

나노 X-선 영상과 생명의학

윤권하

1. 서론

1895년 뢰트겐(Rontgen)에 의해 최초로 발견된 X-선은 투과력이 강하고, 파장이 짧은 전자기파로서 우리들이 항상 눈으로 보고 있는 가시광선 영역에서 카메라, 망원경, 현미경 등의 다양한 광학기계를 이용해 자연계의 영상을 만들고 기록할 수 있듯이 X-선을 이용하여 영상을 만들고 기록하여 저장할 수 있다. X-선을 이용한 영상장치는 우주, 천체에서 인체, 공업재료, 미생물, 세포, 결정표면, 물의 원자배열과 같은 초미세 구조의 세계까지 탐구할 수 있는 다양한 범위의 응용에 이용되고 있다.^{1,2} 최근 생체를 고해상도로 살아있는 상태에서 분자수준의 구조적인 변화와 함께 기능적인 관찰을 할 수 있는 바이오의료영상기술에 대한 개발 및 적용은 미래 의료기술의 핵심적인 분야로 인식되고 있다. 이러한 생체분자영상은 생명과학 및 의료분야 연구의 획기적인 도구를 제공함으로써 생명현상의 나노구조의 기능적 관찰뿐만 아니라 이를 이용한 신약개발, 염색체의 분화과정과 구조의 이상, 미생물연구, 토양 및 식물체 연구, 천연섬유와 단백질의 구조 그리고 기능탐구를 이용한 인공적 배합물의 생산 등에 이용할 수 있어서 생물학적인 응용에 대한 적용범위가 매우 클 것으로 예상되고 있다. 이러한 바이오영상기술에는 MRI, X-ray, US, CT, PET, 광학영상 등의 장치와 기술이 개발되고 있고, 세포와 분자를 표적하여 영상화하기 위한 다양한 나노입자를 개발하여 진단 및 치료와 약물전달 등에 이용하기 위한 광범위한 연구가 진행되고 있다.³

이러한 다양한 바이오영상기술 중에서 X-선을 이용한 영상기술은 X-선이 갖는 다양한 특징, 즉 짧은 파장으로 인한 고해상도 영상을 얻을 수 있고, 강한 투과력 때문에 내부물질의 비파괴적 검사가 가능하며, 물질을 구성하는 특색원소에 대한 영상과 분광정보를 동시에 얻을 수 있고, 물질의 밀도에 따른 흡수차 뿐만 아니라 위상차, 굴절, 회절 등에 의한 풍부한 영상대조도를 얻을 수 있는 등의 많은 장점을 가지고 있다. 이러한 장점에도 불구하고 X-선 영상이 많이 이용되지 못하고 있는 주된 이유는 나노급의 고해상도 영상을 얻을 수 있는 기반 기술의 미비, 방사선량에 의한 영향 등의 원인이 있다고 할 수 있다.⁴

나노 X-선 영상기기는 X-선원, 광학, 검출기, 나노메카트로닉스, 방사선조영제, 생물, 화학, 의학 등의 다양한 학문적 융합과 서로 다른 분야의 첨단 핵심기술을 필요로 한다. 특히, X-선 현미경과 마이크로 및 나노CT의 원리와 개념을 이해하기 위해서는 'X-선 광학'에 대한

지식이 필수적이며 이를 위한 기반기술로서의 X-선 광학소자는 다루어지는 파장이 매우 짧기 때문에 이를 위한 나노광학과 나노테크놀로지에 대한 이해가 필수적으로 요구된다. 또한, 나노급 방사선 영상기술을 개발하는데 있어 세포나 분자 수준의 변화를 관찰하고 표적지향적 영상화를 위해서는 표적리간드를 탐색하고 생체내에서 이를 적용하는 기술로서 X-선 영상에 적합한 나노입자의 합성과 적용기술이 필수적으로 요구된다.

이 글에서는 나노급 X-선 영상을 위한 개념과 원리, 기반기술 및 장치, 그리고 X-선용 나노입자에 대한 설명과 적용에 대해 소개하고자 한다.

2. 본론

2.1 나노급 X-선 영상 시스템

2.1.1 X-선 현미경

높은 해상도를 얻기 위한 새로운 영상기술의 시도는 역사적으로 생명과학을 포함한 많은 과학영역에 중요한 업적을 남겼다. 전처리가 되지 않은 생체시료 관찰에는 주로 광학현미경이 사용되고 있다. 광학현미경의 경우 광원으로 가시광을 이용하기 때문에 현존 기술로 광원의 회절한계에 의해 분해능이 약 150 nm 정도로 제한된다. 전자현미경과 원자현미경과 같은 높은 분해능을 얻을 수 있는 시스템은 생체시료의 관찰을 위해서는 시료에 물리, 화학적인 전처리 과정이 필요하여 살아있는 상태의 생체시료를 관찰할 수 없거나 두꺼운 시료를 관찰하기가 어렵다.



윤권하

1992 원광대학교 의과대학 (학사)
2002 전북대학교 의과대학 (박사)
1993~1997 울산대학교 서울아산병원 전공의/전임의
1998~2008 원광대학교 의과대학 교수
2002 University of Toronto (Visiting Professor)
2004~2008 익산방사선영상과학연구소 소장
2008~현재 대산의료재단 익산병원 부원장
(재) 전북테크노파크 방사선영상기술센터 센터장

Nano X-ray Imaging and Life Science

대산의료재단 익산병원, (재) 전북테크노파크 방사선영상기술센터 (Kwon-Ha Yoon, Department of Radiology, Daesan Medical Foundation, Iksan General Hospital, 141-1 Sin-dong, Iksan, Jeonbuk 570-170, Korea) e-mail: khy1646@wku.ac.kr

연 X-선 현미경은 광원으로 ‘물의 창’($\lambda=2.3\sim4.4$ nm)이라 불리는 X-선 파장영역을 사용한다. ‘물의 창’ 영역에서는 물과 생체시료를 구성하는 단백질과의 X-선 흡수차가 크므로 수 마이크로 두께의 수분층을 통해서도 단백질의 관찰이 가능하며, X-선의 투과성질에 의하여 내부구조의 관찰이 가능하다. ‘물의 창’ 영역에서의 높은 해상도를 갖는 실험실 규모의 현미경 시스템에 대한 현재까지의 연구는 윤대환 광학소자와 레이저 플라즈마를 이용한 연구가 대부분이다. 저자의 연구실에서는 타겟파편 영향이 없고 단색성($\lambda/\Delta\lambda=1000$)이 뛰어난 액체타겟을 이용하여 실험실에서 유용하게 사용할 수 있는 소형의 X-선 투과현미경 시스템의 광학계를 설계하여 50 nm 이하의 공간분해능을 갖는 현미경시스템을 개발하였다. 고출력 레이저를 타겟에 집중하면 이때 발생된 플라즈마에 의하여 X-선이 방사된다. 타겟은 액체질소를 사용하며 발생되는 주요 X-선 파장은 2.88 nm이다. 액체 타겟을 이용하면 단색성이 강한 X-선을 얻을 수 있으며 플라즈마 생성시 발생하는 미세파편도 아주 미소하다. 또한, 100~150 nm 두께의 Ti 필터를 사용하여 레이저 플라즈마에 의하여 발생된 가시광 및 적외선을 제거한다. 조명거울을 통해 반사된 연 X-선은 샘플에 조명되며 샘플을 투과한 연 X-선은 회절윤대판 렌즈(Zone plate)에 의하여 확대되어 검출기에 결상된다. CCD카메라로 이루어진 검출기는 연 X-선의 검출과 시스템 광학계의 정렬에 이용된다. 바이오샘플에 조사되는 X-선량을 최소화하고, 동시에 노출시간을 단축시키고자 하였다. 살아있는 세포를 관찰하기 위해서는 X-선량을 줄이고 카메라 시스템의 감도를 높이는 것이 바람직하나, CCD 자체의 양자 효율(quantum efficiency)의 한계에 의하여 감도를 높이는 것이 현실적으로는 대단히 어렵다. 따라서, X-선 검출면과 카메라 사이에서 광을 증폭하여 전체 시스템의 감도를 높이는 영상증배관을 이용하였다.

연 X-선은 공기중에 쉽게 흡수되므로 현미경 시스템 내부는 X-선의 경로진행을 위해 고 진공을 유지한다. 그러나, 연 X-선 현미경에서 주로 관찰하고자 하는 생체시료는 진공 중에서 수분이 증발하여 건조되어 생체시료는 죽고 조직은 파괴되어 버린다. 따라서, 생체시료의 보존을 위하여 대기압의 수용액 상태를 유지할 수 있는 샘플 홀더가 필요하다. 또한, 동시에 연 X-선은 물질에 쉽게 흡수가 되므로 샘플홀더의 시료창은 연 X-선의 투과율이 우수한 재질을 사용해야 한다. 시료창은 100nm 두께의 Si_3N_4 이고 크기는 1.5×1.5 mm이다. 이때 연 X-선의 투과율이 약 70% 정도로 우수하고, 연 X-선을 이용하여 생체시료를 관찰하기 전에 광학 현미경을 이용하여 생체시료의 놓인 위치와 부착상태를 확인해야 하므로 가시광 파장에서 투명하며, 또한 진공을 유지할 수 있는 강도를 가지고 있다. **그림 1**은 원광대학교에서 개발한 X-선 현미경 사진으로서 이 시스템의 해상도를 평가한 결과 45 nm의 영상을 얻었다.¹

저자의 연구실에서는 개발한 연 X-선 현미경을 이용하여 표준샘플로 사용하고 있는 구조류 세포의 일종인 *Coscinodiscus oculus*의 영상을 얻었다(**그림 2**). 또한, 금나노입자를 함유한 HT1080 세포의 영상을 얻을 수 있었다. 이는 나노입자를 포식한 세포를 살아있는 상태에서 비파괴적, 무표지로 관찰할 수 있는 X-선 현미경의 원리가 실제로 구현된 것으로 평가된다. 이와 같이 X-선 현미경은 향후 지속적인 연구를 통해 생명공학연구에서 혁신적인 도구를 제공할 수 있을 것으로 보인다. 생체시료를 나노단위수준으로 시료에 대한 가공을 하지 않고 살아 있는 상태로 관찰할 수 있는 X-선 현미경은

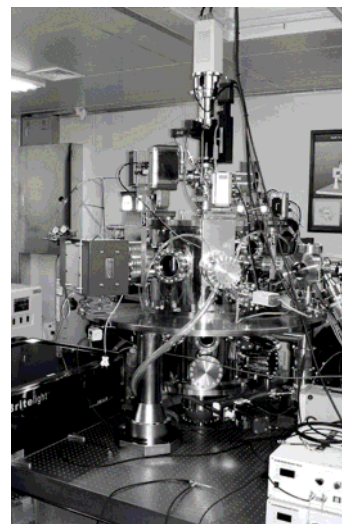


그림 1. Photograph of a compact soft X-ray microscope system for biological application at Wonkwang University.

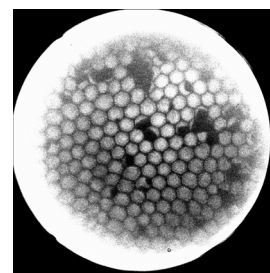


그림 2. An X-ray microscopy image of a diatom(*Coscinodiscus oculus*) with $\times 530$ magnification. The inner hexagonal structure of the *Coscinodiscus oculus* can be clearly seen in the X-ray microscope image.

가까운 장래에 매우 중요한 장비로 이용될 것이다.

2.1.2 마이크로 및 나노CT

최근에는 바이오산업 및 생명공학의 발전에 따라 생물 의료용 X-선 단층 영상 촬영 장치의 사용이 증가되고 있다. 특히 생명공학분야에서 소동물을 고해상도로 촬영하는 마이크로 토모그래피(micro-tomography) 기술이 주목을 받고 있다. 이는 의학 및 생물학의 연구에 있어서는 생물이 갖는 다양한 기능이 그 구조와 밀접한 관계를 가지고 있으므로 생체조직 미세구조의 관찰에 실험용 소동물을 희생시키지 않고 수명기간 동안 비침습적인 방법으로 질병의 진행과 치료 경과를 영상으로 확인이 가능하기 때문이다. 생명공학의 연구들 즉, 병 상태를 정확히 진단하기 위한 연구, 유전자의 발현 및 단백질 연구, 독성 실험, 신약 개발, 염색체의 분화과정과 구조 이상 연구, 미생물 연구, 토양 및 식물체 연구, 천연섬유와 단백질의 구조 그리고 기능탐구를 이용한 인공적 배합물의 생산 등의 다양한 연구들에 폭 넓게 활용되어 지고 있다. 이런 연구에서는 시간의 경과에 따른 생체의 변화를 보는 것이 매우 중요하다. 하지만 종래의 소동물 촬영용 영상시스템들은 낮은 해상도로 인해 생체현상의 미세한 관찰에 많은 어려움이 있었다. 소동물 영상 촬영장치로는 마이크로 토모그래피, 소동물용 자기공명영상장치(micro-MRI), 마이크로 양전자방출 단층촬영장치(micro-PET) 등을 들 수 있다. 이러한 장치들은 각기 장단점을 가지고 있으



그림 3. Photographs of in-vivo micro-CT system. Note respiratory anesthesia tube for live animal study.

며, 이중에서도 X-선을 이용하는 장치는 서론에서도 기술하였듯이 가장 우수한 해상도를 나타내며, 다양한 영상획득 기법을 통해 구성성분의 영상과 분광정보를 동시에 얻을 수 있다는 장점이 있다.⁵⁻⁷

저자의 연구실에서는 고해상도의 X-선 영상장치인 마이크로 CT 및 나노CT를 개발하여 생체의 미세구조와 기능을 탐구하며, 분자생물학적 영상으로 비침습적으로 생체 세포의 구조와 변화를 탐색하고 면역화학 기법을 이용한 특정단백질을 영상화할 수 있으며, 생체에서의 진단 및 치료기법의 개발에 이용할 수 있도록 실시간의 동적영상(real-time dynamic image)을 획득할 수 있는 시스템을 개발하였다(그림 3).

기존 의료영상 촬영 시스템들보다 훨씬 높은 고해상도를 갖기 위해서 마이크로 X-선 CT 장치는 수 μm 이하의 광원크기를 갖는 X-선 발생장치를 이용하고, 상대적으로 낮은 X-선 광원의 세기에 대하여 고감도 타입의 검출기를 채용하고 살아있는 동물을 검사하기 위해 호흡마취 및 생체모니터링 장치를 설치하며, 생체세포의 유지 및 방사선으로부터 보호와 영상의 대조도를 증가시키기 위하여 위상차 영상획득기술을 적용하는 기술을 개발하였다. X-선 단층 촬영장치는 방사선에 대응하는 X-선원을 이용하여 촬영된 피검체의 검출된 정보를 3차원으로 재구성하여 단층 영상으로 보여주는 장치로서, X-선 발생부, 피검체 회전을 위한 기구부, 검출부 장치로 구성되며 X-선 발생부와 검출부의 일직선 사이에 피검체를 위치하여 여러 방향으로부터 X-선관을 통해 피검체의 횡단면 방향으로 X-선을 조사한다. 이때, 투과한 X-선에 의한 각 물질간의 감쇠계수에 따른 흡수차를 검출기로 데이터를 수집하여 단면 영상화한 후 각각의 방향으로부터 생성된 디지털 단면 영상 데이터를 컴퓨터로 산술적 연산방법으로 계산하여 피검체의 촬영 영역에 대응하는 단층 영상을 재구성하여 보여주게 된다. 마이크로 토모그래피 장치의 시료의 흡수선량은 광원조건과 X-선 조사량 조사시간, 그리고 조사수를 고려하여 총 시료의 흡수선량을 구한다. 저자 등이 개발한 마이크로 토모그래피 장치는 110 mGy의 선량이 얻어졌으며, 이는 소동물에 대한 생체영상을 얻는데 허용되는 피폭영역에 해당한다.

저자들은 개발한 마이크로 CT를 이용하여 살아있는 마우스의 폐, 간, 심장, 뼈 등 다양한 영상을 얻었고(그림 4), Ras-oncogene을 갖고 있는 폐암의 발현의 평가, 섬유성 폐질환의 연구, 전이성간암의 영상화, 류마치스관절염의 연구, 골다공증의 연구 등 다양한 동물모델을 이

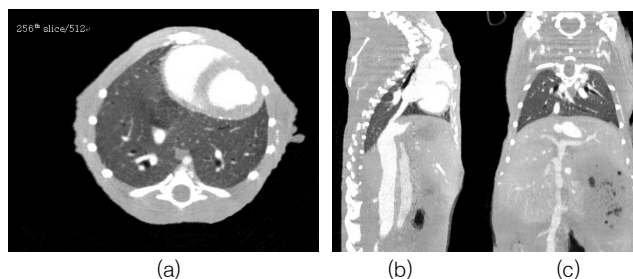


그림 4. Cross-sectional axial (a), sagittal (b) and coronal (c) images of a live mouse after administration of a blood-pool contrast agent. The heart, lung, liver, inferior vena cava and porto-mesenteric venous system are clearly visible.

용한 연구를 진행하고 있다.^{8,9}

나노CT는 나노급 고해상도로 세포조직의 파괴가 없는 상태에서 나노 단위의 구조적인 변화와 기능을 관찰할 수 있는 장치이다. 나노 CT 장치는 X-선 발생부, 회전 기구부, 검출부를 일직선상에 위치함에 있어서 공간해상도에 매우 커다란 영향을 미치는 위치정렬 오차를 줄이고, 광원의 크기와 검출기간의 거리에 따른 상호작용에 의해서 위상차 영상획득기술(phase contrast imaging)을 적용한다. 나노급 고해상도를 얻기 위해서는 우선 X-선 발생장치에서 X-선이 발생하는 초점의 크기가 1 μm 이하로 작아야 영상의 번짐 현상이 없고 고배율에 의한 선명한 영상을 얻을 수 있다. 통상적으로 X-선을 이용한 투과 영상에서 최대로 얻을 수 있는 공간 해상도는 광원의 초점 크기의 이분의 일까지인 것으로 알려져 있다. 또한, 높은 공간 분해능은 광학적인 구성의 배율에 의한 확대에 의해서 가능하게 되는데, X-선 발생장치는 음극(cathode)의 전자 방출이 양극(anode) 타겟면에 부딪히면서 X-선이 발생되어 나오는데, 광원의 발생지점과 출력단까지의 거리는 구성 방식에 따라서 차이가 있게 된다. 반사형 타입(reflective type)은 광원 발생지점과 출력단 까지 다소 거리가 멀리 떨어져 있으므로 기하학적인 배율을 더 이상 확대할 수 없는 제약이 따르게 된다. 따라서, 나노CT에는 투과형 타입(transmission type)의 X-선 발생장치를 적용한다. 나노 초점크기의 튜브형 X-선 발생장치는 X-선 광원 발생지점과 출력단 사이의 거리가 매우 근접하게 밀착되어 있어 시료를 광원 발생지점에 최대한 가까이 할 수 있어 광학배율을 크게 할 수 있으며, 1 μm 이하의 초점 크기를 가지고 있어 번짐 현상이 적고, 더불어 위상차 현상을 함께 이용하면 보다 더 선명한 영상을 얻을 수 있다. 또한, 고해상도 영상을 얻기 위해서는 X-선 검출기의 픽셀 크기도 수 마이크로 이하로 작아야 하며, X-선에 대한 변환효율이 매우 높아야 신호대 잡음비가 유리해져 대조도가 큰 영상을 얻을 수 있다.

CT 시스템의 공간 해상도는 일회전할 때 여러 각도에서 얻은 단면 영상의 조사수에 의해서 결정되며, 조사수에 따라서 촬영시간이 그만큼 증가하게 된다. 이때, 생체 시료는 촬영되는 전체시간 동안 X-선에 노출되며, 방사선에 의한 세포변형이나 파괴가 발생할 수 있게 된다. 따라서, 저자들은 생체시료의 방사선방어를 위해 허용한도내의 저온 상태로 유지하여 방사선으로부터 보호 및 유지토록 하였다.

저자들은 나노CT를 이용하여 마우스의 간의 문맥혈관의 미세구조(그림 5)와 뼈의 미세구조 영상을 얻었으며(그림 6), 다양한 동물모델을 이용한 미세구조의 변화와 기능에 관한 연구를 진행하고 있다. 특히 간의 전이성 종양모델에서 간의 문맥과 동혈관의 미세구조를 나노CT를 통해 삼차원적으로 관찰하고 있다. 또한, 골다공증 연구와 관

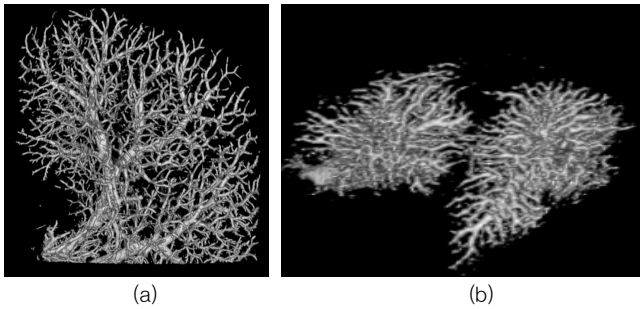


그림 5. 3D rendering image of microvascular structure of portal circulation (a) and sinusoid (b) of the mouse liver on nano X-ray CT.

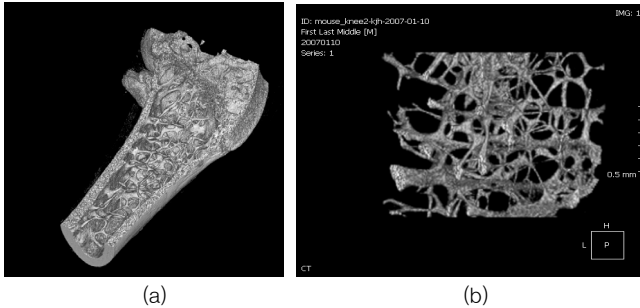


그림 6. Micro-bony structure of the mouse femur (a) and isolated trabecular bony structure of the femur on 3D rendering image (b).

절염 등의 연구에서 뼈와 연골의 미세구조의 정량적 정보제공이 가능하게 되었다. 이는 기존의 다른 영상장치로는 알 수 없었던 정보로서 예컨대, 뼈의 섬유주(trabecular bone)의 용적, 표면면적, 두께, 연속성, 강도 등의 기능적 정보를 정량적으로 제공할 수 있어서 생체역학의 연구와 생체적합성 물질의 치료반응을 관찰하는데 유용하게 적용되고 있다. 이와 같이 나노CT의 개발은 나노급의 고해상도 영상정보를 제공함으로써 생명현상의 미세구조의 형태와 기능적 관찰이 가능하게 하고 있다.

2.2 X-선 영상을 위한 나노입자조영제

2.2.1 X-선 영상을 위한 나노입자조영제의 특성

현재까지 보편적으로 사용하고 있는 요오드계열의 조영제는 혈관내에서 대단히 빠르게 제거되기 때문에 마이크로CT를 이용한 소동물실험에는 부적합하다. 최근에 이용되고 있는 대부분의 마이크로CT는 영상획득 시간이 수분 내지 수십분정도 걸리기 때문에 혈관관류영상을 얻기 위한 조영제의 개발이 필요하며, 이에 따라 수년전부터 Weichert 등과 Vera 등이 요오드계열의 혈관관류조영제 또는 Dysprosium-DTPA-dextran 등을 소개한 바 있다.^{10,11} 최근에는 나노입자를 이용한 분자조영제에 대한 관심이 증대되면서 이러한 나노입자를 CT조영제로 개발하고자 하는 노력이 이루어지고 있다. 나노입자조영제를 CT로 이용할 수 있기 위해서는 요오드계열의 조영제보다 조영효과가 우수하고, 장시간동안 혈관내에 체류해야 하며, 고농도에서도 안정한 구조를 보여야 하며, 세포독성이 없어야 하는 등의 조건을 만족해야 한다. 여기에 특정장기 또는 세포나 분자에 표적이 가능하고 약물전달 또는 치료제로 이용할 수 있으면 더욱 이상적인 조영제가 될 수 있을 것이다.¹²

저자의 연구실에서는 금 나노입자를 이용한 X-선 조영제를 개발하였다(그림 7). 금나노입자에 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 결합시킨 X-선 조영제는 특별한 독성이 없고 혈관 내 잔류시간이 증가하여 혈관 영

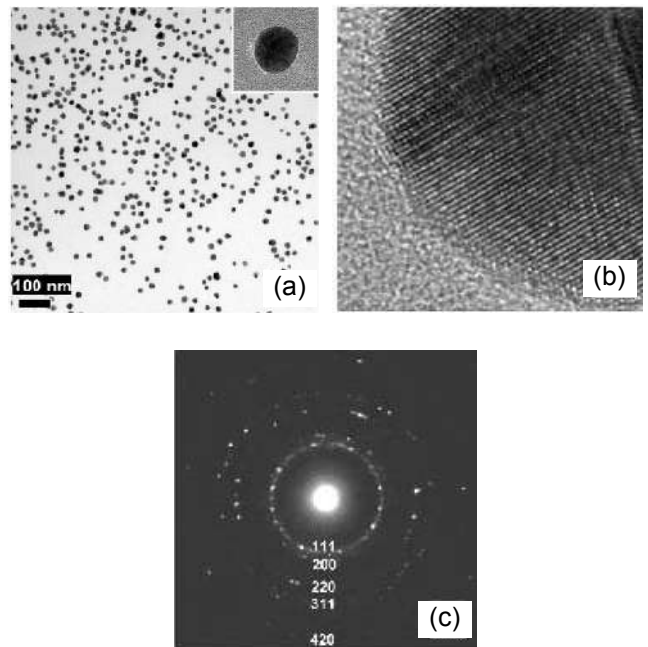


그림 7. TEM image of gold nanoparticles. The gold nanoparticles were observed to be 10 nm in diameter and as quasi-spherical shapes on the TEM image (a). Lattice fringes with a spacing of 0.235 nm which agrees well with that of cubic Au (111) (b). Selected area electron diffraction (SAED) cubic Au crystal (c).

상을 위한 CT(computed tomography) 조영제로서 유용하게 사용할 수 있다.¹³ 생체의 혈관구조와 이의 변화 및 종양조직 내의 신생혈관을 관찰하는데 유용하며, 종양조직의 관류(perfusion) 영상을 얻는 데에도 유용하다. 또한, 금은 요오드보다 X-선 조영효과가 뛰어난 물성을 지니고 있어, 기존의 조영제와 같은 농도를 사용하였을 때 더 좋은 영상을 얻을 수 있다. 기존의 상용화된 요오드계 조영제는 K-edge 에너지가 33.17 KeV인데 비해서 금(Au)은 80.73 KeV의 K-edge를 갖기 때문에 고에너지 마이크로 및 나노영상 X-선 에너지 영역에서 보다 높은 조영효과를 얻을 수 있다. 또한, Au는 나노 입자형태로 합성이 용이하므로 조영소재의 생체분포를 조절할 수 있는 다양한 크기의 나노조영입자를 활용할 수 있으며, 1~20 nm 정도 되는 크기의 조영입자를 합성하여 X-선 조영제로서 생체영상을 얻을 수 있다.

2.2.2 X-선 나노입자조영제의 합성

금 나노입자의 합성은 금 양이온(Au^{3+})을 환원제에 의해 금 원자로(Au^0) 환원한 후, 다양한 리간드와 반응시키는 원리를 이용하며, 이 반응은 리간드, 이온, 환원제, 용매의 종류, 반응액의 pH와 온도 등 다양한 실험 조건에 영향을 받는다. 이 분야의 최초의 연구자는 1857년 Michael Faraday로 에테르 용액 상에서 백인(white phosphorus)을 이용하여 5~10 nm의 크기를 가지는 구형의 콜로이드를 제조하였다. 일반적으로 반응에 사용되는 금이온 생성 시약은 $HAuCl_4$ (tetra-chloroauric acid)이며 ascorbic acid, white phosphorous, sodium citrate, thiocyanate, sodium borohydride, tannic acid 등과 같은 다양한 환원제가 사용될 수 있다. 환원된 콜로이드 금나노입자를 메톡시폴리에틸렌 글리콜 설프하이드릴($MeO-PEG-SH$: Methoxy poly-ethylene glycol sulfhydryl)에 반응시켜 메톡시 폴리에틸렌 글리콜 설프-금 나노입자 콜로이드 결합체를 생성한다. 이 결합체는 20 내지 30 nm의 입자크기를 가짐으로써 혈관 조영제로서 유용하게 사용될 수 있

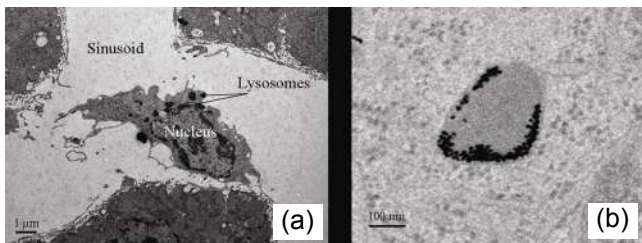


그림 8. TEM of mouse liver 3 days after gold nanoparticles injection shows nanoparticles in a Kupffer cell (arrow). TEM image (a) shows uptake of gold nanoparticle in a Kupffer cell. A magnified TEM image of the Kupffer cell (b).

다. 이번에 개발한 금나노입자조영제는 동물실험을 이용한 마이크로 CT에서 사용가능함을 확인하였으며, 생체에 무해하기 때문에 인체 적용 가능성이 높다. 저자들의 실험에서도 금나노입자가 간과 비장의 RES에 포획되며(그림 8) 그 외의 다른 장기와 세포실험에서 독성은 발견되지 않았다. 또한, 뇌-혈관장벽을 통과하지 않기 때문에 뇌신경독성도 없는 것으로 판단하고 있다.

2.3 나노 X-선 영상의 생물학학적 적용

2.3.1 나노 X-선 세포영상

X-선 현미경을 이용하여 금 나노입자 포획영상을 관찰하기 위해서는 먼저 세포시료를 제작해야 한다. 세포를 배양하기 위한 시료 플레이트는 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ 크기의 실리콘 플레이트의 중심부에 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ 크기의 Si_3N_4 박막으로 이루어져 있다. 세포는 증식속도 및 소형 연 X-선 현미경의 가시영역의 크기를 고려하여 선택할 수 있으며, 저자는 HT1080과 MDA-MB 231등을 이용하였다. 시료 플레이트는 70% 에탄올로 멸균 처리하고, 세포가 잘 부착될 수 있도록 Si_3N_4 박막 표면을 1 mg/mL 젤라틴으로 처리한 다음 12-well culture plate에 넣고 세포시료를 약 1×10^4 개씩 넣어 0.5% 이산화탄소를 공급하고, 습도 20%, 온도 37 °C의 배양기에서 3일간 배양한다. 이후 각각의 배양액에 PEG가 캡핑된 금 나노입자(Core ϕ 5 nm, ϕ 9 nm)를 0.1 mol/L 씩 첨가한 후, 15시간 배양하여 세포의 내포작용이 충분히 발생되도록 한다. 배지를 제거한 후 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 2회 세척하고 4 °C의 메탄올 용액을 3분간 처리하여 세포를 고정한 후, 공기 중에서 건조한다. 금 나노입자가 포획된 세포의 영상을 획득하기 위하여 520배의 배율로 10분간 노출한다. 가시영역은 $35 \times 35 \mu\text{m}^2$ 이고, 세포내의 약 200 nm 이하 크기의 금 나노입자는 가시광 현미경의 회절한계 때문에 관찰이 어렵지만 연 X-선 현미경 영상에서는 연 X-선 현미경의 고 분해능과 금 나노입자의 연 X-선 대한 높은 대조도에 의하여 금 나노입자 군집의 크기 및 위치를 확인할 수 있다.¹⁴

그림 9는 금 나노입자를 포획한 MDA-MB 231 세포영상으로 노출 시간은 10분, 배율 460배, 가시영역은 $35 \times 35 \mu\text{m}^2$ 의 영상이다. 획득된 영상에서 금 나노입자 군집의 크기는 약 직경 60 nm까지 구별이 가능하였고 이는 연 X-선 현미경의 분해능이 460배에서 최대 60 nm까지의 분해능을 갖기 때문이다. 세포내의 포획된 금 나노입자의 군집은 다양한 형태와 크기로 형성됨을 연 X-선 현미경 영상을 통하여 확인할 수 있었다. 같은 샘플의 투과형전자현미경에서 세포내부 액포에 금 나노입자가 포획된 상태를 확인할 수 있었다.

2.3.2 나노 X-선 생체영상

고해상도의 X-선 마이크로 CT 및 나노CT는 나노입자조영제를 이용하였을 때 생체영상의 여러 목적을 달성할 수 있게 된다. 저자의 실험

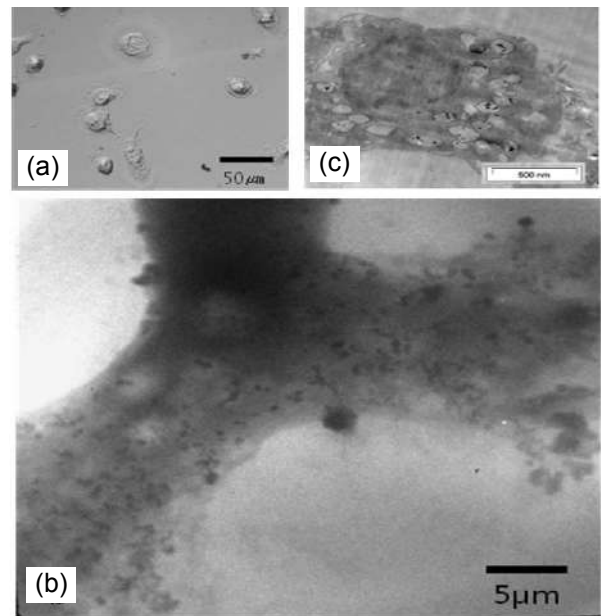


그림 9. Images of MDA-MB 231 cells engulfed gold nanoparticles using a visible light microscope (a) $\times 40$ magnification), a compact soft X-ray microscope (b) $\times 460$ magnification). A transmission electron microscope image shows gold nanoparticles in the vesicles of the same cell (c) $\times 10,000$ magnification).

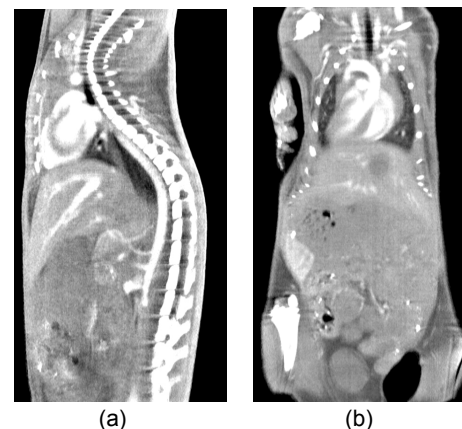


그림 10. Sagittal (a), coronal (b) images at 6-hours following contrast injection. The cardiac ventricles and all major arterial and venous structures were visualized clearly after the gold nanoparticles injection.

험실에서 개발한 금 나노입자 조영제는 특별한 독성이 없고 혈관 내 잔류시간이 증가하여 혈관 영상을 위한 조영제로서 유용하게 사용할 수 있을 것으로 확인되었다(그림 10). 금 나노입자는 생체의 혈관구조와 이의 변화 및 종양조직 내의 신생혈관을 관찰하는데 유용하며, 종양조직의 관류 영상을 얻는 데에도 유용할 것으로 생각된다(그림 11). 또한, 다른 여러 나노입자의 특성과 마찬가지로 입자기반의 종양특이적 약물전달, 분자 및 세포수준의 조기진단 및 치료에도 이용될 수 있는 것으로 연구되고 있다.^{15,16} 금 나노입자는 특정단백질과의 결합을 통해 분자표적조영제의 플랫폼으로 이용할 수 있는 가능성이 있다. 일반적으로 나노입자표면의 PEG는 특정 표적리간드와 쉽게 결합한다. 따라서, 금나노입자는 종양특이적 항체 또는 펩타이드 등의 표적리간드와 결합하여 CT

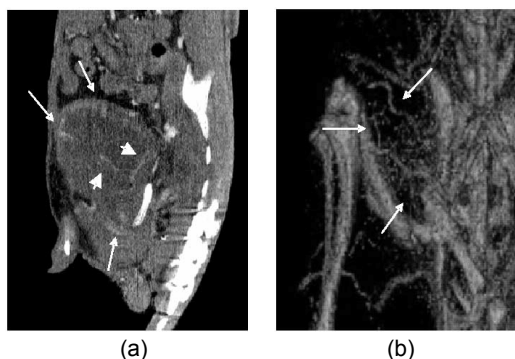


그림 11. Tumor vasculature images of HT-1080 fibrosarcoma mice models following administration of colloidal gold nanoparticles. The sagittal image (a) clearly shows intratumoral (arrow heads) and peritumoral vessels (arrows), and the 3D reformatted image (b) shows the densely proliferative tumor vessels (arrows).

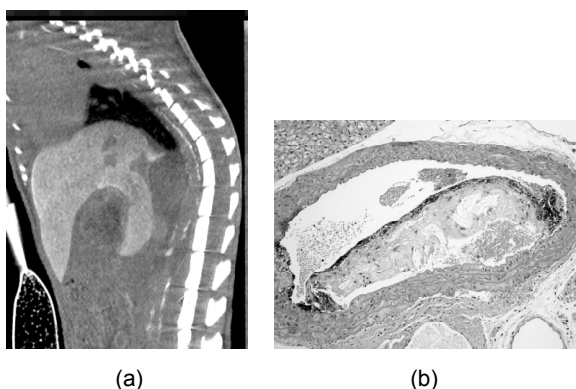


그림 12. (a) Micro-CT image of atherosclerotic aortic wall in ApoE -/- mouse following administration of colloidal gold nanoparticles. (b) Photomicrograph of H&E stain shows macrophage uptake of gold nanoparticles in the vulnerable atherosclerotic plaque of the aortic wall.

를 이용한 새로운 형태의 분자조영제로 사용될 가능성이 있다고 할 수 있다.

X-선 나노영상 분야의 최근 주목할 만한 연구분야는 심혈관질환에서 취약성동맥경화반의 조기 진단이다. 최근 인구의 고령화와 식생활의 서구화로 인해 동맥경화증에 의한 사망이 급속하게 증가하고 있는데, 동맥경화증에 의한 심혈관질환의 임상적 치료는 협착이 진행되어 흉통이 생기거나 심근경색증 발생 후의 치료가 대부분이다. 그러나, 동맥경화증에 의한 관상동맥의 협착보다는 파열 되기 쉬운 동맥경화반의 성분이 급성심근경색증의 가장 중요한 인자임이 밝혀지고 있다. 파열이 쉬운 취약성동맥경화반(vulnerable plaque)은 급성염증과 지질이 풍부한 중심부(lipid-rich core)와 이를 둘러싼 얇은 섬유성 모자(thin fibrous cap), 그리고 90%이상의 협착 등이 주요원인이 된다고 알려져 있다.¹⁷ 최근까지 임상적으로는 경화반성분의 진단은 혈관내 초음파(IVUS: intravascular ultrasound)와 같은 침습적 방법으로만 가능했으나, IVUS는 비용, 시간, 불편, 술기에 따른 위험성 등의 이유 때문에 경화반 진단에 일반적인 검사로 사용되기는 어려움이 있다. 실험적 연구로 광 결함 단층촬영법(optical coherence tomography, OCT)을 이용하여 경화반의 외형을 분석하는 연구가 진행되고 있고, 분자영상분야에서 MRI와 표적자를 이용한 조영제를 통하여 취약성동맥경화반을 증명하는 연구와 핵의학학을 이용한 연구 등이 행하여지고 있다. 그러나, 임상적으로 MR,

핵의학영상을 이용하여 빠르게 움직이고 크기가 작은 관상동맥에 존재하는 취약성동맥경화반 영상을 얻기는 극복해야 할 난제가 많은 실정이다.

최근에 임상에서는 조영증강 다절편 CT(MDCT: multi-detector CT)를 이용하여 동맥경화반을 발견하고 협착을 진단하는데 많이 이용하고 있다.¹⁸ 또한, CT밀도(Hounsfield Unit)로 표현되는 X-선 감쇄 특성을 기초로 하여 지질풍부 경화반, 섬유성 경화반, 석회화 경화반으로 나눌 수 있다는 연구도 있다. 그러나, 이러한 노력은 아직 취약성동맥경화반을 정확히 진단하는데 한계가 있다. 조영증강 다절편 CT를 이용한 관상동맥의 경화반을 발견하고 협착을 진단하는 것보다 취약성동맥경화반을 진단하는 노력이 더욱 중요하다는 인식하에 이를 표적으로 하는 분자영상진단기법의 개발필요성이 제기되어 왔으며, 최근 Integrin, 또는 Fibrin을 표적으로 한 MRI 또는 SPECT/PET를 이용한 취약성동맥경화반을 진단하는 실험적 연구들이 보고되고 있다. 임상에서 널리 이용하고 있는 X-선 CT에서 이용할 수 있는 세포표적조영제의 개발은 급성관상동맥증후군의 예방과 올바른 치료에 크게 도움을 줄 것으로 기대하고 있다. 이런 목적으로 Hyafil 등은 고속영상촬영이 가능한 MDCT와 요오드 신합성물을 이용한 CT 조영제를 이용하여 취약성동맥경화반을 영상화하려는 시도를 하였다.¹⁹ 그러나, 요오드화합물은 독성이 강하여 실용화하는데는 문제가 큰 것으로 생각된다. 저자들은 생체 ApoE-/- 마우스에서 금 나노입자를 주입한 후 micro CT를 이용하여 대동맥을 관찰하였다. 40 nm 크기의 금 나노입자를 62.5 μmol 의 농도로 주입하고 24-48시간 후 촬영한 영상에서 조영 전 영상과 비교하여 높은 조영증강을 보이는 혈관 벽을 확인할 수 있었다. 마이크로 CT에서 CT 영상에서 대동맥의 벽을 따라서 100 HU 이상으로 조영되는 영상을 얻을 수 있었고, 조직학적 검사에서 동맥경화의 혈전의 표면에 침윤된 대식세포에 금 나노입자가 포획되어 조영효과가 나타나는 것을 알 수 있었다(그림 12). 이러한 실험결과는 금 나노입자는 생체에서 대식세포를 직접 표적하므로 동맥경화뿐만 아니라 염증성 또는 자기면역질환 등 여러 병리상태의 진단과 예후를 측정할 수 있는 가능성을 보여주고 있으며, 이에 따라 항동맥 경화성 약물 및 항염증성 약물과 같은 치료약물의 전달을 볼 수 있어서 부작용을 줄이면서 효과를 증진시킬 수 있는 약물개발에 이용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다고 생각된다. 향후 이 금 나노입자를 이용한 연구는 X-선 CT를 이용한 분자진단법이 주요한 이슈가 될 것으로 전망된다.

3. 결론

다양한 바이오영상기술 중에서 X-선을 이용한 영상기술은 아직까지 초보단계이며 한계점도 많이 있으나, X-선이 갖는 장점을 이용하여 다른 장치기술과 융합하거나 나노수준의 고해상도 영상을 통해 새로운 생명현상의 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. X-선을 이용한 나노영상연구는 분자 및 세포수준의 진단과 치료 등 다양한 바이오의료분야에 적용될 수 있으며, 이를 통해 인간생명의 건강에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

참고문헌

1. K.W. Kim, Y. M. Kwon, K. Y. Nam, J. H. Lim, K. G. Kim, and K. S. Chon, *et al.*, *Phys. Med. Bio.*, **51**, N99 (2006).

2. K. S. Chon, Y. Namba, and K. H. Yoon, *Appl. Optics*, **45**, 4609 (2006)
3. K. S. Choi, S. H. Kim, Q. U. Cai, S. Y. Kim, H. O. Kim, and H. J. Lee, *et al.*, *Mol. Imaging*, **6**, 75 (2007)
4. E. L. Ritman, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **6**, 185 (2004).
5. C. T. Badea, B. Fubara, L. W. Hedlund, and G. A. Johnson, *Mol. Imaging*, **4**, 110 (2005).
6. M. J. Paulus, S. S. Gleason, S. J. Kennel, P. R. Hunsicker, and D. K. Johnson, *Neoplasia*, **2**, 62 (2000).
7. F. Kiessling, S. Greschus, and M. P. Lichy, *et al.*, *Nat. Med.*, **10**, 1133 (2004).
8. K. Y. Nam, K. W. Kim, J. H. Kim, H. H. Son, J. H. Ryu, and S. H. Kang, *et al.*, *J. Kor. Med. Physics*, **19**, 102 (2008).
9. H. W. Kim, Q. Y. Cai, H. Y. Jun, K. S. Chon, S. H. Park, and S. J. Byun, *et al.*, *Acad. Radiol.*, **15**, 1282 (2008).
10. J. P. Weichert, F. T. Lee, Jr., and S. G. Chosy, *et al.*, *Radiology*, **216**, 865 (2000).
11. D. R. Vera and R. F. Mattrey, *Acad. Radiol.*, **9**, 784 (2002).
12. R. F. Mattrey and D. A. Aguirre, *Acad. Radiol.*, **10**, 1450 (2003).
13. Q. U. Cai, S. H. Kim, Q. S. Choi, S. Y. Kim, S. J. Byun, and K. W. Kim, *et al.*, *Invest. Radiol.*, **42**, 797 (2007).
14. 권영만, 김한경, 김경우, 김선희, 윤홍화, and 천권수, *et al.*, *Korean J. Microscopy*, **38**, 235 (2008).
15. G. F. Paciotti, L. Myer, and D. Weinreich, *et al.*, *Drug Deliv.*, **11**, 169 (2004).
16. J. Chen, F. Saeki, and B. J. Wiley, *et al.*, *Nano Lett.*, **5**, 473 (2005).
17. M. Naghavi, *Circulation*, **108**, 1664 (2003).
18. Burgstahler, C. Herdeg, C. D. Claussen, A. F. Kopp, S. Schroeder, A. Kuettner, T. Wojak, J. Janzen, M. Heuschmid, T. Athanasiou, and T. Beck, *C. Heart*, **90**, 1471 (2004).
19. O. Rabin, P. J. Manuel, J. Grimm, Wojtkiewicz, and G. R. Weissleder, *Nat. Mater.*, **5**, 118 (2006).