



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월01일
(11) 등록번호 10-1681170
(24) 등록일자 2016년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/49 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)
G01N 11/02 (2006.01) G01N 35/00 (2006.01)
G01N 35/08 (2006.01) G01P 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/4915 (2013.01)
B01L 3/5027 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0153330
(22) 출원일자 2015년11월02일
심사청구일자 2015년11월02일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020090107358 A
Blood Viscoelasticity measurement using
steady and transient flow controls of blood
in a microfluidic analogue of
Wheastone-bridge channel(2013년)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
강양준
광주광역시 서구 풍암순환로 70 현대아파트, 104
동 701호 (풍암동, 현대아파트)
(74) 대리인
특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 8 항

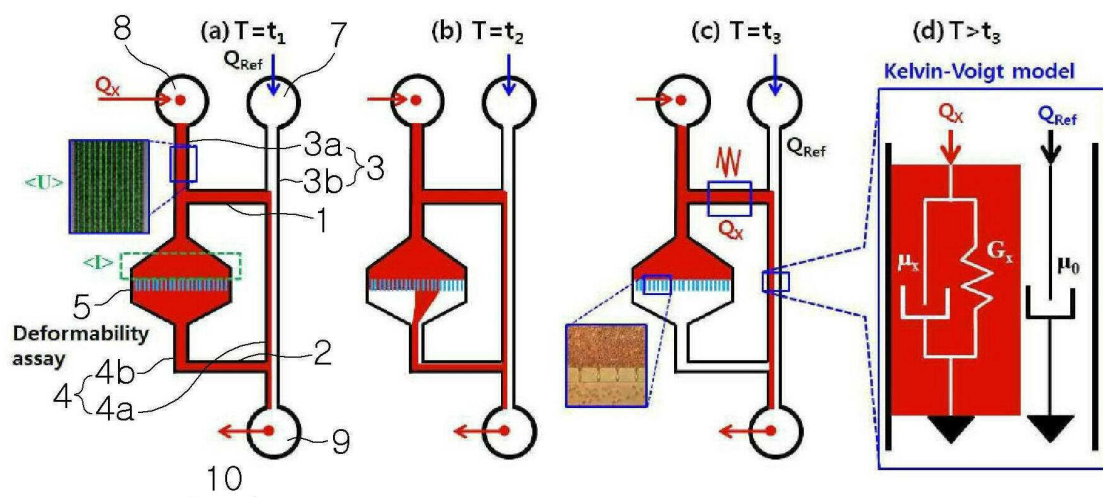
심사관 : 기광용

(54) 발명의 명칭 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구

(57) 요약

본 발명은 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에 관한 것으로서, 혈액의 변형성, 점탄성, 유속 또는 유량 측정이 가능하도록 미세유체소자에 상기 혈액이 통과하는 미세유체채널이 형성되는 미세유체기구에 있어서, 상기 미세유체소자에 상하로 각각 배치되는 상부 및 하부 브리지 채널; 상단부에 혈액을 주입하는 혈액주입구와 기준유(뒷면에 계속)

대표도 - 도2



채를 주입하는 유체주입구가 각각 형성되어 상기 상부 브리지 채널의 양단부에 각각 연결된 상부 사이드 채널; 상기 상부 및 하부 브리지 채널 사이의 양단부에 각각 연결되고 한쪽의 채널은 하부 브리지 채널의 한쪽 끝단에서 연장되어 하단부에 배출구가 형성된 하부 사이드 채널; 및 상기 하부 사이드 채널의 다른 쪽 채널 상에 연결된 가변형성 평가 챔버(DAC)로 구성되는 미세유체 바이오센서를 포함하여 구성되며, 별도의 혈액 채혈 없이 생체 밖(ex-vivo) 조건 하에서 혈액의 생물성치의 연속적○ 장시간 모니터링 관점에서, 미세유체 바이오센서를 폐쇄 유체 회로(즉 질병에 걸린 쥐 모델)에 통합함으로써, 측정을 위하여 유체 회로로부터 채혈이 없이 장기간 및 연속적 모니터링 가능하며, 보관시간 경과 및 인공물로 인한 혈액 생물성치의 특성변화에 대한 고려가 필요 없는 효과가 있다. 또한 채널 변경이 없기 때문에 "Fahraeus-Lindqvist 효과"로 인한 점도 차이 문제가 해결되는 효과가 있다.

(52) CPC특허분류

G01N 11/02 (2013.01)

G01N 35/08 (2013.01)

G01P 5/001 (2013.01)

B01L 2300/0627 (2013.01)

B01L 2300/1822 (2013.01)

G01N 2035/00237 (2013.01)

G01N 2035/00346 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711027695

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구진흥 (조사분석사업명 : 신진연구자지원)

연구과제명 ex-vivo 혈액 생물성치 측정을 위한 미세유체시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2015.07.01 ~ 2016.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

혈액의 변형성, 점탄성, 유속 또는 유량 측정이 가능하도록 미세유체소자에 상기 혈액이 통과하는 미세유체채널이 형성되는 미세유체기구에 있어서,

상기 미세유체소자에 상하로 각각 배치되는 상부 및 하부 브리지 채널;

상단부에 혈액을 주입하는 혈액주입구와 기준유체를 주입하는 유체주입구가 각각 형성되어 상기 상부 브리지 채널의 양단부에 각각 연결된 상부 사이드 채널;

상기 상부 및 하부 브리지 채널 사이의 양단부에 각각 연결되고 한쪽의 채널은 하부 브리지 채널의 한쪽 끝단에 서 연장되어 하단부에 배출구가 형성된 하부 사이드 채널; 및

상기 하부 사이드 채널의 다른 쪽 채널 상에 연결된 가변형성 평가 챔버(DAC)로 구성되는 미세유체 바이오센서를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미세유체 바이오센서가 설치되는 펠티에 칩 및 상기 펠티에 칩에 연결된 온도 제어부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 온도 제어부는,

상기 펠티에 칩과 +극으로 연결된 스위칭 모드 파워 서플라이(SMPS);

상기 펠티에 칩과 -극으로 연결되고 상기 SMPS와도 -극으로 연결된 고체상태 릴레이;

상기 상부 사이드 채널에 연결된 열전대;

상기 열전대 및 고체상태 릴레이와 전기적으로 연결된 온도 제어기; 및

상기 온도 제어기와 연결된 표시부를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 하부 사이드 채널의 한쪽 채널 및 상부 사이드 채널로 혈액의 점탄성을 측정하고, 상기 하부 사이드 채널의 다른 쪽 채널의 가변형성 평가 챔버(DAC)로 적혈구의 변형성을 측정하며, 상기 상부 및 하부 브리지 채널을 포함한 상부 및 하부 사이드 채널의 다른 쪽 채널로 혈유속을 측정하도록 한 것을 특징으로 하는 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 혈액의 점탄성 측정은 Kelvin-Voigt 모델을 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 혈유속은 마이크로-PIV를 이용하여 측정하도록 한 것을 특징으로 하는 혈액의 생물성치 측정용 미세유체 기구.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 상부 사이드 채널의 혈액주입구에 혈액을 주입하고 유체주입구에 기준유체를 주입하는 시린지 펌프를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 하부 사이드 채널의 다른 쪽 채널 및 하부 브리지 채널은 하부 사이드 채널의 한쪽 채널에 연결되지 않고 분리되어 별도의 혈액배출구를 형성함을 특징으로 하는 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구.

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에 관한 것으로서, 상세히는 2개의 브리지 채널에 상부 사이드 채널과 하부 사이드채널을 연결하고, 상기 하부 사이드 채널의 한쪽 채널 상에 DAC(Deformability Assessment Chamber)를 연결하여, 상기 DAC를 통과하는 혈액을 통해 적혈구의 변형성과 혈유속을 측정하고, 상기 상부 사이드 채널과 하부 사이드 채널의 다른 쪽 채널을 통과하는 혈액 및 기준유체를 통해 혈액의 점탄성을 측정하도록 한 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 1. 본 발명의 개요
- [0003] 2009년 건강보험정책연구원의 분석에 의하면, 2008년 고혈압, 당뇨병, 심장질환 등의 심혈관계 질환 환자의 수는 각각 459만명, 178만명, 94만명이며, 매년 7.5%, 4.7%, 3.5% 증가하고 있다고 한다. 또한 미국심장학회에 의하면 심혈관 질환이 현대인들의 제1 사망원인(48%)이며, 국내에서도 제 2의 사망 원인(37.5%)으로 급격히 증가되고 있는 것이 현실이다.
- [0004] 특히 동맥경화, 심근경색, 뇌출혈 등의 심혈관계 질환은 사전증상 없이 갑작스레 발병하여 사망 또는 심각한 합병증을 유발한다. 하지만, 기존의 생화학적인(Biochemical) 검출방법으로만 조기진단이 힘들기 때문에, 이에 대해 효과적으로 사전에 대처하기 위하여 생물리적(Biophysical) 진단기술이 필요하다.
- [0005] 최근에는 혈액 생물성치[점도, 점탄성, 적혈구 용적률(hematocrit:혈액의 전체 부피에 대한 적혈구 부피의 비), 변형성, 응집성 등]들 중 혈액의 점도에 대한 많은 연구결과로부터, 혈액의 점도와 심혈관 질환과의 상관관계 보고들이 늘어나고 있고, 심혈관 질환의 진단 및 질병의 진행상태의 모니터링을 위해 혈액의 점도 측정은 중요하다.
- [0006] 2. 본 발명의 국내외 연구동향
- [0007] 상용의 점도계(conventional viscometer)는 실험실용으로 구입가격이 높고, 상대적으로 많은 샘플 소모량(~mL)과 측정시간(~hr)이 필요하며, 정확한 측정을 위하여 반복적인 점도측정이 필요하다. 부가적으로, 혈액점도 측정 후에 세척하여 사용하는 방식으로 임상현장에서 적용이 곤란하다. 이에 비하여, 미세유체소자 기반의 점도계는 샘플, 정확도, 실제 유동과의 유사성, 자유표면의 부재, 일회성 등의 고유한 장점이 있어 임상현장의 적용성에서 잠재성이 높다.
- [0008] 미세유체소자 기반의 점도계는 측정대상의 유체의 점도를 측정하기 위하여 미세유체 채널내의 유체유동에 의하여 발생하는 마찰손실에 의한 압력강하 (pressure drop)를 기반으로 하여 다양한 방법들이 제안되었다. 이렇게 제안된 방법은 (1) 압력센서를 이용하여 압력강하를 직접적으로 측정하여 점도를 계산하는 직접법이 있고, (2)

기준유체(reference fluid)와 측정대상유체(sample fluid)의 점도차이에 의한 경계면의 이동을 검출하여, 각각의 유체가 차지하는 비율로 점도를 측정할 수 있는 방법이 있다. 또한, 미세유체 채널 어레이(microfluidic channel array) 내에 카운팅 채널(counting channel)을 설치하고, 유체역학 흐름 구획(hydrodynamic flow compartment) 개념을 이용하여 기준유체 대비 측정대상 유체의 점도 차이에 의하여 두 유체가 카운팅 채널에 채워진 채널 개수를 카운팅하여 유체점도를 측정하는 방법이 있다. 마지막으로, 미세유체소자 기반의 휘트스톤 브리지 회로(Wheatstone-bridge circuit)를 이용하여 브리지 회로 내에 흐르는 유체의 역 흐름(reverse flow)이 발생하는 유속을 측정하여 점도를 측정하는 방법이 제안되었다.

[0009] 하지만, 상기한 종래의 방법들은 혈액투석기(hemodialysis) 및 체외순환장치 (cardiopulmonary-bypass procedure) 등의 폐쇄 유체 회로(closed fluidic circuit)에서 혈액을 채혈한 이후에 상용 점도계를 이용하여 혈액의 점도를 측정한다. 이때, 혈액의 유동학적인 정보(flow rate or shear rate)가 소실되는 문제가 있다. 또한 채널 크기에 따른 점도 영향성(즉 Fahraeus-Lindqvist 효과) 때문에 혈액점도의 차이가 발생한다. 이러한 이유로 인하여 Fahraeus-Lindqvist 효과의 영향을 최소화 할 수 있는 채널 크기 조건에서 다양한 전단 속도(shear rate)에 따라 점도측정을 진행하고 있다.

[0010] 또한 혈액 채혈 후 보관시간에 따른 혈액의 특성변화 및 인공물(artifact)로 인하여 정확한 점도측정이 힘들고, 유량 및 압력 등의 동적변화에 대한 정보가 없기 때문에 박동(pulsatility)과 점탄성에 대한 정보를 제공해 주지 못하고 있으며, 순환기 질환과 상관성이 높은 혈액 생물성치 중 변형성 및 점탄성에 대한 동시측정을 못하고 있다.

[0011] 더욱이 폐쇄 유체 회로에서 주기적인 혈액 채취 및 실험측정으로 인하여, 유체 회로 내에 잔존하는 혈액이 점점 감소하여 생리학적적인 문제로 인해 장시간 연속적인 모니터링이 힘들다는 문제가 있다.

[0012] 3. 본 발명의 필요성 및 중요성

[0013] 심혈관계 질환의 위험인자로 알려진 고혈압, 당뇨, 흡연 등의 증상에서 혈액 생물성치가 상대적으로 높기 때문에, 혈액 생물성치 측정은 선행 증상 없이 발병하는 심혈관계 질환 환자의 조기진단을 위하여 필요하다.

[0014] 심혈관계 질환자의 질병진행 상태에 대한 모니터링 및 조기진단을 위하여 임상적용이 가능한 혈액 생물성치 바이오센서의 개발이 필요하다. 즉, 기존 상용 점도계로써는 혈액 생물성치에 대한 임상적용에 제약이 있기 때문에, 다양한 장점을 갖춘 미세유체소자 기반의 혈액 생물성치 측정 바이오센서에 대한 개발이 필요하다.

[0015] 미세유체소자 기반의 혈액 생물성치 측정에 대하여 제안된 방법들은 1) Fahraeus 효과에 의한 점도차이, 2) 압력, 유량, 박동 정보 소실, 3) 장시간 모니터 어려움 등의 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 개선하여 정확하고, 신뢰성 있고, 쉽고 & 간편한 조작 등의 특성을 갖춘 미세유체소자 기반의 생물성치 측정 바이오센서 개발이 필요하다.

[0016] 궁극적으로, 심혈관계 질환자의 건강상태의 모니터링 및 사전진단용으로 현장(병원)에서 소량의 혈액 샘플을 이용하여 정확성 및 신뢰성 있는 혈액 생물성치를 제공하며, 임상적용이 가능한 미세유체소자 기반의 혈액 생물성치 측정 바이오센서의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0017] (특허문헌 0001) 한국 등록특허공보 제10-0830653호

(특허문헌 0002) 한국 등록특허공보 제10-1123959호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명은 상기한 바와 같은 제반 문제점을 개선하기 위해 안출된 것으로서, 그 목적은 생체에서 혈액을 채혈하여 혈액의 생물성치를 측정하는 방법에 있어, 종래 방법에서 야기되는 다양한 문제점을 해결하기 위하여, 생체 밖(ex-vivo) 조건하에서 혈액의 혈유동학적 및 유변학적 물성치를 측정할 수 있는 미세유체 바이오센서

(rheofluidic biosensor)를 기반으로 하는 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구를 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

- [0019] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명의 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구는, 혈액의 변형성, 점탄성, 유속 또는 유량 측정이 가능하도록 미세유체소자에 상기 혈액이 통과하는 미세유체채널이 형성되는 미세유체기구에 있어서, 상기 미세유체소자에 상하로 각각 배치되는 상부 및 하부 브리지 채널; 상단부에 혈액을 주입하는 혈액주입구와 기준유체를 주입하는 유체주입구가 각각 형성되어 상기 상부 브리지 채널의 양단부에 각각 연결된 상부 사이드 채널; 상기 상부 및 하부 브리지 채널 사이의 양단부에 각각 연결되고 한쪽의 채널은 하부 브리지 채널의 한쪽 끝단에서 연장되어 하단부에 배출구가 형성된 하부 사이드 채널; 및 상기 하부 사이드 채널의 다른 쪽 채널 상에 연결된 가변형성 평가 챔버(DAC)로 구성되는 미세유체 바이오센서를 포함하는 것을 특징으로 하고 있다.
- [0020] 또 상기 미세유체 바이오센서가 설치되는 펠티에 칩 및 상기 펠티에 칩에 연결된 온도 제어부를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0021] 또 상기 온도 제어부는, 상기 펠티에 칩과 +극으로 연결된 스위칭 모드 파워 서플라이(SMPS); 상기 펠티에 칩과 -극으로 연결되고 상기 SMPS와도 -극으로 연결된 고체상태 릴레이; 상기 상부 사이드 채널에 연결된 열전대; 상기 열전대 및 고체상태 릴레이와 전기적으로 연결된 온도 제어기; 및 상기 온도 제어기와 연결된 표시부를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0022] 또 상기 하부 사이드 채널의 한쪽 채널 및 상부 사이드 채널로 혈액의 점탄성을 측정하고, 상기 하부 사이드 채널의 다른 쪽 채널의 가변형성 평가 챔버(DAC)로 적혈구의 변형성을 측정하며, 상기 상부 및 하부 브리지 채널을 포함한 상부 및 하부 사이드 채널의 다른 쪽 채널로 혈유속을 측정하도록 하는 것이 바람직하다.
- [0023] 또 상기 혈액의 점탄성 측정은 Kelvin-Voigt 모델을 이용하여 실시되는 것이 바람직하다.
- [0024] 또 상기 혈유속은 마이크로-PIV를 이용하여 측정하도록 하는 것이 바람직하다.
- [0025] 또 상기 상부 사이드 채널의 혈액주입구에 혈액을 주입하고 유체주입구에 기준유체를 주입하는 시린지 펌프를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0026] 또 상기 하부 사이드 채널의 다른 쪽 채널 및 하부 브리지 채널은 하부 사이드 채널의 한쪽 채널에 연결되지 않고 분리되어 별도의 혈액배출구를 형성하는 것이 바람직하다.
- [0027] 또 혈액의 변형성, 점탄성, 유속 또는 유량 측정이 가능하도록 미세유체소자에 상기 혈액이 통과하는 미세유체채널이 형성되는 미세유체기구에 있어서, Y형상의 미세유체채널로 미세유체소자를 구성하되, 상기 Y형상 미세유체채널의 머리 부분의 한쪽은 혈액을 주입하는 혈액주입구로 구성되고 다른 쪽은 기준유체를 주입하는 유체주입구로 구성되며, Y형상의 다리 부분은 혈액과 기준유체가 만나 채워지는 하부 사이드 채널로 구성됨을 다른 특징으로 하고 있다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명의 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에 의하면, 별도의 혈액 채혈 없이 생체 밖(ex-vivo) 조건 하에서 혈액의 생물성치의 연속적인 장시간 모니터링 관점에서, 미세유체 바이오센서를 폐쇄 유체 회로(즉 질병에 걸린 쥐 모델)에 통합함으로써, 측정을 위하여 유체 회로로부터 채혈이 없이 장기간 및 연속적 모니터링 가능하며, 보관시간 경과 및 인공물로 인한 혈액 생물성치의 특성변화에 대한 고려가 필요 없는 효과가 있다. 또한 채널 변경이 없기 때문에 "Fahraeus-Lindqvist 효과"로 인한 점도 차이 문제가 해결되는 효과가 있다.
- [0029] 또 다양한 혈액 생물성치 변화에 대한 동적인 실시간 모니터링 관점에서, 폐쇄 유체 회로 내에 순환하는 혈류의 실시간 모니터링 및 Kelvin-Voigt 모델을 기반으로 혈액 점탄성 측정이 가능하며, 더불어 유체 회로 모델링을 이용하여 압력변화에 대하여 정량화가 가능한 효과가 있다. 또한 이를 바탕으로 혈액의 유량, 압력, 점탄성 등에 대한 박동 평가가 가능하며, 혈액 점탄성에 대한 상대비교를 하기 위한 혈액 변형성 측정이 동시에 가능한 효과가 있다.
- [0030] 또 일정 온도제어, 캘리브레이션이 필요 없고(calibration-free) 비표지 측정(label-free measurement) 및 일회용 기구의 관점에서, 온도조절장치를 이용하여 미세유체 칩 내의 유체온도를 일정하게 제어할 수 있으며, 기준유체를 기준으로 혈액의 점탄성을 동시에 측정하기 때문에 캘리브레이션 및 표지를 필요로 하지 않는 효과가

있다. 더불어, 일회용 칩이기 때문에 측정 후에 세척 절차가 필요하지 않는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구를 보여주는 개략적인 구성도

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에 의한 혈액의 변형성 및 점탄성의 측정 모델링을 보여주는 도면

도 3은 본 발명에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에서 시린지 펌프를 이용한 미세유체기구로써, (A)는 미세유체소자 및 시린지 펌프를 포함하는 실험장치 도식도, (B)는 마이크로-PIV를 이용한 DAC 입구($\langle U \rangle_{\text{dac}}$)와 브리지 채널($\langle U \rangle_b$)의 평균 속도 측정 및 상부 및 하부 사이드 채널에서 혈액이 채워진 폭(α_{Blood})을 이용한 혈액 점도측정을 보여주는 그림, (C)는 시간에 따른 $\langle U \rangle_{\text{dac}}$, $\langle U \rangle_b$ 및 μ_{Blood} 의 변화 그래프

도 4는 본 발명에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에서 연동 유동 조건 하에서의 혈액의 점탄성 측정으로, (A)는 Kelvin-Voigt 모델을 이용한 혈액의 점탄성 모델링 그림, (B)는 혈액의 점탄성 정량화를 위하여 DAC($\langle U \rangle_{\text{DAC}}$) 및 브리지 채널($\langle U \rangle_{\text{BRG}}$)에 흐르는 혈액의 평균 속도 및 오른쪽의 하부 사이드 채널에서 혈액이 채워진 폭(α_{Blood})을 나타내는 그래프

도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구를 보여주는 개략적인 구성도

도 6은 연동 펌프를 이용하여 혈액을 주입하는 본 발명의 다른 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구의 개략적인 구성도

도 7은 질병에 걸린 쥐 모델을 통해 혈액을 주입하는 본 발명의 다른 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구의 개략적인 구성도

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에 의한 과도유량 조건 하에서의 시간상수(time constant) 측정 및 점도 측정 모델링을 보여주는 도면

도 9는 혈액의 점탄성 측정을 위한 본 발명의 다른 실시예에 따른 미세유체기구를 보여주는 개략적인 구성도

도 10은 3개의 혈액샘플에 대한 혈액 점탄성의 정량적인 평가 그래프로써, 적혈구 용적률(hematocrit) 수준과 관련하여 평균 혈류속($\langle U \rangle$)과 혈액의 채워진 폭(α_{Blood})을 보여주는 그래프

도 11은 3개의 혈액샘플에 대한 혈액 점탄성의 정량적인 평가 그래프로써, 증가하는 적혈구 용적률(hematocrit)과 관련하여 점성과 시간상수의 변화를 보여주는 그래프

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에서 혈액배출구가 2개인 경우를 보여주는 개략적인 구성도

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032]

이하, 본 발명에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구의 바람직한 실시예를 첨부한 도면을 참조로 하여 상세히 설명한다. 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위하여 제공되는 것이다.

[0033]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구를 보여주는 개략적인 구성도이다.

[0034]

도 1에 본 발명의 일 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구는 휘트스톤 브리지 회로(Wheatstone-bridge circuit)를 기반으로 하여 혈액 및 기준유체를 주입하여 통과시키는 2개의 상부 브리지 채널(1)과 하부 브리지 채널(2), 2개의 상부 사이드 채널(3)과 하부 사이드 채널(4), 가변형성 평가 챔버(DAC : Deformability Assessment Chamber)(5)가 미세유체소자(6)에 미세유체채널로 설치된 미세유체 바이오센서(10)를 기본 구성으로 하고 있다.

[0035]

상기 상부 브리지 채널(1)과 하부 브리지 채널(2)은 미세유체소자(6)에 상하로 일정간격을 두고 설치되고, 상부 브리지 채널(1)의 상부에서 양쪽 끝단에 상부 사이드 채널(3)이 각각 연결되며, 상기 상부 사이드 채널(3)의 한 쪽 채널(3a)의 상단부는 기준유체를 시린지 펌프로 주입하는 유체주입구(7)로 형성되고, 다른 쪽 채널(3b)의 상

단부는 혈액을 시린지 펌프로 주입하는 혈액주입구(8)로 형성된다. 또한 상기 상부 브리지 채널(1)과 하부 브리지 채널(2) 사이의 양쪽 끝단에는 하부 사이드 채널(4)이 각각 연결되며, 상기 하부 브리지 채널(2)의 한쪽 끝단에 연결된 하부 사이드 채널(4)의 한쪽 채널(4a)은 연장되어 하단부에 상기 브리지 채널과 사이드 채널 등을 통과한 혈액이 배출되는 혈액배출구(9)로 형성된다. 상기 하부 사이드 채널(4)의 다른 쪽 채널(4b) 중간에는 가변형성 평가 챔버(DAC)(5)가 연결되어 형성된다.

[0036] 이와 같은 기본 구성의 미세유체 바이오센서(10)로 구성된 본 발명의 미세유체기구에서 미세유체소자(6)에 설치된 미세유체채널에 의해 혈액의 변형성, 점탄성, 유속 또는 유량을 측정하게 된다. 즉 상기 하부 사이드 채널(4)의 한쪽 채널(4a)을 이용하여 혈액의 점탄성을 측정하고, 다른 쪽 채널(4b)의 가변형성 평가 챔버(DAC)(5)를 이용하여 혈액 성분 중 적혈구의 변형성을 측정하며, 상기 상부 및 하부 브리지 채널(1)(2)을 포함하여 상부 및 하부 사이드 채널(3)(4)을 이용하여 혈유속($\langle U \rangle$)을 측정하게 된다.

[0037] 이러한 본 발명의 미세유체기구로 혈액 투석기, 체외순환장치 및 질병에 걸린 쥐 체외순환루프 등의 폐쇄 유체 회로 내로 순환하는 혈액을 채혈하지 않고, 생체 밖(ex-vivo) 조건 하에서 혈액의 다양한 생물성치(변형성, 점탄성, 유속 또는 유량 등)들을 연속적으로 또한 장시간 동안 모니터링 할 수 있게 된다.

[0038] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에 의한 혈액의 변형성 및 점탄성의 측정 모델링을 보여주는 도면이고, 도 3은 본 발명에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에서 시린지 펌프를 이용한 미세유체기구로써, (A)는 미세유체소자 및 시린지 펌프를 포함하는 실험장치 도식도, (B)는 마이크로-PIV를 이용한 DAC 입구($\langle U \rangle_{\text{dac}}$)와 브리지 채널($\langle U \rangle_b$)의 평균 속도 측정 및 하부 사이드 채널에서 혈액이 채워진 폭(α_{Blood})을 이용한 혈액 점도측정을 보여주는 그림, (C)는 시간에 따른 $\langle U \rangle_{\text{dac}}$, $\langle U \rangle_b$ 및 μ_{Blood} 의 변화 그래프를 도시한 것이다.

[0039] 도 2 및 도 3에 도시한 바와 같이, 본 발명에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구는 정상 전단 유동(Steady shear flow) 조건 하에서 혈액의 점도 및 변형성을 동시에 측정하기 위해 혈액 및 기준유체를 inlet(A)에 해당하는 혈액주입구(8) 및 inlet(B)에 해당하는 유체주입구(7)를 통해 시린지 펌프를 이용하여 상부 사이드 채널(3)의 한쪽 채널(3a) 및 다른 쪽 채널(3b)에 일정한 유량($Q=1 \text{ mL/h}$)으로 주입한다.

[0040] 먼저 주입된 혈액의 변형성을 측정하기 위하여 가변형성 평가 챔버(DAC)(5) 입구단에서 마이크로-PIV 기술을 이용하여 속도장을 측정하고, 이로부터 평균유속($\langle U \rangle$)을 계측한다. 일정시간($t_s=200\text{s}$) 경과 후, 가변형성 평가 챔버(DAC)(5) 내로 혈액 유동이 정지된다. 이를 바탕으로, 각 시간별로 측정된 평균속도를 이용하여 일정시간 동안에 상기 가변형성 평가 챔버(DAC)(5)를 통과하여 Outlet(A)에 해당하는 혈액배출구(9)를 통해 배출되는 혈액의 부피(ΔV)를 계산한다.

[0041] 이후 시린지 펌프를 이용하여 혈액주입구(8)에 주입된 혈액은 상부 사이드 채널(3)의 다른 쪽 채널(3b) 및 상부 브리지 채널(1)을 거쳐서 하부 사이드 채널(4)의 한쪽 채널(4a)에 흐르게 된다. 이때, 유체주입구(7)를 통해 주입된 기준유체와 혈액의 점도비에 따라 상기 상부 사이드 채널(3)의 한쪽 채널(3a)을 통해 하부 사이드 채널(4)의 한쪽 채널(4a)에 채워지는 폭이 다르게 된다. 즉, 혈액과 기준유체의 두 유체가 채워진 채널 폭의 비는 상기 두 유체의 점도비와 주입유량의 함수로 표현된다. 상기 상부 및 하부 브리지 채널(1)(2) 회로 내의 속도장을 측정하고, 이를 이용하여 상기 하부 사이드 채널(4)의 한쪽 채널(4a)에 흘러 Outlet(B)에 해당하는 혈액배출구(9)를 통해 배출되는 혈액유량을 측정한다. 두 유체가 채워진 폭비와 유량비가 주어짐에 따라서 Kelvin-Voigt 모델을 이용하여 혈액의 점도가 측정된다. 도 3에서 Outlet(A) 및 Outlet(B)의 2개의 혈액배출구가 도시되어 있으나 도 1 및 도 2에서와 같이 하나의 혈액배출구(9)로 형성하여도 된다. 즉 도 1 및 도 2의 미세유체 바이오센서(10)에서는 하부 사이드 채널(4)의 다른 쪽 채널(4b)의 하단부가 하부 브리지 채널(2)을 통해 한쪽 채널(4a)에 연결되어 혈액배출구(9)가 하나로 형성되나, 도 12에 도시한 미세유체 바이오센서(10a)에서는 하부 사이드 채널(4)의 다른 쪽 채널(4b)의 하단부가 그대로 혈액배출구(9b)로 되어 한쪽 채널(4a)의 혈액배출구(9a)와 함께 2개의 혈액배출구(9a)(9b)를 형성할 수도 있다.

[0042] 이와 같은 본 발명에 따른 미세유체기구를 이용한 방법으로 다양한 혈액의 조건(적혈구 용적률, 변형성, 기본용액 등)에 대하여 정상 전단 유동 조건 하에서 혈액의 변형성 및 점도를 측정한다.

[0043] 도 4는 본 발명에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에서 연동 유동 조건하에서의 혈액의 점탄성 측정으로, (A)는 Kelvin-Voigt 모델을 이용한 혈액의 점탄성 모델링 그림, (B)는 혈액의 점탄성 정량화를 위하여 DAC($\langle U \rangle_{\text{DAC}}$) 및 브리지 채널($\langle U \rangle_{\text{BRG}}$)에 흐르는 혈액의 평균 속도 및 상부 및 하부 사이드 채널에서 혈액이 채워진

폭(α_{Blood})을 나타내는 그래프를 도시한 것이다.

- [0044] 도 4에 도시한 바와 같이, 본 발명의 미세유체기구에 의한 혈액의 점탄성, 압력, 및 유량에 대한 박동 계수(pulsatility index) 측정은 일정시간이 경과 후 미세유체채널 배열 내의 적혈구의 클로깅(clogging)에 의하여, 가변형성 평가 챔버(DAC)를 통과하는 유동이 정지된다. 이때, 주입된 혈액 및 기준유체는 오른쪽 하부 사이드 채널(4)의 한쪽 채널(4a)에서 단일의 나란한 유동조건을 형성한다. 단일의 나란한 채널, 즉 한쪽 채널(4a) 내에서 두 유체의 동일한 압력조건 및 Kelvin-Voigt 모델을 이용하여 혈액의 점탄성을 측정한다. 혈액의 유속은 마이크로-PIV를 이용하여 측정하고 이를 적분하여 유량을 계산한다.
- [0045] 다양한 외부인자(튜브 및 미세유체소자에 의한 컴플라이언스 효과)에 대한 영향성을 평가하기 위하여 다양한 주기에 대한 동적 특성 분석이 필요하다. 즉 유량조절이 가능한 시린지 펌프를 이용하여 유동속 조건 변경에 따른 정상상태 응답으로부터 시간정수(time constant)를 측정한다. 그런 이후, 혈액의 점탄성을 효과적으로 측정하기 위한 적절한 주기를 선정한다.
- [0046] 가변형성 평가 챔버(DAC)의 주입유량의 조건(일정유량, 주기변동 유량)에 따른 혈액의 변형성을 비교한다. 즉, 연동 유동 조건하에서 Kelvin-Voigt 모델을 이용하여 탄성 측정 결과와 정상 혈액 유동 조건하에서 상기 DAC를 통과한 혈액의 부피(ΔV)를 이용한 변형성에 대하여 서로 비교를 한다.
- [0047] 상기 본 발명의 미세유체기구에 적용하는 쥐 모델 대신에 연동 펌프를 이용하여 폐쇄 유체 회로에 대한 집중 매개변수 모델(lumped parameter model)을 기반으로 혈액유량과 압력관계식을 유도하여, 펌프에서의 압력변화를 예측한다.
- [0048] 상기에서 측정된 유량, 압력 및 점 $\circ$ 탄성에 대하여 박동 계수를 다양하게 측정하여, 혈액의 생물성치와 상관성에 대하여 상세하게 검토한다.
- [0049] 도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구를 보여주는 개략적인 구성도를 도시한 것이다.
- [0050] 본 발명의 다른 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에서 미세유체 바이오센서의 온도제어 및 혈액 생물성치 측정이 중요하다.
- [0051] 혈액의 생물성치는 온도의 영향을 받기 때문에 온도제어가 필수적이다. 이를 위하여 도 5에 도시한 바와 같이, 하부 사이드 채널(4)의 한쪽 채널(4a)에 T-타입의 열전대(thermocouple)(11)를 설치하고, 미세유체소자(6)를 펠티에 칩(Peltier chip)(12)의 상부에 서멀 글루(thermal glue)를 이용하여 결합하여 미세유체 바이오센서(10)를 구성한다. 그런 후 상기 펠티에 칩(12)에 온도 제어부(13)를 +, -극으로 연결하고 상기 열전대(11)와도 전기적으로 연결한다.
- [0052] 상기 온도 제어부(13)는 스위칭 모드 파워 서플라이(SMPS)(14), 고체상태 릴레이(15), 온도 제어기(16) 및 모니터와 같은 표시부(17)로 구성되어, 상기 스위칭 모드 파워 서플라이(SMPS)(14)가 펠티에 칩(12)과 -극으로 연결되고, 상기 고체상태 릴레이(15)를 사이에 두고 펠티에 칩(12)과 스위칭 모드 파워 서플라이(SMPS)(14)가 +극으로 연결되며, 온도 제어기(16)가 열전대(11) 및 고체상태 릴레이(15)에 전기적으로 연결된다. 상기 온도 제어기(16)는 또한 모니터(17)와도 전기적으로 연결되어 있다.
- [0053] 따라서 상기 열전대(11) 및 펠티에 칩(12)과 온도 제어부(13)를 이용하여 12V를 전압을 ON/OFF하면서 미세유체소자(6) 내의 유체의 온도를 36℃의 일정한 온도로 제어하고, 이를 모니터(17)를 통해 표시하게 된다.
- [0054] 또 미세유체채널 내의 유체온도에 따른 정량화를 위하여 펌프의 유량변경(일정유량, 변동유량)에 따라 시간에 따른 온도 변화를 측정한다. 미세유체채널에 흐르는 유체(혈액)의 다양한 온도조건 하에서 혈액의 다양한 생물성치를 측정한다.
- [0055] 도 6은 연동 펌프를 이용하여 혈액을 주입하는 본 발명의 다른 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구의 개략적인 구성도이고, 도 7은 질병에 걸린 쥐 모델을 통해 혈액을 주입하는 본 발명의 다른 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구의 개략적인 구성도를 도시한 것이다.
- [0056] 생체 밖(Ex-vivo) 실험조건 하에서 혈액 생물성치 측정용 쥐 체회순환루프에 질병이 걸린 쥐 모델을 적용하기 전에 도 6에 도시한 바와 같이, 연동펌프(18)를 사용하여 저장용기(19)에 담긴 인간 혈액을 미세유체소자(6)의 미세유체채널을 통해 순환시키는 모의실험을 진행하여, 상기한 본 발명의 미세유체기구에 의한 혈액의 생물성치 측정방법에 대한 신뢰성 및 정확성에 대하여 충분하게 검증한다.

- [0057] 그런 이후에, 도 7에 도시한 바와 같이, 미세유체 바이오센서의 혈액주입구 및 배출구를 질병에 걸린 쥐 모델의 대퇴 동맥 및 경정맥에 각각 연결하여 폐쇄 유체 회로를 구성한다. 또한 캘리브레이션이 필요 없는 (Calibration-free) 조건을 위해 점탄성이 알려진 기준유체(PBS)를 유체주입구에 일정한 유량으로 주입한다.
- [0058] 상기 폐쇄 유체 회로에 대한 집중 매개변수 모델을 기반으로 혈액유량과 압력 관계식으로부터 질병에 걸린 쥐 모델의 대퇴 동맥의 압력변화를 예측한다. 측정된 유량, 압력 및 점도 탄성에 대하여 박동 계수를 계산한다.
- [0059] 마지막으로 생체 밖(ex-vivo) 조건 하에서 다양한 순환기 질환을 갖는 질병에 걸린 쥐(고혈압, 당뇨) 모델 별로 실험하고 측정하여, 혈액 생물성치 측정에 대한 데이터를 확보한다.
- [0060] 한편 본 발명에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에 의한 과도유량 조건 하에서의 시간정수(time constant) 측정 및 점도 측정에 대해 설명하면 다음과 같다.
- [0061] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에 의한 과도유량 조건 하에서의 시간정수(time constant) 측정 및 점도 측정 모델링을 보여주는 도면이다.
- [0062] 도 8에 도시한 바와 같이, 도 2의 (c) 조건에서 $Q_{ref}=Q_1$ 로 혈액을 일정하게 주입하고, 혈액주입 유량을 Q_1 에서 Q_2 로 낮추면 과도응답을 하게 된다. 이때, 혈액의 과도응답을 마이크로-PIV를 이용하여 혈 유속($\langle U \rangle$) 측정하여 시간정수(time constant)를 계산할 수 있다. 측정된 상기 시간정수는 혈액 점탄성에 따라 영향을 받기 때문에, 혈액의 과도유량에 대한 혈 유속의 과도응답으로 혈액 점탄성을 평가 하고자 한 것이다.
- [0063] 또한 도 8의 오른쪽 하단부에서는 Q_1 및 Q_2 유량조건에서는 안정된 혈액 유동(steady blood flow) 조건이기 때문에 혈액의 점도만 측정이 가능하다. 즉, $Q_k=Q_1$ 및 $Q_k=Q_2$ 일 때의 혈액이 채워진 폭(α_{Blood})이 각각 바뀌기 때문에, 혈액 점도가 α_1 및 α_2 를 갖게 된다. 본 발명에서는 혈액의 점도를 $\alpha_x=(\alpha_1 + \alpha_2)/2$ 로 계산하게 된다.
- [0064] 도 9는 혈액의 점탄성 측정을 위한 본 발명의 다른 실시예에 따른 미세유체기구를 보여주는 개략적인 구성도이다.
- [0065] 도 9에 도시한 바와 같이, 혈액의 점탄성 측정을 위한 본 발명의 다른 실시예에 따른 미세유체기구는 Y형상의 미세유체채널로 구성된 미세유체소자(60)로 상기 미세유체기구(10b)를 구성한 것으로, Y형상의 머리 부분 한쪽이 기준유체를 주입하는 유체주입구(7a)가 되고, 상기 머리 부분 다른 쪽이 혈액을 주입하는 혈액주입구(8a)가 되며, 하나로 이어지는 Y형상의 다리부분이 혈액과 기준유체가 만나는 하부 사이드 채널(40)이 된다.
- [0066] 이와 같이 간단한 Y형상의 미세유체소자(60)로 과도유체유동 응답을 이용하여 혈액의 점탄성을 측정하고자 한다. 우선, 혈액의 점도를 측정하기 위하여 시린지 펌프를 이용하여 혈액 및 기준유체를 각각 0.6 ml/h의 유량으로 혈액주입구(8a) 및 유체주입구(7a)에 각각 주입한다. 이후 Y형상의 다리 부분의 하부 사이드 채널(40)에서 혈액이 채워진 폭(α_{Blood})를 측정함으로써 혈액의 점도를 측정 할 수 있다. 그런 후, 혈액의 주입 유량을 0.3 ml/h로 순간적으로 감소시킨다. 시간 분해 마이크로-PIV(Time-resolved micro-PIV)를 이용하여 혈유속의 과도응답을 정량화하기 위하여 시간정수(time constant)를 계산한다. 이러한 시간정수를 측정함으로써 혈액의 점탄성의 변화를 모니터링 할 수가 있다.
- [0067] 상기한 본 발명의 다른 실시예에 따른 미세유체소자의 혈액의 점탄성 측정방법의 성능을 평가하기 위하여, 혈액 샘플은 정상 적혈구(normal red blood cell)를 식염수(1x PBS)에 주입하여 준비하였다. 3가지 점탄성의 값을 만들기 위하여, 적혈구 용적률(hematocrit)을 30%, 40%, 50%로 준비하였다. 점도를 측정하기 위하여 기준유체는 식염수를 사용하였다.
- [0068] 도 10은 3개의 혈액샘플에 대한 혈액 점탄성의 정량적인 평가 그래프로써, 적혈구 용적률(hematocrit) 수준과 관련하여 평균 혈유속($\langle U \rangle$)과 혈액이 채워진 폭(α_{Blood})을 보여주는 그래프를 도시한 것이다.
- [0069] 상기한 본 발명의 다른 실시예에 따른 미세유체소자의 혈액의 점탄성 측정 실험 결과 및 분석에 의하면, 도 10은 적혈구 용적률 수준(hematocrit level)에 따른 혈액이 채워진 폭(α_{Blood}) 및 평균속도 $\langle U \rangle$ 의 변화를 나타낸 것으로서, 적혈구 용적률이 증가할수록 혈액이 채워진 폭(α_{Blood})은 증가하는 경향을 보여주고 있고, 과도유체유동 응답성은 점점 늦어지고 있다. 과도응답 전에는 평균속도가 적혈구 용적률에 반비례하는 경향을 보여주지만, 과도응답 이후에는 적혈구 용적률에 따른 영향도가 상대적으로 낮다. 이를 정량화하기 위하여 과도응답을 이용하여 시간정수를 계산하였고, 과도응답 전 및 후 혈액의 점도를 각각 계산하였다.

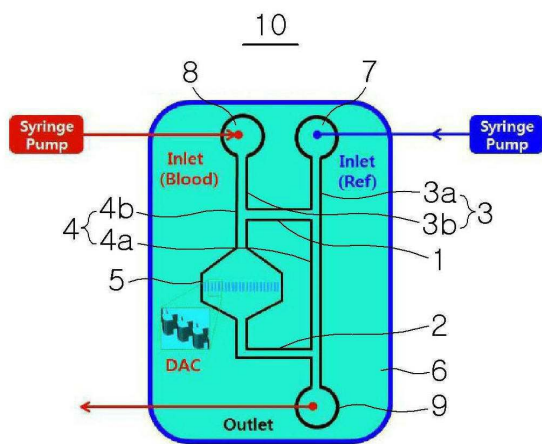
- [0070] 도 11은 3개의 혈액샘플에 대한 혈액 점탄성의 정량적인 평가 그래프로써, 증가하는 적혈구 용적률(hematocrit)과 관련하여 점성과 시간정수의 변화를 보여주는 그래프를 도시한 것이다.
- [0071] 도 11에 도시한 바와 같이, 적혈구 용적률이 증가할수록, 혈액의 점도는 점점 증가하며, 또한 시간정수도 점점 증가하는 경향을 보여주고 있다. 회귀분석결과에 의하여 점도 및 시간정수가 적혈구 용적률에 비례적인 관계를 보여주고 있다. 이 결과로부터, 점도와 시간정수 또한 비례적인 관계이다. 이상의 결과는 기존연구 결과로 비교할 때, 유사한 경향을 보여줌에 따라, 본 발명에 따른 미세유체기구를 이용한 측정방법을 이용하여 혈액의 점탄성의 변화를 충분히 모니터링 할 수 있음을 실험적으로 확인하였다.
- [0072] 결론적으로 본 발명의 다른 실시예에 따른 미세유체기구에서는 Y형상의 미세유체소자로 과도유체유동 응답을 이용하여 혈액의 점탄성을 효과적으로 측정하는 방법이 제안되었다. 3가지 적혈구 용적률을 갖는 혈액 샘플을 이용하여 실험한 결과에 의하면, 본 발명의 실시예의 미세유체기구에 따른 측정방법을 이용하여 측정한 혈액의 점도 및 시간정수가 적혈구 용적률과 충분한 상관성을 보여주고 있음을 실험적으로 확인하였다. 이 실험결과로부터, 본 발명의 다른 실시예에 따른 미세유체기구를 이용한 측정방법을 이용하여 혈액 점탄성을 효과적으로 측정할 수 있다.
- [0073] 이상과 같이 본 발명에 따른 혈액의 생물성치 측정용 미세유체기구에 대해서 예시한 도면을 참조로 하여 설명하였으나, 본 명세서에 개시된 실시예와 도면에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 기술사상의 범위 내에서 당업자에 의해 다양한 변형이 이루어질 수 있음은 물론이다.

부호의 설명

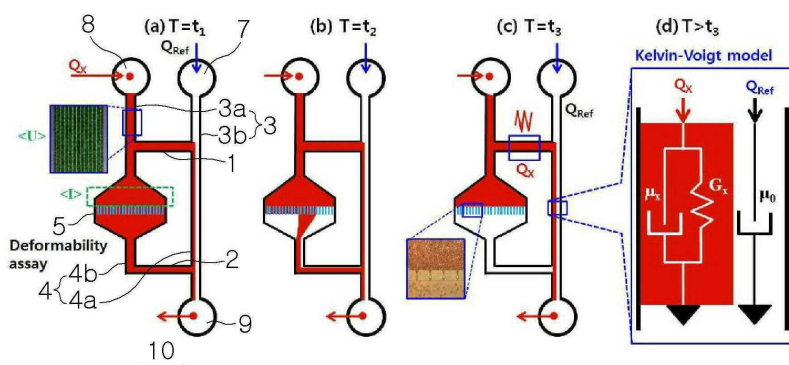
- [0074]
- | | |
|-------------------------|-----------------------------|
| 1 : 하부 브리지 채널 | 2 : 하부 브리지 채널 |
| 3 : 상부 사이드 채널 | 3a : 상부 사이드 채널의 한쪽 채널 |
| 3b : 상부 사이드 채널의 다른 쪽 채널 | |
| 4,40 : 하부 사이드 채널 | 4a : 하부 사이드 채널의 한쪽 채널 |
| 4b : 하부 사이드 채널의 다른 쪽 채널 | |
| 5 : 가변형성 평가 챔버(DAC) | 6,60 : 미세유체소자 |
| 7,7a : 유체주입구 | 8,8a : 혈액주입구 |
| 9,9a,9b : 혈액배출구 | 10,10a,10b,100 : 미세유체 바이오센서 |
| 11 : 열전대 | 12 : 펠티에 칩 |
| 13 : 온도 제어부 | 14 : 스위칭 모드 파워 서플라이(SMPS) |
| 15 : 고체상태 텔레이 | 16 : 온도 제어기 |
| 17 : 모니터 | 18 : 연동펌프 |
| 19 : 저장용기 | |

도면

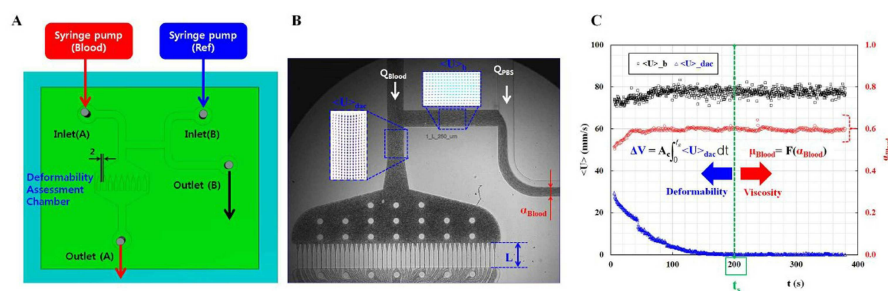
도면1



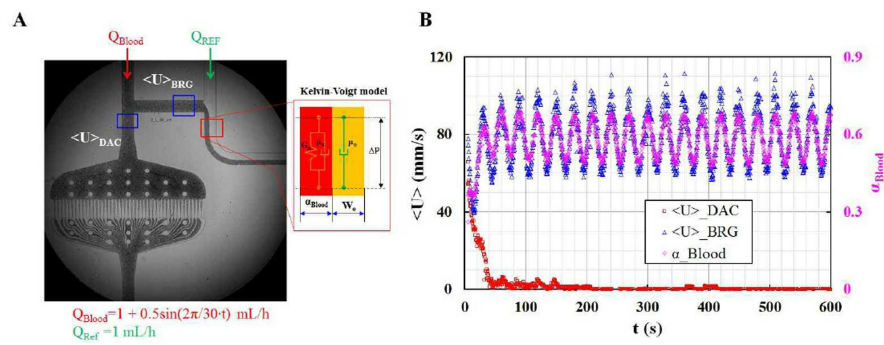
도면2



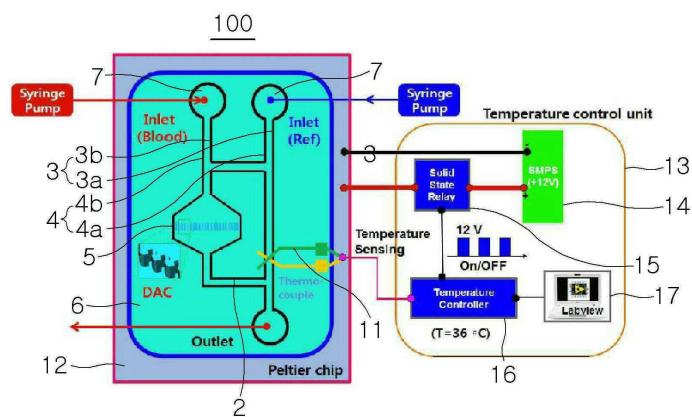
도면3



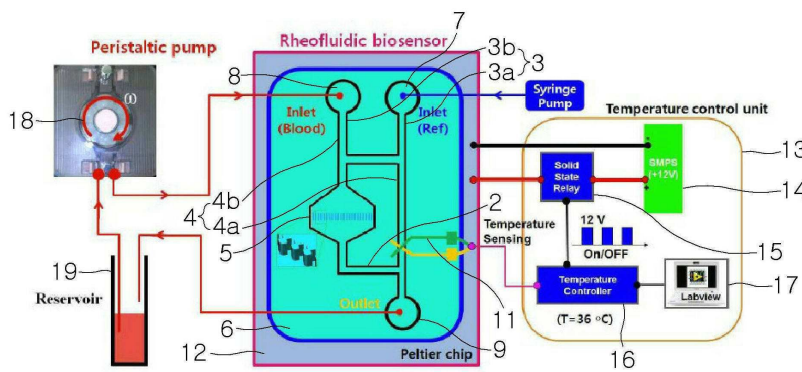
도면4



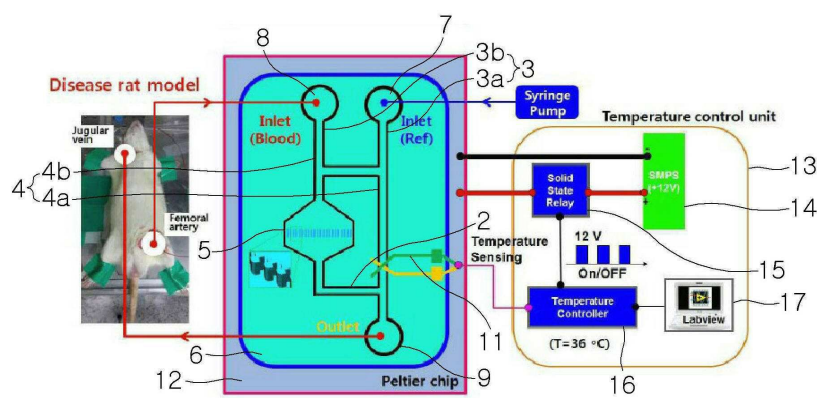
도면5



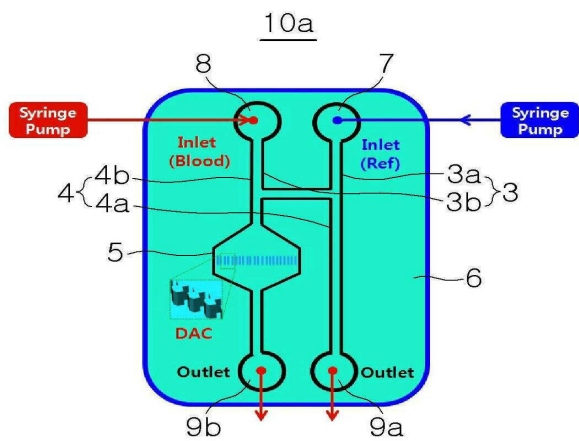
도면6



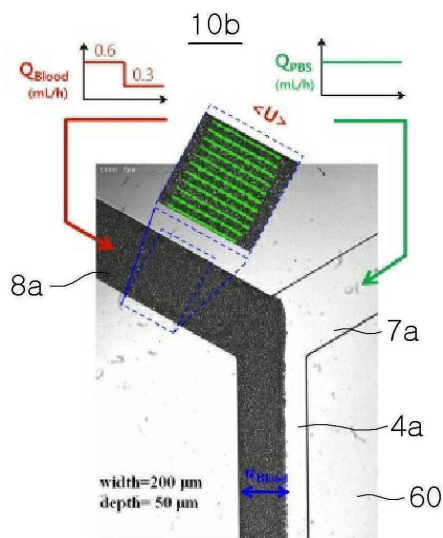
도면7



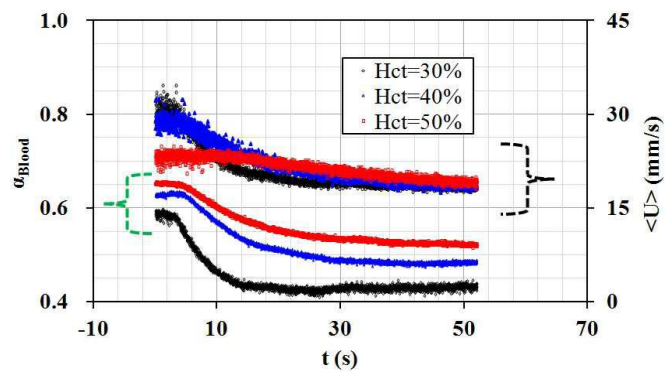
도면8



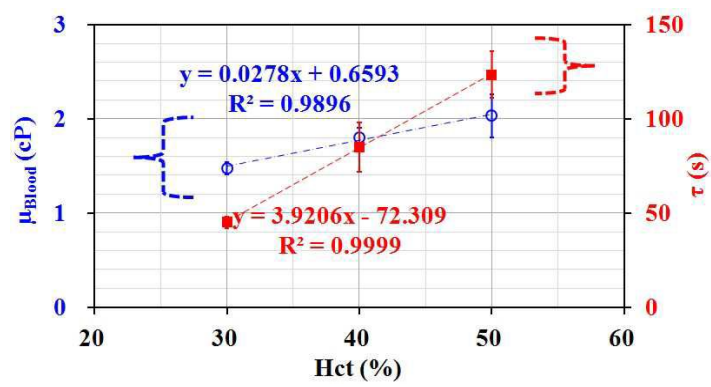
도면9



도면10



도면11



도면12

