

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2006-0108000
A61B 6/00 (2006.01) (43) 공개일자 2006년10월17일

(21) 출원번호 10-2005-0029962

(22) 출원일자 2005년04월11일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 오칠환
서울 강남구 일원동 716 목련타운 103-1501
김진원
서울 용산구 이촌2동 동아그린아파트 103-1403
서홍석
서울 광진구 구의3동 631-1 현대프라임아파트 6-901
제정호
경북 포항시 남구 지곡동 교수아파트 9-1403

(74) 대리인 이문섭
윤여강

심사청구 : 있음

(54) 비단색 방사광 X-선 현미경 이미지를 이용한 혈관의 미세한 병리적 변화 진단 시스템

요약

본 발명은 3 세대 방사선 가속광을 이용한 x-ray 미세 현미경 검사법을 이용하여 혈관의 영상화를 통해 혈관의 병태생리를 검사하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 고전적으로 사용된 방법인 조직학적 검사와 달리 조직의 손상이 전혀 없으면서 염색을 포함한 어떠한 특수 처리 없이도 혈관내의 미세한 병리적 변화를 검출 해 낼 수 있으며, 나아가 인체 내에서 동맥경화와 같은 혈관의 병리적 진단을 위한 새로운 영상 진단의 중요한 기초가 될 수 있다.

대표도

도 1

색인어

방사광, X-선

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 진단 시스템을 개략적으로 도시한 모식도이고,

도 2a는 유전자 조작 동맥경화 유발 동물인 ApoE-knockout mouse의 박리된 동맥 나무(arterial tree)를 촬영한 사진이고,

도 2b는 상기 도 2a의 원형부분인 상행 대동맥(ascending aorta)을 본 발명 진단 시스템을 이용하여 촬영한 방사광-증대된 마이크로이미지이고,

도 3a는 ApoE-knockout mouse의 상행 대동맥을 촬영한 방사광-증대된 마이크로이미지이고,

도 3b는 상기 도 3a의 사각형부분인 경화판 병변의 경계부를 확대 촬영한 방사광-증대된 마이크로이미지이고,

도 4a는 ApoE-knockout mouse의 상행 대동맥의 전진성 동맥경화 병변을 H&E 염색후 조직검사한 사진이고,

도 4b는 ApoE-knockout mouse의 상행 대동맥의 수지에 고정된 죽종(atheromatous) 병변의 단층촬영 재건된 슬라이스를 촬영한 사진이고,

도 5는 야생형 마우스의 하행 대동맥(descending aorta)을 본 발명의 진단 시스템을 이용하여 확대 촬영한 방사광-증대된 마이크로이미지이다.

<도면의 주요부분에 대한 설명>

1. 슬릿 및 어테뉴에이터(Slit and attenuator)
2. X-선 셀 및 시료 지지대(X-ray cell and object holder)
3. 가시광선 전환수단(Scintillator) 4. 거울(Mirror)
5. 광학계(Optical lens) 6. 촬영수단(CCD camera)

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 방사광(synchrotron radiation)을 이용한 혈관 진단시스템에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 비단색 방사광 X-선 현미경 이미지를 이용한 혈관의 미세한 병리적 변화 진단 시스템에 관한 것이다.

일반적으로 의약업계에서는 살아 있는 생체 내부조직을 관찰하기 위해 물질의 투과성이 우수한 X 선 촬영을 많이 사용하고 있다. 상기 방법은 X 선을 살아 있는 생물체에 조사시킨 다음 생체를 투과한 X 선을 검출함으로써 그 내부 조직의 구조를 관찰한다.

상기 X 선 촬영법의 원리는 생체 내부에서 물질의 밀도 차이에 따라 X 선 흡수정도가 다르다는 것이다. 즉, 밀도가 큰 조직은 밀도가 작은 조직에 비해 X 선을 많이 흡수하는 바, 생체 조직에 X 선을 투과시킨 후 X 선 감광 필름이나 검출기에서 관찰하면 밀도가 큰 조직은 X 선 흡수가 많이 되어 밀도가 작은 조직에 비해 검게 나타나게 된다. 그 결과, 밀도 차이에 따른 조직의 구조를 구별할 수 있게 된다(International Commission on Radiation Units and Measurements, "Tissue Substitutes in Radiation Dosimetry and Measurement", ICRU Report, 44(1989)).

한편, 상기 X 선 촬영법은 생체 내부 조직을 고배율로 관찰할 수 없는 바, 미세 조직은 관찰하기가 매우 어렵다는 문제점이 있다. 이에, 종래 X 선 촬영법으로 생체 조직을 고배율로 관찰하기 위해서는 생물체와 X 선 검출기 사이의 거리를 증가시키거나 또는 X 선 검출기의 상을 고배율로 확대해야 한다. 그러나, 상기 두 경우 모두 고배율로 확대를 시도하면 할수록 생물체 조직간 상의 경계가 점점 흐려지게 되어 결국 고배율로 관찰할 수 없게 된다.]

최근 혈관(vessel) 이미징의 중요성이 강조되고 있다. 전통적으로, 혈관에서 동맥경화 병변은 요오드(iodine)과 같은 heavy element를 함유하는 콘트라스트제(contrast agent)를 혈관에 채워서 검출하였다. 그러나, 상기 방법은 알레르기 반응과 같은 심각한 부작용으로 인해 시험대상을 치사에 이르게 할 수 있다. 최근에 Takeda et al.은 생리 식염수만을 사용한 interferometric 페이즈-콘트라스트 X-선에 의해 혈관을 이미징한 결과를 보고하였다(Vessel Imaging by interferometric phase-contrast X-ray technique. Circulation. 2002;105:1708-1702).

그러나, 동맥경화 병변(atherosclerotic lesions)의 판상(plaque) 약점에 관련된 병태생리학을 조사하기 위해서는 콘트라스트제에 의한 관내 충전 결함(luminal filling defect)보다 혈관 벽 자체를 이미징하는 것이 절대적으로 필요하다. 그러나, 지금까지 병변의 상세를 보여줄 수 있는 충분한 파워를 가지고 혈관 벽을 이미징할 수 있는 방법이 거의 없었다. 대부분의 혈관 벽의 변화를 검사하는 방법은 염색(staining)을 포함하는 시료 준비에 의한 현미경 연구 방법이었으나, 이는 조직 손상을 피할 수가 없다.

최근에 개발된 3세대 방사광 X-선은 개선된 해상도 파워를 가지고 있다. Baik et al.은 3세대 방사선 가속광을 이용한 영상화의 가능성을 보고하였다(Review of scientific instruments 2004;75(11): 4355-8). 유전자-타게팅 기술에 의해 제조된 Apolipoprotein E (Apo E) knockout mouse는 인간에서 관찰되는 것과 유사한 동맥경화 병변을 자발적으로 진행시켜 동맥경화 모델 동물로 가장 많이 이용되고 있다(Seo et al. Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E deficient mice, Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17: 3593 3601)

이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 유전자 조작에 의해 동맥경화를 유도한 동물(apoE knockout mouse)에서 방사선 가속광을 이용하여 어떠한 특수 처리나 조직의 손상 없이 혈관의 미세한 병리적 변화를 영상화할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 주된 목적은 어떠한 특수 처리나 조직의 손상 없이 혈관벽의 미세한 병리적 변화를 진단하는 시스템을 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (i) 비단색(unmonochromatized) 방사광 X선의 발생수단; (ii) 상기 방사광 X선의 진행방향에 설치된 시료 지지대; (iii) 시료를 투과한 X선을 가시광선으로 전환하는 가시광선 전환수단; (iv) 상기 전환수단에 의해 전환된 가시광선을 반사시키는 거울; (v) 상기 반사된 가시광선상을 확대하는 광학계; (vi) 상기 광학계에 의해 확대된 상을 검출기에 고정화하는 촬영수단; 및 (vii) 상기 촬영수단에 의해 고정화된 영상의 재생수단을 포함하는 혈관의 미세한 병리적 변화 진단 시스템을 제공한다.

본 발명의 진단 시스템에 있어서, 상기 X 선 발생수단은 3세계 방사광(synchrotron) 가속기인 것을 특징으로 한다. 상기 방사광 X-선은 일반 X-선 시스템과 달리 위상이 일치하고 평행하며 진동방향이 일치하는 특성을 이용하여 고 분해능, 고 대조도의 투사영상을 얻을 수 있다. 본 발명에서는 구체적으로 대한민국 포항공대에 설치된 3세대 가속기인 X-선 미세방사선 line을 이용하였다. 또한, 본 발명에서 이용되는 상기 X 선은 단색(monochromatic) 파장이 아닌 비단색(nonmonochromatic) 파장을 사용한다.

본 발명의 진단 시스템에 있어서, 상기 시료 지지대는 검출기로부터 150-300 mm 앞쪽에 위치시키는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 가장 최적의 음영을 얻기 위해 시료를 검출기의 약 200 mm 앞쪽에 위치시키는 것이 좋다.

본 발명의 진단 시스템에 있어서, 상기 가시광선 전환수단은 NaI, CsI 또는 CdWO₄ 신틸레이션 결정(scintillator)인 것을 특징으로 한다. 본 발명에서, 시료를 통과한 X 선은 가시광선 전환수단, 바람직하게는 형광관(CdWO₄ scintillator)과 반응하여 가시광선으로 바뀐다. 상기 전환수단에 의해 전환된 가시광선은 거울, 바람직하게는 금도금된 거울을 통해 90° 반사된다.

본 발명의 진단 시스템에 있어서, 상기 광학계는 1-40 배의 배율을 갖는 것을 특징으로 한다. 본 발명에서, 가시광선 전환수단에 통과한 상은 광학계에 의해 확대가 되는 바, 본 발명에 이용되는 광학계는 5-40배 배율을 갖는 것이 바람직하다. 본 발명에서 이용되는 광학계는 당업계에서 통상적으로 이용되는 대물렌즈를 이용한다.

본 발명의 진단 시스템에 있어서, 상기 촬영수단은 당업계에서 통상적으로 이용되는 X 선 감광 필름, CCD 카메라 또는 디지털 카메라인 것을 특징으로 한다. 본 발명에서, 상기 광학계에 의해 확대된 상은 촬영수단, 바람직하게는 CCD 카메라에 의해 검출기에 고정화된다.

본 발명의 진단 시스템에 있어서, 상기 재생수단은 모니터 및 영상 재생 프로그램이 장착된 컴퓨터 또는 VCR인 것을 특징으로 한다. 본 발명에서, 상기 촬영수단에 의해 고정화된 영상은 육안으로 인지할 수 있도록 재생수단에 의해 재생된다.

본 발명의 진단 시스템에 있어서, 상기 혈관의 미세한 병리적 변화는 미세관찰을 필요로 하는 어떤 혈관의 병리적 변화도 포함되나, 바람직하게는 혈관동맥경화 병변인 것을 특징으로 한다.

상술한 본 발명 진단 시스템에 의해 달성되는 상의 배율은 1- 1000배이고, 해상도는 최고 수 마이크로미터이다. 따라서, 본 발명 시스템은 염색을 포함한 어떠한 특수 처리 없이도 혈관내의 미세한 병리적 변화를 고해상도 및 고배율의 영상으로 진단할 수 있다. 이러한 놀라운 결과는 굴절율(refractive index)의 차이에 기초한 것으로서, 높은 coherence를 갖는 X-선은 통상의 흡수 콘트라스트를 향상시킬 수 있다.

본 발명의 진단 시스템을 이용한 진단 방법은 상기 진단 시스템의 X 선 발생수단 및 가시광선 전환수단 사이의 시료 지지대에 검사대상 시료를 고정화하고 X 선을 조사함으로써 실시된다. 이때, 검사대상이 되는 시료는 혈관을 포함하는 모든 조직이 될 수 있으며, 또한, 죽은 생명체의 조직 뿐만 아니라 살아 있는 생명체를 시료로 하여 그 조직의 유동성도 동영상으로 촬영함으로써, 생체의 동역학적 진단도 가능케 한다. 따라서, 본 발명 검사방법은 초음파로 관찰할 수 없는 마이크로미터 크기의 미세한 생체 내부 구조를 in vivo로 영상 촬영할 수 있다.

본 발명의 구성을 첨부된 예시 도면을 참조하여 보다 구체적으로 설명한다.

도 1은 본 발명의 진단 시스템을 개략적으로 도시한 모식도이다. 도 1에서, 본 발명의 진단 시스템은 비단색(unmonochromatized) 방사광 X선의 발생수단(미도시), 상기 방사광 X선의 빔의 크기와 강도를 조절하는 슬릿 및 어테뉴에이터(1), 상기 방사광 X선의 진행방향에 설치된 시료 지지대(2), 시료를 투과한 X선을 가시광선으로 전환하는 가시광선 전환수단(3), 상기 전환수단에 의해 전환된 가시광선을 반사시키는 거울(4), 상기 반사된 가시광선상을 확대하는 광학계(5), 상기 광학계에 의해 확대된 상을 검출기에 고정화하는 촬영수단(6), 및 상기 촬영수단에 의해 고정화된 영상의 재생수단(미도시)을 포함한다.. 하는 혈관의 미세한 병리적 변화 진단 시스템을 제공한다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

실시예 1: 실험동물의준비

실험 쥐는 생후 42 주의 유전자 조작을 통해 만든 Apo E (-/-) mouse 암컷 한 마리와 대조군인 성별 및 나이가 동일한 wild type 한 마리를 대상으로 하였다. 체중은 각각 24.1, 23.8 gram 이었다. ketamine /xylazine (85.7/7.7 gram each)로 마취 후 유전자 조작 쥐와 대조군쥐에서 동일하게 10% formalin을 대상 동물 심장의 심박출량과 근사한 100-120 mmHg 압력을 유지하여 첫 20 초간 lactated Ringer 용액으로 관류 후 10 % buffered formalin 을 4 분간 혈관 내로 관류하여 혈관을 고정 시켰다. 고정 후 실험쥐를 혈관박리 시까지 10 % formalin 용액에 담가 저장하였다. 혈관 박리는 두부에서 하지까지 dissecting microscope하 6 배의 확대 조건 하에서 박리하여 10% formalin 에 immersion fixation 하였다. 이때, 각 동맥의 분지는 경동맥과 분지(carotid bifurcation), 흉부 대동맥 (thoracic aorta)와 신장동맥 (renal artery)를 포함한 복부 대동맥 (abdominal aorta), 장동맥(iliac artery) 및 슬와동맥 (popliteal artery)을 포함하였다.

영상 분석을 위하여 혈관 전체의 영상을 얻은 후 동맥 경화 병변이 있을 것으로 여겨지는 상행 대동맥궁 부위를 확대하여 영상을 얻었다. 영상 분석이 끝난 후 동맥경화 병변이 관찰되었던 부위인 상행 대동맥궁 부위를 부분 절제하여 5 mm 간격으로 paraffin block 하여 hematoxylin-eosin 염색한 후 광학 현미경을 이용 관찰 후 synchrotron 영상과 비교 분석 하였다.

실시예 2: 계측 방법

영상은 대한 민국 포항 공대에 설치된 3 세대 가속기의 7B2 x 선 미세방사선 line을 이용하였다 (설치에 대한 자세한 내용은 Baik et al. Rev. Sci. Instrum. 75:4355-4358 참조). 실험은 unmonochromatized white beam line 으로 beamline

의 자세한 내용은 도 1 에 도식하였다. 실험 표본은 가장 최적의 음영을 얻기 위해 검출기의 200 mm 앞쪽에 위치하였으며 0.1 mm 정확도를 가진 sample holder를 이용하여 고정하였다. goniometer 는 tomography 영상을 얻기 위하여 0.001 mm 의 정확도를 갖도록 하였다. X-ray 의 intensity 는 250 μ m 의 두께를 갖는 cleaved CdWO₄ single crystal 에 의해 가시광선으로 변환하였다. scintillator material 은 변환 효율과 lateral resolution을 동시에 극대화 하도록 하였다. 실험 표본은 정확한 위치 선정을 위해 회전이 가능하도록 설계된 stage에 고정하였다.

scintillator 에 의해 만들어진 영상은 검출기가 hard x-ray 에의 노출을 피할 수 있도록 반사경에 의해 reflect 된 후 optical lens 로 확대하였다. lens는 50 배의 확대 능력까지 전환이 가능하도록 하였으며 확대된 영상을 CCD camera를 이용하여 검출하였다. pixel 은 1600 x 1200 의 14 bit gray scale 로 하였으며 본 연구에서는 1280 X 1024 pixel, horizontal of view를 100 ms 내에 얻었다.

미세 영상의 tomographic reconstruction은 검사 대상이 되는 상행 대동맥궁 부위를 절제하여 resin 에 고정한 후 1000 projection을 2 분간 얻어 재구성하였다.

모든 과정은 Korea Academy of Medical Sciences 의 'Guide for Animal Experiments' 에 기초한 고려대학교 의과대학의 실험 동물 사용 및 보호에 관한 위원회의 감독을 받아 실시하였다.

도 2a는 high fat-diet가 공급된 유전자 조작 동맥경화 유발 동물인 42-week-old ApoE-knockout mouse의 박리된 동맥 나무(arterial tree)를 촬영한 사진이다. 혈관 직경은 약 1200 μ m이다. 원 안의 상행 대동맥에 죽상경화판 병변(atherosclerotic plaque lesion)이 보여진다. Bar = 2.5 mm. 도 2b는 상기 도 2a의 원형부분인 상행 대동맥(ascending aorta)을 본 발명 진단 시스템을 이용하여 촬영한 방사광-증대된 마이크로이미지(Synchrotron-enhanced microimage)이다. 어떤 염색이나 특별한 시료준비과정을 거치지 않았다. 화살표는 작은 콜레스테롤 크레프트를 갖는 윤곽이 잘 드러나고 진보된 죽상경화판 병변을 가르킨다. Type : projection image, optical lens magnifier : 2.5X, Field of view : 3.5 mm.

도 3a는 ApoE-knockout mouse의 상행 대동맥을 촬영한 방사광-증대된 마이크로이미지이다. 윤곽이 잘 드러난 죽상경화판 병변을 보여준다. Type : projection image, optical lens magnifier : 2.5X, Field of view : 3.5 mm. 도 3b는 상기 도 3a의 사각형부분인 경화판 병변의 경계부를 확대 촬영한 방사광-증대된 마이크로이미지이다. 콜레스테롤 크레프트(cleft)와 얇은 섬유상 캡(cap)를 갖는 중앙 괴사 존(necrotic zone)을 보여준다. Type : projection image, optical lens magnifier : 10X, Field of view : 910 μ m.

도 4a는 본 발명의 시스템과 광학현미경과의 비교를 위하여 ApoE-knockout mouse의 상행 대동맥의 전진성 동맥경화 병변을 H&E 염색후 조직검사한 사진이다. H& E stain (x100 ; black bar = 100 μ m). 주로 콜레스테롤 크레프트로 구성된 괴사 코어를 대체하는 돌출 매스가 있다. 화살표는 콘드로사이트-양 세포를 포함하는 주변 영역을 표시한다. 병변이 매디아를 침입하기 시작한 것이 관찰된다. 도 4b는 ApoE-knockout mouse의 상행 대동맥의 수지에 고정된 죽종(atheromatous) 병변의 단층촬영 재건된 슬라이스를 촬영한 사진이다. 재건(reconstruction)은 2분내 1000 프로젝션에 기초하였다. Type : tomography, optical lens magnifier 10 X, Field of view : 910 μ m.

도 5는 야생형 마우스의 하행 대동맥(descending aorta)을 본 발명의 진단 시스템을 이용하여 확대 촬영한 방사광-증대된 마이크로이미지이다. 내부 엘라스틱 라미나를 포함하는 혈관벽의 상세 구조를 보여준다. Type : projection image, optical lens magnifier : 10 X, Field of view : 910 μ m.

발명의 효과

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 고전적으로 사용된 방법인 조직학적 검사와 달리 조직의 손상이 전혀 없으면서 염색을 포함한 어떠한 특수 처리 없이도 혈관내의 미세한 병리적 변화를 검출 해 낼 수 있으며, 나아가 인체 내에서 동맥경화와 같은 혈관의 병리적 진단을 위한 새로운 영상 진단의 중요한 기초가 될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- (i) 비단색(unmonochromatized) 방사광 X선의 발생수단;
- (ii) 상기 방사광 X선의 진행방향에 설치된 시료 지지대;
- (iii) 시료를 투과한 X선을 가시광선으로 전환하는 가시광선 전환수단;
- (iv) 상기 전환수단에 의해 전환된 가시광선을 반사시키는 거울;
- (v) 상기 반사된 가시광선상을 확대하는 광학계;
- (vi) 상기 광학계에 의해 확대된 상을 검출기에 고정화하는 촬영수단; 및,
- (vii) 상기 촬영수단에 의해 고정화된 영상의 재생수단을 포함하는 혈관의 미세한 병리적 변화 진단 시스템.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 X 선 발생수단은 3세계 방사광(synchrotron) 가속기인 것을 특징으로 하는 진단 시스템.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 시료 지지대는 검출기로부터 150-300 mm 앞쪽에 위치시키는 것을 특징으로 하는 진단 시스템.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 상기 가시광선 전환수단은 NaI, CsI 또는 CdWO₄ 신틸레이션 결정(scintillator)인 것을 특징으로 하는 진단 시스템.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 상기 광학계는 1-40 배의 배율을 갖는 것을 특징으로 하는 진단 시스템.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 상기 촬영수단은 X 선 감광 필름, CCD 카메라 또는 디지털 카메라인 것을 특징으로 하는 진단 시스템.

청구항 7.

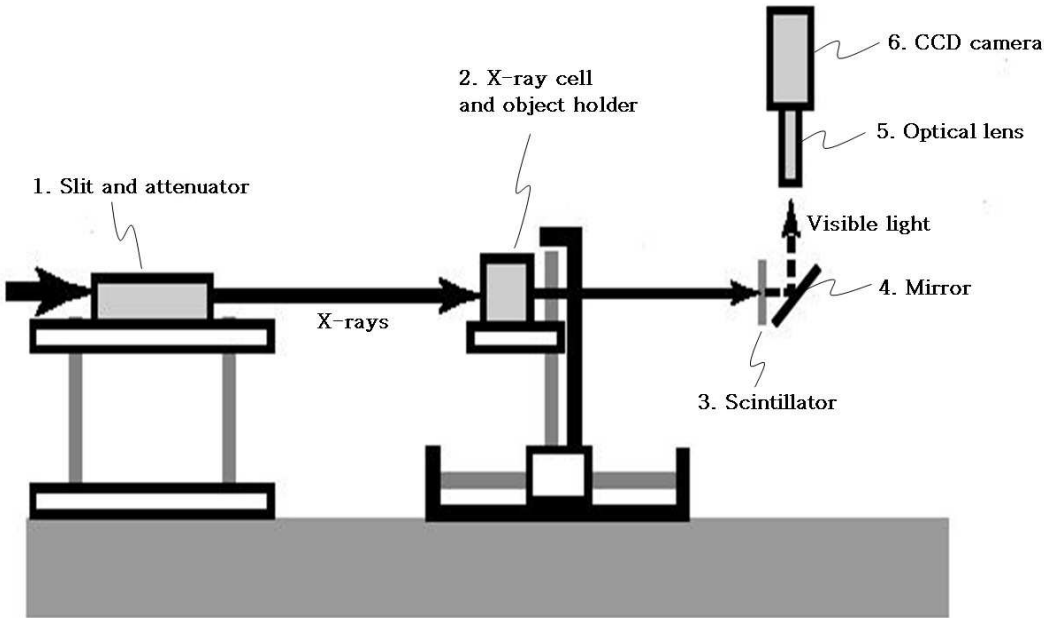
제 1 항에 있어서, 상기 재생수단은 모니터 및 영상 재생 프로그램이 장착된 컴퓨터 또는 VCR인 것을 특징으로 하는 진단 시스템.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 상기 혈관의 미세한 병리적 변화는 동맥경화 병변인 것을 특징으로 하는 진단 시스템.

도면

도면1



도면2a



도면2b



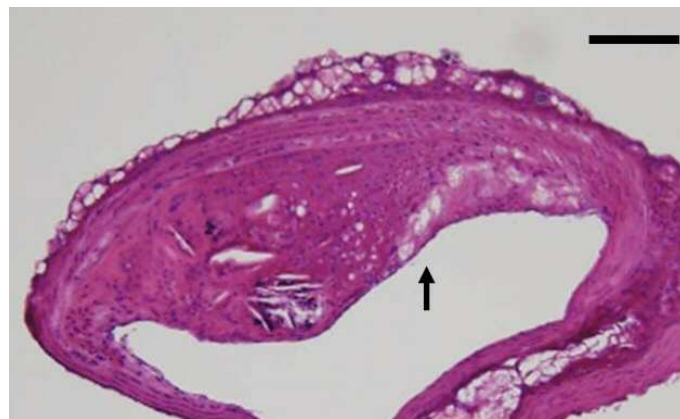
도면3a



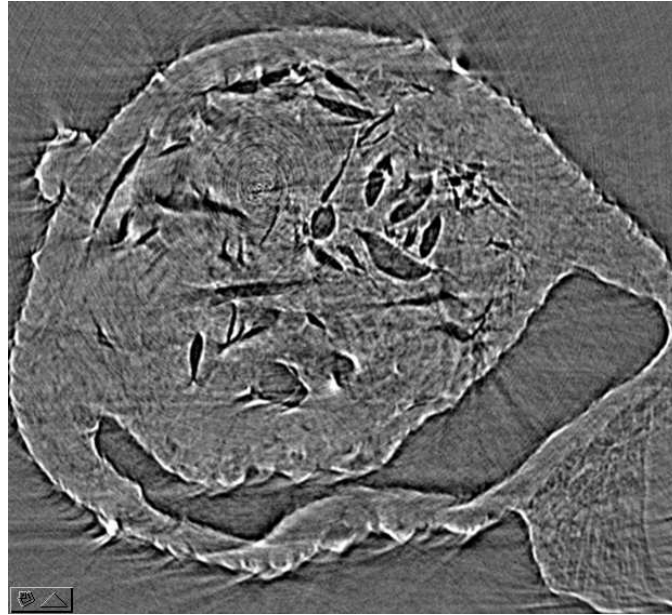
도면3b



도면4a



도면4b



도면5

