



등록특허 10-2466497



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월11일

(11) 등록번호 10-2466497

(24) 등록일자 2022년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/41 (2006.01) G01N 21/23 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 21/41 (2013.01)
G01N 21/23 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0158734

(22) 출원일자 2020년11월24일

심사청구일자 2020년11월24일

(65) 공개번호 10-2022-0071512

(43) 공개일자 2022년05월31일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020090092709 A*

KR1020200049089 A*

KR101855366 B1

JP2001249073 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국기초과학지원연구원

대전광역시 유성구 과학로 169-148 (어은동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이성수

광주광역시 북구 설죽로 560, 104동 602호(일곡동, 금호타운)

박상우

광주광역시 북구 서방로40번길 13, 105동 701호(중흥동, 중흥동 영무예다움 아파트)

송정식

경기도 성남시 분당구 불정로 141, 105동 402호(정자동, 정든마을)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 7 항

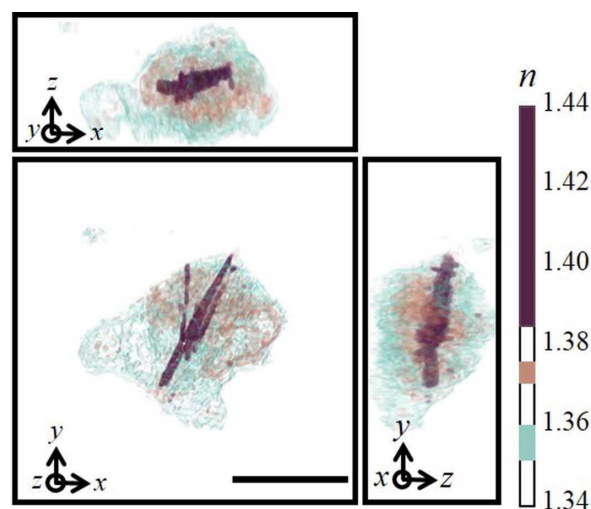
심사관 : 장일석

(54) 발명의 명칭 굴절률을 이용한 요산염 결정의 검출방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 굴절률을 이용한 요산염 결정의 검출방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 피검자 유래 시료에서 3차원 굴절률 분포를 광학적으로 측정하고 이를 이용해 특정 굴절률 범위에 해당하는 영역을 구분하는 요산염 결정의 검출 및 시각화 방법, 요산염 결정의 검출 시스템 및 요산염 결정의 검출을 통한 통풍 진단방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 요산염 결정의 검출 및 시각화 방법은 피검자 유래 생물학적 시료의 3차원 굴절률 분포를 광학적으로 측정함으로써 굴절률 값이 1.383 이상인 영역의 구분을 통해 요산염 결정의 검출이 가능하고, 나아가 요산염 결정에 의해 유발되는 통풍을 포함한 관련 질환을 진단하는데 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도4a



(52) CPC특허분류

G01N 33/483 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711102123
과제번호	D010720
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국기초과학지원연구원
연구사업명	첨단장비 및 분석기술 개발
연구과제명	국산 3D 홀로그래피 현미경성능향상
기 여 율	40/100
과제수행기관명	한국기초과학지원연구원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345317308
과제번호	2018R1D1A1B07045202
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인기초연구지원사업
연구과제명	히스톤의 면역세포독성을 이용한 류마티스관절염 신규 치료타겟 검증
기 여 율	30/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711101838
과제번호	2019COMPA중대형(계속)03
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재단)과학기술일자리진흥원
연구사업명	연구산업육성(R&D)
연구과제명	백색광 이용 고속 Holography 현미경 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	한국과학기술원
연구기간	2018.07.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 피검자 유래 생물학적 시료의 3차원 굴절률 (refractive index) 분포를 광학적으로 측정하는 단계; 및
 (b) 상기 측정된 굴절률 분포를 이용하여 굴절률 값이 1.383 이상 1.44 이하인 영역을 구분하는 단계를 포함하고,
 상기 구분된 영역을 이용하여 형태 정보, 길이 정보 및 직경 정보 중 적어도 하나 이상 정보를 추출하는 단계를 더 포함하고,
 상기 추출된 정보 중 길이 정보 $5.49 \pm 4.48 \mu\text{m}$ 와 직경 정보 $0.34 \pm 0.11 \mu\text{m}$ 을 더 구분하는 단계를 더 포함하는,
 요산염 (monosodium urate) 결정의 검출 및 시각화 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

3차원 굴절률 분포를 측정하는 단계는 광학 회절 단층 촬영 (optical diffraction tomography)을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

피검자 유래 생물학적 시료에서 3차원 굴절률 (refractive index) 분포를 측정하는 굴절률 측정부; 및

상기 측정된 굴절률 분포가 특정 범위에 속하는지 여부로 상기 시료 내 요산염 결정 존재를 결정하는 결과 판독부를 포함하고,

상기 특정 범위는 1.383 이상 1.44 이하인 것을 특징으로 하고,

상기 결과 판독부는 특정 범위가 $5.49 \pm 4.48 \mu\text{m}$ 의 길이 및 $0.34 \pm 0.11 \mu\text{m}$ 의 직경에 속하는지 여부로 상기 시료 내 요산염 결정 존재를 결정하는 것을 특징으로 하는,

요산염 (monosodium urate) 결정의 검출 시스템.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 굴절률 측정부는 편광 필터가 삽입된 것을 특징으로 하는, 시스템.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 시스템은 상기 측정된 굴절률 분포를 분석하여 형태 정보, 길이 정보 및 직경 정보 중 적어도 하나 이상 정보를 추출하는 정보 출력부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 시스템.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항 및 제4항 중 어느 한 항의 방법을 이용하여 피검자 유래 생물학적 시료에서 요산염 (monosodium urate) 결정을 검출하는 단계를 포함하는, 통풍 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 조직 또는 관절액인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 굴절률을 이용한 요산염 결정의 검출방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 피검자 유래 시료에서 3차원 굴절률 분포를 광학적으로 측정하고 이를 이용해 특정 굴절률 범위에 해당하는 영역을 구분하는 요산염 결정의 검출 및 시각화 방법, 요산염 결정의 검출 시스템 및 요산염 결정의 검출을 통한 통풍 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 통풍 (Gout)은 전 세계적으로 증가하는 염증성 관절염의 가장 흔한 원인이며, 이는 요산염 (monosodium urate; MSU) 결정의 침착에 의해 유발된다. 흡인된 활액 (synovial fluid)에서 요산염 결정은 편광 현미경으로 식별할 수 있으며, 이러한 밝은 음성 복굴절 결정을 확인하는 것이 통풍 진단을 위한 표준법으로 이용되고 있다. 그러나 이러한 방법은 요산염 결정을 확인하기 위해 전체 현미경 슬라이드를 스캔해야 하므로 시간이 많이 소요되어 불편하고 항상 결과를 신뢰할 수 있는 것은 아니며, 특히 활액에 결정이 매우 소량 존재하는 경우에는 검사자의 개별적인 경험 정도에 따라 결정을 확인하는 데에 상당한 차이가 나타날 수 있다. 따라서 보다 효율적이고 정확한 통풍의 진단을 위해 요산염 결정을 검출하는데 최소한의 노동이 필요한 객관적인 이미징 방법이 필요하다.

[0003] 광학 회절 단층 촬영 (Optical diffraction tomography; ODT)은 미세한 물질의 굴절률 (refractive index)을 측정하여 샘플의 3차원 단층 촬영 (tomogram)을 재구성하는 정량적 위상 이미징 방법 중 하나이다. 세포 및 조직과 같은 생물학적 샘플을 사용하는 이러한 비-표지의 현미경 이미징 기술은 샘플의 내부 구조를 감지하고 분석하는 매핑 도구뿐만 아니라 살아있는 세포에서 구조 및 생리학적 현상을 방해하지 않고 동적 활성을 추적하는 시간-종속적 추적 수단으로써 이용 가능하다. 최근 ODT는 다양한 분야에서 약물 치료, 질병의 진행, 나노입자 추적 및 광역학적 치료 중 살아있는 세포의 형태적 변화를 비-표지적 방법으로 모니터링 하기 위한 용도로 그 유용성이 입증되었으나 (ACS Nano. 2020 Feb 25;14(2):1856-1865), 이러한 유용성에도 불구하고 임상 검체의 진단 용도로는 보고된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명자들은 ODT 기술을 통해 MSU 결정에 대한 굴절률 범위를 확인하였고, 이러한 굴절률 범위에서 비-표지 방식으로 대식세포와 같은 살아있는 세포에 존재하는 MSU 결정을 효과적으로 구별 및 검출 가능함을 최초로 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0005] 이에, 본 발명은 요산염 (monosodium urate) 결정의 검출 및 시각화 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0006] 또한, 본 발명은 요산염 결정의 검출 시스템을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 요산염 결정을 검출하는 단계를 포함하는, 통풍 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 피검자 유래 생물학적 시료의 3차원 굴절률 (refractive index) 분포를 광학적으로 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 굴절률 분포를 이용하여 굴절률 값이 1.383 이상인 영역을 구분하는 단계를 포함하는, 요산염 (monosodium urate) 결정의 검출 및 시각화 방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일구현예로, 상기 단계 (b)는 굴절률 값이 1.383 이상 1.44 이하인 영역을 구분하는 것일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 구분된 영역을 이용하여 형태 정보, 길이 정보 및 직경 정보 중 적어도 하나 이상 정보를 추출하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 구현예로, 3차원 굴절률 분포를 측정하는 단계는 광학 회절 단층 촬영 (optical diffraction tomography)을 통해 수행되는 것일 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 피검자 유래 생물학적 시료에서 3차원 굴절률 (refractive index) 분포를 측정하는 굴절률 측정부; 및 상기 측정된 굴절률 분포가 특정 범위에 속하는지 여부로 상기 시료 내 요산염 결정 존재를 결정하는 결과 판독부를 포함하는, 요산염 (monosodium urate) 결정의 검출 시스템을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일구현예로, 상기 굴절률 측정부는 편광 필터가 삽입된 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 시스템은 상기 측정된 굴절률 분포를 분석하여 형태 정보, 길이 정보 및 직경 정보 중 적어도 하나 이상의 정보를 추출하는 정보 출력부를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 특정 범위는 1.383 이상일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 특정 범위는 1.383 이상 1.44 이하일 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 방법을 이용하여 피검자 유래 생물학적 시료에서 요산염 결정을 검출하는 단계를 포함하는, 통풍 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일구현예로, 상기 생물학적 시료는 조직 또는 관절액인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에서는 광학 회절 단층 촬영 (ODT) 기술을 이용해 통풍 관절염 환자 유래 관절 활액에서 굴절률 분포를 측정하여 요산염 결정의 효과적이고 정확한 검출 및 3차원 시각화가 가능함을 확인하였는바, 본 발명에 따른 요산염 결정의 검출 및 시각화 방법은 피검자 유래 생물학적 시료의 3차원 굴절률 분포를 광학적으로 측정함으로써 굴절률 값이 1.383 이상인 영역의 구분을 통해 요산염 결정의 검출이 가능하고, 나아가 요산염 결정에 의해 유발되는 통풍을 포함한 관련 질환을 진단하는데 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 요산염 (MSU) 결정 및 상기 결정이 존재하는 RAW 264.7 세포의 3차원 광학 회절 단층 촬영 (ODT) 이미지를 나타낸 것으로, 도 1a는 ODT 광학 설정을 그림으로 도시한 것이고, 도 1b는 위상 검색 알고리즘에 따라 진폭

과 위상의 회절 광학 정보를 이용하여 3차원 이미지로 나타낸 것이고, 도 1c는 1.383 이상의 굴절률 ($RI \geq 1.383$)에서 기록된 시판 MSU 결정의 이미지를 보여주는 것이며, 도 1d는 RAW 264.7 세포의 3차원 굴절률 분포를 보여주는 이미지이고, 도 1e 및 1f는 각각 50 $\mu\text{g/ml}$ MSU 결정 (도 1e) 및 200 $\mu\text{g/ml}$ MSU 결정 (도 1f)을 RAW 264.7 세포에 처리한 이미지를 나타낸 것이다.

도 2는 인간 단핵구 THP-1 세포의 3차원 홀로토포그래픽 이미지를 나타낸 결과로서, 도 2a는 THP-1 세포의 3차원 이미지이고, 도 2b는 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 (phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA)를 72시간 동안 처리한 후 THP-1 세포로부터 분화된 대식세포의 3차원 이미지이며, 도 2c는 THP-1 세포에 10 $\mu\text{g/ml}$ MSU 결정을 처리한 후 2시간 동안 20분 간격으로 시간 경과에 따른 세포의 이미지를 나타낸 것이다.

도 3은 LPS의 존재 또는 부재하에 MSU 결정을 처리한 THP-1 세포에서 IL-1 β 및 HMGB1의 생성량을 측정한 결과로서, 도 3a는 THP1-HMGB1-lucia 세포에서 MSU 결정 처리 후 각각 3시간 및 24시간에 ELISA로 IL-1 β 의 농도를 측정한 결과이고, 도 3b는 THP1-HMGB1-lucia 세포에서 MSU 결정 처리 후 각각 3시간 및 24시간에 루시페라아제 분석을 통해 HMGB1의 농도 변화를 측정한 결과이다.

도 4는 통풍 관절염 환자 유래 MSU 결정을 시판되는 MSU 결정과 비교한 결과로서, 도 4a는 환자에서 추출한 MSU 결정이 내부에 존재하는 세포의 3차원 홀로토포그래픽 이미지이고, 도 4b는 홀로토포그래픽 영상을 사용하여 통풍 환자의 MSU 결정을 광범위한 영역에서 모니터링한 결과이며, 도 4c는 환자 유래 MSU 결정 및 시판되는 MSU 결정의 길이 및 직경을 정량적으로 비교한 결과이다.

도 5는 통풍 관절염 환자 유래 MSU 결정의 복굴절 특성을 분석한 결과로서, 도 5a는 굴절률 측정에 따른 MSU 결정의 3차원 홀로토포그래픽 이미지를 나타낸 것이고, 도 5b는 편광 필터의 90° 각도 차이에서 측정된 복굴절의 MSU 결정의 편광 대비 이미지이며, 도 5c는 통풍 환자의 활액 유래 활액대식세포의 3D 홀로토포그래픽 이미지이고, 도 5d는 편광 필터의 90° 각도 차이에서 측정된 복굴절의 MSU 결정을 포함하는 대식세포의 편광 대비 이미지를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명자들은 ODT 기술을 통해 MSU 결정에 대한 굴절률 범위를 확인하였고, 굴절률 분포를 측정함으로써 MSU 결정만을 효과적이고 특이적으로 구별 및 검출 가능함을 확인하였는바, 이로써 본 발명을 완성하였다.
- [0024] 이에, 본 발명은 (a) 피검자 유래 생물학적 시료의 3차원 굴절률 (refractive index) 분포를 광학적으로 측정하는 단계; 및
- [0025] (b) 상기 측정된 굴절률 분포를 이용하여 굴절률 값이 1.383 이상인 영역을 구분하는 단계를 포함하는, 요산염 (monosodium urate) 결정의 검출 및 시각화 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어, “요산염 (monosodium urate) 결정”은 날카로운 크리스탈 같은 바늘 모양의 구조물로, 신장에서 요산을 적절히 제거하지 못해 체내에 요산 (uric acid)이 축적되어 생성되며 이러한 상태를 고요산혈증 (hyperuricemia)이라고 한다. 요산염 결정은 관절 및 주위 조직에 축적되어 심한 통증 및 염증을 일으키게 되어 통풍의 주요 원인으로 알려져 있다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어, “굴절률 (Refractive index)”이란 투명한 매질로 빛이 진행할 때, 광속이 줄어드는 비율이다. 진공과 샘플을 통과하는 빛의 속도 차이에 의한 시료의 정보를 얻는 데 사용되는 고유한 광학 파라미터이다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 요산염 결정의 시각화는 피검자 유래 생물학적 시료 내 요산염 결정의 3차원 굴절률 분포를 광학적으로 측정하여, 측정된 3차원 굴절률 분포를 기반으로 요산염 결정의 존재 유무, 나아가 형태, 길이 및 직경 정보와 같은 정량적 정보를 결정하기 위한 3차원 이미지를 생성하는 것을 의미할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서는 구체적인 실시예를 통해 상기 요산염 결정에 대한 고유의 굴절률을 광학적 방법으로 측정하였고, 실제 통풍 관절염 환자에서 관절 활액을 채취하여 굴절률 측정을 통해 요산염 결정을 특이적으로 검출할 수 있음을 실험적으로 확인하였다.
- [0030] 본 발명의 일실시예에서는, 광학 회절 단층 촬영 (Optical Diffraction Tomography; ODT)을 이용해 합성된 MSU 결정 및 대식세포의 굴절률을 측정하고 3차원 이미지로 재구성하였다. 그 결과, MSU 결정은 1.383 이상 1.44 이하의 굴절률 범위 ($1.383 \leq RI \leq 1.44$)를 갖는 미세 막대 구조임을 확인하였고, 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포는 1.35 ~ 1.38의 굴절률 범위를 갖는 원형 형태임을 확인하였다. 또한, RAW 264.7 세포에 MSU 결정을 각각

상이한 농도 (50 및 200 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 경우에도 MSU 결정은 대식세포와 구별되는 고유한 높은 굴절률 범위를 나타내어 ODT를 이용한 굴절률 측정을 통해 MSU 결정을 검출할 수 있음을 알 수 있었다 (실시예 2 참조).

- [0031] 본 발명의 다른 실시예에서는, 인간 단핵구 세포인 THP-1 세포를 대식세포로 분화시켜 살아있는 대식세포와 MSU 결정의 동적 이미지를 모니터링하였고, MSU 결정은 형태학적 변화를 일으키는 인간 대식세포에서도 식별 가능함을 확인하였다 (실시예 3 참조).
- [0032] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, THP-1 세포와 MSU 결정의 상호작용 기전을 조사하기 위해, MSU 결정 처리 후 3시간 및 24시간에 IL-1 β 와 HMGB1의 농도를 측정된 결과, LPS의 처리유무에 관계 없이 MSU 결정이 처리된 THP-1 세포에서 염증 반응을 촉진시키는 IL-1 β 및 HMGB1의 발현이 현저히 증가하는 것을 확인하였다 (실시예 4 참조).
- [0033] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 통풍 환자에서 관절 활액을 채취하여 상기 굴절률 범위에서 요산염 결정을 쉽게 검출할 수 있음을 확인하였으며, 환자의 관절 활액 유래 MSU 결정과 합성된 MSU의 길이 및 직경을 정량적으로 비교하여 통풍 환자의 활액에서 추출된 MSU 결정이 더욱 짧고 얇은 형태임을 알 수 있었다 (실시예 5 참조).
- [0034] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, ODT의 광원에 편광 필터를 삽입하여 ODT 기술을 이용해 MSU 결정의 3차원 구조뿐만 아니라 복굴절로 MSU 결정을 인식할 수 있는지 분석한 결과 복굴절을 통해 MSU 결정을 확인하였다 (실시예 6 참조).
- [0035] 이에, 본 발명에 있어서 상기 단계 (b)는 바람직하게 굴절률 값이 1.383 이상 1.44 이하인 영역을 구분함으로써 요산염 결정을 특이적으로 검출 및 시각화할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 상기 특정 굴절률 값으로 구분된 영역을 이용하여 살아있는 세포 내 요산염 결정을 3차원으로 시각화함으로써 형태정보, 길이 정보 및 직경 정보 중 적어도 하나 이상 정보를 추출하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서, 상기 시료의 굴절률 측정은 광학 회절 단층 촬영 (optical diffraction tomography; ODT)을 통해 수행될 수 있다.
- [0038] 상기 광학 회절 단층 촬영은 3차원 홀로그래픽 현미경을 이용하여 얇고 투명한 샘플을 통과하는 레이저의 굴절률 (RI)을 사용하는 정량 위상 이미징 (QPI) 기술이다. 이는 엑스선 전산화 단층 촬영 (X-Ray CT)의 원리와 유사한 기본 원리를 가지는데, 시편에 여러 각도로 X-Ray 빔을 조사하고, 촬영된 여러 장의 2차원 영상을 복원하여 3차원 흡수율 분포 영상을 얻게 되는 것이다. 단, X-ray CT는 주로 생체 조직의 X-ray 흡수율 분포를 측정하는데 반해, ODT는 시편의 3차원 굴절률을 획득한다는 차이가 있다. ODT는 세포를 염색하지 않고 세포의 내부 세포소기관들을 관찰할 수 있고, 굴절률 자체를 정량적으로 측정함으로써 세포의 질량을 측정할 수 있어 생물학적 샘플의 부피, 질량, 단백질 농도 등을 정량적으로 측정할 수 있다. 또한, 적혈구 및 백혈구와 같은 더 복잡한 내부 구조를 가진 진핵세포에 적용되어 세포의 사멸 과정을 측정할 수 있어 암세포 사멸, 약물 반응 등에 큰 연관이 있는 분야에 대한 응용이 보고되어 있다. 그러나 임상 검체의 진단 용도로는 보고된 바가 없다.
- [0039] 이에, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 피검자 유래 생물학적 시료에서 3차원 굴절률 (refractive index) 분포를 측정하는 굴절률 측정부; 및 상기 측정된 굴절률 분포가 특정 범위에 속하는지 여부로 상기 시료 내 요산염 결정 존재를 결정하는 결과 판독부를 포함하는, 검출 시스템을 제공하며, 정보 출력부를 더 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 굴절률 측정부는 결과 산출을 위해 필요한 3차원 굴절률 (refractive index) 분포를 측정하기 위한 구성으로, 광원, 간섭계 및 측정부를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 레이저 (laser) 등의 간섭성이 좋은 광원을 이용하여 시료 내로 광을 조사하고, 다양한 입사각으로 시료로 입사되는 광이 시료 내 포함된 대식세포 또는 요산염 결정에 의해 회절된 후 이를 투과한 광을 간섭계를 이용하여 측정할 수 있다. 이를 위해, 광학 회절 단층 촬영 기법 (optical diffraction tomography, ODT) 등의 기법을 이용하여 3차원 굴절률 분포를 광학적으로 측정할 수 있으며, 바람직하게는 편광 필터가 추가로 삽입된 HT-2H 장비를 이용할 수 있다.
- [0041] 상기 결과 판독부는 상기 굴절률 측정부에서 측정된 3차원 굴절률 분포 결과를 판독하여 시료 내 요산염 결정의 존재 여부를 결정하기 위한 구성으로서, 보다 구체적으로는 굴절률 값이 1.383 이상, 더 바람직하게는 1.383 이상 1.44 이하인 영역이 존재하는 경우, 시료 내 요산염 결정이 존재하는 것으로 최종 결정할 수 있다.
- [0042] 상기 정보 출력부는 3차원 굴절률 분포를 통해 확인된 요산염 결정에 대한 추가 정보를 추출하기 위한 구성으로

서, 추출된 결정의 형태, 길이 및 정보 중 적어도 하나 이상의 정보를 정량하여 추출할 수 있다.

[0043] 전술한 시스템은 스마트기기, PC, 네트워크상의 서버 등과 같이 다양한 형태 중 어느 하나일 수 있다. 다른 측면에서 상기 시스템은 저장장치, 메모리, 인터페이스 장치, 통신 장치, 출력장치 등을 더 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 요산염 결정의 검출방법을 이용하여 피검자 유래 생물학적 시료에서 요산염 결정을 검출하는 단계를 포함하는, 통풍 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0045] 본 발명에 있어서, 생물학적 시료는 요산염 결정이 존재할 수 있는 시료라면 구체적으로 한정되지 않으며, 바람직하게는 인간을 포함한 포유동물 유래 조직 또는 관절액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명에서 사용되는 용어, “통풍 진단을 위한 정보제공방법”은 진단을 위한 예비적 단계로써 통풍의 진단을 위하여 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것이며 의사의 임상학적 판단 또는 소견은 제외된다.

[0048] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[실시예 1. 실험준비 및 실험방법]

1-1. 세포 배양 및 분화

[0053] 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 (ATCC[®] TIB-71[™]) 및 인간 단핵구 세포주 THP-1 (InvivoGen[®] THP-HMGB1-Lucia[™])을 이용하여 스크리닝을 진행하였다. 요산염 결정 (Monosodium urate crystal; MSU crystal)은 InvivoGen에서 구입하였다. RAW 264.7 세포는 10% 소태아혈청 (FBS), 1% 페니실린 및 1% 스트렙토마이신이 보충된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지 (Welgene[®])에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 상기 배양된 RAW 264.7 세포 (1×10⁵)를 TomoDish (Tomocube[®])에서 계대 배양하고 37℃, 5% CO₂를 유지하면서 TomoChamber (Tomocube[®])에서 배양하였다. 이후 RAW 264.7 세포에 HT-2H (TomoCube[®])를 사용하여 MSU 결정을 처리한 후 모니터링하였다.

[0054] 단핵구 THP-1 세포는 10% FBS, 1% 페니실린, 1% 스트렙토마이신 및 1mM HEPES 버퍼 (Welgene[®])가 보충된 RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, Gibco[®], GlutaMAX[™]) 배지가 포함된 T-75 플라스크에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 이후 부유 단핵구 THP-1 세포를 회수하여 1100rpm에서 3분 동안 원심분리하였고, 상층액을 제거한 다음 세포를 재현탁하고 T-75 플라스크에서 3일 동안 배양하였다. 상기 단핵구를 대식세포로 분화시키기 위해, THP-1 세포 (1×10⁵)를 100ng/ml의 포볼12-미리스테이트 13-아세트산 (phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA), 100 μg/ml의 노모신 (Normocin, InvivoGen) 및 100 μg/ml의 제오신(Zeocin, Invitrogen)이 포함된 배양 배지를 이용해 TomoDish에서 72시간 동안 배양하였다. 이후 상기 분화된 THP-1 대식세포를 PBS (pH 7.4, Welgene)로 3회 세척하고, HT-2H를 사용하여 MSU 결정을 처리한 후 TomoChamber에서 배양하면서 모니터링하였다.

1-2. HT-2H를 이용한 광학 회절 단층 촬영 (Optical diffraction tomography)

[0057] 광학 회절 단층 촬영 (Optical diffraction tomography; ODT)은 간략히 하기와 같은 과정으로 진행되었다. Mach Zehnder 간섭계 현미경 (interferometric microscope)을 기반으로 한 상용화 HT-2H를 이용하여 세포의 3차원 (3-D) 형태를 획득했다. 세포의 3차원 이미지는 2차원 굴절률 (refractive index; RI) 분포의 재구성성을 통해 세포의 굴절률 (RI) 분포를 기반으로 구성되었다. 또한 복굴절의 요산염만을 감지하기 위하여 HT-2H에 편광 필터를 추가로 삽입함에 따라서 편광현미경으로 측정 가능한 요산염의 복굴절률 확인하였다. 내장된 TomoStudio (TomoCube[®])를 사용하여 획득한 굴절률 정보에 따라 세포를 렌더링했다. MSU 결정의 길이와 직경은 TomoStudio를 사용하여 3D로 구성된 이미지를 이용해 계산되었다.

1-3. HMGB1 및 IL-1β 정량화를 위한 루시퍼레이즈 어세이 및 ELISA 분석

[0060] THP1-HMGB1-Lucia[™] 단핵구를 25ng/ml의 PMA 존재 하에 96-웰 플레이트에 웰 당 1×10⁵ 밀도로 분주하여 37℃,

5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 이후 활성화된 THP-1 단핵구에 10ng/ml LPS (lipopolysaccharides, L4391, Sigma-Aldrich)가 존재 또는 존재하지 않는 조건에서 MSU 결정을 각각 25, 50, 100, 200 또는 400mg/ml 농도로 처리하였고, 배양 후 3시간 및 24시간에 각 샘플의 상층액을 수집하여 루시퍼레이스 어세이 또는 ELISA 분석을 실시하였다. 보다 구체적으로 QUANTI-LucTM (InvivoGen, rep-qlc1) 용액 또는 IL-1 β 인간 ELISA 키트 (Invitrogen)를 이용해 분석을 진행하고 Flexstation 3 microplate reader (Molecular devices, LLC, San Jose, CA, USA)를 통해 발광 (Luminescence) 또는 광학 밀도를 측정하여 루시퍼레이스 활성 또는 배양배지에서 THP-1의 항체 농도를 측정 및 분석하였다.

[0062] 1-4. 관절 흡인 및 결정 준비

[0063] 통풍성 관절염 (gouty arthritis)으로 진단받은 환자에서 서면 동의를 얻고, 무릎 관절에서 활액 (Synovial fluid)을 흡인하였다. 상기 흡인된 활액을 1300rpm에서 10분간 원심분리 (Fleta 5, Hanil Scientific, Inc.)하고, 세포 펠렛을 90% FBS 및 10% DMSO (Amresco, Inc.)로 구성된 세포 동결 배지에 재현탁시켰다. 이후 1ml 배지에 1×10^5 세포가 포함된 샘플을 -80°C 액체 질소에 저장하였으며, 이후 보관된 샘플을 해동하고 HT-2H를 사용하여 ODT로 모니터링하였다.

[0065] 실시예 2. 합성 MSU 결정 및 마우스 RAW 264.7 대식세포의 시각화

[0066] 3차원 ODT 광학 설정은 도 1a에 그림으로 도시하였다. 굴절률 (RI)은 도 1a에서 볼 수 있는 바와 같이 편광 필터를 삽입하여 ODT (TomoCube, HT-2H)를 이용해 MSU 결정 및/또는 대식세포를 투과함으로써 측정되었다. Mach-Zehnder 간섭계 현미경을 기반으로 한 2차원 이미지는 조명의 순차적 스캔 각도에서 측정되었다. 또한 도 1b에 나타난 바와 같이 위상 검색 알고리즘에 따라 진폭과 위상의 회절 광학 정보를 이용하여 3차원 이미지를 재구성하였다. 3차원 ODT 이미지가 세포에서 MSU 결정을 구별할 수 있는지를 확인하기 위해, 시판되는 MSU 결정에 대하여 굴절률을 측정하여 상기 결정의 굴절률 분포 및 형태를 분석하였다. 그 결과, 도 1c에서 볼 수 있는 바와 같이 MSU 결정은 넓은 굴절률 범위 ($1.383 \leq RI \leq 1.44$)로 미세 막대 (microrod) 구조를 가지며 세포 배양 배지에서 무작위적으로 분포되어 있는 것으로 나타났다.

[0067] 대식세포에 대한 농도 의존적 세포 효과를 모니터링하기 위해, 도 1d에 나타난 바와 같이 마우스 RAW 264.7 세포의 굴절률 정보를 얻어 대조군으로 하였다. RAW 264.7 세포의 굴절률 정보와 형태학적 구조에서 이미 보고된 바와 같이 3차원 굴절률 맵 (map) 이미지는 1.35 ~ 1.38의 굴절률 범위와 원형의 대식세포 형태를 보여주었다. 다음으로, MSU 결정이 RAW 264.7 세포의 형태학적 변화를 유도하는지 여부를 조사하기 위해, RAW 264.7 세포에 각각 50 및 200 μ g/ml MSU 결정을 처리하였다. 그 결과, 각각 도 1e 및 도 1f에 나타난 바와 같이 RAW 264.7에서 MSU 결정은 도 1c에서와 같이 고유한 높은 굴절률 범위를 나타내었으며, MSU 결정은 고농도의 MSU 결정에서 시각화되었다. 이러한 결과는 ODT가 굴절률 측정을 통해 MSU 결정을 검출할 수 있는 유망한 수단임을 의미하는 것이다.

[0069] 실시예 3. MSU 결정과 상호작용하는 살아있는 인간 대식세포 THP-1 세포의 동적 이미징

[0070] 본 발명자들은 인간 대식세포의 3차원 형태학적 변화에 대한 정보를 얻기 위해, 3차원 ODT를 이용하여 실시간 모니터링으로 THP-1 세포의 굴절률을 측정하였다. 측정 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 단핵구 THP-1 세포의 굴절률 분포를 통해 상기 단핵구 세포에서 부유세포의 특징인 둥근 세포 형태 및 세포 경계가 있는 핵막을 확인하였다. 나아가 단핵구 THP-1 세포는 PMA 처리를 통해 대식세포로 분화하였으며, 도 2b에서 볼 수 있는 바와 같이 세포의 접착 후 크기가 커지고 확장된 것으로 나타났다. 또한 3차원 굴절률 정보를 근거로 대식세포는 세포 질 부피가 증가된 것으로 나타났다.

[0071] 다음으로, 본 발명자들은 실시간으로 THP-1 세포에서 존재하는 MSU 결정을 관찰하기 위해 THP-1 세포를 비-표지 굴절률 측정을 통해 모니터링하였다. 도 2c의 각 프레임은 2시간 동안 단일 세포를 20분 간격으로 나타내는 것이다. 결과적으로, MSU 결정을 처리한 후 MSU 결정은 THP-1 세포에 침투되어 2시간 동안 형태학적 구조가 유지되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 MSU 결정이 형태학적 변화를 일으키는 인간 대식세포 THP-1 세포에서 결정될 수 있음을 보여주는 것이다.

[0073] 실시예 4. MSU 노출 후 THP-1 세포에서 전 염증성 단백질 생산 측정

[0074] THP-1 세포와 MSU 결정의 상호작용 기작을 조사하기 위해, MSU 결정 도입 후 3시간 및 24시간에 IL-1 β (interleukin-1 β)와 HMGB1 (high mobility group box 1)의 발현을 측정하였다. 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이 IL-1 β 는 MSU 결정의 존재 하에서 현저히 유도되는 것으로 나타났다. 더욱이 MSU 결정은 THP-1 세포가 이

미 LPS로 자극된 후에도 IL-1 β 생산을 증폭시켰다. 또한, 도 3b에서 볼 수 있는 바와 같이 400ng/ml의 MSU 결정은 HMGB1의 생성을 최대 240배까지 증가시켰으며, LPS로 자극된 THP-1 세포에서 역시 MSU 결정에 의해 HMGB1 생성이 더욱 증가한 것을 확인하였다.

[0076] **실시예 5. 통풍 환자의 활액에서 세포 결정 상호 작용**

[0077] 본 발명자들은 상기 실시예 결과들에 기반하여, 통풍 환자에서 추출한 활액에서 ODT를 이용해 MSU 결정체를 검출하여 통풍 진단에 적용할 수 있는지 여부를 조사하고자 하였다. 이에, ODT를 이용해 통풍 환자 유래 활액 내 MSU 결정을 3차원으로 모니터링한 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이 MSU 결정의 형태학적 구조에 기반하여, 환자의 요산염 결정은 미세 막대 (microrod) 구조를 보였고 높은 굴절률 정보를 확인하였다. 또한, 도 4b에서 볼 수 있는 바와 같이 ODT로 넓은 범위의 굴절률을 측정하여 MSU 결정을 쉽게 검출할 수 있음을 확인하였다. 구체적으로, 도 4b의 정사각형으로 표시된 영역에서 활액 대식세포를 확대하여 하단 이미지의 MSU 결정을 정확하게 확인했다. 확대 된 이미지에서 높은 굴절률을 나타내는 영역은 붉은 색으로 MSU 결정을 효과적으로 나타내었다.

[0078] 다음으로, 시판되는 MSU 결정과 환자의 활액에서 추출된 결정의 길이와 직경을 정량적으로 비교하였다. 그 결과, 도 4c에 나타난 바와 같이 시판되는 MSU 결정과 환자유래 결정의 길이는 각각 $8.19 \pm 4.13\mu\text{m}$ 및 $5.49 \pm 4.48\mu\text{m}$ 이고, 직경은 각각 $0.74 \pm 0.32\mu\text{m}$ 및 $0.34 \pm 0.11\mu\text{m}$ 으로 측정되었다. 이러한 결과를 통해 통풍 환자의 활액에서 추출된 MSU 결정이 시판되는 MSU 결정보다 길이가 짧고 더욱 얇은 형태임을 알 수 있었다.

[0080] **실시예 6. MSU 결정체의 복굴절 검출**

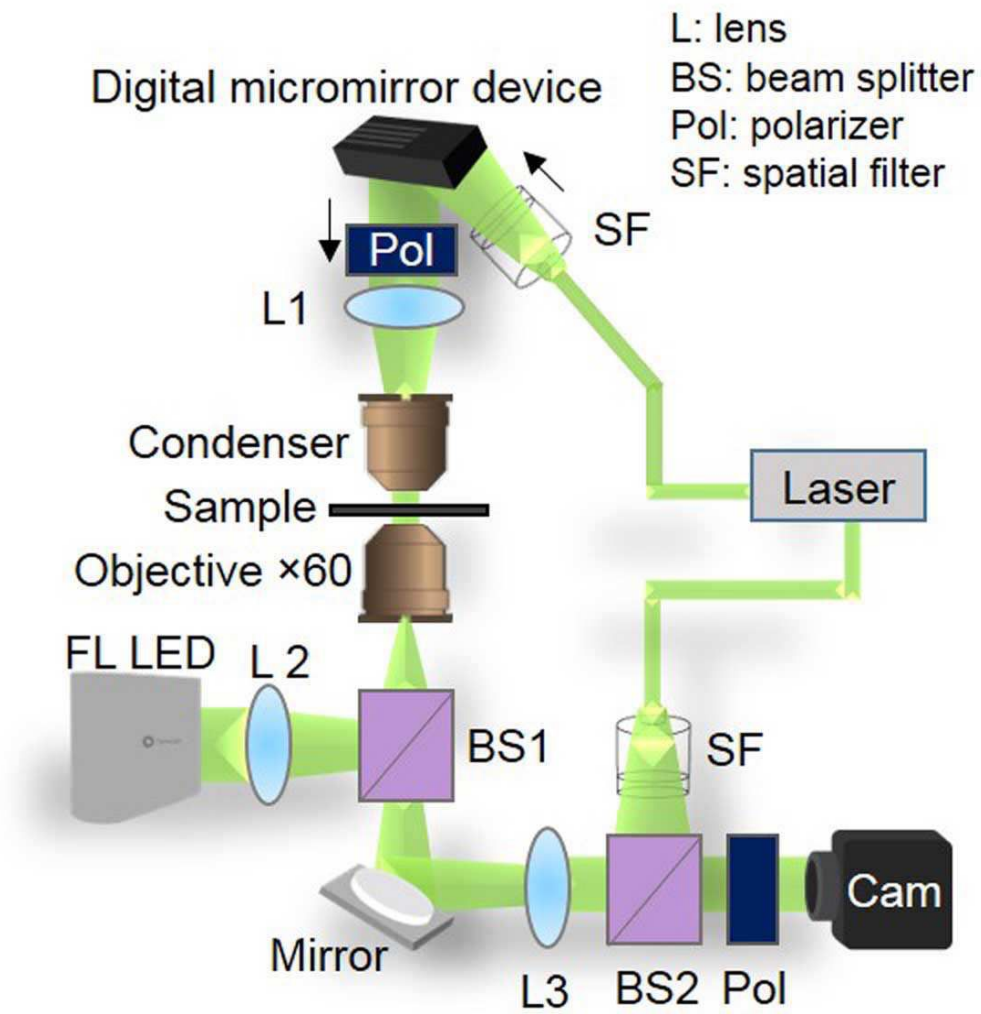
[0081] 종래에는 통풍을 진단하기 위해 편광 현미경이 사용되어왔다. 이에 본 발명자들은 ODT의 광원 끝에 편광 필터 (polarization filter)를 추가로 삽입하여 ODT를 이용해 MSU 결정의 3차원 구조뿐만 아니라 복굴절로 MSU 결정을 인식할 수 있는지 알아보하고자 하였다.

[0082] 그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이 ODT가 적용된 편광 필터로 MSU 결정의 3D 구조를 확인하였고, MSU 결정의 복굴절 특성을 확인하기 위해 편광 필터의 0° 및 90° 각도에서 MSU 결정의 편광 대비 이미지를 획득한 결과, 도 5b에서 볼 수 있는 바와 같이 각 각도에서 획득한 복굴절의 차이는 MSU 결정에서만 입증되었다. 또한 활액에서 편광 하에 대식세포의 3차원 ODT 이미지를 얻어 도 5c에 나타내었으며, 도 5d와 같이 복굴절에 따라 대식세포 내 MSU 결정만이 3차원 구조로 확인되었다.

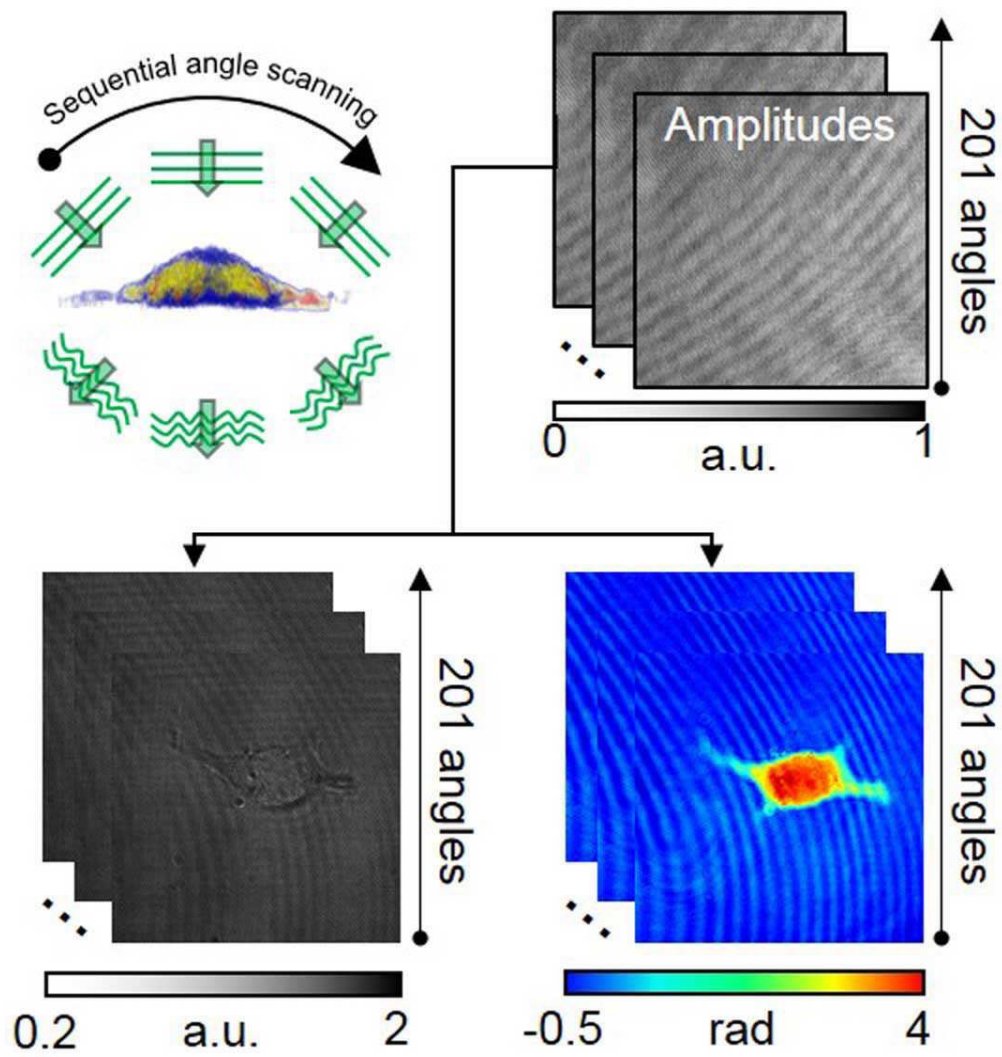
[0084] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

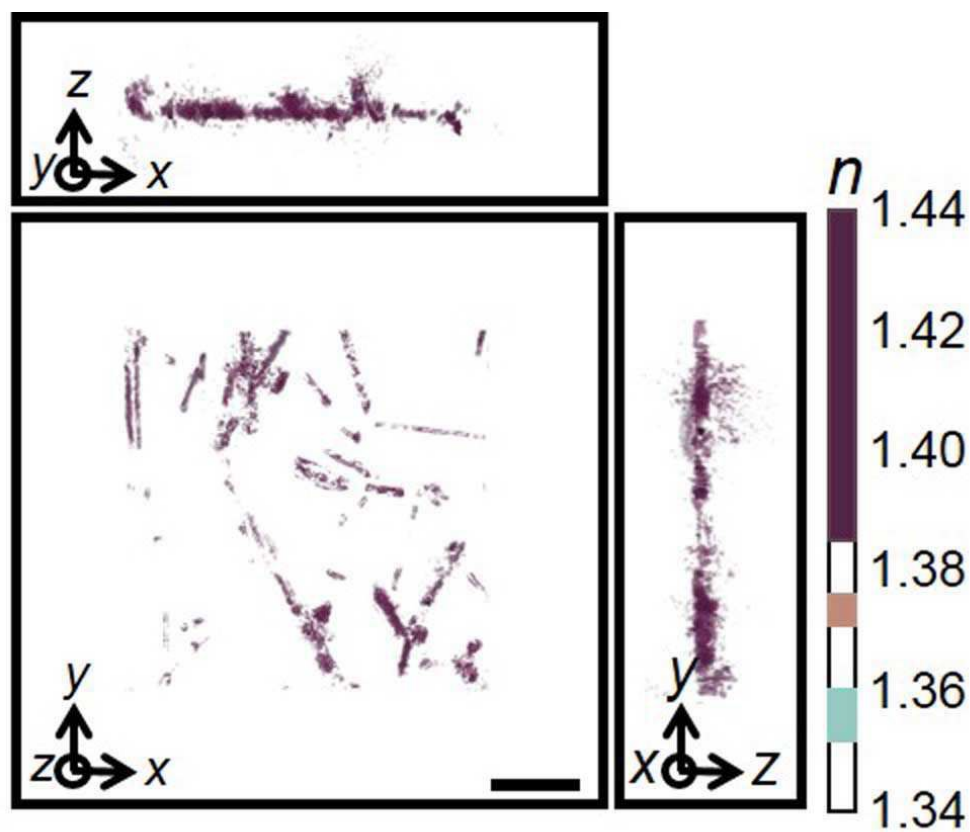
도면1a



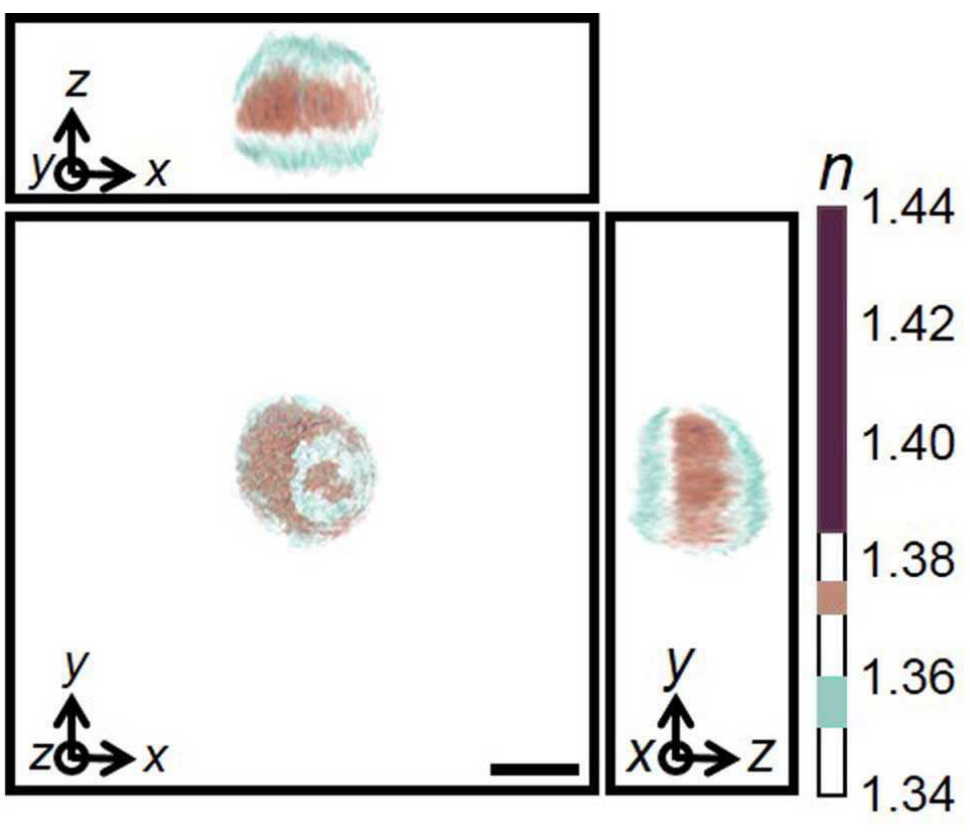
도면1b



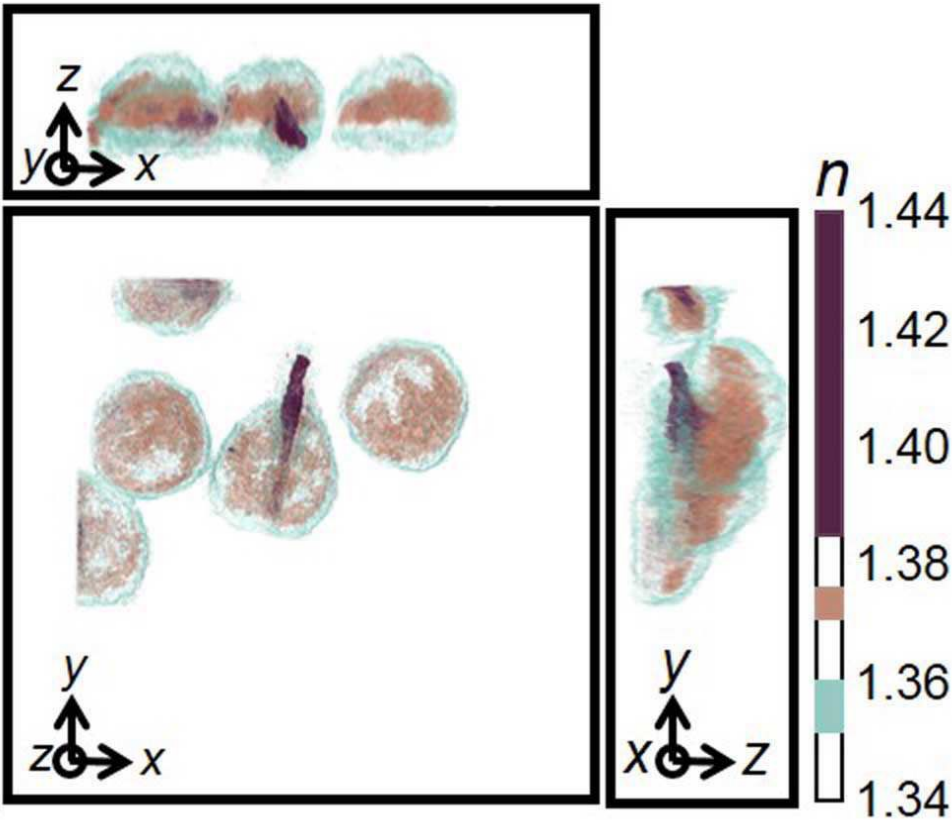
도면1c



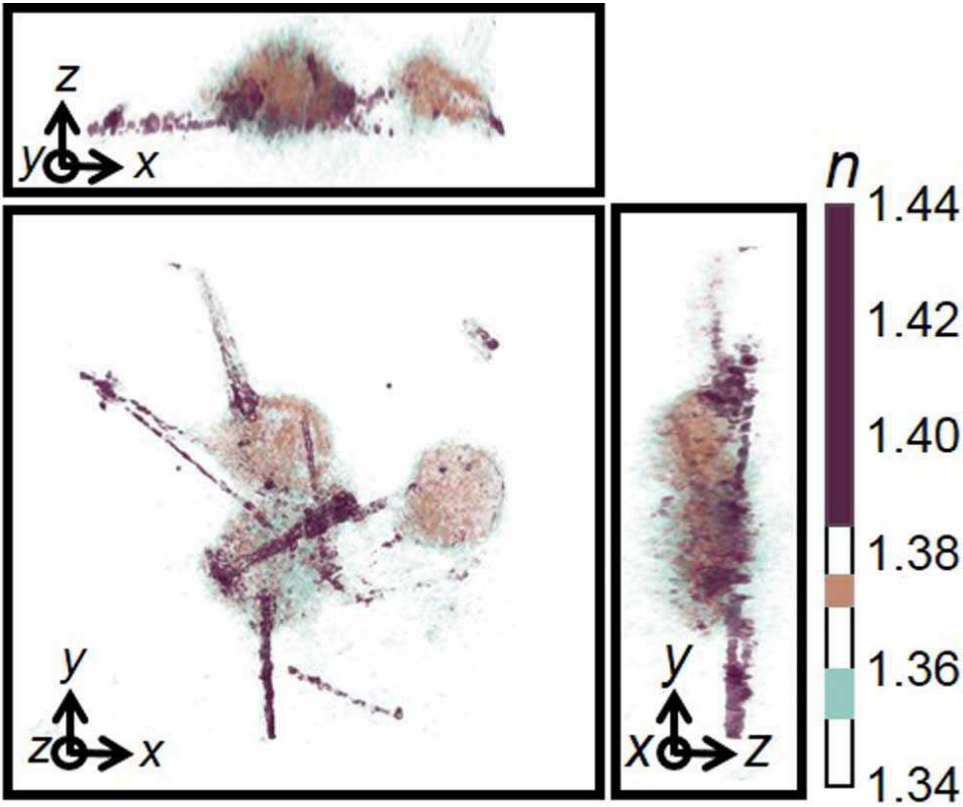
도면1d



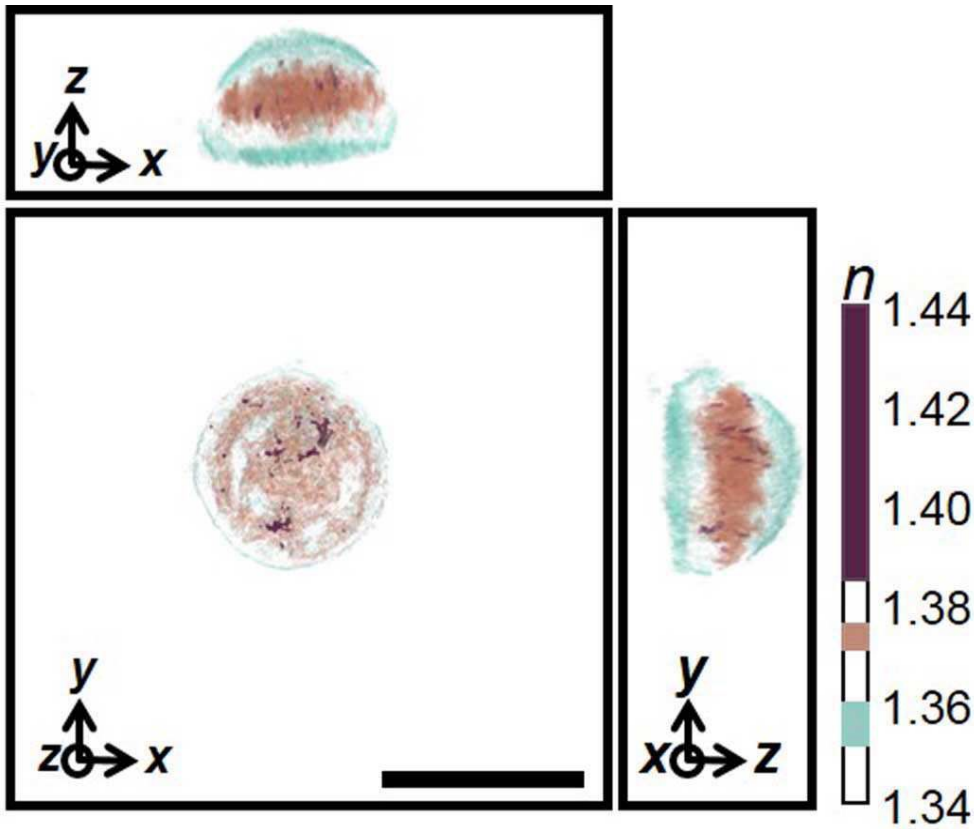
도면1e



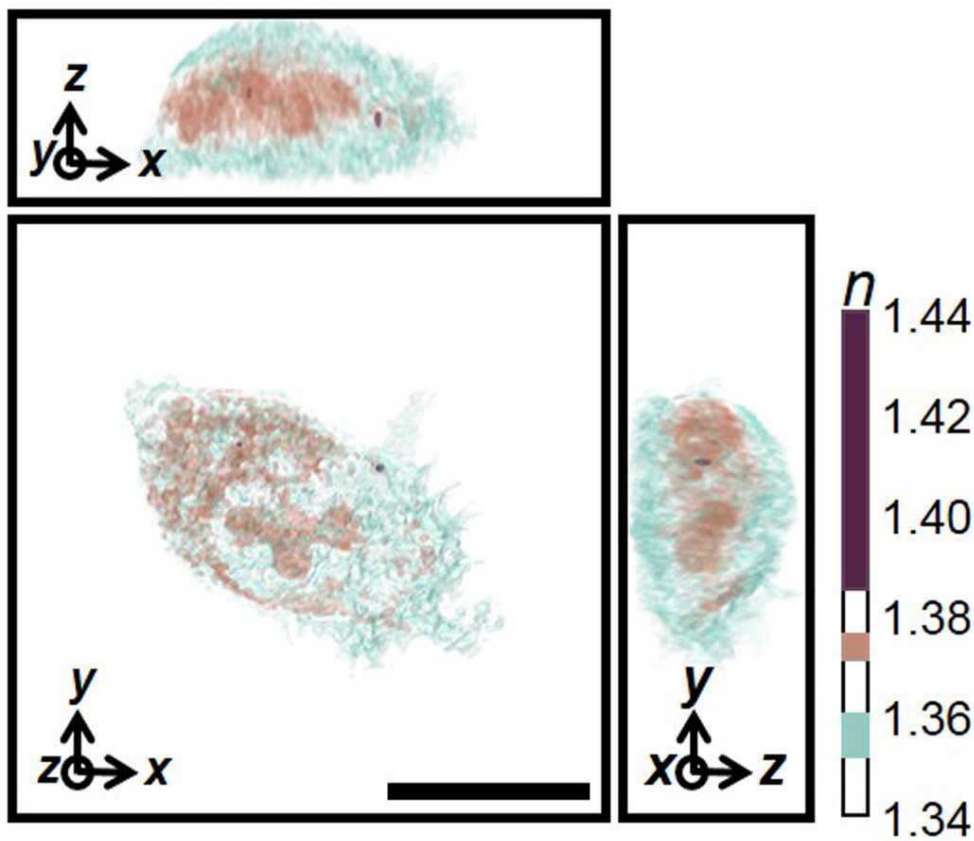
도면1f



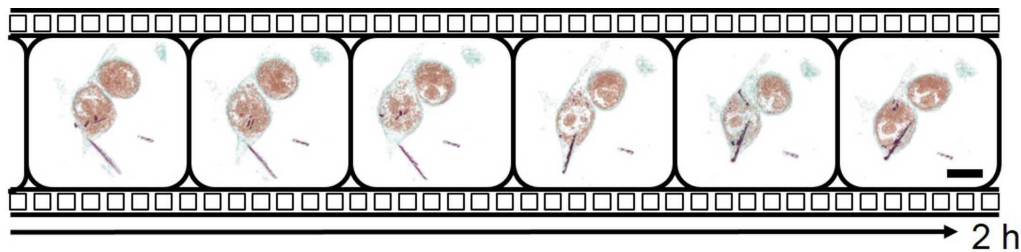
도면2a



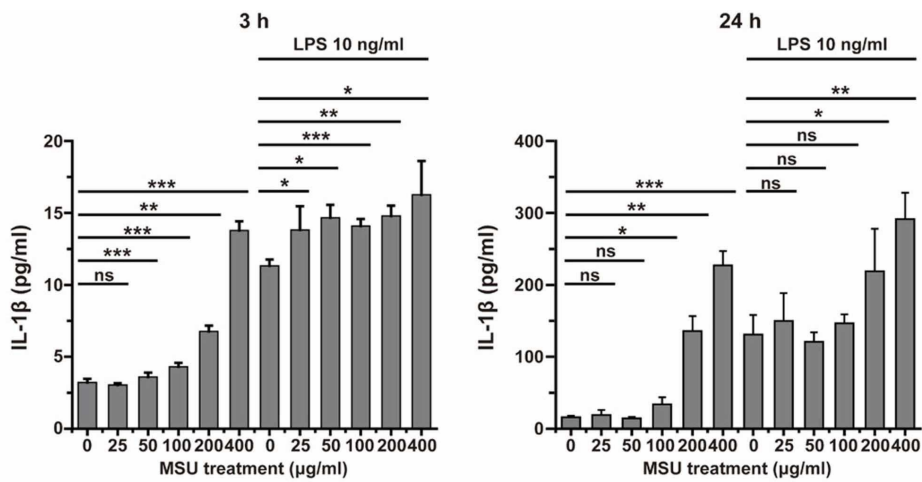
도면2b



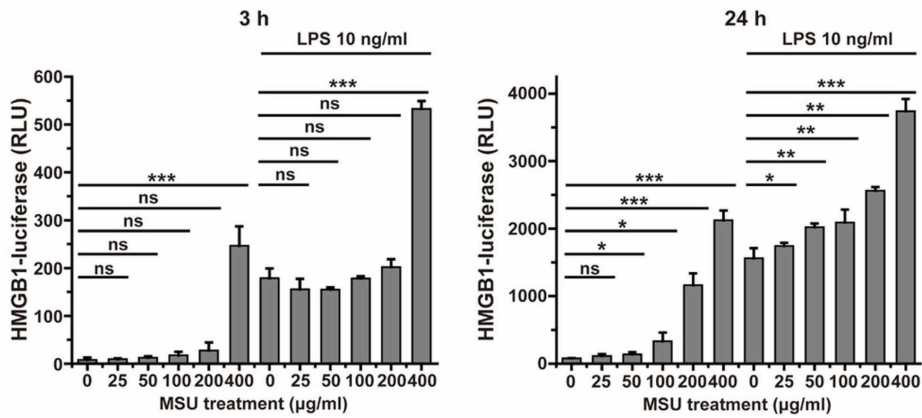
도면2c



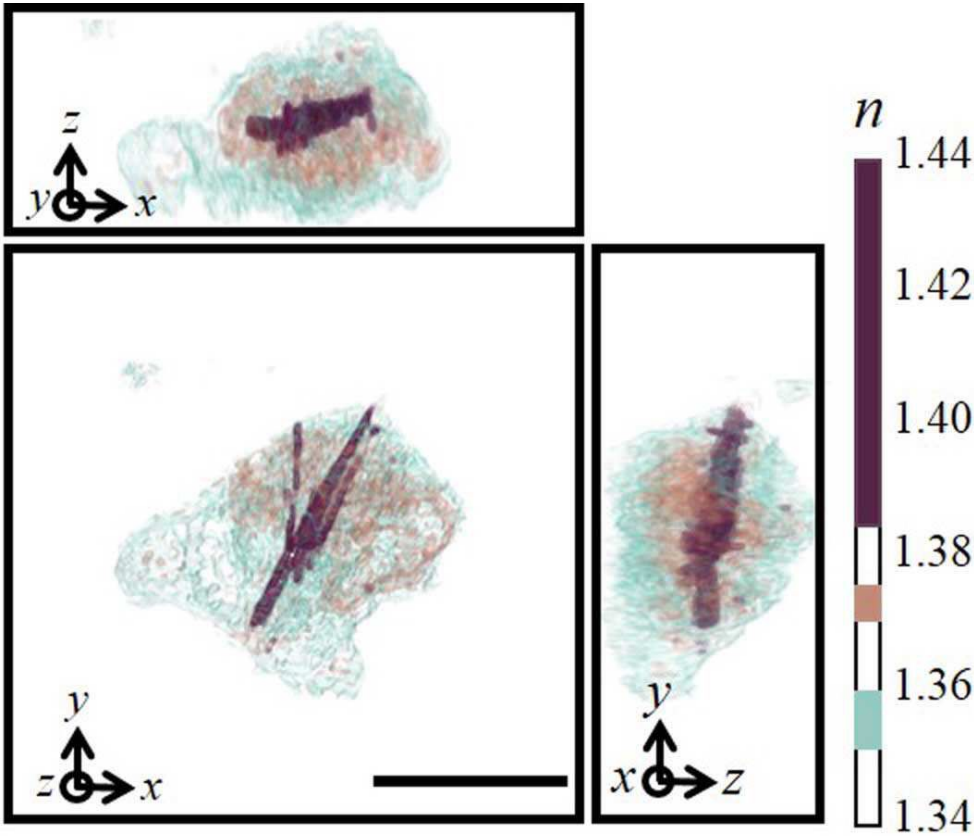
도면3a



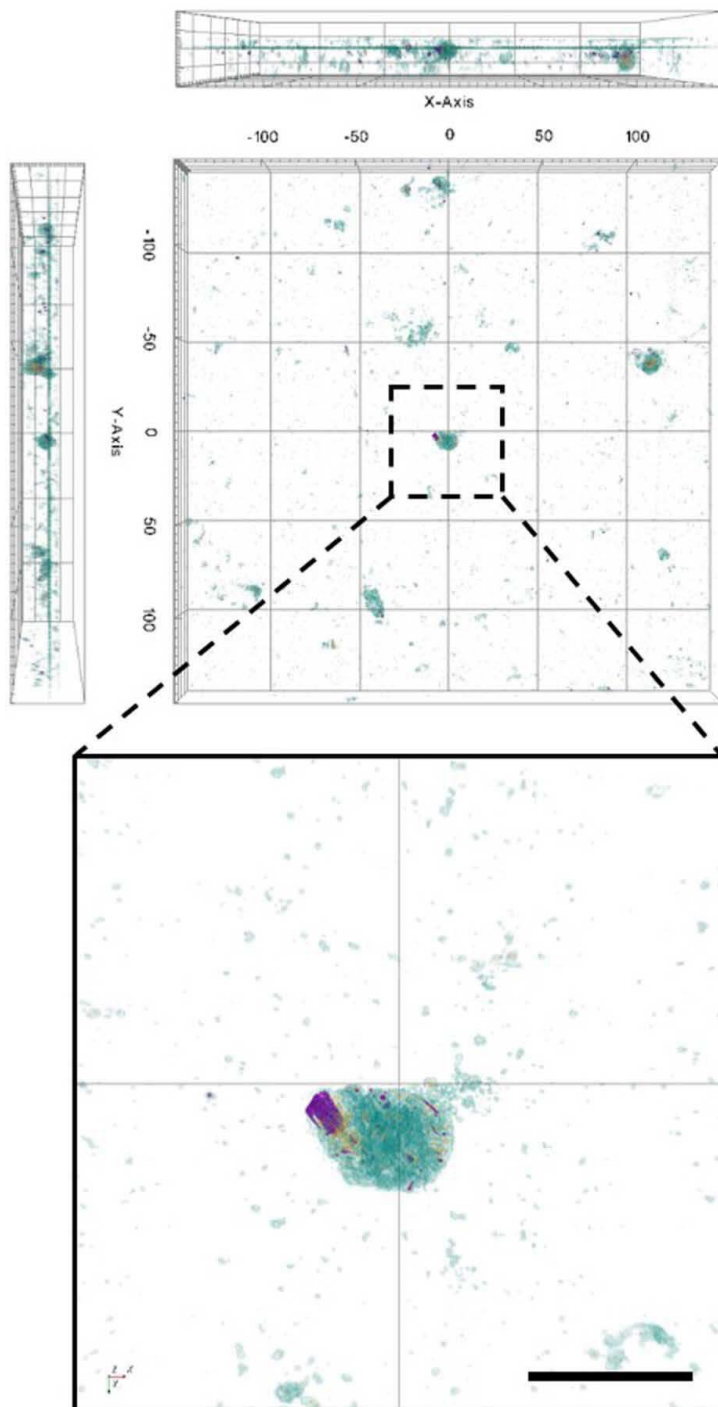
도면3b



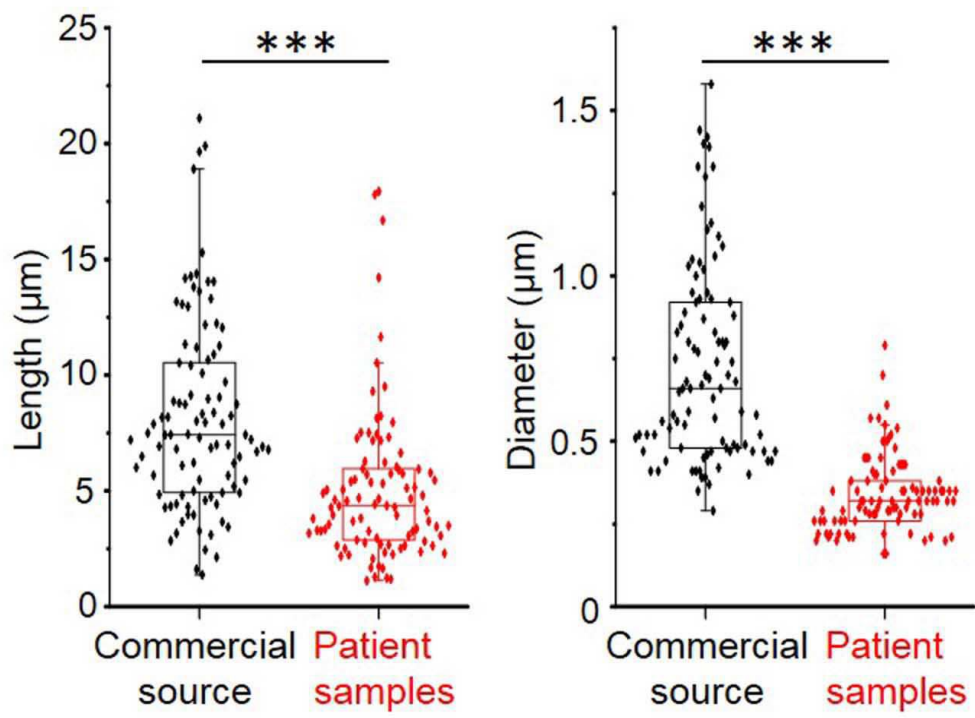
도면4a



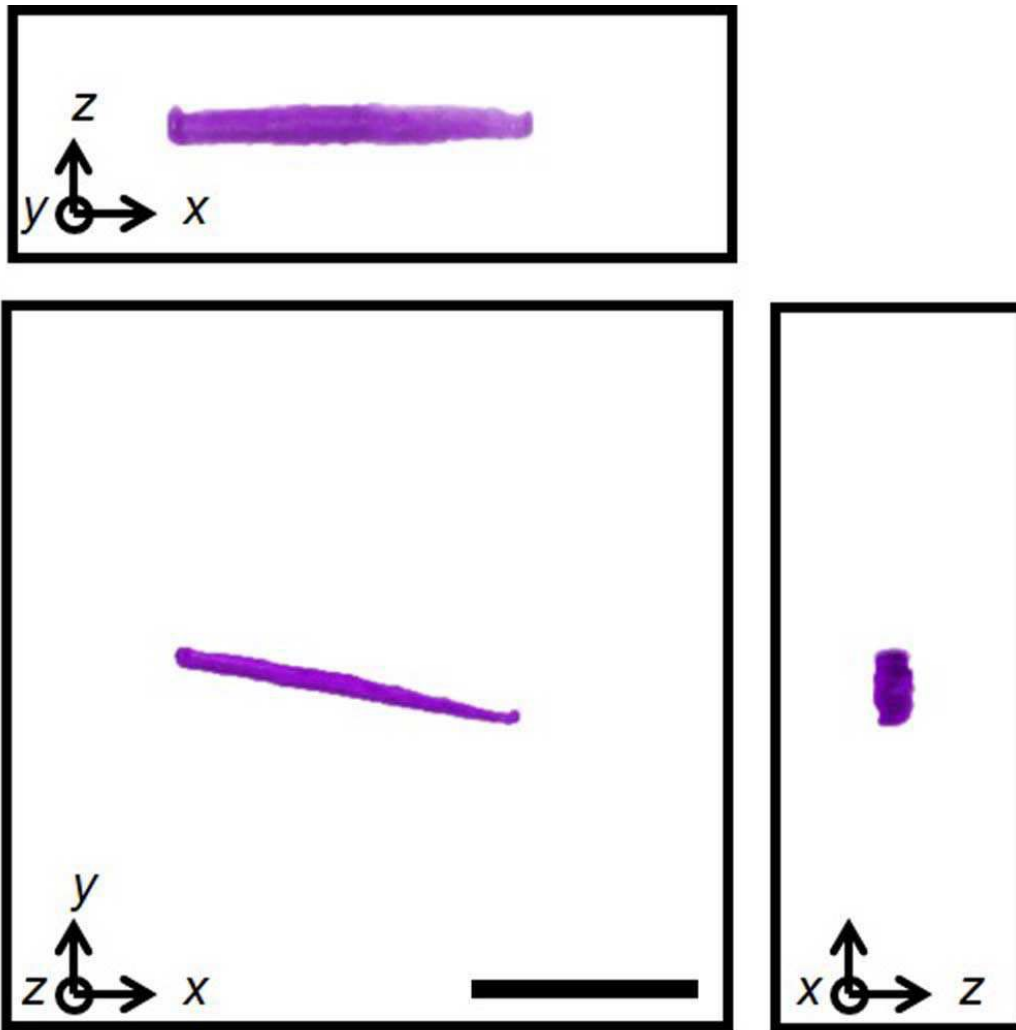
도면4b



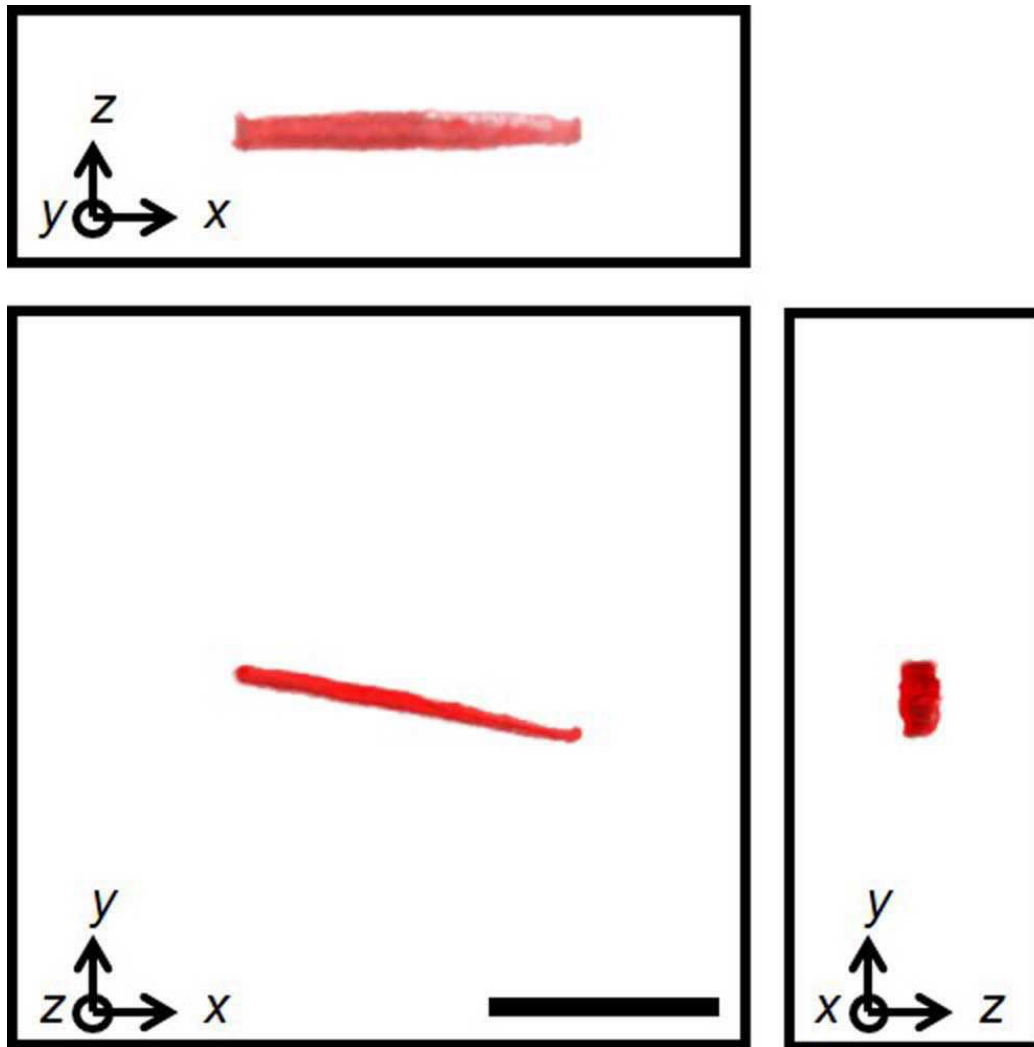
도면4c



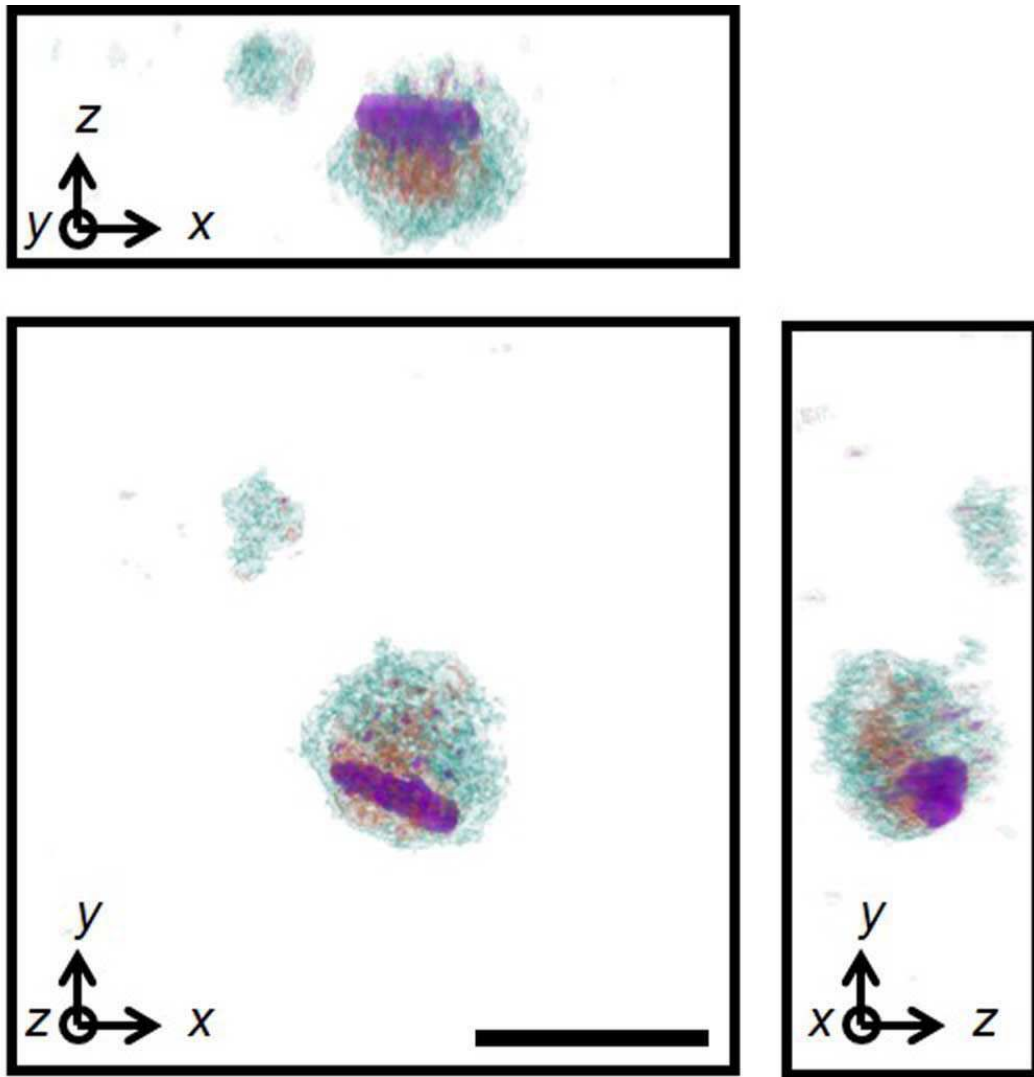
도면5a



도면5b



도면5c



도면5d

