



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0056721
(43) 공개일자 2019년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61B 5/055 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61B 5/055 (2018.08)

(21) 출원번호 10-2017-0153973

(22) 출원일자 2017년11월17일

심사청구일자 2017년11월17일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

조형준

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이한솔

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리앤목특허법인

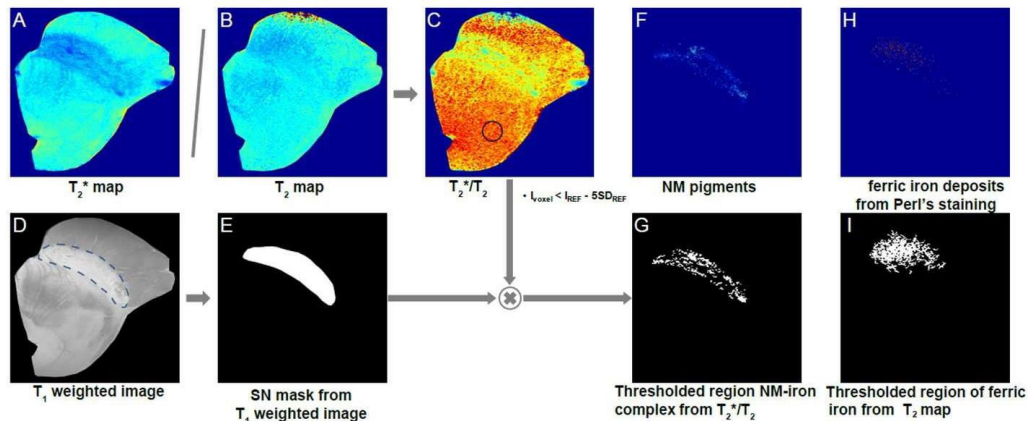
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 뇌에 존재하는 철의 시각화를 위한 방법

(57) 요약

본 발명은 자기공명영상으로 표적조직 내 존재하는 철의 분포를 구별하는 방법으로서, T2 강조영상 (T2-weighted image) 및 T2* 강조영상 (T2*-weighted image)을 획득하는 단계; 및 상기 T2* 강조영상을 상기 T2 강조영상으로 분할하여 T2*/T2 강조영상을 획득하는 단계를 포함하는 방법 및 장치에 관한 것이다.

대표도



(72) 발명자

전세영

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이재혁

경상남도 양산시 물금읍 금오로 20

명세서

청구범위

청구항 1

자기공명영상으로 표적조직 내 존재하는 철의 분포를 구별하는 방법으로서,
T2 강조영상 (T2-weighted image) 및 T2* 강조영상 (T2*-weighted image)을 획득하는 단계; 및
상기 T2* 강조영상을 상기 T2 강조영상으로 분할하여 T2*/T2 강조영상을 획득하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 T2 강조영상 및 T2* 강조영상으로부터 각각 T2 및 T2* 맵을 획득하는 단계; 및
상기 T2* 맵을 T2 맵으로 분할하여 T2*/T2 맵을 획득하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, T1 강조영상 (T1-weighted image)을 획득하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 T1 강조영상에 자화 전이(magnetization transfer; MT) 영향을 부가하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 T1 강조영상으로부터 표적조직 마스크를 획득하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 T2*/T2 강조영상 또는 상기 T2*/T2 맵을 상기 표적조직 마스크와 결합시켜 표적조직 내 철의 분포를 경계화하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 자화율강조영상 (susceptibility weighted image; SWI), 정량적자화율맵 (quantitative susceptibility map; QSM), 또는 이들의 조합을 더 획득하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 T2*/T2 강조영상을 상기 T2 강조영상으로 추가적으로 분할하여 $T2^*/T2^2$ 강조영상을 획득하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 9

청구항 2에 있어서, 상기 T2*/T2 맵을 상기 T2 맵으로 추가적으로 분할하여 $T2^*/T2^2$ 맵을 획득하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 표적조직은 뇌인 것인 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 표적조직은 흑질인 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 뉴런 내 철 축적량과 관련된 질환에 대한 정보를 제공하기 위한 것인 방법.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 표적조직은 파킨슨성 뉴런을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 표적조직 내 존재하는 철은 단백질-철 복합체 및 자유 철 축적물인 것인 방법.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 자유 철 축적물에서의 철은 3가 철인 것인 방법.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 뉴로멜라닌-철 복합체와 3가 철 축적물을 구별하는 것인 방법.

청구항 17

청구항 6에 있어서, 상기 경계화는 $T2^*/T2$ 강조영상, $T2^*/T2^2$ 강조영상, $T2^*/T2$ 맵 또는 $T2^*/T2^2$ 맵으로부터 뉴로멜라닌-철 복합체 및 $T2$ 맵으로부터 3가 철 축적물을 경계화하는 것인 방법.

청구항 18

비침습적 자기공명영상으로서, $T2$ 강조영상 및 $T2^*$ 강조영상을 획득하는 영상 처리부; 및

상기 $T2^*$ 강조영상을 $T2$ 강조영상으로 분할하여 $T2^*/T2$ 강조영상을 형성하는 $T2^*/T2$ 강조영상 획득부를 포함하는, 표적조직 내 존재하는 철의 분포를 구별하는 장치.

청구항 19

청구항 18에 있어서,

상기 영상 처리부로부터 획득된 영상의 각 복셀로부터 $T2$ 값을 추출하여 $T2$ 맵을 형성하는 $T2$ 맵 획득부; 및

상기 영상 처리부로부터 획득된 영상의 각 복셀로부터 $T2^*$ 값을 추출하여 $T2^*$ 맵을 형성하는 $T2^*$ 맵 획득부; 및

상기 획득된 $T2^*$ 맵을 $T2$ 맵으로 분할하여 $T2^*/T2$ 맵을 형성하는 $T2^*/T2$ 맵 획득부를 포함하는, 표적조직 내 존재하는 철의 분포를 구별하는 장치.

청구항 20

청구항 18에 있어서, 상기 장치는 청구항 1의 방법을 구현하기 위한 것인 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 개체의 표적조직 내 단백질-철 복합체와 3가 철 축적물을 비-침습적으로 구분하는 방법 및 그러한 방법을 구현하기 위한 자기공명장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

뉴로멜라닌(neuromelanin)은 SN 치밀부 (SN pars compacta; SN_c)에서 주로 발견되는, 색소신경세포(pigmented neurons)의 내인적(endogenous)이고 강력한 철 킬레이팅 분자이다[1, 2, 3]. 높은 반응성의 자유 산소 라디칼을 생성함으로써 뇌 조직에 산화적 스트레스를 줄 수 있는, 대부분의 철(iron)은 인간의 뇌 중 페리틴에 저장될 수 있다 [4, 5]. SN(substantia nigra)에서 대부분의 철 분자는 도파민성 뉴런의 NM에 의해 킬레이팅되어 안정한 복합체를 형성하므로, 도파민성 뉴런은 철 독성으로부터 보호받을 수 있다 [6, 7]. NM에는 높거나 낮은 친화성을 갖는 두 개의 상이한 철 킬레이팅 사이트가 있다 [1, 8]. 킬레이팅 철에 의한 철의 산화적 스트레스에 대한 NM의 보호 능력은 철이 대부분 높은 친화력 사이트와 킬레이팅되었을 때 일어난다 [1].

[0003] 철의 퇴적(deposition)이 증가됨에 따라, NM-함유 도파민성 뉴론의 감소 및 NM에서의 철 부하(load)의 변화는 일반적으로 파킨슨병 (Parkinson's disease; PD)의 병인발생에 관여하는 중요한 인자로 간주된다. 즉, 파킨슨병은 SN의 NM-함유 도파민성 뉴론의 감소와 관련된 주요한 진행성 신경퇴행성 질환이다 [9]. 파킨슨병의 진행에 따라, 파킨슨병 뇌의 SN에서 철 축적이 증가하는 반면, NM 함유 도파민성 뉴론은 감소한다는 것은 일반적으로 알려져 있다 [1]. 파킨슨병의 병인 생성에서 높은 친화성의 철 킬레이팅 사이트가 포화된 경우, 철은 낮은 친화성의 사이트와 킬레이트될 수 밖에 없고, 히드록실 라디칼이 형성되어 산화적 스트레스를 유발시킨다 [10]. 역사적으로서, 인간 SN의 도파민 뉴론에서 NM 과립의 철의 정량적 측정 및 초미세구조 영상(ultrastructural image)을 X-선 확산 분석, 핵 자기 공명 분광법, 적외선 분광법, 전자 상자성 분광법, 분석적 전자 현미경, 및 나노-2차 이온 질량 분석기를 이용하여 조사하였다 [11, 12, 13]. 파킨슨병 병리를 검출하고 모니터링하는데 SN에서 철의 공간적 분포와 NM의 공간적 분포를 비-침습적으로 구별하는 것은 점차 중요해지고 있다. NM-철 복합체 및 3가 철이 내인성 상자성 근원(source)이므로, 자기공명영상 (magnetic resonance imaging; MRI) 접근법은 SN에서 핵심 구성 요소 모두의 비-침습적 기술화를 위한 유망한 양상으로 보인다.

[0004] MT 영향을 갖는 T1 강조 스캔을 이용한 고강도(hyperintense) NM-관련 MRI 내 대조도를 조사하여 NM 분포를 파악하는 기술은 잘 알려져 있다 [14]. NM-관련 MRI 내 대조도는 상자성 T1 단축 및 MT 영향에 대한 NM의 기여로부터 생성되는 것으로 믿어지고 있다 [14, 15, 16]. 특히, SN 근처의 고강도 영역은 2D 다중 절편 고속 스핀 에코 획득 (2D multi slice fast spin echo acquisition)과 같은 MT 영향을 갖는 T1 강조영상으로 관찰할 수 있다. 파킨슨병이 진행함에 따라, SN 근처의 MT 영향을 갖는 T1 강조영상의 고밀도 영역의 수축을 보고한 연구도 있다 [14, 17, 18, 19]. 그러나, SN에서 그러한 MRI 고강도성의 NM 분포와의 연관성은 혼란스러운 상태다. 정상 및 파킨슨병 SN에서 상자성 NM-철 복합체의 축적 및 3가 철은 서로 중첩되어 나타나므로, 단지 T1 강조 MR 영상으로만 NM의 선택적인(exclusive) 검출을 위한 고강도 영역을 추출하는 것은 어렵다. 또한 MT 포화와 SN의 미엘린 간의 상호의존성은 종래의 MT 영향을 갖는 T1 강조영상으로부터 고강도 영역의 해석을 더욱 복잡하게 만든다 [20].

[0005] 반면에, NM-철 복합체 및 3가 철은 정상 및 파킨슨병 SN에서 하부 조직(underlying tissue)과 관련해 자기자화를 불일치를 유발하는 중요한 내인성 상자성 교란물질로서 역할을 한다 [2]. 생성된 비균질적 자기장 변화는 T2 및 T2* 값과 같은 연관된 횡방향(transverse) MR 이완에 영향을 미친다. T2 및 T2* 값이 상자성 근원의 농도를 변화시킴에 따라 변하기 때문에, NM-철 복합체 및 3가 철을 공간적으로 분리하는 것은 여전히 불가능하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 자기공명영상으로 표적조직 내 존재하는 철의 분포를 구별하는 방법으로서, T2 강조영상 (T2-weighted image) 및 T2* 강조영상 (T2*-weighted image)을 획득하는 단계; 및 상기 T2* 강조영상을 상기 T2 강조영상으로 분할하여 T2*/T2 강조영상을 획득하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0007] 다른 양상은 비침습적 자기공명영상으로서, T2 강조영상 및 T2* 강조영상을 획득하는 영상 처리부; 및 상기 T2* 강조영상을 T2 강조영상으로 분할하여 T2*/T2 강조영상을 형성하는 T2*/T2 강조영상 획득부를 포함하는, 표적조직 내 존재하는 철의 분포를 구별하는 장치를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 통합된다.

[0009] 일 양상은 자기공명영상으로 표적조직 내 존재하는 철의 분포를 구별하는 방법으로서, T2 강조영상 (T2-weighted image) 및 T2* 강조영상 (T2*-weighted image)을 획득하는 단계; 및 상기 T2* 강조영상을 상기 T2 강조영상으로 분할하여 T2*/T2 강조영상을 획득하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0010] 일 구체예에서, 방법은, 상기 T2 강조영상 및 T2* 강조영상으로부터 각각 T2 및 T2* 맵을 획득하는 단계; 및 상기 T2* 맵을 T2 맵으로 분할하여 T2*/T2 맵을 획득하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0011] 실제 병원에서 MR을 이용하여 환자에 대해 영상촬영을 하는 경우, 환자의 복지적인 측면에서 시간 단축이 요구

되는 것은 자명한 사실이다. T2 (T2*) 맵은 표적 조직으로부터 획득된 T2 (T2*)의 정량적인 값을 구하여 맵핑한 것으로서, T2 (T2*) 강조영상을 동일한 조건에서 에코시간 (TE, time to echo)만을 변화시켜가며 여러 장을 촬영한 뒤 각 복셀마다 신호 세기 (signal intensity)를 T2와 TE 간의 관계식에 대입하고 추정하여 계산된 값으로 구성된다. 따라서 하나의 T2 (T2*) 강조영상을 촬영하는데 비해 정량적인 T2 (T2*)를 위한 T2 (T2*) 맵을 얻기 위해서는 굉장히 오랜 시간 (몇 배)이 요구된다. 따라서, 일차적으로는 맵 획득 전의 강조영상 자체로부터 결과를 분석하는 것이 선호될 것임은 통상의 기술자에게 자명한 사실이다. 그런데, 본 발명의 실시예는 조직 염색을 통한 실질적인 상호 비교를 수행하기 위해, 사후 조직을 이용한 것이므로 T2 및 T2* 맵을 획득하였다. 그러나, 상기 논의한 바와 같이, T2 (T2*) 맵 또한 T2 (T2*) 강조영상으로부터 획득된 것이므로, 2차 가공(맵핑)을 거치지 않고, 즉, 각 복셀마다 T2* 강조영상의 신호 세기에 T2 강조영상의 신호 세기를 분할하여 각각의 "강조영상"을 분할하는 과정을 통해 T2*/T2 맵과 유사한 정보를 얻을 수 있다. 따라서, T2*/T2 맵으로부터 입증된 본 발명의 효과는 T2*/T2 강조영상으로부터 동일하게 획득될 수 있을 것임을 통상의 기술자는 쉽게 이해할 것이다.

[0012] 일 구체예에서, 상기 방법은 상기 T2*/T2 강조영상을 상기 T2 강조영상으로 추가적으로 분할하여 T2*/T2² 강조영상을 획득하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0013] 일 구체예에서, 상기 방법은 상기 T2*/T2 맵을 상기 T2 맵으로 추가적으로 분할하여 T2*/T2² 맵을 획득하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0014] 실시예 2의 결과에 의하면, T2 값이 상자성 교란물질의 사이즈가 증가함에 따라 증가하는 경향이 있으므로, 감소된 T2 값의 영역은 대부분 높은 3가 철 축적물과 일치하였으나, NM 색소의 영역과 필수적으로 일치하지 않았다 [21, 33, 34]. 즉, T2 맵은 조직 내 철 축적량을 시각화할 수 있으나, NM-철 복합체의 철을 검출하는데는 적당하지 않다. 반면, 낮은 T2*/T2 (T2*/T2²) 값을 갖는 영역은 상응하는 T2* 값과 비교하여 NM 색소에 대해 개선된 관계를 보였다. 결과적으로, T1 강조 MR 영상으로부터 결정된 SN 영역에서 T2*/T2 맵 (또는 T2*/T2² 맵)으로부터 NM-철 복합체 및 T2 맵의 3가 철 축적물을 분리하여 분획화할 수 있다. 용어 "상자성"은 물질의 자기적인 성질 가운데 자기장 속에 놓으면 자기장과 같은 방향으로 자력을 띠는 성질, 즉, 자기 유도에 의하여 외부의 자기장과 같은 쪽으로 자기 모멘트를 일으키는 성질을 의미하고, "반자성"은 자기장과 반대 방향으로 자력을 띠는 성질을 의미한다.

[0015] 또한 철 축적량이 매우 높은 시료의 경우, T2*/T2로 NM-철 복합체 및 3가 철 축적물을 구별하는데 충분하지 않을 수 있다. 이 경우, T2*/T2 맵을 T2 맵으로 추가적으로 분할하여 T2*/T2² 맵을 획득함으로써 NM-철 복합체 및 3가 철 축적물을 구별할 수 있다. T2*/T2² 맵에 의해서도 구별되지 않는 경우, 높은 3가 철 축적물에 의한 감소된 T2 값의 영역을 T2*/T2² 맵으로부터 배제시키는 단계를 더 수행하여, NM-철 복합체 및 3가 철 축적물을 구별할 수 있다.

[0016] 일 구체예에서, 상기 방법은 T1 강조영상 (T1-weighted image)을 획득하는 단계를 더 포함할 수 있다. T1 강조영상은 표적 조직 영상을 획득하기 위해, 예를 들어 SN 구역을 설정하기 위해 기본적으로 필요할 수 있다.

[0017] 일 구체예에서, 상기 방법은 상기 T1 강조영상에 자화 전이(magnetization transfer; MT) 영향을 부가하는 단계를 더 포함할 수 있다. T1 강조영상에 의해 표적조직 영상을 획득하더라도, 미엘린(myelin)은 T1 강조영상의 NM 영역의 해석을 복잡하게 할 수 있다. 이 경우, MT 영향을 갖는 T1 강조영상은 의미가 있을 수 있다.

[0018] 일 구체예에서, 상기 방법은 상기 T1 강조영상으로부터 표적조직 마스크를 획득하는 단계를 더 포함할 수 있다. 용어 "마스크"는 ROI (region of interest) 즉, 획득한 영상 내에서 관심이 있는 영역으로서, 예를 들어, 표적 조직의 경계면을 생성하여 표적조직에 대한 마스크를 획득할 수 있다. 개체에 대해 수행된 결과에 의하면, MT 영향을 갖는 T1 강조 영상에서 저강도 영역이 LFB 염색으로 입증된 미엘린화 영역과 일치하는 것으로 관찰된다. 이러한 결과는, MT 효과는 자유 폴과 제한된 폴 사이의 양성자들의 상호작용을 바탕으로 제한된 폴에서 자유 폴로 이동하는 양성자를 포화시킬 수 있으므로, 종래의 미엘린 함량을 측정하는데 널리 적용되는 방법과 일치한다 [20]. 그런데, 본 발명자들의 연구에 의하면 SN에서 미엘린과 NM 색소의 영역은 서로 중첩되지 않는다. MT 영향을 갖는 T1 강조 영상에서의 고강도 영역은 비-미엘린화 영역으로 해석될 수 있으나, NM 색소의 밀도와는 직접적인 상관 관계가 없었다. 따라서, MT 영향을 갖는 T1 강조영상은 NM 분포를 시각화하기에 적당하지 않더라도, 미엘린 영역의 신호를 배제시켜 비-미엘린 영역인 SN 영역을 보다 선명하게 보기 위해 요구될 수 있다.

- [0019] 일 구체예에서, 상기 방법은 상기 $T2^*/T2$ 강조영상 또는 상기 $T2^*/T2$ 맵을 상기 표적조직 마스크와 결합시켜 표적조직 내 철의 분포를 경계화하는 단계를 더 포함할 수 있다. 용어 "경계화(thresholding)는 맵 또는 영상에서 부각시키고자 하는 영역을 특정 임계값 이상 또는 이하의 값을 갖는 픽셀만 선별하여 구역화한 것이다. 맵 또는 영상에서 선택적인 영역에 대한 경계화는 맵 또는 영상에 영향을 미칠 수 있는 인자를 배제시켜, 정량화를 용이하게 할 수 있는 이점을 갖는다.
- [0020] 일 구체예에서, 상기 방법은 자화율강조영상 (susceptibility weighted image; SWI), 정량적자화율맵 (quantitative susceptibility map; QSM), 또는 이들의 조합을 더 획득하는 단계를 더 포함할 수 있다. 자화율강조영상, 및 정량적자화율맵은 통상의 기술자에게 잘 알려져 있으며, 그 외 다른 MR 파라미터가 본 발명의 구현을 위해 상호보완적으로 적용될 수 있다. 용어 "자화율(susceptibility)"은 자기자화율(magnetic susceptibility)와 동일한 의미로 사용될 수 있고, 물질의 자기화의 세기와 자기장 세기의 비율을 의미한다. 본 발명의 실시예는 다양한 정량적 MR(magnetic resonance) 파라미터로 $T1$, $T2$, $T2^*$, 자화율강조영상, 정량적자화율맵, 및 자화 전이 효과를 갖는 $T1$ 강조영상을 신경질환 병력이 없는 6 개의 사후(post-mortem) SN으로부터 획득하였다. 이러한 파라미터들은 서로 상호 연관성을 가지므로 다양하게 조합되어 해석될 수 있다. 실시예를 요약하면, NM 색소 및 철 축적을 갖는 영역은 QSM에서 양성 자화율(positive magnetic susceptibility (paramagnetic) value)을 보였으나, 미엘린화된 영역은 음성 자화율을 보였다. SN에서 감소된 $T2$ 값을 갖는 영역은 주로 높은 철 축적량과 일치하였지만, NM 색소와 반드시 일치하지 않았다. NM-철 복합체 및 3가 철 간의 유효 크기 차이로 인해, $T2^*/T2$ (또는 $T2^*/T2^2$) 값과 NM 색소 사이의 연관성은 $T2^*$ 값과 NM 색소 사이의 연관성보다 높았다. 결과적으로, 본 발명의 실시예에 의해 $T1$ 강조영상으로부터 결정된 SN의 경계에서 $T2$ 맵으로부터의 3가 철 및 $T2^*/T2$ 맵 (또는 $T2^*/T2^2$ 맵)으로부터의 NM-철 복합체의 분리된 세분화(segmentation)가 가능함이 입증되었다.
- [0021] 일 구체예에서, 상기 표적조직은 뇌일 수 있다.
- [0022] 일 구체예에서, 상기 표적조직은 흑질(substantia nigra; SN)일 수 있다.
- [0023] 일 구체예에서, 상기 방법은 뉴런 내 철 축적량과 관련된 질환에 대한 정보를 제공하기 위한 것일 수 있다.
- [0024] 일 구체예에서, 상기 표적조직은 파킨슨성 뉴런을 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 일 구체예에서, 상기 뉴런 내 철 축적량과 관련된 질환은 파킨슨병일 수 있다.
- [0026] 일 구체예에서, 상기 방법은 뉴로멜라닌-철 복합체와 3가 철 축적물을 구별하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 연구에서, 본 발명자들은 7T에서 다중 MR 파라미터 [$T1$, $T2$, $T2^*$, $T2^*/T2$, $T2^*/T2^2$, SWI, 및 QSM]의 정량화된 조직학적 구성요소에 대한 직접적인 상관관계를 조사하였다. 상기 조직학적 구성요소로는 LFB(Luxol Fast Blue) 염색에서 관찰되는 미엘린, 페를즈 프루시안 블루 염색(Perls' Prussian blue staining)에서 관찰되는 3가 철, 및 NM 색소를 이용하였으며, 시료는 5 명의 사체(연령: 40세 남성 (40M), 60세 남성 (60M), 70세 여성의 좌우측 SN (70FL, 70FR), 75세 여성 (75F), 및 86세 여성 (86F))로부터 수득된 6 개의 인간 SN으로 하였다. 크기를 다양하게 하여 상자성 구가 존재하는 조건에서 수치적 $T2$ 및 $T2^*$ 이완 시뮬레이션을 수행하여 이들 사이의 크기 차이를 강조함으로써 3가 철로부터 NM-철 복합체를 구별하는 MR 이완시간측정법(relaxometry)의 실행가능성(feasibility)을 도출하였다. 3가 철로부터 NM-철 복합체를 공간적으로 분리하는데 $T1$, $T2$, 및 $T2^*$ 기여도(contribution)를 병합하여 제안된 MR 이완시간측정법의 효능을 5 명의 개체로부터 수득된 6 개의 사후 시료에 대해 SN에서 정합된 조직학적 구성요소를 기준으로 이용함으로써 직접적으로 확인하였다.
- [0028] 철 침착물은 NM-함유 도파민성 뉴론을 감소시키고, NM에서의 철 부하량이 감소하여 파킨슨병이 유발될 가능성이 높아진다. 파킨슨병의 진행에 따라, 파킨슨병 뇌의 SN에서 철 축적이 증가하는 반면, NM 함유 도파민성 뉴론은 감소한다는 것은 일반적으로 알려져 있다 [1]. 그런데 본 발명에 의하면 자기공명영상 장치를 이용하여 비-침습적으로 SN 내 NM-철 복합체 및 3가 철 축적물을 구별할 수 있다. 따라서, 파킨슨병을 진단하거나 예후를 판단하는데 이용될 수 있다.
- [0029] 본 발명자들은, 실시예에서 알 수 있는 바와 같이 횡방향 MR 이완시간 측정을 이용하여 상자성 교란물질의 유효 크기 차이 때문에 상자성 NM-철 복합체가 SN 내 3가 철로부터 분리될 수 있음을 입증하였다. NM-철 복합체의 분해 및 SN 내 철 축적물의 증가는 상기 언급한 바와 같이 파킨슨병의 가장 중요한 병리학적 특징이기 때문에, 이러한 기술은 파킨슨병이 진행됨에 따라 NM의 진행적 변화 및 철 분포를 평가하는데 유용하게 이용될 수 있다.

그러나 이러한 원리는 NM-철 복합체 및 3가 철 축적물의 관계를 그와 유사한 단백질-철 및 자유 철 축적물의 관계로 확장할 수 있음을 통상의 기술자는 쉽게 이해할 것이다. 따라서, 일 구체예에서, 상기 방법에서 표적조직 내 존재하는 철은 단백질-철 복합체 및 자유 철 축적물을 의미하는 것일 수 있다. 또한, 일 구체예에서, 상기 자유 철 축적물에서의 철은 3가 철일 수 있다. 철은 단백질과 결합하지 않고 자유 철로서 조직 내에 존재하는 경우 산화적 스트레스를 유발할 수 있으므로, 일반적으로 독성 물질로 인식된다. 본 발명의 원리를 단백질-철 복합체 및 3가 철 축적물로 확장함으로써 보다 다양한 질환의 진단 및 예후 판단에 활용될 수 있다.

- [0030] 일 구체예에서, 상기 $T2^*/T2$ 강조영상 또는 상기 $T2^*/T2$ 맵을 상기 표적조직 마스크와 결합시켜 표적조직 내 철의 분포를 경계화하는 단계는, $T2^*/T2$ 강조영상, $T2^*/T2^2$ 강조영상, $T2^*/T2$ 맵 또는 $T2^*/T2^2$ 맵으로부터 뉴로멜라닌-철 복합체 및 $T2$ 맵으로부터 3가 철 축적물을 경계화함으로써 이루어지는 것일 수 있다. 이 경우, MT 영향을 갖는 $T1$ 강조영상에 비해 NM-철 복합체 및 3가 철 축적물의 영역을 보다 선명하게 추출하여 구분할 수 있다. 상기 경계화된 영역은 상기 동일 개체로부터의 반자성 조직 영역을 실험 영역의 참조 값(reference region of interest; ROI)로 선택한 다음, 상기 ROI의 평균 및 표준 편차(standard deviation; STD)를 계산하여, 그 값을 " $T2^*/T2 < \text{평균}_{\text{REF}} - 5 \times \text{STD}_{\text{REF}}$ "에 적용하여 얻을 수 있다. 반자성 조직 영역은 정량적자화율맵(QSM)으로부터 판단할 수 있다.
- [0031] 다른 양상은 비침습적 자기공명영상으로서, $T2$ 강조영상 및 $T2^*$ 강조영상을 획득하는 영상 처리부; 및 상기 $T2^*$ 강조영상을 $T2$ 강조영상으로 분할하여 $T2^*/T2$ 강조영상을 형성하는 $T2^*/T2$ 강조영상 획득부를 포함하는, 표적조직 내 존재하는 철의 분포를 구별하는 장치를 제공한다.
- [0032] 일 구체예에서, 상기 장치는 상기 영상 처리부로부터 획득된 영상의 각 복셀로부터 $T2$ 값을 추출하여 $T2$ 맵을 형성하는 $T2$ 맵 획득부; 및 상기 영상 처리부로부터 획득된 영상의 각 복셀로부터 $T2^*$ 값을 추출하여 $T2^*$ 맵을 형성하는 $T2^*$ 맵 획득부; 및 상기 획득된 $T2^*$ 맵을 $T2$ 맵으로 분할하여 $T2^*/T2$ 맵을 형성하는 $T2^*/T2$ 맵 획득부를 더 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 장치는 영상 처리부로부터 획득된 영상으로부터 $T2^*/T2$ 강조영상을 획득하기 위해, 각 복셀마다 $T2^*$ 강조영상의 신호 세기에 $T2$ 강조영상의 신호 세기를 분할하여 각각의 강조영상을 분할하는 영상 후처리부를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 일 구체예에서 상기 장치는 상기 방법을 구현하기 위한 장치, 구체적으로 자기공명영상 장치 또는 의료 영상 처리 장치이다. 상기 영상 처리부, 영상 후처리부, 강조영상 획득부, 맵 획득부, 등의 구체적인 구성, 및 작동 기전은 본 발명의 장치를 구현하기 위해 기존의 자기공명영상 장치 또는 의료 영상 처리 장치에 의해 통상의 기술자에게 잘 알려진 것을 이용할 수 있다.
- [0035] 자기공명영상 장치는 본 발명의 파라미터인 $T1$, $T2$, $T2^*$, 자화율강조영상 (SWI), 정량적자화율맵 (QSM), 및 MT 효과를 갖는 $T1$ 강조영상을 획득할 수 있는 장치라면 어떤 것이든 적용 가능하다. 일 구체예에서, 상기 장치는 자화율강조영상, 정량적자화율맵, 또는 이들의 조합을 더 획득할 수 있는 보조 파라미터 획득부를 더 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 장치는 상기 $T2^*/T2$ 강조영상을 $T2$ 강조영상으로 추가적으로 분할하거나, 또는 상기 $T2^*/T2$ 맵을 상기 $T2$ 맵으로 추가적으로 분할하여 $T2^*/T2^2$ 강조영상 또는 $T2^*/T2^2$ 맵을 획득하는 $T2^*/T2^2$ 강조영상 획득부 또는 $T2^*/T2^2$ 맵 획득부를 더 포함할 수 있다.
- [0036] 상기 방법 또는 장치는 인 비보 또는 인 비트로로 적용될 수 있으며, 개체는 포유동물일 수 있고, 바람직하게는 인간이다.
- [0037] 일 구체예에서, 상기 장치는 $T1$ 강조영상을 획득하는 $T1$ 강조영상 획득부를 더 포함할 수 있고, 상기 $T1$ 강조영상 획득부는 상기 $T1$ 강조영상에 자화 전이 영향을 부가할 수 있는 MT 효과 처리부를 더 포함할 수 있다.
- [0038] 일 구체예에서, 상기 장치는 상기 MT 영향을 갖는 $T1$ 강조영상으로부터 표적조직 마스크를 추출하는 영역 설정부를 더 포함할 수 있다.
- [0039] 일 구체예에서, 상기 장치는 상기 $T2^*/T2$ 강조영상 또는 상기 $T2^*/T2$ 맵을 상기 표적조직 마스크와 결합시켜 표적조직 내 철의 분포를 경계화하는 표적조직 분석부를 더 포함할 수 있다.
- [0040] 일 구체예에서, 상기 표적조직 분석부는 $T2^*/T2$ 강조영상, $T2^*/T2^2$ 강조영상, $T2^*/T2$ 맵 또는 $T2^*/T2^2$ 맵으로부터 뉴로멜라닌-철 복합체 및 $T2$ 맵으로부터 3가 철 축적물을 경계화하는 것일 수 있다. 상기 경계화는 각 획득

부로부터 획득된 파라미터의 값을 " $T2^*/T2 < \text{평균}_{\text{REF}} - 5 \times \text{STD}_{\text{REF}}$ "의 식으로 처리하여 이루어지는 것일 수 있다.

[0041] 상기 장치에서 언급된 용어 또는 요소 중 청구된 방법에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 청구된 방법에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.

발명의 효과

[0042] 일 양상에 따른 자기공명영상으로 표적조직 내 존재하는 철의 분포를 구별하는 방법으로서, 자기공명영상으로 표적조직 내 존재하는 철의 분포를 구별하는 방법으로서, T2 강조영상 (T2-weighted image) 및 T2* 강조영상 (T2*-weighted image)을 획득하는 단계; 및 상기 T2* 강조영상을 상기 T2 강조영상으로 분할하여 T2*/T2 강조영상을 획득하는 단계를 포함하는 방법 및 그러한 방법을 구현하기 위한 장치에 의하여, 개체의 표적조직 내 단백질-철 복합체와 독성을 갖는 3가 철 축적물을 비-침습적으로 구분할 수 있다. 상기 방법 및 장치에 의하여 구체적으로, SN 내의 NM-철 복합체 및 3가 철(ferric iron)과 같은 상자성(paramagnetic) 자기자화율(magnetic susceptibility) 교란물질(perturber)의 공간적(spatial) 분포를 비-침습적으로 기술화(delineate)할 수 있고, 결과적으로 파킨슨병과 같은 조직 내 3가 철 축적물로 발병되는 질환을 환자로부터 비-침습적으로 진단하고 예후를 판단할 수 있도록 한다.

[0043] 다른 양상에 따른 비침습적 자기공명영상으로서, T2 강조영상 및 T2* 강조영상을 획득하는 영상 처리부; 및 상기 T2* 강조영상을 T2 강조영상으로 분할하여 T2*/T2 강조영상을 형성하는 T2*/T2 강조영상 획득부를 포함하는, 표적조직 내 존재하는 철의 분포를 구별하는 장치에 의하여, 비침습적으로 환자로부터 3가 철 축적물로 발병되는 질환을 진단하고 예후를 판단할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 MT 준비 펄스(MT preparation pulse)의 영향을 받은 멀티 슬라이스 T1 강조 영상 및 MT 준비 펄스의 영향을 받지 않은 멀티 슬라이스 T1 강조 영상 (II: 70FL)을 LFB 염색 및 페를즈 프루시안 블루 염색 결과와 함께 나타낸 것이다.

도 2는 유효 철 집합체(cluster) 크기에 따른 MC 시뮬레이션으로부터 유래된 정량적 T2, T2*, T2*/T2 및 T2*/T2² 값을 나타낸 것이다. 도 2A는 유효 철 집합체의 상이한 크기 및 분획 부피에 대한 T2 이완시간 (ms); 도 2B는 유효 철 집합체의 상이한 크기 및 분획 부피에 대한 T2* 이완시간 (ms); 도 2C는 유효 철 집합체의 상이한 크기 및 분획 부피에 대한 T2*/T2 값; 및 도 2D는 6% 분획 부피에서 유효 철 집합체의 상이한 크기에 대한 T2*/T2 및 T2*/T2² 값 사이의 비교를 나타낸다.

도 3은 40M 개체로부터 수득된 시료의 페를즈 프루시안 블루 염색으로부터 검출된 3가 철 축적물 (적색) 및 NM 색소 (청색)에 대한 T2* 값 (ms) (I-1) 및 T2*/T2 값의 분포를 나타낸 그래프이다.

도 4는 MR 이완시간측정법으로부터 획득된 데이터에서 NM-철 복합체 및 3가 철 영역을 분할하는 순서를 개략적으로 나타낸 것이다. 도 4A는 T2* 맵 (ms); 도 4B는 T2 맵 (ms); 도 4C는 T2*/T2 맵; 도 4D는 T1 강조영상; 도 4E는 T1 강조영상에서 추출된 SN 마스크; 도 4F는 페를즈 블루 염색에서 검출된 NM 색소; 도 4G는 T2*/T2 맵으로부터 임계값 처리하여 획득된 NM-철 복합체 영역; 도 4H는 페를즈 블루 염색에서 검출된 철 축적물; 및 도 4I는 T2 맵으로부터 임계값 처리하여 획득된 3가 철을 나타낸다.

도 5는 75F 개체로부터 수득된 시료에 대해 3가 철 및 NM-철 복합체를 분획화하기 위한 다중파라미터 자기공명 영상 및 정합된 조직학적 결과를 나타낸다. 도 5A는 MT 영향을 갖는 T1 강조영상 (멀티 슬라이스 습득 및 MT 이완 펄스); 도 5B는 SWI; 도 5C는 QSM (ppm); 도 5D는 페를즈 블루 염색; 도 5E는 T1 맵 (ms); 도 5F는 T2 맵 (ms); 도 5G는 T2 맵에서 검출된 3가 철 영역; 도 5H는 페를즈 블루 염색에서 검출된 철 축적물; 도 5I는 T2* 맵 (ms); 도 5J는 T2*/T2 맵; 도 5K는 T2*/T2 맵에서 검출된 NM-철 복합체 영역; 도 5L은 페를즈 블루 염색에서 검출된 NM 색소를 나타낸다.

도 6은 70F 개체의 왼쪽 SN으로부터 수득된 시료에 대해 3가 철 및 NM-철 복합체를 분획화하기 위한 다중파라미터 자기공명영상 및 정합된 조직학적 결과를 나타낸다. 도 6A는 MT 영향을 갖는 T1 강조영상 (멀티 슬라이스 습득 및 MT 이완 펄스); 도 6B는 SWI; 도 6C는 QSM (ppm); 도 6D는 페를즈 블루 염색; 도 6E는 T1 맵 (ms); 도 6F는 T2 맵 (ms); 도 6G는 T2 맵에서 검출된 3가 철 영역; 도 6H는 페를즈 블루 염색에서 검출된 철 축적물; 도 6I는 T2* 맵 (ms); 도 6J는 T2*/T2 맵; 도 6K는 T2*/T2 맵에서 검출된 NM-철 복합체 영역; 도 6L은 페를즈 블

루 염색에서 검출된 NM 색소를 나타낸다.

도 7은 86F 개체로부터 수득된 시료에 대해 3가 철 및 NM-철 복합체를 분획화하기 위한 다중파라미터 자기공명 영상 및 정합된 조직학적 결과를 나타낸다. 도 7A는 MT 영향을 갖는 T1 강조영상 (멀티 슬라이스 습득 및 MT 이완 펄스); 도 7B는 SWI; 도 7C는 QSM (ppm); 도 7D는 페를즈 블루 염색; 도 7E는 T1 맵 (ms); 도 7F는 T2 맵 (ms); 도 7G는 T2 맵에서 검출된 3가 철 영역; 도 7H는 페를즈 블루 염색에서 검출된 철 축적물; 도 7I는 T2* 맵 (ms); 도 7J는 T2*/T2 맵; 도 7K는 T2*/T2 맵에서 검출된 NM-철 복합체 영역; 도 7L은 페를즈 블루 염색에서 검출된 NM 색소; 및 도 7M은 T2*/T2² 맵을 나타낸다.

도 8은 60M 개체로부터 수득된 시료에 대해 3가 철 및 NM-철 복합체를 분획화하기 위한 다중파라미터 자기공명 영상 및 정합된 조직학적 결과를 나타낸다. 도 8A는 MT 영향을 갖는 T1 강조영상 (멀티 슬라이스 습득 및 MT 이완 펄스); 도 8B는 SWI; 도 7C는 QSM (ppm); 도 8D는 페를즈 블루 염색; 도 8E는 T1 맵 (ms); 도 8F는 T2 맵 (ms); 도 8G는 T2 맵에서 검출된 3가 철 영역; 도 8H는 페를즈 블루 염색에서 검출된 철 축적물; 도 8I는 T2* 맵 (ms); 도 8J는 T2*/T2 맵; 도 8K는 T2*/T2 맵에서 검출된 NM-철 복합체 영역; 도 8L은 페를즈 블루 염색에서 검출된 NM 색소; 및 도 8M은 T2*/T2² 맵; 도 8N은 T2*/T2² 맵으로부터 3가 철 영역을 제외한 NM-철 복합체 영역; 및 도 8O는 LFB 염색 결과를 나타낸다.

도 9A는 6 개 시료에서 검출된 NM 색소 영역의 조직학적 밀도에 대해 T2* 및 T2*/T2 (60M 및 86F로부터 수득된 시료의 경우 T2*/T2²)의 부분 상관 계수를 나타낸 것이고, 도 9B는 6 개 시료에서 검출된 3가 철 축적물 영역의 조직학적 밀도에 대해 T2* 및 T2*/T2 (60M 및 86F로부터 수득된 시료의 경우 T2*/T2²)의 부분 상관 계수를 나타낸 것이다.

도 10A는 6 개 시료에서 각 개체의 나이(age)에 대한 검출된 NM 색소의 수(NM counts)를 나타낸 것이고, 도 10B는 6 개 시료에서 각 개체의 나이에 대해 T2* 감소에 대한 부분 상관 계수 (β_{NM}) (개별적 NM 색소의 철 부하량) (Relaxivity per unit NM; NM 단위 당 완화도)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 명세서에 기재된 수치는 명시하지 않아도 “약”의 의미를 포함하는 것으로 간주한다.

[0046] 실시예 1: 인간 사체의 흑질에서 자기공명영상 파라미터의 획득

[0047] (1) 시료의 수득 및 자기공명 파라미터 T1, T2, 및 T2*의 측정

[0048] 신경학적 질환 병력이 없는 5 명의 인간 사체 (40M, 60M, 70FL, 70FR, 75F, 및 86F)로부터 SN을 포함한 중뇌 시료를 추출하였다. 40M 및 70FR의 시료로부터 얻은 T2* 및 페를즈 블루 염색간의 상관 관계는 이미 보고된 바 있었고 [22], 이 연구에서 연장하여 적용하였다. 각 개체는 부산대학교 해부학 기부 프로그램에 가입하고 정보에 입각한 동의서에 서명하였다. 이 연구는 헬싱키 선언의 가이드 라인에 따라 부산대학교 양산병원 (Pusan National University Yangsan Hospital; PNUYH) 기관 검토위원회 및 울산국립과학기술원 (Ulsan National Institute of Science and Technology; UNIST) 기관 검토위원회에 의해서 승인을 받았다. 모든 방법을 승인된 지침에 따라 수행하였다. 해부된 뇌를 추출 후 즉시 10 % 중성 완충된 포르말린에 고정시켰다. 각 뇌 시료를, 유선체(mammillary body) 및 상지골(superior colliculus)을 이등분하는 평면에 평행하게 SN의 전면부부터 후면부까지의(rostrcaudal) 범위를 포함한 1.5cm 두께의 절편으로 분할하고, 정중시상면(midsagittal)으로 절개하여 분석을 위한 한쪽의 SN을 얻었다 [23]. 사후 뇌 조직에 대한 생체 외(ex vivo) MRI 실험을 7T 동물 MRI 스캐너 (Bruker, Germany)에서 수행하였다. 표본을 포르말린으로 채워진 50ml 시린지에 조심스럽게 옮기고 조직과 포르말린 용액 사이의 버블을 제거하고, 이미지 슬라이스 지오메트리(geometry)를 주자기장에 대해 수직으로 조정하고, 임의의 비틀림 또는 왜곡이 없도록 조직학적 슬라이스를 MRI 슬라이스와 일치시켰다. MT 영향을 갖는 T1 강조영상을 MT 준비 펄스를 포함하거나 포함하지 않고 TR/TE = 800/8 ms의 다중 절편 RARE 시퀀스에 의해 획득하였다. MT 준비 펄스는 1 kHz 이탈공명(off-resonance), 숙임각 (flip angle) = 600 ° 의 2 개의 순차적인 싱크 펄스(sinc pulse)로 10 밀리초 동안 적용하였다 [15, 17]. T1 맵은 TR = 107, 200, 300, 500, 700, 1000, 2000, 3000 및 5000 ms, TE = 7.1 ms인 RAREVTR 시퀀스를 사용하여 획득하였다. T2 맵은 TR = 5000 ms, TE = 8, 16, 24, 등 및 120 ms (15 에코)의 MSME 시퀀스를 사용하여 획득하였다. T2 * 맵은 TR = 2000 ms 및

TE = 3.3, 7.4, 등 및 40.2 ms (10 에코)인 MGE 시퀀스를 사용하여 획득하였다. 그 외 이미징을 위한 다른 일반적인 파라미터들은 $136 \times 136 \mu\text{m}$ 등방성 평면내 해상도, 256×256 매트릭스 크기, 및 $500 \mu\text{m}$ 슬라이스 두께의 20 개 슬라이스로 획득하였다.

[0049] (2) MR 이완 시뮬레이션 측정

[0050] Monte Carlo (MC) 스핀 확산 시뮬레이션을 수행하여 구형 상자성 교란물질의 크기를 증가시킴에 따라 T2 및 T2* 값의 의존성을 조사함으로써 NM-철 복합체를 분리하는 가능성을 검증하였다.

[0051] 먼저, 시뮬레이션의 입력 파라미터를 MRI 실험으로부터 결정하였다. 구형 교란물질을 시뮬레이션을 반복할 때마다 무작위로 분포하였다. 상기 시뮬레이션 공간의 등방성 매트릭스 크기는 $0.136 \times 0.136 \times 0.136 \text{ mm}^3$ 였다. 교란물질의 분획 부피를 2%, 4%, 및 6%로 다양화하여 입자의 반경을 3, 5, 7, 9, 11, 13, 및 $15 \mu\text{m}$ 로 설정하였다. 각 입자의 자기 자화율을 $1 \times 10^{-7} [\text{cgs}]$ 로 설정하였다. T2 및 T2* 값을 측정하는 에코 시간을 경사 (gradient) 에코 시뮬레이션의 경우 3, 7, 11, 15, 19, 23, 및 27 ms, 스핀 에코 시뮬레이션의 경우 8, 16, 24, 32, 40, 48, 및 56 ms로 설정하였다.

[0052] 각 상자성 입자는 주변 복셀(voxel)의 국지적(local) 자기장을 바꾼다. 교란물질 분포와 교란물질로 인한 큐브 주변의 추정된 국지적 자기장 변화 간의 컨볼루션(convolution)은 총 자기장 변화를 생성한다. MC 시뮬레이션에서, 60,000 양성자 분자는 전체 시뮬레이션 공간에서 무작위로 이동하였다. 0.1 ms의 시간 간격을 갖는 양성자 확산은 에코 시간에 도달할 때까지 계속되었다. 상응하는 복셀당 상(phase)-축적은 불균일한 국지적 자기장의 존재하에 무작위적 양성자 확산을 이용하여 계산되었다. 경사 및 스핀 에코 획득에서의 신호 감소는 각 에코 시간에서 전체 공간의 상 축적으로부터 계산되었다. 상기 시뮬레이션의 모든 단계를 평균 10 회 반복하였다. 상기 평균 T2 및 T2* 값을 에코 시간 의존적 신호적 감소로부터 피팅(fitting)하였다.

[0053] (3) 조직 염색

[0054] 상기 중뇌 시료를 MRI 스캐닝 후 조직병리학 검사를 위해 10%, 20%, 및 30% 수크로오스 용액으로 조직이 얼 때 생기는 문제들을 미리 방지하였다. 그런 다음, 상기 수크로오스 용액에 담긴 중뇌 시료를 액체 질소로 냉각된 이소펜탄에 넣고 동결시켰다. $50 \mu\text{m}$ 두께의 절편(section)을 T1 강조영상에서 조직의 잘-일치된 각도 및 위치에 대해 냉동미세절단기(cryostat)를 이용하여 생성하였다. 각 MR 영상에 상응하는 상기 절편화된 슬라이드를 본 발명자들이 사용했던 동일한 프로토콜에 의해 페를즈 프루시안 블루 염색 및 LFB 염색을 이용하여 염색하였다 [22]. 페를즈 프루시안 블루 염색은 3가 철을 염색하는데 사용되었다. NM-함유 도파민성 뉴론의 3가 철은 NM에 의해 격리되기 때문에 페를즈 프루시안 블루 염색에서 관찰되지 않았다. 페를즈 프루시안 블루 염색에서 얻은 SNc의 관찰된 3가 철은 NM을 포함하지 않는 희소돌기아교세포(oligodendrocyte) 및 비-색소 뉴론에 위치하였다 [1, 24]. LFB 염색은 흰 물질에서 미엘린화된 섬유를 증명하기 위해 사용되었다. 조직 슬라이드를 가상 현미경(Virtual Microscope) (Olympus, Japan)을 이용하여 이미지화되었고, 상기 이미지 파일을 vsi 파일 형식으로 저장하였다. 상기 vis 파일 형식을 Matlab (Mathworks, USA)의 후 처리를 위해 Photoshop CS5를 사용하여 tiff 및 jpeg2000 형식으로 변환하였다.

[0055] NM의 2진수(binary) 이미지는 흰색 바탕에 모든 색 채널의 합계 이미지를 경계화(thresholding)함으로써 페를즈 프루시안 블루 염색에서 검정 또는 갈색 색소로 검출되었다. 페를즈 프루시안 블루 염색은 3가 철을 염색할 수 있으나, NM과 결합한 철은 염색되지 않는다. 또한 NM 색소는 갈색 내지 검은색을 갖는다. 따라서, 페를즈 프루시안 블루 염색 결과물을 적색-녹색-청색 3개의 채널로 각각 나누어 관찰하였고, 각 채널에서 임계값 설정을 통해 원하는 염색 결과물의 이미지를 추출하였다(***추가). 철의 2진수 이미지는 청색 (청색 채널 - 적색 채널/2 - 녹색 채널/2)을 강조하여 모든 세 가지 채널을 통해 페를즈 프루시안 블루 염색에서 파란 점으로 확인되었다. 미엘린 2진수 이미지는 단지 청색 채널 정보를 이용하여 LFB 염색으로 확인되었다. 정량화 과정에서 획득된 NM, 철, 및 미엘린 수에 대한 2진수 이미지를 10×10 픽셀 블록을 이용하여 더 작은 이미지로 10 배 다운-샘플링하여 상기 염색으로부터 획득된 각 구성요소의 밀도를 나타내었다 [22].

[0056] (4) T2*/T2 맵 및 T2*/T2² 맵, 및 그 외 파라미터의 획득

[0057] 각 복셀에 대한 정량적인 T1, T2, 및 T2* 값을 개별적인 펄스 시퀀스로부터 이완 신호의 대수선형 회귀에 의해 추정하였다. SWI를 동일한 경사 에코 시퀀스의 규모 및 위상 이미지로부터 생성하였다 [25]. 상기 위상 이미지를 (위상) 펼침(unwrapping) 및 저역 통과 필터(loss pass filter)를 이용하여 필터링 후 획득하여 노이즈를 제거한 다음, 상기 위상 이미지를 상응하는 규모의 이미지와 결합시켰다 [25]. QSM 알고리즘으로부터의 덩어리

(bulk) 자기 자화율을 시간적 및 공간적 위상 펼침 [26], 라플라시안 경계 값 방법을 이용하여 배경 필드를 제거하고 [27], 형태학 활성화 쌍극자 반전 (morphology enabled dipole inversion; MEDI) 기법에 의한 쌍극자 커널(kernel)의 디콘볼루션(deconvolution)을 통해 생산하였다. MC 시뮬레이션 결과를 바탕으로, 정략적인 T2*/T2 맵을 복셀-복셀(voxel by voxel)로 획득하여 3가 철 및 다른 반자성(diamagnetic) 조직 구성요소의 영역으로부터 NM-철 복합체의 영역을 분할하였다. 상기 동일 개체로부터의 반자성 조직 영역을 실험 영역의 참조 값(reference region of interest; ROI)로 선택한 다음, 상기 ROI의 평균 및 표준 편차(standard deviation; STD)를 계산하였다. NM-철 복합체의 영역을 세분화하기 위한 임계값(threshold value)을 $\text{평균}_{\text{REF}} - \text{ROI의 } 5 \times \text{STD}_{\text{REF}}$ 로 설정하였다. 전체 SN 마스크를 T1 강조영상으로부터 선택하였다. 결과적으로, NM-철 복합체의 영역을 T2*/T2 맵 중 경계화된 NM-철 복합체 영역 및 T1 강조영상 중 전체 SN 마스크를 곱셈시킴(multiplying)으로써 나타내었다. 3가 철이 풍부한 영역을 또한 T2 맵에서 경계화하여 선택하였다.

[0058] MRI 및 상응하는 조직학적 슬라이드를 매치시키기 위해, 각 MRI 이미지를 B-스플린 보간법(cubic B-spline interpolation)에 의해 업샘플링하였다. 상기 업샘플링된 T1 강조영상을 상응하는 LFB 염색 이미지에 2D 강체 변형(2D rigid transformation)을 이용하여 정합하여 동일한 해상도를 갖도록 하였다. 다른 MR 이미지를 동일한 2D 변형 매트릭스 정보를 이용하여 정합하였다. 페를즈 프루시안 블루 염색 이미지를 바로 인접한 LFB 염색 이미지에 정합하였다. 다양한 MR 이미지와 페를즈 프루시안 블루 염색으로부터의 색소 분포 간의 복셀-복셀 상관 관계를 조사하였다. 각 개체의 다섯개 슬라이스로부터 상응하는 데이터를 분석하였다. 피어슨 부분 상관 계수 (Pearson's partial correlation coefficient)는 하나의 다른 변수의 영향을 제어하면서 MR 파라미터, 철 축적, 및 NM 색소 사이에서 계산하여 구하였다. 다중 선형 회귀 모형을 만들기 위해, NM 색소 및 철 축적에 대한 부분 상관 계수, β_{NM} 과 β_{iron} (각각, x_{NM} 과 x_{iron} 에 대한 기울기)을 방정식 ' $Y = \beta_0 + \beta_{\text{NM}}x_{\text{NM}} + \beta_{\text{iron}}x_{\text{iron}}$ '로 결정하였다. 상기 방정식에서 β_0 은 Y 절편, x_{NM} 과 x_{iron} 은 독립적 변수로서, 각각, NM 색소 및 철 축적의 밀도로 하였다. β_{NM} 과 β_{iron} 은 각 변수가 종속 변수 Y (즉, T2*)에 얼마나 큰 영향을 주는지를 의미한다. β_{NM} 은 단위 NM 당 T2* 감소를 제시하는데, NM의 철 부하량을 나타낸다.

[0059] 하기의 표 1은 각 시료에 대한 다중모달 MRI의 피어슨 부분 상관 계수 (Pearson's partial correlation coefficients; PCC)를 나타낸다.

표 1

PCC(40M)	T_1 맵	T_2 맵	T_2^* 맵	SWI	QSM	T_2^*/T_2 맵	T_2^*/T_2^2 맵
NM							
SNc	0.04	0.01	-0.52*	-0.54*	0.32*	-0.70*	
SN	-0.03	0.25*	-0.28*	-0.21*	0.04	-0.63*	
철							
SNc	-0.52*	-0.61*	-0.58*	-0.57*	0.54*	-0.23	
SNr	-0.32*	-0.44*	-0.43*	-0.42*	0.42*	-0.22	
SN	-0.37*	-0.46*	-0.47*	-0.45*	0.44*	-0.26*	
PCC(60M)							
NM							
SNc	0.00	-0.09	-0.42*	-0.43*	0.28*	-0.48*	-0.49*
SN	-0.10	-0.18**	-0.39*	-0.37*	0.39*	-0.45*	-0.43*
철							
SNc	-0.12	-0.61*	-0.60*	-0.59*	0.25*	-0.53*	-0.26**
SNr	-0.34*	-0.62*	-0.67*	-0.68*	0.35*	-0.67*	-0.41*
SN	-0.32*	-0.61*	-0.65*	-0.65*	0.29*	-0.64*	-0.39*
PCC(70F _R)							
NM							
SNc	-0.11	-0.08	-0.68*	-0.68*	0.50*	-0.74*	
SN	-0.12	-0.05	-0.64*	-0.65*	0.55*	-0.73*	
철							
SNc	-0.28*	-0.45*	-0.45*	-0.41*	0.41*	-0.30*	
SNr	-0.29*	-0.28*	-0.60*	-0.60*	0.60*	-0.65*	
SN	-0.27*	-0.35*	-0.52*	-0.51*	0.44*	-0.48*	
PCC(70F _L)							
NM							
SNc	0.05	0.06	-0.38*	-0.46*	0.40*	-0.43*	
SN	0.05	0.14	-0.45*	-0.47*	0.35*	-0.57*	
철							
SNc	-0.03	-0.24*	-0.07	-0.02	0.16	0.06	
SNr	-0.10	-0.34*	-0.47*	-0.44*	0.37*	-0.49*	
SN	-0.13	-0.36*	-0.25*	-0.18**	0.34*	-0.10	
PCC(75F)							
NM							
SNc	0.29*	0.35*	-0.27*	-0.18**	-0.05	-0.46*	
SN	0.45*	0.51*	-0.08	0.23*	-0.14*	-0.50*	
철							
SNc	-0.13	-0.17**	-0.22*	-0.17**	0.04	-0.13	
SNr	0.08	0.12	-0.06	0.04	0.09	-0.16**	
SN	0.02	0.04	-0.11*	-0.02	0.07	-0.15*	
PCC(86F)							
NM							
SNc	0.07	0.23*	-0.13	-0.16	-0.13	-0.43*	-0.60*
SN	0.05	0.27*	0.01	0.09	-0.40*	-0.22*	-0.43*
철							
SNc	-0.16	-0.49*	-0.59*	-0.60*	0.47*	-0.64*	-0.33*
SNr	-0.10	-0.34*	-0.47*	-0.44*	0.37*	-0.49*	-0.24*
SN	-0.11*	-0.38*	-0.50*	-0.47*	0.32*	-0.53*	-0.26*

[0060]

[0061] 실시예 2: 인간 흑질에서 MT 효과를 갖는 T1 강조영상의 해석

[0062] 실시예 1로부터 획득한 MT 효과를 갖는 T1 강조영상 및 조직 염색 결과 중 개체 40M 및 70F로부터의 결과를 도 1에 나타내었다.

[0063] 도 1은 MT 준비 펄스(MT preparation pulse)의 영향을 받은 멀티 슬라이스 T1 강조 영상 및 MT 준비 펄스의 영향을 받지 않은 멀티 슬라이스 T1 강조 영상 (II: 70F_L)을 LFB 염색 및 페를즈 프루시안 블루 염색과 함께 나타낸 것이다. 도 1에서 (A)는 MT 영향을 갖는 T1 강조영상을 나타낸 것이고, (A)의 검은 사각형으로 선택된 부분을 (D), (E), 및 (F)에 확대시켜 나타내었다. 도 1에서 (B)는 조직을 LFB 염색, (C)는 페를즈 프루시안 염색한 것이다. 도 1에서 (D)는 SN 내 MT 효과를 갖는 T1 강조영상으로부터 획득된 저강도 영역을 확대하여 적색으로 표시한 것이고, (E)는 페를즈 프루시안 블루 염색으로 검출된 NM 색소(**정확히 철이 아닌지) (청색 점) 및 LFB 염색으로 검출된 미엘린 분포 (적색 점)을 (D) 결과를 획득하는데 사용된 동일한 확대 조건으로 획득한 이미지이다. 도 1에서 (F)는 페를즈 프루시안 블루 염색으로 검출된 철 축적물 (흑색 점)을 (D) 결과를 획득하는데 사용된 동일한 확대 조건으로 획득한 이미지이다. 상기 MT 효과를 갖는 T1 강조영상과 정합된 LFB 염색 및 페를즈 프루시안 블루 염색 결과는 MT 효과를 갖는 T1 강조영상의 해석을 입증하는 역할을 한다.

[0064] SN 내 저강도 영역은 MT 효과를 갖는 T1 강조영상 중 확대된 적색 영역으로 도 1I-D 및 도 1II-D에 나타내었다.

또한, LFB 염색에 의해 청색으로 염색된 SN 내 미엘린을 적색 점, 페를즈 프루시안 블루 염색에 의해 청색으로 염색된 SN 내 NM 색소를 청색 점으로 도 1I-E와 도 1II-E에 나타내었다. 정합된 페를즈 프루시안 블루 염색으로부터의 철 축적을 추출하여 흑색 점으로 도 1F 및 1I-F에 나타내었다. 동일한 배율을 사용하는 정합된 도 1-D 및 도 1-E를 비교하면 적색 영역이 상당히 공동으로 국한되어 있다. 즉, MT 효과를 갖는 T1 강조영상의 저장도 영역은 LFB 염색의 미엘린 분포와 관련이 있다. 따라서, T1 강조영상의 고강도 영역의 해석을 복잡하게 하는 미엘린은 T1 강조영상에 MT 효과를 부가함으로써 MR 파라미터의 영상 및 맵으로부터 배제시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0065] 실시예 3: $T2^*/T2$ 값에 의한 단백질-철 복합체 및 3가 철의 구별

[0066] 철 축적물의 형태에 따라 MR 파라미터 변화를 유발시킬 수 있는지 확인하기 위해, MC 시뮬레이션을 통해 구형 교란물질의 크기 및 분획 부피에 따라 횡방향 MR 이완시간을 추정하였다(Transverse MR relaxometry). MR 복셀(voxel)의 $T2$ 및 $T2^*$ 값은 분획(fractional) 부피 (농도)에 의존할 뿐만 아니라, 상자성 교란물질의 유효 크기에도 의존한다 [21]. 예를 들어, 상자성 근원의 분획 부피를 증가시키면 따라, $T2$ 및 $T2^*$ 값 모두 상응하여 단축된다. 반면에, $T2$ 및 $T2^*$ 값은 고정된 분획 부피에서 상자성 교란물질의 크기를 증가시키면 따라, 각각 길어지고 포화되는 경향이 있다 [21]. 따라서 본 발명자들은 3가 철에 비해 NM-철 복합체의 유효 크기가 훨씬 크다는 것을 고려할 때, 상자성 교란물질의 크기를 증가시키면 따라 $T2$ 및 $T2^*$ 양상을 다양화할 수 있음이 유용할 수 있을 것이라 가정하였다.

[0067] 도 2는 유효 철 집합체(cluster) 크기에 따른 MC 시뮬레이션(실시예 1-(2))으로부터 유래된 정량적 $T2$, $T2^*$, $T2^*/T2$ 및 $T2^*/T2^2$ 값을 나타낸 것으로서, 유효 철 집합체의 크기가 이러한 MR 파라미터에 미치는 영향을 보여준다. 도 2A는 유효 철 집합체의 상이한 크기 및 분획 부피(하나의 MR 복셀 내에 교란물질이 차지하는 부피 비율)에 대한 $T2$ 이완시간 (ms); 도 2B는 유효 철 집합체의 상이한 크기 및 분획 부피에 대한 $T2^*$ 이완시간 (ms); 도 2C는 유효 철 집합체의 상이한 크기 및 분획 부피에 대한 $T2^*/T2$ 값; 및 도 2D는 6% 분획 부피에서 유효 철 집합체의 상이한 크기에 대한 $T2^*/T2$ 및 $T2^*/T2^2$ 값 사이의 비교를 나타낸다. 적색, 청색, 및 흑색 선은 각각 분획 부피 2%, 4%, 및 6%에 상응한다. 특히 도 2C에서 청색 화살표는 각각 3가 철 및 NM-철 복합체에 상응하는 것으로 설정하였다.

[0068] SN 내 NM의 철 부하는 일반적으로 철 독성을 감소시키는 것으로 알려져 있고, SN 내 생성된 NM-철 복합체는 내재적 상자성 자기자화를 교란물질로 활동할 수 있다 [2, 6, 7]. 따라서, 본 발명자들은 MR 이완시간이 상자성 교란물질의 기하학적 구조에 의존한다면, SN에서 NM-철 복합체를 특이적으로 검출할 수 있도록 할 것이라 가정하였고, 실제로, 구형 교란물질의 분획 부피가 증가함에 따라 $T2$ 및 $T2^*$ 값 모두 단축시키는 것이 관찰되었다. 또한, $T2$ 및 $T2^*$ 값은 구형 크기가 증가하면서 단축되는 경향이 있다. 그런데, 반지름이 5 μm 이상이 되자, 구의 크기가 더 커지면, $T2$ 값은 상승하기 시작하고, $T2^*$ 값은 곧 포화상태에 도달하였다. 즉, 구형 교란물질의 크기 및 분획 부피 모두 $T2$ 및 $T2^*$ 값에 영향을 미쳤다. 그러나, 도 2C에 나타낸 바와 같이, 구형 교란물질의 부피 분획의 영향은 $T2^*/T2$ 에 대해 최소화됨을 관찰하였다. 상기 $T2^*/T2$ 값은 주로 구형 교란물질의 크기와 상관 관계가 있었다. 또한 $T2^*/T2^2$ 값은 도 2D에서 나타난 것처럼 고정된 분획 부피 (6 %)에서 상응하는 $T2^*/T2$ 값보다 구형 교란물질의 크기가 증가함에 따라 더 급격히 감소함이 관찰되었다. 종합적으로, 철이 구형 교란물질로 작용할 수 있음을 고려하면, 크기가 작은 3가 철과 크기가 큰 NM-철 복합체를 $T2^*/T2$ 값을 산출함으로써 조직 내 철의 농도와 관계없이 구분할 수 있고, 철의 농도가 매우 높아 구별이 분명하지 않은 경우 $T2^*/T2^2$ 값을 산출하는 것이 도움이 될 수 있음을 알 수 있다.

[0069] 실시예 4: $T2^*/T2$ 맵에 의한 단백질-철 복합체와 3가 철의 시각적 세분화

[0070] $T2^*/T2$ 맵에 의하여 단백질-철 복합체와 3가 철을 시각적으로 구분할 수 있는지 시험하기 위해, SN 내 NM-철 복합체 및 3가 철에 대해서 $T2^*/T2$ 맵을 작성하였다.

[0071] 도 3은 40M 개체로부터 수득된 시료의 페를즈 프루시안 블루 염색에서 검출된 3가 철 축적물 (적색) 및 NM 색소 (청색)에 대한 $T2^*$ 값 (ms) (I-1) 및 $T2^*/T2$ 값 (ms) (I-2)을 나타낸 그래프이다. 중간 값을 화살표로 표시하였는데, 확연히 $T2^*/T2$ 이 경우 $T2^*$ 의 중첩되는 구간이 분리되는 것을 볼 수 있다.

[0072] 도 3에서 측정된 $T2^*$ 값 (ms) 및 $T2^*/T2$ 값 (ms)을 시각화하기 위해 $T2^*/T2$ 맵으로 작성하였다. 도 4는 MR 이완시간측정법으로부터 획득된 영상 및 맵들로부터 NM-철 복합체 및 3가 철 영역을 분할하는 순서를 개략적으로 나타낸 것이다. 구체적으로 도 4에서 (A)는 $T2^*$ 맵 (ms); (B)는 $T2$ 맵 (ms); (C)는 $T2^*/T2$ 맵; (D)는 T1 강조

영상; (E)는 T1 강조영상에서 추출된 SN 마스크; (F)는 페를즈 블루 염색에서 검출된 NM 색소; (G)는 T2*/T2 맵으로부터 임계값 처리하여 획득된 NM-철 복합체 영역; (H)는 페를즈 블루 염색에서 검출된 철 축적물; 및 (I)는 T2 맵으로부터 임계값 처리하여 획득된 3가 철을 나타낸다.

[0073] 도 4A의 실험적 T2* 맵은 페를즈 프루시안 블루 염색으로부터 확인된 철 축적 및 NM 색소의 존재를 나타낸다. 도 4A의 T2* 맵에서 페를즈 프루시안 블루 염색에 의한 철 축적은 NM 색소와 공간적으로 겹치게 나타난다. 이러한 T2* 맵 상의 NM의 공간적 중첩을 제거하기 위해, T2* 맵을 도 4B의 T2 맵에 의해서 분할하여 T2*/T2 맵을 얻었고 이를 도 4C에 나타내었다. T1 강조영상으로 획득된 전체 조직 영상 중 표적조직인 SN 만을 추출하기 위해, 도 4D의 T1 강조영상으로부터 전체 SN 마스크를 추출하여 도 4E에 나타내었다. 그런 다음, T2*/T2 맵을 SN 마스크와 결합시키고, 경계화하였다. 경계화는 $T2^*/T2 < \text{평균}_{\text{REF}} - 5 \times \text{STD}_{\text{REF}}$ 로 처리하였고, 조직 참조값 ROI는 도 4C에서 흑색 원으로 지정된 부위로부터 얻었다. 그 결과, 도 4G에 나타난 바와 같이 SN 중 세분화된 NM-철 복합체가 선명하게 관찰되었다. 3가 철의 영역은 T2 맵을 동일한 방정식으로 경계화함으로써 얻었고, 이를 도 4I에 나타내었다. 직접적인 비교를 위해, 조직학적 염색된 NM 색소 및 3가 철 축적을 도 4F 및 도 4H에 각각 나타내었다. 따라서, T2*/T2 맵을 이용하면, 자기공명영상 장치에서 일반적인 MR 파라미터인 T1, T2, 및 T2*를 이용하되, 비-침습적으로 NM-철 복합체 및 3가 철 축적물을 구분할 수 있다.

[0074] **실시예 5: 단백질-철 복합체와 3가 철의 시각적 세분화의 추가 검증**

[0075] 다수의 시료에 대해 실시예 2 내지 4에서 평가된 바와 같은 결과를 획득할 수 있는지 검증하였다.

[0076] 다양한 MRI-유도된 이미지 및 맵을 개체 75F, 70FL, 86F, 및 60M으로부터 정합된 페를즈 프루시안 블루 염색으로부터 추출된 상응하는 NM 색소 및 3가 철과 비교하여 각각 도 5 내지 8에 나타내었다. MRI-유도된 이미지는 (A) MT 효과를 갖는 T1 강조영상; (B) SWI; (C) QSM; (E) T1 맵; (F) T2 맵; (I) T2* 맵; 및 (J) T2*/T2 맵을 포함하였다. T2*/T2 맵이 지나치게 증가된 철 농도를 갖는 시료에 대한 NM 색소를 세분화하는데 충분하지 않다고 판단되는 경우, 도 7 및 8과 같이 T2*/T2² 맵 (M)을 추가적으로 획득하였다. 철 축적 (H) 및 NM 색소 (L)는 페를즈 프루시안 블루 염색 (D)로 유도하여 MR 파라미터 해석의 검증에 이용하였다. 도 5 내지 8에서는, T2*/T2 맵 (또는 60M 및 86F에 대해서는 T2*/T2² 맵) 및 T2 맵으로부터 NM-철 복합체 (K) 및 3가 철 (G)의 경계화된 영역을 각각 상응하는 조직학적 염색 결과 함께 배치하여, 두 철의 존재 형태를 직접적으로 비교할 수 있다.

[0077] 모든 시료에서 상자성 NM-철 복합체 및 3가 철이 SWI (B) 및 T2* (I) 맵에서 관찰되는 바와 같은 현저한 T2* 단축에 기여함이 관찰되었다. QSM (C)는 미엘린을 포함하는 백질이 반자성 특성을 갖는 음성 자기자화율 값을 가짐을 보여주었고, 이는 이전의 결과와 일치한다 [30, 31, 32]. 반면, 흑질망상부(substantia nigra pars reticulata; SNr) 및 적색 핵과 같은 3가 철 영역, 및 SNc와 같은 NM-철 복합체가 풍부한 영역은 양성 자기 자화율 값을 갖는 상자성 물질로서 나타났다. 이는 전자 상자 공명(Electron paramagnetic resonance; EPR) 및 모에스bauer 분광법(Moessbauer spectroscopy)을 이용한 이전의 연구와 동일한 결과였다 [2, 3, 4]. NM-철 복합체 및 3가 철을 갖는 영역에서 QSM의 양성 자기 자화율 값은 철이 NM과 킬레이팅함을 증명한다. 3가 철 색소를 갖는 영역은 일반적으로 감소된 T2 (F) 및 T2* (I) 값을 갖는 것으로 관찰되는데, NM-철 복합체를 갖는 영역은 현저하게 단축된 T2* (I) 값을 갖는 것으로 나타난다. T1 (E) 값은 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 이 사후 연구에서 NM 색소와 특이적인 상관 관계가 없었다. 다양한 MT 효과를 갖는 T1 강조영상에서 고강도 영역은 모든 경우에 대해 단지 비-미엘린화된 SN 영역과 겹치는 것으로 보였다. 이는 NM을 MT 영향을 갖는 T1 강조영상으로 시각화할 수 있다는 이전의 보고와 전혀 상반된 결과이다 [14, 15, 16].

[0078] 철 축적의 매우 증가된 수를 갖는 86F SN 시료의 경우, 철 분포는 도 7J에 나타난 바와 같이 T2*/T2 맵에서 지속되는 것으로 나타났으나, NM-철 영역은 도 7M에 나타난 바와 같이 T2*/T2² 맵에서 3가 철 이온의 영역으로부터 구분할 수 있었다. 따라서, T2*/T2² 맵을 이용하여 이에 상응하도록 경계화된 NM-철 복합체 마스크를 도 7K에 나타내었고, 도 7L에서 NM 색소를 조직학적으로 염색하여 나타난 영역과 비교하였다. 60M 개체로부터의 시료에 대해, 3가 철 및 NM-철 복합체의 영역은 도 8M에 나타난 바와 같이 T2*/T2² 맵에서도 분리되지 않았다. 그러나, 이 개체의 경우 높은 3가 철 축적 (H)이 T2 맵 (F) 상에 현저하게 관찰되었는데, 감소된 T2 값의 영역은 대부분 높은 3가 철 축적물과 일치한다. 따라서, 이러한 낮은 T2 값 (G)을 갖는 철이 풍부한 영역을 T2*/T2²-경계된 영역 (K)으로부터 배제(도 8G 중 흰색 영역을 경계화한 후, 도 8K과 합쳐 중첩되는 부분을 추출하여 흑색으로 표시함)하여 도 8N을 생성하였다. 이는 또한 도 8L에서의 NM 색소의 조직학적 염색으로 나타난 영역과 유사한 영역에 해당함을 보여준다. 도 8O에 나타난 바와 같이, 미엘린화된 영역의 현저하게 큰 부분이 60M SN 사이

에 관찰되었으며, 이는 MT 효과를 갖는 T1 강조영상에서 고강도 영역의 축소에 기여하는 것으로 보였다 (도 8A).

[0079] 상기 4 개의 시료에 대한 결과에서 추가적으로 알 수 있는 바와 같이, $T2^*/T2$ 맵 또는 $T2^*/T2^2$ 맵을 이용함으로써 비-침습적인 방법인 자기공명영상 장치에 의해 NM-철 복합체 및 3가 철 축적물을 구별할 수 있다. 이러한 원리는 단백질-철 복합체 및 3가 철 축적물의 관계를 규명하기 위하여 동일하게 적용할 수 있음을 통상의 기술자는 쉽게 이해할 것이다.

[0080] **실시예 6: MR 파라미터 및 조직학적 구성요소 간의 직접적인 상관관계**

[0081] 모든 개체 (40M, 60M, 70FL, 70FR, 75F, 및 86F)에 대한 부분 상관 계수는 상기 표 1에 요약하였다. 부분 상관 계수의 결과에 의하면, 일반적으로 NM 색소가 T1 또는 T2보다 $T2^*$ 에서 더 유의한 상관 관계가 있음이 관찰되었다. 이는 역시 기존에 알려진 바와 상반된 결과이다. 3가 철 축적은 T1에 비해 T2 및 $T2^*$ 에 더욱 민감하였다. 일관되게, $T2^*/T2$ (또는 60M 및 86F의 경우 $T2^*/T2^2$ 에 대해)는 임의의 다른 MR-유래된 파라미터에 비해 NM 색소와 가장 높은 부분 상관 계수를 보였다. 모든 6 개 시료에서 NM 색소 및 3가 철 축적에 관한 지표로서, $T2^*$ 와 NM 색소 및 3가 철 축적 간의 부분 상관 계수에서 $T2^*/T2$ (또는 $T2^*/T2^2$)와 NM 색소 및 3가 철 축적 간의 부분 상관 계수로의 ($T2^*$ to $T2^*/T2$ (또는 $T2^*/T2^2$)) 부분 상관 계수의 변화를 도 9에 도시하였다. 도 9A는 6 개 시료에서 검출된 NM 색소의 조직학적 밀도에 대해 $T2^*$ 및 $T2^*/T2$ (60M 및 86F로부터 수득된 시료의 경우 $T2^*/T2^2$)의 부분 상관 계수를 나타낸 것이고, 도 9B는 6 개 시료에서 검출된 3가 철 축적물 영역의 조직학적 밀도에 대해 $T2^*$ 및 $T2^*/T2$ (60M 및 86F로부터 수득된 시료의 경우 $T2^*/T2^2$)의 부분 상관 계수의 변화를 나타낸 것이다.

[0082] $T2^*/T2$ (또는 $T2^*/T2^2$)와 NM 색소 간의 부분 상관 계수는 $T2^*$ 와 NM 색소 간의 부분 상관 계수에 비해 현저하게 개선되었으나, 3가 철 축적에 대해서는 더욱 악화되어, 철과 NM-철 복합체가 랜덤하게 분포하는 경우에도 철의 영향을 제외한 NM-철 복합체 만의 영역 세분화에 있어 상호 보완적 MR 이완시간측정법을 결합하는 것의 효능을 확인하였다. 부분 상관 계수의 변화에 대한 대응-표본(paired-sample) t-테스트의 p 값은 3가 철 축적 및 NM 색소 모두에 대해 0.05 미만이었다. 동시에, T2 값은 상응하는 3가 철 축적과 유의한 상관 관계가 있었지만, 반드시 NM 색소와 관련 있는 것은 아니었다. NM 색소는 도 10A에 도시된 바와 같이 연령과 함께 증가 추세를 보였고, 이는 이전의 연구와 일치하였다 [24, 29]. 개별 NM에 대한 철 하중의 변화를 평가하기 위해, 각 개체에 대한 다중 선형 회귀 모형의 β_{NM} 값인 NM 당 $T2^*$ 감소(relaxivity per unit NM)를 도 10B에 도시하였다. 도 10B에 도시한 바와 같이, NM에 3가 철이 얼마나 침착되어 있느냐에 따라 개별 NM이 $T2^*$ 감소를 가져오기 때문에 β_{NM} 을 파악하면 단위 NM당 얼마나 많은 철이 침착되어 있는지 파악할 수 있다. 인간 SN에 카운트된 NM 색소의 선형 증가와 대조적으로, β_{NM} 은 정상적인 노화와 함께 단조로운 경향을 나타내지 않았다. 이는 즉, NM 색소 수의 증가를 NM 내 철 부하량 또는 SN 내 철 축적량과 결코 동일시 할 수 없고, NM-철 복합체 및 3가 철 축적물의 양으로 구별하여 평가해야 함을 입증하는 것이다. 또한 NM 함유 뉴런의 손실에 의한 신경 퇴화는 NM 내에서의 철 과부하로 촉진될 수 있지만, 개별 NM에 대한 철 킬레이트의 양을 특성화할 수 있는 생체 내 방법은 존재하지 않는다 [37,38]. 그러나 본 발명의 방법 및 이러한 방법을 적용하여 획득된 자기공명영상 파라미터는 조직 내 단백질-철 및 독성을 갖는 3가 철을 구별할 수 있으므로, 비-침습적으로 개별 NM에 대한 철 킬레이트의 양을 정량화할 수 있도록 한다.

[0083] [참고문헌]

[0084] 1. Zucca FA, Segura-Aguilar J, Ferrari E, Munoz P, Paris I, Sulzer D, Sarna T, Casella L, and Zecca L, "Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease". Progress in neurobiology, 155, 96-119. (2017).

[0085] 2. Enochs WS, Petherick P, Bogdanova A, Mohr U, and Weissleder R, "Paramagnetic metal scavenging by melanin: MR imaging". Radiology, 204(2), 417-423. (1997).

[0086] 3. Zecca L, and Swartz HM, "Total and paramagnetic metals in human substantia nigra and its neuromelanin". Journal of Neural Transmission: Parkinson's Disease and Dementia Section, 5(3), 203-213. (1993).

- [0087] 4. Zecca L, Gallorini M, Schunemann V, Trautwein AX, Gerlach M, Riederer P, Vezzoni P, and Tampellini D, "Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes." *Journal of neurochemistry*, 76(6), pp.1766-1773. (2001).
- [0088] 5. Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, and Zecca L, "The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders". *The Lancet Neurology*, 13(10), 1045-1060. (2014).
- [0089] 6. Zecca L, Pietra R, Goj C, Mecacci C, Radice D, and Sabbioni E, "Iron and other metals in neuromelanin, substantia nigra, and putamen of human brain". *Journal of neurochemistry*, 62(3), 1097-1101. (1994).
- [0090] 7. Zecca L, Casella L, Albertini A, Bellei C, Zucca FA, Engelen M, Zadlo A, Szewczyk G, Zareba M, and Sarna T, "Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease". *Journal of neurochemistry*, 106(4), 1866-1875. (2008).
- [0091] 8. Bolzoni F, Giraudo S, Lopiano L, Bergamasco B, Fasano M, and Crippa PR, "Magnetic investigations of human mesencephalic neuromelanin". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1586(2), 210-218. (2002).
- [0092] 9. Damier P, Hirsch EC, Agid Y, and Graybiel AM, "The substantia nigra of the human brain". *Brain*, 122(8), 1421-1436. (1999).
- [0093] 10. Zareba M, Bober A, Korytowski W, Zecca L, and Sarna T, "The effect of a synthetic neuromelanin on yield of free hydroxyl radicals generated in model systems". *Biochimica et biophysica acta*, 1271(2-3), 343-348. (1995).
- [0094] 11. Zecca L, Mecacci C, Seraglia R, and Parati E, "The chemical characterization of melanin contained in substantia nigra of human brain". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1138(1), 6-10. (1992).
- [0095] 12. Zecca L, Shima T, Stroppolo A, Goj C, Battiston GA, Gerbasi R, Sarna T, and Swartz HM, "Interaction of neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain". *Neuroscience*, 73(2), 407-415. (1996).
- [0096] 13. Biesemeier A, Eibl O, Eswara S, Audinot JN, Wirtz T, Pezzoli G, Zucca FA, Zecca L, and Schraermeyer U, "Elemental mapping of Neuromelanin organelles of human Substantia Nigra: correlative ultrastructural and chemical analysis by analytical transmission electron microscopy and nano-secondary ion mass spectrometry". *Journal of neurochemistry*, 138(2), 339-353. (2016).
- [0097] 14. Sasaki M, Shibata E, Kudo K, and Tohyama K, "Neuromelanin-sensitive MRI". *Clinical Neuroradiology*, 18(3), 147-153. (2008).
- [0098] 15. Nakane T, Nihasi T, Kawai H, and Naganawa S, "Visualization of neuromelanin in the Substantia nigra and locus ceruleus at 1.5 T using a 3D-gradient echo sequence with magnetization transfer contrast". *Magnetic Resonance in Medical Sciences*, 7(4), 205-210. (2008).
- [0099] 16. Trujillo P, Summers PE, Ferrari E, Zucca FA, Sturini M, Mainardi LT, Cerutti S, Smith AK, Smith SA, Zecca L, and Costa A, "Contrast mechanisms associated with neuromelanin-MRI". *Magnetic resonance in medicine*. (2016).
- [0100] 17. Ogisu K, Kudo K, Sasaki M, Sakushima K, Yabe I, Sasaki H, Terae S, Nakanishi M, and Shirato H, "3D neuromelanin-sensitive magnetic resonance imaging with semi-automated volume measurement of the substantia nigra pars compacta for diagnosis of Parkinson's disease". *Neuroradiology*, 55(6), 719-724. (2013).
- [0101] 18. Sasaki M, Shibata E, Tohyama K, Takahashi J, Otsuka K, Tsuchiya K, Takahashi S, Ehara S, Terayama Y, and Sakai A, "Neuromelanin magnetic resonance imaging of locus ceruleus and substantia nigra in

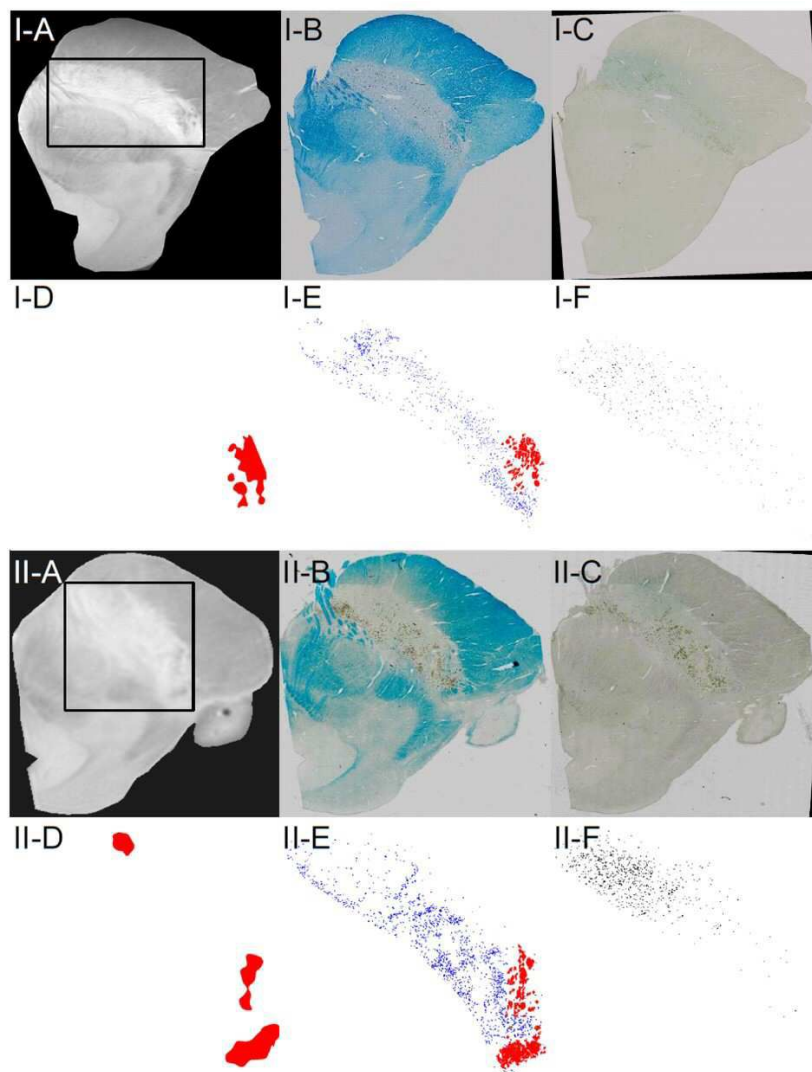
Parkinson's disease". *Neuroreport*, 17(11), 1215-1218. (2006).

- [0102] 19. Isaias IU, Trujillo P, Summers P, Marotta G, Mainardi L, Pezzoli G, Zecca L, and Costa A, "Neuromelanin Imaging and Dopaminergic Loss in Parkinson's Disease". *Frontiers in aging neuroscience*, 8. (2016).
- [0103] 20. Schmierer K, Scaravilli F, Altmann DR, Barker GJ, and Miller DH, "Magnetization transfer ratio and myelin in postmortem multiple sclerosis brain". *Annals of neurology*, 56(3), 407-415. (2004).
- [0104] 21. Hardy PA, and Henkelman RM, "Transverse relaxation rate enhancement caused by magnetic particulates". *Magnetic resonance imaging*, 7(3), 265-275. (1989).
- [0105] 22. Lee JH, Baek SY, Song Y, Lim S, Lee H, Nguyen MP, Kim EJ, Huh GY, Chun SY, and Cho HJ, "The Neuromelanin-related T2* Contrast in Postmortem Human Substantia Nigra with 7T MRI". *Scientific Reports*, 6. (2016).
- [0106] 23. Eapen M, Zald DH, Gatenby JC, Ding Z, and Gore JC, "Using high-resolution MR imaging at 7T to evaluate the anatomy of the midbrain dopaminergic system. *American Journal of Neuroradiology*, 32(4), 688-694. (2011).
- [0107] 24. Zecca L, Stroppolo A, Gatti A, Tampellini D, Toscani M, Gallorini M, Giaveri G, Arosio P, Santambrogio P, Fariello RG, and Karatekin E, "The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9843-9848. (2004).
- [0108] 25. Haacke EM, Xu Y, Cheng YCN, and Reichenbach JR, "Susceptibility weighted imaging (SWI)". *Magnetic resonance in medicine*, 52(3), 612-618. (2004).
- [0109] 26. Schofield MA, Zhu Y, "Fast phase unwrapping algorithm for interferometric applications". *Optics letters*, 28(14), 1194-1196. (2003).
- [0110] 27. Zhou D, Liu T, Spincemaille P, Wang Y, "Background field removal by solving the Laplacian boundary value problem". *NMR in Biomedicine*, 27(3), 312-319. (2014).
- [0111] 28. Liu J, Liu T, Rochefort Ld, Ledoux J, Khalidov I, Chen W, Tsiouris AJ, Wisnieff C, Spincemaille P, Prince MR, Wang Y, "Morphology enabled dipole inversion for quantitative susceptibility mapping using structural consistency between the magnitude image and the susceptibility map". *Neuroimage*, 59(3), 2560-2568. (2012).
- [0112] 29. Zecca L, Fariello R, Riederer P, Sulzer D, Gatti A, and Tampellini D, "The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease". *FEBS letters*, 510(3), 216-220. (2002).
- [0113] 30. Fukunaga M, Li TQ, van Gelderen P, de Zwart JA, Shmueli K, Yao B, Lee J, Maric D, Aronova MA, Zhang G, Leapman RD, Schenck JF, Merkle H, and Duyn JH, "Layer-specific variation of iron content in cerebral cortex as a source of MRI contrast". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3834-3839. (2010).
- [0114] 31. Baxan N, Harsan LA, Dragonu I, Merkle A, Hennig J, and von Elverfeldt D, "Myelin as a primary source of phase contrast demonstrated in vivo in the mouse brain". In *Proc., ISMRM, 19th Annual Meeting and Exhibition, Stockholm, Sweden* (p. 3016). (2010).
- [0115] 32. Liu C, Li W, Johnson GA, and Wu B, "High-field (9.4 T) MRI of brain dysmyelination by quantitative mapping of magnetic susceptibility". *Neuroimage*, 56(3), 930-938. (2011).
- [0116] 33. Wang ZJ, Lian L, Chen Q, Zhao H, Asakura T, and Cohen AR, "1/T2 and Magnetic Susceptibility Measurements in a Gerbil Cardiac Iron Overload Model 1". *Radiology*, 234(3), 749-755. (2005).
- [0117] 34. Drayer B, Burger P, Darwin R, Riederer S, Herfkens R, and Johnson GA, "Magnetic resonance imaging of brain iron". *American journal of neuroradiology*, 7(3), 373-380. (1986).

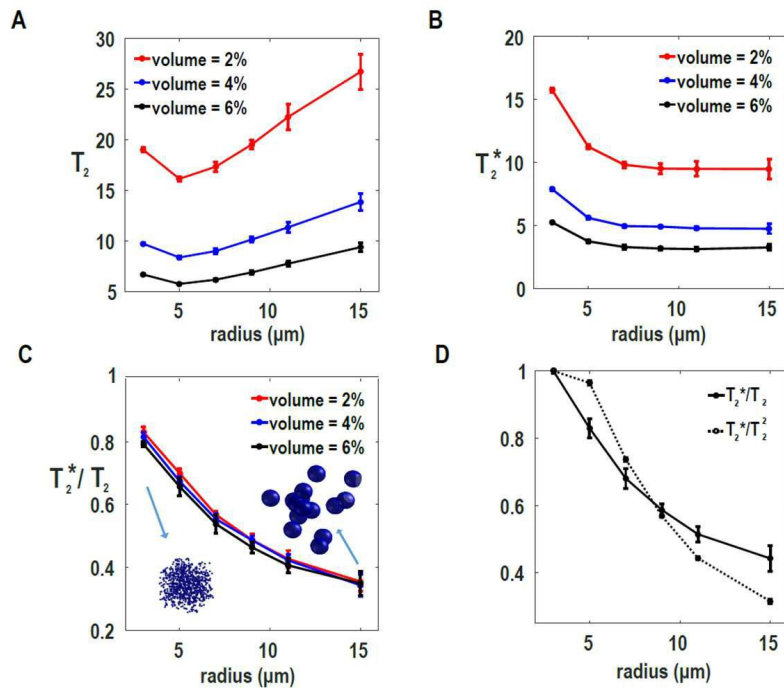
- [0118] 35. Zecca L, Fariello R, Riederer P, Sulzer D, Gatti A, and Tampellini D, "The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease". *FEBS letters*, 510(3), 216-220. (2002).
- [0119] 36. Shima T, Sarna T, Swartz HM, Stroppolo A, Gerbasi R, and Zecca L, "Binding of iron to neuromelanin of human substantia nigra and synthetic melanin: an electron paramagnetic resonance spectroscopy study". *Free Radical Biology and Medicine*, 23(1), 110-119. (1997).
- [0120] 37. Jellinger K, Kienzl E, Rumpelmair G, Riederer P, Stachelberger H, Ben-Shachar D, and Youdim MBH, "Iron-Melanin Complex in Substantia Nigra of Parkinsonian Brains: An X-Ray Microanalysis". *Journal of neurochemistry*, 59(3), 1168-1171. (1992).
- [0121] 38. Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hauw JJ, Agid Y, and Hirsch EC, "Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease". *Journal of neurochemistry*, 86(5), 1142-1148. (2003).

도면

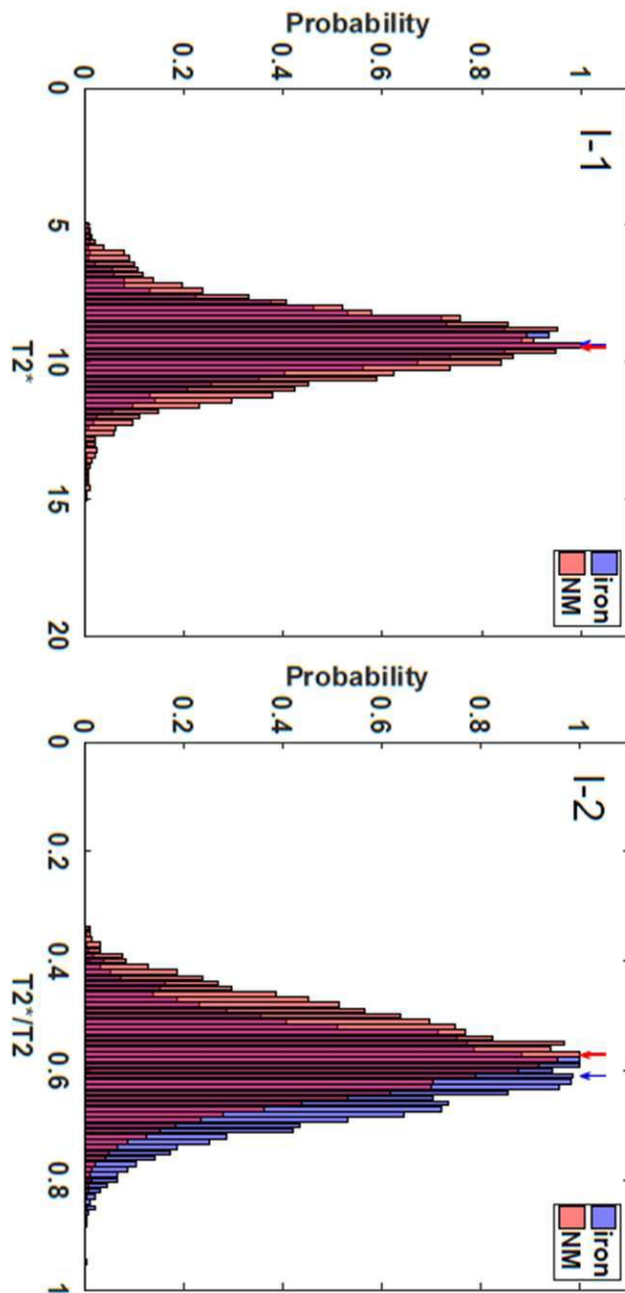
도면1



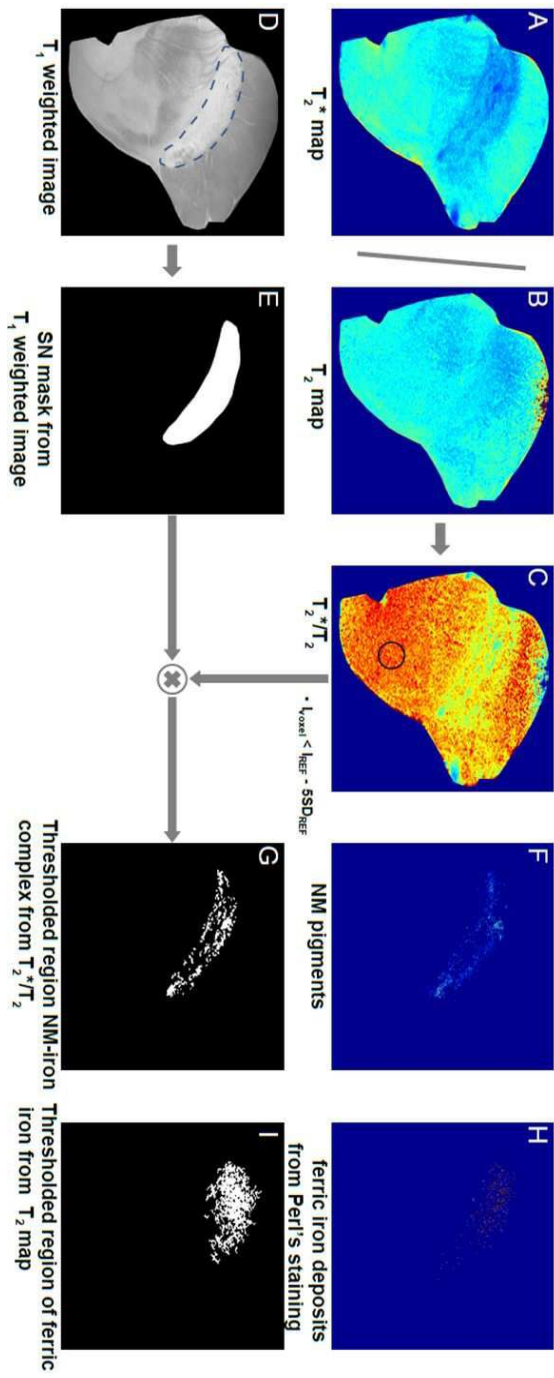
도면2



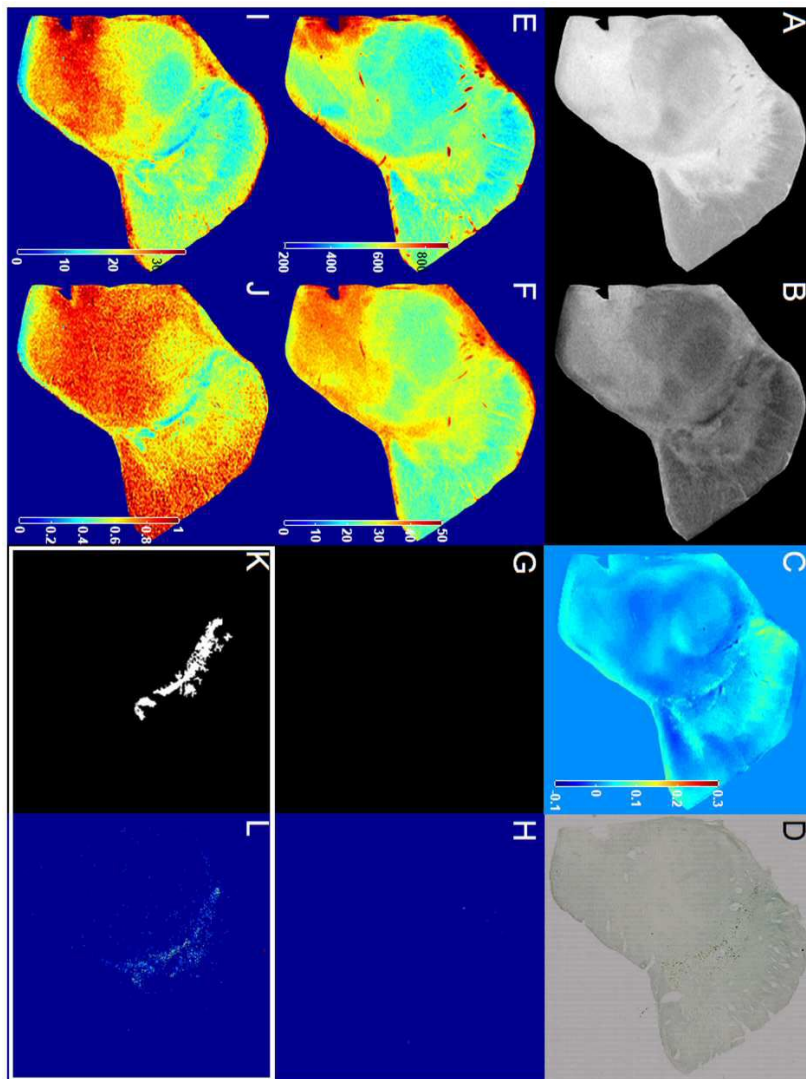
도면3



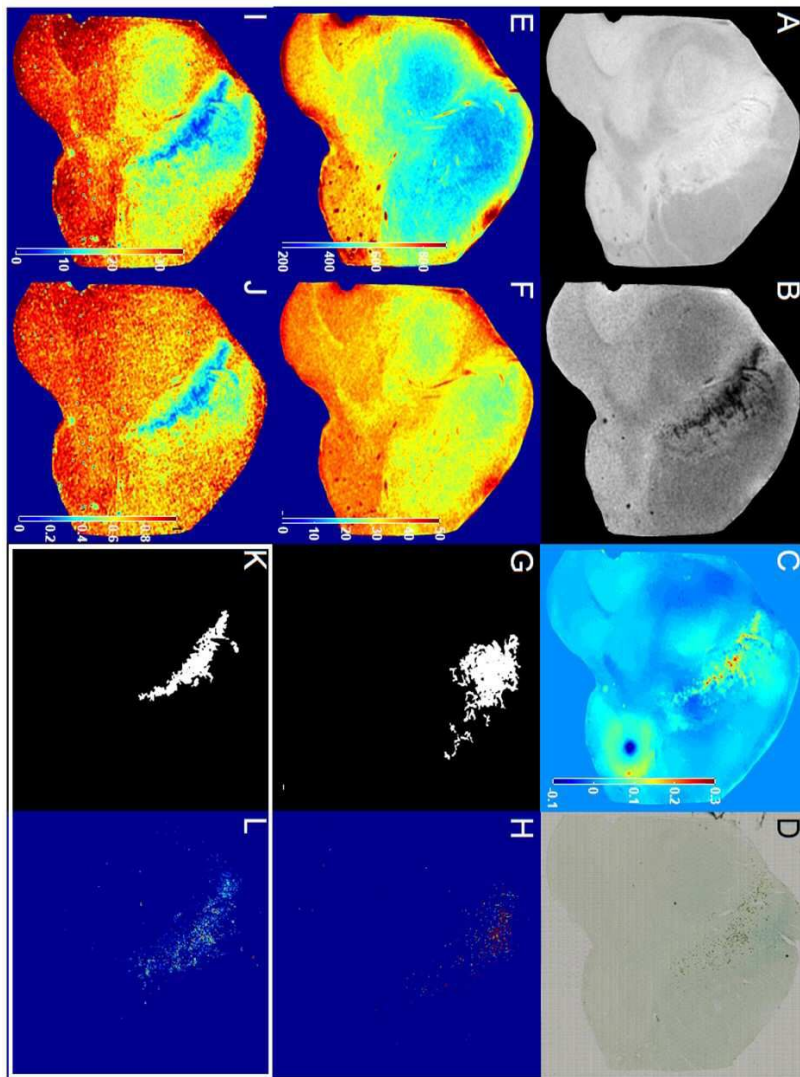
도면4



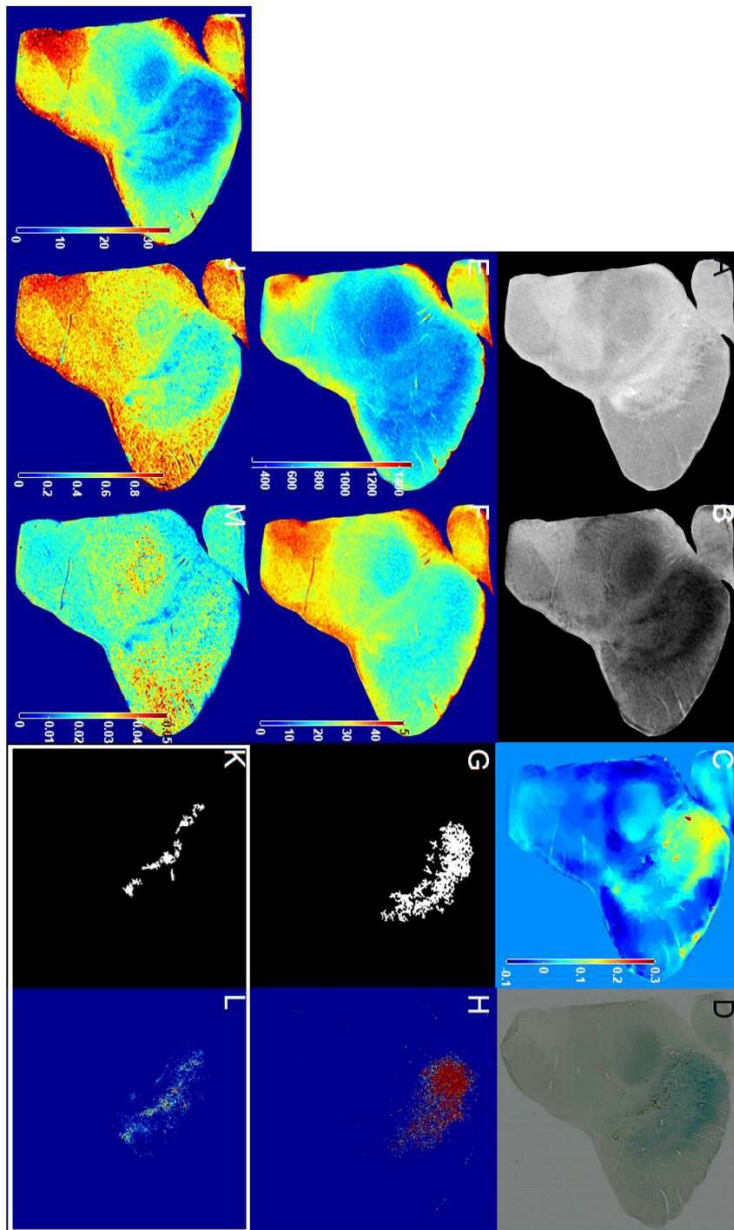
도면5



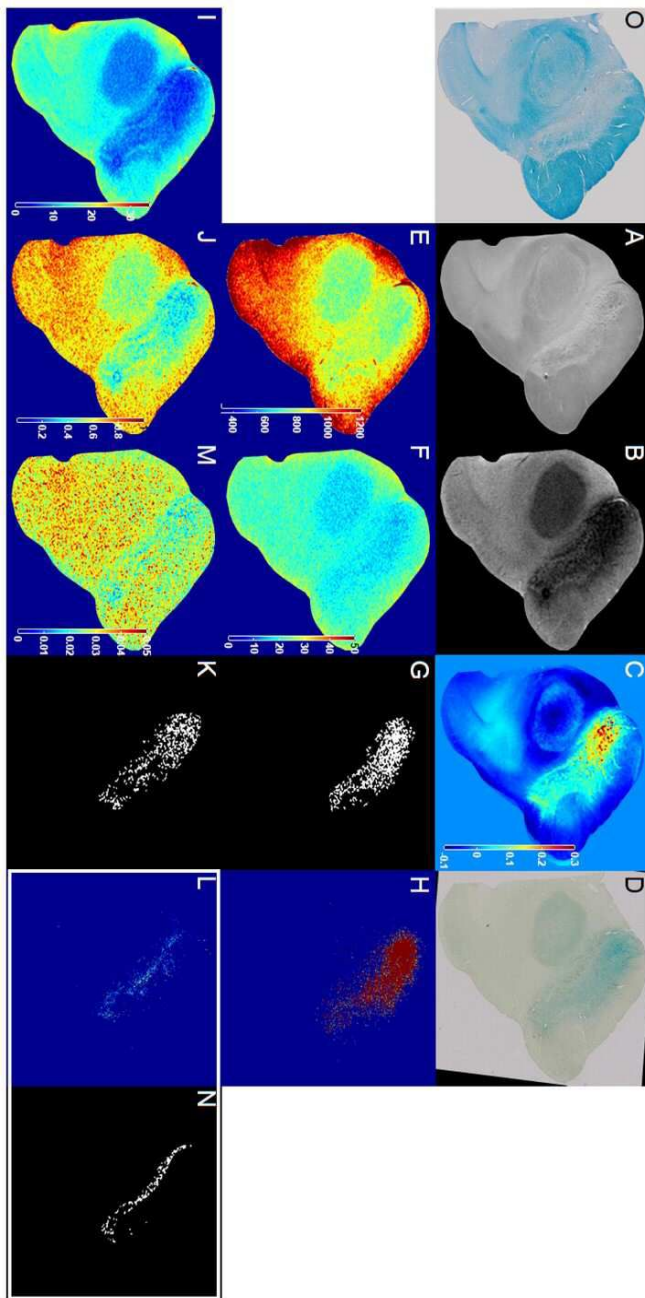
도면6



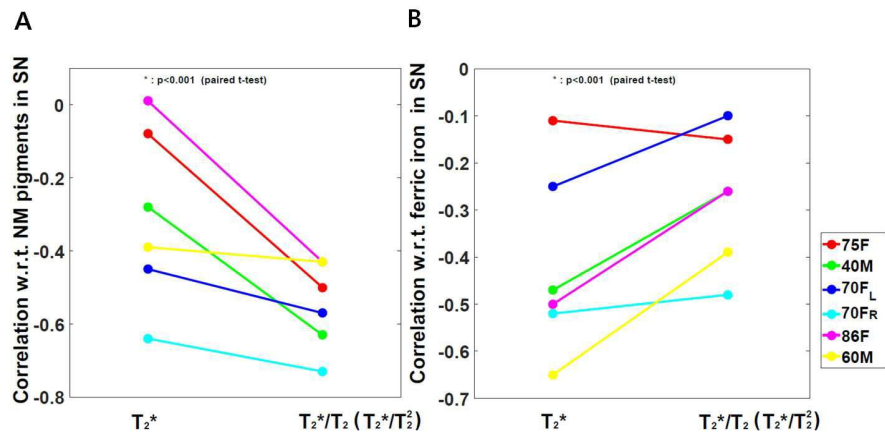
도면7



도면8



도면9



도면10

