

Indocyanine green 형광조영제의 형광발현을 위한 농도 범위 분석

김용재[†], 이다애^{**}, 윤기철^{***}, 김광기^{****}

Concentration Range Analysis for Fluorescence Expression of Indocyanine Green

Yong Jae Kim[†], Da Ae Lee^{**}, Ki-Cheol Yoon^{***}, Kwang Gi Kim^{****}

ABSTRACT

In the characteristic of the brain malignant, the blood vessels and tumors have the same color and shape, and the boundary distinction is not clear, Therefore, it is difficult to observe the naked eye. Because of the high invasiveness, the risk of recurrence is high. Therefore, complete resection of the tumor is essential. The method for distinguishing the boundary between blood vessels and tumors is a fluorescence contrast method using indocyanine green (ICG), a fluorescence contrast agent. In ICG, the concentration range analysis is very important because the fluorescence expression state varies depending on the concentration. However, since the analysis result of the fluorescence expression condition is insufficient according to the current concentration, this paper proposes by analyzing the initial protocol of the concentration range. 780 nm infrared light was irradiated to the ICG sample to observe the fluorescence expression through a near infrared (NIR) camera. The wavelength is measured by using a spectrum instrument (ocean view) to observe the fluorescence expression wavelength of 811nm. As a result of analyzing the mol concentration according to each sample, the fluorescence expression range was found to be 16.15-0.16M and the optimum fluorescence concentration on the brightest part was found to be 3.23-0.81M.

Key words: Indocyanine Green, Fluorescein Contrast Agent, Wavelength, Concentration, Brightness

1. 서 론

국가 암 정보센터 통계에 따르면, 국내 암 발생 환자는 2010년부터 2016년까지 매년 평균 21.3만명 씩 발생하고 있다[1]. 그 중에서 뇌종양은 인구 10만

명당 10명의 발생률이 보고되고 있고, 15세 미만의 소아청소년 연령 층은 약 10만명당 2-3명의 발생률을 차지하고 있다 [2].

뇌종양의 종류는 다양하지만 그 중에서 가장 빈번히 발병하는 뇌 신경 교종은 전체 뇌종양의 약 35%

* Corresponding Author: Kwang Gi Kim, Address: Dept. of Biomedical Engineering, College of Medicine, Gachon University, 38-13, Dokjeom-ro 3 beon-gil, Nam-dong-gu, Incheon, 21565 Republic of Korea, TEL : +82-32-460-2177, E-mail : kimkg@gachon.ac.kr
Receipt date : Aug. 13, 2019, Revision date : Oct. 8, 2019
Approval date : Nov. 18, 2019

[†] Dept. of Bionano Technology, College of Bionano Technology, Gachon University, Seongnam, Republic of Korea (E-mail : kyj9602@gmail.com)

^{**} Dept. of Nanophysics, College of Bionano Technology, Gachon University, Seongnam, Republic of Korea (E-mail : piggyda2@naver.com)

^{***} Dept. of Premedical, College of Medicine, Gachon University, Incheon, Republic of Korea (E-mail : kcyoon98@gachon.ac.kr)

^{****} Medical Devices R&D Center, Gachon University Gil Hospital, Incheon, Republic of Korea

* This work was supported by the Project of Future Innovation and Challenges (2019-0303)

를 차지하고 있다 [2]. 종양에는 수많은 혈관들이 종양과 함께 같은 색상과 형태를 가지고 있고 이들은 같은 색상과 형태를 가지고 있다. 그러므로 종양과 혈관의 경계구분에 대한 육안관찰이 어렵다 [2]. 종양과 혈관의 경계구분이 어려운 관계로 종양을 절제하는 과정에서 절제가 덜 되거나 혈관을 손상시킬 수 있는 가능성이 크다 [2]. 즉, 침윤성이 강한 악성종양이 절제가 덜 이루어지면 재발위험이 크고 반면, 완벽한 절제가 이루어지면 혈관을 손상시킬 수 있게 되어 혈류 순환의 장애가 발생된다 [3]. 종양 절제가 덜 이루어지게 되면 방사선치료를 통해 제거가 가능하겠지만 혈관 손상으로 인한 혈류순환 장애 발생은 심각한 의료사고를 일으키게 된다. 그러므로 종양과 혈관을 구분하고 혈관의 혈류순환 상태를 관찰할 수 있는 방법은 형광염색을 통한 영상진단 방법이 있다 [4]. 형광염색 진단 방법을 적용하기 위해 형광조영제를 정맥 주사하여 외부에서 광원을 조사하였을 때, 혈관에서 형광이 발현되고 혈류순환에 대한 형광발현을 외부 모니터를 통해 관찰할 수 있다[4]. 혈관의 혈류순환 상태를 관찰하기 위해 사용되는 형광조영제는 인도시아닌 그린(ICG: indocyanine green)이며 1956년부터 미국 FDA에서 승인을 받아 지금까지 사용되고 있다[4]. ICG는 60년 동안 일부 임상 분야에서 사용되어 왔지만, 최근 다양한 의학 분야에서 새로운 ICG기반 의료영상 관독 방법이 개발되고 있다 [5]. 그러나, ICG는 농도에 따라 형광발현 상태가 달라지는데 ICG의 초기 농도와 형광발현 상태의 상관관계에 따른 데이터가 부족한 실정이다. 따라서 형광발현을 위한 ICG 농도범위분석이 매우 중요하며 이는 치료과정에서 혈류 형광진단에 도움이 된다고 판단된다.

본 논문은 실험을 통해서 형광발현을 위한 ICG 농도범위에 대해 분석을 하였고 형광 농도범위와 ICG 상관관계를 통해 ICG가 주입된 혈관에서 적외선을 조사하였을 때, 형광발현이 가장 밝고 명확하게 나타나는 ICG농도범위값을 제시한다.

2. 형광발현 특성 분석

형광의 정의는 광원이 조사되어 물질에 빛이 흡수되었을 때 화학변화를 일으켜 다른 파장을 방출하는 특성을 의미한다 [6]. 이때, 광원 조사에 의해 분자간 파장의 빛을 흡수하여 다른 파장에서 방출하면

그 분자는 형광단(fluorophore)이라고 정의된다[6]. 빛은 광자(photon)로 구성되고 빛의 색상은 광자에 포함된 파장의 크기에 따라 달라진다[6]. 광자가 형광단에 부딪히면 에너지는 형광단전자(fluorophore's electrons)로 전달된다[6]. Fig. 1과 같이 들뜬 전자는 여기되는 에너지를 빠르게 잃게 된다[7].

에너지 손실의 최종결과는 광자의 방출이며, 광자는 들뜬 광자보다 에너지가 적으므로 파장이 길고 색이 달라진다[6].

임상관점의 분석에 따르면 형광조영제를 주입했을 때, Fig. 2와 같이 체외에서 광원을 조사하게 되면 형광 물질은 광원과 화학적 반응을 일으켜 해당 조직으로부터 형광을 발현시킨다. 이때, 외부 광원은 조사파장(excitation wavelength)과 일정한 전력(power)을 가지고 있고 형광발현에서는 발현파장(emission

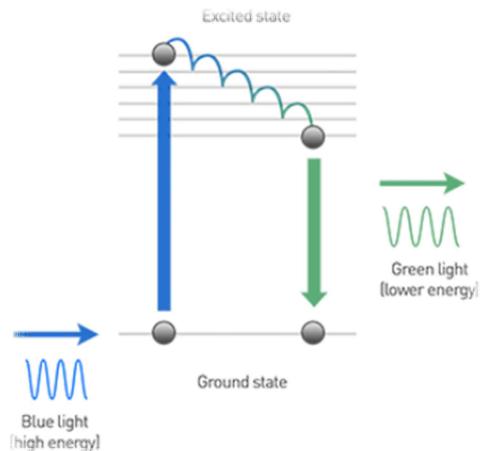


Fig. 1. Emission of the fluorescence by irradiation of optical source [6].

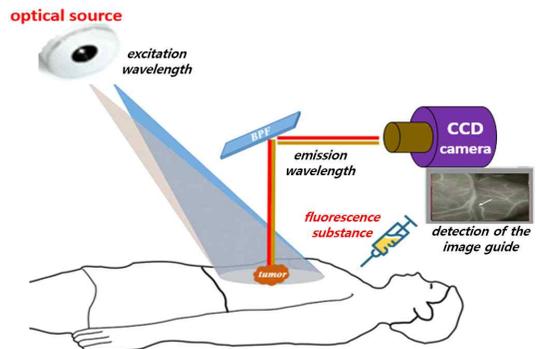


Fig. 2. Fluorescence expression condition [6].

Table 1. Irradiation wavelength and expression wavelength according to type of fluorescent contrast agent [8, 9]

Fluorescein contrast agent	Irradiation wavelength[nm]	Expression wavelength[nm]
ICG	750-800	835

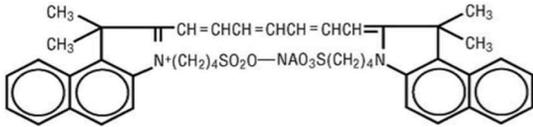


Fig. 3. Molecular structure of Indocyanine green.

wavelength)과 전력(power)을 가지게 된다.

형광조영제는 ICG(indocyanine green)와 5-ALA (5-aminolevulinic acid), Yellow dye(Fluorescein natrium)등이 있으며, 그 중에서 혈관의 혈류순환 상태를 관찰하기 위해 사용되는 형광조영제는 ICG이다 [8]. 각 조영제마다 조사과장과 발현과장이 다르며 ICG의 경우 Table 1에 제시하였다[9].

Fig. 3은 형광발현에 대한 ICG의 화학식 구조를 보여주고 있다[9]. ICG는 양친매성의 특징을 가지고 있고 혈관 내에서 ICG는 혈청 알부민(albumin) 및 α, β-지질단백질과 같은 혈장 단백질의 소수성 영역과 결합한다[8]. 주입된 ICG중에서 98%는 혈장 단백질과 결합하고 2%는 혈청에 결합하지 않은 상태로 존재한다[8]. 결합하지 못한 ICG는 glutathione S-transferase에 의해 간담즙으로 전달되는 반면, 결합된 ICG는 혈관 내 공간에 더 오랜 기간동안 유지된다

Table 2. Experimental environment for fluorescence expression analysis

Laser Type	Irradiation wavelength [nm]	Fluorescent contrast agent	Mass [mg]
THORLABS M780L3	780nm	Indocyanine green (ICG)	25

[8].

분석에 의하면 ICG는 농도에 민감하여 농도에 따라 형광발현 조건이 결정된다. 그러므로 농도 조절이 중요하며 형광발현 조건을 위해 농도 범위에 대한 초기 프로토콜(protocol) 분석이 중요하다 [10].

3. 형광발현 조건을 위한 농도 분석

형광발현 조건에 대한 초기 농도 프로토콜을 분석 및 실험하기 위해 Fig. 4와 같이 실험 환경을 구성하였다. 조사 광원과 필터 그리고 카메라로 구성되며 형광발현 관찰을 위해 어두운 암실에서 실험을 수행하였다. 이때, 필터는 800nm 고역 파장통과 필터(long-pass filter)를 사용하여 발현되는 형광과장을 카메라에 포착할 수 있는 용도로 사용하였다.

실험을 위해 사용되는 기구에 대한 정확한 사양 및 정보는 Table 2와 같이 제시되며 조사 광원은 LED(light emitting diode)를 사용하였다.

Fig. 5와 같이 광원 조사를 위해 사용한 LED의 빔 폭(bean angle)은 20°이고 조영제 샘플(sample)과 광원 사이의 조사 거리는 7mm이며 조사 강도는 1600mW로 구성된다[12]. 또한 관찰용 CCD카메라

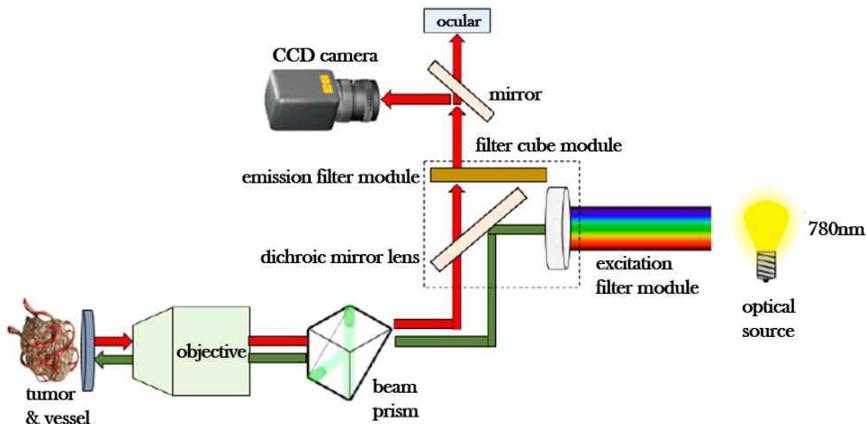


Fig. 4. Experimental environment for fluorescence expression analysis [11].

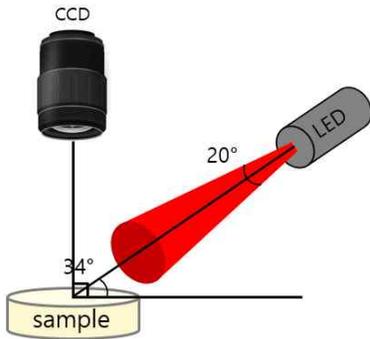


Fig. 5. Direction angle of the CCD camera and LED.

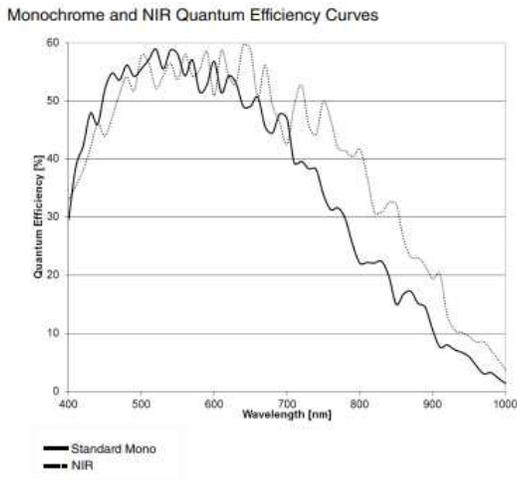


Fig. 6. Pass range of the wavelength for CCD NIR camera [13].

와 표본 샘플(sample)이 수직일 때, LED 조사 방향 각은 34°의 관계를 유지하고 있다.

광원을 조사했을 때, 형광발현 조건을 관찰하기 위해 근적외선(NIR: near infrared)카메라를 사용하였고 Table 3에는 카메라 사양을 제시한다. 이때, Fig. 6은 카메라가 투영할 수 있는 파장 대역이며 파장대역은 근적외선(NIR) 400 nm부터 적외선(IR) 1000 nm 대역까지 통과할 수 있다.

Table 3. Camera specifications [13]

Type	Model	Specification	
NIR	Lt-225M-NIR-SCI	Image sensor	CMOS
		Pixel size [nm]	5.5 × 5.5 μm
		Resolution	2048 × 1088 pixels
		Frame Rate	170 fps

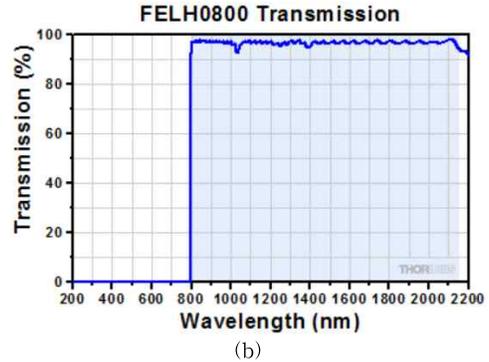
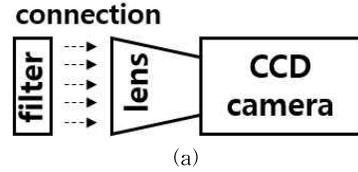


Fig. 7. long pass filter (Thorlabs, FELH0800) for noise rejection (a) connection between filter and lens (b) wavelength range of the filter

Fig. 7과 같이 형광발현에 대한 파장대역을 카메라에 통과시켜주고 주변의 잡음을 제거해 주기 위해 반사율(OD) 0.01 %이내, 투과율 98% 그리고 대역폭 50%를 가진 고역통과 필터(Thorlabs, FELH0800) 카메라 렌즈(lens)에 삽입을 하여 형광발현에 대한 영상 화질을 높였다. 이때, 근적외선 파장대역은 차단되고 적외선 대역은 통과시켜주며 통과시작되는 파장은 800 nm이다.

4. 실험 방법 및 결과

Fig. 8과 같이 형광 시약 제조를 위해 고형 ICG(25 mg)에 농도에 따라 생리식염수(normal saline)을 첨가하여 시약을 제조하였다. 제조된 시약에 780nm의 적외선(M780L3)을 조사하여 형광이 발현되는 것을 NIR 카메라(Lt225M_NIR_SCI)를 통해 관찰하였고, 스펙트럼(spectrum) 계측기(ocean view)를 통해 파

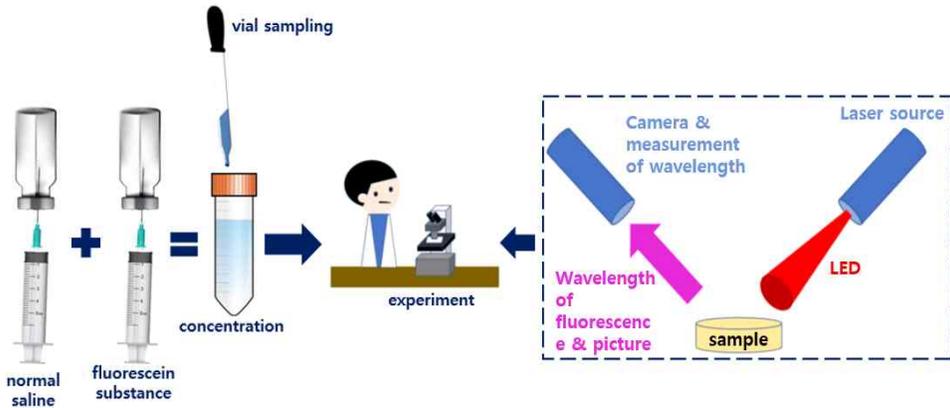


Fig. 8. Experimental procedure for analysis of fluorescence expression concentration.

장을 측정하여 형광발현 상태의 파장을 분석하였다 [14].

스펙트럼 계측기(ocean view)를 통해 파장을 측정 한 결과를 Fig. 9에 제시하였고 LED는 780 nm에서 측정되었고 형광발현 파장은 대략 810 nm의 파장

인 것을 측정을 통해 확인할 수 있었다.

농도에 따른 ICG의 형광발현 정도를 확인하기 위해 몰(Mol) 농도를 조절하여 NIR카메라(Lt225M-NIR-SCI)을 통해 관찰하였고 그 결과를 Fig. 10에 제시했다. 그림으로부터 0.21-0.0006mM범위에서 형광이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 0.065-0.0065 mM인 경우 형광이 가장 밝은 것을 확인할 수 있었다.

ICG 파우더(powder)의 초기 몰 농도는 ICG 25 mg(분자량: 774.96 g/mol)에 생리식염수 10 ml을 추가하여 2.5 mg/ml에서 3.23 mM이다. 이때, 초기 몰 농도를 형광발현 최적의 농도를 분석하여 형광발현 조건을 밝히기 위해 계산 및 실험을 통해 표 4와 같이 제시를 하였다.

농도에 따른 형광의 세기를 확인하기 위해서 명도를 측정하였고 그 결과를 Fig. 11에 나타냈다. Fig. 8에서 관찰한 바와 같이 0.065-0.0065 mM 범위에서 명도가 가장 큰 것을 확인할 수 있었고 최적 농도에서 진해지거나 연해지면서 명도가 점차 줄어드는 것으로 보아 형광발현 퇴색을 가지는 것으로 분석되었다.

5. 결 론

ICG(indocyanine green)는 농도에 따라 형광발현 조건이 결정되어 농도조절이 중요하기 때문에 형광 발현 조건을 위해 농도 범위에 대한 초기 프로토콜(protocol) 제시가 중요하다. 본 논문에서는 ICG stock volume에 생리식염수(normal saline)의 농도

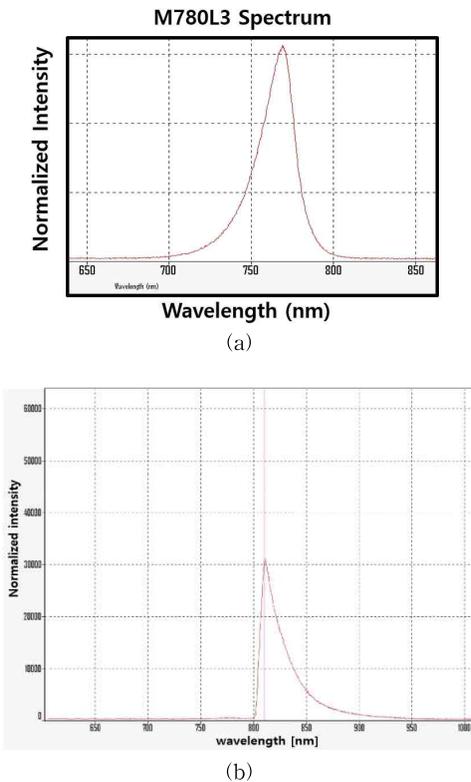


Fig. 9. Measurement results for wavelength (a) LED (b) fluorescence.

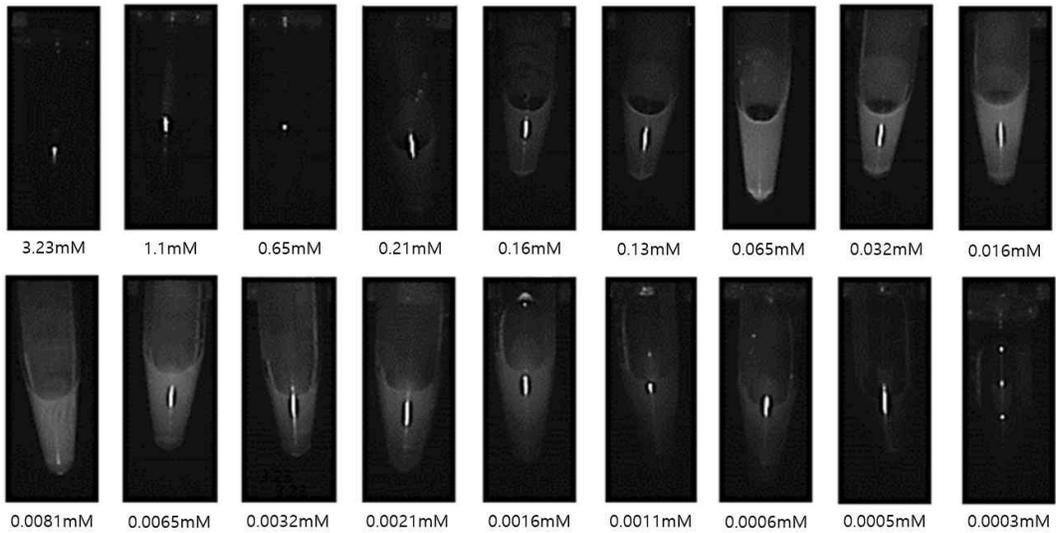


Fig. 10. ICG fluorescence results by concentration.

Table 4. ICG molarity by concentration

concentration (mM)	3.23	1.1	0.65	0.21	0.16	0.13	0.065	0.032	0.016
concentration (mM)	0.0081	0.0065	0.0032	0.0021	0.0016	0.0011	0.0006	0.0005	0.0003

를 점차 늘려가며 이미지를 통해 형광 범위를 조사하였고, 흑백 이미지가 되기 때문에 명도에 따라 최적 형광 농도를 관찰하였다. 형광발현 조건을 분석하기 위해 조사 광원으로는 780 nm LED(Light Emitting Diode)를 사용하였고 NIR(Near InfraRed)카메라를 통해 형광발현 상태를 관찰하였다. 명도를 측정하기 위해서는 NIR카메라를 통해 얻은 형광 이미지를 통해 가장 밝은 부분을 명도 측정툴(tool)을 사용하여 측정하였다.

형광발현 영상 화질을 높이기 위해 카메라 헤더(Header)부분에 800 nm Long-pass-filter를 고정하였고, 필터(filter)를 통해 주변 잡음 광원을 차단시킴으로써 선명한 이미지를 얻을 수 있었다.

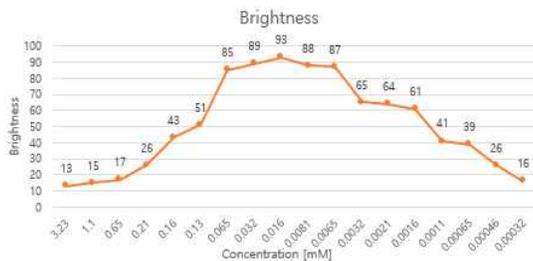


Fig. 11. Brightness according to ICG concentration.

형광 이미지로 보아 0.21-0.0006 mM에서 형광이 발현되는 것을 확인할 수 있었고, 0.065-0.0065 mM에서 명도가 높은 것으로 보아 최적 형광 범위인 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 종양이 있는 환자의 혈액에 최적농도의 ICG 형광조영제를 투입함으로써 혈관과 종양사이의 경계를 뚜렷이 확일 할 수 있어 정상조직의 손상 없이 종양의 완전 절제가 가능할 것으로 기대할 수 있다.

본 연구에서 실제 동물실험을 대비하기 위해 ICG(indocyanine green)의 자체 형광발현이 가능하도록 생리식염수의 희석농도 범위를 분석하기 위한 실험을 수행하였다. 상기 실험을 통해 향후 동물실험 혹은 실제 환자 적용에 가능할 수 있는 희석 농도에 대한 참고문헌에 기여될 것으로 사료된다.

REFERENCE

[1] Korean Central Cancer Registry, *National Cancer Registration and Statistics*, 2015.
 [2] A Story of a Brain Tumor, <http://braintumor.or.kr/public/content/?sid=4> (accessed July 23, 2019).

- [3] F. Lefranc, N. Sadeghi, I. Camby, T. Metens, O. Dewitte, and R. Kiss, "Present and Potential Future Issues in Glioblastoma Treatment," *Expert Review of Anticancer Therapy*, Vol. 6, pp. 719-732, 2006.
- [4] W.B. Yoon, H.R. Kim, H.M. Lee, Y.J. Kim, K. G. Kim, H. Yoo, et al., "Development of Image-based System for Multiple Fluorescence Imaging Study," *Journal of Korea Multimedia Society*, Vol. 18, No. 12, pp. 1445-1452, 2015.
- [5] J.T. Alander, I. Kaartinen, A. Laakso, T. Patila, T. Spillmann, V.V. Tuchin, et al., "A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery," *International Journal of Biomedical Imaging*, Vol. 2012, pp. 1-26, 2012.
- [6] Physical Properties That Define Fluorescence, <https://www.thermofisher.com/kr/ko/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/fundamentals-of-fluorescence-microscopy/physical-properties-that-define-fluorescence.html> (accessed September 3, 2019).
- [7] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, and J.R. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, 5 th, Cengage, USA, 2017.
- [8] M.B. Reinhart, C.R. Huntington, L.J. Blair, B.T. Heniford, and V.A. Augenstein, "Indocyanine Green: Historical Context, Current Applications, and Future Considerations," *Surgical Innovation*, Vol. 23, No. 2, pp. 166-175, 2016.
- [9] IC-GREEN™, Sterile Indocyanine Green, <https://www.drugs.com/drp/indocyanine-green.html/> (accessed July 24, 2019).
- [10] S. Wang, G. Hüttmann, F. Rudnitzki, H. Diddens-Tschoeke, Z. Zhang, and r. Rahmanzadeh, "Indocyanine Green as Effective Antibody Conjugate for Intracellular Molecular Targeted Photodynamic Therapy," *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 21, No. 7, pp. 078001-1-078001-8, 2016.
- [11] K.C. Yoon and K.G. Kim, "Optical Bandpass Filter with Adjustable Reflection Using a Thin-film Thickness for Surgical Fluorescein Image-guided Microscopy Applications," *Micro-wave Optics Technology Letter*, Vol. 61, No. 4, pp. 1126-1131, 2019.
- [12] M780L3-SpecSheet, <https://www.thorlabs.com/drawings/a537bae8f4ab8685-23249574-B83C-5493-B6D4D110BCA09A21/M780L3-SpecSheet.pdf> (accessed July 28, 2019).
- [13] Lt225 Camera Datasheet, <https://www.lumenera.com/media/wysiwyg/resources/documents/datasheets/industrial/Lt225-datasheet.pdf> (accessed July 28, 2019).
- [14] T.W. Bae, "Evaluation System for Color Filter Array(CFA) in Digital Camera," *Journal of Korea Multimedia Society*, Vol. 20, No. 11, pp. 1741-1749, 2017.



김 용 재

2014년 03월~2019년 현재 가천
대학교 바이오나노대학
바이오나노학과 재학 중
2019년 6월~8월 가천대의과대
학 길병원 의료기기R&D
센터 학부연구원

관심분야 : 광역학진단의학, 인공지능영상의학, 바이오
센서, 인공생체재료, 의료진단시스템 소형화
개발



윤 기 철

2007년 02월 광운대학교 대학원
전과공학과(공학석사)
2011년 08월 광운대학교 대학원
전과공학과(공학박사)
2019년 08월 고려대학교 의학물
리학과 (이학석사)

2018년 09월~2019년 현재 가천대학교 의과대학 의예과
관심분야 : 고주파 치료, 광역학진단의학, 인공지능영상
의학, 전자빔치료계획, 인공생체재료



이 다 애

2017년 03월~2019년 현재 가천
대학교 바이오나노대학
나노물리학과 재학 중
2019년 6월~현재 가천의과대학
길병원 의료기기R&D센
터 학부연구원

관심분야 : 광역학진단의학, 인공지능영상의학, 바이오
센서, 인공생체재료, 의료진단시스템 소형화
개발



김 광 기

1998년 2월 포항공과대학교 물리
학과(이학석사)
2005년 2월 서울대학교 의용공학
과(공학박사)
2007년 7월~2017년 1월 국립암
센터 의공학연구과

2017년 2월~현재 가천대학교 의용생체공학과 교수
관심분야 : 의료영상, 의료정보, 인공지능, 로봇