

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호  
**WO 2010/131785 A1**

(43) 국제공개일  
2010년 11월 18일 (18.11.2010)

PCT

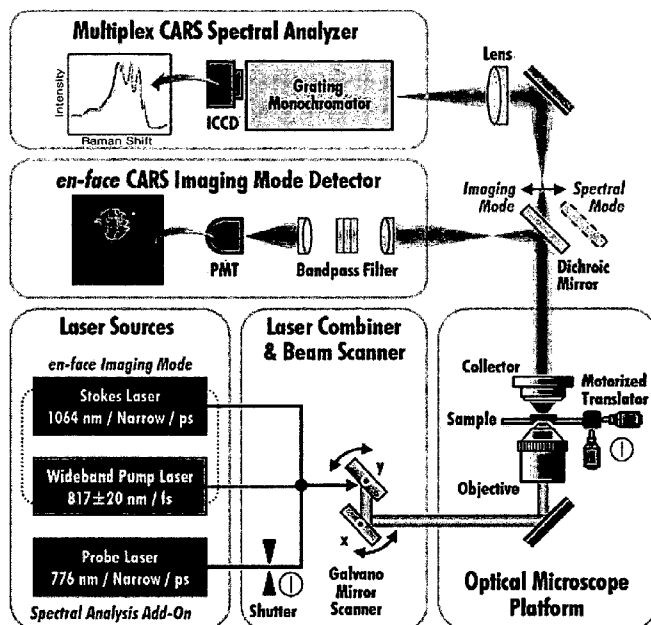
- (51) 국제특허분류: A61B 5/00 (2006.01) A61B 5/1455 (2006.01)  
G01J 3/44 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/002478
- (22) 국제출원일: 2009년 5월 11일 (11.05.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국표준과학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 도룡동 1번지, 305-340 Daejeon (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김세화 (KIM, Se Hwa) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 전민동 청구나라 아파트, 305-729 Daejeon (KR). 이재용 (LEE, Jae Yong) [KR/KR]; 충청북도 청주시 상당구 용담동 대림 e-편한세상 아파트 101-1102, 360-789 Chungcheongbuk-do (KR). 이운성 (LEE, Eun Seong) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 가정동 236-2 KIT 아파트 13-301, 305-350 Daejeon (KR). 문대원 (MOON, Dae Won) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 전민동 464-1 엑스포아파트 307-1, 305-761 Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 서울특별시 강남구 역삼동 648-1 BYC 빌딩 501호, 135-080 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 규칙 4.17에 의한 선언서:

[다음 쪽 계속]

(54) Title: SYSTEM FOR DIAGNOSING PATHOLOGICAL CHANGE OF LIPIDS IN BLOOD VESSELS USING A NON-LINEAR OPTICAL MICROSCOPE

(54) 발명의 명칭: 비선형 광학현미경을 이용한 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단시스템

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a system for diagnosing pathological change of lipids in blood vessels using a non-linear optical microscope. More particularly, the present invention relates to a system for diagnosing pathological changes of lipids in blood vessels using a non-linear optical microscope which can determine the progression stage of lipid-related diseases by diagnosing minute pathological changes in blood vessels through imaging microlipids which are abnormally deposited at blood vessel inner walls and analyzing imaged lipid components without any labeling or destroying of blood vessels using the non-linear optical microscope.

(57) 요약서: 본 발명은 비선형광학현미경을 이용한 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템에 관한 것으로, 보다 상세하게는 비선형광학현미경을 이용하여 혈관을 어떠한 표지나 파괴없이 혈관 내벽에 비정상적으로 침착된 미세지질을 이미지화함과 동시에 이미징된 지질의 성분을 분석하여 혈관의 미세한 병리적 변화를 진단함으로써 지질 관련 질병의 진행 단계를 판단할 수 있는 비선형광학현미경을 이용한 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템에 관한 것이다.



— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의  
예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

# 명세서

## 비선형 광학현미경을 이용한 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단시스템

### 기술분야

- [1] 본 발명은 비선형광학현미경을 이용한 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템에 관한 것으로, 보다 상세하게는 비선형광학현미경을 이용하여 혈관을 어떠한 표지나 파괴없이 혈관 내벽에 비정상적으로 침착된 미세지질을 이미지화함과 동시에 이미징된 지질의 성분을 분석하여 혈관의 미세한 병리학적 변화를 진단함으로써 지질 관련 질병의 진행 단계를 판단할 수 있는 비선형광학현미경을 이용한 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템에 관한 것이다.

[2]

### 배경기술

- [3] 지질은 동맥경화의 진행 단계와 연관되어 있다. 동맥경화의 초기 단계에서 지질 체류는 주요한 개시 사건인 것으로 생각되고 있다. 소위 "내막 체류에 이은 현상(response-retention)" 가설에 대한 구체적인 사항은 밝혀져 있지 않으나, 동맥경화성 지단백이 내막에 축적되고, 죽종형성(atherogenesis)이 유도된다고 강조하고 있다. 이 모델에 따르면, 침투된 지단백은 세포외 기질(extracellular matrix, ECM), 특히 프로테오글리칸(proteoglycan)과 결합하고, 이들 지단백-프로테오글리칸 복합체는 분비된 사이토카인과 지질을 포함하는 거품세포(foam cell)의 분화에 의한 대식세포의 모집과 같은 동맥경화 현상을 유도한다. 반면, 지질 함량은 진행 단계에서 동맥경화 병반 취약성을 결정하는 결정적인 역할을 한다. 상처받기 쉬운 병반은 콜라겐이 많이 있는 중심부 대신에 지질이 많이 있는 중심부의 소프트 그루엘(soft gruel) 단계를 포함한다. 사실상, 병소의 지질 성분은 병반 파열과 혈전증에 직접적으로 연관되어 있다는 몇몇 연구들이 보고되어 있다. 진행된 죽상 중심부(atheromatous core)에는 콜레스테롤(유리형 및 에스테르화된 형태), 인지질, 트리아실글리세롤, 및 지방산을 포함되어 있다. 주요 구성성분인 콜레스테롤은 판형, 바늘형 및 때때로 헬릭스형 등의 다양한 외형을 가진 결정 형태로 존재할 수 있다. 세포막 콜레스테롤과는 달리, 진행된 병반에서 관찰되는 콜레스테롤 결정 구조는 세포외 지질로 활성이 없다. 최근에, Virmani 등은 파열된 병반은 절단된 관상동맥에서 침식 또는 안정된 병반보다는 괴저 중심부에서 콜레스테롤 클레프트 또는 결정을 포함하여 잠재적으로, 병반 취약성을 나타내는 것이라고 보고한 바 있다.
- [4] 일반적으로, 동맥경화 병소는 적절한 이미징 양식이 없기 때문에 개개의 동맥경화 병소의 형태적 및 화학적 조성물보다는 좁아진 동맥 내강을 평가하여

측정하였다. 종래에는 혈관조영제 등을 투여하여 관내 충진 결함(luminal filling defect)을 판독하여, 전신성 이미징(systemic imaging)으로 동맥경화를 진단하였으나, 최근에는 각 병변 개체의 이질성(heterogeneity)이 인정되어 혈관 벽 자체의 이미징이 매우 필요한 실정이다. 그러나, 혈관 벽의 미세 병리학적 판독을 위해서는 조직의 손상을 가져오는 염색을 해야 한다. 또한, 횡단면적(cross-sectional) 이미지만을 얻을 수 있으므로, 조직에 존재하는 상태로 판독을 하는 것은 매우 어려운 일이다. 또한, 어떠한 염색의 경우에도 각 지질의 성분을 이미지 상에서 분석해 내는 일은 불가능한 일이었다.

- [5] 동맥경화를 진단함에 있어서 중요한 척도는 다음과 같다. 본격적인 지질의 침착은 대식세포(macrophage)라 하는 특정 면역세포에 의해 진행되는데, 활성화된 대식세포는 과량의 지질을 함유하게 되고 거품세포(foam cell)로 분화하게 된다. 이러한 거품세포의 등장은 동맥경화의 중요 척도로 인식되고 있으나, 현재의 이미징 기술로는 조직 내에 있는 거품세포를 이미징하는 것이 불가능한 일이었다. 또한, 매우 심화된 단계의 동맥경화에서는 콜레스테롤이 결정 상태(cholesterol crystals)로 존재하는데 심화된 정도에 따라 콜레스테롤 결정의 양이 다르게 나타난다. 콜레스테롤 결정 역시, 조직의 파괴 없이 이미징하는 것은 현재의 이미징 기술로는 불가능하다.
- [6] 한편, 비선형광학현미경(Coherent anti-Stokes Raman scattering(CARS) microscopy)은 최근에 표적 분자의 표지 및 표본 고정 없이 생체 내 분자 진동을 추적하여 생체 내 조직의 3차원 화학적 이미징을 위한 가장 실용적인 수단으로 대두되었다. CARS 현미경은 형광 표지 기술의 바람직하지 않은 바이어스가 입증되어 살아있는 생물체에서 지질 대사에 대한 실험 크기의 생물학적 연구에 이용되어 왔다. 최근에, 생체 내 피부 조직을 이미징하기 위한 비디오 레이트 CARS 현미경이 개발되었다. CARS 프로세스의 비선형 특징 때문에, 표본에 대한 촘촘한 초점의 빠른 스캐닝은 종래의 라만 현미경과 달리 3차원 초미세 분할로 된 진동 차이에 따른 이미지의 실시간 수집이 가능하다. 주변 조직과 비교하여 2700 내지 3000  $\text{cm}^{-1}$ 의 CARS 스펙트럼에서 강하고 특징적인 진동 사인을 나타내면서 탄화수소 결합이 풍부하기 때문에, CARS 현미경은 특히 지질의 선택적 이미징에 적합하다. 그러나, 지질 조성물을 넘어서 단순한 진동 조직학의 세밀한 화학적 분석은 여전히 CARS 측정으로는 한계가 있다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 혈관벽 내부를 어떠한 표지나 파괴없이 en-face 마이크로 이미징을 하고, 각 구조체의 화학적 성분을 직접 분석하여, 미세한 병리학적 변화를 진단하는 시스템을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 시스템을 이용하여 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 방법을 제공하는 것이다.

## 기술적 해결방법

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [10] 서로 다른 파장의 스톱스광, 펌프광 및 탐침광을 선택적으로 조사하여 콤바인드 레이저 빔을 발생시키는 근적외선 펄스 레이저 유니트;
- [11] 상기 근적외선 펄스 레이저 유니트로부터 전달된 콤바인드 레이저 빔이 조사되는 시료가 장착된 플랫폼;
- [12] 상기 시료에서 발생된 CARS 신호를 수집하여 스펙트럼을 검출하는 광대역 멀티플렉스 CARS 현미 분광 유니트;
- [13] 상기 시료에서 발생된 CARS 신호를 수집하여 입체 영상을 제공하는 En face CARS 이미지 모드 검출 유니트; 및
- [14] 상기 광대역 멀티플렉스 CARS 현미 분광 유니트와 En face CARS 이미지 모드 검출 유니트 사이에 배치되어, 상기 시료에서 발생된 CARS 신호를 선택적으로 각 유니트로 전달하는 이색 미러를 포함하는 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템을 제공한다.
- [15]
- [16] 본 발명은 또한
- [17] 스톱스광과 펌프광을 시료에 조사하여 산란되는 CARS(coherent anti-Stokes Raman scattering) 지질 신호의 파장 및 세기를 측정하는 단계;
- [18] 상기 신호를 3 차원 이미지로 검출하는 단계; 및
- [19] 상기 이미지에서 지질의 구조를 분석하는 단계를 포함하는 혈관 내 지질의 비파괴적 병리적 변화 진단 방법을 제공한다.
- [20]
- [21] 본 발명은 또한
- [22] 탐침광을 시료에 조사하여 산란되는 CARS(coherent anti-Stokes Raman scattering) 지질 신호의 파장 및 세기를 측정하는 단계;
- [23] 상기 신호를 스펙트럼으로 검출하는 단계; 및
- [24] 상기 스펙트럼에서 지질 구조의 스펙트럼 피크를 분석하는 단계를 포함하는 혈관 내 지질의 비파괴적 병리적 변화 진단 방법을 제공한다.

## 유리한 효과

- [25] 본 발명은 염색 또는 절단에 따른 조직 손상 없이, 또한 표지 없이 3 차원적으로 혈관 내 지질을 선택적으로 이미징 함으로써 동맥경화의 진행 단계를 진단할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 본 발명의 지질 선택적 3 차원 이미징 및 점 스펙트럼 분석이 가능한 CARS 현미경 측정 플랫폼을 도시한 것이다.
- [27] 도 2는 광대역 펌프 레이저 여기를 포함한 삼원색 멀티플렉스 CARS의 에너지 도표를 나타낸 것으로, a)는 탐침 레이저 빔 없이, 빠른 지질-윈도우 이미징을

위한 다수의 지질 관련 Raman 공명에 의해 발생한 2원색 여기 반-스톡스 신호의 광대역 통합 검출을 나타낸 것이고, b)는 각각의 분리된 탐침 레이저를 추가하여 실시한 멀티플렉스 CARS 스펙트럼 분석을 나타낸 것이다.

[28] 도 3은 동맥경화 병반에 대한 표지 없는 지질 선택적 CARS 이미징 결과를 나타낸 것으로, a)는 CARS에 의한 동맥경화 병반의 serial en face 이미지의 3 차원 복원 결과를 나타낸 것이고, b)는 a) 이미지를 46배로 나타낸 것이다.

[29] 도 4는 단일 동맥경화 병반에 대한 표지 없는 지질 선택적 CARS 이미징 결과를 나타낸 것으로, a)는 CARS 이미지의 3 차원 표현을 도시한 것이고, b)는 표면층에서 거품세포, 및 심층 내막(deep intima)에서 판-형태의 지질 결정과 세포외 지질 침착물을 포함하여 구체적인 지질 구조를 관찰하기 위해 동맥경화 병반의 3 차원 이미징을 2 차원 형태로 나타낸 것이며, 삽입된 인덱스는 CH 결합 진동과 관련된 CARS 강도를 나타낸 것이고, 흰색 테두리는 3 차원 CARS 이미지에서 동맥경화 병반의 반 구상 형태를 나타낸 것이다.

[30] 도 5는 인간의 동맥경화의 경동맥의 CARS 이미지를 나타낸 것으로, a)는 핵에 해당하는 짙은 내부 공간을 갖는 표면 영역에서 지질이 풍부한 거품세포이고, b)는 괴저 중심부에서 판-형태 및 바늘 형태의 지질 결정을 나타낸 것이다

[31] 도 6은 CARS에 의해 특성 규명된 아포리포단백질 E발현억제(ApoE<sup>-/-</sup>) 마우스에서 동맥경화의 진행단계를 나타낸 것이다.

[32] 도 7은 CARS에 의한 동맥경화의 진행단계에 따른 부피 분석을 나타낸 것으로, 지질 축적 및 각 지질 구조의 크기에 대하여 초기(a), 중기(b) 및 심화(c) 단계별로 나타낸 것이다.

[33] 도 8은 CARS에 의한 동맥경화 지질의 on-site 스펙트럼 분석을 나타낸 것으로, a-f)는 동맥경화 지질을 형태적 차이에 따라 분류한 것으로, 세포내(a), 세포외(b), 판-형태(c), 바늘 형태(d), 연결조직으로부터 비동맥(e), 및 매트릭스로부터 비지질(f)을 나타낸 것이며, 삽입된 이미지는 스펙트럼 분석을 위해 사용된 일반적인 형태를 나타낸 것이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[34] 이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[35] 본 발명은

[36] 서로 다른 파장의 스톡스광, 펌프광 및 탐침광을 선택적으로 조사하여 컴바인드 레이저 빔을 발생시키는 근적외선 펄스 레이저 유니트;

[37] 상기 근적외선 펄스 레이저 유니트로부터 전달된 컴바인드 레이저 빔이 조사되는 시료가 장착된 플랫폼;

[38] 상기 시료에서 발생된 CARS 신호를 수집하여 스펙트럼을 검출하는 광대역 멀티플렉스 CARS 현미 분광 유니트;

[39] 상기 시료에서 발생된 CARS 신호를 수집하여 입체 영상을 제공하는 En face CARS 이미지 모드 검출 유니트; 및

- [40] 상기 광대역 멀티플렉스 CARS 현미 분광 유니트와 En face CARS 이미지 모드 검출 유니트 사이에 배치되어, 상기 시료에서 발생된 CARS 신호를 선택적으로 각 유니트로 전달하는 이색 미러를 포함하는 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템에 관한 것이다.
- [41] 본 발명의 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템은 지질의 탄화수소의 진동을 통해 이미지가 뚜렷하게 구별되는 지질 선택적 3 차원 이미징과 점 스펙트럼 분석이 가능한 것을 특징으로 한다.
- [42] 본 발명의 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템을 도 1를 참조하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [43] 상기 근적외선 펄스 레이저 유니트는 서로 다른 파장의 스톡스광, 펌프광 및 탐침광을 선택적으로 조사하여 콤바인드 레이저 빔을 발생할 수 있으며, 상기 빔은 지질의 탄화수소 부분을 진동시켜 3 차원 이미징뿐만 아니라 이에 따른 라만 쉬프트를 동시에 평가할 수 있다.
- [44] 구체적으로, 지질의 3 차원 이미징을 위해 스톡스광과 펌프광을 시료에 조사하며, 탐침광은 지질의 스펙트럼 분석을 위해 사용할 수 있어 3 차원 이미징 시 기계적 셔터를 통해 차단될 수 있다.
- [45] 지질의 3차원 이미징을 위해, 상기 근적외선 펄스 레이저 유니트의 여기빔을 통해 얻은 지질의 CARS 신호가 전체 탄화수소의 진동 부분을 포함하도록 대역폭은 2700 내지 3050  $\text{cm}^{-1}$ 인 것이 바람직하다.
- [46] 또한, 상기 CARS 신호 수집 시간은 1.0s/frame이고, 공간적 밀도는 좌우 측면이 0.4 $\mu\text{m}$ , 축방향이 1.3 $\mu\text{m}$ 인 것이 바람직하다.
- [47]
- [48] 또한, 상기 멀티플렉스 CARS 현미 분광 유니트는 시료에서 발생된 CARS 신호를 수집하여 스펙트럼을 검출할 수 있으며, 대한민국 공개특허 제2009-0024965호에 기재된 것을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [49]
- [50] 또한, 본 발명의 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템은 상기 광대역 멀티플렉스 CARS 현미 분광 유니트와 En face CARS 이미지 모드 검출 유니트 사이에 배치되어, 상기 시료에서 발생된 CARS 신호를 선택적으로 각 유니트로 전달하는 이색 미러를 포함하고 있다.
- [51] 상기 이색 미러는 1000 nm 미만의 파장을 반사시키고, 그 이상의 파장을 투과시키는 특징을 가지고 있다.
- [52] 상기 이색 미러를 이용하여, 지질의 3 차원 이미징을 위해서는 스톡스광과 펌프광을 시료에 조사하여 645 내지 675 nm 범위의 CARS 지질 신호를 대역 투과 필터를 통해 분리하고 en face CARS 이미징 모드 검출 유니트를 통해 검출하여 3 차원 이미지를 얻을 수 있다.
- [53] 또한, 지질의 스펙트럼 분석을 위해서는 광대역 멀티플렉스 CARS 현미 분광

유니트를 셋업 전환하고, 포인트-스캔 모드로 레이저-스캐너를 조정하여 시료에 탐침광을 50 내지 150 ms 동안 조사하여 멀티플렉스 CARS 신호가 발생시키고, 상기 신호는 격자형 모노크로메터를 통과하여 스펙트럼 분석이 가능하도록 할 수 있다. 이때, 상기 탐침광은  $3.5\text{cm}^{-1}$  이하의 협대역 파장을 갖는 것이 바람직하며, 이로부터 발생하는 반-스톡스 신호는 620 내지 640 nm 범위에서 나타날 수 있다.

[54]

[55] 또한, 본 발명의 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템에서 사용하는 시료는 어떠한 고정이나 염색 처리되지 않는 것으로, 동물에서 적출된 조직이라면 특별히 제한하지는 않으며, 예를 들어 동물의 심혈관 조직일 수 있다.

[56]

[57] 또한, 본 발명의 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템을 통해 분석할 수 있는 시료의 두께는 100 내지  $150\mu\text{m}$ 의 범위에서 3 차원 이미징이 가능하다.

[58]

[59] 또한, 본 발명의 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템을 통해 진단할 수 있는 혈관 내 지질의 병리적 변화는 동맥경화 병반일 수 있다.

[60]

일 구체예에서, 본 발명의 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템을 통해 얻은 지질의 3 차원 이미지에서 초기 단계에 해당하는 시료의 경우, 지질 액적(거품세포)이 표면 내막에서 관찰되며, 중기 단계에 해당하는 시료의 경우, 지질 액적의 수가 현저히 증가하고, 세포의 지질 액적이 혈관 벽에 깊이 침착되어 있고, 지질 액적이 심층 내막에서 다층 판 형태로 관찰된다. 심화 단계에 해당하는 시료의 경우에는, 괴저 중심부가 내강쪽으로 커져 있고, 콜레스테롤 결정 층이 우세하게 관찰되고 거품세포가 현저히 감소하며, 섬유상 비후가 관찰된다.

[61]

[62] 본 발명은 또한

[63]

스톡스광과 펌프광을 시료에 조사하여 산란되는 CARS(coherent anti-Stokes Raman scattering) 지질 신호의 파장 및 세기를 측정하는 단계;

[64]

상기 신호를 3 차원 이미지로 검출하는 단계; 및

[65]

상기 이미지에서 지질의 구조를 분석하는 단계를 포함하는 혈관 내 지질의 비파괴적 병리적 변화 진단 방법에 관한 것이다.

[66]

상기 시료는 어떠한 고정이나 염색 처리되지 않는 것으로, 동물에서 적출된 조직이라면 특별히 제한하지는 않으며, 예를 들어 동물의 심혈관 조직일 수 있다.

[67]

상기 신호는 대역 투과 필터를 통해 수집되어 en face CARS 이미징 모드 검출 유니트를 통해 검출되어 3 차원 이미지로 얻을 수 있다.

[68]

상기 지질의 3차원 이미지는 지질의 구조, 예를 들어, 지질 액적, 판 형태, 바늘 형태로 관찰되며, 동물의 동맥경화성 혈관을 이미징할 경우, 동맥경화의 진행

단계에 따른 특이적인 지질 구조를 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 지질의 부피 및 크기를 분석할 수 있어 동맥경화의 진행 단계를 진단할 수 있다.

[69]

[70] 본 발명은 또한

[71] 탐침광을 시료에 조사하여 산란되는 CARS(coherent anti-Stokes Raman scattering) 지질 신호의 파장 및 세기를 측정하는 단계;

[72] 상기 신호를 스펙트럼으로 검출하는 단계; 및

[73] 상기 스펙트럼에서 지질 구조의 스펙트럼 피크를 분석하는 단계를 포함하는 혈관 내 지질의 비파괴적 병리적 변화 진단 방법에 관한 것이다.

[74] 상기 시료는 어떠한 고정이나 염색 처리되지 않는 것으로, 동물에서 적출된 조직이라면 특별히 제한하지는 않으며, 예를 들어 동물의 심혈관 조직일 수 있다.

[75] 상기 신호는 격자형 모노크로메터를 투과하여 광대역 멀티플렉스 CARS 현미 분광 유닛을 통해 스펙트럼으로 검출될 수 있다.

[76] 상기 스펙트럼을 분석함에 있어서, 일 구체예에 따르면, 세포외 및 세포내 지질 액적의 스펙트럼은  $2845\text{ cm}^{-1}$ 에서 한 개의 주요 피크를 나타내고, 판 형태의 지질의 경우 4개의 주요 피크, 즉,  $2880, 2905, 2920, 2950\text{ cm}^{-1}$ 를 나타내고, 바늘 형태의 지질의 경우  $2905, 2920, 2950\text{ cm}^{-1}$ 에서 약한 피크를 나타내므로 상기 피크에 따라 지질의 병리적 변화를 진단할 수 있다.

[77] 따라서, 지질의 화학적 프로파일은 동맥경화의 진행 단계를 진단하는데 적용할 수 있다.

[78]

[79] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[80]

## 발명의 실시를 위한 형태

[81] <실시예 1> CARS 이미징 플랫폼의 준비

[82] 동맥경화 병소를 갖는 심혈관 조직의 지질 선택적 3차원 현미경 이미징 및 점 스펙트럼 분석을 위해 같은 플랫폼 상에 광대역 멀티플렉스 CARS 현미 분광계와 레이저-스캐닝 CARS 현미경을 동시에 설치하였다.

[83] 도 1에 도시된 바와 같이, 레이저-스캐닝 CARS 현미경은 격자형 모노크로메터(grating monochromator, Triax320; Horiba Jobin Yvon)가 장착되어 있는 변형 레이저-스캐닝 공초점 현미경(IX81/FV300; Olympus, Japan)과 3 가지 색을 동시에 발생할 수 있는 CARS 여기 빔을 발생하는 근적외선(near-IR) 펄스 레이저 시스템으로 구성되어 있다. 출력전력의 10%를 분할하면서 이를 펄스 전송 라인(delay line)을 통해 현미경으로 전달하여 CARS 스톱스 빔을 발생하기

위해, 76 MHz의 반복률에서 10W 평균 전력 7ps 펄스 트레인을 전달하는 1064 nm 모드 락 네오디뮴 바나테이트(Nd:VO<sub>4</sub>) 레이저(picoTrain; High Q Laser Production GmbH, Hohenems, Austria)를 사용하였다. 흡수선량(intracavity) 이중 광학 파라메트릭 오실레이터(Levante; APE GmbH, Berlin, Germany)를 동시에 펌핑하기 위해 메인 포션(9 W)을 사용하여 776.7 nm 파장에서 6 ps, 76 MHz 펄스 트레인에서 1.3W CARS 탐침 빔을 발생시켰다. 800 mW 평균 전력과 약 35 nm로 조정된 펄스 대역폭, 76 MHz에서 일반 반복률을 유지하기 위한 1064 nm CARS 스톱스 빔과 동시에 활동적으로 발생하는 출력 펄스 트레인 및 공진기 안정화 피드백 서보(SynchroLock-AP; Coherent, Inc.)를 이용하여 동일 펄스 타이밍을 제공하는 광대역 펌토세컨 모드 락 티타늄-사피어 레이저로부터 817 nm 파장에 집중되어 있는 멀티플렉스 CARS 펌프 빔을 발생시켰다. 각 빔 패스(path)에 위치한 망원경의 빔 확대기(beam expander)가 서로 매치되도록 각 레이저의 빔 직경 및 디버전스(divergence)를 조정하였다. 그리고 나서 3개의 CARS 여기 빔은 2개의 빔 컴바이닝 옵틱스(beam combining optics)를 순차적으로 이용하여 공중에서 동일선상으로 겹쳐지도록 하였다: 펌프 및 탐침 빔은 50:50 광대역 빔스플리터(CVI Melles Griot, Albuquerque, NM)에서 연결되고, 스톱스 빔은 730-960 nm의 범위의 근적외선 파장에 대해 고반사율을 가지며, 1064 nm에서 스톱스 빔에 대해 높은 투과율을 갖는 색 선별 미러(dichroic mirror, Chroma Technologies Corp., Rockingham, VT)와 연결하였다. 컴바인드 레이저 빔은 600 nm 이상의 파장에 대해 약 95%의 투과율을 갖는 한 쌍의 갈바노미터-마운트 골드 미러로 구성된 두 축을 갖는 빔 스캐닝 유닛(FV300)을 통해 1.2 NA 60X water-immersion microscope objective(UPlanSApo UIS2; Olympus)로 전달하였다. 조직 시료의 레이저에 의한 손상을 피하기 위해, ND 필터(neutral density filter)로 각 레이저 출력의 전력을 감쇄하여 시료를 조명하는 컴바인드 레이저 빔의 평균 전력을 총 40 mW 이하로 제한하였다.

- [84] 요약하자면, CARS 플랫폼을 사용하여 표지 없이 지질 선택적으로 화학적 이미징을 수행하기 위해, 빔의 대역폭을 전체 CH 진동 부분을 포함하도록 라만 쉬프트에서 2700 내지 3050 cm<sup>-1</sup>의 범위로 확장하여 다양한 변형을 겪고 있는 동맥경화성 지질을 이미지화하고 화학적으로 분석하였다. 두 번째로, 표지 없는 바이오 이미징을 위한 통상의 라만 현미경과 비교하여 수집 시간이 1.0s/frame이고, 공간적 밀도(spatial resolution)는 좌우 측면에서(x-y) 0.4 $\mu$ m이고 축방향(z-direction)은 1.3 $\mu$ m으로 하여, 250 $\times$ 250  $\mu$ m<sup>2</sup>의 맥시멈 필드(maximum field)를 갖는 2 차원 이미징을 개선하였다. 세 번째로, CARS 현미경은 동맥경화성 지질의 스펙트럼 분석을 위한 광대역 멀티플렉스 CARS 셋업으로 쉽게 전환될 수 있게 하였다. 3 차원 지질 선택적 이미징 후, CARS 스펙트럼 분석을 위한 지점들을 선택하고, 50-150 ms 노출하여 분석하였다.

[85]

[86] (시료 준비)

- [87] 시료로 사용하기 위한 표본을 준비하기 위해, 삼성서울병원 (Samsung Medical Center, SMC)에서 수술을 받은 경동맥 협착증 환자(63-81세)로부터 경동맥 내막 절제(carotid endarterectomy) 표본을 얻었다. CARS 분석을 위한 표본은 인산염 완충용액(phosphate-buffered saline, PBS)에 즉시 침지시켜 이동하였다. 또한, 비교 기준으로 사용하기 위해 관상동맥 바이패스 그래프트 환자로부터 두 개의 내유동맥(internal mammary artery) 표본을 얻었다. 본 발명은 헬싱키 가이드라인 선언을 따른 SMC의 임상시험심사위원회의 승인을 받았으며, 고지(告知)에 입각한 환자의 동의는 모든 피검체로부터 얻었다(IRB 2006-02-11).
- [88]
- [89] (동물 실험)
- [90] 아포리포단백질(Apolipoprotein) E의 발현기능이 제거된 유전자 조작 실험용 쥐 (ApoE<sup>-/-</sup>)는 잭슨 실험실(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)에서 구입하였고, 삼성생명과학연구소 실험동물연구센터에서 특정 병원균이 없는 무균 환경에서 일주일간 적응시켰다. 8주령된 수컷 ApoE<sup>-/-</sup> 마우스 22마리에 2-20주 동안 0.15% 고지방 고콜레스테롤 식이(HFHC)를 섭취시켰다. 2주 후에 매주 마다 CO<sub>2</sub>를 흡입시켜 4-6마리의 마우스를 희생시켰다. CARS 이미징을 위해 심장과 대동맥에 10분 동안 PBS를 살포하고 나서 신속하게 제거하였다. 모든 동물 실험들은 삼성생명과학연구소 실험동물연구센터의 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하였다.
- [91]
- [92] (*ex vivo* CARS 이미징을 위한 시료 준비)
- [93] 심장과 대동맥을 수거한 후, CARS 이미징을 위해 시료를 준비하였다. 결합조직을 조심스레 제거하고 지질의 화학적 프로파일을 분석하기 위해 cold PBS에 저장하였다. 대동맥은 상행대동맥에서 흉관의 하행대동맥 방향으로 수직으로 절개한 후 네 조각으로 절개하였다: 한 조각은 대동맥활의 소만부, 두 조각은 좌우 동맥을 포함하고 있고, 나머지 흉관 하행대동맥은 쇄골하동맥을 포함함. 대동맥으로부터 분리한 동맥은 마이크로시저로 조심스레 절개하였다. *en face* CARS 이미징을 위한 화학적 설치 용액 또는 어떠한 고정액 없이 PBS를 이용하여 준비된 조각들을 내강측(lumen-side)을 아래로 하여 커버슬립 위에 설치하였다.
- [94]
- [95] (통계분석)
- [96] 이미지는 Image-Pro 소프트웨어(MediaCybernetics, Inc., Bethesda, MD)를 이용하여 분석하였다. 각각의 변이를 최소화하기 위해, 모든 흡광도 측정은 각 동맥경화 병반에 대해 3 반복 수행하였다. Student's t-test(two-sided)로 모든 확률을 실험하였다. 0.05 미만의 P-값은 유의한 것으로 간주하였다.
- [97]
- [98] <실험예 1> 동맥경화 병소의 *en face* CARS 3 차원 이미징

- [99] 실시예 1의 CARS 현미경을 이용하여 마우스 및 인간의 동맥경화 병반에 대한 en face 화학적 이미징을 실시하였다. 동맥경화 ApoE<sup>-/-</sup> 마우스(28 마리)로부터 전 대동맥을 수집한 후, 대동맥궁과 경동맥의 소만부를 수직으로 절개하고 CARS 이미징을 위해 고정 없이 준비하였다.
- [100] 도 3은 내강에서 심층 내막(deep intima)에 이르는 동맥경화 병반의 en face 이미지 슬라이스의 3 차원 복원을 나타낸 것으로, CARS 이미지에서, 밝은 스팟은 2700 내지 3050 cm<sup>-1</sup> 범위의 특징적인 CH 분자 진동을 갖는 고농도의 지질을 나타낸 것이다. 이는 병소 깊이에 의존적인 동맥경화성 지질의 전형적인 3 차원 현미경적 특징을 입증한 것이다. 표면층에서(내강으로부터 5-10 $\mu$ m), 세포내 지질 액적을 포함하는 거품세포가 명백하게 이미지화되는 반면, 지질 결정은 그들의 부피 구조를 방해하지 않으면서 심층 내막(deep intima) 부분(>25 $\mu$ m 깊이)에서 이미지화되었다. 동맥경화 병반에서 지질 구조는 형태학적으로 1) 세포 내 액적, 2) 세포외 액적, 3) 다층의 결정 판, 및 4) 바늘 형태의 결정 구조로 분류할 수 있다. 거품세포는 표면 내막의 얇은 부분(3-4 $\mu$ m 깊이)에서만 발견되었다. 반면, 다층 판 지질은 거품세포에서 잘 분리된 심층 내막(deep intima)에서 관찰되었다. 어떤 종류의 다층 지질 결정들은 평행하게 배열되거나, 내막 표면에 기울어진 판으로 넓은 범위에 걸쳐있었다. 또한, 바늘 모양의 지질 구조는 판 형태의 지질 결정과 더불어 심층 내막(deep intima)에서 침착되어 있었다.
- [101] 또한, 도 4의 단일 동맥경화 병반의 반구상 형태의 3 차원 CARS 이미지에서 나타난 바와 같이, 지질 액적(거품세포), 표면층과 세포외 지질 침착물 및 심층 내막(deep intima)에서 콜레스테롤 결정이 풍부한 신장 세포(extended cell)를 포함하여 미세해부학적인 성분들이 관찰되었다.
- [102]
- [103] 의료적 응용 가능성을 조사하기 위해, 동일한 이미징 프로토콜을 사용하여 CARS 현미경을 인간의 동맥경화성 경동맥에 적용하였다(도 5). 거품세포는 표면에서 깊이 40 $\mu$ m까지 성공적으로 이미지화되었고, 마우스에서처럼, 지질 결정은 심층 내막(deep intima)에서 발견되었다(>80 $\mu$ m). 인간 조직에 대한 CARS 이미징의 최대 깊이는 100 내지 150  $\mu$ m였다.
- [104]
- [105] <실험예 2> CARS 이미징에 의한 동맥경화 진행 단계 확인 실험
- [106] 상기 실시예 1의 CARS 이미징 플랫폼을 이용하여 동맥경화의 진행 단계를 실험하기 위해, 고 지방 식이를 투여한 ApoE<sup>-/-</sup> 마우스(28 마리)로부터 2-20 주 후에 동맥경화 병반의 다양한 수준을 얻었다. 정상 식이를 투여한 ApoE<sup>-/-</sup> 마우스를 대조군으로 하여 동시에 평가하였다. 매주마다 마우스 대동맥의 serial en face CARS 이미징을 실시하였다. 대동맥 벽을 통한 지질의 수직적 침투 수준 및 동맥경화 진행에 따른 지질 구조의 형태적 변화에 대한 CARS 이미징을 통해 동맥경화의 진행단계를 분석하였다.

[107] 2주령된 동맥경화 마우스 모델에서, ECM에 결합된 지질 액적은 거의 관찰되지 않았다(도 6a). 4주령된 동맥경화 마우스 모델에서, 지질 액적은 표면 내막(혈관 벽으로의 침투 깊이가  $<10\mu\text{m}$ )에서만 관찰되었고, ECM 아래는 배지쪽으로 크레이터(crater) 형태로 재편성되어 있었다(도 6b). 6주령된 동맥경화 마우스 모델에서, 지질 액적의 수는 2주령된 마우스와 비교하여 현저하게 증가하였다(도 6c). 특히, ECM에 막혀있는 세포외 지질 액적은 혈관 벽에서 30  $\mu\text{m}$  침투 깊이에 침착되어 있었다. 어떤 종류의 지질 액적은 핵에 해당하는 질은 내부 공간을 갖는 세포의 전형적인 형태로 분포되어 있으며, 이는 지질을 포함하는 거품세포의 모습을 제시하는 것이다. 8주령된 동맥경화 마우스 모델에서, 동맥경화 병소는 심층 내막(deep intima)에서 결정 형태의 지질 구조와 같은 심화된 병원성 특징을 나타냈다(도 6d). 거품세포는 표면 부분에서만 여전히 관찰되었다. 그러나, 거품세포의 구조는 6주령된 동맥경화 마우스 모델보다 명확하였다(도 6d의 흰색 화살표). 또한, 괴저 중심부의 전체 부피는 3 차원 CARS 이미징에서 측정할 만 하였다: 100 내지  $120\mu\text{m}$ . 10주령된 동맥경화 마우스 모델에서, 동맥경화 병반의 반구상 형태는 거품세포와 세포외 지질 침착물로 편성되어 있었다(도 6e). 12주령된 동맥경화 마우스 모델에서, 결정 형태의 지질 구조는 혈관 벽으로  $60\mu\text{m}$  이상 침투되어 있었다(도 6f). 어떤 종류의 지질 액적이 심층 내막(deep intima)(푸른색 화살표)에서 결정 형태의 지질의 잘 규정된 다층 판 형태로 침착되어 있었다. 그러나, 거품세포는 여전히 건강한 형태(흰색 화살표)로 관찰되었다. 16주령된 동맥경화 마우스 모델에서, 괴저 중심부는 내강쪽으로 커져있고, 크기는 대략 직경이  $250\mu\text{m}$ 까지 커져있었다(도 6g). 이는 8주령된 동맥경화 마우스에서 관찰되는 것에 비해 거의 두 배에 해당하는 것이다. 흥미롭게도, 콜레스테롤 결정 층이 우세하게 관찰된 반면, 거품세포는 현저히 감소하였다. 이는 거품세포에서 세포외 지질로 전이되는 시점임을 말하는 것이다. 20주령된 동맥경화 마우스 모델에서, 섬유상 비후가 관찰되었다(도 6h).

[108]

[109] <실험예 3> CARS에 의한 동맥경화 병반의 특성 규명

[110] 3 차원 CARS 이미징에서 지질 분포는 3개의 주요 단계로 정량적으로 분석하였다(초기, 중기 및 심화 단계, 도 7). 동맥경화의 진행 단계의 전형적인 특징은 지질 분획의 부피(z-stack에서 2 차원 적용범위로 계산) 및 지질 구조의 크기로 분석한다. 초기 단계 동안(2-6주: 도 7a i-iv), 단지 소량의 지질이 작은 크기로 명시되어 있다. 중기 단계에서(8-12주, 도 7b: i-iv), 지질 침착물은 z-stack으로 깊게 이동하였다. 흥미롭게도, 지질 크기 또는 심층 내막(deep intima)에서 증가하여 판-형태의 지질 결정을 형성하였다. 심화 단계에서(16주, 도 7c: i-iv), 지질 적용범위(coverage) 및 크기 둘 다 증가하였다. 동맥경화성 지질은  $30\mu\text{m}$  깊이까지 침투하였고, 심지어  $90\mu\text{m}^2$  크기의 단일 지질 구조가 직접적으로 검출되는데, 이는 심각한 동맥경화 병반으로 간주되는 특징이다.

[111]

[112] 또한, 단일 동맥경화 병소에 대한 3 차원 이미지에 대한 CARS 능력을 이용하여, 도 7a-7c의 i-iv를 지질 분포를 비교하여 각각의 동맥경화 병반의 이질성을 인식하였다.

[113]

[114] <실험예 4> 멀티플렉스 CARS에 의한 동맥경화 지질의 화학적 프로파일의 on-site 분석

[115] 멀티플렉스 CARS를 이용하여 스펙트럼 형태를 기초로 한 다양한 형태의 동맥경화성 지질에서의 화학적 차이를 분석할 수 있었다. 분석한 지질은 en face 이미지에서 검출된 형태적 차이를 기반으로 하여 4 종류의 주요 타입, 즉, 세포외 및 세포내 지질 액적, 판-형태 및 바늘-형태의 지질로 분류하였다.

[116] 세포외 및 세포내 지질 액적의 스펙트럼은 대칭적인  $\text{CH}_2$  진동에서 한 개의 주 피크( $2845\text{cm}^{-1}$ )를 나타냈다(도 8). 그러나, 판-형태의 지질의 화학적 프로파일은 지질 액적과는 현저하게 달랐다. 즉, 심층 내막(deep intima)에서 판-형태의 지질의 스펙트럼은 지질 액적과 비교하여 그들의 스펙트럼 프로파일에서 4개의 엑스트라 피크( $2880, 2905, 2920, 2950\text{cm}^{-1}$ )를 나타냈다. 엑스트라 피크는 각각  $\text{CH}_2$  비대칭, 탄화수소,  $\text{CH}_3$  대칭, 및  $\text{CH}_3$  비대칭 진동에 해당한다. 반대로, 결정 형태의 지질의 바늘 형태는 다층 판-형태의 지질의 스펙트럼과 비교하여  $2905, 2920, 2950\text{cm}^{-1}$ 에서 보다 약한 피크를 나타냈다. 지질-결정 구조는 넓은 범위의 침투 깊이에서 분석하였다. 그러나, 스펙트럼은 육안으로 보는 깊이와는 상관없이 형태 의존적으로 매우 높게 재생하였다( $n=187$ ).

[117]

### 산업상 이용가능성

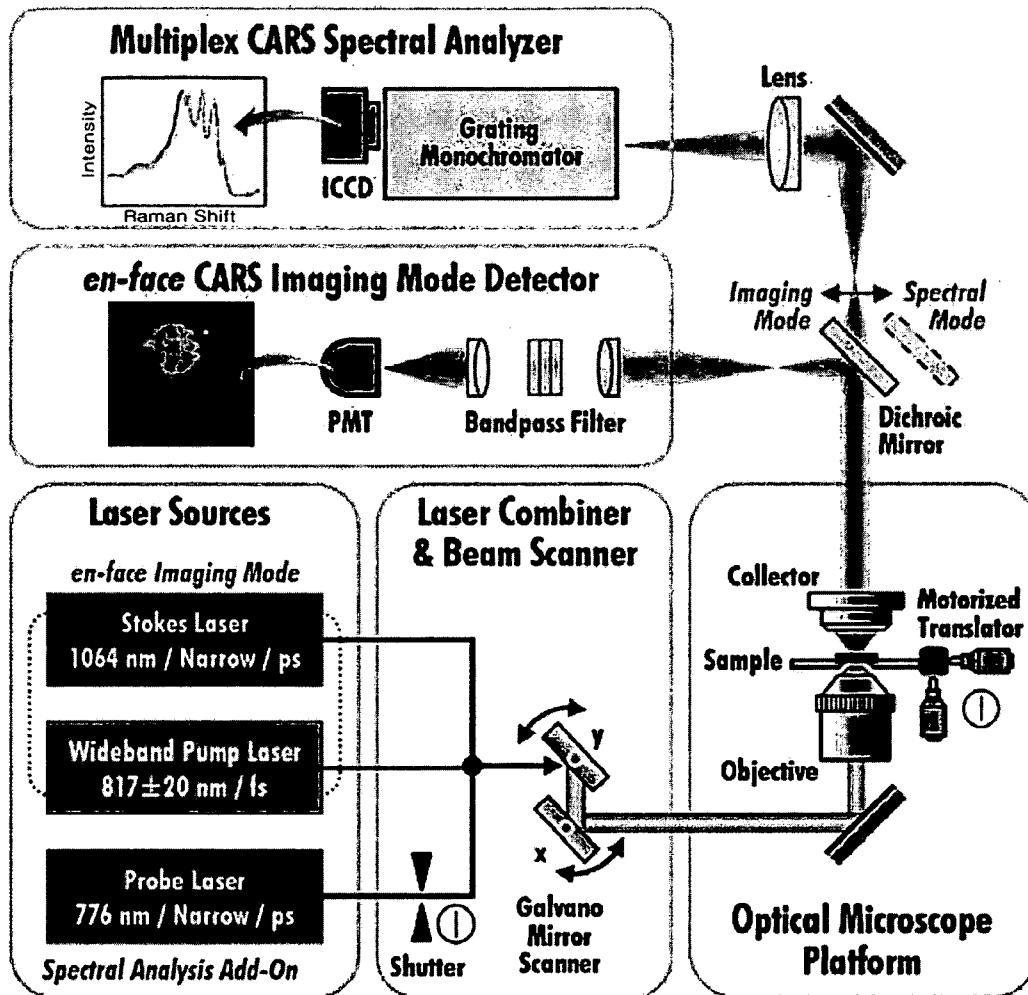
[118] 본 발명은 염색 또는 절단에 따른 조직 손상 없이, 또한 표지 없이 3 차원적으로 혈관 내 지질을 선택적으로 이미징 함으로써 동맥경화의 진행 단계를 진단할 수 있으므로 의료기기 산업상 매우 유용하다.

## 청구범위

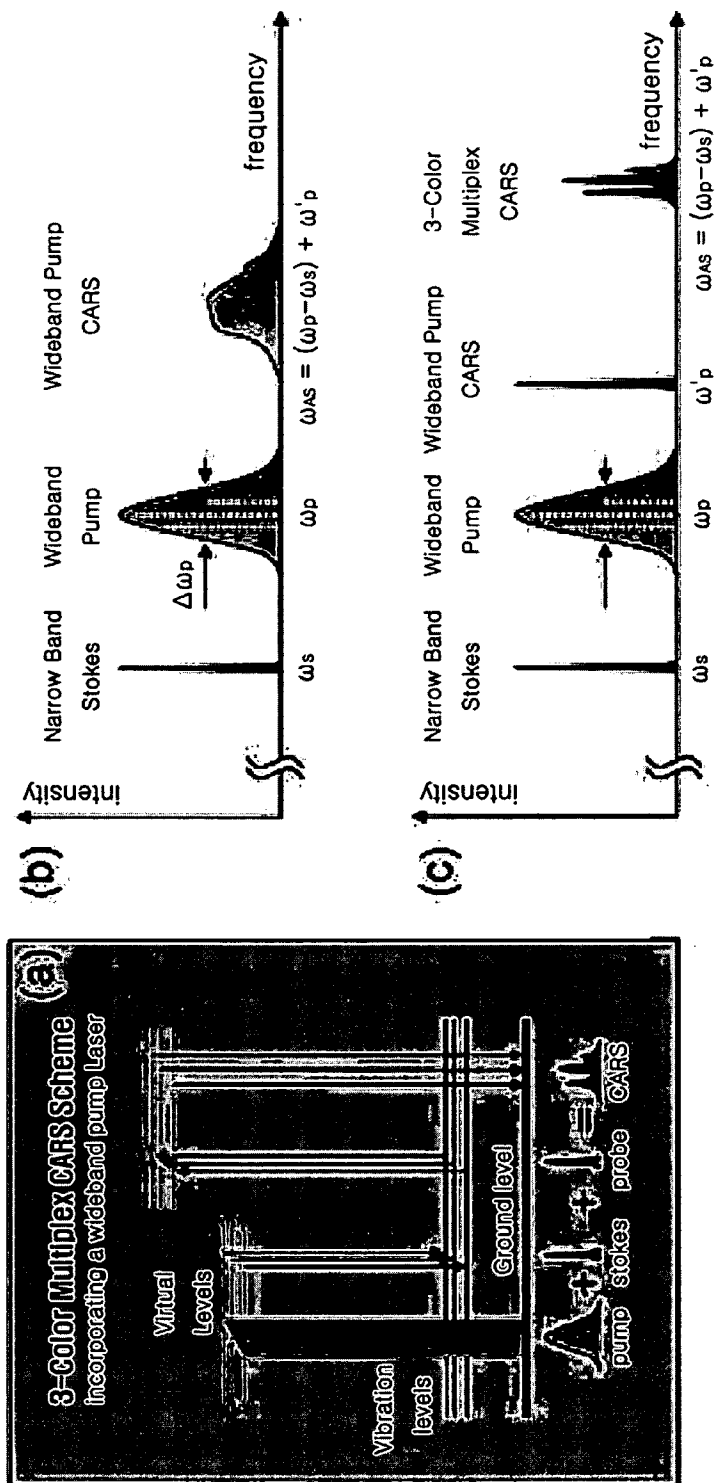
- [1] 서로 다른 파장의 스톡스광, 펌프광 및 탐침광을 선택적으로 조사하여 컴바인드 레이저 빔을 발생시키는 근적외선 펄스 레이저 유니트;  
상기 근적외선 펄스 레이저 유니트로부터 전달된 컴바인드 레이저 빔이 조사되는 시료가 장착된 플랫폼;  
상기 시료에서 발생된 CARS 신호를 수집하여 스펙트럼을 검출하는 광대역 멀티플렉스 CARS 현미 분광 유니트;  
상기 시료에서 발생된 CARS 신호를 수집하여 입체 영상을 제공하는 En face CARS 이미지 모드 검출 유니트; 및  
상기 광대역 멀티플렉스 CARS 현미 분광 유니트와 En face CARS 이미지 모드 검출 유니트 사이에 배치되어, 상기 시료에서 발생된 CARS 신호를 선택적으로 각 유니트로 전달하는 이색 미러를 포함하는 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템.
- [2] 제1항에 있어서,  
상기 시료가 동물의 심혈관 조직인 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템.
- [3] 제1항에 있어서,  
상기 CARS 신호의 대역은 2700 내지 3050cm<sup>-1</sup>인 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템.
- [4] 제1항에 있어서,  
상기 CARS 신호 수집 시간은 1.0s/frame이고, 공간적 밀도는 좌우 측면이 0.4 $\mu$ m, 축방향이 1.3 $\mu$ m인 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템.
- [5] 제1항에 있어서,  
상기 이색 미러는 1000nm 미만의 파장을 반사시키고, 그 이상의 파장을 투과시키는 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템.
- [6] 제1항에 있어서,  
혈관 내 지질의 병리적 변화가 동맥경화 병반인 것인 혈관 내 지질의 병리적 변화 진단 시스템.
- [7] 스톡스광과 펌프광을 시료에 조사하여 산란되는 CARS(coherent anti-Stokes Raman scattering) 지질 신호의 파장 및 세기를 측정하는 단계;  
상기 신호를 3 차원 이미지로 검출하는 단계; 및  
상기 이미지에서 지질의 구조를 분석하는 단계를 포함하는 혈관 내 지질의 비파괴적 병리적 변화 진단 방법.
- [8] 제7항에 있어서,  
시료는 동물의 심혈관 조직인 혈관 내 지질의 비파괴적 병리적 변화 진단 방법.
- [9] 제7항에 있어서,

- 혈관 내 지질의 병리적 변화가 동맥경화 병반인 혈관 내 지질의 비파괴적 병리적 변화 진단 방법.
- [10] 탐침광을 시료에 조사하여 산란되는 CARS(coherent anti-Stokes Raman scattering) 지질 신호의 파장 및 세기를 측정하는 단계;  
상기 신호를 스펙트럼으로 검출하는 단계; 및  
상기 스펙트럼에서 지질 구조의 스펙트럼 피크를 분석하는 단계를 포함하는 혈관 내 지질의 비파괴적 병리적 변화 진단 방법.
- [11] 제10항에 있어서,  
시료는 동물의 심혈관 조직인 혈관 내 지질의 비파괴적 병리적 변화 진단 방법.
- [12] 제10항에 있어서,  
혈관 내 지질의 병리적 변화가 동맥경화 병반인 혈관 내 지질의 비파괴적 병리적 변화 진단 방법.

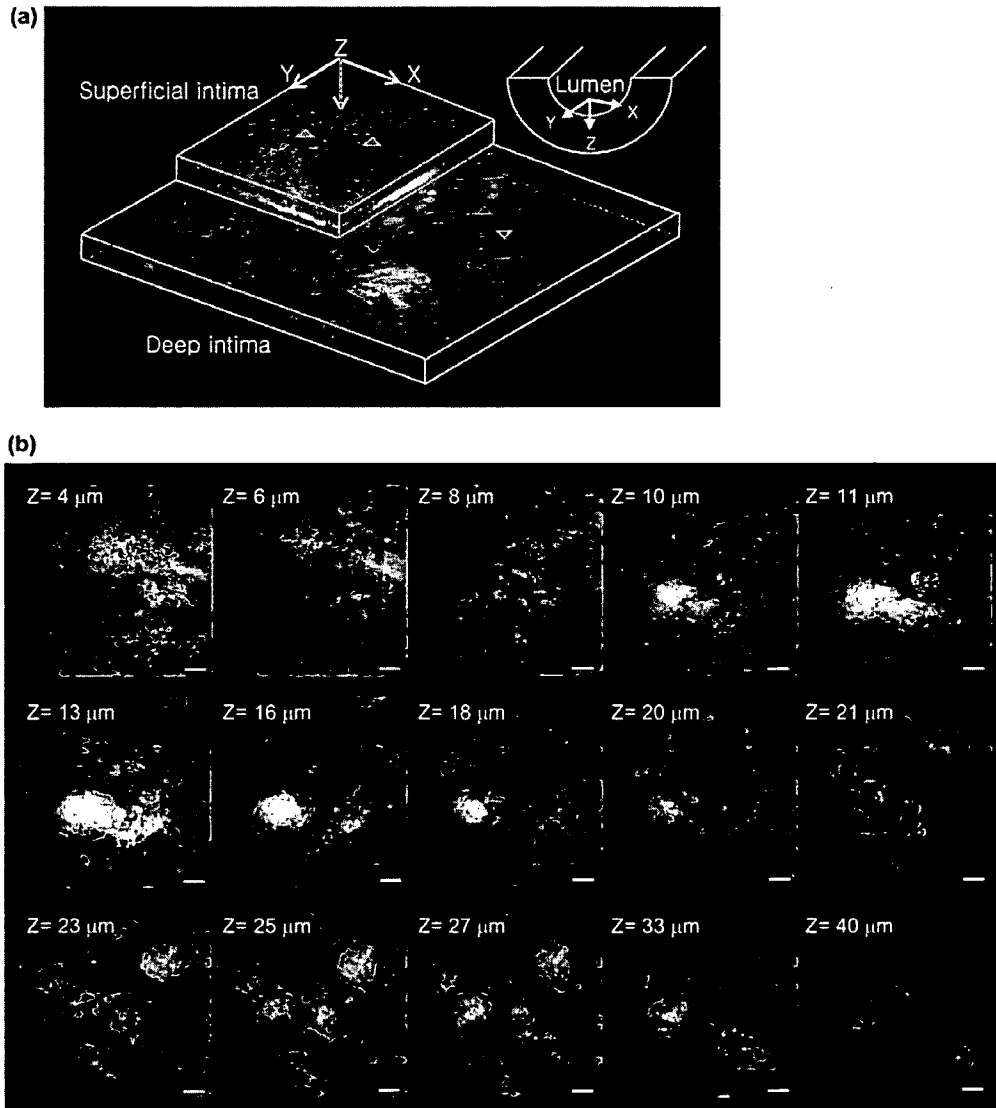
[Fig. 1]



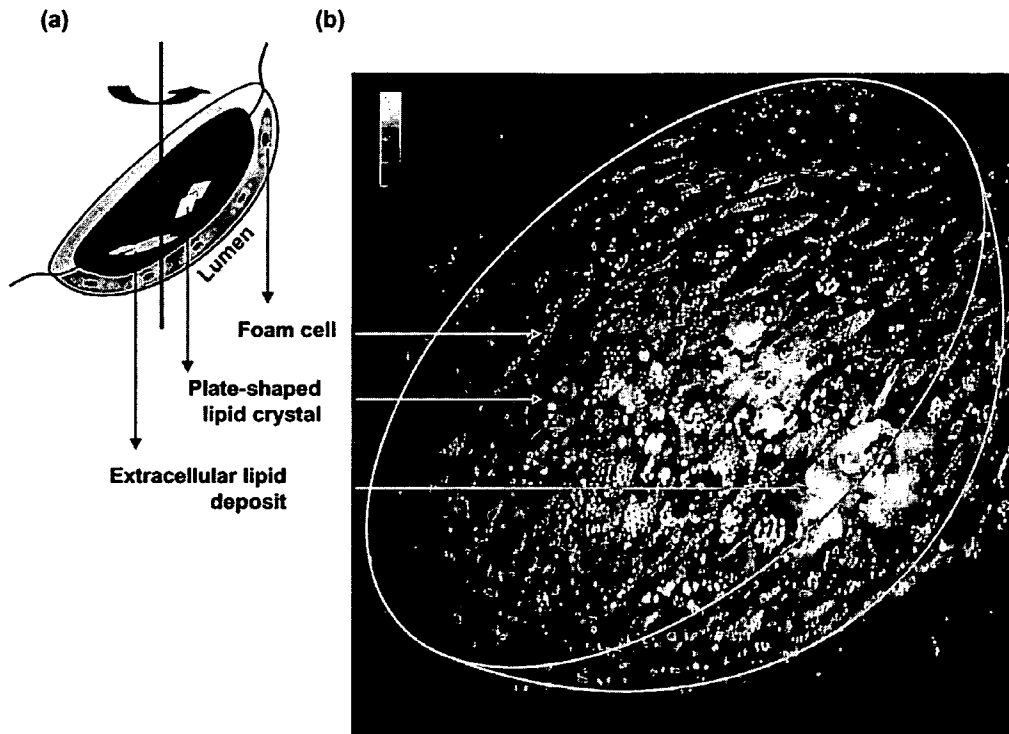
[Fig. 2]



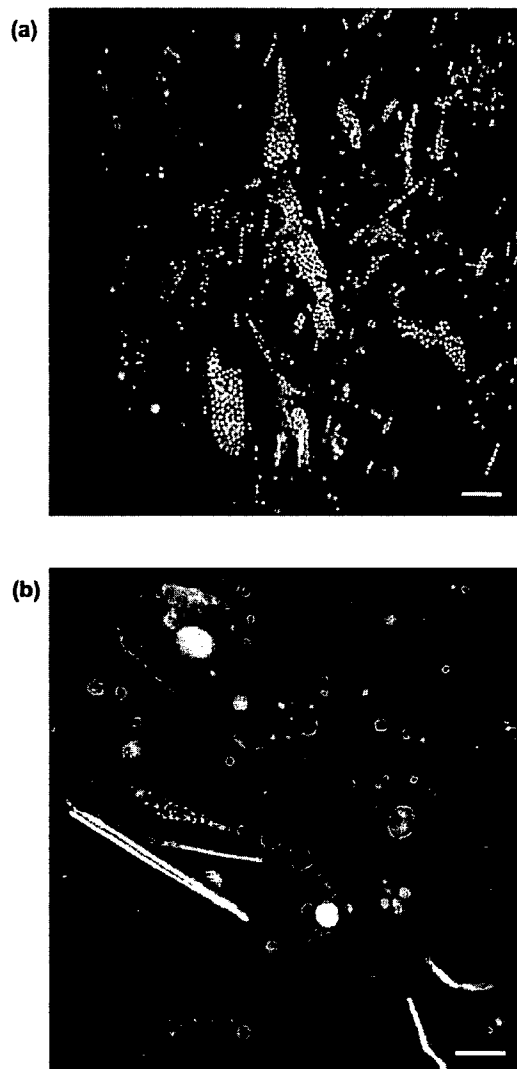
[Fig. 3]



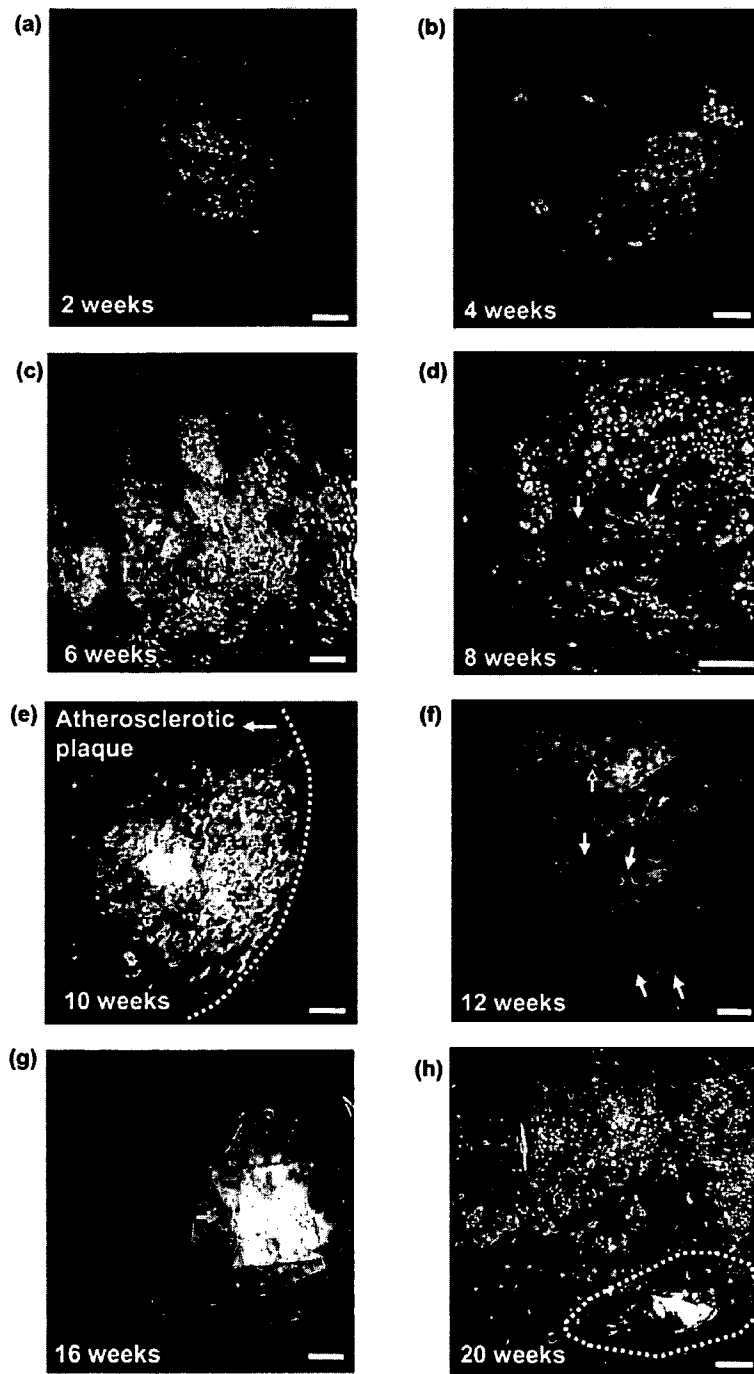
[Fig. 4]



[Fig. 5]

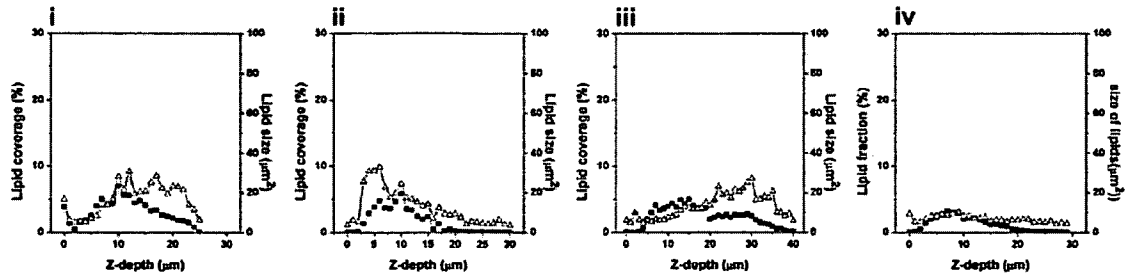


[Fig. 6]

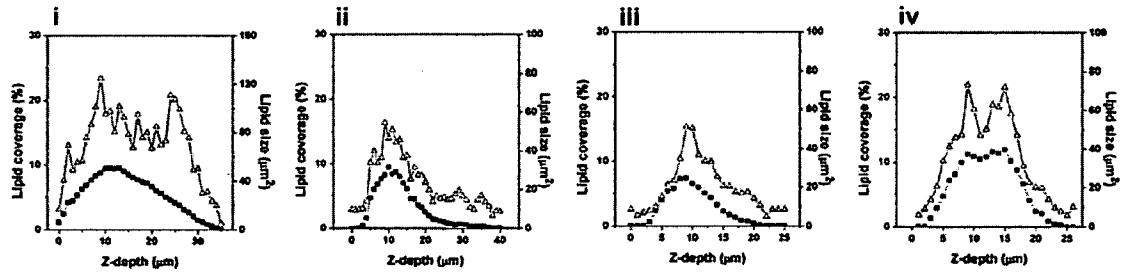


[Fig. 7]

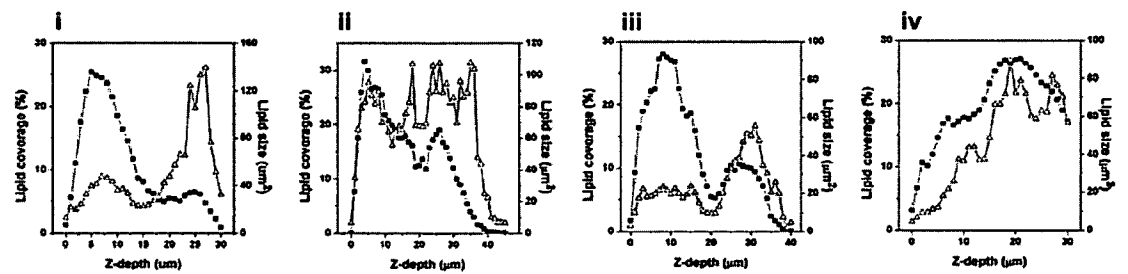
## (a) Initial stage (Type II)



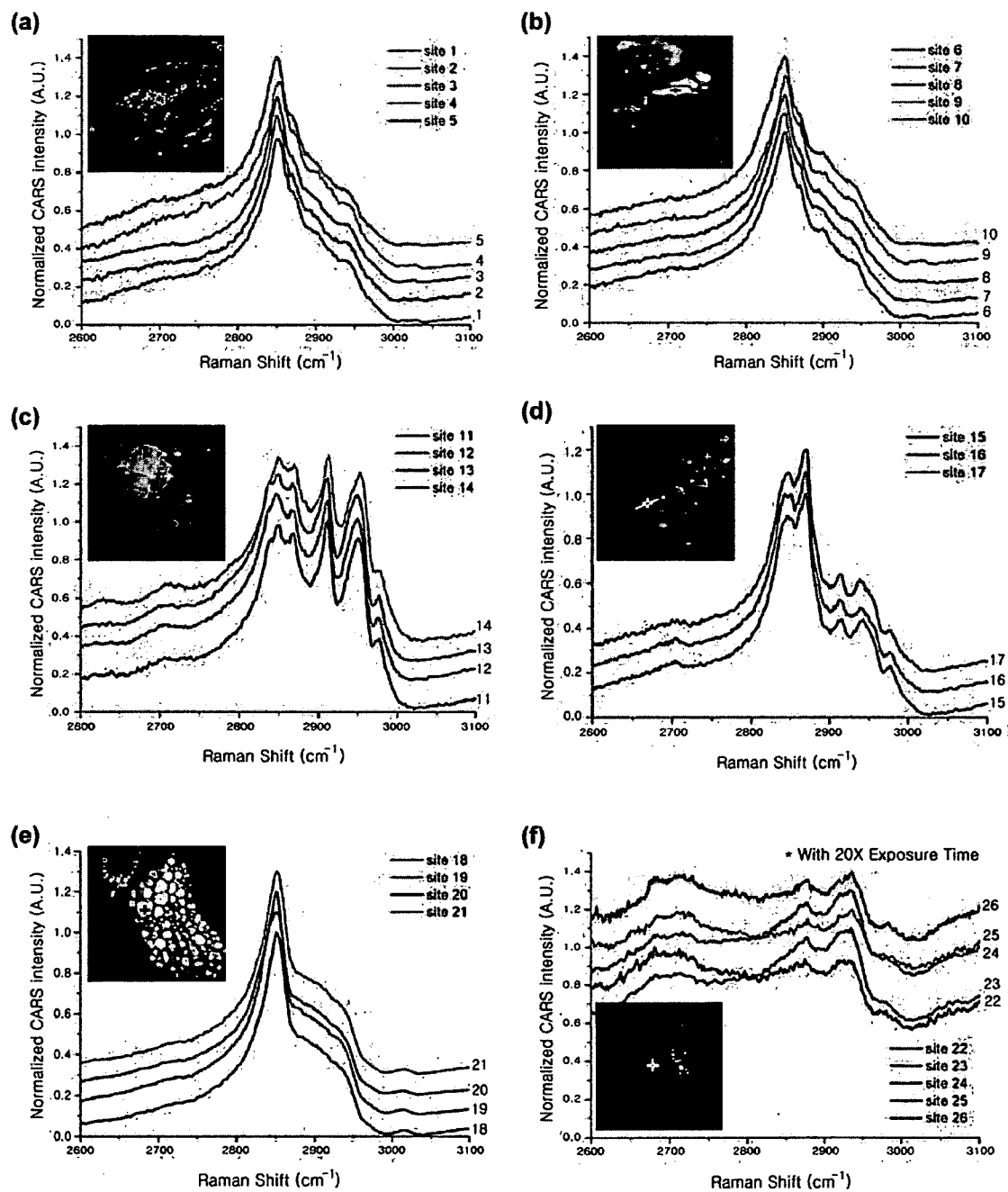
## (b) Intermediate stage (Type III and IV)



## (c) Advanced stage (Type V)



[Fig. 8]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2009/002478****A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61B 5/00(2006.01)i, G01J 3/44(2006.01)i, A61B 5/1455(2006.01)i**

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61B 5/00; G01B 11/00; G01B 11/06; G01N 21/00; G01N 21/65

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) &amp; Keywords: CARS, Laser, Beam, Microscope, Spectrum

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | KR 10-2009-0024965 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) 10 March 2009<br>See claims 1-15 and figures 1-5 | 1-12                  |
| A         | KR 10-0826593 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) 30 April 2008<br>See claims 1-6 and figures 1-5      | 1-12                  |
| A         | KR 10-0781745 B1 (JOBIN YVON S.A.) 04 December 2007<br>See claims 1-8 and figures 1-2                                     | 1-12                  |



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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**28 JANUARY 2010 (28.01.2010)**

Date of mailing of the international search report

**09 FEBRUARY 2010 (09.02.2010)**

Name and mailing address of the ISA/

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2009/002478**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| KR 10-2009-0024965 A                      | 10.03.2009          | WO 2009-031838 A1          | 12.03.2009          |
| KR 10-0826593 B1                          | 30.04.2008          | US 2008-0192260 A1         | 14.08.2008          |
| KR 10-0781745 B1                          | 04.12.2007          | EP 1121580 A1              | 08.08.2001          |
|                                           |                     | EP 1121580 B1              | 29.03.2006          |
|                                           |                     | JP 2002-527742 A           | 27.08.2002          |
|                                           |                     | US 6657708 B1              | 02.12.2003          |
|                                           |                     | WO 00-22416 A1             | 20.04.2000          |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                     |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b><br><br><b><i>A61B 5/00(2006.01)i, G01J 3/44(2006.01)i, A61B 5/1455(2006.01)i</i></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                     |        |
| <b>B. 조사된 분야</b><br>조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)<br>A61B 5/00; G01B 11/00; G01B 11/06; G01N 21/00; G01N 21/65<br><br>조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌<br>한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                     |        |
| 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))<br><b>eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) &amp; 키워드: CARS, Laser, Beam, Microscope, Spectrum</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                     |        |
| <b>C. 관련 문헌</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                     |        |
| 카테고리*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                          | 관련 청구항 |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | KR 10-2009-0024965 A (한국표준과학연구원) 2009.03.10<br>청구항 1-15 및 도면 1-5 참조 | 1-12   |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | KR 10-0826593 B1 (한국표준과학연구원) 2008.04.30<br>청구항 1-6 및 도면 1-5 참조      | 1-12   |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | KR 10-0781745 B1 (조병 본 에스. 에이.) 2007.12.04<br>청구항 1-8 및 도면 1-2 참조   | 1-12   |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.</span> </div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                     |        |
| * 인용된 문헌의 특별 카테고리:<br><div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌</p> <p>“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌</p> <p>“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌</p> <p>“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌</p> <p>“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌</p> <p>“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.</p> <p>“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.</p> <p>“&amp;” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌</p> </div> </div> |                                                                     |        |
| 국제조사의 실제 완료일<br>2010년 01월 28일 (28.01.2010)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 국제조사보고서 발송일<br><b>2010년 02월 09일 (09.02.2010)</b>                    |        |
| ISA/KR의 명칭 및 우편주소<br>대한민국 특허청<br>(302-701) 대전광역시 서구 선사로 139,<br>정부대전청사<br>팩스 번호 82-42-472-7140                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 심사관<br>이승환<br>전화번호 82-42-481-8419<br>                               |        |

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌             | 공개일        |
|-----------------------|------------|--------------------|------------|
| KR 10-2009-0024965 A  | 2009.03.10 | WO 2009-031838 A1  | 2009.03.12 |
| KR 10-0826593 B1      | 2008.04.30 | US 2008-0192260 A1 | 2008.08.14 |
| KR 10-0781745 B1      | 2007.12.04 | EP 1121580 A1      | 2001.08.08 |
|                       |            | EP 1121580 B1      | 2006.03.29 |
|                       |            | JP 2002-527742 A   | 2002.08.27 |
|                       |            | US 6657708 B1      | 2003.12.02 |
|                       |            | WO 00-22416 A1     | 2000.04.20 |