(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 5 월 7 일 (07.05.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/091201 A1

(51) 국제특허분류:
A61B 5/00 (2006.01) *A61B 3/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/010224

(22) 국제출원일: 2019 년 8 월 12 일 (12.08.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0131826 2018 년 10 월 31 일 (31.10.2018) KR
10-2019-0098246 2019 년 8 월 12 일 (12.08.2019) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: **엄영섭 (EOM, Young Sub)**; 05514 서울시 송파구 올림픽로 135 리센츠 201-1502, Seoul (KR). **권순일 (KOUN, Soon il)**; 15443 경기도 안산시 단원구 광덕2로 17 그린빌주공13단지 1311동 306호, Gyeonggi-do (KR). **김재영 (KIM, Jae Young)**; 07671 서울시 강서구 등촌로 163 등촌아이파크 102동 601호, Seoul (KR).

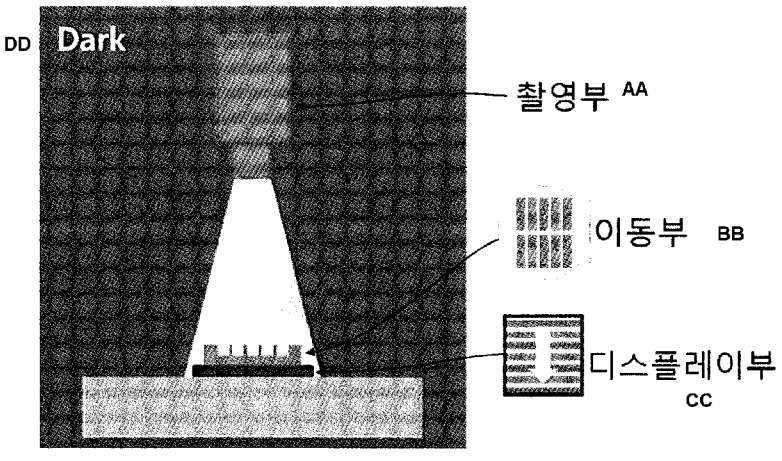
(74) 대리인: 특허법인다해 (**DAHAI INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM**); 06156 서울시 강남구 삼성로 531 고운빌딩 3층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: SYSTEM FOR EVALUATING VISUAL FUNCTION OF FISH, METHOD FOR SCREENING OCULAR TOXIC DRUG USING SAME, METHOD FOR RATING VISION OF FISH, AND COMPUTER-READABLE STORAGE MEDIUM

(54) 발명의 명칭: 어류의 시기능 평가 시스템 및 이를 이용한 안구 독성 약물 스크리닝 방법, 어류의 시력 등급화 방법 및 컴퓨터 판독 가능한 저장매체



AA ... Photographing unit
BB ... Movable unit
CC ... Display unit
DD ... Dark

(57) Abstract: The present invention relates to a system for evaluating a visual function of fish and a method for screening an ocular toxic drug using same. The system for evaluating visual function of fish according to the present invention provides an effect of sorting the degrees of visual function abnormality on a step-by-step basis.

(57) 요약서: 본 발명은 어류의 시기능 평가 시스템 및 이를 이용한 안구 독성 약물 스크리닝 방법에 대한 것이다. 본 발명에 따른 어류의 시기능 평가 시스템은, 시기능 이상 정도를 단계별로 구분하는 효과를 제공한다.

[다음 쪽 계속]

WO 2020/091201 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 어류의 시기능 평가 시스템 및 이를 이용한 안구 독성 약물 스크리닝 방법, 어류의 시력 등급화 방법 및 컴퓨터 판독 가능한 저장매체

기술분야

[1] 본 발명은 어류의 시기능 평가 시스템 및 이를 이용한 안구 독성 약물 스크리닝 방법, 어류의 시력 등급화 방법 및 컴퓨터 판독 가능한 저장매체에 대한 것이다.

배경기술

[2] 국내에서 발생한 가습기 살균제 사건을 계기로, 여러 가지 화학 물질에 대한 독성 연구의 중요성이 강조되고 있다. 또한, 여러 가지 약제와 화학 물질에서 안독성이 보고되고, 약제 및 화학물질에 의한 실명이 보고되기도 한다.

[3] 전 세계적으로 80,000종 이상의 화학 물질이 등록되어 있으며, 매년 수천 개의 새로운 물질이 의약품, 식품, 화장품 등의 원료로 사용되고 있어, 여러 화학 물질의 안구 독성 조기 스크리닝을 위한 방법 개발이 필요하다.

[4] 기존 연구들은 흰색과 검은색 또는 회색의 한 가지 대비 시자극에 대한 어류(예를 들면, 제브라피쉬)의 반응을 평가하여 시자극에 대한 어류의 반응 유무만 확인할 수 있으며, 약제 또는 유전질환에 의한 시기능의 소실이 있을 경우 시기능 이상 정도의 단계를 구분할 수 있을 뿐이다.

[5] 안과 영역에서 사용되는 시기능 평가 방법 중 하나인 대비 감도 검사는 공간 내의 인접한 물체 사이에 존재하는 서로 다른 세기의 빛(명시도 차이)을 감지해 내는 능력을 평가함으로써 보다 넓은 망막의 기능을 평가할 수 있다. 이는 문자를 이용한 시기능 평가 보다 더 민감한 평가법이다.

[6] 비특허문헌 1을 보면, 제브라피쉬의 대비 감도를 이용한 시각 검사 방법에 대하여 개시하고 있다. 그러나 비특허문헌 1은 유전적으로 변형되고 운동성이 없는 제브라피쉬 라바의 시각 퍼포먼스를 정량화할 뿐이다.

[7]

[8] 본 발명자들은 대비 감도 차이를 이용하여 시기능을 평가하는 방법에 대해 연구를 계속하여, 일반적인 검사에서는 확인할 수 없었던 시기능 이상을 확인할 뿐만 아니라 시기능 이상 정도를 단계별로 구분할 수 있는 객관적이고 정량화된 시기능 평가방법을 개발하고, 본 발명을 완성하였다.

[9] [비 특허문헌 1] Rinner, Oliver, Rick, Jens M, Neuhauss, Stephan C F. Contrast sensitivity, spatial and temporal tuning of the larval zebrafish optokinetic response *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, January 2005, Vol. 46, No. 1

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명의 목적은 어류의 시기능 평가 시스템을 제공하기 위한 것이다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 약물의 안구 독성 스크리닝 평가 방법을 제공하기 위한 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 어류의 시력 등급화 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결 수단

[13] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명은 어류의 시기능 평가 시스템을 제공한다.

[14]

[15] 상기 어류의 시기능 평가 시스템은, 다음을 포함할 수 있다:

[16] 기 설정된 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상이 디스플레이되는 디스플레이부;

[17] 상기 디스플레이 장치의 상부측에 위치되며, 상기 동영상에 시각적으로 반응하는 다수의 어류의 이동이 가능하도록 하는 이동부;

[18] 상기 이동부의 상부측로부터 소정 거리 이격되도록 설치되어, 상기 이동부를 촬영하는 촬영부; 및

[19] 상기 촬영 영상을 수신 및 분석하여 어류 이동 패턴을 분석하는 분석부.

[20] 상기 디스플레이부는 단계별 대비 감도(명시도) 차이가 있는 물흐름 시자극 패턴을 가지 동영상이 디스플레이될 수 있다.

[21]

[22] 도 1을 보면, 본 발명에 따른 어류의 시기능 평가 시스템은 디스플레이부; 이동부; 및 촬영부를 포함한다.

[23] 상기 디스플레이부 하부에는 지지대를 포함할 수도 있다.

[24]

[25] 본 발명에서 "대비 감도"란, 검사 공간 내의 인접한 물체 사이에 존재하는 서로 다른 세기의 빛(명시도 차이)을 말하며, "대비 감도 검사"란, 이러한 대비 감도의 차이를 감지해는 내는 능력을 평가하는 것을 말한다.

[26] 상기 단계별 대비 감도 차이가 있는 물흐름 시자극 패턴에서, 상기 단계별 대비 감도 차이란 색깔의 대비 감도 차이를 의미할 수 있다.

[27] 상기 대비 감도는 색깔별로 다양하게 단계를 정할 수 있고, 흰색/회색뿐만 아니라 회색/검은색, 흰색/파란색 등 다양한 색깔의 조합으로 대비 감도를 정할 수 있다.

[28] 상기 디스플레이부는 대비 감도 차이가 있는 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상이 디스플레이 될 수 있는 장치라면 어느 장치나 이용이 가능하다. 예를 들면 스마트폰, 태블릿 등 휴대성이 있는 디스플레이 구현 장치라면 어느 것이나 사용 가능하다.

[29] 상기 "물흐름 시자극 패턴"이란, 물 흐름을 보여주면서 동시에 일정 색깔의 반복 무늬의 시자극 패턴을 가지는 동영상 패턴을 말한다.

[30] "주류성(rheotaxis)"이란, 흐르는 물의 자극에 반응하는 세포나 동물의 이동을 의미한다.

[31] 일반적으로, 물이 흐르면 빛의 흐름은 물의 흐름과 반대 방향으로 생긴다. 치어(larvae)의 경우, 빛의 흐름을 따라 움직이는 경향이 있다.

[32] 본 발명은 이러한 어류의 주류성을 시기능 평가에 도입한 것이다. 구체적으로, 일정 빛(색깔)의 반복 무늬를 가지는 시자극 패턴 동영상을 재생하면, 반복 무늬의 시자극 패턴 동영상은 물 흐름과 반대 방향인 빛의 흐름으로 인지되고, 정상 시각을 가진 어류는 이에 반응하여 시자극 패턴 동영상의 시자극 방향으로 움직일 것이다.

[33] 본 발명에서는 상기 디스플레이부에서 단계별로 대비 감도에 차이가 있는 물흐름 시자극 패턴(시자극 등급표)을 가진 동영상을 제작하였다.

[34] 도 2는 일반적인 RGB 색상표이다(https://en.wikipedia.org/wiki/Web_colors 등 참고). 그레이(gray) 색상을 RGB로 표현하는 경우 0부터 255까지 256단계로 구별할 수 있다. 도 3의 맨 왼쪽(노란색)과 같이 그레이 등급을 일정한 간격(17)으로 16 단계로 나누는 경우, 짙은색의 색상이 더 몰려있게 느껴진다. 이는 사람이 색상의 밝기에 대해 비선형적으로 반응하기 때문이다. 따라서, 이를 비선형 전달 함수를 이용하여 색상의 밝기를 비선형적으로 변형시키는 감마 보정이 필요하다(도 3의 가운데 초록색). 감마 보정은 "Adobe® RGB (1998) Color Image Encoding"을 참고하여 수행하였다. 감마 보정을 하고 나면 밝은 색상의 분포가 더 많아진 것을 알 수 있다. 본 발명은 도 3의 맨 오른쪽과 같이 표시된 감마 보정값이 반영된 대비 감도 차이가 있는 시자극 등급표를 제작하여 이용하였다.

[35] 도 4는 도 3의 맨 오른쪽 등급표를 별도로 분리하여 나타낸 본 발명의 시자극 등급표이다.

[36] 본 발명의 상기 단계별 대비 감도(명시도) 차이가 있는 물흐름 시자극 패턴에서, 상기 단계별 대비 감도 차이는 도 4에 기재된 색상표의 색상 차이를 기준으로 할 수 있다.

[37] 상기 대비 감도 차이는 G4 단계 색상에서 G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13 또는 G14 단계 색상으로 차이를 주는 것일 수 있다.

[38] 구체적으로 도 4의 G4 단계의 색깔을 가지는 물흐름 동영상을 재생하고, 그 다음에 G7 단계의 색깔을 가지는 물흐름 동영상을 재생한 다음 어류의 이동 패턴을 분석하는 것이다. 그 다음 G4 단계의 색깔을 가지는 물흐름 동영상을 재생하고 그 다음에 G8 단계의 색깔을 가지는 물흐름 동영상을 재생하여 어류의 이동 패턴을 분석하는 것이다. 그리고 또 그 다음 G4 단계 색깔 물흐름 동영상을 재생하고 G9 단계 색깔 물흐름 동영상을 재생하는 순서이다.

[39]

[40] 상기 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상이 디스플레이되는 디스플레이부는, 일 방향의 흐름을 가진 물흐름 영상을 일정 시간 재생하고, 일정 시간 정지

이후에, 상기 재생 영상과 대비 감도에 차이를 가지면서 반대 방향의 흐름을 가진 물 흐름 영상이 일정 시간 재생될 수 있다.

[41] 일 구체예로, 상기 일 방향의 흐름을 가진 물흐름 영상을 5 내지 25초 재생하고, 1 내지 5초 정지 이후에, 상기 재생 영상과 대비 감도에 차이를 가지면서 반대 방향의 흐름을 가진 물 흐름 영상이 5 내지 25초 재생될 수 있다.

[42] 일시 시간 정지를 주는 이유는, 시자극 패턴 중 짙은 색깔 부분에 치어가 위치하는 경우, 치어 분간이 되지 않아 정확한 분석이 어려운 문제점이 발생할 경우 이를 해결하기 위한 것이다. 즉, 배경의 시자극 패턴 영상이 없는 상태에서 어류의 이동 거리를 평가하기 위함이다.

[43] 상기 이동부는 어류가 이동할 수 있는 투명 재질의 다수의 레인을 포함할 수 있다. 이는 촬영이 명확하게 이루어질 수 있게 하기 위함이다.

[44] 도 1에서 이동부에 표시된 화살표는 물 흐름 방향을 표시한 것이다.

[45] 상기 분석부는, 데스크탑, 노트북, 스마트폰 등과 같은 각종 컴퓨팅 장치로 구현될 수 있다

[46]

[47] 상기 분석부는 다음 식과 같이 어류의 이동 패턴을 분석할 수 있다:

[48]

$$\text{어류의 이동 개체 비율(\%)} = \frac{\text{물흐름 시자극 패턴 동영상에 반응하여 반대쪽으로 이동한 개체 수}}{\text{시작점 개체 수}} \times 100$$

[49]

[50] 또한 상기 분석부에서 어류의 이동 패턴 분석은 자동화 개체 추적을 통하여 수행할 수도 있다. 구체적으로 상기 자동화 개체 추적은 자동화 고성능 추적 시스템 (automated high-throughput tracking system) 등의 방법으로 구현될 수 있다.

[51] 상기 자동화 고성능 추적 시스템은 이 기술분야에 널리 알려져 있다. 예를 들면, Nodulus사의 DanioVision과 ViewPoint사의 ZebraLab 및 VisioBox 등이 있다.

[52] G4 단계의 물 흐름 동영상이 재생되는 것을 시작점으로 보고, G4 단계 물 흐름 동영상 재생 이후 G7 단계 동영상이 재생되었을 때 어류의 주류성으로 인해 시작점에서 반대쪽으로 이동한 개체수의 비율을 분석하는 것이다.

[53] 어류의 시기능이 정상이라면 주류성으로 인해 G4 다음에 G7의 물흐름 시자극 패턴 동영상이 재생되면 반대 방향으로 이동할 것이다. 그런데 만약 어류의 시기능이 손상되었다면, 반대 방향으로 이동하지 못할 것이다.

[54] 따라서 본 발명의 어류의 시기능 평가 시스템을 통해 어떤 약물이 안구 독성이 있는지 평가 할 수 있다. 검사하고자 하는 화합물을 어류에 처리한 다음 상기 언급한 시기능 평가 시스템에 적용하여, 피검 화합물이 처리된 약물이 안구 이상을 유발하는 지 여부를 평가할 수 있다.

[55] 더욱이 본 발명은 일반적인 검사에서는 확인할 수 없었던 시기능 이상을

확인할 수 있으며, 시기능 이상 정도를 단계별로 구분할 수 있도록 객관적이고 정량화된 평가법을 제공한다.

[56]

[57] 상기 어류는 제브라피쉬(zebrafish)일 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.

[58] 상기 제브라피쉬는 수정 후 4일 이상인 치어일 수 있다.

[59]

[60] 다른 측면에서 본 발명은,

[61] 어류들에 약물을 처리하고; 그리고

[62] 상기 어류들이 대비 감도 차이가 있는 물흐름 시자극에 대해 반응하여 이동한 개체수를 검출하는;

[63] 단계를 포함하는 약물의 안구 독성 스크리닝 방법을 제공한다.

[64] 상기 대비 감도 차이가 있는 물흐름 시자극은, 앞서 설명한 바와 같이, 도 4에 개시된 시자극 등급표에 기반하여 시자극 등급 차이가 있는 물흐름 시자극을 의미한다. 예를 들면, G4 단계의 물흐름 시자극 다음에 G7 단계의 물흐름 시자극이 주어진다면, 이것이 "대비 감도 차이가 있는 물흐름 시자극"이 될 것이다.

[65] 앞서 설명한 바와 같이, 어류의 주류성으로 인해 대비 감도 차이가 있는 물흐름 시자극에 대해 정상적으로 반응하면 어류가 반대 방향으로 이동할 것이다. 약물 처리된 어류의 반대 방향으로 이동한 개체수의 비율을 분석하였는데, 정상 어류의 대비 감도 차이 물흐름 시자극에 반응하여 반대 방향으로 이동하는 개체 비율에 비해서 일정 수준으로 반대 방향으로 이동하는 개체 비율이 감소되어 있다면 그 약물은 안구 독성이 있는 약물로 평가할 수 있을 것이다.

[66] 상기 어류는 제브라피쉬(zebrafish)일 수 있다.

[67] 상기 제브라피쉬는 수정 후 4일 이상인 치어일 수 있다.

[68] 상기 약물은 안독성 평가가 필요한 약물이라면 어느 것이나 포함될 수 있다. 구체적으로, 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소 및 단백질로 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이로 제한 되는 것은 아니다.

[69] 상기 어류들에 약물을 처리한 단계 이후에, 일정 시간 동안 암순응 단계를 거친 다음에, 상기 어류들의 물흐름 시자극에 대한 반응을 검출하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[70] 상기 암순응은 20 내지 60분 수행할 수 있다.

[71] 본 발명의 어류의 시기능 평가 시스템은 암실에서 수행되는데, 그 이유는 물흐름 시자극 이외에 다른 시자극을 최소화하기 위함이다. 따라서 어류의 물흐름 시자극에 대한 반응 전에 암순응을 실시하면, 물흐름 시자극에 대한 민감도가 더욱 높아지는 효과가 있다.

[72] 상기 검출 단계는, 앞서 언급한 본 발명의 어류의 시기능 평가 시스템을

이용하여 상기 동물의 시기능을 평가하는 단계일 수 있다.

[73]

[74] 덧붙여 상기한 과제의 해결수단은, 본 발명의 특징을 모두 열거한 것이 아니다. 본 발명의 다양한 특징과 그에 따른 장점과 효과는 아래의 구체적인 실시형태를 참조하여 보다 상세하게 이해될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[75] 본 발명에 따른 어류의 시기능 평가 시스템은, 시기능 이상 정도를 단계별로 구분하는 효과를 제공한다. 상기 어류의 시기능 평가 시스템을 이용한 본 발명의 안구 독성 스크리닝 방법은, 신약의 안독성 및 안전성 평가에 대한 신속하고 효율적인 대규모 스크리닝 기술이 가능한 효과를 제공한다.

[76] 또한, 본 발명에 따른 어류의 시력 등급화 방법은, 어류의 시력을 등급화하여 시기능의 손상 정도를 정량화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[77] 도 1은 본 발명에 따른 어류의 시기능 평가 시스템의 모식도이다.

[78] 도 2는 일반적인 RGB 색상표이다.

[79] 도 3은 본 발명의 시자극 등급표 제작 과정을 나타낸 것이다.

[80] 도 4는 본 발명의 시자극 등급표이다.

[81] 도 5는 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상 구현 방법을 나타낸 모식도이다.

[82] 도 6은 암순응(상), 명순응(중), 비순응(하)에 따른 제브라피쉬 반응 실험 결과를 나타낸 것이다.

[83] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 Digoxigenin 농도 별 제브라피쉬 안구 독성 평가 결과이다.

[84] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 Gentamicin 농도 별 제브라피쉬 안구 독성 평가 결과이다.

[85] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 어류의 시력 등급화 방법의 흐름도이다.

[86] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 초기 반응 특성을 설명하기 위한 그래프이다.

[87] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 물흐름 시자극 패턴의 단계별 대비 감도 차이에 따른 평균 초기 반응 속도 및 최대 초기 반응 속도를 비교한 결과를 도시하는 도면이다.

[88] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 물흐름 시자극 패턴의 단계별 대비 감도 차이에 따른 초기 반응률을 비교한 결과를 도시하는 도면이다.

[89] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 복수의 단계별 대비 감도 차이가 있는 하나 이상의 물흐름 시자극 패턴에 따른 초기 반응률의 곡선하 면적을 평균한 결과를 도시하는 도면이다.

[90] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 반응 종료 특성을 설명하기 위한 그래프이다.

[91] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 물흐름 시자극 패턴의 단계별 대비 감도 차이에 따른 평균 반응 종료 속도를 비교한 결과를 도시하는 도면이다.

[92] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따라 복수의 단계별 대비 감도 차이가 있는 하나 이상의 물흐름 시자극 패턴에 따른 전체 반응률의 곡선하 면적을 평균한 결과를 도시하는 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[93] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있도록 바람직한 실시예를 상세히 설명한다. 다만, 본 발명의 바람직한 실시예를 상세하게 설명함에 있어, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략한다. 또한, 유사한 기능 및 작용을 하는 부분에 대해서는 도면 전체에 걸쳐 동일한 부호를 사용한다.

[94] 덧붙여, 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 '연결'되어 있다고 할 때, 이는 '직접적으로 연결'되어 있는 경우뿐만 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 '간접적으로 연결'되어 있는 경우도 포함한다. 또한, 어떤 구성요소를 '포함'한다는 것은, 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[95]

[96] **실시예 1: 제브라피쉬의 시기능 평가 시스템 구축**

[97] 수정 후 4일된 제브라피쉬 치어를 사용하였다. 제브라피쉬 시기능을 효과적으로 평가할 수 있는 물흐름 시자극 동영상 구현 방법으로, 처음 일정 시간 (예, 45분간) 암순응 혹은 명순응 이후 암실에서 이동부 아래에 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상이 디스플레이되는 디스플레이부를 재생하여 촬영부를 통해 비디오 녹화를 시행하였다(도 1).

[98] 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상은 도 5에 모식적으로 나타내었다. 제브라피쉬를 출발 기준점으로 이동시키기 위하여 물흐름 동영상을 한쪽 방향으로 흐르도록 일정 시간 (예, 15초간) 재생 후, 1초의 멈춤 이후, 대비 감도에 차이 물흐름 동영상이 반대 방향으로 일정 시간 (예, 15초씩) 재생되도록 하였다.

[99] 암순응, 명순응 및 비순응 조건에서 제브라피쉬의 반응 결과를 알아보기 위해, 암실에서 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상이 디스플레이되는 디스플레이부를 재생하기 전에 암순응, 명순을 및 비순응 조건을 주었다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[100] 도 6을 보면, 대비 감도 차이가 있는 물흐름 시자극 동영상에 노출 전, 45분 암순응 후 시행한 실험이 명순응 및 비순응에 비해서 대비 감도 차이에 따른 제브라피쉬의 반응을 평가하기 좋은 조건임을 알 수 있었다. 이는 암순응 이후 물이 흐를 때 반대 방향으로 생기는 빛의 흐름을 보다 잘 인지할 수 있기 때문으로 생각된다.

[101]

[102] **실시예 2: Digoxigenin 약물의 안구 독성 평가**

[103] 수정 후 4 또는 5일 된(4 ~ 5 days post fertilization, DPF) 치어에 24 시간 동안 Digoxigenin 약물을 처리하였다. 그리고 5 DPF에서 시기능 평가를 수행하였다. 대조군으로 DMSO를 처리한 제브라피쉬를 이용하였다. 그룹 당 30마리씩 검사하였고, 6회 반복 실험을 실시하여 통계 분석을 진행하였다. Digoxigenin은 5 uM, 10 uM 및 15 uM 농도로 처리하였다.

[104] 실시예 1에 기재된 대로, 암순응을 거친 다음, 암실에서 시기능 평가 시스템을 수행하였다. 구체적으로, 대비 감도 차이는 도 4의 시자극 등급표를 기준으로 G4에서 G7; G4에서 G8; G4에서 G9; G4에서 G10; G4에서 G11; G4에서 G12 및 G4에서 G13으로 단계별로 대비 감도에 차이가 있는 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상을 디스플레이부에서 재생하였다. 시기능이 정상인 제브라피쉬는 G4 단계의 시자극을 받으면 왼쪽으로 모이고, G7, G8, G9, G10, G11, G12 또는 G13 단계의 시자극을 받으면 오른쪽(반대쪽)으로 이동하게 된다. 만약 시기능에 이상 있는 제브라피쉬의 경우 대비 감도가 감소되어 있는 시자극 이동 방향인 오른쪽(반대쪽)으로 잘 움직이지 않을 것이다. 제브라피쉬의 이동 개체 비율을 분석하여 도 7에 나타내었다.

[105] 도 7을 보면, G4에서 DMSO, Digoxigenin 5 uM, 10 uM을 처리한 군 사이에는 시기능에 차이가 없으나, Digoxigenin 15 uM 처리 군에서 유의하게 시기능 저하 소견이 관찰되었다. 또한 시자극 단계별 대비 감도 차이가 작아질수록 시자극에 따른 이동 계체 비율이 감소함을 확인하였다. 또한 G4에서 G9, G4에서 G10, G4에서 G11의 대비 감도 차이가 있는 경우, DMSO, Digoxigenin 각각 10 uM, 15 uM 사이에 시기능 차이가 있음을 확인하였다. 시자극 검사의 모든 구간에서 DMSO와 Digoxigenin 5 uM 사이에는 시기능 차이가 없었다.

[106]

[107] **실시예 3: Gentamicin 약물의 안구 독성 평가**

[108] Digoxigenin 대신 Gentamicin을 사용한 것을 제외하고는 실시예 3과 동일하게 안구 독성 평가를 수행하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에 나타난 바와 같이, 시자극 단계별 대비 감도가 작아질수록 시자극에 따른 이동 계체 비율이 선형으로 감소함을 알 수 있다. 또한 G4 단계에서 G8~G13 단계로의 시자극을 준 경우, 4 그룹(DMSO, Gentamicin 5uM, 10uM 및 15uM) 사이에 Gentamicin의 농도에 따른 시기능 저하의 차이를 구별할 수 있었다.

[109]

[110] 본 발명은 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 의해 한정되는 것이 아니다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명에 따른 구성요소를 치환, 변형 및 변경할 수 있다는 것이 명백할 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[111] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 어류의 시력 등급화 방법의 흐름도이다.

[112] 도 9를 참조하면, 우선, 기 설정된 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상이 디스플레이됨에 따라 이동하는 어류의 영상을 획득할 수 있다(S110).

[113] 본 발명에서는 단계별 대비 감도 차이, 즉 색깔의 대비 감도 차이가 있는 물흐름 시자극 패턴을 가진 동영상을 디스플레이하고, 이에 반응하여 이동하는 어류의 영상을 획득할 수 있다.

[114] 일 실시예에 따르면, 도 4와 같이 G1 내지 G16의 16 단계로 구분된 색상표에서 G4 단계 색상에서 G7 내지 G12 단계 중 어느 하나 이상의 색상으로 차이를 주어 대비 감도 차이가 있는 하나 이상의 물흐름 시자극 패턴을 사용할 수 있다.

[115]

[116] 이후, 어류의 영상을 분석하여 초기 반응 특성 및 반응 종료 특성 중 적어도 하나를 산출할 수 있다(S120).

[117] 여기서, 초기 반응 특성은 평균 초기 반응 속도, 최대 초기 반응 속도 및 초기 반응률 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[118] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 초기 반응 특성을 설명하기 위한 그래프이다.

[119] 도 10을 참조하면, 잠복기는 자극 시작 후에 첫번째 개체가 출발점 경계선을 통과할 때까지 걸리는 시간을 나타내고, 평균 초기 반응 속도는 하기의 수식에 따라 산출할 수 있으며, 최대 초기 반응 속도는 도 10에 도시된 개체수 변화곡선에서 가장 많은 개체수 감소 속도를 보이는 시간에서의 접선의 기울기로 산출할 수 있다.

[120]

$$\text{평균초기반응속도} = \frac{\text{출발결개체감소수}(n)}{\text{자극종료시간} - \text{잠복기}(sec)}$$

[121] 또한, 초기 반응률은 하기의 수식에 따라 산출할 수 있다.

[122]

$$\text{초기반응률}(\%) = \frac{\text{자극시작시출발결개체수} - \text{자극종료시출발결개체수}}{\text{자극시작시출발결개체수}} \times 100$$

[123]

[124] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 물흐름 시자극 패턴의 단계별 대비 감도 차이에 따른 평균 초기 반응 속도 및 최대 초기 반응 속도를 비교한 결과를 도시하는 도면으로, 도 11의 (a)는 평균 초기 반응 속도를 나타내고, (b)는 최대 초기 반응 속도를 나타낸다.

[125] 구체적으로, 도 11은 대조군 어류(즉, 정상 어류, control)와 Gentamicin 처리 농도 별(5uM, 10uM, 15uM) 어류에 대해 G7 내지 G12 단계의 색상으로 각각 대비 감도 차이를 준 경우의 평균 초기 반응 속도와 최대 초기 반응 속도를 나타내는 것으로, G7 및 G8 단계의 색상의 경우에 농도 별 반응 특성의 구분이 비교적

명확함을 알 수 있다.

[126]

[127] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 물흐름 시자극 패턴의 단계별 대비 감도 차이에 따른 초기 반응률을 비교한 결과를 도시하는 도면이다.

[128] 도 12 역시 대조군 어류(control)와 Gentamicin 처리 농도 별(5uM, 10uM, 15uM) 어류에 대해 G7 내지 G12 단계의 색상으로 각각 대비 감도 차이를 준 경우의 초기 반응률을 나타내는 것으로, G7 및 G8 단계의 색상의 경우에 농도 별 반응 특성의 구분이 비교적 명확함을 알 수 있다.

[129]

[130] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 복수의 단계별 대비 감도 차이가 있는 하나 이상의 물흐름 시자극 패턴에 따른 초기 반응률의 곡선하 면적을 평균한 결과를 도시하는 도면으로, (a)는 Digoxigenin 처리 농도 별로 G7 내지 G12 단계의 색상으로 각각 대비 감도 차이를 준 경우의 초기 반응률의 곡선하 면적을 평균한 결과를 나타내고, (b)는 Digoxigenin 처리 농도 별로 G10 내지 G12 단계의 색상으로 각각 대비 감도 차이를 준 경우의 초기 반응률의 곡선하 면적을 평균한 결과를 나타낸다.

[131] 도 13을 참조하면, 복수의 단계별 대비 감도 차이가 있는 하나 이상의 물흐름 시자극 패턴에 따른 반응 특성을 평균한 결과를 사용하는 경우에도 농도 별 반응 특성의 구분이 비교적 명확함을 알 수 있다.

[132] 다시 말해, 약물의 처리 농도가 높아질수록 시기능의 손상 정도가 심해질 수 있고, 이와 같은 시기능의 손상 정도에 따라 초기 반응 특성도 차등화되어 나타난다.

[133] 이에, 본 발명에서는 이와 같은 초기 반응 특성을 정상군과 비교한 결과를 기초로 어류의 시력을 등급화하는 방법을 제시한다.

[134]

[135] 한편, 반응 종료 특성은 평균 반응 종료 속도, 최대 반응 종료 속도 및 전체 반응률 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[136] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 반응 종료 특성을 설명하기 위한 그래프이다.

[137] 도 14를 참조하면, 최소반응시간은 자극 시작 후에 첫번째 개체가 도착점 경계선을 통과할 때까지 걸리는 시간을 나타내고, 평균 반응 종료 속도는 하기의 수식에 따라 산출할 수 있으며, 최대 반응 종료 속도는 도 14에 도시된 개체수 변화곡선에서 가장 많은 개체수 증가 속도를 보이는 시간에서의 접선의 기울기로 산출할 수 있다.

[138]

$$\text{평균반응종료속도} = \frac{\text{도착점 개체 증가수 (}n\text{)}}{\text{자극종료시간} - \text{최소반응시간(sec)}}$$

[139] 또한, 전체 반응률은 하기의 수식에 따라 산출할 수 있다.

[140] $$\text{전체반응률}(\%) = \frac{\text{자극종료시도착결개체수} - \text{자극시작시도착결개체수}}{\text{자극시작시출발결개체수} - \text{자극시작시도착결개체수}} \times 100$$

[141]

[142] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 물흐름 시자극 패턴의 단계별 대비 감도 차이에 따른 평균 반응 종료 속도를 비교한 결과를 도시하는 도면이다.

[143] 구체적으로, 도 15는 대조군 어류(control)와 Gentamicin 처리 농도 별(5uM, 10uM, 15uM) 어류에 대해 G7 내지 G12 단계의 색상으로 각각 대비 감도 차이를 준 경우의 평균 반응 종료 속도를 나타내는 것으로, G7 및 G8 단계의 색상의 경우에 농도 별 반응 특성의 구분이 비교적 명확함을 알 수 있다.

[144]

[145] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따라 복수의 단계별 대비 감도 차이가 있는 하나 이상의 물흐름 시자극 패턴에 따른 전체 반응률의 곡선하 면적을 평균한 결과를 도시하는 도면으로, (a)는 Digoxigenin 처리 농도 별로 G7 내지 G12 단계의 색상으로 각각 대비 감도 차이를 준 경우의 전체 반응률의 곡선하 면적을 평균한 결과를 나타내고, (b)는 Digoxigenin 처리 농도 별로 G10 내지 G12 단계의 색상으로 각각 대비 감도 차이를 준 경우의 전체 반응률의 곡선하 면적을 평균한 결과를 나타낸다.

[146] 도 16을 참조하면, 복수의 단계별 대비 감도 차이가 있는 하나 이상의 물흐름 시자극 패턴에 따른 반응 특성을 평균한 결과를 사용하는 경우에도 농도 별 반응 특성의 구분이 비교적 명확함을 알 수 있다.

[147] 다시 말해, 약물의 처리 농도가 높아질수록 시기능의 손상 정도가 심해질 수 있고, 이와 같은 시기능의 손상 정도에 따라 반응 종료 특성도 차등화되어 나타난다.

[148] 이에, 본 발명에서는 이와 같은 반응 종료 특성을 정상군과 비교한 결과를 기초로 어류의 시력을 등급화하는 방법을 제시한다.

[149]

[150] 이후, 산출한 초기 반응 특성 및 반응 종료 특성 중 적어도 하나를 기초로 어류의 시력을 등급화할 수 있다(S130).

[151] 일 실시예에 따르면, 초기 반응 특성 및 반응 종료 특성 중 적어도 하나에 대해 대조군 어류의 특성값 대비 어류의 특성값의 비율을 기 설정된 등급화 기준과 비교하여 어류의 시력을 등급화할 수 있다.

[152]

[153] 도 9를 참조하여 상술한 어류의 시력 등급화 방법은 영상 처리 및 연산이 가능한 프로세싱 장치에 의해 수행될 수 있다.

[154]

[155] 또한, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 도 9를 참조하여 상술한 어류의 시력 등급화 방법의 각 단계를 실행하기 위한 프로세서에 의해 실행 가능한 명령들이

기록된 컴퓨터 판독 가능한 저장매체가 제공될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 기 설정된 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상이 디스플레이되는 디스플레이부;
상기 디스플레이 장치의 상부측에 위치되며, 상기 동영상에 시각적으로 반응하는 다수의 어류의 이동이 가능하도록 하는 이동부;
상기 이동부의 상부측로부터 소정 거리 이격되도록 설치되어, 상기 이동부를 촬영하는 촬영부; 및
상기 촬영 영상을 수신 및 분석하여 어류 이동 패턴을 분석하는 분석부;
를 포함하는 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 디스플레이부는 단계별 대비 감도 차이가 있는 물흐름 시자극 패턴을 가지 동영상이 디스플레이 되는 것인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 단계별 대비 감도 차이가 있는 물흐름 시자극 패턴에서, 상기 단계별 대비 감도 차이란 색깔의 대비 감도 차이인 것인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 단계별 대비 감도(명시도) 차이가 있는 물흐름 시자극 패턴에서, 상기 단계별 대비 감도 차이는 도 4에 기재된 색상표의 색상 차이를 기준으로 하는 것인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 대비 감도 차이는 G4 단계 색상에서 G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13 또는 G14 단계 색상으로 차이를 주는 것인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 물흐름 시자극 패턴을 가지 동영상이 디스플레이되는 디스플레이부는, 일 방향의 흐름을 가진 물흐름 영상을 일정 시간 재생하고, 일정 시간 정지 이후에, 상기 재생 영상과 대비 감도에 차이를 가지면서 반대 방향의 흐름을 가진 물 흐름 영상이 일정 시간 재생되는 것인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 일 방향의 흐름을 가진 물흐름 영상을 5 내지 25초 재생하고, 1 내지 5초 정지 이후에, 상기 재생 영상과 대비 감도에 차이를 가지면서 반대 방향의 흐름을 가진 물 흐름 영상이 5 내지 25초 재생되는 것인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 이동부는 어류가 이동할 수 있는 투명 재질의 다수의 레인을 포함하는 것인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 분석부는 다음 식과 같이 어류의 이동 패턴을 분석하는 것인, 어류의 시기능 평가 시스템:

$$\text{어류의 이동 개체 비율(\%)} = \frac{\text{물흐름 시자극 패턴 동영상에 반응하여 반대쪽으로 이동한 개체 수}}{\text{시작점 개체 수}} \times 100$$

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 분석부는 어류 자동화 고성능 추적 시스템(automated high-throughput tracking system)을 이용하여 어류의 이동 패턴을 분석하는 것인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 어류는 제브라피쉬(zebrafish)인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 제브라피쉬는 수정후 4일 이상인 치어인 것인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 13] 어류들에 약물을 처리하고; 그리고
상기 어류들이 대비 감도 차이가 있는 물흐름 시자극에 대해 반응하여 이동한 개체수를 검출하는;
단계를 포함하는 약물의 안구 독성 스크리닝 방법.

[청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 어류는 제브라피쉬(zebrafish)인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 제브라피쉬는 수정후 4일 이상인 치어인 것인, 어류의 시기능 평가 시스템.

[청구항 16] 제13항에 있어서,
상기 약물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소 및 단백질로 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나인 것인, 약물의 안구 독성 스크리닝 방법.

[청구항 17] 제13 항에 있어서,
상기 어류들에 약물을 처리한 단계 이후에,
일정 시간 동안 암순응 단계를 더 포함하는 것인, 약물의 안구 독성 스크리닝 방법.

[청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 암순응은 20 내지 60분 수행하는 것인, 약물의 안구 독성 스크리닝 방법.

[청구항 19] 제13항에 있어서,

상기 검출 단계는,
제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 평가 시스템을 이용하여 상기 동물의 시기능을 평가하는 단계를 포함하는 약물의 안구 독성 스크리닝 방법.

[청구항 20] 기 설정된 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상이 디스플레이됨에 따라 이동하는 어류의 영상을 획득하는 단계;
상기 어류의 영상을 분석하여 초기 반응 특성 및 반응 종료 특성 중 적어도 하나를 산출하는 단계; 및
상기 초기 반응 특성 및 반응 종료 특성 중 적어도 하나를 기초로 상기 어류의 시력을 등급화하는 단계를 포함하는 어류의 시력 등급화 방법.

[청구항 21] 제 20 항에 있어서,
상기 초기 반응 특성은 평균 초기 반응 속도, 최대 초기 반응 속도 및 초기 반응률 중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 어류의 시력 등급화 방법.

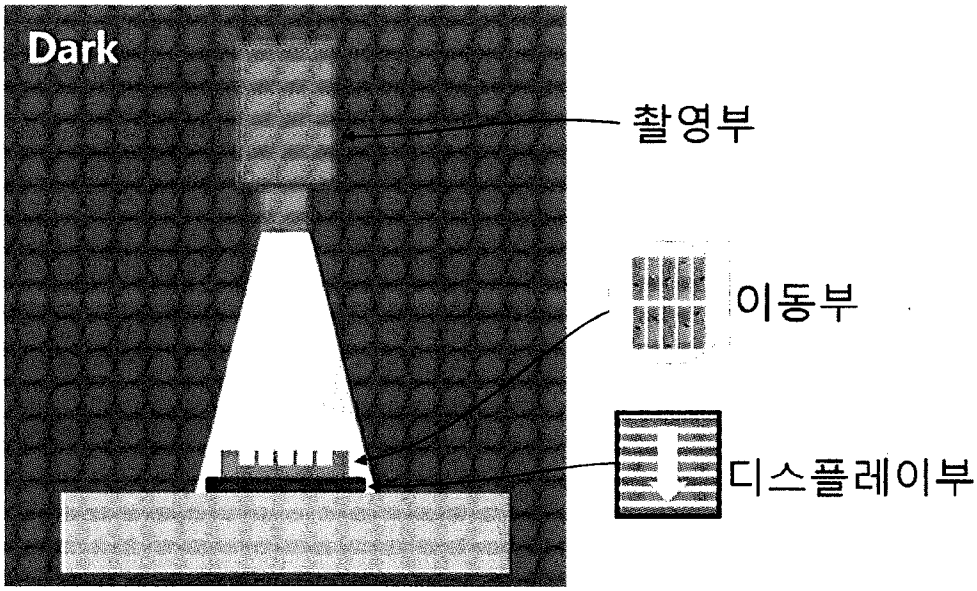
[청구항 22] 제 20 항에 있어서,
상기 반응 종료 특성은 평균 반응 종료 속도, 최대 반응 종료 속도 및 전체 반응률 중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 어류의 시력 등급화 방법.

[청구항 23] 제 20 항에 있어서, 상기 어류의 시력을 등급화하는 단계는,
상기 초기 반응 특성 및 반응 종료 특성 중 적어도 하나에 대해 대조군 어류의 특성값 대비 상기 어류의 특성값의 비율을 기 설정된 등급화 기준과 비교하여 상기 어류의 시력을 등급화하는 것을 특징으로 하는 어류의 시력 등급화 방법.

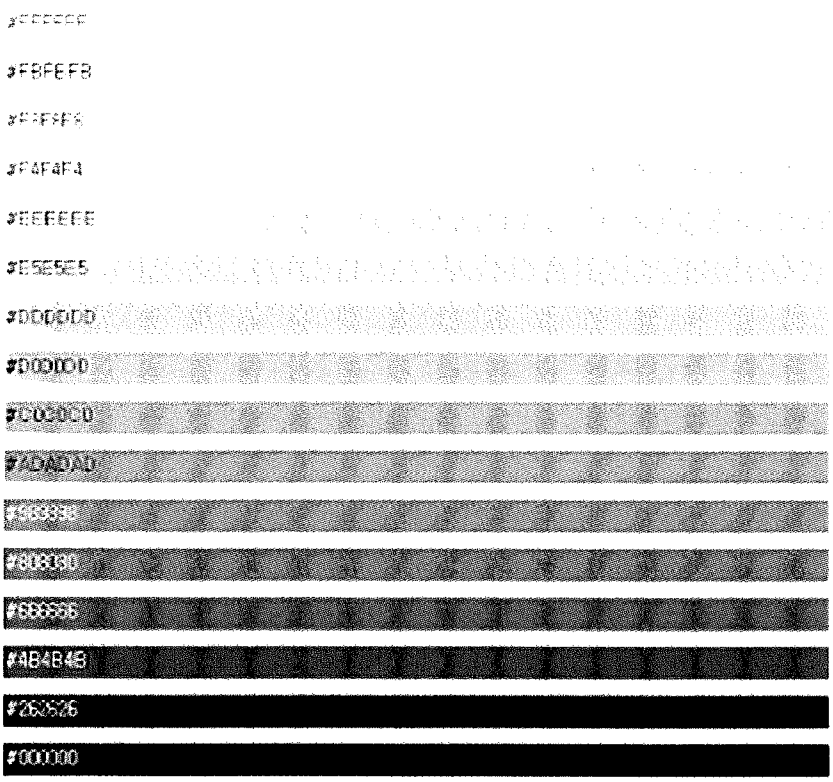
[청구항 24] 제 20 항에 있어서, 상기 어류의 영상을 획득하는 단계는,
G1 내지 G16의 16 단계로 구분되어 기 정해진 색상표에서 G4 단계 색상에서 G7 내지 G12 단계 중 어느 하나 이상의 색상으로 차이를 주어 대비 감도 차이가 있는 하나 이상의 물흐름 시자극 패턴을 사용하는 것을 특징으로 하는 어류의 시력 등급화 방법.

[청구항 25] 제 20 항에 따른 어류의 시력 등급화 방법을 실행하기 위한 프로세서에 의해 실행 가능한 명령들이 기록된 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체.

[도1]


Dark
촬영부
이동부
디스플레이부

[도2]


#FBFBFB
#F4F4F4
#EEEEEE
#E5E5E5
#DDDDDD
#D0D0D0
#C0C0C0
#ADADAD
#808080
#666666
#4B4B4B
#262626
#000000

[도3]

간격 17로 일정

선형값(0~255) / 255

선형값(0~1)^(1/2.199)

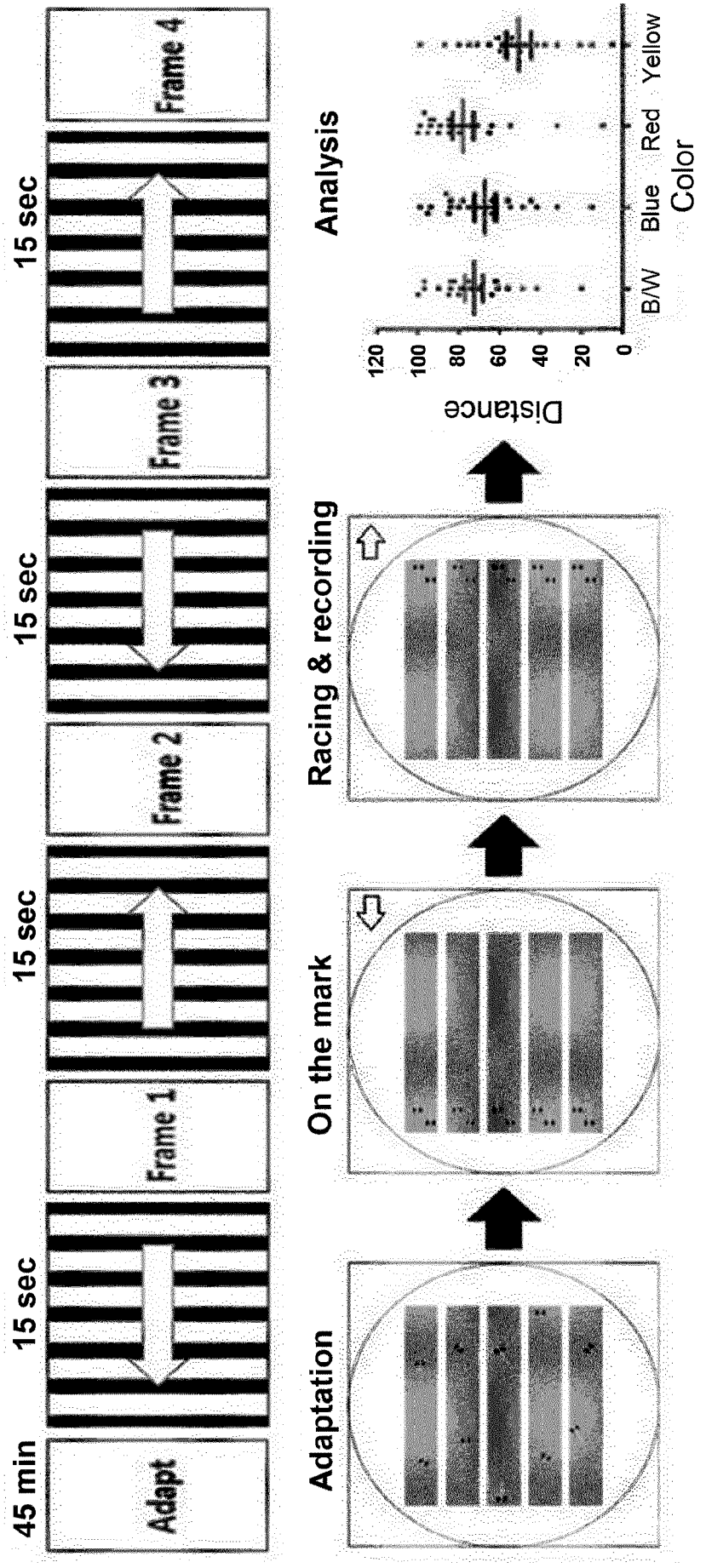
γ보정값(0~1)x255

	선형값			γ보정 계산값				연구에서 사용한 값			
16단계	Gray	선형	0-1	16단계	γ보정	γ보정	Gray	16단계	16진수	10진수	Gray
16		255	1.00	16	1.00	255		16	#FFFFFF	255	
15		238	0.93	15	0.97	247		15	#FBFBFB	251	
14		221	0.87	14	0.94	239		14	#F8F8F8	248	
13		204	0.80	13	0.90	230		13	#F4F4F4	244	
12		187	0.73	12	0.87	221		12	#EEEEEE	238	
11		170	0.67	11	0.83	212		11	#E5E5E5	229	
10		153	0.60	10	0.79	202		10	#DDDDDD	221	
9		136	0.53	9	0.75	192		9	#D0D0D0	208	
8		119	0.47	8	0.71	180		8	#C0C0C0	192	
7		102	0.40	7	0.66	168		7	#ADADAD	173	
6		85	0.33	6	0.61	155		6	#989898	152	
5		68	0.27	5	0.55	140		5	#808080	128	
4		51	0.20	4	0.48	123		4	#666666	102	
3		34	0.13	3	0.40	102		3	#4B4B4B	75	
2		17	0.07	2	0.29	74		2	#262626	38	
1		0	0.00	1	0.00	0		1	#000000	0	

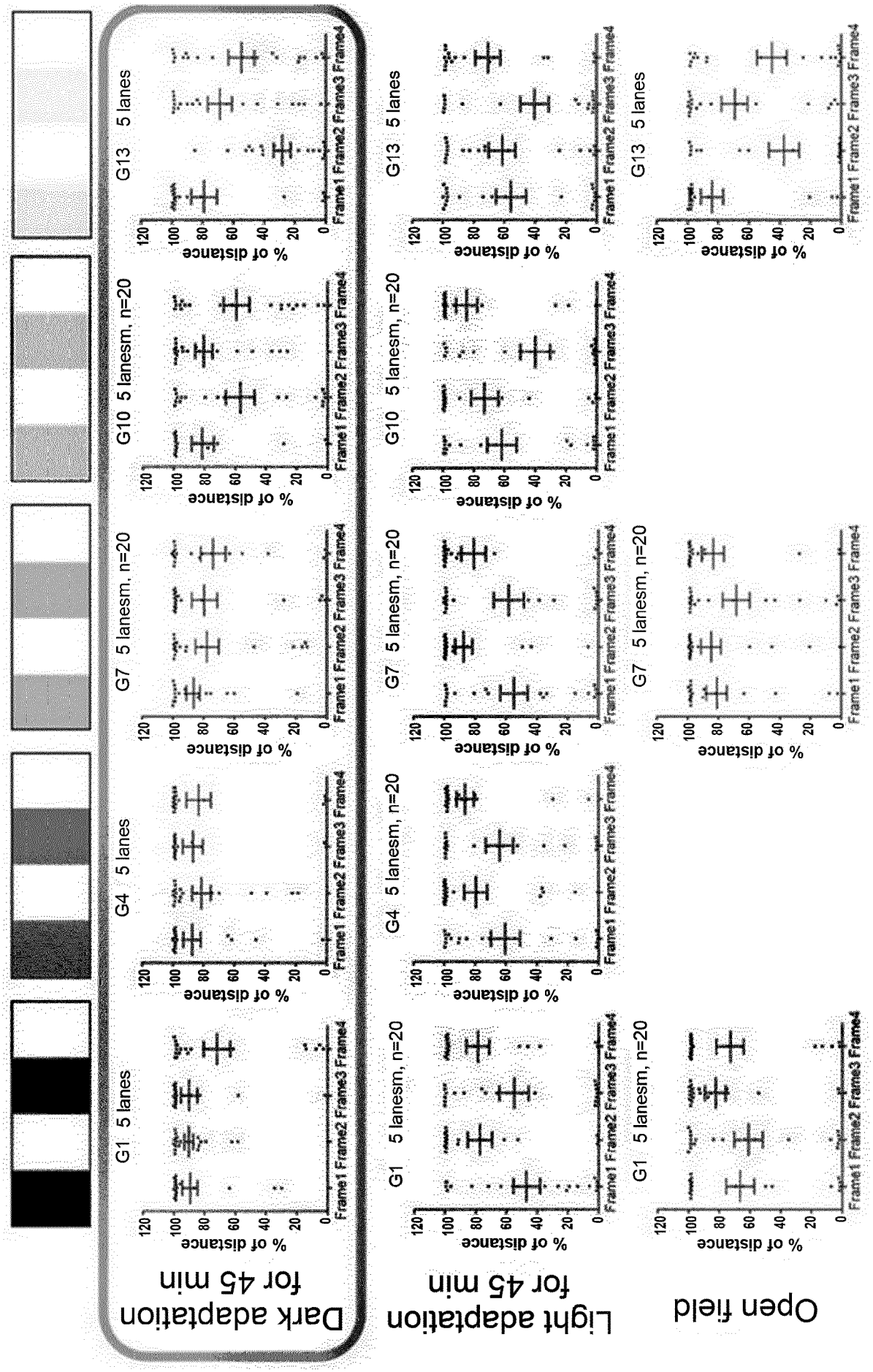
[도4]

R,G,B	Grade
255	16
251	15
248	14
244	13
238	12
229	11
221	10
208	9
192	8
173	7
152	6
128	5
102	4
75	3
38	2
0	1

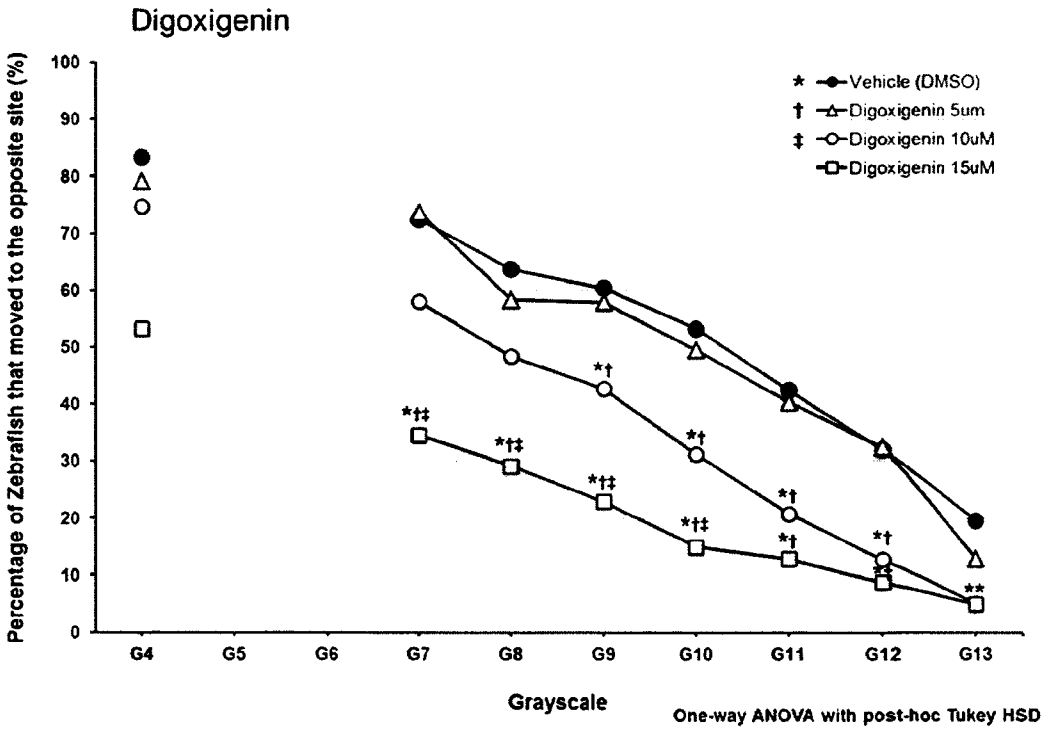
[도5]


45 min
Adapt
15 sec
Frame 1
15 sec
Frame 2
15 sec
Frame 3
15 sec
Frame 4
Adaptation
On the mark
Racing & recording
Analysis
Distance
120
100
80
60
40
20
0
B/W
Blue
Red
Yellow
Color

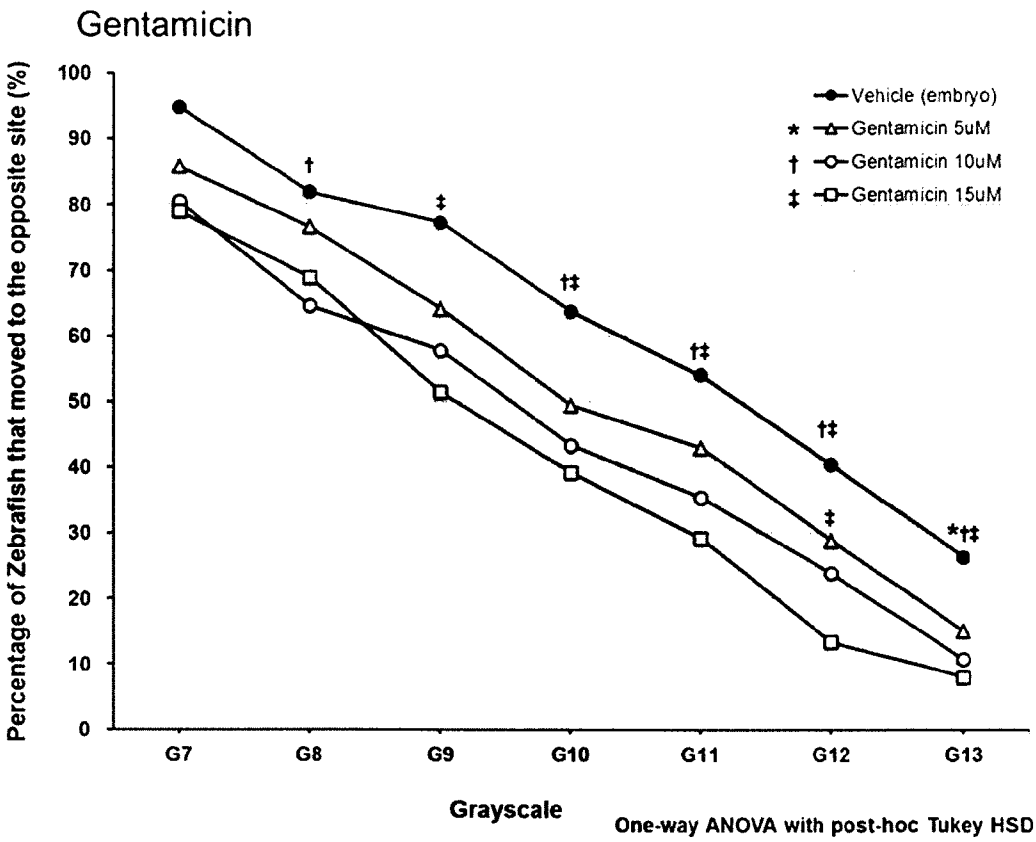
[도6]


Dark adaptation for 45 min
Light adaptation for 45 min
Open field
G1 5 lanes
G4 5 lanes
G7 5 lanesm, n=20
G10 5 lanesm, n=20
G13 5 lanes
G1 5 lanesm, n=20
G4 5 lanesm, n=20
G7 5 lanesm, n=20
G10 5 lanesm, n=20
G13 5 lanes
G1 5 lanesm, n=20
G4 5 lanesm, n=20
G7 5 lanesm, n=20
G10 5 lanesm, n=20
G13 5 lanes
% of distance
Frame1 Frame2 Frame3 Frame4

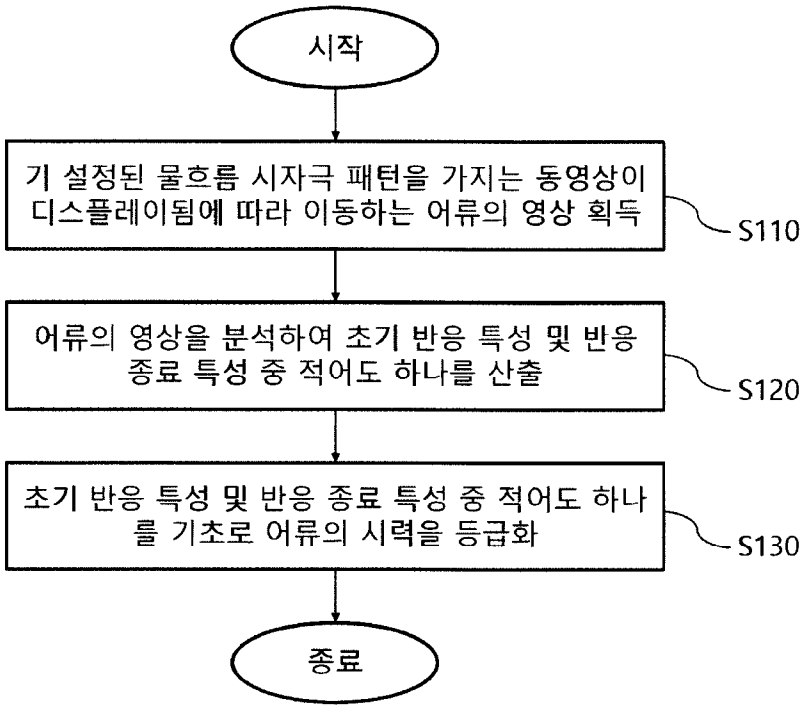
[도7]


Digoxigenin
Percentage of Zebrafish that moved to the opposite site (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
* Vehicle (DMSO)
† Digoxigenin 5um
‡ Digoxigenin 10uM
Digoxigenin 15uM
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10
G11
G12
G13
Grayscale
One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD

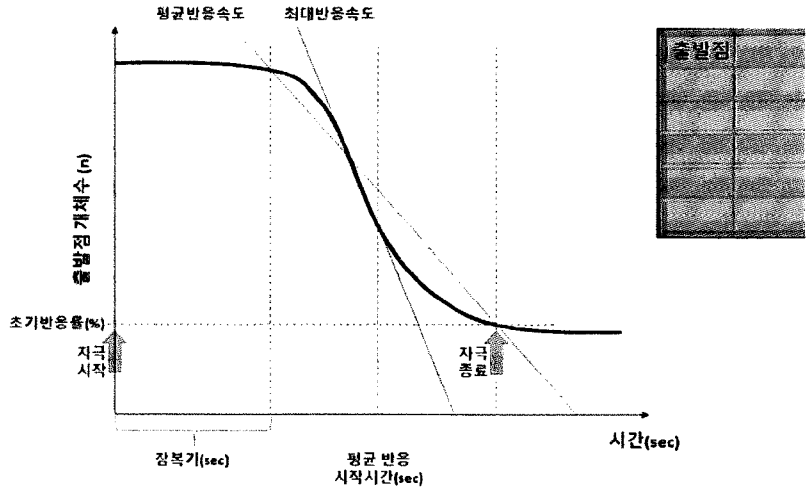
[도8]


Gentamicin
Percentage of Zebrafish that moved to the opposite site (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Vehicle (embryo)
* Gentamicin 5uM
† Gentamicin 10uM
‡ Gentamicin 15uM
G7
G8
G9
G10
G11
G12
G13
Grayscale
One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD

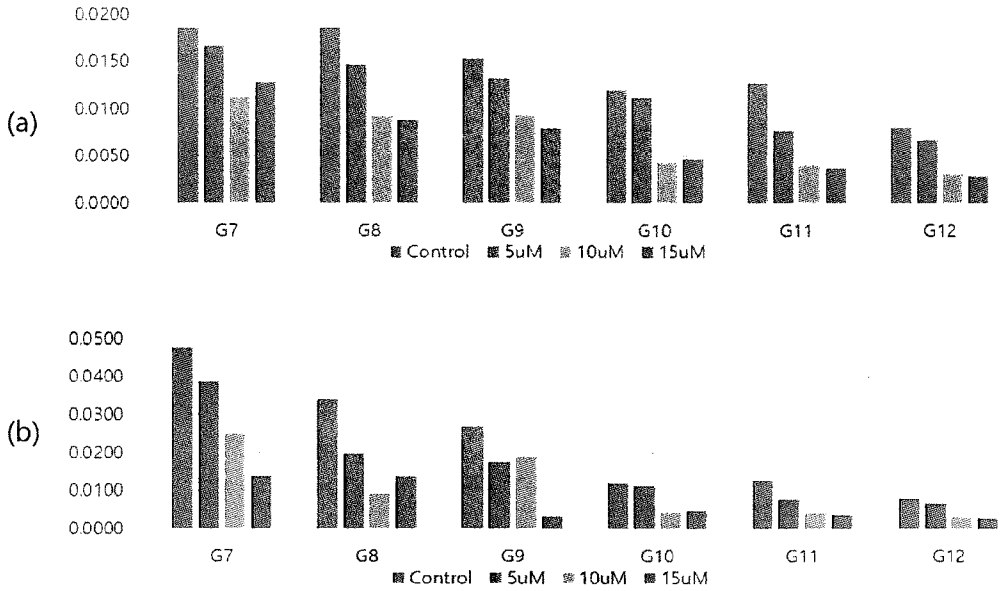
[도9]


시작
기 설정된 물흐름 시자극 패턴을 가지는 동영상이 디스플레이됨에 따라 이동하는 어류의 영상 획득
S110
어류의 영상을 분석하여 초기 반응 특성 및 반응 종료 특성 중 적어도 하나를 산출
S120
초기 반응 특성 및 반응 종료 특성 중 적어도 하나를 기초로 어류의 시력을 등급화
S130
종료

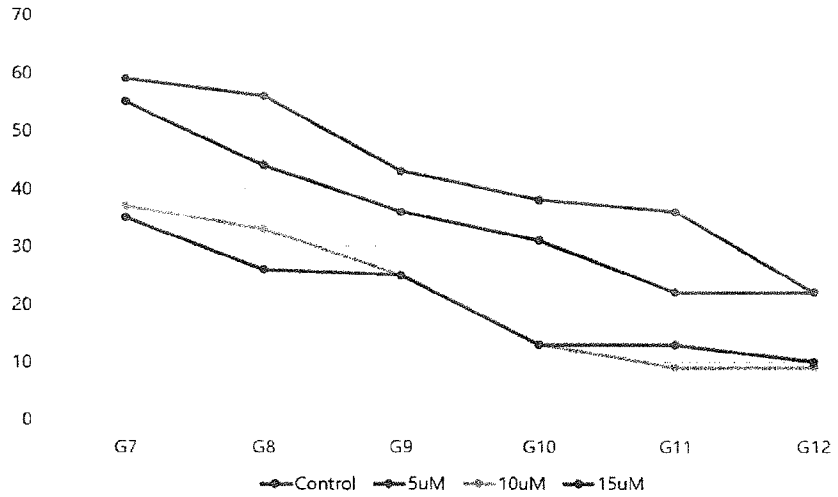
[도10]


평균반응속도
최대반응속도
출발점
출발점 개체수 (n)
초기반응률(%)
자극 시작
자극 종료
시간(sec)
잠복기(sec)
평균 반응 시작시간(sec)

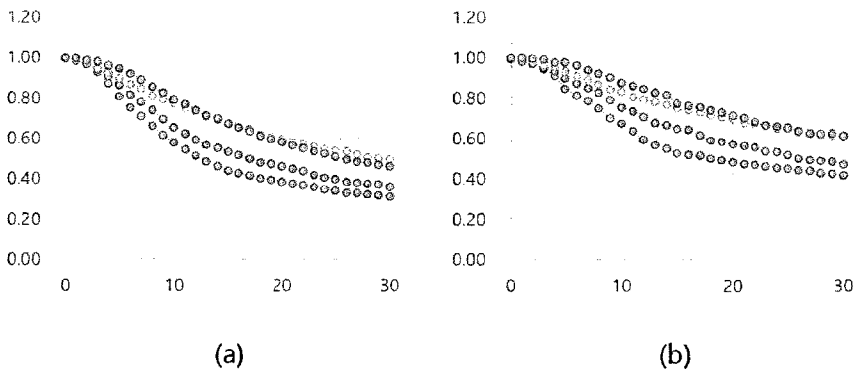
[도11]


(a)
0.0200
0.0150
0.0100
0.0050
0.0000
G7
G8
G9
G10
G11
G12
Control
5uM
10uM
15uM
(b)
0.0500
0.0400
0.0300
0.0200
0.0100
0.0000
G7
G8
G9
G10
G11
G12
Control
5uM
10uM
15uM

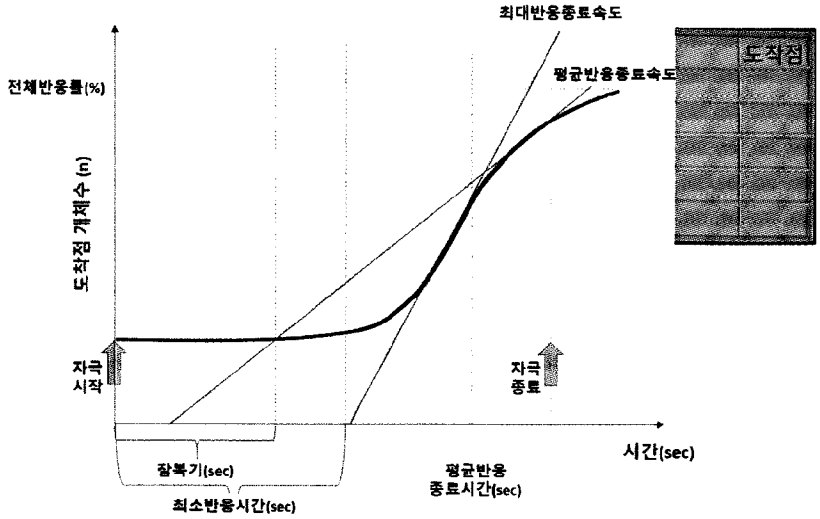
[도12]


70
60
50
40
30
20
10
0
G7
G8
G9
G10
G11
G12
Control
5uM
10uM
15uM

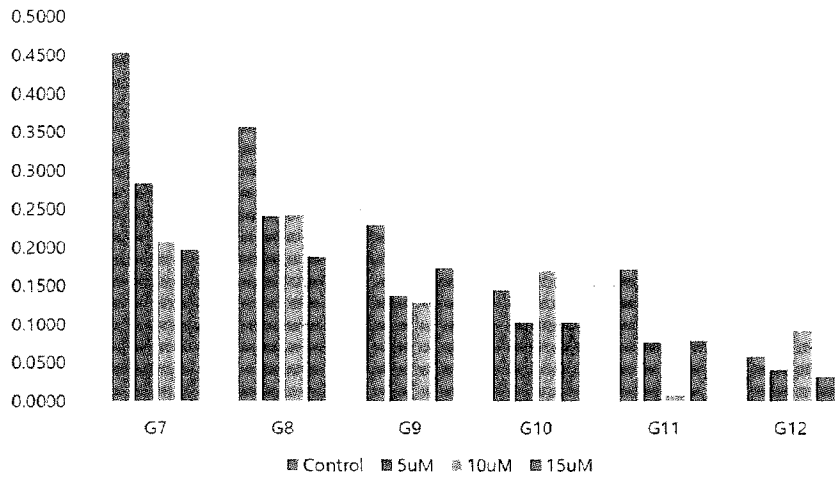
[도13]


1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0
10
20
30
(a)
(b)

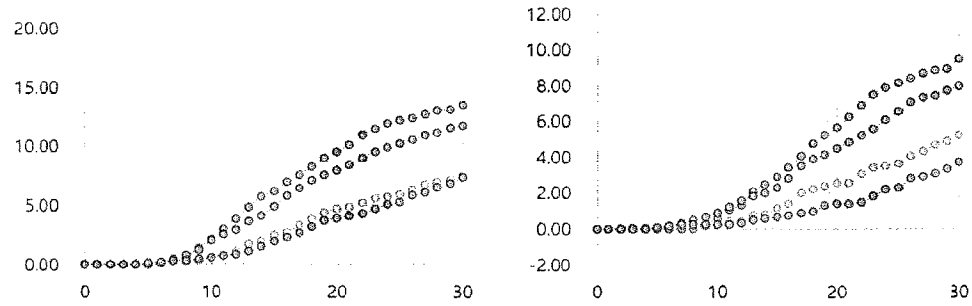
[도14]



[도15]



[도16]



(a) (b)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/010224

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61B 5/00(2006.01)i, A61B 3/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61B 5/00; A01K 15/02; A01K 63/00; A61B 5/11; A61D 99/00; A61K 31/16; A61K 31/198; G01N 33/15; A61B 3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: visual stimulation pattern, display, fish, camera, moving pattern

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1533573 B1 (GENOMIC DESIGN BIOENGINEERING COMPANY) 06 July 2015 See paragraphs [0040]-[0071], [0117] and claim 1.	1-25
A	KR 10-1476355 B1 (KNU-INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION) 24 December 2014 See claims 1-2 and figures 1-2.	1-25
A	KR 10-2017-0086678 A (DCB-USA LLC. et al.) 26 July 2017 See paragraphs [0010]-[0011].	1-25
A	KR 10-1638596 B1 (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE) 11 July 2016 See claim 1 and figure 1.	1-25
A	US 2018-0279921 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 04 October 2018 See claim 1.	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 DECEMBER 2019 (02.12.2019)	**02 DECEMBER 2019 (02.12.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/010224

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1533573 B1	06/07/2015	KR 10-1365732 B1	21/02/2014
		KR 10-1479204 B1	21/01/2015
		KR 10-2014-0003983 A	10/01/2014
		KR 10-2014-0004031 A	10/01/2014
		KR 10-2014-0004032 A	10/01/2014
		US 2015-0177228 A1	25/06/2015
		US 9737206 B2	22/08/2017
		WO 2014-014189 A1	23/01/2014
KR 10-1476355 B1	24/12/2014	None	
KR 10-2017-0086678 A	26/07/2017	CN 104394856 A	04/03/2015
		EP 2852383 A2	01/04/2015
		JP 2015-517575 A	22/06/2015
		JP 2016-130258 A	21/07/2016
		JP 6300856 B2	28/03/2018
		KR 10-1953736 B1	04/03/2019
		KR 10-2015-0013867 A	05/02/2015
		SG 10201701145 A	30/03/2017
		SG 11201407729 A	30/12/2014
		TW 201408280 A	01/03/2014
		TW I532480 B	11/05/2016
		US 2014-0073611 A1	13/03/2014
		WO 2013-177170 A2	28/11/2013
		WO 2013-177170 A3	13/02/2014
KR 10-1638596 B1	11/07/2016	KR 10-2016-0064491 A	08/06/2016
US 2018-0279921 A1	04/10/2018	AU 2016-338856 A1	20/04/2017
		CA 3001063 A1	20/04/2017
		CN 108471943 A	31/08/2018
		EP 3361935 A1	22/08/2018
		IL 258006 A	31/05/2018
		JP 2019-505029 A	21/02/2019
		WO 2017-066209 A1	20/04/2017

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/010224

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61B 5/00(2006.01)i, A61B 3/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61B 5/00; A01K 15/02; A01K 63/00; A61B 5/11; A61D 99/00; A61K 31/16; A61K 31/198; G01N 33/15; A61B 3/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 시자극 패턴(visual stimulation pattern), 디스플레이(display), 어류(fish), 촬영부(camera), 이동 패턴(moving pattern)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1533573 B1 (지노믹디자인 주식회사) 2015.07.06 단락 [0040]-[0071], [0117] 및 청구항 1 참조.	1-25
A	KR 10-1476355 B1 (강원대학교산학협력단) 2014.12.24 청구항 1-2 및 도면 1-2 참조.	1-25
A	KR 10-2017-0086678 A (디씨비-유에스에이 엘엘씨 등) 2017.07.26 단락 [0010]-[0011] 참조.	1-25
A	KR 10-1638596 B1 (기초과학연구원) 2016.07.11 청구항 1 및 도면 1 참조.	1-25
A	US 2018-0279921 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 2018.10.04 청구항 1 참조.	1-25

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 12월 02일 (02.12.2019)	2019년 12월 02일 (02.12.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
김연경
전화번호 +82-42-481-3325

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/010224

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1533573 B1	2015/07/06	KR 10-1365732 B1	2014/02/21
		KR 10-1479204 B1	2015/01/21
		KR 10-2014-0003983 A	2014/01/10
		KR 10-2014-0004031 A	2014/01/10
		KR 10-2014-0004032 A	2014/01/10
		US 2015-0177228 A1	2015/06/25
		US 9737206 B2	2017/08/22
		WO 2014-014189 A1	2014/01/23
KR 10-1476355 B1	2014/12/24	없음	
KR 10-2017-0086678 A	2017/07/26	CN 104394856 A	2015/03/04
		EP 2852383 A2	2015/04/01
		JP 2015-517575 A	2015/06/22
		JP 2016-130258 A	2016/07/21
		JP 6300856 B2	2018/03/28
		KR 10-1953736 B1	2019/03/04
		KR 10-2015-0013867 A	2015/02/05
		SG 10201701145 A	2017/03/30
		SG 11201407729 A	2014/12/30
		TW 201408280 A	2014/03/01
		TW I532480 B	2016/05/11
		US 2014-0073611 A1	2014/03/13
		WO 2013-177170 A2	2013/11/28
		WO 2013-177170 A3	2014/02/13
KR 10-1638596 B1	2016/07/11	KR 10-2016-0064491 A	2016/06/08
US 2018-0279921 A1	2018/10/04	AU 2016-338856 A1	2017/04/20
		CA 3001063 A1	2017/04/20
		CN 108471943 A	2018/08/31
		EP 3361935 A1	2018/08/22
		IL 258006 A	2018/05/31
		JP 2019-505029 A	2019/02/21
		WO 2017-066209 A1	2017/04/20