www.roche.com/products/product-list.htm?type=diagnostics&id=3>
- [18] Stone MJ, Waterman MR, Harimoto D, Murray G, Willson N, Platt MR, Blomqvist G and Willerson JT, "Serum myoglobin level as diagnostic test in patients with acute myocardial infarction," *Br Heart J*, vol. 39, no. 4, pp. 375-380, 1977.
- [19] Bessman SP and Carpenter CL, "The creatine-creatine phosphate energy shuttle," *Ann. Rev Biochem*, vol. 54, pp. 831-862, 1985.