(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0043251
(43) 공개일자 2020년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61B 5/00 (2006.01) *G02B 21/00* (2006.01)
G02B 21/06 (2006.01) *G02B 21/24* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61B 5/0068 (2013.01)
A61B 5/0071 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0155498
(22) 출원일자 2018년12월05일
심사청구일자 2018년12월05일
(30) 우선권주장
1020180123869 2018년10월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
김필한
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
공은지
대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동)
안진효
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(74) 대리인
유미특허법인

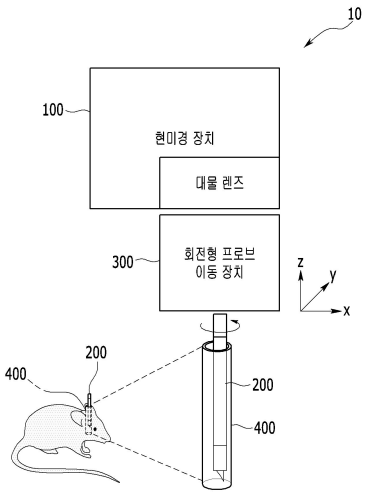
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **생체 심부 조직의 미세 영상 획득 시스템 및 이의 미세 영상 제공 방법**

(57) 요 약

미세 영상 획득 시스템은, 복수 파장들의 빛을 주사(scanning)하여 대물 렌즈로 전달하고, 생체 조직에서 반사되어 대물 렌즈로 들어온 형광 신호를 검출하는 현미경 장치, 그리고 생체에 이식된 유리관에 삽입되어 상기 대물 렌즈에서 입사된 빛을 아랫단의 측면 개구부로 전달하고, 형광 물질 표지된 상기 생체 조직에서 발광된 형광 신호를 상기 대물 렌즈로 전달하는 렌즈로 구성된 내시프로브, 상기 내시프로브를 고정하고, 고정된 상기 내시프로브를 회전 또는 수직 이동시키는 회전형 프로브 이동 장치를 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G02B 21/0004 (2013.01)
G02B 21/06 (2013.01)
G02B 21/24 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2017R1E1A1A01074190
부처명 과학기술정통부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업
연구과제명 인간질환 병태생리 분석 및 진단을 위한 초고속 레이저주사 생체현미경 니들프로브 기반 생체조직 초심부 미세 영상 기술
기 여 율 34/100
주관기관 한국과학기술원
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI15C0399030017
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 서울대학교병원
연구사업명 질환극복기술개발사업
연구과제명 생체 내 현미경기술 기반 폐동맥 고혈압 병태생리의 세포수준 영상분석법 개발(2017)
기 여 율 33/100
주관기관 한국과학기술원
연구기간 2017.09.07 ~ 2018.09.06
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2017M3A9E4047243
부처명 과학기술정통부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발사업
연구과제명 치아줄기세포와 3D 프린팅 기반 바이오치아 생성기술 개발
기 여 율 33/100
주관기관 대구경북과학기술원
연구기간 2018.03.01 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

미세 영상 획득 시스템으로서,

복수 파장들의 빛을 주사(scanning)하여 대물 렌즈로 전달하고, 생체 조직에서 반사되어 대물 렌즈로 들어온 형광 신호를 검출하는 현미경 장치,

생체에 이식된 유리관에 삽입되어 상기 대물 렌즈에서 입사된 빛을 아랫단의 측면 개구부로 전달하고, 형광 물질 표지된 상기 생체 조직에서 발광된 형광 신호를 상기 대물 렌즈로 전달하는 렌즈로 구성된 내시프로브, 그리고

상기 내시프로브를 고정하고, 고정된 상기 내시프로브를 회전 또는 수직 이동시키는 회전형 프로브 이동 장치

를 포함하는 미세 영상 획득 시스템.

청구항 2

제1항에서,

상기 내시프로브는

상기 대물 렌즈를 투과한 빛을 전달하는 굴절률 분포형 렌즈(gradient index lens, GRIN lens), 그리고 상기 굴절률 분포형 렌즈로부터 전달된 빛을 측면으로 조사하는 마이크로프리즘을 포함하는, 미세 영상 획득 시스템.

청구항 3

제1항에서,

상기 내시프로브는

커플링 렌즈(coupling lens), 릴레이 렌즈(relay lens), 그리고 이미징 렌즈(imaging lens)로 구성되는 미세 영상 획득 시스템.

청구항 4

제1항에서,

상기 회전형 프로브 이동 장치는

상기 내시프로브를 고정하는 프로브 홀더,

상기 프로브 홀더를 끼우고 회전시키는 회전 틀, 그리고

상기 회전 틀을 수직 또는 수평 이동시키는 이동 스테이지

를 포함하는, 미세 영상 획득 시스템.

청구항 5

제4항에서,

상기 회전형 프로브 이동 장치는

상기 회전 틀을 움직여 상기 프로브 홀더에 고정된 상기 내시프로브를 회전시키고, 상기 이동 스테이지를 움직여 상기 내시프로브를 수직 방향으로 이동시키는, 미세 영상 획득 시스템.

청구항 6

제1항에서,

상기 유리관이 이식된 동물을 정위 고정(stereotactic system)하는 스테이지를 더 포함하고,

상기 유리관을 부착한 플레이트가 상기 스테이지에 고정되는, 미세 영상 획득 시스템.

청구항 7

제1항에서,

상기 유리관은 상기 플레이트에 고정되어 상기 동물에 이식되는, 미세 영상 획득 시스템.

청구항 8

제1항에서,

상기 유리관은 상기 내시프로브에서 조사된 빛의 굴절을 조절하는 특정 굴절률의 액체로 채워지는, 미세 영상 획득 시스템

청구항 9

제1항에서,

상기 현미경 장치는

상기 복수 파장들의 빛을 방출하는 레이저 광원들,

복수의 거울들을 이용하여 상기 레이저 광원들로부터 나오는 빛을 주사하는 스캐너,

상기 스캐너를 통과하여 나온 빛을 상기 내시프로브로 전달하는 상기 대물 렌즈,

상기 내시프로브로부터 들어온 형광 신호 중에서 공초점면에 설치된 핀홀들을 통과한 형광 신호를 파장별로 검출하는 광검출기들, 그리고

상기 광검출기들에서 출력된 신호들을 조합하여 영상을 생성하는 컴퓨팅 장치를 포함하는, 미세 영상 획득 시스템.

청구항 10

제1항에서,

상기 현미경 장치는

다광자 현미경(Multi-photon microscopy)을 포함하는, 미세 영상 획득 시스템.

청구항 11

제1항에서,

상기 컴퓨팅 장치는

상기 내시프로브가 회전하는 경우, 특정 깊이의 생체 조직에 표지된 형광 물질이 상기 레이저 광원들에 의해 여기되어 나타나는 형광 영상을 생성하는, 미세 영상 획득 시스템.

청구항 12

제9항에서,

상기 컴퓨팅 장치는

상기 내시프로브의 회전 및 수직 이동 위치를 기초로, 상기 생체 조직의 형광 영상을 입체적으로 생성하는, 미세 영상 획득 시스템.

청구항 13

미세 영상 획득 시스템의 미세 영상 획득 방법으로서,

현미경 장치의 복수 파장들의 빛을 내시프로브를 통해 생체 조직으로 조사하는 단계, 그리고

상기 생체 조직에서 발광된 형광 신호를 이용하여, 상기 생체 조직에 표지된 형광 물질이 다중 파장 레이저에 의해 여기되어 나타나는 형광 영상을 생성하는 단계를 포함하고,

상기 복수 파장들의 빛은 상기 현미경 장치의 대물 렌즈에서 상기 내시프로브의 렌즈로 전달되어 상기 내시프로브의 측면 개부구 주변의 생체 조직에 조사되고, 상기 형광 신호는 상기 내시프로브의 렌즈에서 상기 대물 렌즈로 전달되며,

상기 내시프로브는 생체 조직에 이식된 유리관에 삽입되어 회전 및 수직 이동하는, 미세 영상 획득 방법.

청구항 14

제13항에서,

상기 형광 영상을 생성하는 단계는

상기 내시프로브의 회전 및 수직 이동 위치를 기초로, 상기 생체 조직의 형광 영상을 입체적으로 생성하는, 미세 영상 획득 방법.

청구항 15

제13항에서,

상기 현미경 장치는 공초점 현미경 또는 다광자 현미경을 포함하는, 미세 영상 획득 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바이오 이미징 기술에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 형광 신호를 이용한 내시현미경(Endomicroscopy)은 생체 심부 조직에서 일어나는 세포 및 분자 수준의 현상을 관찰하기 위해 개발되었다. 하지만, 뇌 혹은 소장의 조직은 미세 구조별 특수 기능을 수행하는 동시에 유기적으로 연결되어 있고, 다른 조직들에 비해 넓고 깊은 영역에 걸쳐 분포되어 있어, 이전 광학 영상 기술로 뇌 조직 등을 영상화하는 데에 한계가 있다. 이러한 한계를 극복하기 위해, 광학 프로브를 생체 내로 삽입하여 심부 조직의 전면(front view) 또는 측면(side view)을 영상화하는 형광 내시현미경이 연구되었다.

[0003] 하지만 광학 프로브를 동일 지점에 반복적으로 삽입하면 조직이 파괴되는 문제가 있다. 따라서, 기존 형광 내시현미경으로, 살아있는 생체의 심부 조직을 세포 수준에서 입체적이고 반복적으로 영상화하기 어렵다.

[0004] 이러한 한계에도 불구하고, 생체 심부 조직에서 일어나는 현상을 정확히 관찰하기 위해서, 살아있는 동물의 생리적 특성 및 행동 특성이 유지된 상태에서 미세 영상을 획득하는 것이 필요하다. 또한, 시간에 따른 조직 변화를 관찰하기 위해 심부 조직의 세포 수준 고해상도 영상화를 반복적으로 수행하는 것이 필요하다. 이러한 생체 내 미세영상(in vivo microscopic imaging) 연구를 위한 새로운 기술이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 해결하고자 하는 과제는 생체 심부 조직의 미세 영상을 입체적이고 반복적으로 획득하는 미세 영상 시스템을 제공하는 것이고, 특히, 살아있는 동물에 유리관(wall glass capillary)을 이식하고, 유리관에 삽입되어 수직 이동 및 회전하는 내시프로브(endoscope probe)를 이용하는 것이다.

[0006] 해결하고자 하는 과제는 살아있는 동물에 이식된 유리관에 내시프로브가 삽입되면, 현미경 장치에 결합된 내시프로브가 수직 이동 및 회전하면서 다중 파장의 빛을 조사하고, 현미경 장치가 조직 심부에서 발광된 형광 신호를 획득하여 미세 영상화하는 미세 영상 시스템을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 한 실시예에 따른 미세 영상 획득 시스템으로서, 복수 파장들의 빛을 주사(scanning)하여 대물 렌즈로

전달하고, 생체 조직에서 반사되어 대물 렌즈로 들어온 형광 신호를 검출하는 현미경 장치, 생체에 이식된 유리관에 삽입되어 상기 대물 렌즈에서 입사된 빛을 아랫단의 측면 개구부로 전달하고, 형광 물질 표지된 상기 생체 조직에서 발광된 형광 신호를 상기 대물 렌즈로 전달하는 렌즈로 구성된 내시프로브, 그리고 상기 내시프로브를 고정하고, 고정된 상기 내시프로브를 회전 또는 수직 이동시키는 회전형 프로브 이동 장치를 포함한다.

[0008] 상기 내시프로브는 상기 대물 렌즈를 투과한 빛을 전달하는 굴절률 분포형 렌즈(gradient index lens, GRIN lens), 그리고 상기 굴절률 분포형 렌즈로부터 전달된 빛을 측면으로 조사하는 마이크로프리즘을 포함할 수 있다.

[0009] 상기 내시프로브는 커플링 렌즈(coupling lens), 릴레이 렌즈(relay lens), 그리고 이미징 렌즈(imaging lens)로 구성될 수 있다.,

[0010] 상기 회전형 프로브 이동 장치는 상기 내시프로브를 고정하는 프로브 홀더, 상기 프로브 홀더를 끼우고 회전시키는 회전 틀, 그리고 상기 회전 틀을 수직 또는 수평 이동시키는 이동 스테이지를 포함할 수 있다.

[0011] 상기 회전형 프로브 이동 장치는 상기 회전 틀을 움직여 상기 프로브 홀더에 고정된 상기 내시프로브를 회전시키고, 상기 이동 스테이지를 움직여 상기 내시프로브를 수직 방향으로 이동시킬 수 있다.

[0012] 상기 미세 영상 획득 시스템은 상기 유리관이 이식된 동물을 정위 고정(stereotactic system)하는 스테이지를 더 포함할 수 있다. 상기 유리관을 부착한 플레이트가 상기 스테이지에 고정될 수 있다.

[0013] 상기 유리관은 상기 플레이트에 고정되어 상기 동물에 이식될 수 있다.

[0014] 상기 유리관은 상기 내시프로브에서 조사된 빛의 굴절을 조절하는 특정 굴절률의 액체로 채워질 수 있다.

[0015] 상기 현미경 장치는 상기 복수 파장들의 빛을 방출하는 레이저 광원들, 복수의 거울들을 이용하여 상기 레이저 광원들로부터 나오는 빛을 주사하는 스캐너, 상기 스캐너를 통과하여 나온 빛을 상기 내시프로브로 전달하는 상기 대물 렌즈, 상기 내시프로브로부터 들어온 형광 신호 중에서 공초점면에 설치된 핀홀들을 통과한 형광 신호를 파장별로 검출하는 광검출기들, 그리고 상기 광검출기들에서 출력된 신호들을 조합하여 영상을 생성하는 컴퓨팅 장치를 포함할 수 있다.

[0016] 상기 현미경 장치는 다광자 현미경(Multi-photon microscopy)을 포함할 수 있다.

[0017] 상기 컴퓨팅 장치는 상기 내시프로브가 회전하는 경우, 특정 깊이의 생체 조직에 표지된 형광 물질이 상기 레이저 광원들에 의해 여기되어 나타나는 형광 영상을 생성할 수 있다.

[0018] 상기 컴퓨팅 장치는 상기 내시프로브의 회전 및 수직 이동 위치를 기초로, 상기 생체 조직의 형광 영상을 입체적으로 생성할 수 있다.

[0019] 한 실시예에 따른 미세 영상 획득 시스템의 미세 영상 획득 방법으로서, 현미경 장치의 복수 파장들의 빛을 내시프로브를 통해 생체 조직으로 조사하는 단계, 그리고 상기 생체 조직에서 발광된 형광 신호를 이용하여, 상기 생체 조직에 표지된 형광 물질이 다중 파장 레이저에 의해 여기되어 나타나는 형광 영상을 생성하는 단계를 포함한다. 상기 복수 파장들의 빛은 상기 현미경 장치의 대물 렌즈에서 상기 내시프로브의 렌즈로 전달되어 상기 내시프로브의 측면 개부구 주변의 생체 조직에 조사된다. 상기 형광 신호는 상기 내시프로브의 렌즈에서 상기 대물 렌즈로 전달된다. 상기 내시프로브는 생체 조직에 이식된 유리관에 삽입되어 회전 및 수직 이동할 수 있다.

[0020] 상기 형광 영상을 생성하는 단계는 상기 내시프로브의 회전 및 수직 이동 위치를 기초로, 상기 생체 조직의 형광 영상을 입체적으로 생성할 수 있다.

[0021] 상기 현미경 장치는 공초점 현미경 또는 다광자 현미경을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0022] 실시예에 따르면 살아있는 동물 조직을 형광 영상화하므로, 생리적 특성 및 행동 특성이 유지된 생체 조직에서 일어나는 현상을 실시간으로 정확히 관찰할 수 있다.

[0023] 실시예에 따르면 동일한 생체 심부 조직의 미세 영상을 반복적으로 획득할 수 있으므로, 시간에 따른 생체 조직 변화를 장기적이고 반복적으로 관찰할 수 있다.

[0024] 실시예에 따르면 내시프로브가 수직 이동 및 회전하므로, 대면적의 확장된 영상을 획득할 수 있고, 2차원뿐만

아니라 3차원의 입체적 영상을 획득할 수 있다.

[0025] 실시예에 따르면 기존 형광 내시현미경으로 접근할 수 없는 심부 조직으로도 안정적으로 장기간에 걸쳐 반복적으로 접근할 수 있다. 따라서, 실시예에 따르면 뇌 조직을 포함한 다양한 심부 조직에서 발생하는 다양한 질병 혹은 생물학적 현상들을 보다 정밀하게 장기간에 걸쳐 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 한 실시예에 따른 미세 영상 획득 시스템의 구성도이다.

도 2는 한 실시예에 따른 내시프로브의 예시이다.

도 3은 한 실시예에 따른 회전형 프로브 이동 장치의 예시이다.

도 4는 한 실시예에 따른 공초점 현미경 장치의 예시이다.

도 5는 한 실시예에 따른 생체 내 유리관 이식을 위한 두개골 부착형 플레이트를 설명하는 도면이다.

도 6은 한 실시예에 따른 미세 영상 획득 시스템의 스테이지에 마우스가 고정된 모습을 설명하는 도면이다.

도 7은 한 실시예에 따른 미세 영상 획득 시스템으로 획득한 마우스의 뇌조직 영상의 예시이다.

도 8은 한 실시예에 따라 획득한 대면적 형광 영상의 예시이다.

도 9는 한 실시예에 따른 미세 영상 획득 방법의 흐름도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 아래에서는 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 실시예에 대하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0028] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 또한, 명세서에 기재된 "…부", "…기", "모듈" 등의 용어는 적어도 하나의 기능이나 동작을 처리하는 단위를 의미하며, 이는 하드웨어나 소프트웨어 또는 하드웨어 및 소프트웨어의 결합으로 구현될 수 있다.

[0029] 도 1은 한 실시예에 따른 미세 영상 획득 시스템의 구성도이고, 도 2는 한 실시예에 따른 내시프로브의 예시이며, 도 3은 한 실시예에 따른 회전형 프로브 이동 장치의 예시이다.

[0030] 도 1을 참고하면, 미세 영상 획득 시스템(10)은 현미경 장치(microscope apparatus)(100), 일정 길이의 내시프로브(endoscope probe)(200), 현미경 장치(100)의 대물 렌즈에서 입사된 빛이 내시프로브(200)로 전달되도록 내시프로브(200)를 고정하고 내시프로브(200)를 수직 이동 또는 회전시키는 회전형 프로브 이동 장치(300)를 포함한다.

[0031] 살아있는 동물의 조직에 유리관(wall glass capillary)(400)이 이식된다. 유리관(400)이 삽입된 동물은 정위 고정(stereotactic system)이 가능한 모터 스테이지(motorized stage)에 고정된다. 이후, 회전형 프로브 이동 장치(300)에 고정된 내시프로브(200)가 살아있는 동물의 조직에 이식된 유리관(400)에 삽입된다. 유리관(400)에 삽입된 내시프로브(200)는 회전형 프로브 이동 장치(300)에 의해 수직 이동 및 회전하면서 조직 심부로 빛을 조사하고, 형광 물질 표지된 조직 심부에서 발광된 빛(형광 신호)을 현미경 장치(100)로 전달한다.

[0032] 현미경 장치(100)의 대물 렌즈와 내시프로브(200)의 위치 관계, 그리고 내시프로브(200)와 유리관(400)의 위치 관계는 정밀한 조정이 가능하도록 설계된다.

[0033] 현미경 장치(100)는 다양한 종류의 현미경일 수 있고, 예를 들면, 공초점 현미경(confocal microscopy)나 다광자 현미경(Multi-photon microscopy)을 이용할 수 있다. 현미경 장치(100)는 레이저 주사(laser scanning) 방식으로 형광 물질을 발광시키고, 내시프로브(200)로부터 전달된 빛을 검출하여 2차원 또는 3차원 영상을 생성한다.

[0034] 내시프로브(200)는 유리관(400) 벽 방향으로 빛을 조사하는 측면 내시경(side-view endoscope)으로서, 현미경

장치(100) 대물렌즈를 통해 들어온 빛을 생체 조직 내부의 촬영 부위로 전달하고, 생체 조직 내부로부터 반사된 빛을 다시 대물렌즈로 전달한다. 내시프로브(200)의 모양은 다양할 수 있으나, 본 발명에서는 유리관(400)에 삽입이 가능하면서 굴절률 분포형 렌즈(gradient index lens, GRIN lens)를 포함할 수 있는 막대나 니들 모양일 수 있다.

[0035] 내시프로브(200)는 동물의 조직에 이식된 유리관(400)에 삽입되므로, 미세 영상 획득 시스템(10)은 조직 손상 없이 생체 심부 조직의 미세 영상을 반복적으로 생성할 수 있다.

[0036] 내시프로브(200)의 윗단은 회전형 프로브 이동 장치(300)에 결합하고, 대물 렌즈에서 입사된 빛을 아랫단의 측면 개구부로 전달하는 렌즈 구조를 포함한다.

[0037] 도 2를 참고하면, 내시프로브(200)는 측면 영상화를 위해 아랫단에 마이크로프리즘(microprism)이 부착된 GRIN 렌즈로 제작될 수 있다. GRIN 렌즈의 광학적 조건은 저침습(minimal invasive)을 포함한 생체 미세조직 관찰에 적합한 조건들을 고려하여 최적화된다. 광학적 조건은 GRIN 렌즈 직경(예를 들면, 1mm), 길이(예를 들면, 28.5mm), 작동거리, 그리고 부착된 마이크로프리즘의 크기(예를 들며, 0.7x0.7x0.7mm^3) 등을 포함한다. 내시프로브(200)의 내부는 커플링 렌즈(coupling lens)(210), 릴레이 렌즈(relay lens)(220), 이미징 렌즈(imaging lens)(230)로 구성된 트리플렛(triplet) 렌즈 구조일 수 있다. 커플링 렌즈(210)와 이미징 렌즈(230)의 NA(Numerical Aperture)는 0.45 내지 0.55이고, 중계렌즈(220)의 NA는 0.15 내지 0.25일수 있다. 예를 들면, 렌즈 직경이 1mm인 GRIN 렌즈로서, 커플링 렌즈(210)와 이미징 렌즈(230)의 NA는 0.5이고, 중계렌즈(220)의 NA는 0.2일 수 있다.

[0038] 회전형 프로브 이동 장치(300)는 내시프로브(200)를 회전할 뿐만 아니라, 내시프로브(200)의 좌우상하 움직임을 정밀 조정할 수 있는 구조로서, 결합된 내시프로브(200)와 현미경 장치(100) 대물렌즈와의 위치 관계에 중요한 평면(X축 및 Y축) 이동, Z축 방향의 수직 이동을 제어한다.

[0039] 도 3을 참고하면, 회전형 프로브 이동 장치(300)는 내시프로브(200)를 고정하는 프로브 홀더(310), 프로브 홀더(310)를 정밀 회전시키는 회전 틀(rotation mount)(330), 회전 틀(330)을 X축, Y축, Z축 정밀 이동시키는 이동 스테이지(translation stage)(350)를 포함할 수 있다. 회전형 프로브 이동 장치(300)는 회전, 3축 이동(수직 및 수평 이동)을 제어하는 부재들의 조합으로 구현될 수 있고, 세부 구성은 다양하게 설계될 수 있다.

[0040] 유리관(400)은 GRIN 렌즈를 통해 생체 조직으로 전달될 수 있는 광원의 작동거리(400um)를 고려하여 제작된다. 유리관(400)은 예를 들면, 내경 1.04mm 그리고 외경 1.2mm의 매우 얇은 유리관일 수 있다. 유리관(400)은 정밀한 축 조정을 위하여 두개골 부착에 적합하도록 고안된 플레이트에 고정된 상태로 동물에 이식될 수 있다. 유리관(400) 하단은 막혀있고, 상단은 내시프로브(200)가 삽입되도록 뚫려있다. 유리관(400)의 내벽은 내시프로브(200)가 매끄럽게 이동 및 회전할 수 있도록 표면 처리될 수 있다. 유리관(400)의 내부는 내시프로브(200)으로부터의 빛의 굴절을 고려하여 특정 굴절률을 갖는 액체로 채워질 수 있다.

[0041] 도 4는 한 실시예에 따른 공초점 현미경 장치의 예시이다.

[0042] 도 4를 참고하면, 공초점 현미경이 현미경 장치(100)에 이용될 수 있다.

[0043] 공초점 현미경 장치(100a)는 복수 파장들의 빛을 방출하는 레이저 광원들(110a, 110b, 110c, 110d), 복수의 거울들을 이용하여 레이저 광원들로부터 나오는 빛을 X-Y 방향으로 주사하는 스캐너(130), 스캐너(130)를 통과하여 나온 빛을 형광 물질 표지된 타겟 조직으로 입사하는 대물렌즈(150), 핀홀을 통해 대물 렌즈 초점에서 반사된 형광 신호를 파장별로 검출하는 광검출기들(170a, 170b, 170c, 170d), 그리고 광검출기들에서 검출된 신호들을 조합하여 영상을 생성하는 컴퓨팅 장치(190)를 포함한다.

[0044] 레이저 광원들(110a, 110b, 110c, 110d) 각각은 가시광선 대역의 네 개의 레이저 광원들로 구성되고, 예를 들면 405nm, 488nm, 561nm, 640nm의 파장의 레이저 광원일 수 있다. 여기 광원으로 사용되는 레이저 광원의 개수와 파장은 다양하게 변경될 수 있다.

[0045] 레이저 광원들(110a, 110b, 110c, 110d) 각각에서 방출된 빛들은 빔통과필터(Beam Pass Filter, BPF), 회색필터(Neutral Density filter, NDF), 파장에 따라 빔을 분리하는 빔스플리터(Beam Splitter)를 거쳐, 스캐너(130)로 전달되도록 광 경로가 설계될 수 있다. 광 경로를 변경하기 위해 거울(Mirror, M)이 사용될 수 있다. 빔스플리터는 Dichroic 빔스플리터(Dichroic Beam Splitter, DBS)일 수 있다.

[0046] 스캐너(130)는 회전 다각 거울(Polygonal Rotation Mirror)(131), 그리고 갈바노미터 거울(galvanometer

mirror)(133)을 포함할 수 있다. 회전 다각 거울(131)은 X축을 스캐닝하고, 갈바노미터 거울은 Y축을 스캐닝하여 X-Y 래스터(Raster) 스캔 패턴을 생성할 수 있다. 스캐너(130)는 레이저 스캐닝 패턴에 따라 대물렌즈(150)의 초점 위치를 빠르게 이동시킨다.

[0047] 대물렌즈(150)는 스캐너(130)를 통과하여 나온 빛을 형광 물질 표지된 타겟 조직으로 입사한다. 형광 물질 표지된 조직 심부에서 발광된 빛(형광 신호)은 내시프로브(200)를 거쳐 대물렌즈(150)로 들어오고, 스캐너(130)로 전달된다. 대물렌즈(150)는 250×250um^2의 시야를 가지는 40배 대물렌즈로 설정될 수 있으나, 적절한 배율의 렌즈를 설정하여 다양한 시야를 갖도록 설정될 수 있다.

[0048] 형광 신호는 스캐너(130)에서 광검출기들(170a, 170b, 170c, 170d)로 전달된다. 광검출기들(170a, 170b, 170c, 170d)은 파장마다 별도로 설치된 광전자 증배관들(photomultiplier tubes, PMTs)일 수 있고, 각 파장의 형광 신호는 공초점면(confocal plane)에 설치된 핀홀들(173a, 173b, 173c, 173d)을 통과하여 광전자 증배관들로 전달된다. 핀홀은 공초점면에 설치된 미세 구멍 또는 슬릿일 수 있다. 스캐너(130)로부터 전달된 형광 신호는 Dichroic 빔스플리터들(DBSs)을 통해 파장별로 분리될 수 있다. 광검출기들(170a, 170b, 170c, 170d) 각각은 입력된 형광 신호를 전기 신호로 변환하여 컴퓨팅 장치(190)로 전달한다.

[0049] 컴퓨팅 장치(190)는 광검출기들(170a, 170b, 170c, 170d)로부터 수신한 전기 신호를 레이저 스캐닝 패턴에 따라 조합하여 세포 및 분자 수준의 미세 영상을 생성한다. 컴퓨팅 장치(190)는 프레임 그래버(Frame Grabber)를 포함할 수 있다. 예를 들면, 컴퓨팅 장치(190)는 Z축 구획화가 가능한 세포 수준 해상도의 2차원 영상을 초당 30 프레임의 속도로 획득할 수 있다.

[0050] 특히, 내시프로브(200)의 Z축 이동 또는 회전 이동에 따라 실시간으로 광검출기들(170a, 170b, 170c, 170d)로부터 신호들이 전달되면, 컴퓨팅 장치(190)는 살아있는 동물의 심부 조직에서의 나타나는 형광 현상을 세포 및 분자 수준으로 실시간 영상화할 수 있다.

[0051] 도 5는 한 실시예에 따른 생체 내 유리관 이식을 위한 두개골 부착형 플레이트를 설명하는 도면이다.

[0052] 도 5의 (a)를 참고하면, 유리관(400)은 플레이트(500)에 부착된 상태로 동물에 이식될 수 있다. 또는 이식된 유리관(400)은 플레이트(500)에 부착될 수 있다.

[0053] 플레이트(500)는 현미경 장치(100)에 결합된 내시프로브(200)와의 정밀한 축 조정을 위하여, 적어도 하나의 유리관이 삽입되는 홀 위치가 결정된다. 또한, 플레이트(500)가 모터 스테이지(motorized stage)에 고정되어 유리관(400)이 부착된 동물을 정위 고정할 수 있다. 플레이트(500) 덕분에, 내시프로브(200)와 유리관(400)이 기계적 정렬되어, 내시프로브(200)가 정확하고 안정적이고 반복적으로 유리관(400)에 삽입될 수 있다.

[0054] 살아있는 동물에 유리관 이식 시 출혈에 의한 모세관 현상이 일어날 수 있으므로, 유리관 삽입술은 광학접착제로 유리관 하단을 막은 후 생체 조직 내 유리관 삽입을 할 수 있다. 특히, 본 발명은 플레이트(500)에 부착된 유리관(400)을 뇌 조직에 삽입하는 수술법을 통해, 생리적, 행동적 특성이 유지되는 생체 조직의 미세 영상을 획득할 수 있다.

[0055] 플레이트 모양은 유리관이 삽입되는 위치 및 유리관의 크기와 길이, 유리관이 삽입되는 동물의 크기 및 부위, 플레이트가 고정되는 스테이지의 구조에 따라 다양하게 변경될 수 있다.

[0056] 도 5의 (b)를 참고하면, 마우스의 뇌 조직에 삽입되는 유리관을 고정하는 두개골 부착형 플레이트(500)는 예를 들면, 유리관 삽입 플레이트(510), 유리관 삽입 플레이트(510) 양단에 연결된 스테이지 고정 플레이트들(530, 550)로 구성될 수 있다. 유리관 삽입 플레이트(510)는 유리관이 삽입되는 적어도 하나의 홀이 있다.

[0057] 도 5의 (c)를 참고하면, 유리관 삽입 플레이트(510)의 홀을 통해 유리관이 부착 및 고정된다.

[0058] 도 6은 한 실시예에 따른 미세 영상 획득 시스템의 스테이지에 마우스가 고정된 모습을 설명하는 도면이고, 도 7은 한 실시예에 따른 미세 영상 획득 시스템으로 획득한 마우스의 뇌조직 영상의 예시이다.

[0059] 도 6의 (a)를 참고하면, 유리관 삽입술로 두개골 부착형 플레이트(500)가 부착된 마우스가 미세 영상 획득 시스템의 스테이지(600)에 놓이고, 두개골 부착형 플레이트(500)가 스테이지(600)에 정위 고정된다. 이후, 회전형 프로브 이동 장치(300)에 결합된 내시프로브(200)가 수직 이동 및 회전하고, 대물 렌즈(150)에서 투과된 빛이 내시프로브(200)로 전달되어 유리관 내 심부 조직으로 빛이 조사된다.

[0060] 실제로, 도 6의 (b)와 같이, 미세 영상 획득 시스템의 스테이지에 마우스가 고정될 수 있다.

[0061] 영상 획들을 위해 DyLight 594 형광이 결합된 Lectin 항체를 실험 전 1시간 전에 CX3CR1-GFP 마우스에 주입한다. 그러면 혈관(blood vessel)이 염색되고, 뇌 조직의 microglia 세포가 녹색 형광을 발현하여 도 7과 같은 형광 영상이 획득된다. 내시프로브(200)의 수직 이동 및 회전운동, 그리고 모터 스테이지(600)의 수직 이동이 동시에 진행되면서 다중 파장의 빛을 조사하므로, 도 7과 같이 확장된 영역에서 고해상도 세포 수준 영상을 획득할 수 있다.

[0062] 영상 획득 후 조직 적출 및 고정을 통하여 뇌 조직 내 삽입 좌표 및 깊이를 재검증할 수 있다.

[0063] 도 8은 한 실시예에 따라 획득한 대면적 형광 영상의 예시이다.

[0064] 도 8을 참고하면, 얇은 유리관을 따라 내시프로브(200)를 안정적이고 반복적으로 삽입할 수 있는 미세 영상 획득 시스템(10)에, FITC 형광물질이 도포된 렌즈 티슈 샘플을 적용한 결과, 내시프로브(200)의 수직 이동 및 회전에 의해 대면적 형광 영상을 얻을 수 있다

[0065] 도 9는 한 실시예에 따른 미세 영상 획득 방법의 흐름도이다.

[0066] 도 9를 참고하면, 미세 영상 획득 시스템(10)은 현미경 장치(100)의 복수 파장들의 빛을 내시프로브(200)를 통해 생체 조직으로 조사한다(S110). 현미경 장치(100)의 대물렌즈를 통과한 빛은 내시프로브(200)로 전달된다.

[0067] 미세 영상 획득 시스템(10)은 생체 조직에 이식된 유리관에 삽입되어 회전 및 수직 이동하면서 생체 조직에 빛을 조사하는 내시프로브(200)로부터, 생체 조직에서 발광된 형광 신호를 획득한다(S120).

[0068] 미세 영상 획득 시스템(10)은 내시프로브(200)부터 획득한 형광 신호를 파장별로 분리 및 검출한다(S130).

[0069] 미세 영상 획득 시스템(10)은 내시프로브(200)의 이동 위치에 따른 형광 신호 검출 위치를 고려하여, 내시프로브(200)부터 획득한 형광 신호를 2차원 또는 3차원 영상으로 생성한다(S140). 내시프로브(200)의 이동 위치는 내시프로브(200)의 회전 및 수직 이동에 의해 결정된다.

[0070] 이와 같이, 미세 영상 획득 시스템(10)은 동물 조직을 형광 영상화하므로, 생리적 특성 및 행동 특성이 유지된 생체 조직에서 일어나는 현상을 실시간으로 정확히 관찰할 수 있다.

[0071] 미세 영상 획득 시스템(10)은 동일한 생체 심부 조직의 미세 영상을 반복적으로 획득할 수 있으므로, 시간에 따른 생체 조직 변화를 장기적이고 반복적으로 관찰할 수 있다.

[0072] 미세 영상 획득 시스템(10)은 내시프로브가 수직 이동 및 회전하므로, 대면적의 확장된 영상을 획득할 수 있고, 2차원뿐만 아니라 3차원의 입체적 영상을 획득할 수 있다.

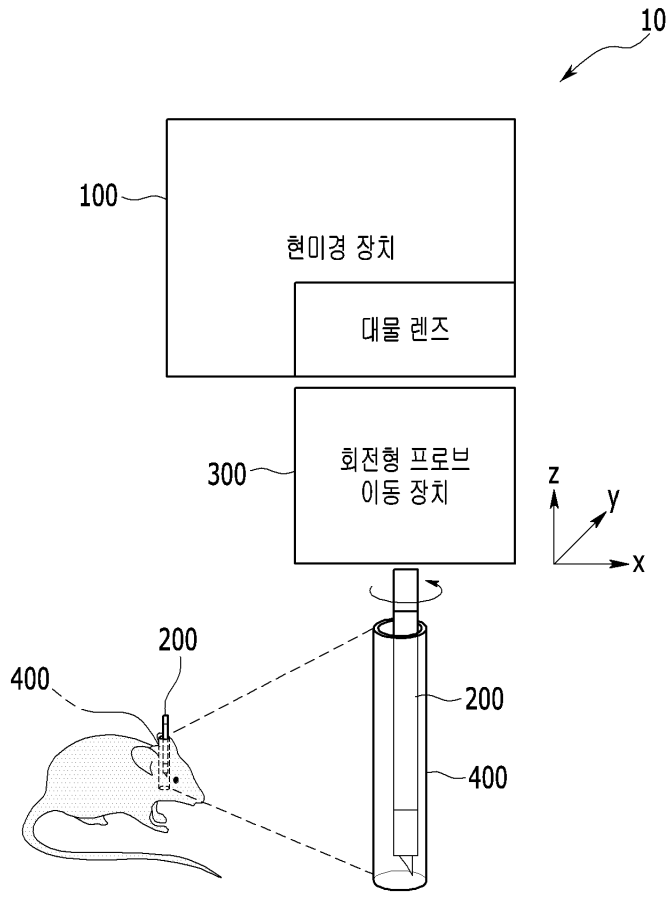
[0073] 미세 영상 획득 시스템(10)은 기존 형광 내시현미경으로 접근할 수 없는 심부 조직으로도 안정적으로 접근할 수 있다. 따라서, 미세 영상 획득 시스템(10)은 뇌 조직을 포함한 다양한 심부 조직에서 발생하는 다양한 질병 혹은 생물학적 현상들을 확인할 수 있다.

[0074] 이상에서 설명한 본 발명의 실시예는 장치 및 방법을 통해서만 구현이 되는 것은 아니며, 본 발명의 실시예의 구성에 대응하는 기능을 실현하는 프로그램 또는 그 프로그램이 기록된 기록 매체를 통해 구현될 수도 있다.

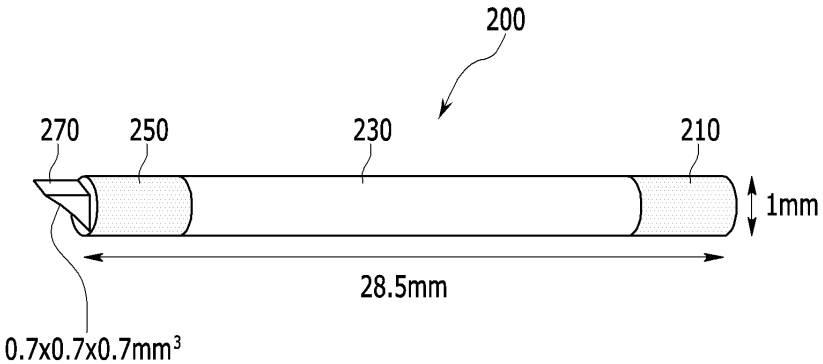
[0075] 이상에서 본 발명의 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

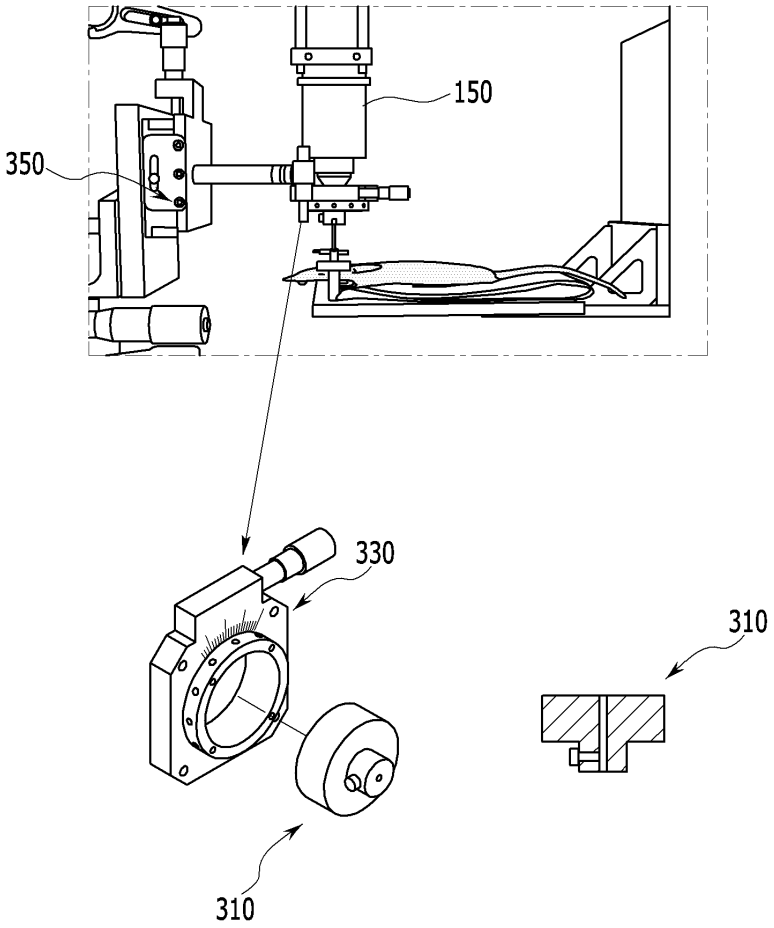
도면1


10
100
현미경 장치
대물 렌즈
300
회전형 프로브
이동 장치
z
y
x
200
400
200
400

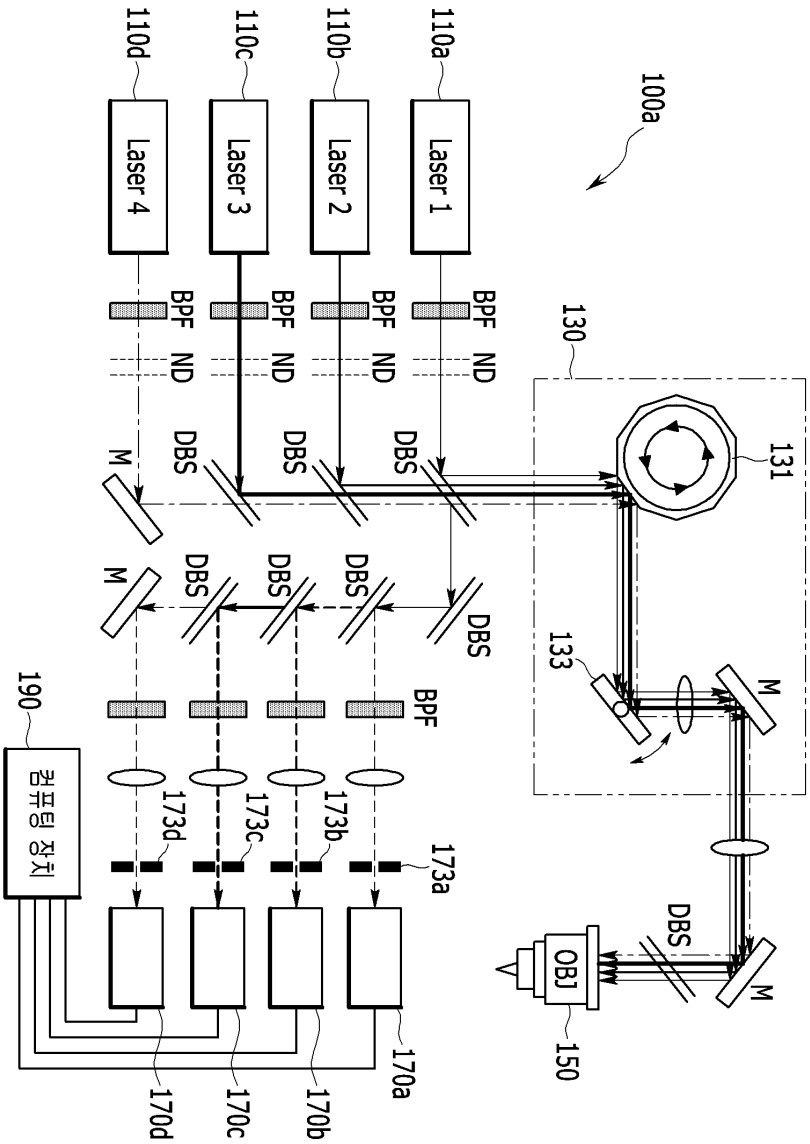
도면2


200
270
250
230
210
1mm
28.5mm
0.7x0.7x0.7mm3

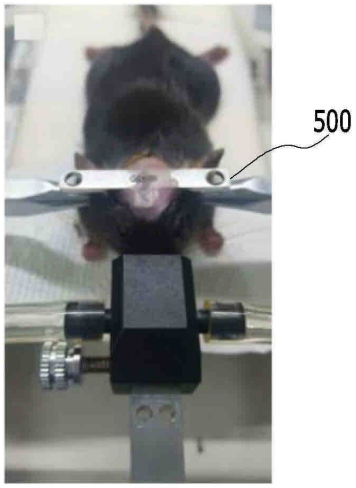
도면3



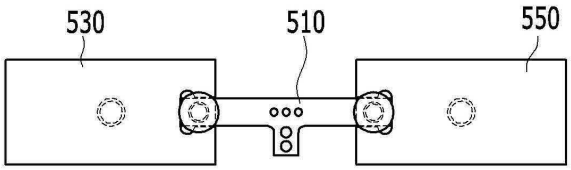
도면4


110d
110c
110b
110a
100a
Laser 4
Laser 3
Laser 2
Laser 1
BPF
ND
130
131
DBS
M
133
190
컴퓨팅 장치
173d
173c
173b
173a
OBJ
150
170d
170c
170b
170a

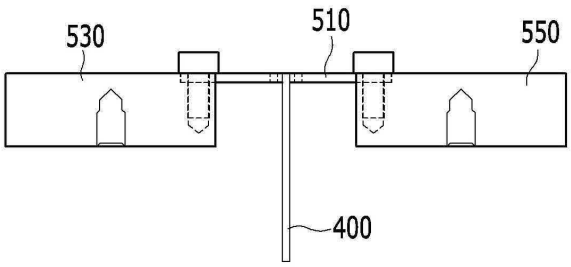
도면5



(a)

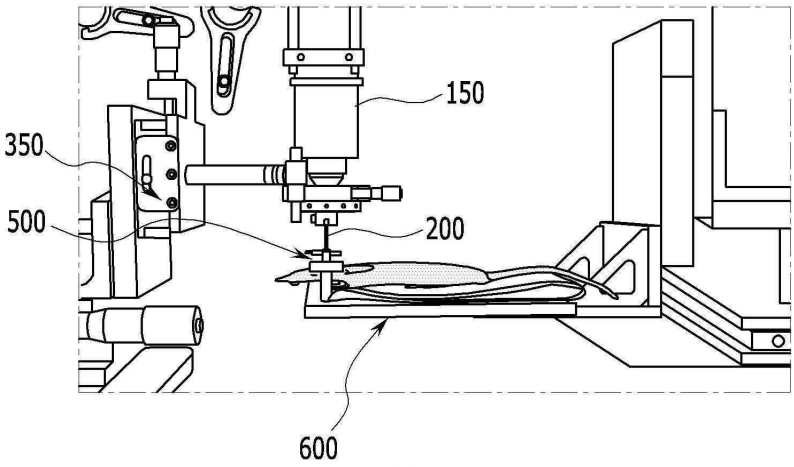


(b)

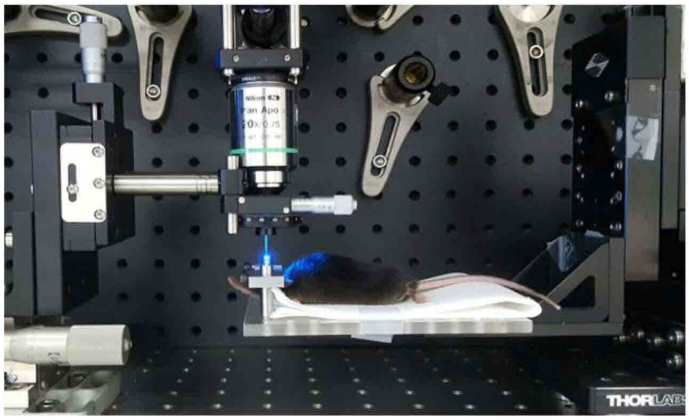


(c)

도면6

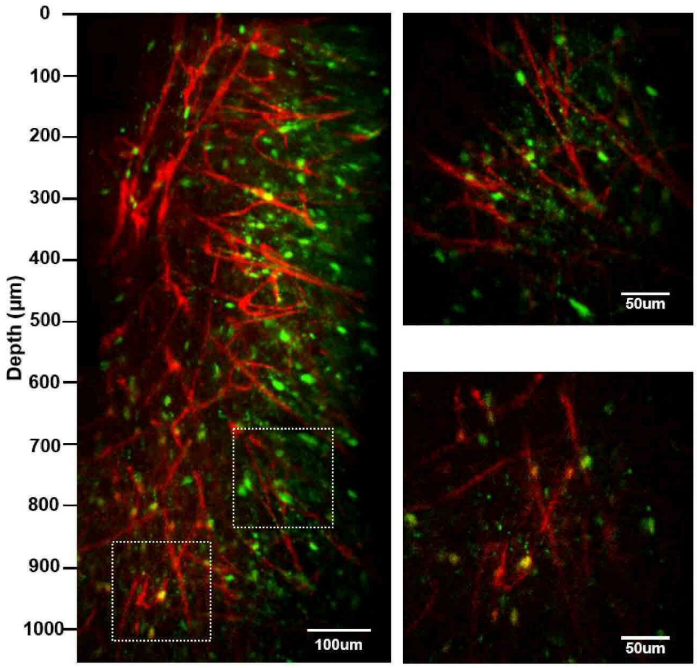


(a)

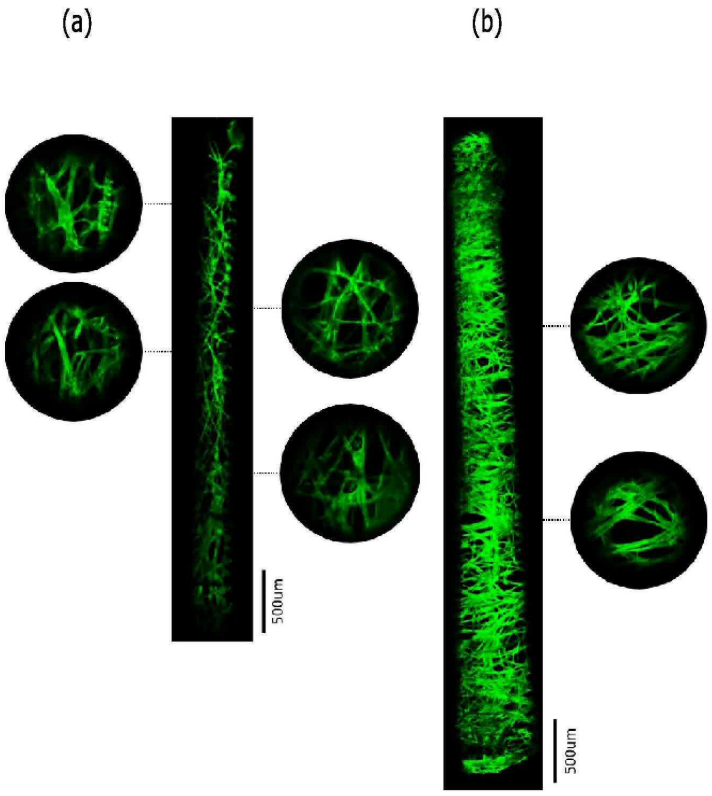


(b)

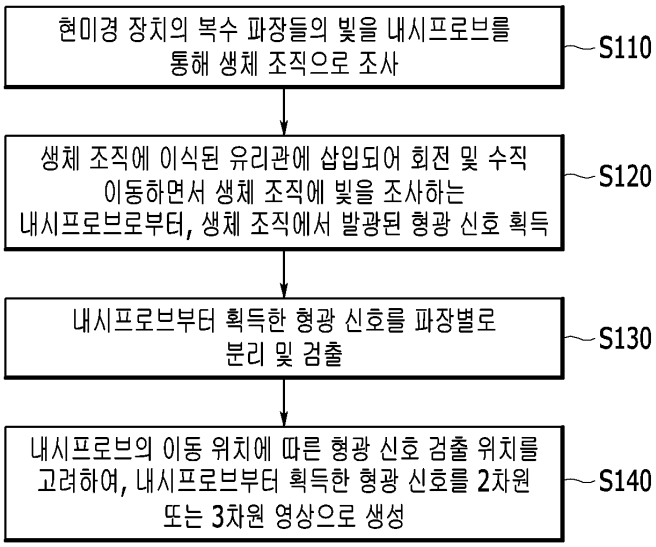
도면7


0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
Depth (μm)
100um
50um
50um

도면8


(a)
(b)
500um
500um

도면9


현미경 장치의 복수 파장들의 빛을 내시프로브를 통해 생체 조직으로 조사
S110
생체 조직에 이식된 유리관에 삽입되어 회전 및 수직 이동하면서 생체 조직에 빛을 조사하는 내시프로브로부터, 생체 조직에서 발광된 형광 신호 획득
S120
내시프로브부터 획득한 형광 신호를 파장별로 분리 및 검출
S130
내시프로브의 이동 위치에 따른 형광 신호 검출 위치를 고려하여, 내시프로브부터 획득한 형광 신호를 2차원 또는 3차원 영상으로 생성
S140