

방사광 전파위상대조 동결미세단층촬영법을 활용한 3차원 조직학

김주현², 한성미³, 송현욱⁴, 서윤경⁵, 문용석¹, 김홍태¹

¹대구가톨릭대학교 의과대학 해부학교실, ²영주직접자병원 영상의학과, ³대구가톨릭대학교 안광학융합사업단,
⁴대구가톨릭대학교 의과대학 기생충학교실, ⁵한양대학교 의과대학 해부세포생물학교실

(2018년 9월 10일 접수, 2018년 12월 2일 수정접수, 2018년 12월 3일 게재승인)

간추림 : 조직표본의 실제적인 3차원 구조에 대한 정보를 3차원 조직학이라고 하였다. 무른 성분들이 섞여 있고, 물을 포함 하고 있는 조직 내부의 미세구조의 3차원적 분석을 위해 방사광의 X선을 광원으로 하는 위상대조 미세단층 촬영이 활용되고 있다. 하지만, X선 위상대조영상 분석에서 물을 포함하고 있는 조직에서는 위상대조가 제대로 구현 되지 않다는 것을 알게 되었다. 이러한 현상을 해결하기 위해 다양한 방법들을 적용하였으며, 표본을 얼렸을 때 위상대조가 강화된다는 사실을 확인하였다. 방사광 전파위상대조 동결미세단층촬영은 포항가속기연구소 X선 영상방라 인에서 수행하였다. 표본을 동결상태로 유지하면서 0.18° 간격으로 180° 회전하였으며, 표본을 통과한 X선에 의해 섬 광기에 맺힌 영상을 광학렌즈로 확대하여 CCD카메라로 모았다. 각 표본 전체 투사영상을 OCTOPUS 소프트웨어로 재구성하여 2차원 단면영상으로 만들고, Amira 소프트웨어를 이용하여 3차원 영상으로 재구성하였으며, 단면영상에서 각 구조에 대한 구역화와 렌더링 작업을 수행하였다. 물에 의한 위상대조 방해 영향을 줄이기 위해 표본을 얼렸을 때 위상대조는 강화되었으나 동결팽창에 의한 조직변형이 관찰되었다. 표본을 막힌 공간에 넣고 주위를 포매제로 채워 급속냉동 동안 표본이 압박되도록 하였을 때 위상대조의 강화와 동결팽창에 의한 조직변형을 줄일 수 있었다. 결론적으로, 생체조직 내부 미세구조의 비파괴, 고해상도 3차원 영상분석에 있어 조직표본을 동결포매제로 포매 후 급속냉동하고, 방사광에서 방출되는 X선을 광원으로 하는 전파위상대조 동결미세단층촬영법은 효과적인 방법이 될 수 있을 것으로 기대한다.

찾아보기 낱말 : 3차원 조직학, 방사광, 동결미세단층촬영법, X선 전파위상대조, 콜라겐유도성관절염

서 론

우리 몸을 구성하는 모든 구성요소는 그 크기에 상관없이 입체적인 구조를 하고 있으므로 제대로 된 모양을 분석하기 위해서는 3차원 영상기술이 필요하다. 사람 몸 전체와 계통에 대한 3차원 정보는 해부 시신의 맨눈 관찰, 컴퓨터 단층촬영, 자기공명영상 같은 영상기기뿐만 아니라 Visible human 영상정보의 재구성 등을 통하여 얻을 수 있다[1,2].

*이 연구는 대구가톨릭대학교 의과대학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.
저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.
교신저자 : 김홍태(대구가톨릭대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : htaekim@cu.ac.kr

현미경을 이용한 조직학적 지식들은 대부분 얇게 자른 평면을 대상으로 한 것으로, 절단면의 위치에 따라 모양이 다를 수 있어 대상 조직의 실제적인 3차원 구조를 이해하는 데 한계가 있다. 그러므로 조직표본의 실제적인 3차원 구조에 대한 정보를 제공할 수 있는 영상기법이 필요하며, 이것을 3차원 조직학(3D histology)이라고 정의하였다. 조직의 연속절편과 주사전자현미경, 공초점현미경, 광학현미경 등의 영상장비를 활용한 3차원 영상분석은 통상적인 고정과 조직처리 과정 후 대상 표본의 연속절편을 제작하고, 각 절편에 대한 2차원 영상을 하나하나 얻는 과정을 거친다. 이후 각 절편의 2차원 영상을 컴퓨터와 소프트웨어를 활용하여 3차원 재구성을 한다[3,4]. 이러한 영상처리과정은 많은 시간과 노력이 필요하며, 절편의 소실과 찢김, 불완전 절단 등

에 의한 영상 배열에 오류가 생길 수 있으며 이러한 오류는 최종적인 3차원 영상의 정확도에 심각한 문제를 일으킬 수 있다[5]. 조직 내부의 미세구조를 살아 있는 상태에 가까운 3차원적 분석을 위해서는 조직과 영상처리과정의 오류를 줄일 수 있는 비절단, 비변형, 고해상도 3차원 영상기법이 필요하다. 단층촬영(tomography)은 표본을 일정 간격으로 돌리면서 각각의 투사영상을 모아 재구성하는 것으로 조직에 인위적인 처리과정과 절단 없이 고해상도 3차원 조직학을 구현하기 적절한 영상기법이다[6]. 밀도가 비슷한 무른 성분들이 섞여 있고, 물을 포함하고 있으며, 두꺼운 조직 표본의 3차원적 분석을 위해서는 각 구성요소들을 구분할 수 있는 고해상도의 단층촬영 영상이 가능한 투과력이 높은 에너지와 짧은 파장의 광원이 필요하다. 조직학에서 통상 사용하는 가시광선은 투과력이 낮고 파장이 길어 단층촬영을 위한 광원으로 적합하지 못하다. 전자현미경의 광원인 전자빔은 높은 해상도를 구현 할 수 있으나 투과도가 너무 낮다는 단점이 있다[7]. 이용할 수 있는 전자기파에서 높은 에너지와 짧은 파장의 X선이 3차원 조직학의 단층촬영에 가장 적합한 광원으로 생각된다. 우리가 물체나 물질을 볼 수 있는 것은 광원 즉 빛과 보고자 하는 대상 사이에서 일어나는 물리적 현상들을 인식하는 것이며, 대상의 구성성분에 따라 이런 물리현상의 차이 즉 대조가 있을 때 그것들을 구분 할 수 있다. X선이 물질을 통과할 때 흡수, 굴절, 산란, 간섭 등의 현상들이 유발되며 이 현상들 각각의 대조차이를 영상에 활용 할 수 있다[8]. 임상영역을 포함한 대부분의 X선 영상은 밀도차이가 큰 물질 사이의 X선 흡수차이를 이용한다. 하지만 이러한 흡수대조는 물을 포함하고 X선 흡수도가 낮은 물렁조직이나 광학적 밀도가 비슷한 구조들이 포함된 생체조직의 영상화에는 많은 제약이 있다[9]. 그러므로 3차원 조직학을 구현하기 위해서는 기존의 흡수대조의 단점을 해결 할 수 있는 새로운 영상기법이 필요하다. X선이 물질의 가장자리에서 굴절이 커지는 것을 가장자리강화(edge enhancement)현상이라 하고, 이것을 영상에 이용하는 것을 위상대조(phase contrast)라고 한다. 실제로 위상대조는 흡수대조보다 훨씬 민감하며, 광학적 밀도가 비슷한 구조라도 가장자리에서 생기는 미세한 굴절 차이로 인해 각 구조를 구별 할 수 있어 X선 흡수도가 낮은 조직을 관찰하는데 유용한 영상기법으로 활용되고 있다[10]. X선 위상차를 이용한 다양한 영상기법들이 개발되어 있다. 시료와 검출기 사이 거리를 조절하는 전파(propagation)위상대조[11,12], 굴절강조영상(diffraction enhanced Imaging, DEI) [13], 암시야영상(dark field imaging, DFI) [14], 격자간섭계(grating interferometer)영상[15] 등이 예이다. 고해상도의 위상대조를 구현하기 위해서는 세밀한 위상차를 생성 할

수 있는 광원이 필요하다. 방사광(synchrotron radiation)은 방사광가속기에서 빛의 속도로 가속된 전자빔이 방향을 바꿀 때, 방출되는 좁은 퍼짐의 빛으로 X선, 자외선, 가시광선 적외선에 이르는 광범위한 파장영역의 빛을 포함하고 있다. 이 중에서 X-선은 그 파장이 0.1 nm 정도로 방사광에서 가장 파장이 짧은 영역이다. 3세대 방사광가속기에서 방출되는 X선은 임상에서 사용하는 음극선관에서 방출되는 X선과 물리적으로 성질은 같지만, 빛의 크기가 작고, 파면이 고르며, 결맞은 성질을 가지고 있어 높은 집속도와 공간분해능의 위상대조를 유도 할 수 있어 3차원 조직학 구현을 위한 미세단층촬영에 가장 적합한 광원이다. 우리나라에도 포항가속기연구소(pohang accelerator laboratory, PAL)에 3세대 방사광가속기가 가동 중이며, X선 영상빔라인에서 단순하면서도 높은 해상도 영상을 구현 할 수 있는 전파위상대조기법을 활용하여 생체조직표본들에 대한 단면투사영상과 미세단층촬영을 얻을 수 있었다[16,17]. 하지만, 전파위상대조영상을 분석한 결과, 물렁조직에 대한 높은 대조를 구현할 것이라는 기대와는 달리 물을 포함하고 있는 조직에서는 위상대조가 제대로 구현되지 않는다는 것을 알게 되었다. 연구자는 이러한 현상을 해결하기 위해 다양한 방법들을 적용하였으며, 표본을 얼렸을 때 위상대조가 강화된다는 사실을 확인하였다. 이 논문은 동결에 의한 위상대조 강화의 이유를 분석하고, 다양한 조직표본과 동결조건을 대상으로 한 영상을 분석하여 얻은 이상적인 동결조건을 소개하고자 하고, X선 위상대조 동결미세단층촬영이 조직 손상 없이 표본 내부 입체구조를 분석하는데 효과적인 영상기법으로의 가능성에 대해 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. X선 영상빔라인

3세대 방사광가속기인 포항가속기연구소에는 의생물학 생체표본을 대상으로 단면투사영상과 미세단층촬영이 가능한 X선 영상빔라인이 설치되어 있다. 이 연구는 포항가속기 성능개선 이전(PLS I) 7B2빔라인과 이후(PLS II) 6D 빔라인에서 수행하였다. 두 빔라인은 모두 휨자석빔라인(bending-magnet beamline)이며 에너지와 전류 수준은 각각 2.5 GeV(개선 후 3 GeV)와 100 mA이었다. 광원은 에너지 범위가 7~45 KeV인 경X선 백색광을 사용하였다. X선이 표본에 흡수되면서 생길 수 있는 방사선손상과 선속경화를 방지하기 위해 표본 앞쪽에 미세조절셔터와 실리콘 차단판을 설치하여 10 KeV보다 낮은 에너지의 X선을 걸

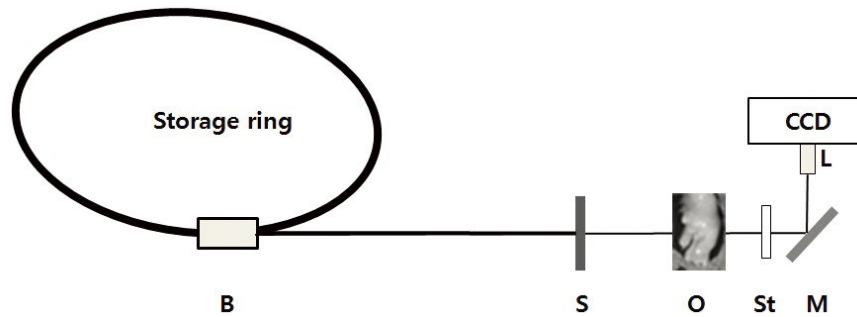


Fig. 1. Schematic drawing of the experimental setup. Unmonochromatic beam arrived from the bending magnet device (B) was reduced to the beam size for matching the scintillator after passing the slit (S). The X-ray irradiated the object (O) positioned 34.8 m away from the source. Visible-light images on the surface of CdWO₄ scintillator (St) placed at a distance of 10 cm from object were reflected at 90 degrees by a gold-coated mirror (M) and magnified by a microscope objective lens (X5-X20) (L). Finally, the images reached the CCD camera.

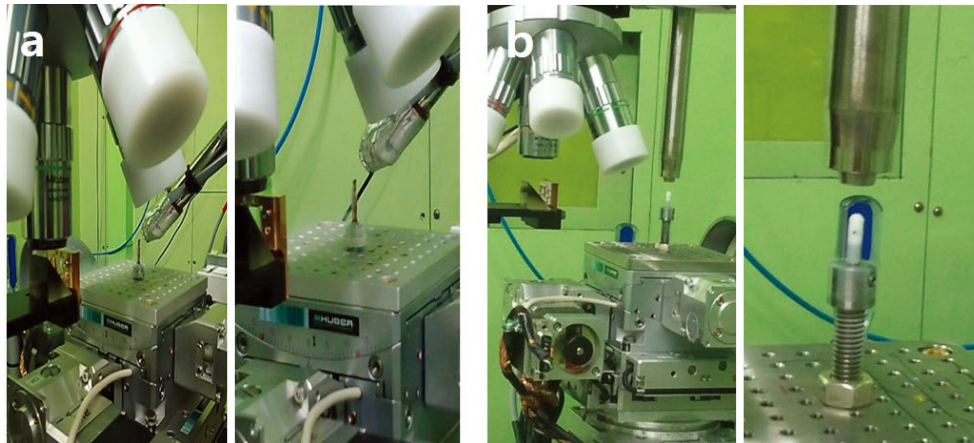


Fig. 2. Pictures of the cryo-tomography devices. (a) The sample was directly exposed to liquid nitrogen stream. (b) The sample was embedded in OCT compound.

리내었다. 단층촬영을 위해 표본을 x, y, z 축으로 미세조정이 가능한 측각기(goniometer)가 장착된 단층촬영스테이지에 올려두고 0.18° 간격으로 180° 회전하면서 1,000장의 투과영상을 모았다. 각각의 노출 시간은 100~200 ms으로 하였다. 표본을 통과하면서 위상차가 생긴 X선은 카드뮴텅스테이트(CdWO₄)막이 입혀진 섬광기(scintillator)에서 가시광선을 발생시킨다. 이때 표본과 섬광기 사이의 거리는 위상차대조가 잘 나타나는 10 cm로 유지하였다. 섬광기에 맺힌 영상을 5, 20배 광학렌즈로 확대하여 CCD카메라(Vieworks VM-11M5, Korea)로 모았다(Fig. 1). 20배 렌즈 조건에서 영상장치의 관찰창 크기는 1.7×1.1 mm이며, 픽셀크기는 0.43 μm, 공간분해능은 1.5 μm이었다.

2. 조직표본 동결처리

정상 생쥐의 간조직과 발가락관절, 류마티스관절염 모델

인 콜라겐유도관절염(collagen induced arthritis, CIA) 생쥐의 무릎관절과 발가락관절, 정상 생쥐의 안구 등을 대상으로 방사광 동결미세단층촬영을 하였다. 조직표본은 계획된 목적의 실험이 모두 끝난 후 안락사 한 동물에서 채취하였다. 조직표본은 4% formalin으로 고정한 후 단층촬영 때까지 고정액에 담아 4°C에 보관하였다. 동결미세단층촬영을 위해 조직표본을 CCD카메라의 관찰창에 맞는 크기로 자른 다음 액체질소에 급속 냉동하거나, 대롱에 넣고 주위를 OCT (Jung Leica instrument, Nussioch, Germany)로 채워 포매하고, 드라이아이스로 -70°C로 유지된 isopentane (Junsei chemical, Japan) 용액에서 급속 냉동시킨 후, 단층촬영스테이지에 올려놓았다. 동결된 표본 위로 100 K (-173°C) 질소가스를 일정한 속도로 흘러보내면서 단층촬영 동안 표본이 동결상태를 유지하고, 표본 주위에 성애가 생기지 않도록 하였다(Fig. 2). 표본을 얼렸을 때 위상대조가 증가하는지를 검증하기 위해 표본을 아가로스로 포매하여 얼리지

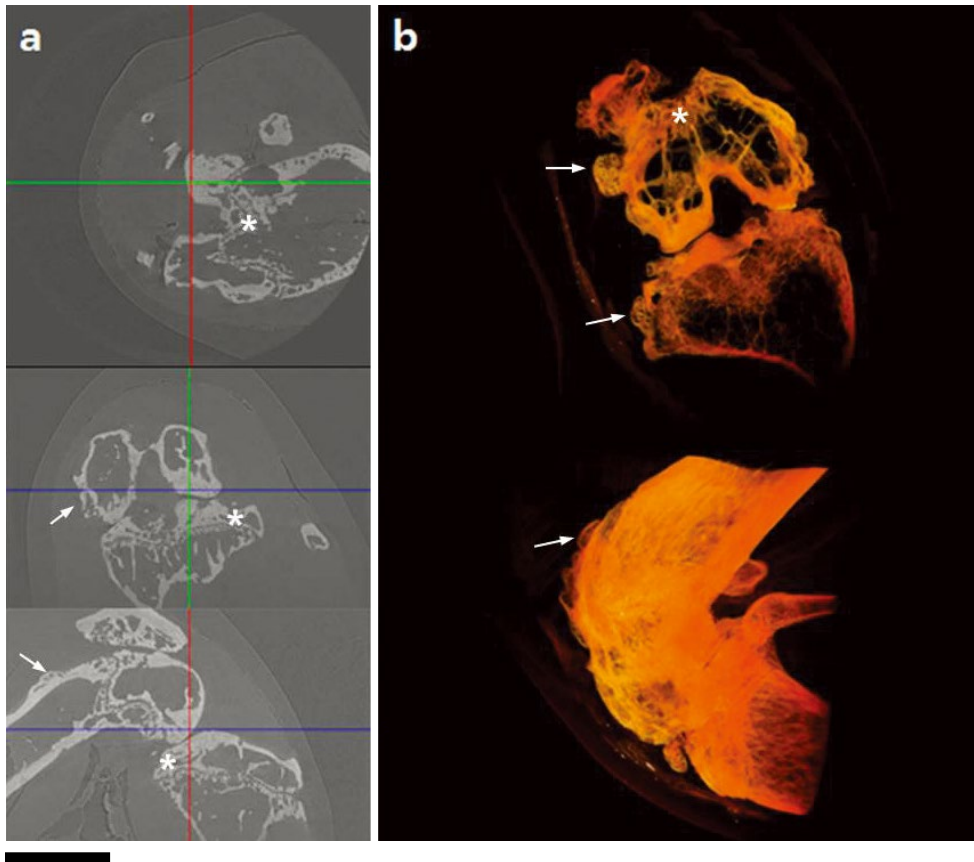


Fig. 3. Typical CT image (a) and three-dimensional micro-structural architecture (b) of the knee joint of collagen induced arthritis (CIA) mouse model. The typical findings of CIA, destructive changes in bones (*), and new bone formation (arrows), can be seen in detail. Scale bar = 1 mm

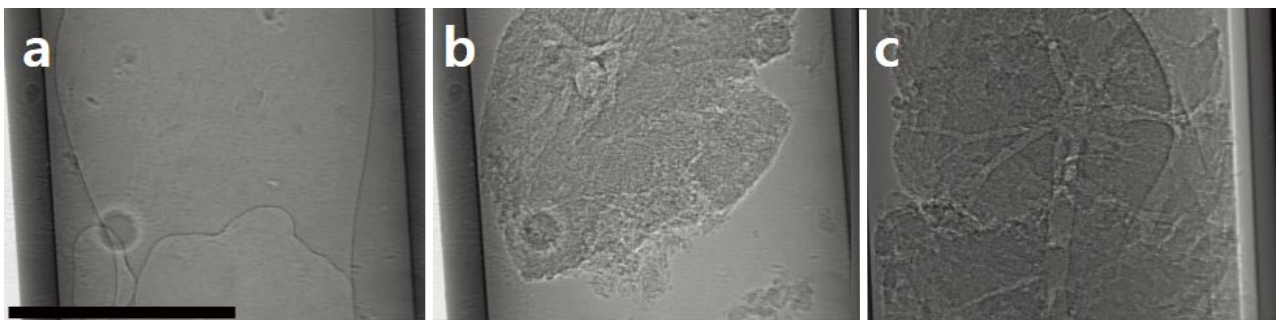


Fig. 4. Phase contrast synchrotron micrographic images of mouse liver tissue, hydrated (a) and dried (b and c) samples. The edge enhancement effect was disturbed by water (a), but it was increased after drying tissue samples. Scale bar = 500 μ m.

않고 실온에서 동결표본과 같은 조건으로 단층촬영하였다. X선 미세단층촬영 영상을 실제 조직영상과 비교하기 위해 단층촬영을 마친 동일한 표본을 조직처리과정을 거친 후 H&E 염색하고 광학현미경 영상을 얻었다.

3. 영상처리

표본을 통과한 X선에 의해 섬광기에 맺힌 투과영상을 대물렌즈로 확대하여 모았다. 한 표본 당 1,000개의 투사영상을 한 폴더에 저장 하고, OCTOPUS (inCT, Belgium) 소프

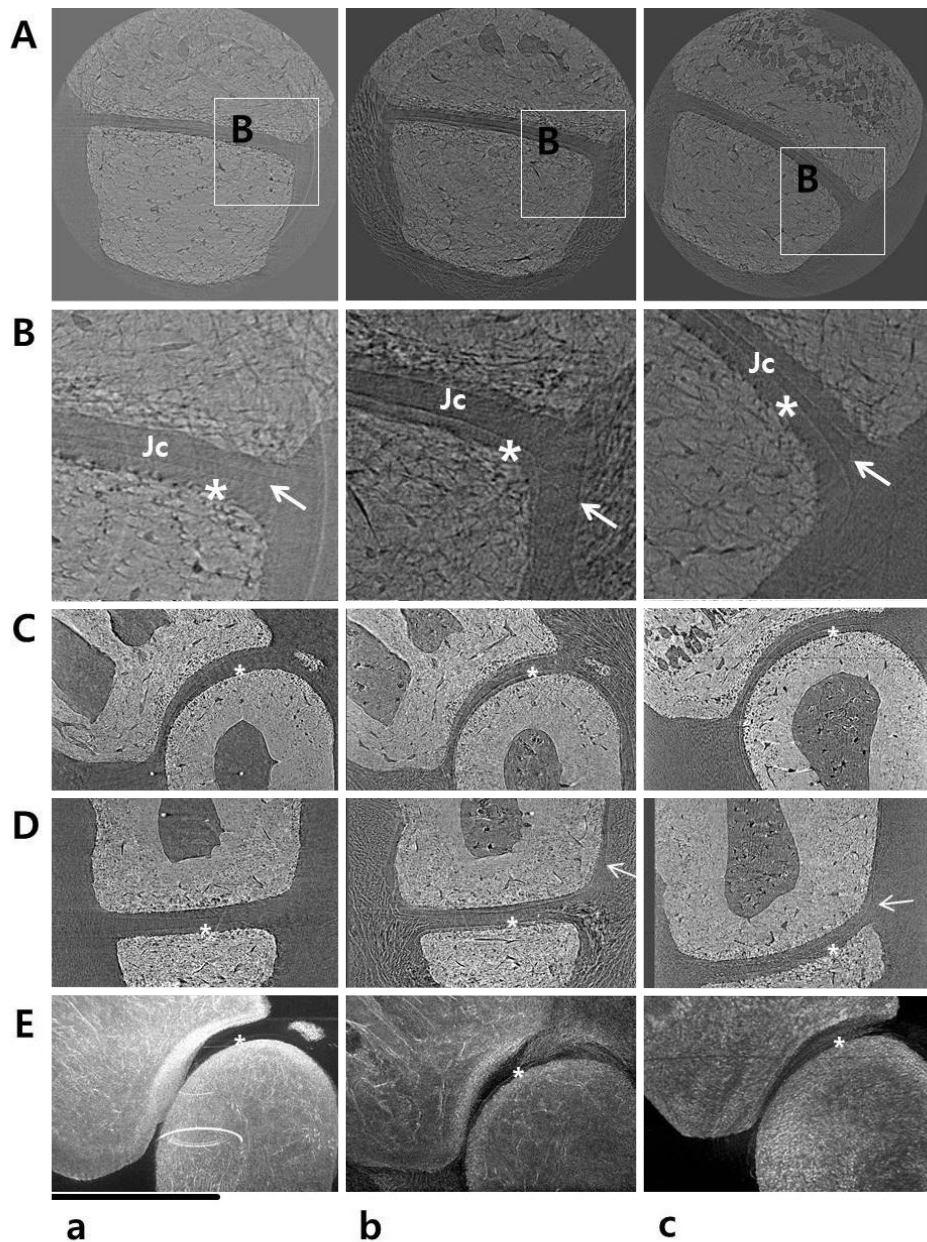


Fig. 5. Comparison of X-ray phase contrast micro-CT images of the rat metatarsophalangeal joint of the 3rd toe according to the condition of micro-CT, (a) non-frozen agarose embedded sample (b) directly frozen sample (c) and frozen OCT embedded sample. The tomographic slices are on 3 sectional planes, horizontal plane (A and B), sagittal plane (C) and coronal plane(D) and the 3-dimensional volume-rendered images (E). Panel B shows the differences of the thickness of articular cartilage (*), the wideness of joint cavity (Jc) and the lining of synovial membrane (arrows) between each condition of microCT. Scale bar = 1 mm.

트웨어를 이용하여 재구성 과정을 거쳐 1,300장의 2차원 단면영상으로 만들었다. Amira (VSG, USA.) 소프트웨어를 이용하여 각 표본의 단면영상들을 3차원 영상으로 재구성 하였으며, 단면영상에서 각 구조에 대한 구역화(segmentation)를 통한 렌더링 작업도 수행하였다. 이와 같은 영상처리 과정은 고성능의 워크스테이션을 이용하였다.

결 과

1. 비동결 방사광 위상대조 영상

동결하지 않은 상태의 CIA 생쥐의 무릎관절을 방사광 위상대조 미세단층촬영 후 재구성한 단면영상과 3차원 렌더

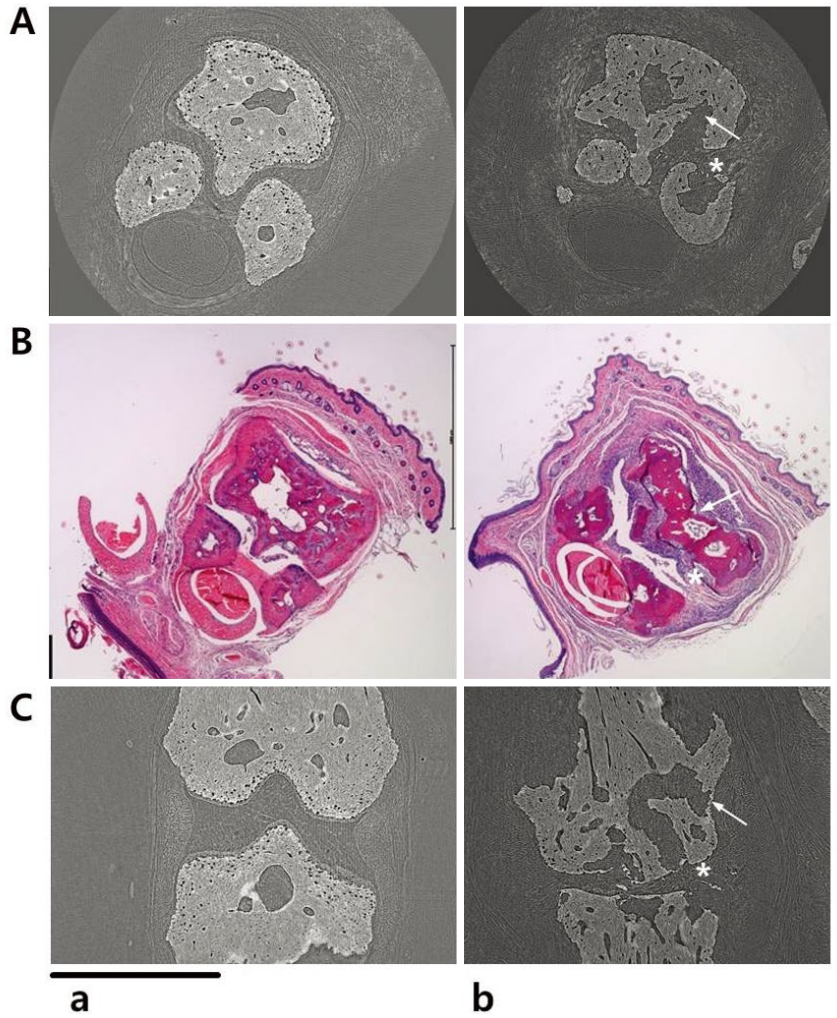


Fig. 6. The tomographic slices of X-ray phase contrast cryo-microCT reconstruction images (A and C) and histologic images (B) of the metatarsophalangeal joints of the 3rd toe of normal control mouse (a) and collagen induced arthritis (CIA) mouse model. The typical findings of CIA, destructive change (arrows) in bone and pannus formation (*), can be seen in detail. Scale bar = 1 mm.

링 영상에서 연골밑뼈의 파괴와 얇아짐, 뼈주위 새뼈 형성 등 관절염에 의한 뼈의 미세변형을 관찰 할 수 있었다. 하지만 윤활막 증식과 파누스(pannus) 형성 같은 물렁조직의 변화는 잘 관찰 되지 않았다(Fig. 3). 고정액에 들어 있는 간조직과 말린 간조직의 위상대조영상을 비교한 결과 말린 조직표본에서 위상대조가 강화되어 나타났다(Fig. 4). 이러한 결과에서 생체조직에 가장 많이 포함된 물이 위상대조를 방해할 것으로 추측하였다.

2. 표본의 직접 동결 후 방사광 위상대조 동결미세단층 촬영

액체 상태의 물에 의한 위상대조 방해 영향을 줄이기 위해 표본을 얼리기로 하였다. 고정한 생쥐 발가락관절을 액

체질소에서 급속냉동 후 동결이 유지된 상태에서 단층촬영을 하였으며, 이후 표본을 녹이고 아가로스로 포매하여 비동결 상태로 다시 단층촬영을 하고 두 영상자료를 비교하였다. 두 조건 모두에서 뼈의 구조는 잘 보였지만, 관절연골, 윤활막, 관절공간은 비동결영상과 비교해서 동결단층촬영에서 잘 구분 되었다(Fig. 5a and 5b). 하지만 열린 후 관절연골 두께의 감소, 관절공간의 확장, 주위 결합조직 섬유 성분 사이 벌어짐 등 조직변형도 같이 관찰되었다(Fig. 5b). 이러한 현상은 물의 동결팽창(frozen expansion)에 의한 것으로 추정하였다.

3. 동결미세단층촬영을 위한 표본 동결조건 결정

동결과정에서 유발되는 동결팽창에 의한 조직변형을 줄

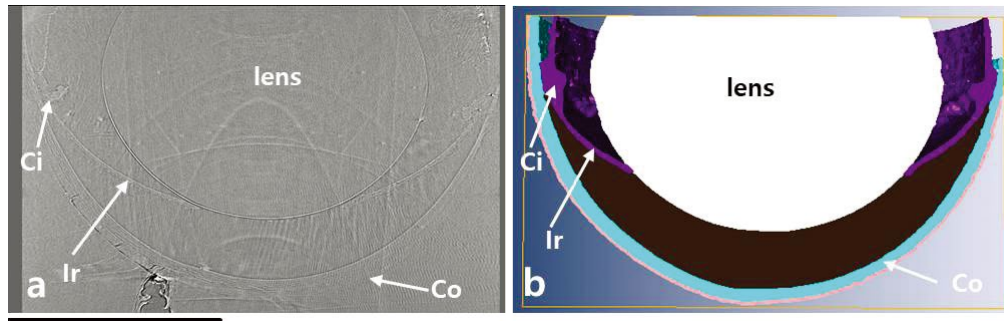


Fig. 7. A tomographic slice of X-ray phase contrast cryo-microCT reconstruction image (a) and a 3-dimensional volume-rendered microCT image (b) of a mouse eyeball. Ci: ciliary body, Co: cornea, Ir: iris. Scale bar = 1 mm.

일 수 있는 방법들을 조사하고 적당한 조건을 결정하였다. 대롱으로 주위가 막힌 공간을 만들고 그 속에 표본을 넣고 주위를 포매제로 OCT를 채워 급속냉동이 이루어지는 동안 표본이 압박되도록 하였다(Fig. 2b). 이런 조건으로 처음 동결 촬영을 시도한 생쥐 발가락관절을 단층촬영하여, 직접동결과 비동결 영상들과 비교하였다(Fig. 5). OCT 포매한 간접동결 조건에서 물렁조직의 위상대조는 직접동결 영상과 유사한 정도로 나타났으며, 관절연골 두께, 관절공간 넓이는 얼리지 않을 상태와 유사하였으며 주위 조직의 벌어진 정도 줄어들었다(Fig. 5c).

4. 간접 표본동결 후 미세단층촬영을 활용한 3차원 조직학 영상분석

정상 생쥐와 CIA 생쥐 뒤발의 발허리발가락관절(metatarsophalangeal joint)을 간접 표본동결 후 위상대조 동결미세단층촬영으로 표본 속 구조의 병리학적인 변형을 관찰하였다. 정상과 CIA 모델의 재구성 단층촬영 영상은 광학현미경 조직영상과 잘 일치하였다. 관절 구성성분과 힘줄 같은 주위 구조의 높은 해상도 영상을 얻을 수 있었으며, 정상 관절영상에서 관절 구성성분의 형태학적 특징을 표본 절단 없이 관찰할 수 있었다. CIA 모델에서는 관절연골과 관절공간 변형, 윤활막 증식과 이로 인해 형성된 파누스의 골수공간 침범에 의한 뼈파괴 등을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 생쥐의 정상 안구의 동결미세단층촬영 재구성 단면과 3차원 렌더링 영상에서 각막, 홍채, 섬모체의 3차원 배열을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

고 찰

인위적인 손상 없이 생체조직의 내부 구조를 3차원적으로 분석하는 3차원 조직학을 위해서는 구성 성분의 생물-

물리-화학적 특성을 고려한 적절한 광원, 영상기법, 영상 획득 방법의 조합이 필요하다. 방사광에서 방출되는 X선은 파장이 짧고, 결맞는 높은 에너지의 빛으로 높은 투과력과 해상도를 구현할 수 있고 다양한 영상대조에 활용할 수 있다. 단층촬영은 표본이나 광원을 일정한 간격으로 180°나 360° 회전하면 얻은 영상들을 재구성하는 단순하지만 강력한 3차원 영상 획득법이다[18].

환자 진단을 위해 주로 이용하는 일반적인 X선 영상은 흡수대조 영상으로 X선 흡수도가 낮은 물렁조직이나 유기 물질을 영상화하기 힘들다. 이러한 어려움을 극복하기 위해 조영제나 중금속 염색을 이용하는 경우가 있지만, 이러한 처리가 늘 가능하지 않으며 표본의 구조 변화를 유발할 수도 있다. 이에 비해 X선 위상대조 기법은 표본을 통과하면서 굴절되어 검출기 위치에서 서로 간섭을 일으키는 것을 이용하는 것으로 흡수대조 영상으로는 보이지 않는 미세한 밀도차이도 구분할 수 있어 생체의 물렁조직 영상이 가능하고 알려져 있다[19].

표본에서 유발된 미세한 X선 위상차를 탐지하는 다양한 영상기법들이 개발되어 있으나 대체적으로 흡수대조 영상 장치보다 상당히 복잡한 장치들이 필요하다는 단점이 있다[13-15]. 표본과 검출기(detector) 사이 거리를 조절하면서 위상차를 키우는 전파(propagation) 위상대조 기법은 장치의 배치가 간단하고, X선 진행선상에 복잡한 광학장치가 없어 입사 X선을 충분히 이용할 수 있으며, 위상대조와 흡수대조를 같이 볼 수 있고 상대적으로 해상도가 높다는 장점이 있다.

치아나 털 같은 단단한 조직을 대상으로 한 경우 각 구성 성분들에 대한 고해상도의 영상을 얻을 수 있었다[11,20,21]. 하지만, 위상대조가 물렁조직 영상에 장점이 있을 것이라는 기대와는 다르게 뇌조직이나 CIA 모델에서 쥐관절 조직의 전파위상대조 영상에서 만족스러운 결과를 얻을 수 없었다(Fig. 3)[17]. 연구자는 그 원인이 조직에 포함된

액체상태의 물이 위상대조 생성에 영향을 미치기 때문에 생각 하였으며, 물을 포함한 간조직과 마른 간조직의 전파 위상대조 영상을 비교하여 그 가능성을 확인하였다(Fig. 4). 전파위상대조 장치는 표본을 통과한 X선과 검출기가 같은 진행 선상에 위치하고 있으므로, X선이 물이 포함된 표본을 통과 할 때, 물과 X선의 상호작용이 다른 구성성분에서 발생하는 위상차를 직접적으로 상쇄시킨 것으로 추측된다. 이에 비해, 간섭장치나 분석결정(analyser crystal)을 이용하는 위상대조 영상기법은 표본을 통과하는 X선 진행 선상에 있는 광학장치에 의해 물의 위상대조 방해현상이 걸려져 물이 포함된 표본이라도 위상대조가 잘 만들어지는 것으로 생각된다. 하지만 이들 영상기법은 상대적으로 해상도가 낮은 단점이 있다[22,23]. 수 마이크로의 해상도가 필요한 3차원 조직학에는 전파위상대조가 적합하지만 물에 의한 위상대조 방해현상을 해결할 방법이 필요하였다. 표본을 말리거나, X선 흡수가 높은 중금속 염색 등이 시도 되었지만[24,25], 이러한 방법들은 생체조직의 인위적인 변형이 불가피하다.

생체표본의 전자현미경 표본제작과정에서 탈수에 의한 수축, 지질 소실, 단백질 응집 등으로 물을 함유한 살아있는 상태와 유사한 조건으로 영상을 얻기 힘들다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 동결전자현미경법이 개발되었다[26]. 동결법은 X선 에너지를 가진 광자가 표본의 분자와 반응하여 분자의 결합 구조를 깨뜨리게 되는 방사선손상에 대한 영향도 줄일 수 있는 것으로 알려져 있으며[27], 실제로 연 X선현미경에서는 세포의 방사선손상을 줄이기 위해 동결 단층촬영을 하고 있다[28].

생체조직을 적절히 얼리면 그 구조적 변형과 방사선손상을 최소화 할 수 있을 뿐만 아니라 액체 상태의 물이 고체 상태로 바뀌면서 물의 위상대조 방해 현상을 줄일 수 있을 것으로 기대하였다. 이를 위해 동결과정에서 생길 수 있는 조직변형을 줄일 수 있는 방법들을 조사하고 가장 적당한 조건을 결정하였다. 조직 내에 존재하는 수분은 동결과정에서 얼음 결정으로 변하여 조직이 단단해진다. 이때 온도를 급랭시킬수록 얼음결정은 작고 형태의 파괴가 적다. 특히 -20°C 전후를 통과 할 때 시간이 길면 작은 얼음 결정이 융합하여 큰 결정체가 되는 재결정화가 일어나 조직이나 세포에 손상이 커진다[29]. 얼음결정형성을 줄이기 위한 급속동결은 포매조직에 균열이 잘 생기는 액체질소에 바로 얼리는 대신에 드라이아이스로 -70°C 정도 유지된 isopentane 액에서 얼리는 방법을 선택하였다. 조직표본을 위의 방법으로 직접 얼린 후 시행한 단층촬영영상에서 위상대조 효과가 뚜렷이 증가되어 물렁조직의 고해상도 영상이 가능하였다. 하지만 예상치 않은 동결팽창에 의한 조직

변형도 같이 나타났다(Fig. 5). 동결팽창을 줄이기 위해 표본 주위에 공간을 만들고 그 안에 시료를 넣고 주위를 포매제로 채워 표본이 어는 동안 시료를 눌러 주도록 한 결과, 동결에 의한 위상대조 효과는 증가되고, 동결팽창은 억제된다는 것을 확인 할 수 있었다.

류마티스관절염은 관절의 만성염증과 점차 진행되는 관절의 파괴가 특징인 질병이다. 관절윤활막에서 염증이 시작하여 관절 연골과 뼈가 파괴되어 관절의 변형을 초래하므로 조기진단으로 초기 치료가 필요한 질환이다. 생쥐에서 CIA모델은 류마티스관절염의 병인과 기전을 이해하고, 여러 가지 새로운 실험들을 진행하여 반응을 관찰하는데 많이 이용되고 있지만 기존의 영상기법으로는 병변의 미세한 변화를 제대로 관찰 할 수 없었다. CIA모델 관절조직의 X선 위상대조 동결단층촬영 결과 뼈 손상뿐만 아니라 관절 연골과 관절공간 변형, 파누스 형성 등을 광학현미경 수준의 영상을 얻을 수 있었으며, 이들 영상들의 재구성을 통해 병변에 대한 고해상도 3차원 구조분석이 가능하였다.

결론적으로, 생체조직 내부 미세구조의 비파괴, 고해상도 3차원 영상분석에 있어 조직표본을 동결포매제로 포매 후 급속냉동하고, 방사광에서 방출되는 X선을 광원으로 하는 전파위상대조 동결미세단층촬영법은 활용 가능한 효과적인 방법이 될 수 있을 것으로 기대한다.

REFERENCES

1. Park JS, Chung MS, Hwang SB, Lee YS, Har DH, Park HS. Visible Korean human: improved serially sectioned images of the entire body. *IEEE Trans Med Imaging*. 2005; 24:352-60.
2. Hwang SB, Chung MS, Hwang YI, Park HS, Har DH, Shin DS, et al. Improved sectional images of the female pelvis showing detailed urogenital and neighboring structures. *Korena J Phys Anthropol*. 2010; 12:187-98.
3. Fiala JC. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J Microsc*. 2005; 218:52-61.
4. Song WC, Hu KS, Kim HJ, Koh KS. A study of the secretion mechanism of the sebaceous gland using three-dimensional reconstruction to examine the morphological relationship between the sebaceous gland and arrector pili muscle in the follicular unit. *Dermatol*. 2007; 157:325-30.
5. Roy D, Steyer GJ, Gargasha M, Stone ME, Wilson DL. 3D cryo-imaging: A very high-resolution view of the whole mouse. *Ana Rec (Hoboken)*. 2009; 293:342-52.
6. Le Gros M, McDermott G, Larabell CA. X-ray tomography of whole cells. *Curr Opin Struct Biol*. 2005; 15:593-600.

7. Meuli R, Hwu Y, Je JH, Margaritondo G. Synchrotron radiation in radiology: radiology techniques based on synchrotron sources. *Eur Radiol.* 2004; 14:1550-60.
8. Zhou SA, Brahme A. Development of phase-contrast X-ray imaging techniques and potential medical applications. *Physica Medica.* 2008; 24:129-48.
9. Momose A. Recent advances in X-ray phase imaging. *Jap J Applied Physics.* 2005; 44:6355-7.
10. Takeda T, Momose A, Wu J, Yu Q, Zeniya T, Lwin TT, et al. Vessel imaging by interferometric phase-contrast X-ray technique. *Circulation.* 2002; 105:1708-12.
11. Wilkins SW, Gureyev TE, Gao D, Pogany A, Stevenson AW. Phase-contrast imaging using polychromatic hard X-rays. *Nature.* 1996; 384:335-8.
12. Youn SW, Kim HK, Kim HT, Han SM, Don JK, DO YR, et al. Propagation-based phase-contrast X-ray microtomography of a cerebral protection device retrieved after carotid artery stenting. *J Synchrotron Rad.* 2014; 21:215-22.
13. Bravin A, Keyriläinen J, Fernández M, Fiedler S, Nemoz C, Karjalainen-Lindsberg KL, et al. High-resolution CT by diffraction-enhanced x-ray imaging: mapping of breast tissue samples and comparison with their histo-pathology. *Phys Med Biol.* 2007; 52:2197-211.
14. Sunaguchi N, Yuasa T, Huo Q, Ando M. Convolution reconstruction algorithm for refraction-contrast computed tomography using a Laue-case analyzer for drak field imging. *Opt Lett.* 2011; 36:391-3.
15. Pfeiffer F, Weitkamp T, Bunk O, David C. Phase retrieval and differential phase-contrast imaging with low-brilliance X-ray sources. *Nature Physics.* 2006; 2:258-61.
16. Kim BI, Kim KH, Youn HS, Jheon S, Kim JK, Kim HT. High-resolution X-ray phase contrast synchrotron imaging of normal and ligation damaged rat sciatic nerves. *Micros Res Tech.* 2008; 71:443-7.
17. Choi CH, Kim HT, Choe JY, Kim SK, Choi GW, Jheon SH, et al. In vivo high-resolution synchrotron radiation imaging of collagen-induced arthritis in a rodent model. *J. Synchrotron Rad.* 2010; 17:393-9.
18. Larabell CA, Le Gros MA. X-ray tomography generates 3-D reconstruction of the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, at 60-nm resolution. *Molecular Biology of the Cell.* 2004; 15:957-62.
19. Fitzgerald R. Phase-sensitive X-ray imaging. *Phys Today.* 2000; 53:23-6.
20. Berhardt R, van den Dolder J, Bierbaum S, Beutner R, Scharnweber D, Jansen J, et al. Osteoconductive modification of Ti-implants in a goat defect model: characterization of bone growth with SR μ CT and histology. *Biomaterials.* 2005; 26:3009-19.
21. Kim HT, Han SM, Moon YS, Seo SJ, Kim JK, Kim KH. Comparison of the 3D structures of Hairs from humans and from animals by using synchrotron radiation micro-CT. *New Phys: Sae Mulli.* 2012; 62:269-74.
22. Wu J, Takeda T, Lwin TT, Momose A, Sunaguchi N, Fukami T, et al. Imaging renal structures by X-ray phase-contrast microtomography. *Kidney International.* 2009; 75:945-51.
23. Bravin A, Coan P, Suortti P. X-ray phase-contrast imaging: from pre-clinical applications towards clinics. *Phys Med Biol.* 2013; 58:R1-R35.
24. Tang L, Li G, Sun YS, Li J, Zhang XP. Synchrotron radiation phase-contrast imaging of human stomach and gastric cancer: in vitro studies. *J Synchrotron Rad.* 2012; 19:319-22.
25. Mizutani R, Takeuchi A, Hara T, Uesugi K, Suzuki Y. Computed tomography imaging of the neuronal structure of *Drosophila* brain. *J Synchrotron Rad.* 2007; 14:282-7.
26. Studer D, Humbel BM, Matthias C. Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130:877-89.
27. Kuzay TM, Kazmierczak M, Hsieh BJ. X-ray beam/bio-material thermal interaction in third-generation synchrotron sources. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2001; 59:69-81.
28. McDermott G, Le Gros MA, Knoechel CG, Uchida M, Larabell CA. Soft X-ray tomography and cryogenic light microscopy: the cool combination in cellular imaging. *Trends in Cell Biol.* 2009; 19:587-95.
29. Rosene AL, Roy NJ, Davis BJ. A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. *J Histochem Cytochem.* 1986; 34:1301-15.

3D Histology Using the Synchrotron Radiation Propagation Phase Contrast Cryo-microCT

Ju-Heon Kim², Sung-Mi Han³, Hyun-Ouk Song⁴, Youn-Kyung Seo⁵, Young-Suk Moon¹,
Hong-Tae Kim¹

¹*Department of Anatomy, Catholic University of Daegu School of Medicine*

²*Department of Radiology, Yeongju Red Cross Hospital*

³*Optical Convergence Technology Center, Catholic University of Daegu*

⁴*Department of Parasitology, Catholic University of Daegu School of Medicine*

⁵*Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University*

Abstract : 3D histology is a imaging system for the 3D structural information of cells or tissues. The synchrotron radiation propagation phase contrast micro-CT has been used in 3D imaging methods. However, the simple phase contrast micro-CT did not give sufficient micro-structural information when the specimen contains soft elements, as is the case with many biomedical tissue samples. The purpose of this study is to develop a new technique to enhance the phase contrast effect for soft tissue imaging. Experiments were performed at the imaging beam lines of Pohang Accelerator Laboratory (PAL). The biomedical tissue samples under frozen state was mounted on a computer-controlled precision stage and rotated in 0.18° increments through 180°. An X-ray shadow of a specimen was converted into a visual image on the surface of a CdWO₄ scintillator that was magnified using a microscopic objective lens (X5 or X20) before being captured with a digital CCD camera. 3-dimensional volume images of the specimen were obtained by applying a filtered back-projection algorithm to the projection images using a software package OCTOPUS. Surface reconstruction and volume segmentation and rendering were performed were performed using Amira software. In this study, We found that synchrotron phase contrast imaging of frozen tissue samples has higher contrast power for soft tissue than that of non-frozen samples. In conclusion, synchrotron radiation propagation phase contrast cryo-microCT imaging offers a promising tool for non-destructive high resolution 3D histology.

Keywords : 3D histology, Synchrotron radiation, Cryo-microtomography, X-ray propagation phase contrast, Collagen induced arthritis