

## 근적외선 형광 이미징 영상 구현을 위한 다채널 필터 모듈 특성분석 연구

최진수<sup>1</sup> · 조상욱<sup>2</sup> · 김두인<sup>3</sup> · 이학근<sup>4</sup> · 최학수<sup>1,5</sup> · 정명영<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 광메카트로닉스공학과

<sup>2</sup>부산대학교 인지메카트로닉스공학과

<sup>3</sup>부산대학교 BK21+나노융합인지메카트로닉스공학 사업단

<sup>4</sup>나우비전 기술연구소

<sup>5</sup>Harvard Medical School

### A Study on Characteristics Analysis of Multichannel Filter Module for Near-infrared Fluorescence Imaging

Jinsoo Choi<sup>1</sup>, Sang Uk Cho<sup>2</sup>, Doo-In Kim<sup>3</sup>, Hak-Guen Lee<sup>4</sup>, Hak Soo Choi<sup>1,5</sup> and Myung Yung Jeong<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Opto-Mechatronics Engineering, Pusan National University, Geumjeong-gu, Busan 609-735, Korea

<sup>2</sup>Department of Cogno-Mechatronics Engineering, Pusan National University, Geumjeong-gu, Busan 609-735, Korea

<sup>3</sup>BK21+Nano-integrated Cognomechatronics Engineering, Pusan National University, Geumjeong-gu, Busan 609-735, Korea

<sup>4</sup>Nawoo Vision Corporation R&D Gropu, Miryang-si, Gyeongsangnam-do, 50463, Korea

<sup>5</sup>Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, MA 02215, USA

(Received March 16, 2016: Corrected March 24, 2016: Accepted March 29, 2016)

**초 록:** 본 연구에서는 생체 영상 이미징을 위한 다채널 필터 모듈 개발 및 특성 평가 연구를 수행하였다. 필터 모듈은 700 nm 및 800 nm 파장대의 근적외선 형광 이미징을 동시에 구현할 수 있도록 제작되었으며, 모듈의 특성 평가를 위해 magnification, exposure, gain의 변수에 따른 signal to back ground ratio (SBR)을 통한 대조영상 평가를 진행하였다. 또한 생체 영상 분석을 위해 신장 및 간의 광학적 특성이 동일한 생체 모사 조직인 phantom을 제작하여 두께에 따른 필터 모듈의 특성 및 광원의 주입량에 따른 특성 연구를 진행하였다. 제작된 필터 모듈은 magnification, exposure, gain의 변화에도 4이상의 SBR 차이를 보이며, kidney phantom 및 liver phantom의 경우 각각 50 mA, 60 mA의 광원 주입량에서 4이상의 SBR 대조 영상을 확인하였다.

**Abstract:** In this study, development of multichannel filter module and characteristic evaluation for bio imaging were studied. The filter module was fabricated in order to realize near infrared fluorescence imaging of 700 nm and 800 nm wavelength ranges, and contrast imaging analysis for characteristic evaluation of the filter module was studied through signal to back ground ratio (SBR), controlled by parameters such as magnification, exposure, gain. Furthermore, phantoms, which are biomimetic tissue with equal optical properties of kidney and liver, were fabricated to study characteristics of both filter module depending on thickness and exposure amount of light source for bio imaging analysis. The fabricated filter module has more than 4 of SBR difference despite changes of magnification, exposure, gain, and in the case of the kidney phantom and the liver phantom, contrast imaging of more than 4 of SBR was confirmed on 50 mA, 60 mA exposure amount of light source respectively.

**Keywords:** Medical image, Fluorescence filter system, Near-infrared fluorescence microscope, Phantom imaging

## 1. 서 론

최근 의료영상(medical image) 기술의 진보와 발전으로 인해 생체영상을 획득하는 다양한 기법연구들이 진행되

고 있다. 대표적인 의료영상 기법은 computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET), single photon emission computed tomography (SPECT) 등이 사용되고 있다.<sup>1,2)</sup> 하지만 기존의 의

<sup>†</sup>Corresponding author

E-mail: myjeong@pusan.ac.kr

© 2016, The Korean Microelectronics and Packaging Society

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

료영상 시스템인 CT는 빛의 에너지가 매우 강한 방사선에 노출되고, MRI는 강한 자기장을 사용하고 촬영 시간이 길며 데이터 처리 속도가 낮고, PET는 암과 단순한 염증을 구별하거나 병변부위에 대한 정확한 해부학적 위치 정보를 주는데 한계가 있으며, SPECT는 몸 속 기능적 변화는 알 수 있지만 해부학적 영상을 얻을 수 없어 정확한 위치 판별에 한계가 발생되고 있다.<sup>3,4)</sup> 또한 정확한 진단 및 치료를 위해서는 실시간 영상구현이 필요하며, 경험적 진단에 의존하게 되는 의료영상 장비의 단점 개선을 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 기존의 의료영상 시스템의 단점 개선을 위해 최근 생체영상의 민감도가 높고, 실시간 영상구현이 가능한 광학영상 기법 연구들이 진행되고 있으며, 대표적인 광학영상 방법은 생물발광영상(bioluminescence imaging)과 형광영상(fluorescence imaging)을 이용한 연구들이 대표적으로 연구되고 있다.<sup>3,8)</sup> 이러한 광학영상의 핵심 기술로는 생체 외부로 발광하는 특정 파장의 빛을 획득하여 영상화하는 기술로, 생체 조직의 자가형광(autofluorescence)에 의해 이미징의 한계를 극복하는 것이 중요한 요소이다. 최근 근적외선(near infrared, NIR) 영역의 파장을 이용한 이미징에 대한 연구가 활발히 진행되는 이유는 기존의 자외선 영역의 파장은 생체 내 조직이나 장기에 의한 자가형광의 발생이 배경 노이즈 신호를 증가시켜 신호대 잡음비(signal to background ratio, SBR 또는 signal to noise ratio, SNR)를 나쁘게 만들기 때문이다.<sup>5,6)</sup> 생체 조직에 광원이 조사되면 조직 내에 존재하는 내재성 형광 물질이 형광 신호를 방출한다. 이미징을 위해 투여된 형광 dye 외에 방출된 형광으로 인하여 SBR를 매우 나쁘게 하여 대조영상을 얻는 것이 어렵다.<sup>1,7)</sup> 이미징을 위해 투여되는 형광 dye의 형광 신호를 높이더라도 주변 생체 조직에서 나오는 노이즈 신호의 비율 SBR이 낮아져서 대조영상의 분리가 어렵다. 또한 Fig. 1과 같이 생체에 존재하는 물의 흡수 및 산란의 영향으로 인해 손실을 최소화 시켜야 의료영상 구현이 가능하다.

따라서 본 논문에서는 실시간 근적외선 의료영상 획득이 가능한 다채널 필터 모듈 시스템을 구성하여 근적외

선 형광영상의 SBR 분석 연구를 수행하였으며, 생체 조직 특성에 따른 NIR 형광 영상의 분석을 위해 생체 모사 조직인 phantom을 제작 하여 생체조직의 흡수 및 산란에 따른 형광 영상의 SBR 분석을 통한 필터 모듈의 성능 평가 연구를 수행하였다.

## 2. 다채널 형광 필터 모듈 제작 및 이미징 특성 분석

### 2.1. 다채널 형광 필터 모듈 제작

다채널 형광 영상 시스템 및 필터 모듈 구성은 NIR 형광체인 polymethine indocyanine core를 기반으로 한 methylene blue (MB), indocyanine green (ICG) 대역의 형광체를 기반으로 필터 모듈을 설계하였다. 필터 구성을 위한 형광 dye의 광학적 특성은 Table 1과 같이 673 nm에서 흡수하여 692 nm의 형광을 방출하는 MB 형광 dye와 780 nm에서 흡수 하여 820 nm의 형광을 방출하는 ICG 형광 dye를 기반으로 구성 하였다.

다채널 이미징 및 필터 모듈에는 가시광선과 근적외선을 동시에 실시간으로 이미징할 수 있도록 2CCD (camera)로 구성을 하였다. 2CCD는 컬러 이미지 및 ICG 형광 dye의 형광신호를 획득하고, MB 형광 dye의 신호는 700 대역의 NIR CCD로 측정할 수 있도록 구성하여, 다채널의 형광 영상을 실시간으로 이미징할 수 있도록 배열하였다. 또한 가시광선 영역과 근적외선 영역은 beam splitter인 T660lpxr 필터를 이용하여 두 개의 이미지로 분할할 수 있도록 하였으며, zoom를 이용하여 이미징 대상의 확대와 축소가 가능하도록 구성하였다.

주입되는 근적외선 형광 dye의 이미징 신호와 주입되는 광원에 의한 SBR를 최소화 하기 위해 각각의 CCD에

Table 1. Optical properties of MB and ICG

Dye	Absorption peak. (nm)	Emission peak. (nm)	Extinction Coefficient (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Quantum Yield (%)
MB	670	690	71,200	3.8
ICG	807	822	121,000	9.3

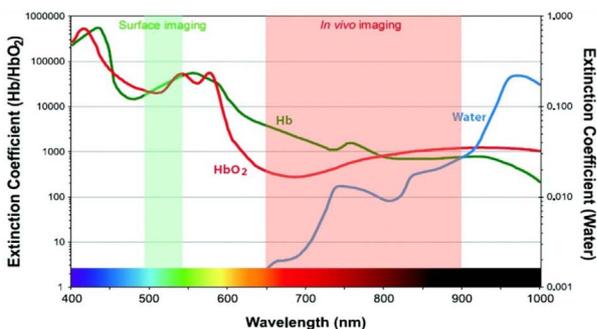


Fig. 1. Extinction coefficient value of water and oxy- and deoxyhemoglobin plotted ranging from visible to NIR wavelength (image ref.).<sup>9)</sup>

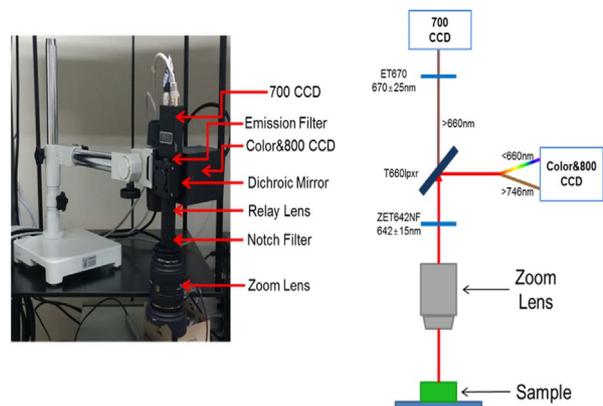


Fig. 2. Schematic of multichannel filter module.

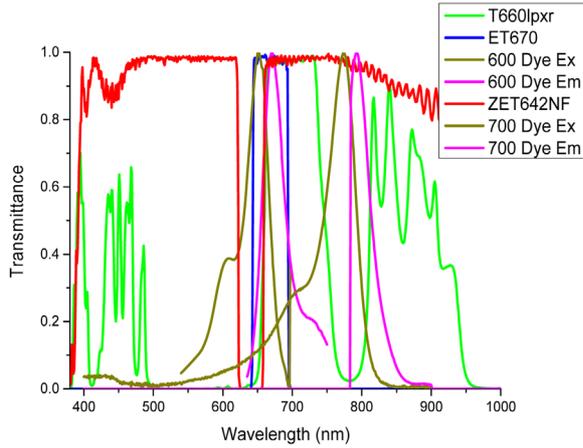


Fig. 3. Comparison of multichannel filter setup transmission spectrum.

Emission filter로 외부 신호를 차단이 용이하도록 구성하였으며, 구성된 필터 모듈은 Fig. 3과 같이 컬러영상, NIR 2채널이 동시에 구동될 수 있도록 설계 및 제작하였다.

2.2. 다채널 형광 필터 모듈의 이미징 특성 분석

다채널 형광 영상 시스템 및 필터 모듈 구성의 광학적 특성 분석을 위해 이미징 획득의 조건에 따른 SBR을 바탕으로 표적 이미징 신호(dye signal)와 이미징 배경의 노이즈 신호(background signal)에 의한 명암비를 확인하여 특성 평가를 진행하였다. SBR은 측정의 위한 표적 신호와 배경 노이즈 신호 차이에 의한 SBR은 식 (1)과 같이 표현될 수 있다.

$$SBR = P_s / P_b \tag{1}$$

여기서,  $P_s$ 와  $P_b$ 은 각각 표적 이미징 신호와 이미징 배경 노이즈의 신호에 해당한다. 이미징 배경 노이즈의 신호 대비 표적 이미징 신호의 세기를 봄으로써 상대적인 신호의 크기를 나타낼 수 있다.

즉 근적외선 형광 신호의 세기가 아무리 높더라도 주변 조직에서 나오는 이미징 배경 노이즈의 신호의 비율이 높아지면, SBR이 작아져서 좋은 대조영상을 얻기가 힘들다. 표적 이미징 신호와 이미징 배경의 신호의 비가 클수록 좋은 대조 영상을 얻을 수 있으며, 형광이미지의 SBR의 비율은 2이상이면 대조영상으로 구분이 가능하다. Fig. 4는 표적 이미징 신호와 이미징 배경 노이즈의

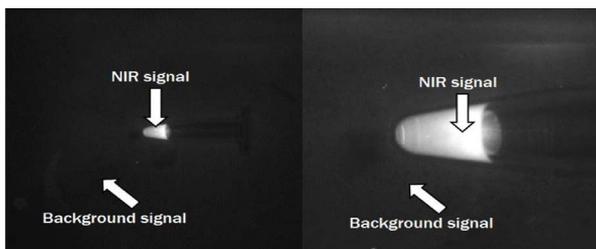


Fig. 4. Analysis of signal to background ratio.

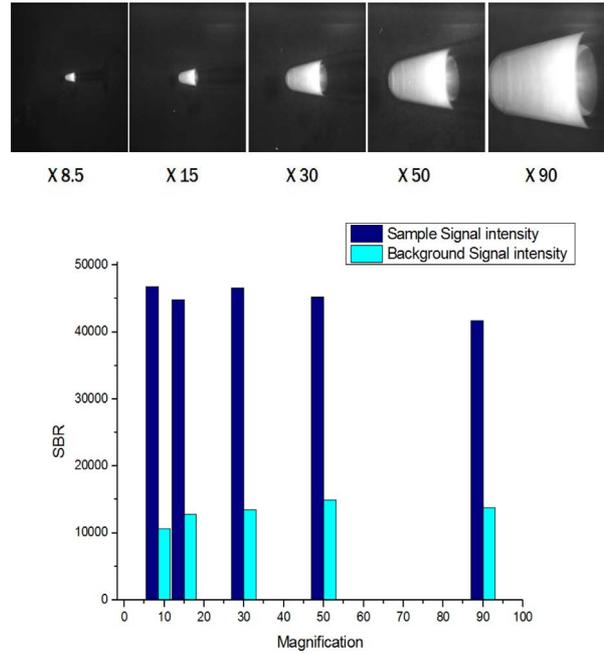


Fig. 5. Analysis of magnification for signal to background ratio.

신호를 통한 SBR 측정 방법을 보여주고 있다.

다채널 형광 필터 모듈의 SBR 특성 분석을 위해서 배율(magnification)에 따른 특성 분석을 진행하였다. 배율에 따른 특성 측정을 위한 작동거리(working distance, WD)를 9인치로 고정하고, 근적외선 광원 조사시간은 400 ms로 고정하여 진행하였다. 정확한 측정을 위해 배경은 NIR의 반사가 없도록 black paper 기판과 암실에서 측정하였다. 배율의 변화는 생체 이미징에 있어서 미세한 조직의 대조영상에 매우 중요한 요소가 된다. 미세한 혈관 및 신경의 정확한 구분을 위해서는 배율의 변화에 의해 SBR의 변화가 없어야 한다. 또한 배율에 따른 SBR의 차이가 2이상이어야 정확한 대조영상을 구현할 수 있다.

제작된 다채널 형광 필터 모듈의 배율에 따른 SBR의 차이는 Fig. 5와 같이 평균 4이상 차이를 보이며, 배율에 따른 SBR의 편차도 매우 낮고 고 배율에서도 정확한 대조영상 확인이 가능하며, 매우 우수한 특성을 확인할 수 있었다.

배율에 따른 특성분석을 바탕으로 근적외선의 조사 시간에 따른 SBR 특성 분석을 진행하였다. 측정을 위해 WD는 9인치, 배율은 90에서 SBR특성을 확인하였다. Fig. 6의 결과에서는 NIR의 조사 시간이 증가할수록 SBR의 차이도 증가하는 특성을 확인할 수 있다. 평균 3.5 이상의 SBR의 차이는 이미징 배경의 노이즈 신호의 증가량은 미비하고 표적 이미징 신호만 증가하는 것으로 확인할 수 있다.

즉 구성된 필터 모듈이 산란되어 반사되는 배경 노이즈의 신호 차단 효율이 매우 우수하며, 생체 이미징에서 발생하는 기타 장기에 의한 배경 노이즈 신호의 차단에 매우 효과적인 특성을 나타낼 수 있다. 앞에서 진행되어

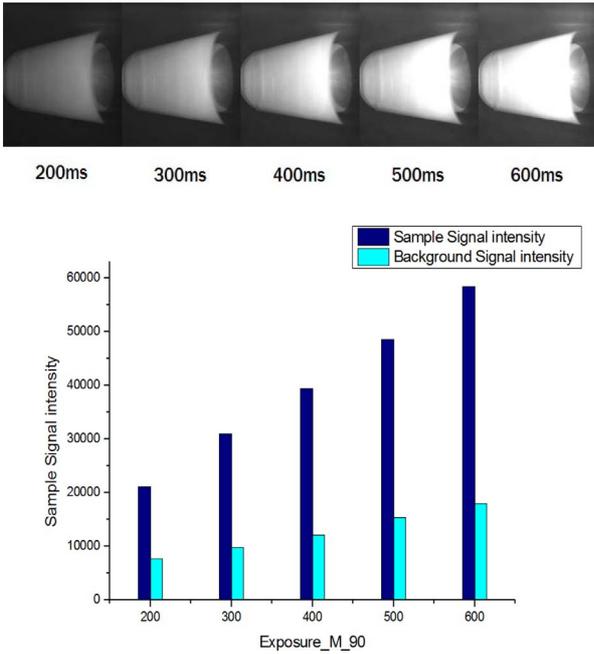


Fig. 6. Analysis of exposure for signal to background ratio.

진 다채널 필터 모듈의 SBR 특성 분석 연구를 바탕으로 CCD의 gain의 변화에 따른 SBR 특성 분석 연구를 수행하였다. gain의 변화는 영상 밝기의 변화가 발생되고, 이러한 밝기의 변화는 사용 환경에 대한 평가를 수행할 수 있다. 즉 영상에 정확성을 위해서는 gain의 변화에도 SBR의 변화는 낮아야 신뢰할 수 있다.

gain의 변화에 따른 SBR 측정을 위해 WD는 9인치, 배율 90, 400 ms NIR을 조사하여 SBR 특성 분석 연구를 수행하였다. gain의 변화는 10%~60%로 설정 하여 측정을

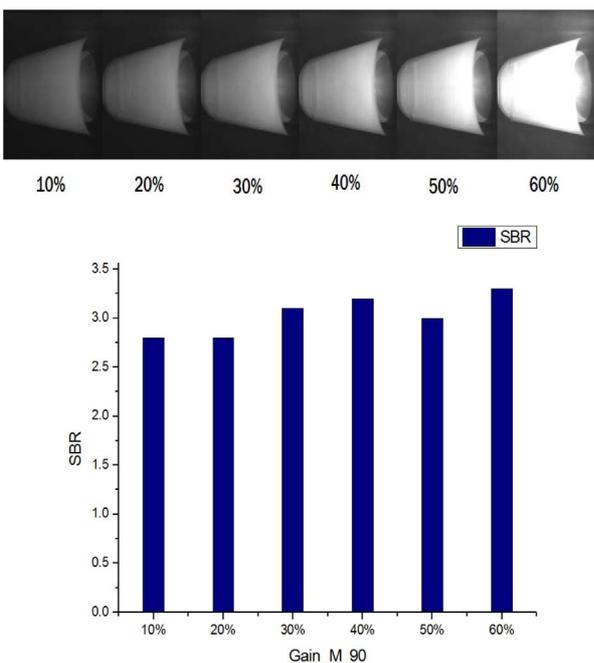


Fig. 7. Analysis of exposure for signal to background ratio.

진행 하였다. Fig. 7은 gain의 변화에 따른 SBR의 특성을 나타낸 결과로, gain의 변화에 의해 이미지의 밝기 변화가 발생된다.

gain의 증가는 CCD의 조리개와 같이 빛의 양을 조절하는 방법으로 gain이 증가 되며, SBR은 증가된다. 하지만 제작된 필터 모듈로 인하여 gain의 증가에 의해 이미지의 밝기 변화는 증가하지만 SBR의 편차는 낮은 특성을 보인다. 즉 제작된 필터의 모듈의 환경에 따른 SBR의 편차에 따른 이미지의 변화는 낮은 것으로 평가할 수 있다.

### 3. 생체 모사조직을 이용한 다채널 형광 필터 모듈의 이미징 특성 분석

#### 3.1. 생체 조직 모사를 위한 phantom 제작 공정

제작된 필터 모듈의 SBR 특성 평가를 바탕으로 생체 모사 조직인 phantom을 이용한 이미징 특성 평가를 수행하였다. phantom을 이용한 이미징 특성 평가는 생체 조직의 두께 및 근적외선 조사량에 따른 SBR 특성을 통한 높이 방향의 정보를 예측하여 최적의 이미징 변수를 예측할 수 있기 때문이다.

일반적으로 생체 모사 조직인 phantom은 생체 조직이 나타내고 있는 흡수계수와 산란계수를 모사하여 광학적 특성을 분석하는 방법으로 다양한 분야에 응용되고 있다. 따라서 본 연구에서도 생체 주요 장기인 신장(kidney) 및 간(liver)의 생체 모사 조직인 phantom을 제작하여 근적외선 조사량에 따른 필터 모듈의 SBR 특성을 평가하였다. 생체 모사 조직인 phantom 제작은 Table 2와 같이 생체 장기의 흡수계수와 산란계수를 모사하여 Fig. 8와 같이 3단계로 제작하였다.

Fig. 8의 1단계와 같이 생체 조직의 흡수계수를 모사하기 위해 실리콘 주체와 india ink를 혼합하고, 2단계와 같이 형광 dye를 dichloromethane (DCM) 유기용매에 혼합하였다. 또한 형광 dye는 diethylthiadicarbocyanine iodide (DTDC)를 사용하였으며, 혼합된 시료에 산란계수를 맞추기 위한 titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)를 섞은 후 Sonicater를 실시하여 용매를 증발시킨다.

마지막 3단계로 1, 2단계에서 제작된 용액을 실리콘 주체와 경화제의 비율을 맞추어 혼합하고 기포를 제거하여 경화공정을 통해 kidney phantom 및 liver phantom을 생체 조직의 피부 두께를 고려하여 12 mm, 7 mm, 2 mm 두께로 제작 하였다. 제작된 phantom 시편은 두께에 따라

Table 2. Optical absorption and reduced scattering coefficients of liver, and kidney at NIR light.

Tissue	Absorption coefficient $\mu_a$ (mm <sup>-1</sup> )	Reduced scattering coefficient $\mu_s$ (mm <sup>-1</sup> )	Fluorescence ( $\mu M$ )
Kidney	0.47	0.9	5
Liver	0.22	0.88	5

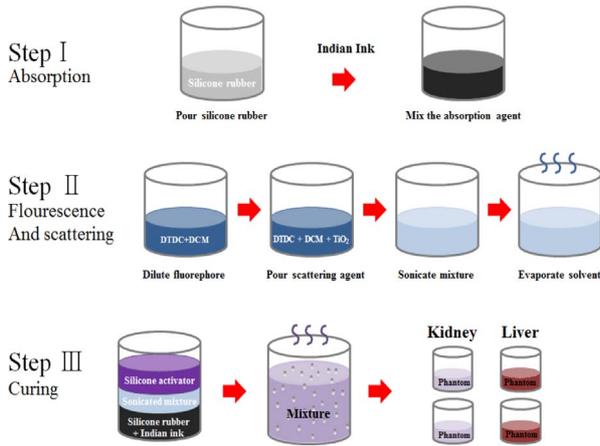


Fig. 8. Schematic of phantom manufacture process.

흡수계수 및 산란계의 변화가 발생된다. 이러한 변화는 주입되는 광원의 세기에 따라 SBR의 변화가 발생되며, 이러한 변화 특성을 통하여 이미징 특성 분석 연구 및 필터 모듈의 SBR의 특성 분석 연구를 수행 하였다.

### 3.1. Phantom 생체 조직을 이용한 필터 모듈의 SBR 특성 분석

제작된 phantom의 두께는 12 mm, 7 mm, 2 mm 제작하여 NIR 광원의 세기를 조절 하면서 SBR의 특성 분석을 진행하였다.

생체 조직의 두께 및 광원의 세기의 변화를 통해 최소 대조영상 획득을 위한 특성 분석 연구를 수행 하였다. Fig. 9의 kidney phantom의 경우 50 mA에서부터 4이상의 SBR의 차이를 보이며, 대조영상이 획득이 가능하였으며, 형광 dye의 신호의 최대 방출 지점인 130 mA로 증가시 SBR도 증가를 보이는 특성을 확인하였다. 하지만 형광 dye의 신호의 포화 상태로 더 이상의 SBR의 차이는 발생되지 않으며 감소되는 특성을 확인할 수 있었다.

liver phantom의 경우 Fig. 10과 같이 60 mA에서부터 4

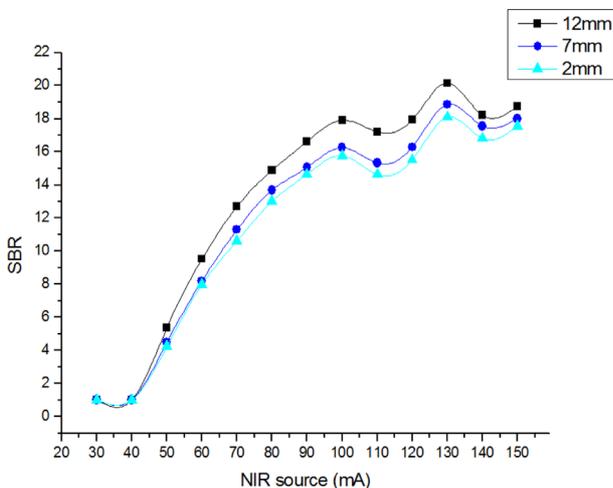


Fig. 9. SBR of 12 mm, 7 mm, 2 mm thickness rat kidney depending on NIR source power.

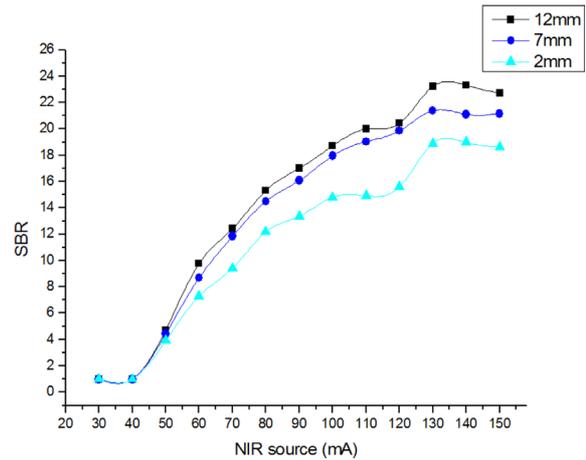


Fig. 10. SBR of 12 mm, 7 mm, 2 mm thickness rat liver depending on NIR source power.

이상의 SBR의 차이를 보이며, 대조영상을 획득이 가능하였다. 또한 kidney phantom과 동일하게 형광 dye의 신호의 최대 방출 지점인 130 mA로 증가시 SBR도 증가를 보이는 특성 보이나, kidney phantom과 달리 liver phantom의 경우 두께에 따른 SBR의 편차가 매우 높아 이미징에 있어서 두께에 따른 특성 변화가 큰 것으로 확인 되었다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 근적외선 형광 이미징 영상 구현을 위한 다채널 필터 모듈을 제작하여 이미징 특성 분석 연구를 수행 하였다. 다채널 필터 모듈의 특성 분석은 변수에 따른 SBR의 차이를 평가 하여 시각적 판별이 가능한 대조영상의 가능 여부를 확인하였다. 제작된 필터 모듈을 이용하여 magnification, exposure, gain의 변수를 변화 시키며 근적외선 형광 이미징의 영상 구현 가능여부를 확인하였으며, 특성 분석결과 magnification, exposure, gain의 변화에도 SBR은 4이상의 대조영상 획득이 가능한 특성을 확인하였다.

또한 생체 이미징 특성 분석을 위하여 kidney 및 liver의 phantom을 제작하여 두께에 따른 NIR 광원의 주사량에 따른 SBR 특성을 분석하여 두께에 따른 대조영상이 가능한 조건을 확인하였다. kidney phantom 및 liver phantom의 경우 각각 50 mA, 60 mA에서 4이상의 SBR의 대조영상을 확인 하였다. 이러한 방법은 근적외선 형광영상을 통한 생체 표적 탐지가 가능하며, 각 장기별 또는 신체 조직별 형광 특성 분석에 매우 유용한 방법으로 다양한 생체 영상 연구에 활용될 수 있을 것으로 보인다.

## Acknowledgments

“이 논문은 2015년도 밀양시의 재원으로 재단법인경남테크노파크의 지원을 받아 수행된 나노융합 신규연구개발사업임”.

## References

1. J. G. Jeong, "General perspectives for molecular nuclear imaging", *The Korean Society of Nuclear Medicine*, 38(2), 111 (2004).
2. J. H. Lee, G. Park, G. H. Hong, J. Choi, and H. S. Choi, "Design considerations for targeted optical contrast agents", *Quant. Imaging, Med. Surg.*, 2(4), 266 (2012).
3. A. W. Yang, S. U. Cho, M. Y. Jeong, and H. S. Choi, "NIR Fluorescence Imaging Systems with Optical Packaging Technology", *J. Microelectron. Packag. Soc.*, 21(4), 25 (2014).
4. H. S. Choi, S. L. Gibbs, J. H. Lee, S. H. Kim, Y. Ashitate, F. Liu, H. Hyun, G. Park, Y. Xie, S. Bae, M. Henary, and J. V. Frangioni, "Targeted zwitterionic near-infrared fluorophores for improved optical imaging", *Nature Biotechnology*, 31(2), 148 (2013).
5. M. A. Crane, G. Themelis, H. J. G. Arts, K. T. Buddingh, A. H. Brouwers, V. Ntziachristos, G. M. van Dam, and A. G. J. van der Zee, "Intraoperative nearinfrared fluorescence imaging for sentinel lymph node detection in vulvar cancer: First clinical results", *First Clinical Results*, 120, 291 (2011).
6. S. L. Troyan, V. Kianzad, S. L. Gibbs-Strauss, S. Gioux, A. Matsui, R. Oketokoun, L. Ngo, A. Khamene, F. Azar, and J. V. Frangioni, "The FLARE™, intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping", *Ann. Surg. Oncol.*, 16(10), 2943 (2009).
7. A. M. De Grand and J. V. Frangioni, "An operational nearinfrared fluorescence imaging system prototype for large animal surgery", *Technol. Cancer. Res. Treat.*, 2(6), 553 (2003).
8. J. V. Frangioni, "In vivo near-infrared fluorescence imaging", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7(5), 626 (2003).
9. H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, and Y. Urano, "New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging", *Nature Biotechnology, Chem. Rev.*, 110, 2620 (2010).