

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 9월 3일 (03.09.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/175956 A1

(51) 국제특허분류:

A61B 3/13 (2006.01) *A61K 31/4709* (2006.01)
A61B 3/135 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
A61B 3/00 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)
A61B 5/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/002893

(22) 국제출원일: 2020년 2월 28일 (28.02.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
16/289,536 2019년 2월 28일 (28.02.2019) US

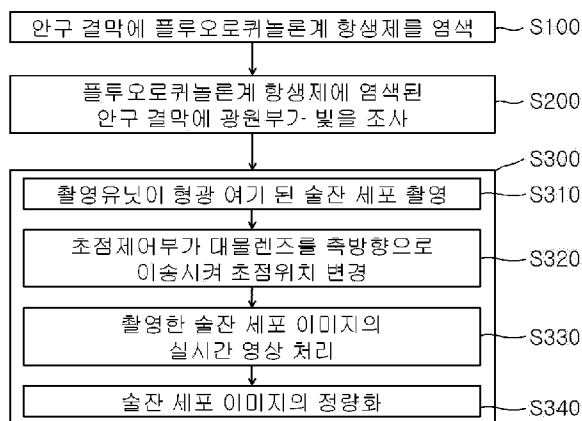
(71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH
RESEARCH AND BUSINESS DEVELOPMENT

FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR).

(72) 발명자: 김성한 (KIM, Seong Han); 04180 서울시 마포구 새창로8길 72, 202동 1504호, Seoul (KR). 김기현 (KIM, Ki Hean); 37673 경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 포스빌 9동 602호, Gyeongsangbuk-do (KR). 김명준 (KIM, Myoung Joon); 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 이승훈 (LEE, Seung Hun); 42665 대구시 달서구 두류남길 134, Daegu (KR). 장훈철 (CHANG, Hoon Chul); 08330 서울시 구로구 개봉로20길 158, 210동 802호, Seoul (KR). 르비엣호안 (LE, Viet Hoan); 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, 도미토리 15-206, Gyeongsangbuk-do (KR). 박수현 (PARK, Soo Hyun); 30100 세종시 달빛1로 201, 306동 701호, Sejong-si (KR).

(54) Title: METHOD FOR INSPECTING CELL IMAGES IN CONJUNCTIVAS USING FLUOROQUINOLONE-BASED ANTIBIOTIC, METHOD FOR DIAGNOSING OCULAR LESIONS AND DETECTING EFFICACY OF OCULAR LESION TREATMENT AGENT USING SAME, AND APPARATUS FOR SAME FOR INSPECTING CELL IMAGES IN CONJUNCTIVAS

(54) 발명의 명칭: 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법, 이를 이용한 안구 병변 진단방법과 안구병변 치료제 효능 검출방법 및 이를 위한 결막 내 세포영상 검사장치



S100 ... Stain ocular conjunctiva with fluoroquinolone-based antibiotic

S200 ... Irradiate fluoroquinolone-based antibiotic-stained ocular conjunctiva with light emitted from light source unit

S310 ... Capture images of fluorescence-excited goblet cells using imaging unit

S320 ... Change focal position by transferring objective lens in axial direction using focus control unit

S330 ... Real-time image process captured goblet cell images

S340 ... Quantify goblet cell images

(57) Abstract: The present invention pertains to: a method for inspecting cell images in conjunctivas using a fluoroquinolone-based antibiotic; a method for diagnosing ocular lesions and detecting the efficacy of an ocular lesion treatment agent using same, and an apparatus for same for inspecting cell images in conjunctivas, wherein goblet cells of ocular conjunctivas are stained with Moxifloxacin, which is a type of fluoroquinolone-based antibiotic, and fluorescence images of the stained goblet cells are captured by single-photon excitation in the near-ultraviolet or visible light region, thus making it possible to obtain morphological information about living tissue without damaging or destroying ocular conjunctivas. To this end, the present invention provides a method for inspecting cell images in conjunctivas using a fluoroquinolone-based antibiotic, the method characterized by comprising: a conjunctiva-staining step for staining an ocular conjunctiva with a fluoroquinolone-based antibiotic; a light irradiation step for irradiating the fluoroquinolone-based antibiotic-stained ocular conjunctiva with light emitted from a light source unit; and a conjunctiva-imaging step for using an imaging unit to image the ocular conjunctiva through the fluoroquinolone-based antibiotic fluorescence-excited by light in the light irradiation step, wherein the fluoroquinolone-based antibiotic stains goblet cells of the ocular conjunctiva in the conjunctiva-staining step, the light source unit outputs a single photon in the light irradiation step, and the imaging unit for imaging the ocular



(74) 대리인: 박진호 (PARK, Jin Ho); 06730 서울시 서초구 남부순환로 347길 60, 2층, 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, KR, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

conjunctiva in the conjunctiva-imaging step is a high-magnification fluorescence microscope or a slit lamp microscope.

(57) 요약서: 본 발명은 플루오로퀴놀론계 항생제 중 하나인 목시플록사신을 안구 결막의 술잔 세포에 염색하고, 염색된 술잔 세포를 근자외선 영역 또는 가시광선 영역으로 단광자 여기하여 형광 촬영함으로써 생체 조직의 형태학적 정보를 안구 결막의 손상이나 파괴 없이 얻을 수 있는 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법, 이를 이용한 안구 병변 진단방법과 안구병변 치료제 효능 검출방법 및 이를 위한 결막 내 세포영상 검사장치에 관한 것이다. 이를 위하여, 본 발명은 안구 결막에 플루오로퀴놀론계 항생제를 염색하는 결막 염색단계와, 상기 플루오로퀴놀론계 항생제에 염색된 상기 안구 결막에 광원부가 빛을 조사하는 광 조사단계와, 상기 광 조사단계에서 빛에 의하여 형광 여기된 상기 플루오로퀴놀론계 항생제를 통하여 촬영유닛이 상기 안구 결막을 촬영하는 결막 촬영단계를 포함하며, 상기 결막 염색단계에서 상기 플루오로퀴놀론계 항생제는 상기 안구 결막의 술잔 세포(goblet cell)를 염색하고, 상기 광 조사단계에서 상기 광원부는 단광자를 출력하며, 상기 결막 촬영단계에서 상기 안구 결막을 촬영하는 상기 촬영유닛은 고배율 형광 현미경(macroscope) 또는 세극등 현미경(slitt lamp microscope)인 것을 특징으로 하는 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 제공한다.

명세서

발명의 명칭: 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법, 이를 이용한 안구 병변 진단방법과 안구병변 치료제 효능 검출방법 및 이를 위한 결막 내 세포영상 검사장치 기술분야

- [1] 본 발명은 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법, 이를 이용한 안구 병변 진단방법과 안구병변 치료제 효능 검출방법 및 이를 위한 결막 내 세포영상 검사장치에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 플루오로퀴놀론계 항생제 중 하나인 목시플록사신을 안구 결막의 술잔 세포에 염색하고, 염색된 술잔 세포를 근자외선 영역 또는 가시광선 영역으로 단광자 여기하여 형광 촬영함으로써 생체 조직의 형태학적 정보를 안구 결막의 손상이나 파괴 없이 얻을 수 있는 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법, 이를 이용한 안구 병변 진단방법과 안구병변 치료제 효능 검출방법 및 이를 위한 결막 내 세포영상 검사장치에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 생체 조직 내 세포를 고해상도 촬영할 수 있는 광학현미경(optical microscopy)은 생물학 연구에서 사용되고 있으며, 임상에서는 안과, 피부과 검사에 활용되고 있다.
- [3] 임상에서는 주로 빛의 반사를 활용하는 비침습적 광학현미경을 사용하며 여기에는 공초점 반사현미경 (confocal reflectance microscopy) 등이 있다. 하지만 반사 현미경은 세포 대비도가 높지 않아, 대비도 향상이 필요임상에서는 주로 빛의 반사를 활용하는 비침습적 광학현미경을 사용하며 여기에는 공초점 반사현미경 (confocal reflectance microscopy) 등이 있다.
- [4] 하지만, 반사 현미경은 세포 대비도가 높지 않아, 대비도 향상이 필요한 경우 형광 물질(fluorescent probe)로 생체 조직을 염색한 후 여기(excitation)된 형광(fluorescence)을 이용하여 생체 조직을 촬영하는 형광 현미경이 사용된다.한 경우 형광 물질(fluorescent probe)로 생체 조직을 염색한 후 여기(excitation)된 형광(fluorescence)을 이용하여 생체 조직을 촬영하는 형광 현미경이 사용된다.
- [5] 여기서 형광 물질은 특정 관심 영역에서 강한 형광 신호를 발현함으로써 고 대비도 및 고속 영상 촬영을 가능하게 한다.
- [6] 형광 물질의 활용에 있어서, 동물 대상으로는 많은 종류의 형광 물질을 사용하고 있으나, 인체 대상으로는 인도시아닌 그린(indocyanine green)과 플루오레세인(fluorescein) 등이 혈관 염색 형광 물질로써 사용되고 있다.
- [7] 또한, 혈관 염색만으로는 병변 또는 암을 진단하거나, 세포의 형태학적 정보를 얻는데 어려움이 있으므로, 정확한 진단을 위해서는 인체 내 세포 염색이 필요하다.

- [8] 이를 위하여 인체 대상 세포 염색을 위한 형광 염색 약물이 연구되고 있으나, 현재는 세포에 대한 독성 문제 등으로 인하여 인체에 적용될 수 있는 마땅한 형광 물질이 없는 실정이었다.
- [9] 세포에 염색될 수 있는 약물 중 독성이 없는 목시플록사신은 현재 임상에서 세균감염을 치료하거나 예방하는데 사용되는 항균제인데, 내재적 형광(*intrinsic fluorescence*)을 지니고 있으며 조직 침투성이 뛰어나 생체 조직 염색 및 형광 촬영에 유리한 특성을 보유하고 있다.
- [10] 하지만, 목시플록사신의 경우 여기 효율(*excitation efficiency*)이 280nm의 중자외선 영역에서 최고치로 발현되고, 자외선은 인체에 유해하게 작용되므로 목시플록사신이 인체의 생체(*in-vivo*) 촬영에 사용되지 못하는 문제가 있었다.
- [11] 이를 해결하기 위하여, 최근 근적외선 여기 파장을 이용한 목시플록사신의 이광자 여기(*two-photon excitation*) 형광 촬영이 시연되었으며, 이를 통해 목시플록사신이 생체 내 조직과 세포를 염색하고, 이들의 형태를 고해상도로 촬영할 수 있음을 확인하였다.
- [12] 한편, 안구의 결막(*conjunctiva*)은 눈꺼풀의 안쪽과 안구의 흰 부분(공막)을 덮고 있는 얇고 투명한 점막이다. 결막은 각막과 함께 눈의 가장 바깥쪽 표면에 있어 눈을 보호한다. 결막은 상피세포와 술잔 세포로 구성된 표면 세포층 그리고 아래의 기질로 이루어져 있으며, 결막의 술잔 세포는 눈물 구성성분인 점액을 분비하고, 기질은 혈관과 림프조직이 풍부하며 면역 관련 세포가 분포되어 있다.
- [13] 상술한 바와 같이, 눈물 구성성분 중 하나인 점액을 만드는 술잔 세포의 점액분비 이상이 있는 경우, 안구건조증이 안구건조에 따른 염증이 일어날 수 있다. 술잔 세포의 점액 분비 이상은 결막의 술잔 세포의 밀도 변화와 형태 변화로부터 야기되고, 임상적으로 술잔 세포가 감소하는 질환은 알려져 있다.
- [14] 이로 인하여, 술잔 세포의 이미징 기술은 안구 질환 진단과 질환의 중증도를 판단하는데 도움이 되고 치료를 할 경우 치료에 대한 반응을 평가하고 경과를 임상관찰하는데 유용한 정보이다.
- [15] 이러한 검사방법 중, 현재 결막 내 술잔 세포 밀도 검사를 위해서 압흔세포진단법 (*impression cytology*)이 주로 사용된다. 압흔세포진단법은 여과지를 각막 윤부에 압박접촉시켜 결막의 최상위세포층을 추출하고, 이를 염색해서 검사하는 방법인데 상대적으로 쉽고 간단하지만 약간의 손상을 유발하므로 검사를 여러번 시행하는 경우에는 추천되지 않는다.
- [16] 최근 압흔세포진단법을 대체할 수 있는 방법으로 공초점 반사 현미경 (*confocal reflectance microscopy*)으로 비침습적으로 결막을 세포영상 촬영을 하여 술잔 세포 밀도를 계산하는 검사법이 보고되었다.
- [17] 이러한 공초점 반사 현미경 영상에서는 술잔 세포가 상대적으로 반사도가 높으며 크고 둥그란 형태로 나타나서 주변의 상피세포와 구별된다. 그러나 공초점 반사 현미경은 현미경 대물렌즈를 안구에 가까이 위치시켜야 검사가 가능하므로, 검사방법에 어려움이 따르고, 대비도가 높지 않으며, 장비가

고가여서 많이 활용되지 못하는 문제점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [18] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 플루오로퀴놀론계 항생제 중 하나인 목시플록사신을 안구 결막의 술잔 세포에 염색하고, 염색된 술잔 세포를 근자외선 영역 또는 가시광선 영역으로 단광자 여기하여 형광 촬영함으로써 생체 조직의 형태학적 정보를 안구 결막의 손상이나 파괴 없이 얻을 수 있는 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법, 이를 이용한 안구 병변 진단방법과 안구병변 치료제 효능 검출방법 및 이를 위한 결막 내 세포영상 검사장치를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [19] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 안구 결막에 플루오로퀴놀론계 항생제를 염색하는 결막 염색단계와, 상기 플루오로퀴놀론계 항생제에 염색된 상기 안구 결막에 광원부가 빛을 조사하는 광 조사단계와, 상기 광 조사단계에서 빛에 의하여 형광 여기된 상기 플루오로퀴놀론계 항생제를 통하여 촬영유닛이 상기 안구 결막을 촬영하는 결막 촬영단계를 포함하며, 상기 결막 염색단계에서 상기 플루오로퀴놀론계 항생제는 상기 안구 결막의 술잔 세포(goblet cell)를 염색하고, 상기 광 조사단계에서 상기 광원부는 단광자를 출력하며, 상기 광 조사단계에서 상기 광원부에서 출력되는 연속파 파장의 범위는 근자외선 영역 및 가시광선 영역이고, 상기 결막 촬영단계에서 상기 안구 결막을 촬영하는 상기 촬영유닛은 고배율 형광 현미경(microscope) 또는 세극등 현미경(slits lamp microscope)인 것을 특징으로 하는 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 제공한다.
- [20] 여기서, 상기 결막 염색단계에서 상기 안구 결막을 염색하는 상기 플루오로퀴놀론계 항생제는 목시플록사신을 포함할 수 있다.
- [21] 또한, 상기 광 조사단계에서 상기 광원부에서 출력되는 연속파 파장의 범위는 근자외선 영역 및 가시광선 영역을 포함할 수 있다.
- [22] 또한, 상기 근자외선 영역 및 가시광선 영역은 300nm 내지 476nm일 수 있다.
- [23] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 통해 촬영된 안구 결막의 술잔 세포를 통해 안구의 병변을 진단하는 방법에 있어서, 상기 술잔 세포의 단위 면적당 개수 변화, 형태 변화 또는 면적 변화를 기준으로 안구의 병변을 진단하는 안구 병변 진단방법을 제공한다.
- [24] 여기서, 상기 안구 병변은 화학 화상(chemical burns), 각결막염(keratoconjunctivitis), 반흔성유천포창(Ocular Cicatricial Pemphigoid), 스티븐스존슨증후군(Stevens-Johnson syndrome) 및 상윤부각결막염(Superior limbic keratoconjunctivitis)을 포함할 수 있다.

- [25] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 통해 촬영된 안구 결막의 술잔 세포를 통해 안구병변 치료제의 효능을 검출하는 방법에 있어서, 상기 안구 결막에 안구 병변 치료제를 투입하는 치료제 투입단계와, 상기 안구 병변 치료제를 투입하지 않은 안구 결막의 술잔 세포와 상기 치료제 투입단계를 통해 상기 안구 병변 치료제를 투입한 안구 결막의 술잔 세포의 단위 면적당 개수 변화, 형태 변화 또는 면적 변화를 기준으로 치료제의 효능을 검출하는 치료제 효능 검출단계를 포함하는 안구병변 치료제 효능 검출방법을 제공한다.
- [26] 또한, 본 발명은 플루오로퀴놀론계 항생제로 염색된 안구결막의 생체조직을 촬영하는 장치에 있어서, 상기 생체조직으로 빛을 조사하는 광원부와, 상기 광원부에서 조사된 빛에 의하여 형광 여기된 상기 생체조직을 촬영하는 촬영유닛과, 상기 광원부로부터 출력된 빛 또는 상기 빛에 의해 여기된 상기 플루오로퀴놀론계 항생제의 형광의 경로를 제어하는 렌즈부와, 상기 촬영유닛의 초점을 제어하는 대물렌즈와, 상기 대물렌즈와 결합되어, 상기 생체조직에 맺히는 초점위치를 변경시키는 초점제어부와, 상기 촬영유닛에서 촬영한 생체조직의 이미지를 생성하는 이미지 생성부를 포함하며, 상기 초점제어부에 의하여 변경되는 초점위치마다 상기 촬영유닛은 복수회 상기 생체조직을 촬영하여 촬영이미지를 생성하고, 상기 이미지 생성부는 복수개의 상기 촬영이미지 중 초점이 맞는 영역의 이미지를 조합하여 하나의 생체조직 이미지를 생성하며, 상기 광원부는 단광자를 출력하며, 상기 광원부에서 출력되는 연속파 파장의 범위는 근자외선 영역 및 가시광선 영역이고, 상기 촬영유닛은 고배율 형광 현미경(microscope) 또는 세극등 현미경(slits lamp microscope)인 것을 특징으로 하는 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사장치를 제공한다.
- [27] 여기서, 상기 안구 결막을 염색하는 상기 플루오로퀴놀론계 항생제는 목시플록사신을 포함할 수 있다.
- [28] 또한, 상기 근자외선 영역 및 가시광선 영역은 300nm 내지 476nm일 수 있다.

발명의 효과

- [29] 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법, 이를 이용한 안구 병변 진단방법과 안구병변 치료제 효능 검출방법 및 이를 위한 결막 내 세포영상 검사장치는 다음과 같은 효과를 가진다.
- [30] 첫째, 안구 결막을 플루오로퀴놀론계 항생제 중 하나인 목시플록사신으로 염색하고, 목시플록사신을 가시광선 영역의 빛으로 조사함으로써 안구 결막의 파괴 없이 신속하게 직접 촬영할 수 있으므로, 빠르고 정확한 진단을 수행할 수 있는 이점이 있다.
- [31] 둘째, 목시플록사신으로 염색한 안구 결막의 술잔 세포의 형광 영상화에 있어서, 공초점 형광 현미경과 같은 삼차원 해상도를 가지는 고비용, 고성능

현미경뿐만 아니라, 삼차원 해상도를 지원하지 않는 고배율 형광 현미경 또는 세극등 현미경에서와 같은 촬영장치에서도 안구 결막 표면에 분포한 술잔 세포를 촬영할 수 있으므로 검출 장비의 제한이 완화되는 이점이 있다.

[32] 셋째, 안구 결막의 술잔 세포의 구성 변화를 통해 안구의 병변을 진단할 수 있는 이점이 있다.

[33] 넷째, 안구건조병을 포함한 결막 술잔 세포 관련 질환에 대한 치료제 성능 검사에 있어서 인비보 동물 모델에서의 효과 검증에 활용되는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[34] 도 1은 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법의 흐름도를 도시한 도면이다.

[35] 도 2는 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 수행하기 위한 단광자 여기 현상에 대한 메커니즘을 도시한 도면이다.

[36] 도 3은 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법에서 목시플록사신의 근자외선 및 가시광선 영역의 단광자 여기 스펙트럼과 형광 방출 스펙트럼을 도시한 도면이다.

[37] 도 4의 (a)는 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법에서 목시플록사신으로 염색되지 않는 쥐의 안구 결막을 반사 공초점 현미경으로 촬영한 사진이고, 도 4 (b)는 목시플록사신으로 염색된 쥐의 안구 결막을 공초점 형광 현미경으로 촬영한 사진이다.

[38] 도 5의 (a) 내지 (e)는 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법에 따라 쥐의 결막을 목시플록사신으로 염색하여 촬영한 사진으로, 도 5의 (a) 내지 도 5의 (c)는 목시플록사신으로 염색된 쥐의 구결막(bulbar)을 삼차원 해상도를 지원하지 않는 일반 고배율 형광 현미경으로 촬영한 사진이며, 도 5의 (d)는 목시플록사신으로 염색된 쥐의 원개결막(fornix conjunctiva)을 고배율 형광 현미경으로 촬영한 사진이고, 도 5의 (e)는 목시플록사신으로 염색된 쥐의 검결막(orbital 또는 palpebral conjunctiva)을 고배율 형광 현미경으로 촬영한 사진이다.

[39] 도 6의 (a) 내지 (c)는 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법에 따라 쥐의 결막을 목시플록사신으로 염색하여 촬영한 사진으로, 도 6의 (a)는 목시플록사신으로 염색된 쥐의 구결막(bulbar)을 공초점 형광 현미경으로 촬영한 사진이고, 도 6의 (b)는 목시플록사신으로 염색된 쥐의 원개결막(fornix conjunctiva)을 공초점 형광 현미경으로 촬영한 사진이며, 도 6의 (c)는 목시플록사신으로 염색된 쥐의 결막 중 구결막(bulbar)과 원개결막(fornix conjunctiva)을 공초점 형광 현미경으로 이어서 촬영한 사진이다.

[40] 도 7은 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사장치의 구성을 개략적으로 도시한 도면이다.

[41] 도 8은 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사장치의 초점제어부의 제어에 의하여 변경되는 초점영역 및 생체조직 이미지의 예시를 도시한 도면이다.

[42] 도 9는 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사장치의 초점제어부의 제어에 의하여 변경되는 생체조직의 이미지를 도시한 도면이다.

[43] 도 10은 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법에서 이미지 정량화 단계를 구체적으로 도시한 도면이다.

발명의 실시를 위한 형태

[44] 이하, 상술한 해결하고자 하는 과제가 구체적으로 실현될 수 있는 본 발명의 바람직한 실시 예들이 첨부된 도면을 참조하여 설명된다. 본 실시 예들을 설명함에 있어서, 동일 구성에 대해서는 동일 명칭 및 동일 부호가 사용되며, 이에 따른 부가적인 설명은 하기에서 생략된다.

[45] 도 1 내지 도 6을 참조하여, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 설명하면 다음과 같다.

[46] 먼저, 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법 후술하는 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사장치를 이용하여 수행되며, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법은 결막 염색단계(S100), 광 조사단계(S200) 및 결막 촬영단계(S300)를 포함한다.

[47] 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 설명하기에 앞서, 도 2를 참조하여 단광자 여기 현상에 대한 메커니즘을 설명하면 다음과 같다.

[48] 도 2에 도시된 바와 같이, 여기 광자(excitation photon)를 이용하여 형광물질 분자 내 전자 에너지 준위를 바닥 상태(ground state)에서부터 들뜬 상태(excited state)까지 상승시킨다.

[49] 이후 들뜬 상태에서 바닥 상태로 전자의 에너지 준위가 다시 하강할 때 형광 광자(fluorescence photon)가 방출되며, 이때, 하나의 여기 광자가 흡수되고, 하나의 형광 광자를 방출하는 현상을 단광자 여기 형광이라고 하며, 이러한 단광자 여기 형광에 의하여 단광자 여기 효율은 이광자 여기 효율보다 높아 후술하는 광원부에서 조사하는 빛의 세기를 낮추어 촬영할 수 있게 된다.

[50] 즉, 생물체의 분자, 세포, 조직의 활동 모습은, 생물체의 분자, 세포, 조직을 형광 물질로 처리하면 광학 형광 현미경을 통해 고해상도로 관찰할 수 있다. 이는 형광 물질 내의 전자가 여기 광자에 의해 들뜬 상태로 되었다가 다시 제자리로 돌아가는 과정에서 독특한 색채의 형광 광자를 방출하기 때문이다.

[51] 이러한 형광 물질이 생체 조직에 주입되고, 형광 물질이 생체 조직의 세포에 흡수되어 고농도로 유지되는 경우, 형광 물질의 형광을 이용하여 생체 조직의 고

대비(contrast) 촬영이 가능하다.

- [52] 이때, 생체 조직에 염색되는 형광 물질이 인체에 독성을 가지지 않고, 인체에 부정적 영향을 주지 않는 가시광선 영역에서 형광 여기가 가능하면 형광 물질을 생체 조직에 염색하여 생체 조직의 형태학적 정보를 제공할 수 있게 된다.
- [53] 본 발명에서 생체 조직의 염색을 위하여 사용하는 플루오로퀴놀론계 항생제에는 목시플록사신, 가티플록사신, 페플록사신, 디플록사신, 노플록사신, 시프로플록사신, 오픈록사신 및 엔로플록사신 등이 있으며, 본 명세서에서는 자가 형광이 가시광선 영역에서 발현 가능한 목시플록사신을 사용하여 생체 조직의 염색을 진행하였다.
- [54] 또한, 도 3을 참조하여, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법에서 목시플록사신의 근자외선 및 가시광선 영역의 단광자 여기 스펙트럼과 형광 방출 스펙트럼을 설명하면 다음과 같다.
- [55] 도 3(a)와 도 3(b)는 각각 근자외선 영역과 가시광선 영역에서 목시플록사신의 여기 스펙트럼과 형광 방출 스펙트럼을 나타낸다.
- [56] 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법에서 사용하는 목시플록사신은 현재 시중에서 판매되고 있는 Vigamox 점안액 0.5%(Alcon, 미국)을 사용하였다.
- [57] 도 3(a) 및 도 3(b)에 도시된 바와 같이, 목시플록사신은 근자외선 영역의 340nm 부근에서 여기 효율이 가장 높았고, 그 이후 파장 증가에 따라 여기 효율이 점차 감소하였다.
- [58] 하지만, 근자외선 범위 밖의 가시광선 영역인 405nm 내지 478nm 파장에서도 여기가 가능하며, 405nm에서는 340nm에 비해 약 27%의 형광 세기를 가졌으며, 이는 700nm 여기 광 기반의 이광자 형광 세기보다 훨씬 더 높은 것을 확인하였다.
- [59] 따라서, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법에서 사용하는 연속파 광원은 300nm 내지 476nm의 파장을 사용하며, 이에 따라 근자외선 내지 중자외선 파장을 사용함으로써 형광 신호가 증가되므로 더 빠른 속도로 촬영할 수 있게 되며, 가시광선에 해당하는 파장을 사용함으로써 생체 조직에 사용될 수 있게 된다.
- [60] 물론, 상술한 단광자 파장 중 근자외선 영역에 해당하는 영역은 생체 내 조직의 세포 손상의 위험이 따를 수 있지만, 단광자 여기 효율이 높은 특징을 이용하여 광원부에서 조사하는 빛의 세기를 낮추어 촬영함으로써 생체 조직에 사용될 수 있게 된다.
- [61] 다시 도 1을 참조하여, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 설명하면 다음과 같다.
- [62] 상기 결막 염색단계(S100)는 실험하고자 하는 생체 조직인 안구 결막의 세포에 플루오로퀴놀론계 항생제를 염색하며, 본 명세서에서는 플루오로퀴놀론계 항생제 중 하나인 목시플록사신을 사용한다.

- [63] 이때, 상기 결막 염색단계(S100)에서는 목시플록사신이 상기 안구 결막의 술잔 세포(goblet cell)를 염색한다.
- [64] 상기 광 조사단계(S200)에서는 목시플록사신에 염색된 상기 안구 결막에 광원부가 빛을 조사한다. 여기서 상기 광원부는 상기 광원부는 플루오로퀴놀론계 항생제 형광발현을 위한 여기광인 단광자를 출력하되, 상술한 근자외선과 가시광선 범위의 연속파 빛을 출력하며, 후술하는 실험 예에서 상기 광원부는 근자외선과 가시광선 범위의 연속파 빛을 출력함으로써 형광 여기를 수행한다.
- [65] 상기 결막 촬영단계(S300)는 상기 광 조사단계(S200)에서 빛에 의하여 형광 여기된 상기 목시플록사신을 통하여 후술하는 촬영유닛이 상기 술잔 세포를 촬영하며, 후술하겠지만, 이때, 상기 촬영유닛은 초점 이송장치를 포함하고, 삼차원 해상도를 지원하지 않는 일반 고배율 형광 현미경(microscope) 또는 세극등 현미경(slut lamp microscope)을 포함한다. 물론, 삼차원 해상도를 지원하는 현미경에도 적용 가능하다.
- [66] 구체적으로, 상기 결막 촬영단계는(S300) 세포 촬영단계(S310), 초점위치 변경단계(S320), 실시간 영상처리단계(S330) 및 이미지 정량화 단계(S340)를 포함한다.
- [67] 상기 세포 촬영단계(S310)에서는 상기 촬영 유닛이 안구 결막에 염색되어 형광 여기된 술잔 세포를 촬영한다.
- [68] 이후, 상기 초점위치 변경단계(S320)에서 후술하는 초점제어부가 대물렌즈를 축방향으로 이송시켜 초점위치를 변경시킨다.
- [69] 상기 세포 촬영단계(S310)와 상기 초점위치 변경단계(S320)는 촬영하는 영역의 크기 및 초점위치에 따라 복수번 수행된다.
- [70] 상기 실시간 영상처리단계(S330)에서는 촬영한 술잔 세포 이미지를 실시간으로 영상처리한다.
- [71] 상기 이미지 정량화 단계(S340)에서는 술잔세포의 실시간으로 영상처리된 술잔 세포의 이미지를 정량화 하며, 도 10에 도시된 바와 같이, 얻어지는 이미지로부터 영상 대비도 조정(contrast enhance)을 수행하고, 임계값을 기준으로 술잔 세포 이미지를 이진 이미지(binary image)로 만들어 술잔 세포의 정량적 정보를 얻도록 한다.
- [72] 상술한 이미지 정량화 단계를 통해 획득하는 상기 정량적 정보는 술잔 세포의 밀도, 술잔 세포 군집(cluster)의 크기 분포, 술잔 세포의 형태, 술잔 세포의 균일성을 포함한다.
- [73] 상술한 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 이용한 실험 예들을 설명하면 다음과 같다.
- [74]
- [75] <실험 예1: 목시플록사신 염색 여부에 따른 쥐의 안구 결막 촬영>
- [76] 도 4의 (a)는 쥐의 안구 결막에 목시플록사신을 투여하기 전에 반사 공초점

현미경(Reflectance confocal microscope)으로 촬영한 사진이며, 도 4 (b)는 쥐의 안구 결막에 목시플록사신을 투여한 후 공초점 형광 현미경(Confocal fluorescence microscop)으로 촬영한 사진이다.

[77] 도 4의 (a)와 도 4 (b)에 각각 도시된 바와 같이, 쥐의 안구 결막의 술잔 세포는 자가 형광이 약하기 때문에 대비도가 좋지 못해 목시플록사신의 투여 전에는 세포의 촬영에 어려움이 따랐지만, 목시플록사신 투여 후에는 목시플록사신이 술잔 세포에 염색되며, 목시플록사신의 단광자 여기 형광으로 인하여 안구 결막의 술잔 세포가 고대비도로 촬영됨을 알 수 있다.

[78] 즉, 목시플록사신이 안구 결막의 술잔 세포 내에서 고농도를 유지하면서 자가 형광보다 강한 세기의 형광을 발현한 것을 확인할 수 있으며, 이에 따라 고대비의 형태학적 정보를 얻을 수 있게 된다.

[79]

[80] <실험 예2: 고배율 형광 현미경을 사용한 쥐의 안구 결막 촬영>

[81] 도 5의 (a) 내지 (e)는 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법에 따라 살아있는 상태의 쥐의 결막을 목시플록사신으로 염색하여 촬영한 사진이다.

[82] 여기서, 도 5의 (a) 내지 도 5의 (c)는 목시플록사신으로 염색된 쥐의 구결막(bulbar)을 고배율 형광 현미경으로 촬영한 사진이다. 도 5의 (a) 내지 도 5의 (c)에 도시된 바와 같이, 구결막에서 술잔 세포의 분포와 군집의 크기가 작은 것을 확인할 수 있다.

[83] 또한, 도 5의 (d)는 목시플록사신으로 염색된 쥐의 원개결막(fornix conjunctiva)을 고배율 형광 현미경으로 촬영한 사진이며, 도 5의 (d)에 도시된 바와 같이, 원개결막에서 술잔 세포의 분포가 뿔뿔하고 군집의 크기가 큰 것을 확인할 수 있다.

[84] 또한, 도 5의 (e)는 목시플록사신으로 염색된 쥐의 검결막(orbital 또는 palpebral conjunctiva)을 상기 촬영유닛에 포함되는 고배율 형광 현미경으로 촬영한 사진이며, 도 5의 (e)에 도시된 바와 같이, 검결막에서 술잔 세포의 분포가 뿔뿔하고 군집의 크기가 큰 것을 확인할 수 있다.

[85] 즉, 도 5의 (a) 내지 도 5의 (e)에 도시된 바와 같이, 살아있는 상태의 쥐의 결막을 목시플록사신으로 염색함으로써 안구 결막의 술잔 세포를 확인할 수 있다. 뿐만 아니라, 안구 결막의 술잔 세포 형광 영상화에는 공초점 현미경과 같은 삼차원 해상도를 지원하는 고성능 현미경뿐만 아니라, 삼차원 해상도를 지원하지 않는 일반 고배율 형광 현미경에서 촬영이 가능하다.

[86] 즉, 삼차원 해상도를 지원하지만, 고가이며, 사용이 복잡하고, 좁은 촬영영역을 가지는 공초점 현미경을 사용하지 않더라도, 삼차원 해상도를 지원하지 않는 형광 현미경에 상기 초점제어부를 결합시킴으로써 곡면의 생체조직도 초점을 맞춰 촬영할 수 있다.

[87]

- [88] <실험 예3: 고배율 형광 현미경을 사용한 쥐의 안구 결막 촬영>
- [89] 도 6의 (a) 내지 (c)는 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법에 따라 쥐의 결막을 목시플룩사신으로 염색하여 공초점 형광 현미경으로 촬영한 사진이다.
- [90] 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법에서 상기 촬영장치는 공초점 형광 현미경을 더 포함할 수 있다.
- [91] 여기서, 도 6의 (a)는 목시플룩사신으로 염색된 쥐의 구결막(bulbar)을 공초점 형광 현미경으로 촬영한 사진이며, 도 6의 (a)에 도시된 바와 같이, 구결막에서 술잔 세포의 분포와 군집의 크기가 작을 것을 확인할 수 있다.
- [92] 또한, 도 6의 (b)는 목시플룩사신으로 염색된 쥐의 원개결막(fornix conjunctiva)을 공초점 형광 현미경으로 촬영한 사진이며, 도 6의 (b)에 도시된 바와 같이, 원개결막에서 술잔 세포의 분포가 뿔뿔하고 군집의 크기가 큰 것을 확인할 수 있다.
- [93] 또한, 도 6의 (c)는 목시플룩사신으로 염색된 쥐의 결막 중 구결막(bulbar)과 원개결막(fornix conjunctiva)을 공초점 형광 현미경으로 이어서 촬영한 사진이며, 도 6의 (c)에 도시된 바와 같이, 각막(cornea)과 연곽(limbus)에서는 술잔 세포(goblet cell)가 없지만, 구결막부터 점차 술잔 세포가 나타나 원개결막으로 이동이 진행될수록 술잔 세포의 분포가 뿔뿔하고, 군집의 크기가 커지는 것을 확인할 수 있다.
- [94] 즉, 도 6의 (a) 내지 (c)에 도시된 바와 같이, 살아있는 상태의 쥐의 결막을 목시플룩사신으로 염색함으로써 안구 결막의 술잔 세포를 확인할 수 있다.
- [95] 또한, 본 발명에 따른 안구 병변 진단방법을 설명하면 다음과 같다.
- [96] 본 발명에 따른 안구 병변 진단방법은 상술한 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 통해 촬영된 안구 결막의 술잔 세포를 통해 안구의 병변을 진단한다.
- [97] 상기 안구 병변은 단위 면적당 술잔 세포의 개수 또는 술잔 세포의 면적을 기준으로 진단하며, 상기 안구 병변은 화학 화상(chemical burns), 각결막염(keratoconjunctivitis), 반흔성유천포창(Ocular Cicatricial Pemphigoid), 스티븐스존슨증후군(Stevens-Johnson syndrome) 및 상윤부각결막염(Superior limbic keratoconjunctivitis)을 포함하고, 상기 안구 병변의 진단을 다음 표 1을 기준으로 수행될 수 있다.
- [98]

[표1]

	구결막 술잔 세포 수 손실 (%)	검결막 술잔 세포 수 손실 (%)	차이 (%)
Chemical burns	60%	40%	20
keratoconjunctivitis sicca (KCS)	70-80 %	60-80	10
Ocular Cicatricial Pemphigoid (OCP)	95	90-95	0-5
Stevens-Johnson syndrome	99-100	98-100	0-1
Superior limbic keratoconjunctivitis (SLK)	85	90	-5

- [99] 상기 표 1과 같이, 구결막 술잔 세포 수가 60% 손상되고, 검결막 술잔 세포 수가 40%로 손상되며, 구결막과 검결막의 술잔 세포 손상 차이가 20%가 될 때 화학 화상으로 진단된다.또는, 구결막 술잔 세포 수가 70-80% 손상되고, 검결막 술잔 세포 수가 60-80%로 손상되며, 구결막과 검결막의 술잔 세포 손상 차이가 0-10%가 될 때 각결막염으로 진단된다.
- [100] 또는, 구결막 술잔 세포 수가 95% 손상되고, 검결막 술잔 세포 수가 90-95%로 손상되며, 구결막과 검결막의 술잔 세포 손상 차이가 0-5%가 될 때 반흔성유헤천포창으로 진단된다.
- [101] 또는, 구결막 술잔 세포 수가 99-100% 손상되고, 검결막 술잔 세포 수가 98-100%로 손상되며, 구결막과 검결막의 술잔 세포 손상 차이가 0-1%가 될 때 스티븐스존슨증후군으로 진단된다.
- [102] 마지막으로, 구결막 술잔 세포 수가 85% 손상되고, 검결막 술잔 세포 수가 90%로 손상되며, 구결막과 검결막의 술잔 세포 손상 차이가 5%가 될 때 상윤부각결막염군으로 진단된다.
- [103] 물론, 상술한 안구 병변의 진단은 술잔 세포 수의 변화뿐만 아니라, 단위면적당 술잔 세포의 면적 변화를 기준으로도 수행될 수 있다.
- [104] 또한, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 통해 촬영된 상기 술잔 세포의 형태학적인 정보를 제공할 수 있고, 이러한 형태학 적 정보는 술잔 세포의 크기 및 분포 형태등 모든 형태를 포함하며, 이를 기준으로 안구 병변의 진단을 수행할 수 있게 된다.
- [105] 즉, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법은 상술한 실험에서 활용된 쥐 뿐만 아니라, 이 외의 동물 생체(in-vivo) 모델에서 생체 조직을 염색하여 촬영함으로써 세포의 형태학적 정보를 확인할

수 있으며, 이에 따라 동물의 안구 병변의 진단을 수행할 수 있다.

- [106] 또한, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 이용해 촬영된 안구 결막의 술잔 세포를 기반으로, 안구병변 치료제의 효능을 검출할 수 있다.
- [107] 본 발명에 따른 안구병변 치료제 효능 검출방법은 치료제 투입단계와 치료제 효능 검출단계를 포함한다.
- [108] 상기 치료제 투입단계에서는 상기 안구 결막에 안구 병변 치료제를 투입한다.
- [109] 이후, 상술한 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 이용함으로써 상기 안구 병변 치료제를 투입하지 않은 안구 결막의 술잔 세포와 상기 치료제 투입단계를 통해 상기 안구 병변 치료제를 투입한 안구 결막의 술잔 세포를 촬영한다.
- [110] 상기 치료제 효능 검출단계에서 상기 안구 병변 치료제를 투입하지 않은 안구 결막의 술잔 세포와, 상기 치료제 투입단계를 통해 상기 안구 병변 치료제를 투입한 안구 결막의 술잔 세포의 단위 면적당 개수 변화, 형태 변화 또는 면적 변화를 기준으로 치료제의 효능을 검출한다.
- [111] 즉, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 술잔세포 영상화 방법은 안구 병변의 진단뿐만 아니라, 관련 병변에 대한 치료제 성능 검사에 있어서 인비보 동물 모델에서의 효과 검증에 활용될 수 있다.
- [112] 상술한 바와 같이, 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 통해 안구 결막에 포함된 여러 종류의 결막을 촬영할 수 있으며, 여러 종류의 결막을 구성하는 술잔 세포의 개수 또는 면적의 변화를 기준으로 안구의 병변을 진단뿐만 아니라, 안구 병변의 치료제의 효능을 검출할 수 있다.
- [113] 도 7 내지 도 9를 참조하여, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사장치를 설명하면 다음과 같다.
- [114] 먼저, 도 7을 참조하여, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사장치의 구성을 설명하면 다음과 같다.
- [115] 도 7에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사장치는 광원부(100), 촬영유닛(200), 렌즈부, 차단필터(BF), 여기필터(EF), 빔 스플리터(BS), 대물렌즈(300), 초점제어부(400) 및 이미지 생성부(500)를 포함한다.
- [116] 상기 광원부(100)는 플루오로퀴놀론계 항생제로 염색된 안구결막의 생체조직에 빛을 조사하며, 여기서 상기 안구 결막을 염색하는 상기 플루오로퀴놀론계 항생제는 목시플록사신이다.
- [117] 또한, 상기 광원부(100)는 단광자를 출력하며, 상기 광원부(100)에서 출력되는 연속파 파장의 범위는 근자외선 영역 및 가시광선 영역이며, 상기 근자외선 영역 및 가시광선 영역은 300nm 내지 476nm인 것이 바람직하다.
- [118] 상기 촬영유닛(200)은 상기 광원부(100)에서 조사된 빛에 의하여 형광 여기된 상기 생체조직을 촬영하며, 여기서, 상기 촬영유닛(200)은 고배율 형광

- 현미경(macroscope) 또는 세극등 현미경(slit lamp microscope)을 포함한다.
- [119] 상기 렌즈부는 상기 광원부(100)로부터 출력된 빛 또는 상기 빛에 의해 여기된 상기 플루오로퀴놀론계 항생제의 형광의 경로를 제어하며, 상기 렌즈부는 배치된 위치 및 역할에 따라 제1 내지 제3 렌즈(L3)를 포함하며, 이에 대한 설명은 후술한다.
- [120] 상기 대물렌즈(300)는 상기 촬영유닛(200)의 초점을 제어하며, 상기 초점제어부(400)는 상기 대물렌즈(300)와 결합되어 상기 대물렌즈(300)를 이동시키면서 상기 생체조직에 맺히는 초점위치를 변경시킨다.
- [121] 즉, 상기 초점제어부(400)에 의하여 변경되는 초점위치마다 상기 촬영유닛(200)은 복수회 상기 생체조직을 촬영하여 촬영이미지를 생성하며, 이에 대한 설명은 후술한다.
- [122] 상기 이미지 생성부(500)는 상기 촬영유닛(200)에서 촬영한 생체조직의 이미지를 생성하며, 상기 이미지 생성부(500)는 복수개의 상기 촬영이미지 중 초점이 맞는 영역의 이미지를 조합하여 하나의 생체조직 이미지를 생성한다.
- [123] 상기 생체조직 이미지를 생성하는 과정을 설명하기 이전에, 상기 광원부(100)에서 조사되는 빛의 경로와, 상기 생체조직에 염색된 목시플록사신으로부터 여기된 형광의 경로를 설명하면 다음과 같다.
- [124] 도 7에 도시된 바와 같이, 상기 광원부(100)에서는 단광자의 빛을 조사하며, 상기 빛은 제3 렌즈(L3), 여기필터(EF), 빔 스플리터(BS) 및 대물렌즈(300)를 거쳐 상기 안구결막의 생체조직에 빛을 조사한다.
- [125] 상기 생체조직에 빛에 의하여 여기된 형광은 상기 대물렌즈(300), 상기 차단필터(BF) 및 제1 렌즈(L1)를 거쳐 촬영유닛(200)에 촬영되어 이미지를 생성한다.
- [126] 이때, 상기 촬영유닛(200)이 촬영한 이미지는 상기 초점제어부(400)에 의하여 상기 대물렌즈(300)의 위치, 정확하게는 상기 대물렌즈(300)의 Z축(수직방향) 위치가 변경되며, 상기 대물렌즈(300)의 위치에 따라, 상기 생체조직에서 초점이 맺히는 부분이 달라진다. 이는 상기 안구결막의 형상이 굴곡지게 형성되어, 안구결막의 높이차에 따라 초점이 맺히는 영역이 달라지기 때문이다.
- [127] 즉, 도 8 및 도 9에 도시된 바와 같이, 상기 대물렌즈(300)의 위치가 변경됨에 따라 상기 촬영유닛(200)에서 촬영한 이미지마다 초점이 맺히는 영역이 변경되며, 이에 따라 상기 촬영유닛(200)은 상기 대물렌즈(300)의 위치가 변경될 때마다 서로 다른 초점영역을 가지는 복수개의 이미지(I1)를 생성한다.
- [128] 이후, 도 8에 도시된 바와 같이, 복수개의 상기 이미지 중 초점이 맞는 영역의 이미지를 조합하여 하나의 생체조직 이미지(I2)를 생성한다.
- [129] 이 외, 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사장치의 구성의 상세 내용은 상술한 본 발명에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법과 동일하므로, 이에 대한 설명은 생략한다.

- [130] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명은 상술한 특정한 바람직한 실시 예에 한정되지 아니하며, 청구범위에서 청구하는 본 발명의 요지를 벗어남 없이 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변형의 실시가 가능하고 이러한 변형은 본 발명의 범위에 속한다.

산업상 이용가능성

- [131] 본 발명은 안구 결막을 플루오로퀴놀론계 항생제 중 하나인 목시플록사신으로 염색하고, 목시플록사신을 가시광선 영역의 빛으로 조사함으로써 안구 결막의 파괴 없이 신속하게 직접 촬영할 수 있으므로, 빠르고 정확한 진단을 수행할 수 있으며, 안구의 병변을 진단할 수 있고, 치료제 성능 검사와 관련된 산업에 이용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 안구 결막에 플루오로퀴놀론계 항생제를 염색하는 결막 염색단계;
 상기 플루오로퀴놀론계 항생제에 염색된 상기 안구 결막에 광원부가
 빛을 조사하는 광 조사단계;
 상기 광 조사단계에서 빛에 의하여 형광 여기 된 상기 플루오로퀴놀론계
 항생제를 통하여 촬영유닛이 상기 안구 결막을 촬영하는 결막
 촬영단계;를 포함하며,
 상기 결막 염색단계에서 상기 플루오로퀴놀론계 항생제는 상기 안구
 결막의 술잔 세포(goblet cell)를 염색하고,
 상기 광 조사단계에서 상기 광원부는 단광자를 출력하며,
 상기 광 조사단계에서 상기 광원부에서 출력되는 연속파 파장의 범위는
 근자외선 영역 및 가시광선 영역이고,
 상기 결막 촬영단계에서 상기 안구 결막을 촬영하는 상기 촬영유닛은
 고배율 형광 현미경(microscope) 또는 세극등 현미경(slitt lamp
 microscope)인 것을 특징으로 하는 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한
 결막 내 세포영상 검사방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 결막 염색단계에서 상기 안구 결막을 염색하는 상기
 플루오로퀴놀론계 항생제는 목시플록사신을 포함하는 것을 특징으로
 하는 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
 상기 근자외선 영역 및 가시광선 영역은 300nm 내지 476nm인 것을
 특징으로 하는 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상
 검사방법.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를
 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 통해 촬영된 안구 결막의 술잔
 세포를 통해 안구의 병변을 진단하는 방법에 있어서,
 상기 술잔 세포의 단위 면적당 개수 변화, 형태 변화 또는 면적 변화를
 기준으로 안구의 병변을 진단하는 안구 병변 진단방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
 상기 안구 병변은 화학 화상(chemical burns),
 각결막염(keratoconjunctivitis), 반흔성유천포창(Ocular Cicatricial
 Pemphigoid), 스티븐스존슨증후군(Stevens-Johnson syndrome) 및
 상윤부각결막염(Superior limbic keratoconjunctivitis)을 포함하는 것을
 특징으로 하는 안구 병변 진단방법.
- [청구항 6] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 플루오로퀴놀론계 항생제를
 이용한 결막 내 세포영상 검사방법을 통해 촬영된 안구 결막의 술잔

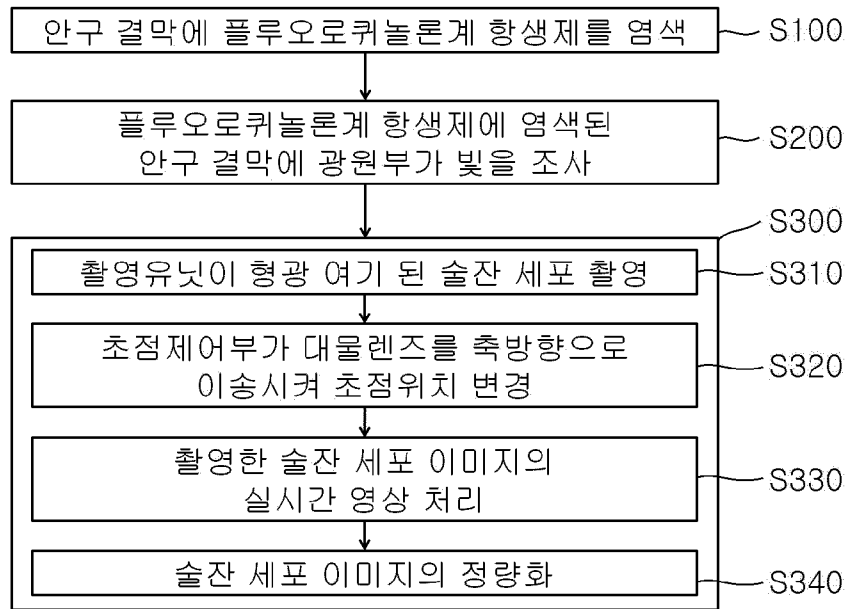
세포를 통해 안구병변 치료제의 효능을 검출하는 방법에 있어서,
 상기 안구 결막에 안구 병변 치료제를 투입하는 치료제 투입단계; 및
 상기 안구 병변 치료제를 투입하지 않은 안구 결막의 술잔 세포와 상기
 치료제 투입단계를 통해 상기 안구 병변 치료제를 투입한 안구 결막의
 술잔 세포의 단위 면적당 개수 변화, 형태 변화 또는 면적 변화를
 기준으로 치료제의 효능을 검출하는 치료제 효능 검출단계;를 포함하는
 안구병변 치료제 효능 검출방법.

[청구항 7] 플루오로퀴놀론계 항생제로 염색된 안구결막의 생체조직을 촬영하는
 장치에 있어서,
 상기 생체조직으로 빛을 조사하는 광원부;
 상기 광원부에서 조사된 빛에 의하여 형광 여기된 상기 생체조직을
 촬영하는 촬영유닛;
 상기 광원부로부터 출력된 빛 또는 상기 빛에 의해 여기된 상기
 플루오로퀴놀론계 항생제의 형광의 경로를 제어하는 렌즈부;
 상기 촬영유닛의 초점을 제어하는 대물렌즈;
 상기 대물렌즈와 결합되어, 상기 생체조직에 맺히는 초점위치를
 변경시키는 초점제어부; 및
 상기 촬영유닛에서 촬영한 생체조직의 이미지를 생성하는 이미지
 생성부;를 포함하며,
 상기 초점제어부에 의하여 변경되는 초점위치마다 상기 촬영유닛은
 복수회 상기 생체조직을 촬영하여 촬영이미지를 생성하고,
 상기 이미지 생성부는 복수개의 상기 촬영이미지 중 초점이 맞는 영역의
 이미지를 조합하여 하나의 생체조직 이미지를 생성하며,
 상기 광원부는 단광자를 출력하며, 상기 광원부에서 출력되는 연속파
 파장의 범위는 근자외선 영역 및 가시광선 영역이고,
 상기 촬영유닛은 고배율 형광 현미경(microscope) 또는 세극등 현미경(slits
 lamp microscope)인 것을 특징으로 하는 플루오로퀴놀론계 항생제를
 이용한 결막 내 세포영상 검사장치.

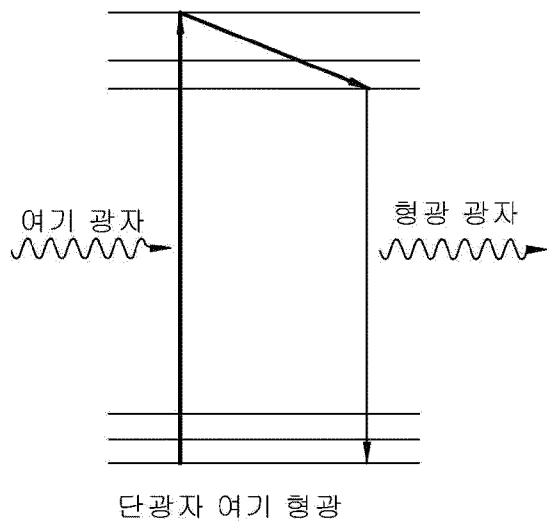
[청구항 8] 제7항에 있어서,
 상기 안구 결막을 염색하는 상기 플루오로퀴놀론계 항생제는
 목시플록사신을 포함하는 것을 특징으로 하는 플루오로퀴놀론계
 항생제를 이용한 결막 내 세포영상 검사장치.

[청구항 9] 제7항에 있어서,
 상기 근자외선 영역 및 가시광선 영역은 300nm 내지 476nm인 것을
 특징으로 하는 플루오로퀴놀론계 항생제를 이용한 결막 내 세포영상
 검사장치.

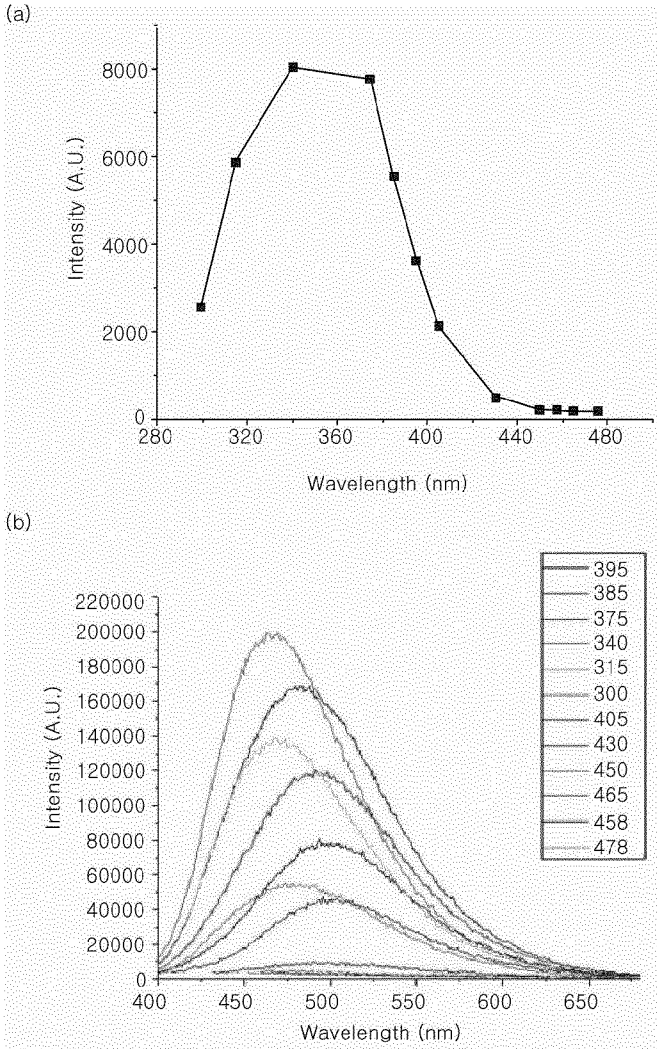
[도1]



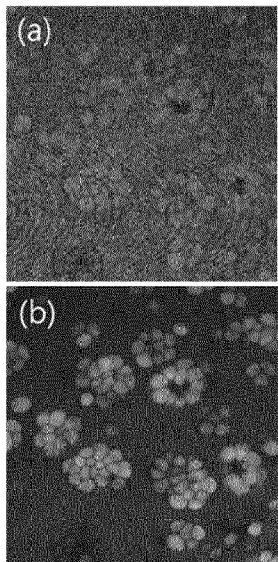
[도2]



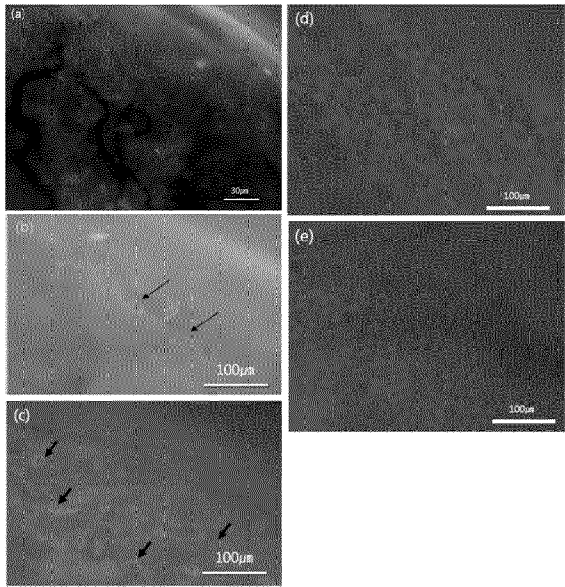
[도3]



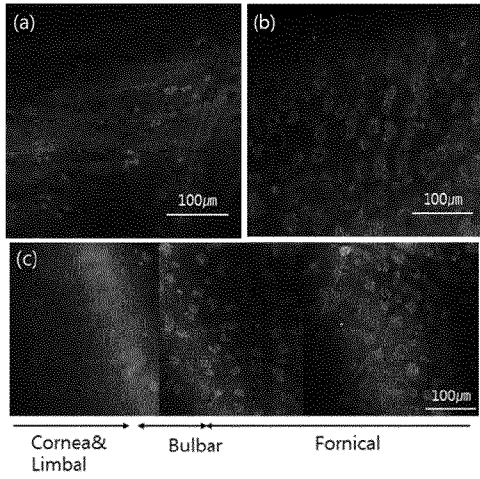
[도4]



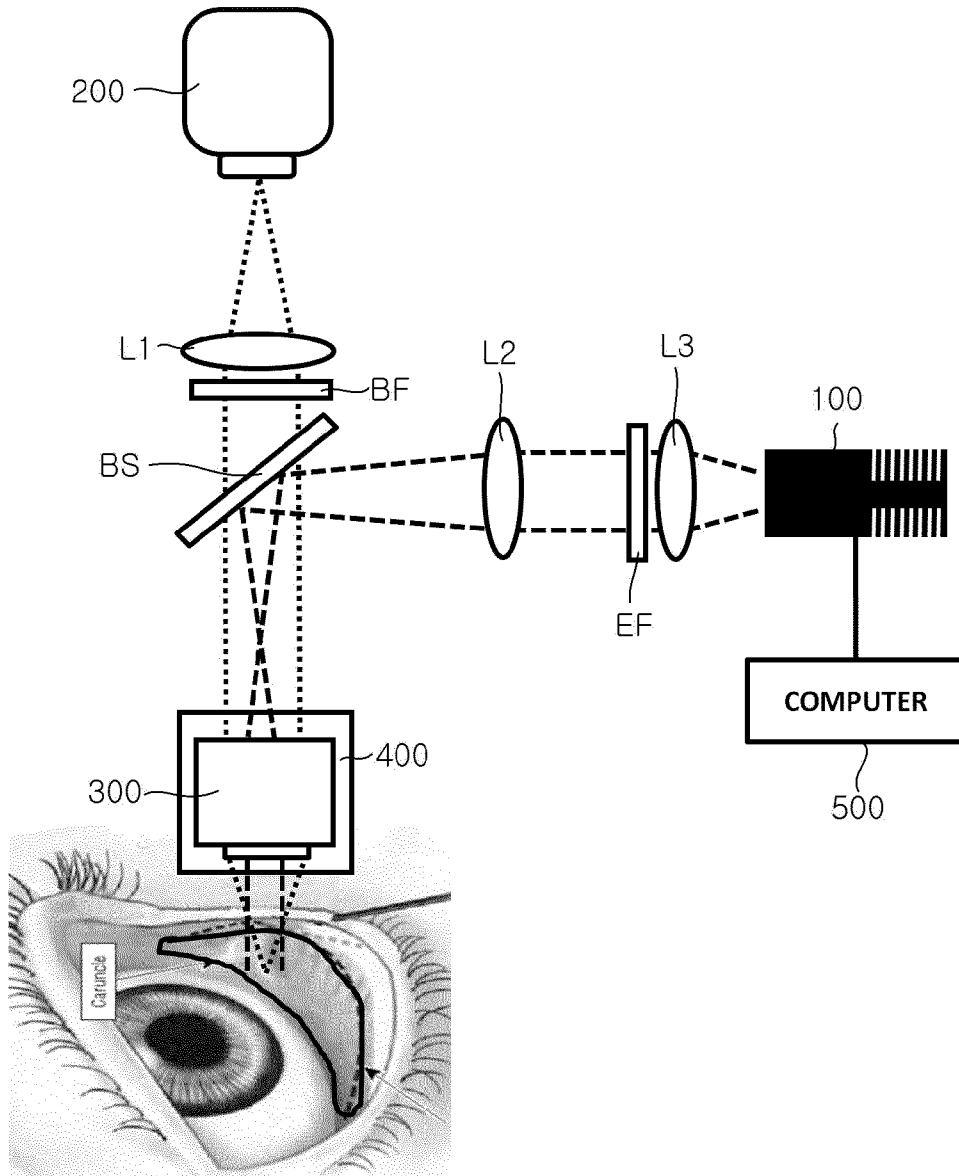
[도5]



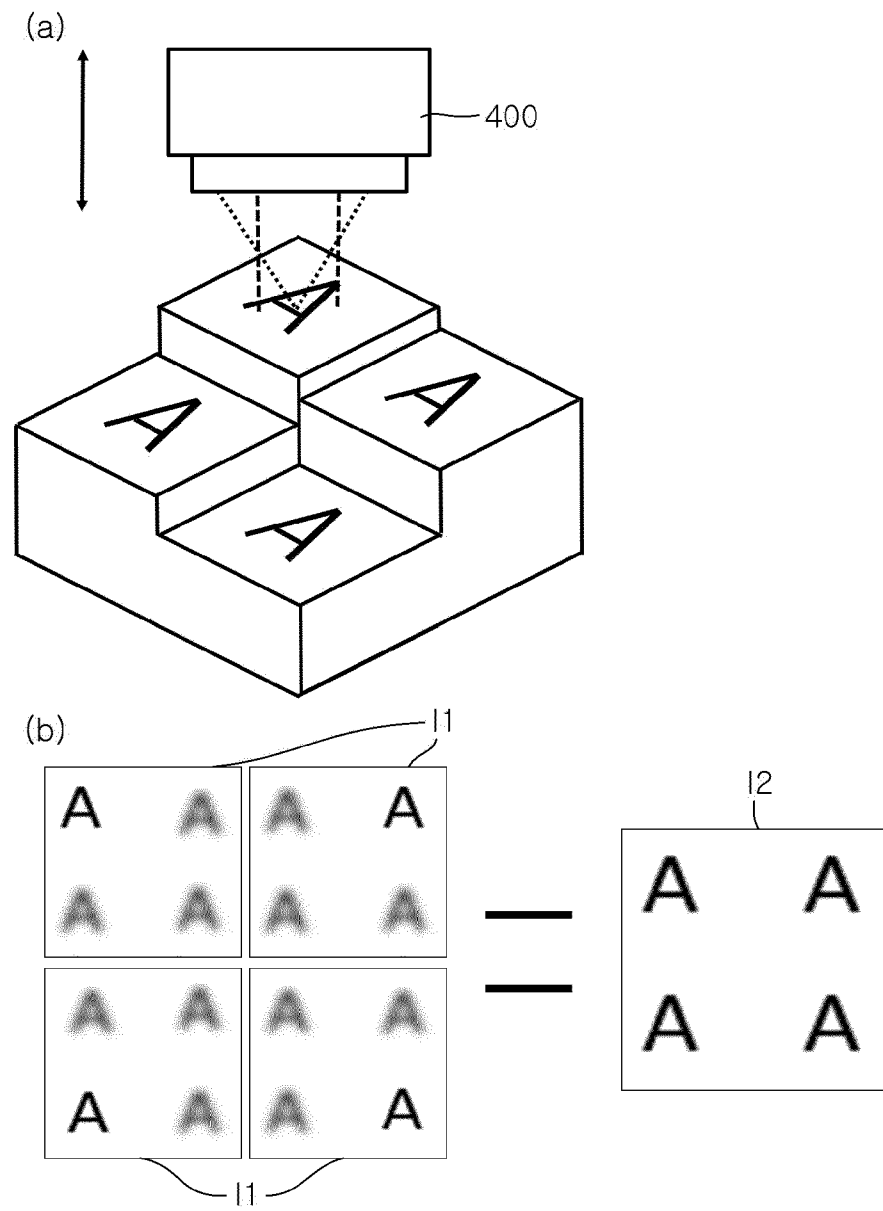
[도6]



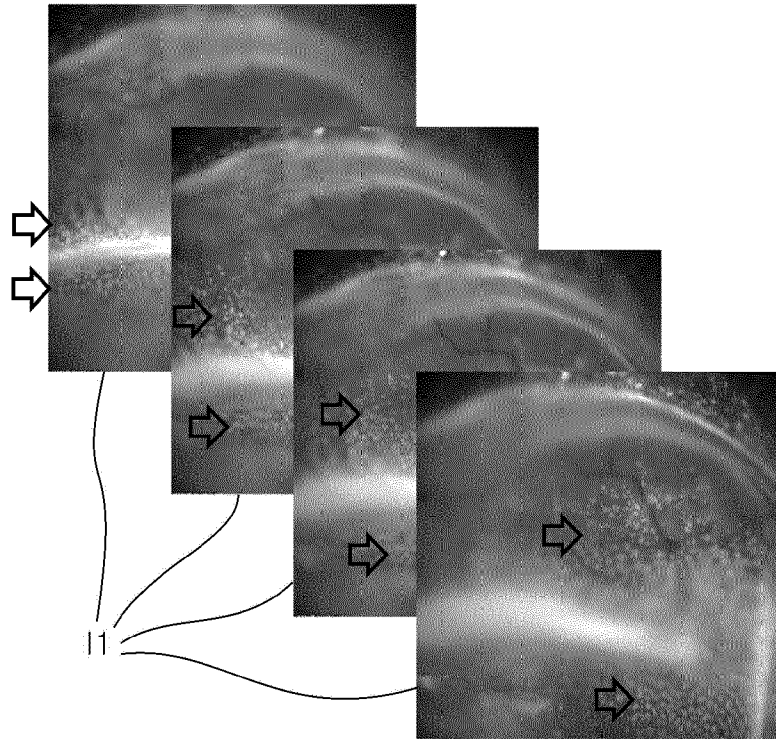
[도7]



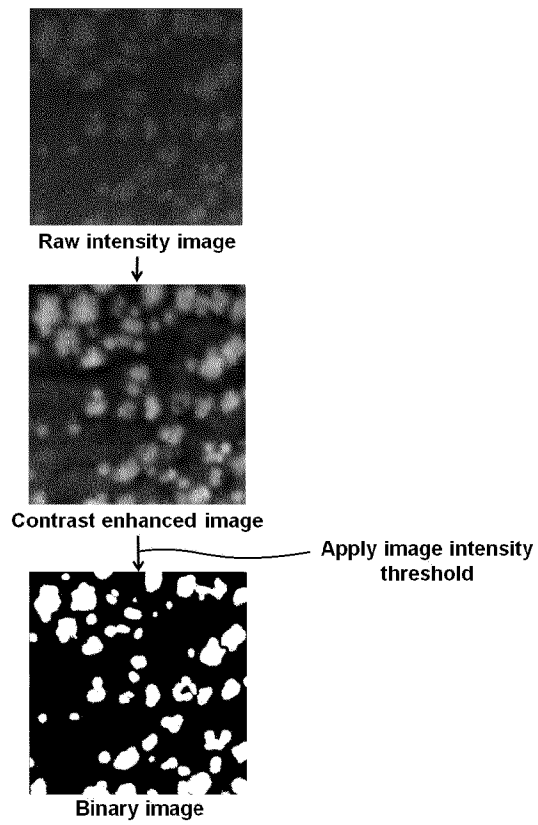
[도8]



[도9]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/002893

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61B 3/13(2006.01)i, A61B 3/135(2006.01)i, A61B 3/00(2006.01)i, A61B 5/00(2006.01)i, A61K 31/4709(2006.01)i, A61P 31/00(2006.01)i, A61K 49/00(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 3/13; A61B 5/00; A61B 5/05; A61K 31/437; A61K 31/4725; A61K 49/00; G01N 21/64; A61B 3/135; A61B 3/00; A61K 31/4709; A61P 31/00

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: conjunctiva, goblet cell, fluoro quinolone, moxifloxacin, photon, slit lamp microscope, lesion

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2016-0136738 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) 30 November 2016 See paragraphs [0027]-[0036], [0083].	1-9
A	US 2010-0121172 A1 (LADIC, Lance Anthony et al.) 13 May 2010 See paragraphs [0002], [0020].	1-9
A	US 2016-0077007 A1 (LAWRENCE LIVERMORE NATIONAL SECURITY, LLC. et al.) 17 March 2016 See claims 1-18.	1-9
A	KR 10-2016-0037834 A (LUMICELL, INC.) 06 April 2016 See paragraphs [0071]-[0087].	1-9
PX	KIM, Seonghan et al. In vivo fluorescence imaging of conjunctival goblet cells. Scientific reports. 2019, vol. 9, Article no. 1545 (Published online on 29 October 2019) See abstract and pages 1-7.	1-9



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

10 JUNE 2020 (10.06.2020)

Date of mailing of the international search report

10 JUNE 2020 (10.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-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/KR2020/002893

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0136738 A	30/11/2016	KR 10-1781261 B1	23/10/2017
		KR 10-1872163 B1	31/07/2018
		US 2016-0341734 A1	24/11/2016
		US 2017-0146546 A1	25/05/2017
		US 9719997 B2	01/08/2017
US 2010-0121172 A1	13/05/2010	WO 2010-056409 A1	20/05/2010
US 2016-0077007 A1	17/03/2016	AU 2015-318251 A1	23/03/2017
		AU 2015-318251 A1	24/03/2016
		AU 2015-318251 B2	10/10/2019
		CN 107003242 A	01/08/2017
		EP 3194937 A1	26/07/2017
		IL 251244 D0	29/05/2017
		JP 2017-534846 A	24/11/2017
		KR 10-2017-0055973 A	22/05/2017
		US 2017-191937 A1	06/07/2017
		US 9625387 B2	18/04/2017
		US 9964489 B2	08/05/2018
		WO 2016-043991 A1	24/03/2016
		WO 2018-175565 A1	27/09/2018
KR 10-2016-0037834 A	06/04/2016	AU 2014-236561 A1	01/10/2015
		AU 2014-236561 A1	25/09/2014
		AU 2014-236561 B2	16/08/2018
		CA 2906056 A1	25/09/2014
		CN 105473051 A	06/04/2016
		CN 105473051 B	30/04/2019
		EP 2967280 A2	20/01/2016
		JP 2016-520339 A	14/07/2016
		JP 2019-111351 A	11/07/2019
		JP 6478971 B2	06/03/2019
		US 2014-0276102 A1	18/09/2014
		US 2014-0276103 A1	18/09/2014
		US 2014-0301950 A1	09/10/2014
		US 2016-0317037 A1	03/11/2016
		US 9763577 B2	19/09/2017
		WO 2014-152389 A1	25/09/2014
		WO 2014-152389 A8	25/09/2014
		WO 2014-152797 A2	25/09/2014
		WO 2014-152797 A3	08/01/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61B 3/13(2006.01)i, A61B 3/135(2006.01)i, A61B 3/00(2006.01)i, A61B 5/00(2006.01)i, A61K 31/4709(2006.01)i, A61P 31/00(2006.01)i, A61K 49/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61B 3/13; A61B 5/00; A61B 5/05; A61K 31/437; A61K 31/4725; A61K 49/00; G01N 21/64; A61B 3/135; A61B 3/00; A61K 31/4709; A61P 31/00

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: 결막(conjunctiva), 술잔 세포(goblet cell), 플루오로퀴놀론(fluoro quinolone), 모시플록사신(moxifloxacin), 단광자(photon), 세극등 현미경(slit lamp microscope), 병변(lesion)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2016-0136738 A (포항공과대학교 산학협력단) 2016.11.30 단락 [0027]-[0036], [0083]	1-9
A	US 2010-0121172 A1 (LADIC, LANCE ANTHONY 등) 2010.05.13 단락 [0002], [0020]	1-9
A	US 2016-0077007 A1 (LAWRENCE LIVERMORE NATIONAL SECURITY, LLC 등) 2016.03.17 청구항 1-18	1-9
A	KR 10-2016-0037834 A (루미셀, 아이엔씨.) 2016.04.06 단락 [0071]-[0087]	1-9
PX	KIM, SEONGHAN 등, "In vivo fluorescence imaging of conjunctival goblet cells", Scientific reports, 2019년, 9권, Article No. 15457 (온라인 공개 2019.10.29.) 초록 및 페이지 1-7 참조.	1-9

☐ 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 이후 "X"에 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

2020년 06월 10일 (10.06.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 06월 10일 (10.06.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김연정

전화번호 +82-42-481-3325



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0136738 A	2016/11/30	KR 10-1781261 B1 KR 10-1872163 B1 US 2016-0341734 A1 US 2017-0146546 A1 US 9719997 B2	2017/10/23 2018/07/31 2016/11/24 2017/05/25 2017/08/01
US 2010-0121172 A1	2010/05/13	WO 2010-056409 A1	2010/05/20
US 2016-0077007 A1	2016/03/17	AU 2015-318251 A1 AU 2015-318251 A1 AU 2015-318251 B2 CN 107003242 A EP 3194937 A1 IL 251244 D0 JP 2017-534846 A KR 10-2017-0055973 A US 2017-191937 A1 US 9625387 B2 US 9964489 B2 WO 2016-043991 A1 WO 2018-175565 A1	2017/03/23 2016/03/24 2019/10/10 2017/08/01 2017/07/26 2017/05/29 2017/11/24 2017/05/22 2017/07/06 2017/04/18 2018/05/08 2016/03/24 2018/09/27
KR 10-2016-0037834 A	2016/04/06	AU 2014-236561 A1 AU 2014-236561 A1 AU 2014-236561 B2 CA 2906056 A1 CN 105473051 A CN 105473051 B EP 2967280 A2 JP 2016-520339 A JP 2019-111351 A JP 6478971 B2 US 2014-0276102 A1 US 2014-0276103 A1 US 2014-0301950 A1 US 2016-0317037 A1 US 9763577 B2 WO 2014-152389 A1 WO 2014-152389 A8 WO 2014-152797 A2 WO 2014-152797 A3	2015/10/01 2014/09/25 2018/08/16 2014/09/25 2016/04/06 2019/04/30 2016/01/20 2016/07/14 2019/07/11 2019/03/06 2014/09/18 2014/09/18 2014/10/09 2016/11/03 2017/09/19 2014/09/25 2014/09/25 2014/09/25 2015/01/08