

초음파 조영제 제작 및 평가

연세대학교 대학원

의 공 학 과

박 진 감

초음파 조영제 제작 및 평가

연세대학교 대학원

의 공 학 과

박 진 감

초음파 조영제 제작 및 평가

지도 서 종 범 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2012년 6월 20일

연세대학교 대학원

의 공 학 과

박 진 감

박진감의 석사 학위논문으로 인준함

심사위원 서 1/0 반 Gung Bum Seo
심사위원 윤 대성 Da Seung Yoon
심사위원 오 제민 Je Min Oh

연세대학교 대학원

2012년 6월 20일

감사의 글

2년 반이란 대학원 생활을 통하여 삶에 피가 되고 살이 되는 좋은 경험을 많이 할 수 있었고, 많은 분들의 따뜻한 관심과 애정 어린 질책 속에 한층 더 성숙해질 수 있었습니다. 진정한 이 시대의 지식인으로 거듭나도록 소양과 자세를 일깨워주고 부족한 저에게 애정을 가져주신 모든 분들께 감사의 인사를 드리고자 합니다.

먼저 연구와 강의로 바쁘신 가운데도 커다란 관심으로 저를 인도해 주시고 넓은 안목으로 연구 방향을 지도해주신 서종범 교수님께 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 석사 초기에 교수님의 지도방식에 적응하지 못하고 힘들기도 했지만 돌이켜 보면 기초와 논리를 강조하셨던 하나하나가 모여 지금의 저를 있게 만들었던 것 같습니다. 앞으로 더 발전하는 모습 보여 드리겠습니다. 또한 실험과정 동안 항상 자상하게 지도해주신 오제민 교수님, 논문 심사를 맡아주신 윤대성 교수님께도 감사를 드립니다.

존재자체가 초음파 연구실인 동희형. 가장 오랫동안 이 연구실에서 살며 나에게 2번째 지도교수님 같았던 당신이 있어서 배움의 여정이 힘들지 않고 즐거울 수 있었던 것 같습니다. 당신께 배운 것들이 얼마 지나지 않아 내가 이 연구실을 이끌어 갈 때, 정말 많은 도움이 될 것 같습니다. 두고두고 고마워하면서 박사과정동안 연구실 잘 이끌어 가겠습니다. 감사합니다.

내가 힘들거나 지칠 때 항상 내편에 되어주고 위로해 주고 나를 웃게 해주며, 이제는 같은 곳을 바라보는 내 애인 태임. 당신이 있어서 대학원 생활에서 내가 많이 발전할 수 있는 힘이 되었습니다. 감사합니다. 학교에 유일하게 남아있는 동기 친구인 근상. 무심한 척 세심하고 좋은 것은 함께 나눌 수 있는 평생 친구인 당신이 있어서 앞으로도 든든합니다. 고맙습니다. 내가 고민이 있을 때 먼저 찾게 되었던 유덕형. 힘들 때 쉬어가는 쉼터 같은 당신이 있어서 대학원 생활이 한결 가벼운 느낌이었습니다. 고맙습니다.

또한 초자연적인 힘이 존재하는 이곳에서 2년 반동안 같이 지냈고, 같이 지낸 초음파 전사들. 식약청에서 디아블로하고 있을 홍일, 연구실의 유일한 홍일점이었던 유미, 유일한 다른 나라 친구인 Saad, 나보다도 축구에 대해서 많이 아는 마법사 상협, 도무지 정체를 알 수 없는 경희, 다른 연구실이지만 언제나 우리 식구 같은 균정이형, 앞으로 나와 같이 이곳을 지켜나가면서 나에게 든든한 힘이 되어줄 정우와 종호, 이 모두에게 고마운 마음을 전합니다.

이외에도 친동생 같은 후배 현수, 친형 같은 선배 상원, 나와 주말마다 축구로 열정을 불태우는 의공학과 후배들과 티포스 식구들에게도 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로 항상 곁에서 격려의 말씀을 해주시고 제 편으로 든든하게 지켜주신 아버지, 언제나 따뜻하게 사랑해주시고 저의 결정을 지지해주신 자어로우신 어머니, 나 대신 집안에 더 신경쓰면서 내가 마음 편히 연구를 할 수 있게 해준 동생, 하늘에서 지켜보고 계실 할머니에게 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 앞으로 더욱 열심히 살며 받은 은혜를 돌려 드릴 수 있도록 노력하

겠습니다.

감사한 분들의 이름 하나 하나를 되새기지 못함을 죄송하게 생각합니다. 앞으로 어느 곳에서 무엇을 하던 인생의 선배로서 그리고 친구로서 많은 관심과 애정을 가지고 저를 지켜 봐주셨던 모든 분들께 부끄럽지 않은 사람이 되어, 세상에 보탬이 되고 즐거움을 줄 수 있도록 끊임없이 노력하고 정진하겠습니다.

2012년 6월 어느 화창한 날 초음파 연구실에서

박진감 올림

차 례

그림 차례	vi
표 차례	ix
국문 요약	x
제 1 장 서론	1
제 2 장 이론적 배경	4
2.1 초음파 및 초음파 조영제	4
2.2 초음파 조영제의 기본 원리	11
2.3 초음파 조영제의 임상적 활용	13
(1) 염증 반응에 대한 Imaging	13
(2) 신생혈관 생성 Imaging	13
(3) 혈관내의 혈전에 대한 Imaging	14
(4) 약물전달에서의 초음파 조영제	14
제 3 장 연구 방법	17
3.1 제작 방법	17
(1) Albumin shell 초음파 조영제 제작 방법	17
(2) Lipid shell 초음파 조영제 제작 방법	21
(3) Perfluorobutane 액화 시스템	23

3.2 평가 방법	24
(1) 광학현미경을 통한 미세기포의 밀도 및 크기 분석	24
(2) Cryo-SEM 촬영	25
(3) 입도 분석기를 이용한 크기 분포 분석	27
(4) 영상기기를 통한 반사 증가 특성 분석	29
(5) 세포 독성 분석	31
(6) T-TEST	33
제 4 장 연구 결과	34
4.1 광학현미경을 통한 영상 분석 결과	34
4.2 Cryo-SEM을 통한 영상 분석 결과	38
4.3 입도분석기를 통한 크기 분포 분석 결과	39
4.4 영상기기를 통한 시간 별 반사 신호 증가 특성 분석 결과	41
4.5 세포 독성 검사 결과	48
4.6 T-TEST 결과	49
제 5 장 결론	51
참고 문헌	54
영문 요약	64

그림 차례

그림 2.1 (좌) 초음파 조영제 주입 전의 심장 영상 (우) 초음파 조영제 주입 후의 심장영상	5
그림 2.2 (a) 일반 초음파 영상 (b) 하모닉 영상 기법	6
그림 2.3 간혈관종의 초음파 영상 (a) 초음파 조영제 주입 직후 (b) 초음파 조영제 주입 후 15초 (c) 초음파 조영제 주입 후 35초	7
그림 2.4 간세포암의 초음파 영상 (a) 초음파 조영제 주입 전 (b) 초음파 조영제 주입 후 25초	8
그림 2.5 Sonophoresis	9
그림 2.6 초음파 조영제의 구조	10
그림 2.7 초음파에 따른 초음파 조영제의 반응	12
그림 2.8 초음파에 의한 초음파 조영제의 파열 효과	15
그림 3.1 초음파 조영제 제작 시 Gas의 비율 조절	18
그림 3.2 Albumin shell 초음파 조영제 제작 시 albumin의 비율 조절	20
그림 3.3 Perfluorobutane 액화 시스템 구성도	23
그림 3.4 광학현미경 시스템	24
그림 3.5 Cryo-SEM의 원리 및 시스템	26
그림 3.6 입도 분석기의 원리	28
그림 3.7 입도 분석을 위한 시스템 구성도	28

그림 3.8 영상기기를 통한 반사 신호 특성 분석을 위한 시스템 구성도	30
그림 3.9 WST-8 및 WST-8 Formazan의 구조	31
그림 3.10 세포 독성 분석을 위한 setting	32
그림 3.11 T-Test 모식도	33
그림 4.1 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 크기 및 밀도 (Day 1)	34
그림 4.2 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 크기 및 밀도 (Day 4)	35
그림 4.3 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 크기 및 밀도 (Day 7)	35
그림 4.4 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 크기 및 밀도 (Day 10)	36
그림 4.5 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 크기 및 밀도 (Day 13)	36
그림 4.6 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 3D 영상 (Day 4)	37
그림 4.7 초음파 조영제의 Cryo-SEM 촬영	38
그림 4.8 입도분석기를 통한 초음파 조영제의 크기 분포 (Volume)	39
그림 4.9 입도분석기를 통한 초음파 조영제의 크기 분포 (Number)	40
그림 4.10 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 영상 (Day 1)	42
그림 4.11 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 그래프 (Day 1)	42
그림 4.12 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 영상 (Day 4)	43
그림 4.13 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 그래프 (Day 4)	43
그림 4.14 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 영상 (Day 7)	44
그림 4.15 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 그래프 (Day 7)	44
그림 4.16 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 영상 (Day 10)	45
그림 4.17 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 그래프 (Day 10)	45

그림 4.18 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 영상 (Day 13) 46
그림 4.19 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 그래프 (Day 13) . . 46
그림 4.20 4가지 초음파 조영제의 세포 독성 분석 결과 48

표 차례

표 3.1 세포 독성 분석을 위한 setting	32
표 4.1 Filter를 사용하지 않고 제작한 초음파 조영제의 평균 크기	49
표 4.2 Filter를 사용하여 제작한 초음파 조영제의 평균 크기	49
표 4.3 T-Test 분석 결과	49

국 문 요 약

초음파 조영제 제작 및 평가

본 연구에서는 초음파 조영제를 자체 제작하고 다양한 분석을 통하여 제작된 초음파 조영제에 대한 유효성을 평가하였다. 초음파 영상은 피부로부터 거리가 먼 채장 같은 조직은 관찰하기 어렵다. 따라서 초음파가 더 깊은 장기까지 볼 수 있고, 정확한 진단을 하기 위해서 반사 대비를 극대화시키는 문제를 해결하는 목적으로 초음파 조영제가 개발 되었다. 초음파 조영제는 선형 및 비선형적 특성에 의하여 신호의 SNR을 높여주며 이에 따라 내부 장기 및 혈관을 더 정확히 진단할 수 있도록 돕는다. 상용화되어 있는 초음파 조영제는 미세 기포로 구성되며 그 크기는 대부분 2-10 μm 범위이다. 이 기포는 안정성 확보를 위하여 Shell로 보호되어 있으며, Shell 물질로는 생물학적 적합성을 띄는 Protein, Lipid, Biopolymers 등으로 만들어 졌다. 이러한 기포 내부에 사용되는 기체로는 신체 내에서 물질적 부작용이 없으며, 불활성기체인 Perfluorocarbon gas가 사용된다. 이 Perfluorocarbon gas가 미세기포의 안정성을 유지하며 빠르게 파괴되는 것을 막아주는 역할을 한다.

본 연구에서 제작된 초음파 조영제는 기존에 Shell로 사용되는 Lipid 및 Albumin Shell을 사용하였으며, Perfluorocarbon gas로는 Perfluorobutane을 이용하여 초음파 조영제를 개발하였고, 시판 중인 초음파 조영제인 Definity와 Sonovue와의 비교를 통해 그 유효성을 평가하였다.

Key word : 초음파 조영제, 초음파 영상, 미세 기포, 초음파, Perfluorocarbon Shell material

제 1 장 서론

초음파 의료 영상은 주파수 20kHz 이상의 음파인 초음파를 인체 내부에 인가하여 반사되는 신호의 크기를 영상화 하는 비침습적 영상화 기법으로 지난 30년 동안 기술 발전에 힘입어 임상 및 산업적인 측면에 있어서 현대 의료 영상 분야의 중요한 위치를 차지하고 있다.

의료진단용 초음파 영상장치는 1980년대 배열 변환자를 이용한 고속 전자 주사법 및 칼라 도플러 검사법의 발전과 함께 급속히 발전하였으며, 1990년대에 이르러서는 디지털 영상 기술의 발전에 따라 B-모드 주사법은 수신동적집속, 3차원 영상, 고조파 영상과 같은 새로운 기술들이 구현되어 성능 면에서 획기적인 발전과 함께 임상적인 측면에서도 그 응용 분야가 현저히 확대되어 종양검사, 태아진단 등 널리 쓰이고 있다.[1-4]

초음파 검사는 초음파가 뼈, 근육, 지방 등 조직의 경계면과 같은 서로 다른 매질의 경계를 만나게 되면 굴절, 반사, 산란 등이 일어나는 것을 이용한다. 이러한 굴절, 반사, 산란을 대비 영상(contrast image)으로 이미지화하여 진단이 이루어진다. 대부분의 초음파 검사는 피부에 초음파 프로브를 접촉시켜 초음파의 투과력을 이용해 복부 속 장기를 관찰한다. 그러나 피부로부터 거리가 먼 췌장 같은 조직은 초음파의 투과력으로는 관찰하기 어렵다. 따라서 초음파가 더 깊은 장기까지 볼 수 있고, 정확한 진단을 위해 반사 대비를 극대화시키는 문제가 대두되었다. 이를 위해서 초음파 조영제(Ultrasound Contrast Agent)의 개발이 다각도로 이루어지고 있다.[5-6]

초음파 조영제는 1969년에 Gramiak과 Shah가 생리적 식염수를 경정맥 주사한 후 심장초음파 검사에서 초음파 신호강도가 증가한다는 보고를 한 이후에 약 30년간에 걸쳐 계속 발전되어 왔으며, 선형 및 비선형적 특성에 의하여 신호의 SNR을 높여주며 이에 따라 내부 장기 및 혈관을 더 정확히 진단할 수 있다.[7-8]

초음파 조영제는 혈관 내에서 안정적으로 존재할 수 있는 미소기포로써 초음파가 전달되는 영역 내에서 반사 신호를 높여 SNR의 향상을 유발한다. 또한 기포가 확장할 때와 수축할 때의 비선형 운동적 공명진동을 하며, 이러한 비선형 운동의 음파를 Transducer가 검출하면 하모닉 영상을 얻을 수 있다. 비선형 성분을 영상화 하는 기법을 contrast harmonic imaging이라 하며 최근 그 사용이 증대되고 있다.[9-12]

최근에는 초음파 조영제를 활용하여 치료용 초음파의 수술 효과를 높이려는 시도가 이루어지고 있다. 약물에 함유된 초음파 조영제를 특정 혈관이나 조직에서 초음파를 이용하여 파열시키면, 효과적인 약물 투여 효과를 얻을 수 있다. 더불어 초음파 조영제는 초음파 공동 효과를 조정할 수 있기 때문에, 공동 현상을 이용하는 초음파 암 수술 효과를 개선하는 용도로도 활용할 수 있을 것으로 보인다. 따라서 목적에 맞는 다양한 형태의 초음파 조영제의 개발이 진행되고 있으며, 최근에는 특정 세포에 결합할 수 있는 ligand binding site가 첨가되기도 한다.[10, 13-14]

이상적인 초음파 조영제는 독성이 없어야 하며, 혈관으로 주입 가능하여야 하고, 폐의 모세혈관 내에서 자유롭게 이동할 수 있을 정도로 마이크로 단

위의 작은 크기여야 한다. 또한 오랫동안 사용하기 위해서 높은 안정성을 가지고 있어야 한다.[15] 초음파 조영제는 미세기포로 구성되며 그 크기가 2-10 μm 로 이루어져 있다. 이 기포는 안정성 확보를 위하여 shell로 보호되어 있다. Shell 물질로는 생체 내 존재하는 albumin 등의 단백질 또는 lipid 물질이 사용되는 것이 일반적이거나, 최근에는 polymer의 활용도 연구 중이다.[16]

Shell 특징을 살펴 보면 Lipid shell의 경우 Shell 특성이 딱딱하거나 유연하게 제조 가능한 다양한 물질특성을 가지고 있으며, Albumin에 비해 확산이 느리다. 이러한 기포 내부에 사용되는 기체로는 신체 내에서 물질적 부작용이 없으며 불활성기체인 Perfluorocarbon gas가 사용된다. 이 Perfluorocarbon gas가 미세기포의 안정성을 유지하며 빠르게 파괴되는 것을 막아준다. 또한 초음파 조영제마다 Perfluorocarbon gas의 기화점 차이 때문에 제작 방법 및 보관 방법이 다르다.[18]

본 연구에서는 기존에 shell로 사용되는 Lipid 및 Albumin shell을 사용하였으며, Perfluorocarbon gas로는 Perfluorobutane(Alpolo, USA)을 이용하여 초음파 조영제를 제작하고 현재 상용화되고 있는 초음파 조영제와의 비교를 통해 그 유효성을 평가하고자 한다

제 2 장 이론적 배경

2.1 초음파 및 초음파 조영제

초음파 검사는 초음파를 생성하는 탐촉자를 검사 부위에 밀착시켜 초음파를 보낸 다음 되돌아오는 초음파를 실시간 영상화하는 방식으로 검사가 진행된다. 따라서 초음파 검사는 간편하고, 검사 시 환자가 편안하며, 인체에 해가 없기 때문에 영상 검사 중 가장 기초가 되는 검사법이다. 특히 유방, 갑상선, 근골격과 같이 우리 몸의 표면에 위치한 구조를 쉽고 정확하게 평가할 수 있고, 컴퓨터 단층촬영(CT)이나 자기공명영상(MRI)에 비해 검사 장비를 쉽게 움직일 수 있으며 실제 움직이는 구조물을 볼 수 있어, 중환자나 수술 직후 환자의 중재적 시술에도 유리한 장점이 있다. 그러나 피부로부터 거리가 먼 체장 같은 조직은 초음파의 투과력으로는 관찰하기 어렵다. 따라서 초음파가 더 깊은 장기까지 볼 수 있고, 정확한 진단을 위해 반사 대비를 극대화시키는 문제가 대두되었다. 이를 위해서 초음파 조영제(UCA)의 개발이 다각도로 이루어지고 있다.[1, 19]



**그림 2.1 (좌) 초음파 조영제 주입 전 심장영상
(우) 초음파 조영제 주입 후 심장영상 (심찬섭, 2009, 소화기연수강좌)**

초음파 조영제는 선형 및 비선형적 특성에 의하여 신호의 SNR을 높여주며 이에 따라 내부 장기 및 혈관을 더 정확히 진단할 수 있다. 초음파의 음압 (mechanical index)이 높아지면 미세기포는 초음파가 전달되는 영역 내에서 기포의 확장시와 수축시의 크기가 일치되지 않은 비선형 운동의 공명진동을 하게 된다. 이러한 미세기포에서 발산되는 비선형 운동의 음파를 초음파 프로브가 검출하면 하모닉 영상이 얻어진다. 이러한 비선형 성분을 영상화 하는 기법을 contrast harmonic imaging이라고 부른다.[9-12, 20]

최근 많이 사용되고 있는 몇 가지 하모닉 영상기법으로는 2차 하모닉 영상기법(second harmonic imaging), 펄스 역전 하모닉 영상기법(pulse inversion harmonic imaging), 부호화 하모닉 영상기법(coded harmonic angio US) 등이 있다. 하모닉 영상기법의 복부 초음파 검사에서의 응용은 낭포성 조직에서 무에코의 액체를 가진 조직이나 병변 영상화에 유리하다는 것이 특징 중 하나이다. 낭포성 구조 안의 잡음 신호를 현저히 감소시켜, 낭포

성 구조의 벽과 내부 병변을 일반 초음파 영상에 비하여 뚜렷하게 보여 줄 수 있다. 결석과 석회화의 경우 하모닉 영상기법에서는 높은 대조도로 인해 결석 또는 석회화의 특성이라고 할 수 있는 후방 그림자가 일반 초음파에 비하여 뚜렷하게 보이는 장점이 있다.[21]

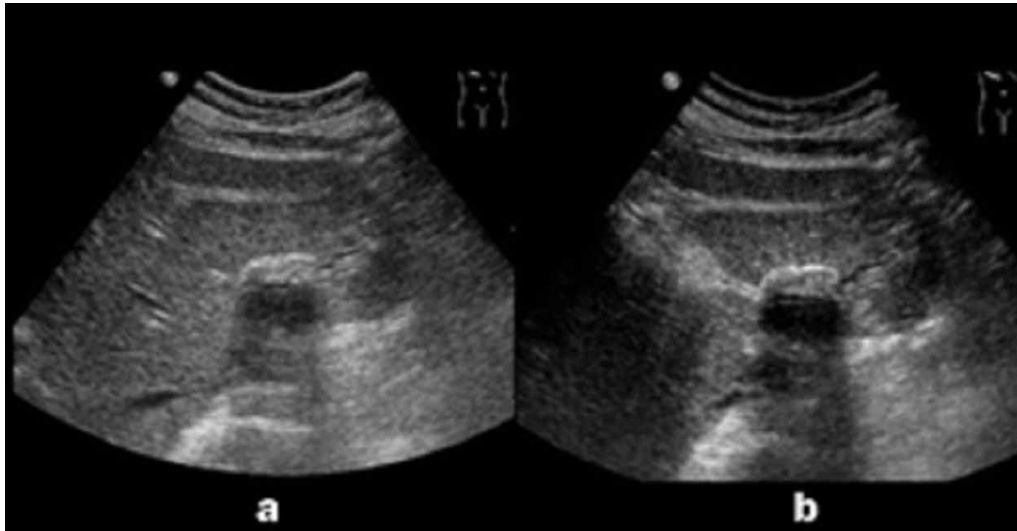


그림 2.2 (a) 일반 초음파 영상 (b) 하모닉 영상기법 (심찬섭, 2009, 소화기연수강좌)

또한 초음파를 이용한 간 종양의 검사는 지난 수년간 도플러 검사를 이용하여 진행되어 왔으나 도플러 초음파는 종양 내의 혈류신호를 발견하는데 민감하나, 양성 종양과 악성 종양간에 상당한 중복조건이 있어 실제 종양의 감별에 한계가 있다. 하지만 근래에 미세기포 초음파 조영제를 주입하고 미세기포 조영제의 혈관 내 존재를 명확하게 나타내는 하모닉 영상기법을 이용한 조영 증강 초음파 검사를 시행하면 종양 내 혈류분포 양상에 관한 정보를 쉽게 얻을 수 있으며, 다양한 간 종양의 감별에 유용성이 보고되고 있다.[22-23]

혈관종은 종양내에 혈류가 매우 천천히 흐르므로 대부분 도플러 초음파에서 종양내 혈류를 검출하기가 어렵다. 그러나 초음파 조영제를 사용한 하모닉 영상기법에서는 혈류검출이 가능하다. 종양의 크기에 따라 차이가 있으나 저음압의 연속적 영상 또는 고음압의 간헐적 영상으로 CT 또는 MRI에서 보이는 것과 같은 종양의 변연부에서 결절성 조영 증강이 점차 안쪽으로 확대되는 형태를 보인다. 초음파 조영제를 사용하여 간세포암 결절내의 혈관질 (vascularity)을 파악하는 것이 가능하므로 결절이 간세포암인지를 비교적 쉽게 진단할 수 있다. 특히 고혈관성 간암에서는 조영제를 사용한 하모닉 영상기법에서 강한 혈류가 종양의 주위와 종양내에 보이며 꼬불꼬불한 모양의 종양혈관을 볼 수 있다.[24-25]

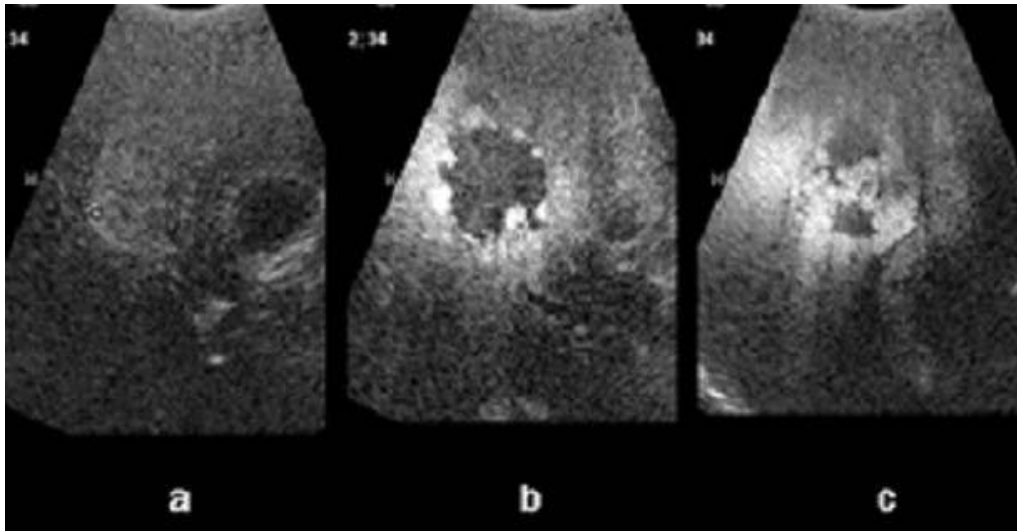


그림 2.3 간혈관종 초음파 영상 (a) 초음파 조영제 주입 직후 (b) 초음파 조영제 주입 후 15초 (c) 초음파 조영제 주입 후 35초 (심찬섭, 2009, 소화기연수강좌)

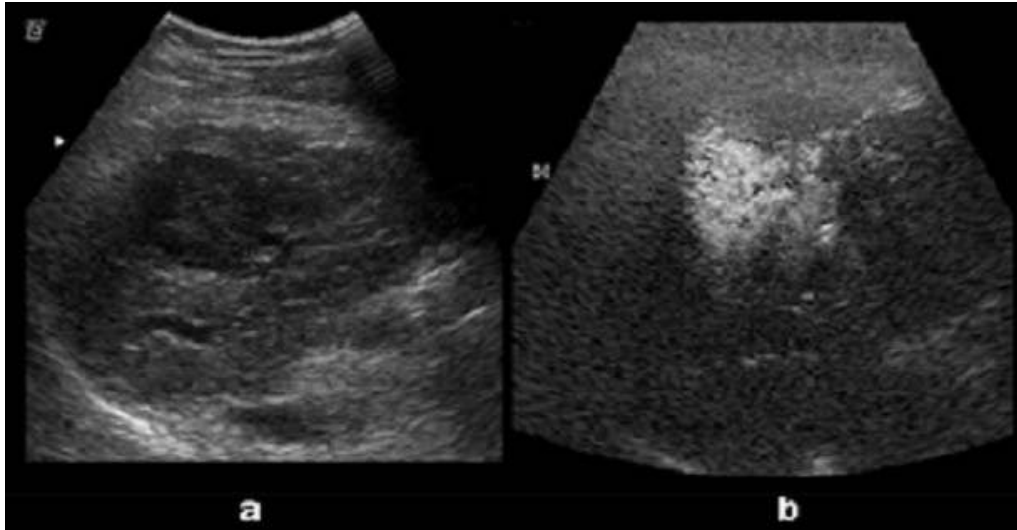


그림 2.4 간세포암 초음파 영상 (a) 초음파 조영제 주입 전 (b) 초음파 조영제 주입 후 25초 (심찬섭, 2009, 소화기연수강좌)

한편 초음파 조사시 에너지를 높이면 치료적 효과를 나타낼 수 있으며, 이는 열적 현상, 또는 신체내부에 있는 미세기포의 공동화 현상 (Cavitation) 등의 기전을 통해 나타난다. 열적 효과는 음파 에너지가 집중된 초점 부위에 전달된 음파에너지가 조직에 흡수되면서 유도되는 온도가 상승에 의한 약물의 흡수 정도 활성화 및 면역력 증가 (hyperthermia)와 급격한 온도 상승에 의한 조직의 열적 괴사 (thermal ablation)와 관련된다. 또한 미세 기포에 상대적으로 높은 압력의 초음파가 조사되거나 순간적으로 shock wave가 전달되는 경우, cavitation 현상이 유발되며 이는 열적 현상과는 달리 순간적으로 매우 국지적인 (수 μm 이하) 기계적 충격을 유발하여 세포의 막을 흔들어 줌으로써 세포막의 투과율이 일시적으로 증가하는 효과가 나타난다.[26-28]

이렇게 초음파 조영제는 CT, MRI와는 달리 영상의 질을 개선하는 용도 외에도 치료용 초음파와 함께 약물 투여 및, 초음파 종양 수술 효과 개선 등

을 위한 치료용으로도 활용이 가능하다. 이상적인 초음파 조영제는 독성이 없어야 하며, 혈관으로 주입 가능하여야 하고, 폐의 모세혈관 내에서 자유롭게 이동할 수 있을 정도로 마이크로 단위의 작은 크기여야 한다. 또한 오랫동안 사용하기 위해서 높은 안정성을 가지고 있어야 한다.[15, 29-31]

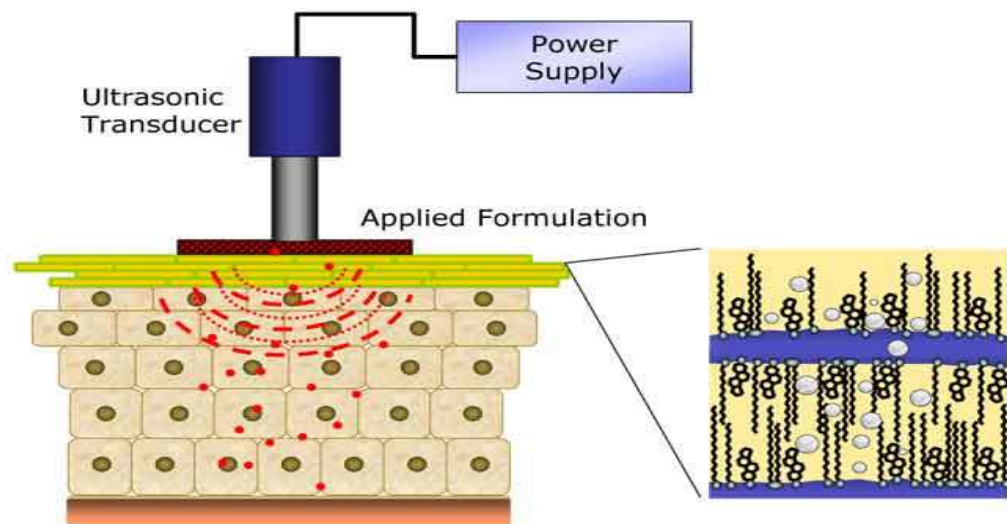


그림 2.5 Sonophoresis (Rolf daniels, 2004, Skin care forum)

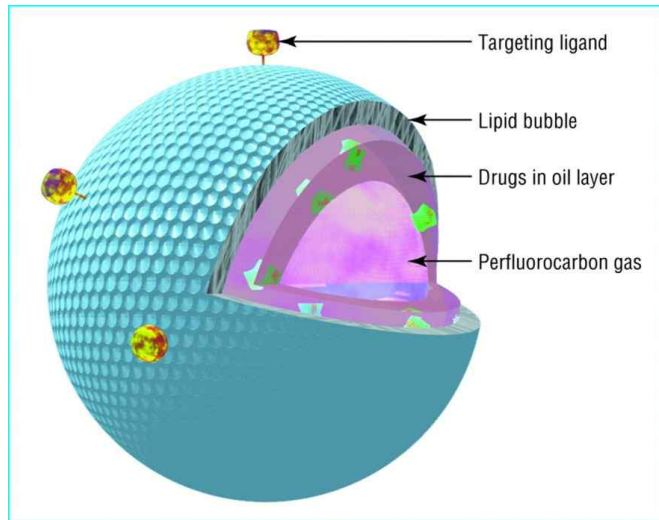


그림 2.6 초음파 조영제의 구조 (Evan C. Unger, 2004, Advanced drug delivery reviews)

초음파 조영제는 미세기포로 구성되며 그 크기가 2-10 μm 로 이루어져 있다. 이 기포는 안정성 확보를 위하여 shell로 보호되어 있다. Shell 물질로는 생체 내 존재하는 albumin 등의 단백질 또는 lipid 물질이 사용되는 것이 일반적이거나, 최근에는 polymer의 활용도 연구 중이다.[16, 31-32]

2.2 초음파 조영제의 기본 원리

초음파 조영제의 기본 원리는 초음파에 대한 기포의 반응 특성, 즉, 초음파 반사의 증가 (increased reflection), 기포 운동의 비선형성 (nonlinear behavior), 기포의 파열 효과 (bubble disruption)에 근거한다. 무엇보다도 초음파 조영제는 획기적으로 증가하는 기포에 대한 초음파 산란 효과를 이용한다. 초음파 조영제가 초음파의 산란을 증가시키는 초음파 조영제와 주변 조직간의 음향 임피던스 차이가 매우 크고, 의료용 초음파의 전형적인 주파수 대역인 2-10 MHz에서 공진 하기 때문이다.[33]

$$\sigma = \left(\frac{1}{144} \pi k^{\frac{1}{4}} a^b \right) \left(\left| \frac{x_0 - x}{x} \right|^2 + \frac{1}{3} \left| \frac{3(\rho_s - \rho)}{2\rho_s - \rho} \right|^2 \right)$$

식 2.1 산란 단면의 크기

여기서 σ 는 산란된 초음파 강도, $k=2\pi/\lambda$, λ 는 파장, a 는 산란체의 직경 ($a \ll \lambda$), k_s , ρ_s 는 각각 산란체의 단열 압축율 및 밀도, k , ρ 는 산란체 주위 매질의 단열 압축율 및 밀도를 의미한다. 식(2.1)에서 첫 번째 괄호 부분은 산란체의 직경이 초음파 산란에 큰 영향을 주고 있음을 의미한다. 두 번째 괄호 부분은 산란체와 주변 매질간의 단열 압축율과 밀도 차이가 초음파 산란에 기여하는 효과를 반영한다. 만일 산란체와 주변 매질간의 밀도와 압축율이 같거나 유사하다면 초음파 산란은 전혀 발생하지 않거나 거의 발생하지 않는다.[34]

또한 초음파 조사 시 초음파 조영제는 비선형적으로 진동하기 때문에 신

호 성분에는 서브 하모닉 성분이 포함된다. 이러한 서브 하모닉 성분을 이용하여 영상을 구성한 것이 최근 임상적 유용성이 급증하는 서브 하모닉 영상이다.[35]

그리고 초음파 조영제는 외부의 강한 초음파에 의해 파괴될 수 있다. 초음파를 이용하여 초음파 조영제를 파괴하면 기포가 파괴되면서 발생하는 입력파의 크기나 위치로부터 진단에 필요한 정보를 얻을 수 있다.[36] 또한 UCA 기포 내에 약물이 주입된 경우 국부적인 약물 투여 효과를 얻을 수 있다.[37]

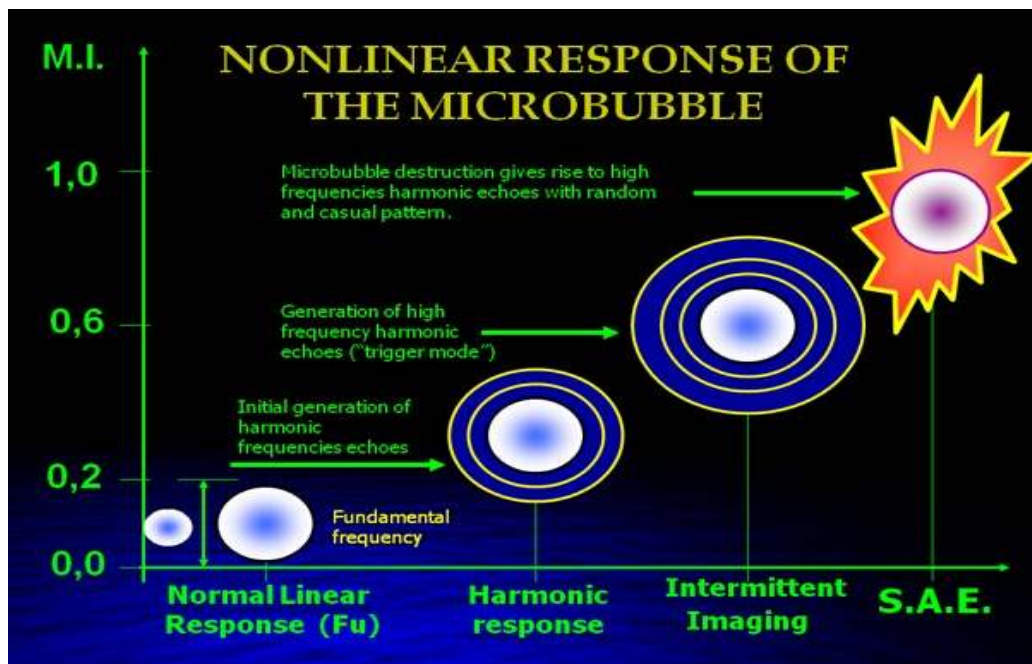


그림 2.7 초음파에 따른 초음파 조영제의 반응 (Vincenzo migaleddu, 2009, Methods of cancer diagnosis)

2.3 초음파 조영제의 임상적 활용

1) 염증 반응에 대한 Imaging

염증과 이에 대한 면역 반응이 발생하는 원인은 내피 조직 층을 통해 염증을 유발하는 세포들이 체내 순환계로부터 표적이 되는 조직으로 이동하기 때문이다. 염증을 유발하는 세포의 이동을 내피 조직에 부착된 특정한 분자에 의해 조절되는데 이 분자는 혈류 속에서 염증 세포의 이동 속도를 늦추고 염증 세포들이 내피 조직의 벽을 넘을 수 있도록 한다. 세포에 부착되어 있는 분자는 다른 세포나 extracellular matrix과의 결합에 관련되어 세포 표면에 존재하는 단백질로 Intercellular Cell Adhesion Molecule (ICAM-1)과 Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM-1)이 염증을 detect 하는데 널리 사용된다. ICAM-1과 VCAM-1을 표적으로 하는 항체는 이미 개발되어 있으며 이러한 항체를 microbubble 표면에 부착함으로써 염증 반응을 초음파로 이미징 할 수 있다.[38-40]

2) 신생혈관 생성 Imaging

신생혈관 생성기작 (Angiogenesis)은 이미 존재하는 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되기 위해 내피 조직의 세포가 자라나는 생물학적 과정으로 성인의 경우 난소 주기와 상처 치유 과정, 질병 과정 등에서 발생한다. 신생혈관 생성 기작에 대해 주로 사용되는 표적으로는 내피조직의 $\alpha v\beta 3$ integrin으

로 Glioma(신경교종)을 포함한 다른 종양들에서 발견되는 receptor이다. 이러한 receptor를 표적으로 하는 ligand를 초음파 조영제인 microbubble에 결합시켜 특이적으로 신생혈관을 표적 지향할 수 있게 함으로써 종양과 암세포의 전이에 대한 탐지가 가능하게 된다. 또한 이를 이용하여 치료 목적의 모니터링과 국부적인 약물 전달이 가능하다.[41-43]

3) 혈관내의 혈전에 대한 Imaging

초음파 조영제의 발달로 인해 최근에 정맥 깊숙한 곳까지 진단이 가능해졌고 심장내부의 혈전을 개선할 수 있게 되었다. IIbIIIa는 혈소판에서 발견되는 integrin으로 fibrinogen에 대한 receptor로 작용한다. 이 물질을 표적으로 하는 microbubble은 체내에 생기는 혈전에 의한 응고 물질에 달라붙고 이를 이용하여 detect하는 것이 가능하다. 이와 유사한 방식으로 fibrinogen을 표적으로 하는 liposome으로 심장에서 발생한 apical thrombi의 이미징을 향상시킬 수 있다.[40, 44-45]

4) 약물전달에서의 초음파 조영제

초음파 조영제인 microbubble 속에 약물을 넣어 체내에 투여했을 때 초음파를 가하게 되면 아주 높은 음압으로 인해 체내에 투여된 microbubble이 빠른 속도로 파괴된다. 이러한 방식은 보통 진단의 목적으로 사용되는 방법이

지만 특정한 조건아래 문제가 될 수 있는 bioeffect를 야기할 수도 있다. 예를 들어 초음파의 음압이 아주 강하기 때문에 약한 모세혈관이 파열된다거나 미세혈관의 누수, 용혈 현상 등이 일어날 수 있다. 이 밖에도 조영제의 농도가 높은지 낮은지, 어떠한 전달 방식을 쓰는지, 초음파를 사용할 때의 설정 상태, 어떠한 조직을 표적으로 삼을 것인가 등과 같은 여러 요소들이 조합되었을 때 어떠한 예기치 못한 결과가 두드러질 수도 있다.[46-51]

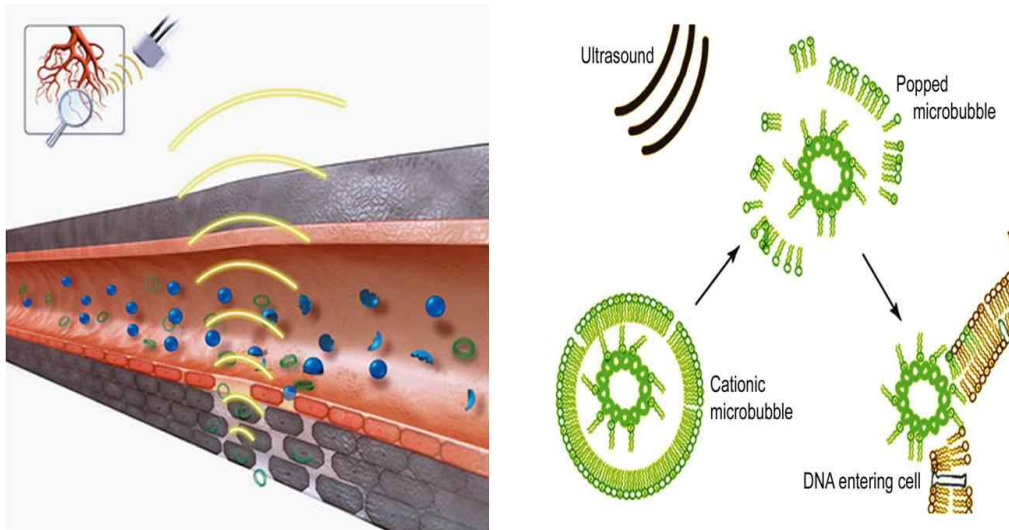


그림 2.8 초음파에 의한 초음파 조영제의 파열 효과 (Philips 2009, Blomley MJ, BMJ 2001)

체내에 투여된 microbubble이 초음파에 의해 파괴될 경우 그 영향으로 미세혈관이 즉각적으로 파괴 될 수 있다. 그 결과로 미세 혈관 속에 있던 적혈구 세포들이 빠져 나와 체내 조직 사이에 위치하게 된다. 이 점에 착안하여 단순한 이미징에서 한 단계 더 나아가 치료의 목적으로 bubble을 사용할 수 있는 가능성이 생겼다. 세포와 plasmid DNA 그리고 약물 전달 입자들은 일반적으로 내피 층을 통과하고 혈류로부터 빠져 나오기 어렵지만 초음파 방사를

통해 microbubble을 파괴함으로써 표적부위의 혈관 투과성이 향상되어 약물 전달 입자들이 내피 층을 통과하여 혈류로부터 빠져 나올 수 있게 된다.[52-53]

또한 microbubble에 근접해 있는 경우 초음파 방사로 microbubble이 파괴 되었을 때 cavitation nuclei로 작용하는 microbubble의 특성으로 인해 세포막의 투과성이 향상된다. 물론 초음파 자체만으로도 세포막의 투과성이 향상되지만 추가적으로 microbubble을 사용함으로써 얻는 효과는 더욱 커진다. 또한 초음파 에너지의 흡수 및 소실을 통해 발생하는 국소적이고 일시적인 온도 증가는 또한 phospholipid bilayer 유동성에 영향을 미치고 결국 세포의 투과성에도 영향을 미친다.[54-55]

제 3 장 연구 방법

3.1 제작 방법

1. Albumin shell 초음파 조영제 제작 방법

식염수 25ml에 냉장 보관 되어 있는 소혈청 albumin(Sigma, USA) 0.2g을 섞는다. 그 후 마이크로 피펫(eppendorf 1000, Germany)을 이용하여 2ml을 빼낸 뒤 2ml vial에 담아 둔다. 2ml vial에 담긴 혼합물 2000 μ l에 액화된 Perfluorobutane(Alpolo, FC-31-10, UK)을 마이크로 피펫을 사용하여 20 μ l을 섞고, Vialmix (Lantheus Medical Imaging, Inc., USA)를 사용하여 45초 동안 흔든다. 섞인 용액을 5 μ m 시린지 필터(Millex-GV 13mm 5 μ m RS, Millipore, USA)를 사용하여 여과한다. 이 때 사용된 시린지 필터는 버블 사이즈를 고려하여 선택한다.

1) Albumin shell 조영제를 제작 시, Albumin 및 Gas 비율 결정 과정.

- ① 식염수 25ml에 냉장 보관 되어 있는 소혈청 albumin(Sigma, USA) 0.01g을 섞는다.
- ② 마이크로 피펫을 이용하여 1ml을 빼낸 뒤 2ml vial에 담아 둔다.
- ③ 2ml vial에 담긴 혼합물 1ml에 액화된 Perfluorobutane을 마이크로 피

펫을 사용하여 2 μ l을 섞고, Vialmix를 사용하여 45초 동안 흔든다. 섞인 용액을 5 μ m 시린지 필터를 사용하여 여과한다.

- 초음파 영상 장비로 반사 신호 확인 결과 Brightness가 낮아서 Gas의 비율을 조절 하였다.

- ① 식염수 25ml에 냉장 보관 되어 있는 소혈청 albumin 0.01g을 섞는다.
- ② 마이크로 피펫을 이용하여 1ml을 빼낸 뒤 2ml vial에 담아둔 샘플을 2개 만든다.
- ③ 샘플에 액화된 Perfluorobutane을 마이크로 피펫을 사용하여 10 μ l을 섞은 vial과 20 μ l을 섞은 vial을 따로 제작한 뒤, Vialmix를 사용하여 45초 동안 흔든다. 섞인 용액을 5 μ m 시린지 필터를 사용하여 여과한다.

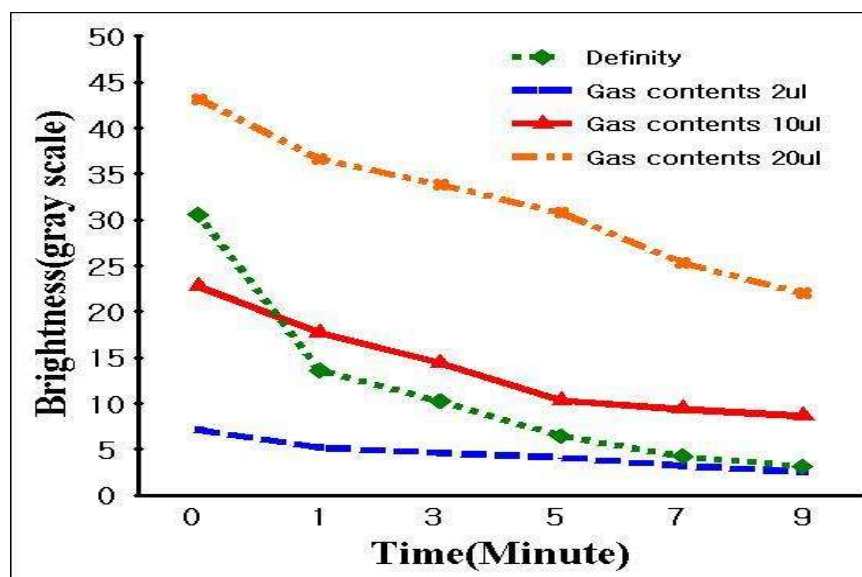


그림 3.1 초음파 조영제 제작 시 Gas의 비율 조절

- 초음파 영상 장비로 반사 신호 확인 결과 Brightness의 변화가 Gas를 20ul 넣었을 때 조금 있을 뿐, 별 다른 변화가 없어서 Albumin 비율을 조절하였다.

- ① 식염수 25ml를 스포이드를 이용하여 비커 5개에 각각 담아둔 뒤, 냉장 보관 되어 있는 소혈청 albumin 0.01g, 0.05g, 0.1g, 0.2g, 0.4g을 각각 비커에서 혼합한다.
- ② 마이크로 피펫을 이용하여 각각 1ml을 빼낸 뒤 2ml vial에 각각 담아둔다.
- ③ 샘플에 액화된 Perfluorobutane을 마이크로 피펫을 사용하여 20ul 각각 섞고, Vialmix를 사용하여 45초 동안 흔든다. 섞인 용액을 5 μ m 시린지 필터를 사용하여 여과한다.

- 초음파 영상 장비로 반사 신호 확인 결과 Brightness의 변화가 아래의 그림 3.2처럼 나타나 식염수 25ml에 소혈청 albumin 0.2g을 혼합하여 Aulbumin shell 조영제를 제작하였다.

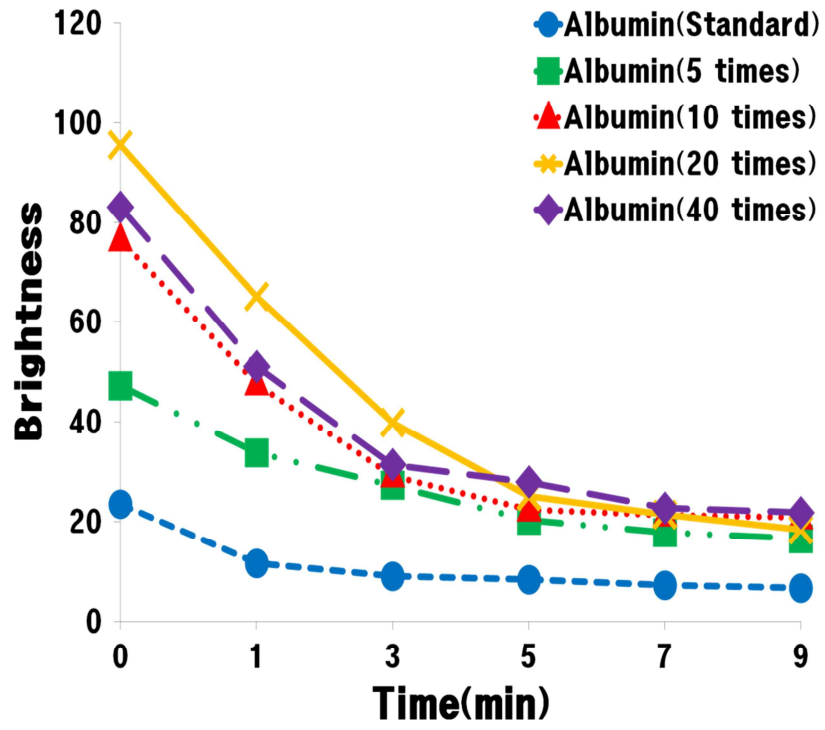


그림 3.2 Albumin shell 초음파 조영제 제작 시 albumin의 비율 조절

2. Lipid shell 초음파 조영제 제작방법

식염수 50ml와 글리세롤(Sigma-Aldrich, USA) 2.5ml를 섞은 뒤, 프로필렌 글리콜 (Acros Organics, USA) 52.5ml와 섞는다. 이 혼합물에 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) (Avanti Polar Lipids Inc., USA) 0.1g과 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (DPPA) (Avanti Polar Lipids Inc., USA) 0.01g을 섞은 후 hot plate(PC-420D, Corning, USA)로 60°C에서 30분정도 가열한다. 그 다음 마이크로 피펫을 사용하여 2000 μ l를 빼낸 후 2ml vial에 담아 둔다. 여기서 사용된 DPPC와 DPPA는 파우더 형태이므로, 가열 시간은 파우더가 다 녹았을 때까지이며, 온도에 따라 시간을 조절할 수 있다. 2ml vial에 담아둔 혼합물 2000 μ l에 액화된 Perfluorobutane을 마이크로 피펫을 사용하여 20 μ l을 섞고, Vialmix를 사용하여 45초 동안 혼돈다. 섞인 용액을 100 μ m 멤브레인 필터를 사용하여 여과한다. 이 때 사용된 멤브레인 필터는 버블 사이즈를 고려하여 선택한다.

3. Perfluorobutane 액화 시스템

그림 3.3 은 Perfluorobutane 을 액화시키기 위한 시스템의 스케메틱이다. Perfluorobutane 의 끓는점이 -2°C 이기 때문에 상온에서는 사용을 할 수 없다. -2°C 이하의 환경을 만들기 위해 Freezer(젤라또 쇼케이스)가 사용되었다. 시스템 구성을 살펴보면 먼저 Perfluorobutane 의 양을 조절하기 위해서 Regulator 가 사용되었다. 이 Regulator 끝에 실리콘 튜브를 연결시켜 Freezer 안에 들어 있는 Circular tank 에 Perfluorobutane 이 나올 수 있도록 제작하였다. 항온수조는 Circular tank 안의 온도를 -2°C 이하로 낮추기 위해 사용된다. 항온수조는 -20°C 까지 조절이 가능하며, 본 실험에서는 -15°C 를 사용하였다. 항온수조의 냉매로는 알코올을 사용하였으며, 실리콘 튜브를 통해 Circular tank 를 알코올로 순환시켜 온도를 -15°C 로 낮추어 Perfluorobutane 을 액화 시킨다. 액화된 Perfluorobutane 는 Freezer 안에서 실험에 사용되었다.

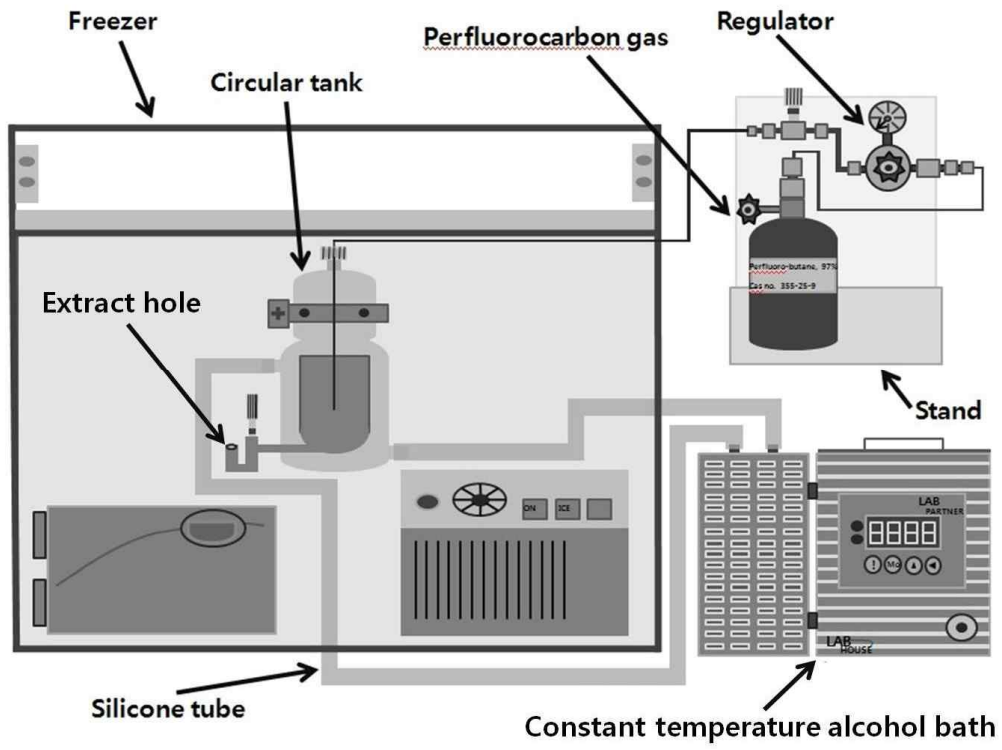


그림 3.3 Perfluorobutane 액화 시스템 구성도

3.2 평가 방법

1. 광학현미경을 통한 미세기포의 밀도 및 크기 분석

미리 제작된 Lipid 및 Albumin shell의 2가지 초음파 조영제와 현재 시판 중인 조영제인 Definity®와 Sonovue를 냉장보관 시킨 뒤, 관찰 직전에 activation한다. activation이 끝나면 마이크로 피펫을 사용하여 Slide glass에 10ul 떨어 뜨린 후 Cover glass로 덮는다. 그 뒤 Slide glass를 현미경 Plate 위에 올려 놓은 뒤 현미경의 초점을 맞춘다. 영상은 광학현미경(KH-7700, Hirox, Japan)을 이용하여 획득하였으며, 이 때 사용된 렌즈(MXG-10C, OL-140Ⅱ)의 배율은 1400배이며, 3D 영상 획득 시 사용된 렌즈(MXG-5040Z) 배율은 400배 상태에서 관찰하였다.

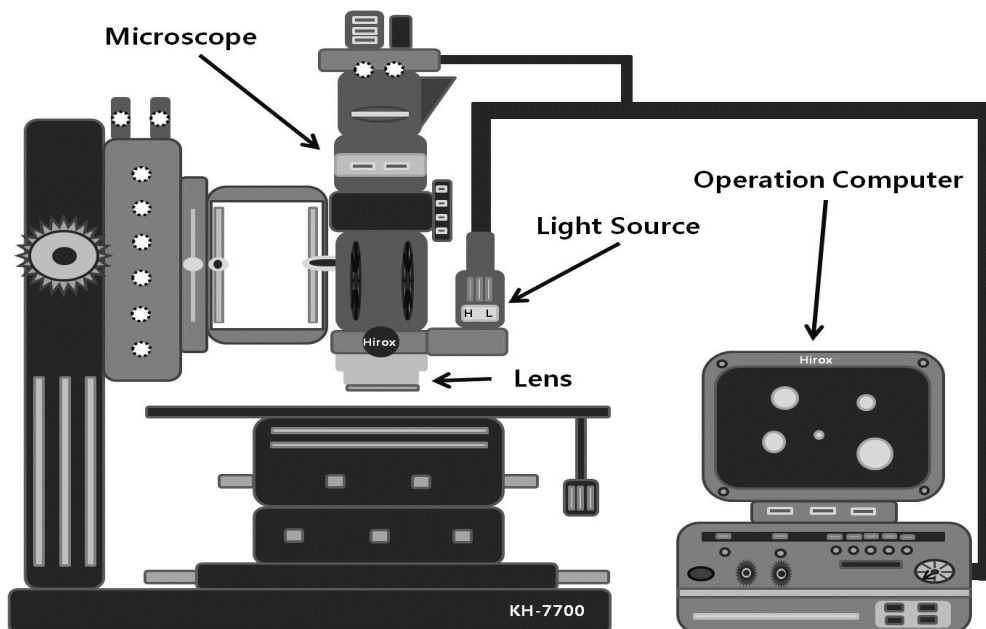


그림 3.4 광학현미경 시스템

2. Cryo-SEM 촬영

Cryo-SEM은 수분을 함유하거나 액상 시료를 동결된 상태로 관찰하는 방법으로 rapid cooling, fracturing, sectioning, etching, coating과 같은 다소 복잡한 여러 과정의 전처리(Cryo-methods)로 구성된다. 각 과정에서는 분석 목적이나 시료 특성(예: 시료크기, 물 함량 등)을 고려하여 최적의 조건을 설정하여야 한다.

미리 제작된 시편(Ultrasound contrast agent)을 냉장보관을 시킨 뒤, 동결할단을 위한 전용 알루미늄 캐리어에 마이크로 피펫을 사용하여 10ul loading 후 액체 질소 내(-196°C)에서 급속 동결 시켰다. 동결된 시료는 동결할단장치(BAF060, BAL-TEC, Balzers, FL)를 이용하여 -120°C에서 동결할단을 시행하고, 1.5kV, 60mA 조건에서 Pt 이온코팅을 실시하였다. 전처리가 완료된 시편은 공기중 노출 없이 vacuum chamber transfer(VCT100, BAL-TEC, Balzers, FL)를 이용하여 cooling stage가 장착되어 있는 SEM(LEO 1455VP, Carl Zeiss, Germany)으로 옮겨 가속전압 15kV, stage temperature -150°C 상에서 관찰하였다.

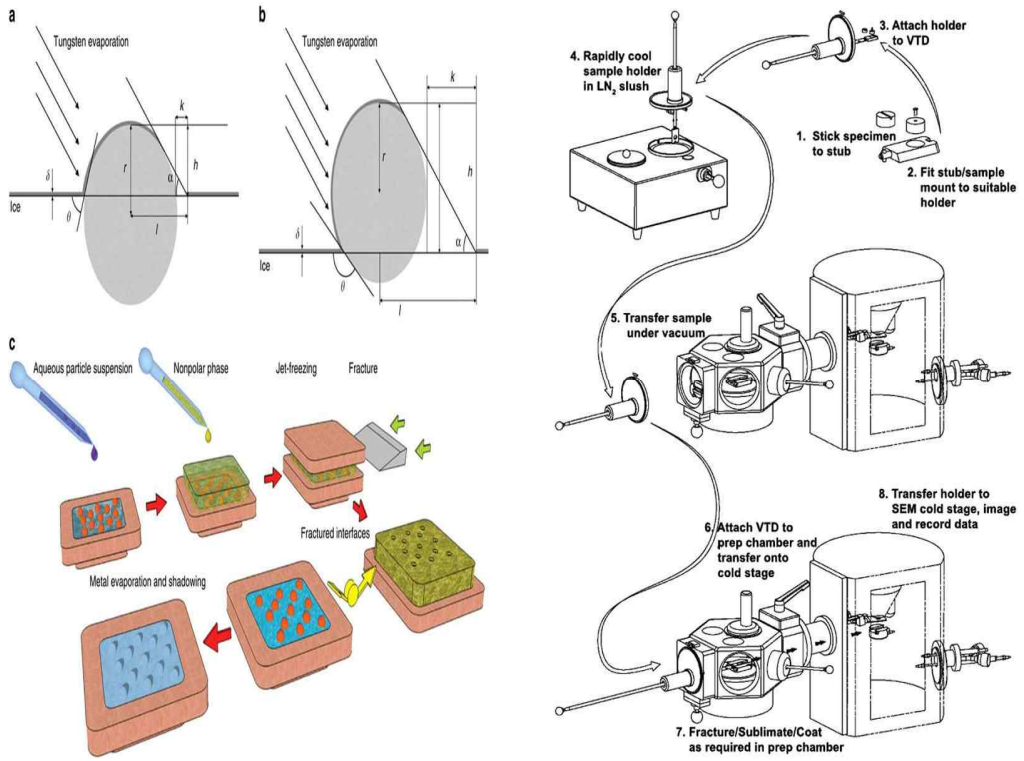


그림 3.5 Cryo-SEM의 원리 및 시스템 (Marilyn carey, Cryo-SEM mdae

easy)

3. 입도 분석기를 이용한 크기 분포 분석

입자에 일정파장의 레이저 beam이 도착하면, 산란, 투과, 흡수된다. 산란되는 빛 중에는 회절(Diffraction), 굴절(Refraction), 반사(Reflection)되는 것이 있으며, 흡수된 빛의 일부는 입사 빛 보다 긴 파장의 빛을 다시 방출하기도 한다. 이러한 현상은 동시에 복합적으로 나타나며 이를 통틀어 광산란이라고 하며, 광산란정도를 검출기로 검출하여서 입도분포를 측정한다. 사용된 입도분석기는 Mastersizer 2000(Malvern Instruments Ltd, U.K)으로 emulsion, suspension, 분체의 입도를 레이저 산란방식에 의한 입자의 분포와 크기 측정을 0.02um부터 1000um까지 측정이 가능하다. 측정 전 조영제와 용매인 3차 증류수의 Refractive Index를 입력한다. 조영제 같은 경우 Protein의 값인 1.4를 사용하였고, 3차증류수의 경우는 Water의 값인 1.33을 사용하였다. 장비의 셋팅이 끝나면 미리 제작되어 냉장보관된 Lipid 및 Albumin shell의 2가지 초음파 조영제와 현재 시판중인 조영제인 Definity®와 Sonovue를 관찰 직전에 activation한다. activation이 끝나면 700ml 비커에 3차 증류수에 조영제를 1000:1로 혼합한다. 이때 혼합액의 양은 500ml 이상이 되어야 한다. 그 뒤 입도분석기에 하단에 있는 교반기에 비커를 위치시키고 실험을 진행한다. 실험의 반복횟수는 15회 이다.

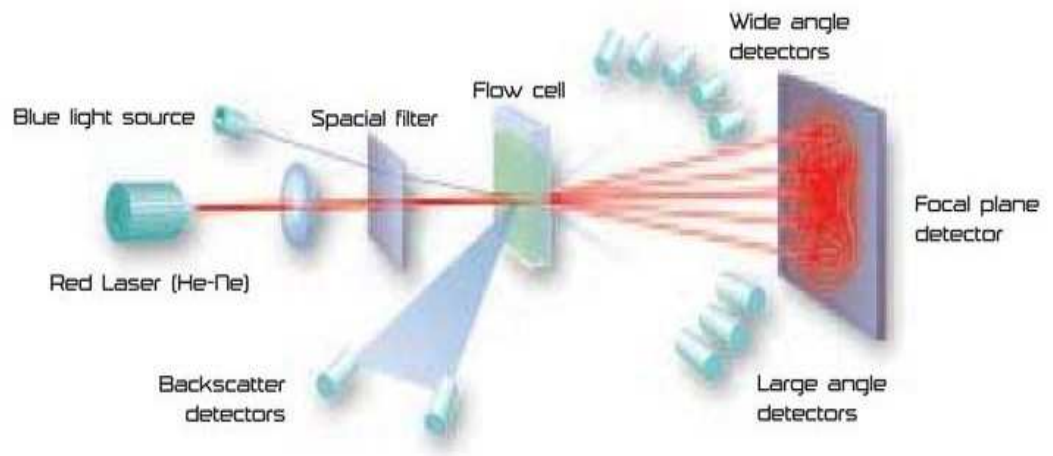


그림 3.6 입도 분석기의 원리 (Mastersizer 2000, Malvern)

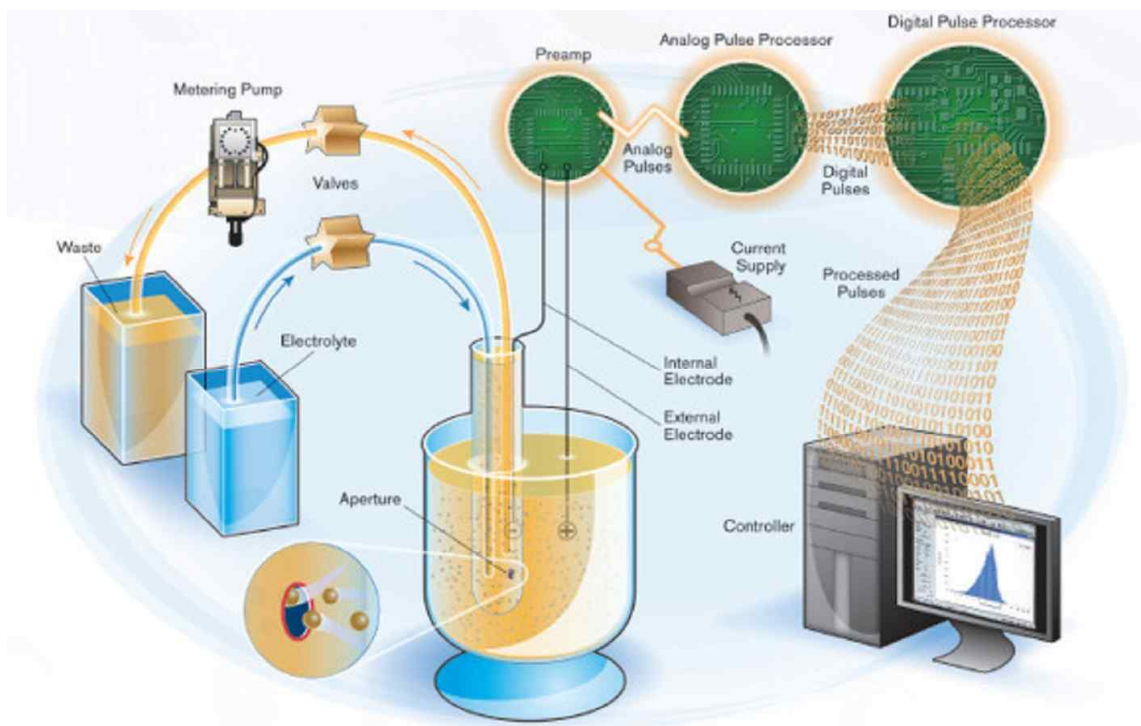


그림 3.7 입도 분석을 위한 시스템 구성도 (Mastersizer 2000, Malvern)

4. 영상기기를 통한 반사 신호 증가 특성 분석

실험에서 사용된 물은 초음파의 감쇠를 최소화 하기 위하여 자체 제작된 디게싱 시스템을 이용하였다. 디게싱 시스템은 Gear pump(Cole parmer 75211-15, USA)와 디게싱 Header와 호스로 이루어져 있다. 실험 전 12시간 동안 degassing을 통해 용존 산소량을 50% 이하로 준비하였으며, 물의 온도는 37-38℃로 유지하였다.

먼저 미리 제작된 Lipid 및 Albumin shell의 2가지 초음파 조영제와 현재 시판중인 조영제인 Definity®를 라텍스 재질의 풍선에 Degassed water 600ml를 채운 뒤, 마이크로 피펫을 사용하여 10,000:1의 비율로 혼합한다. 그 다음 Degassed water와 초음파 조영제가 혼합된 라텍스 풍선을 Degassed water가 채워져 있는 20L 수조에 움직이지 않도록 고정한다.

영상은 Sonoace Pico(Version 1.04.02, Medison, My202c-dom , Korea)를 이용하여 획득하였으며, 이 때 사용된 초음파 프로브는 5Mhz linear transducer다. 영상은 B-mode로 획득되었으며, Mechanical Index는 0.59이며 Gain은 96dB 이다. 영상에서 밝기가 변하는 부분을 3 cm x 3 cm 선택하여 정량적으로 계산하여 비교한다. 실험 setting은 아래의 그림 3.4와 같다.

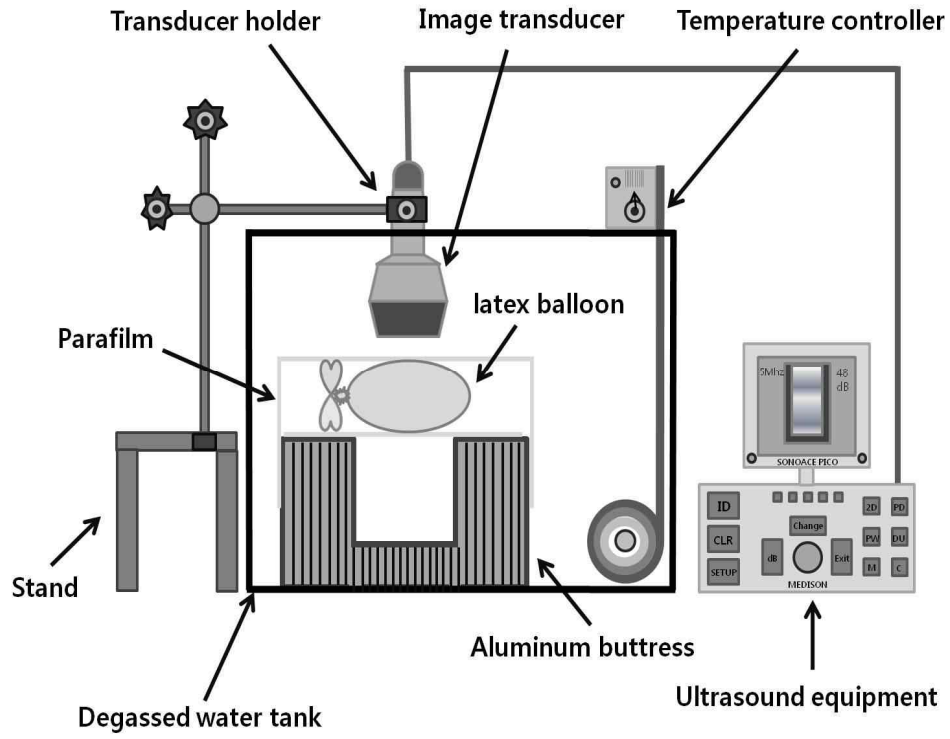


그림 3.8 영상기기를 통한 반사 신호 특성 분석을 위한 시스템 구성도

5. 세포 독성 분석

4개의 96 well plate에 293A세포를 숫자만큼 seeding을 한다. Plate가 4개인 이유는 시간마다 검사하는 plate를 따로 두고 실험하기 때문이다. Seeding 후 12시간 동안 세포가 plate에 잘 붙어서 자랄 수 있도록 5% co2 incubation에서 배양을 하게 된다. 그런 뒤에 다양한 농도로 조영제를 각 well에 맞게 넣으면 된다. 그런 다음 2, 7, 12, 22시간이 지난 후에 각각의 plate에 CCK-8 용액을 넣고 2시간 가량(1-4시간 사이) 다시 배양을 시키게 된다. 그러면 CCK-8의 용액에 WST-8이 세포와의 작용에 의해 Formazan으로 변화가 되게 되고, 이것을 흡광도를 측정하는 장치에 넣어서 450 nm의 파장에서 측정하게 된다. 그러면 세포의 증식정도 (살아있는 수)와 비례하게 흡광도 값이 높게 나오게 된다.

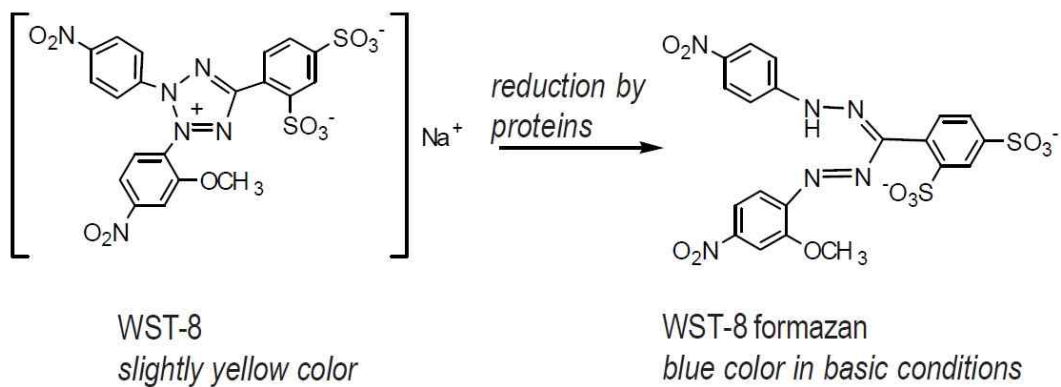


그림 3.9 WST-8 및 WST-8 Formazan의 구조 (Dojindo Molecular technologies, Inc)

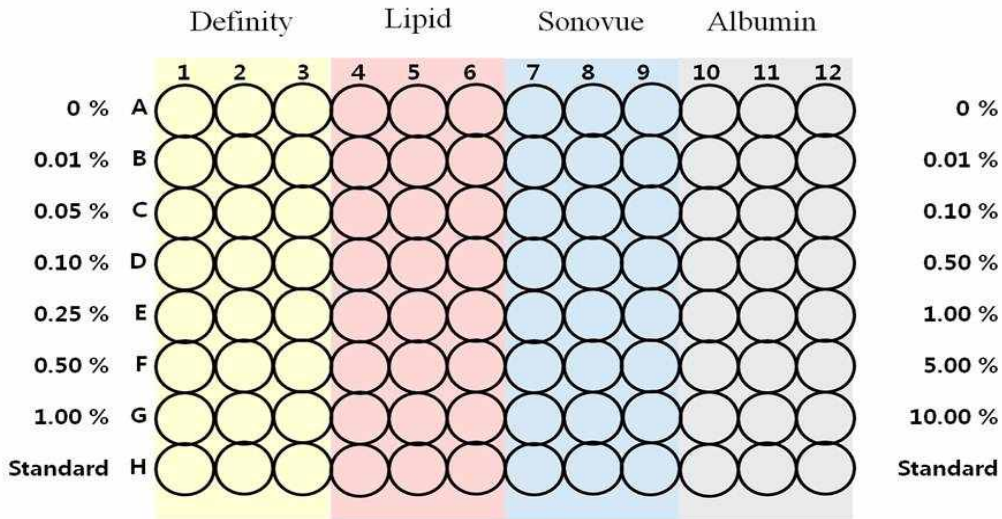


그림 3.10 세포 독성 분석을 실험 setting

	Definity			Lipid			Sonovue			Albumin		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 %			0 %			0 %			0 %		
B	0.01 %			0.01 %			0.01 %			0.01 %		
C	0.05 %			0.05 %			0.1 %			0.1 %		
D	0.1 %			0.1 %			0.5 %			0.5 %		
E	0.25 %			0.25 %			1 %			1 %		
F	0.5 %			0.5 %			5 %			5 %		
G	1 %			1 %			10 %			10 %		
H	Standard			Standard			Standard			Standard		

표 3.1 세포 독성 분석을 위한 실험 setting

6. T-TEST

두 집단 또는 두 상관적인 표본의 평균치가 동일한 모집단에서 추출되었는지를 검증하는 모수치 통계 기법이다. 실험에서 가장 많이 사용하는 방법으로 두 집단 간의 통계적 차이를 검증하는 모수적 검증 방법 중 하나이다.

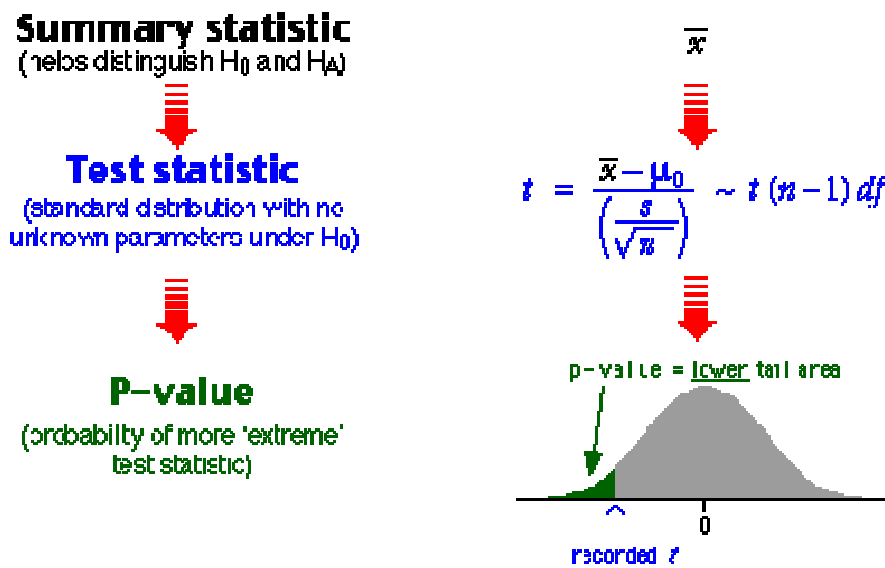


그림 3.11 T-TEST 모식도 (Massey university)

제 4 장 연구 결과

본 연구에서 제작된 Albumin shell 과 Lipid shell 초음파 조영제의 유효성을 평가하기 위해서 현재 시판되고 있는 초음파 조영제인 Definity와 Sonovue를 함께 평가를 진행 하였다.

1. 광학현미경을 통한 영상 분석 결과

광학현미경을 통한 초음파 조영제 안의 미세기포의 크기 및 밀도 분석은 2 주일에 걸쳐서 분석이 되었다. Albumin 및 Lipid shell 의 초음파 조영제가 제작된 날부터 분석이 시작되어 3 일 간격으로 반사 증가 특성을 분석 하였다.

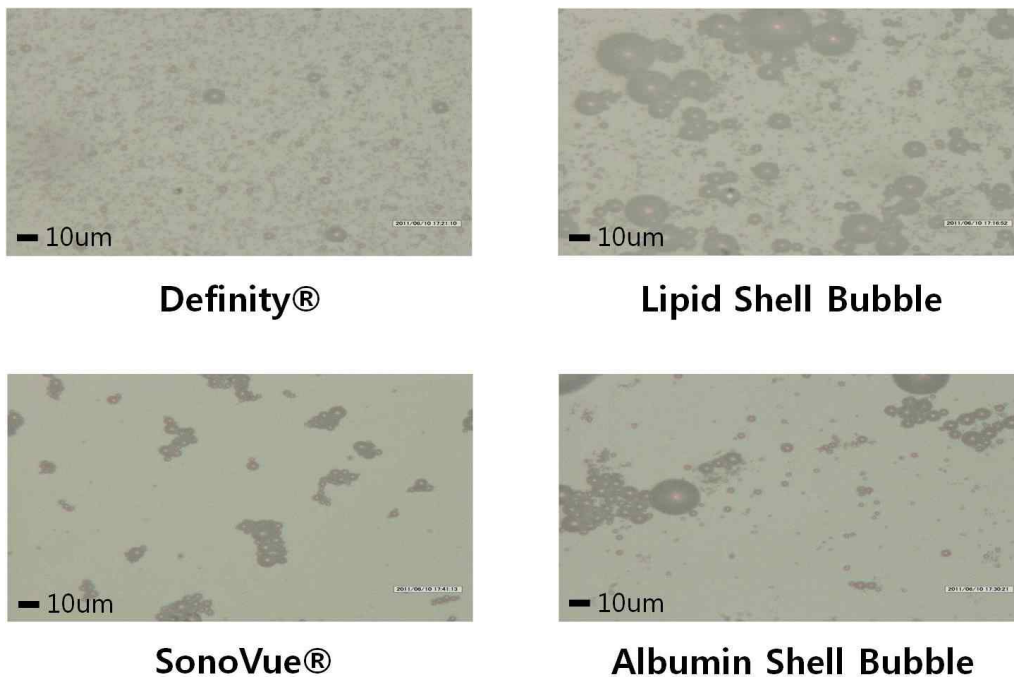
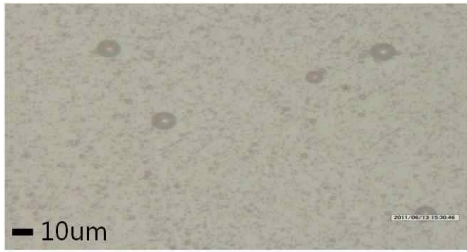
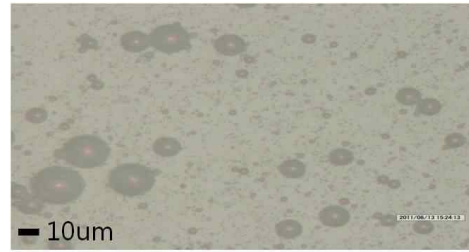


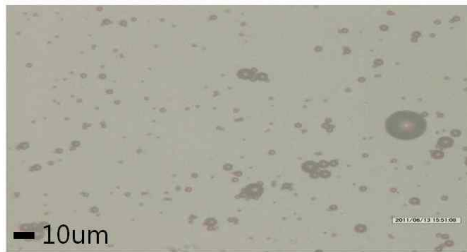
그림 4.1 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 크기 및 밀도 (Day 1)



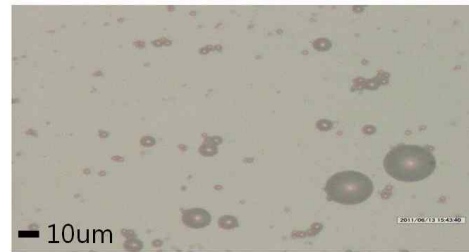
Definity®



Lipid Shell Bubble



SonoVue®

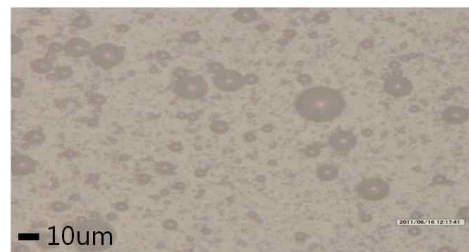


Albumin Shell Bubble

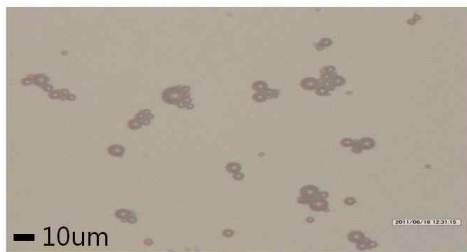
그림 4.2 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 크기 및 밀도 (Day 4)



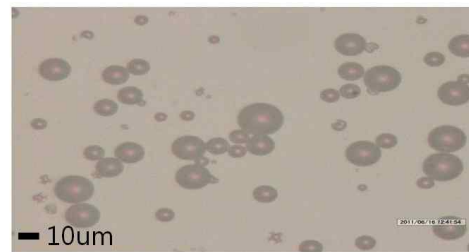
Definity®



Lipid Shell Bubble

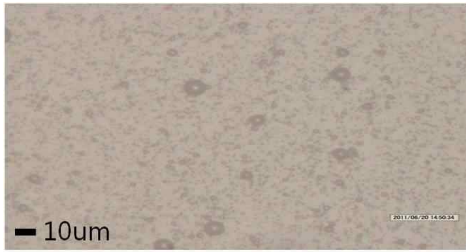


SonoVue®

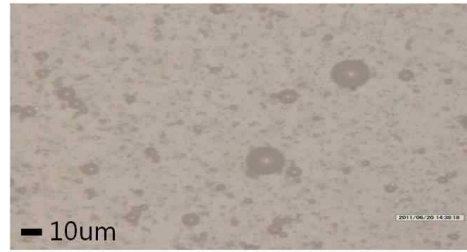


Albumin Shell Bubble

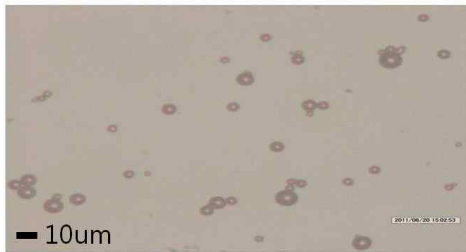
그림 4.3 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 크기 및 밀도 (Day 7)



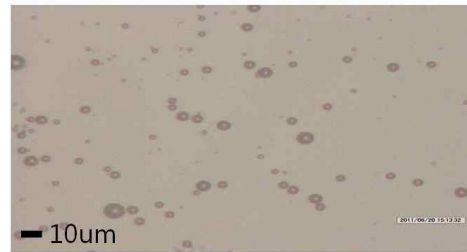
Definity®



Lipid Shell Bubble



SonoVue®

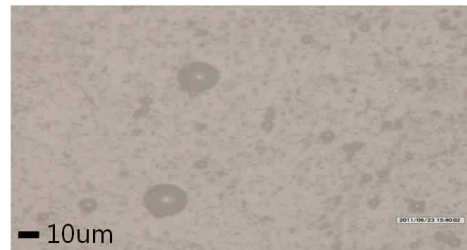


Albumin Shell Bubble

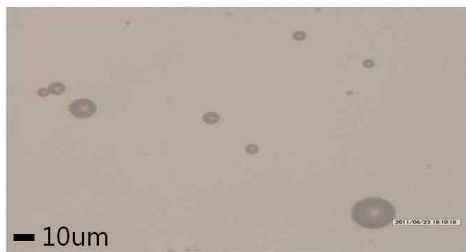
그림 4.4 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 크기 및 밀도 (Day 10)



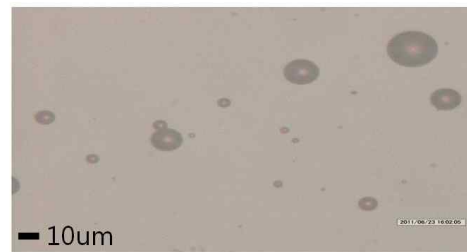
Definity®



Lipid Shell Bubble

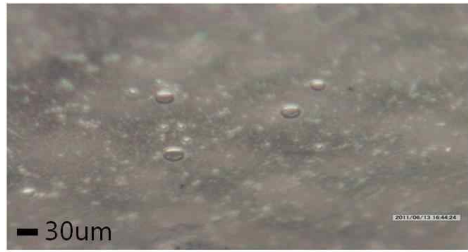


SonoVue®

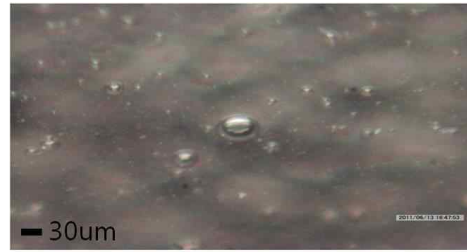


Albumin Shell Bubble

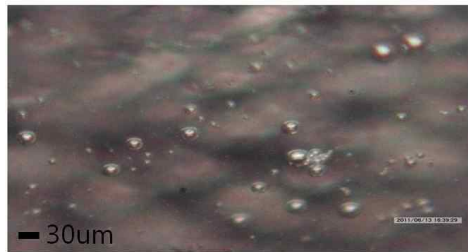
그림 4.5 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 크기 및 밀도 (Day 13)



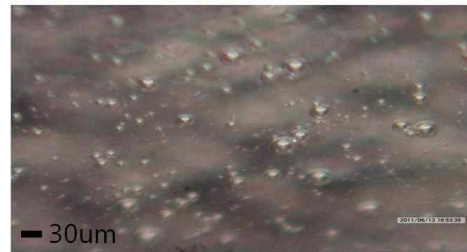
Definity®



Lipid Shell Bubble



SonoVue®



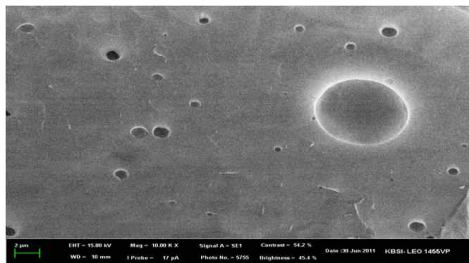
Albumin Shell Bubble

그림 4.6 광학현미경을 통한 초음파 조영제의 3D 영상 (Day 4)

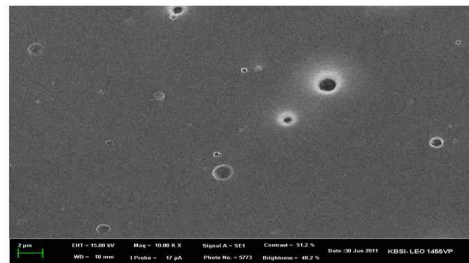
결과를 보면 초음파 조영제 안의 미세기포가 구의 형태로 성공적으로 제작된 것을 볼 수 있다. 제작된 날 영상을 보면 Definity와 Lipid shell 조영제는 높은 밀도를 보이고 있고, 그에 비해 Sonovue와 albumin shell의 경우는 낮은 밀도를 가지고 있다. 또한 Sonovue와 albumin shell의 경우는 미세기포들끼리 서로 붙는 현상도 나타남을 확인할 수 있다. 실제로 시판중인 Definity의 밀도는 $1.2 \times 10^{10}/\text{ml}$ 이고, Sonovue의 경우는 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 로 Definity가 Sonovue에 비해 미세기포수가 많다.

2. Cryo-SEM을 통한 영상 분석 결과

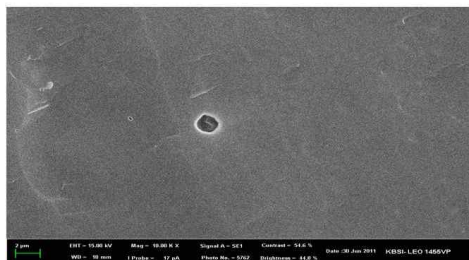
Cryo-SEM 을 통하여 4 가지 초음파 조영제 안의 미세기포의 유무를 촬영하였다. Scale bar 의 크기는 2um 이고, 15,000 배의 배율로 촬영하였다. 그림 4.7 을 보면 4 가지 초음파 조영제가 모두 구의 형태를 가지고 있는 것으로 나타나 성공적으로 초음파 조영제가 제작됨을 확인 할 수 있다.



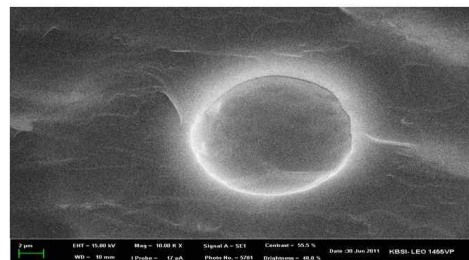
Definity®



Lipid Shell Bubble



SonoVue®

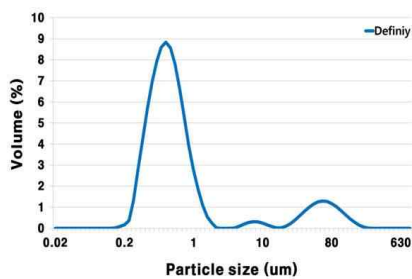


Albumin Shell Bubble

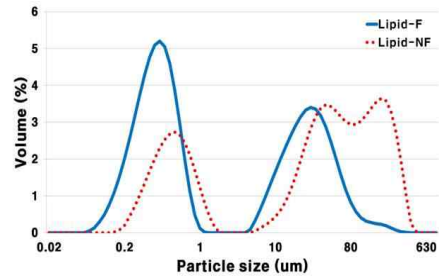
그림 4.7 초음파 조영제의 Cryo-SEM 촬영

3. 입도분석기를 통한 크기 분석 결과

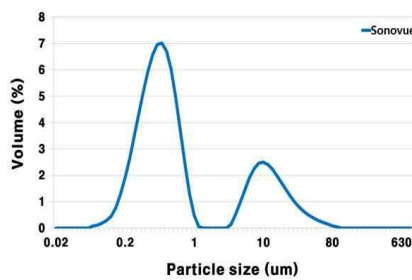
입도분석기를 통한 4 가지 초음파 조영제의 크기 분포 분석 결과를 보면 그림 4.8 과 같이 나타나는데, 시판 중인 초음파 조영제인 Definity 와 Sonovue 의 경우 대부분의 미세기포의 크기가 0.5 - 1um 임을 보인다. 그리고 제작 된 2 가지 초음파 조영제의 경우도 filtering 을 하기 전에는 10um 이상의 미세기포가 많았지만 filtering 후에는 시판중인 초음파 조영제와 비슷한 크기 분포를 가지고 있음을 알 수 있다.



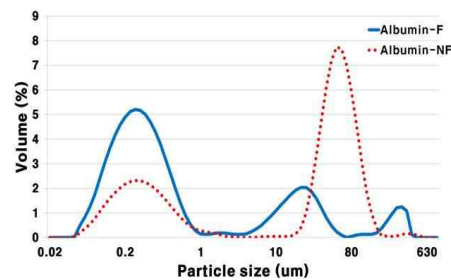
Definity®



Lipid Shell Bubble

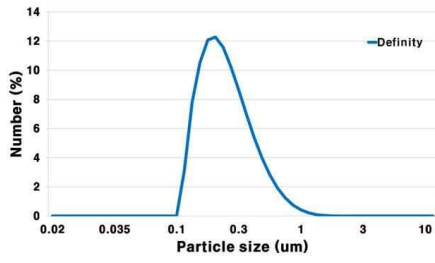


SonoVue®

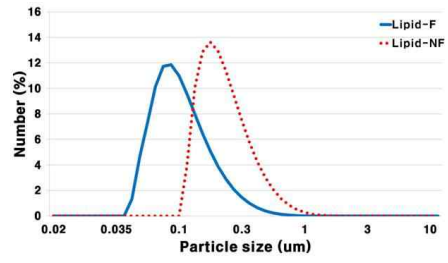


Albumin Shell Bubble

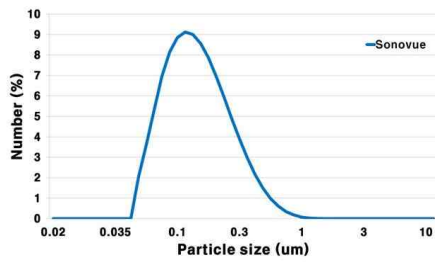
그림 4.8 입도분석기를 통한 초음파 조영제의 크기 분포 (Volume)



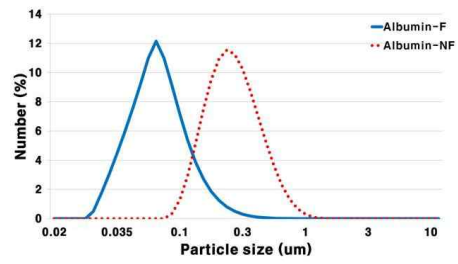
Definity®



Lipid Shell Bubble



SonoVue®



Albumin Shell Bubble

그림 4.9 입도분석기를 통한 초음파 조영제의 크기 분포(Number)

4. 영상기기를 통한 반사 신호 증가 특성 분석 결과

초음파 영상기기를 통한 촬영은 2주일에 걸쳐서 진행되었다. Albumin shell 및 Lipid shell의 초음파 조영제가 제작된 날부터 분석이 시작되어 3일 간격으로 반사 증가 특성을 분석하였다. 유효성을 비교 평가 하기 위해서 시판중인 초음파 조영제인 Definity와 Sonovue를 함께 촬영 하였으며, 영상은 촬영할 때에는 2분 간격으로 하였고, 촬영이 끝난 후 영상의 ROI를 3cm x 3cm 으로 설정한 후 후처리 후 정량화하였다.

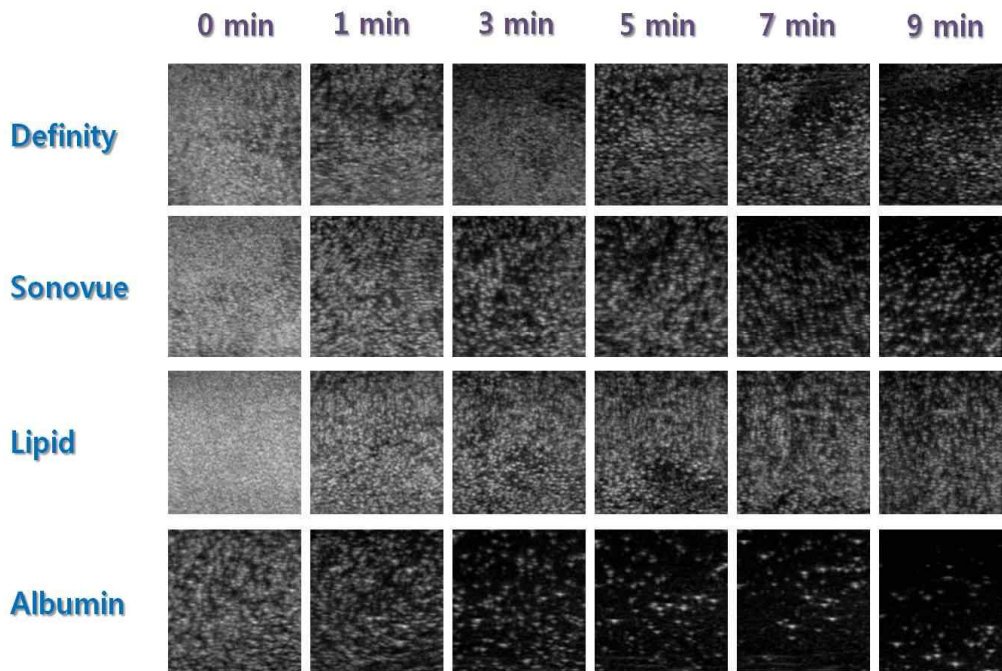


그림 4.10 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 영상 (Day 1)

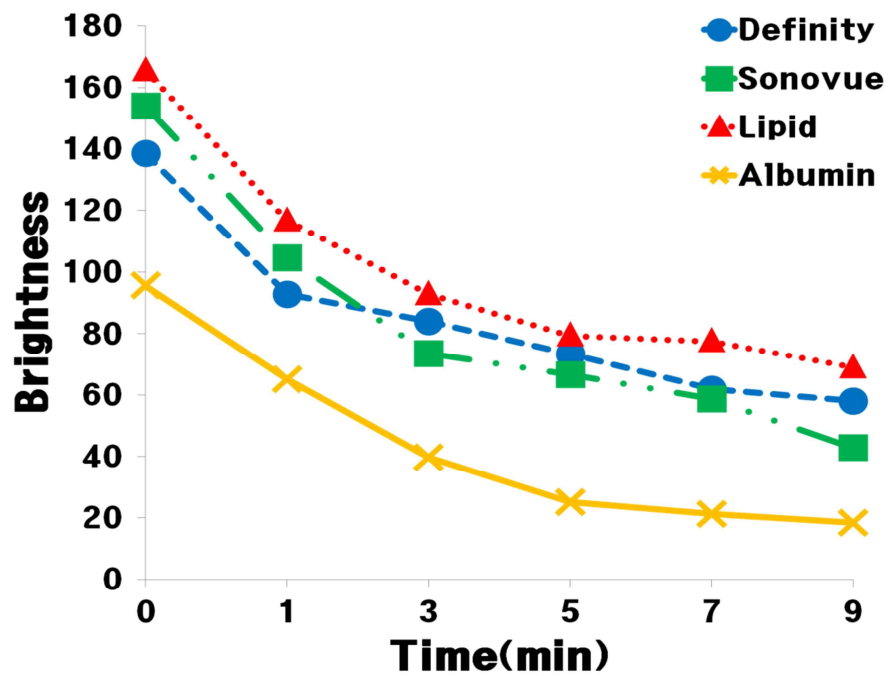


그림 4.11 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 그래프 (Day 1)

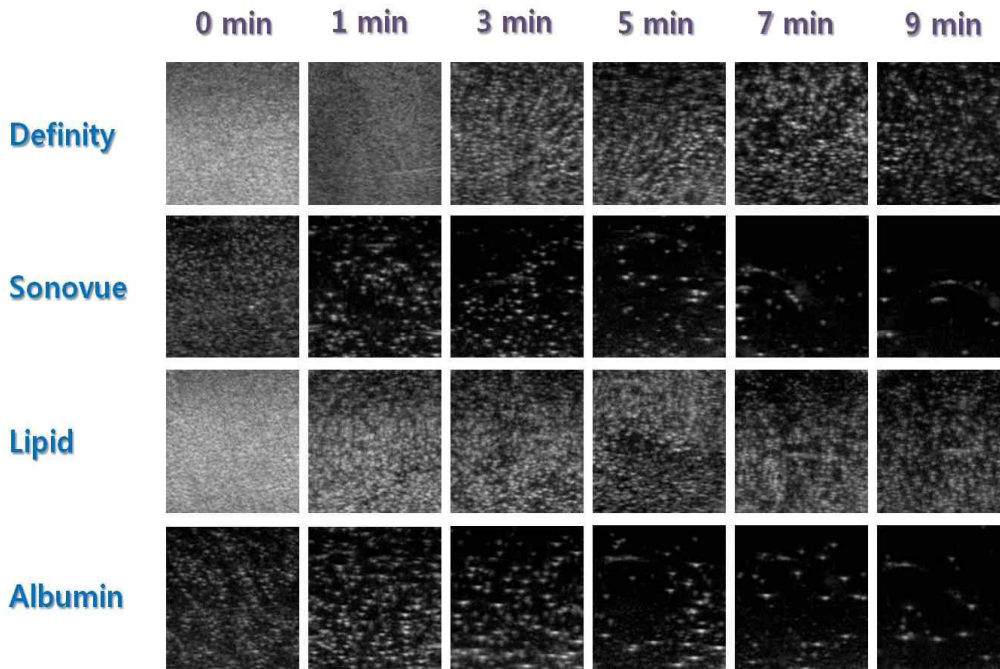


그림 4.12 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 영상 (Day 4)

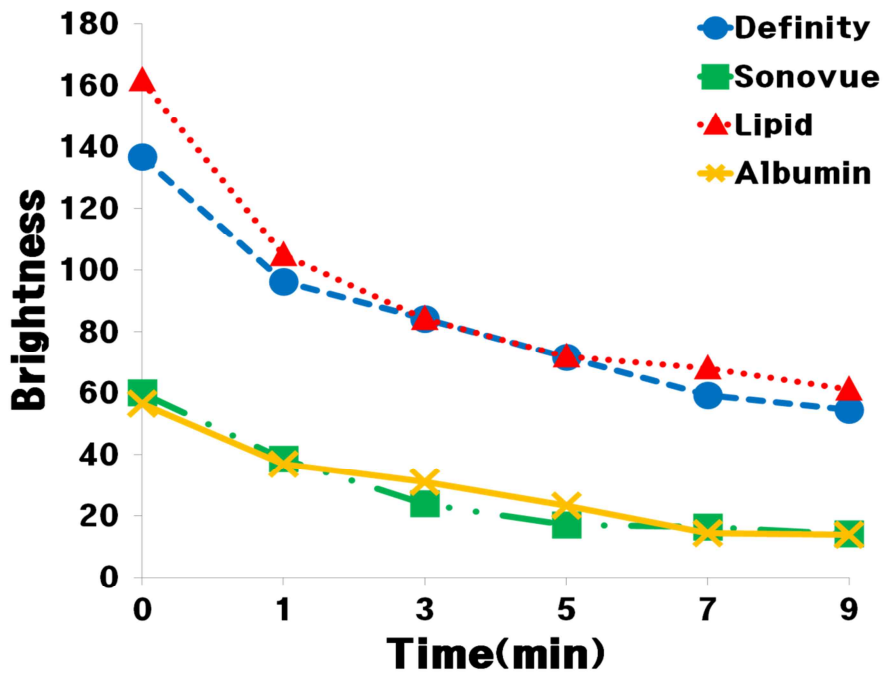


그림 4.13 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 그래프 (Day 4)

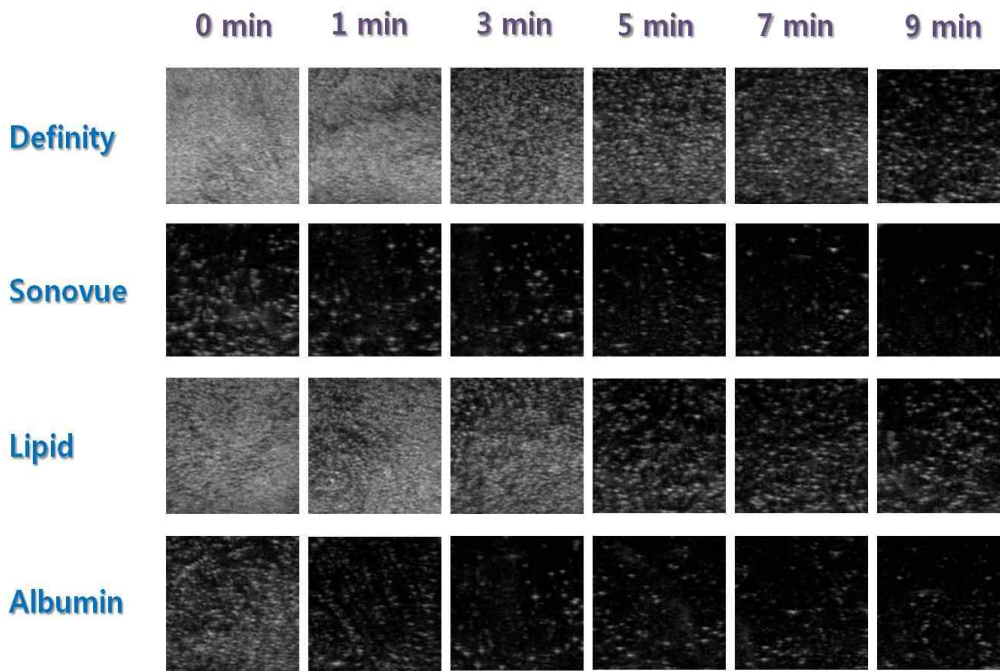


그림 4.14 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 영상 (Day 7)

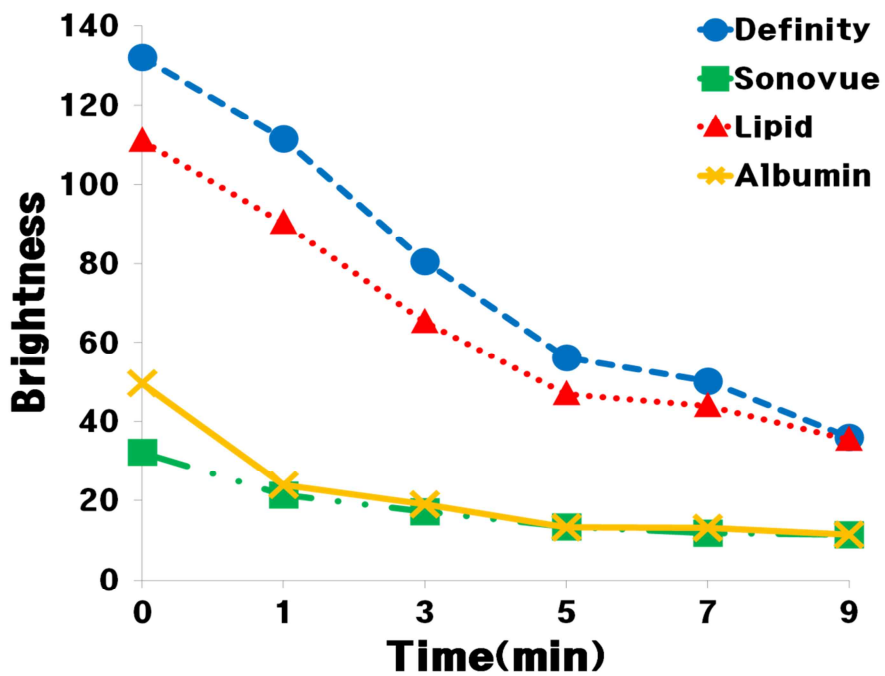


그림 4.15 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 그래프 (Day 7)

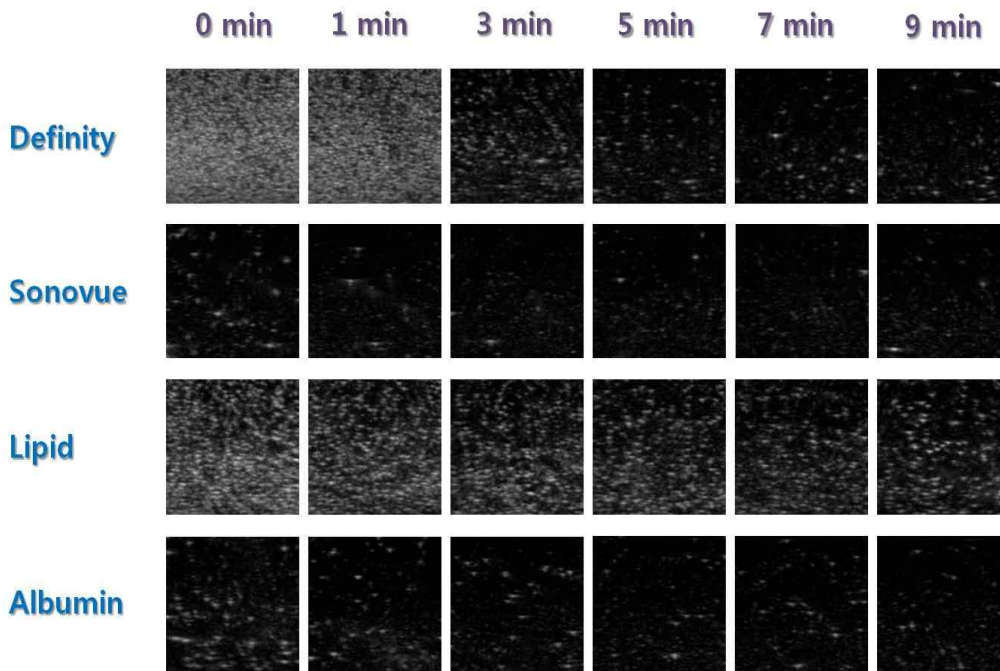


그림 4.16 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 영상 (Day 10)

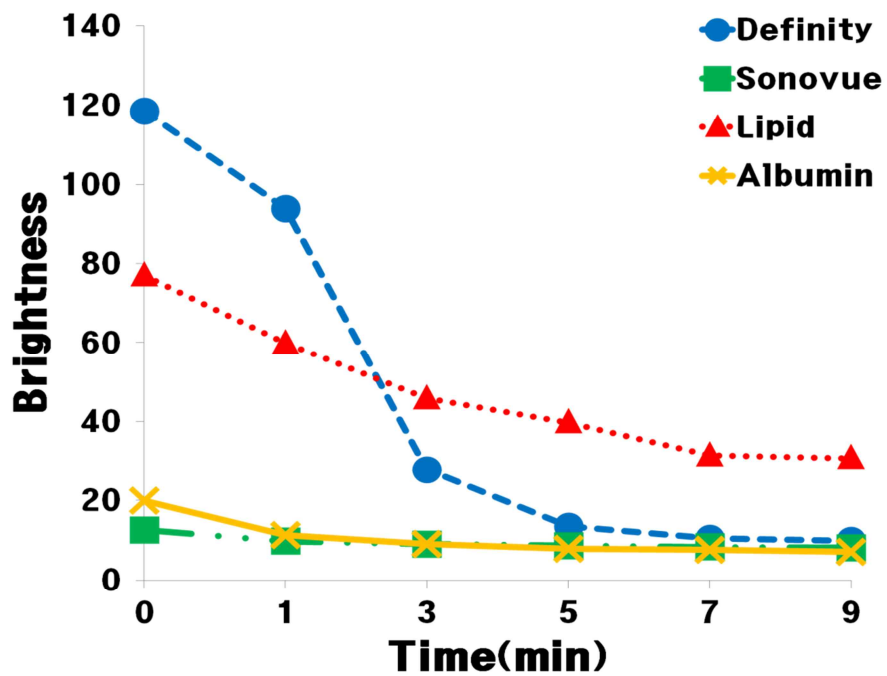


그림 4.17 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 그래프 (Day 10)

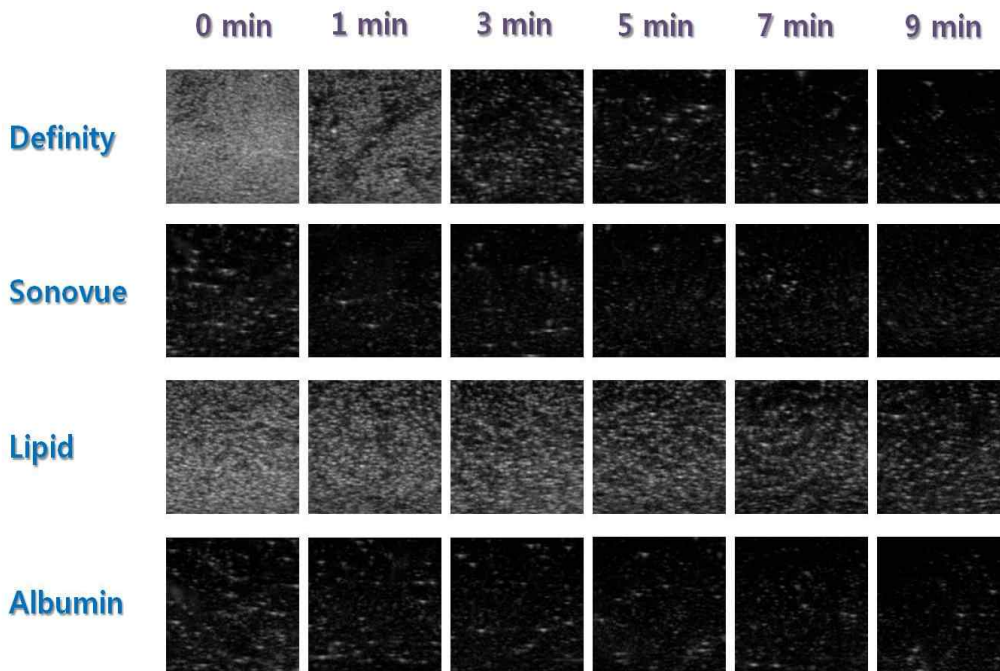


그림 4.18 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 영상 (Day 13)

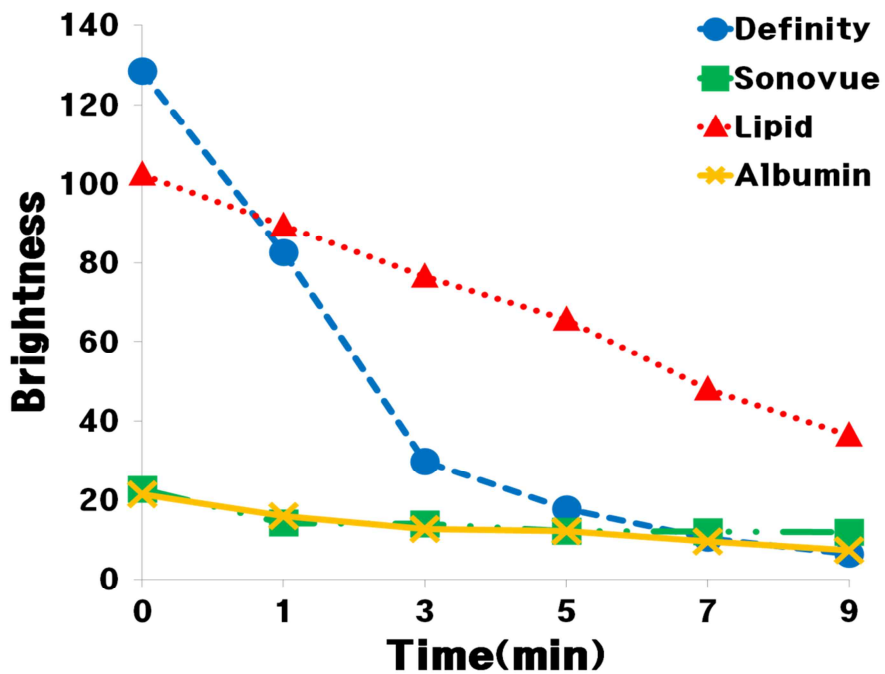


그림 4.19 영상기기에서 시간에 따른 반사신호 변화 영상 (Day 13)

초음파 조영제가 제작된 날 초음파 영상기기를 통한 반사신호의 변화를 보면 시판중인 초음파 조영제인 Definity 와 Sonovue 의 경우 미세기포들에 의한 강한 반사 신호가 나타나며, 그 신호가 약 7-8 분 가량 유지된다.

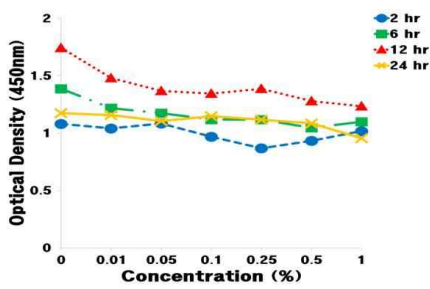
제작된 Lipid shell 의 경우는 시판중인 조영제와 유사한 형태의 반사신호 특성을 가지고 있지만, Albumin shell 의 경우는 시판중인 조영제보다는 적은 반사신호 특성을 갖는다. 3 일후 다시 촬영 하였을 때 Definity 와 Lipid shell 조영제의 경우 제작된 날과 유사하게 강한 반사신호를 유지하지만 Sonovue 의 경우 신호가 많이 사라진 것을 볼 수 있다. 또 다시 3 일후 역시 비슷한 영상을 촬영 하였다.

10 일 정도 후의 4 가지의 초음파 조영제의 반사신호를 관찰해 보면 Sonovue 와 albumin shell 의 경우 미세기포가 거의 없어 반사신호가 매우 작고, Definity 의 경우 반사 신호가 제작한 날의 2/3 정도 유지 되지만 3 분이 지나면서 반사신호가 매우 약해 진다. 하지만 Lipid shell 의 경우는 처음의 반사신호는 Definity 에 비하여 작지만 시간이 지남에 따라 조금 더 안정적이라고 할 수 있다.

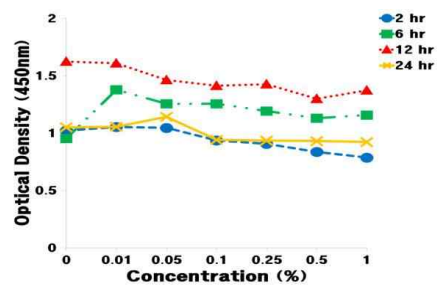
또한 Lipid shell 의 경우 Shell 특성이 딱딱하거나 유연하게 제조 가능한 다양한 물질특성을 가지고 있으며, Albumin 에 비해 확산이 느리다. Albumin 의 경우 점성을 가지고 있어, 일정 수준 이상 사용시 서로 뭉쳐서 Shell 형성을 방해하는 작용을 한다. 또한 Shell 의 형태 및 모양이 일정하지 않아 영상장비로 반사신호 측정 시 brightness 가 낮은 결과를 볼 수 있다.

5. 세포 독성 분석 결과

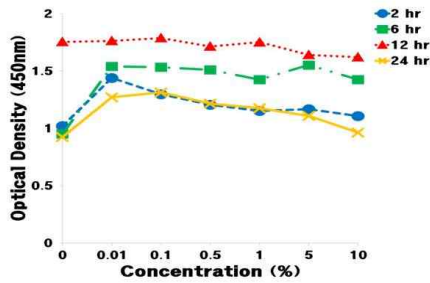
세포독성시험에서 시간이 지남에 따라 Concentration 이 일정하게 나타나는 것이 독성 반응이 없는 것이다. 아래 그림 4.20 을 보면 4 가지 초음파 조영제 모두 독성 반응이 거의 나타나지 않았다.



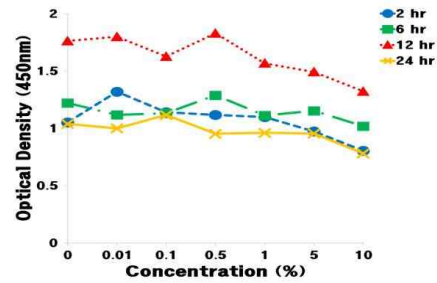
Definity®



Lipid Shell Bubble



SonoVue®



Albumin Shell Bubble

그림 4.20 4가지 초음파 조영제의 세포 독성 분석 결과

6. T-TEST

입도 분석기를 통한 크기 분포 자료를 바탕으로 T-Test 분석을 한 결과 P-Value ≤ 0.05 로서 유의한 분석임을 나타낸다.

	Albumin(Vol)	Albumin(Num)	Lipid(Vol)	Lipid(Num)
Average	40.51607	0.24	80.82811	0.27881
STD	8.47107	0.05128	32.60865	0.03125

표 4.1 Filter를 사용하지 않고 제작한 초음파 조영제의 평균 크기

	Albumin(Vol)	Albumin(Num)	Lipid(Vol)	Lipid(Num)
Average	12.41753	0.07646	4.83333	0.14415
STD	7.27521	0.00096	1.27262	0.01528

표 4.2 Filter를 사용하여 제작한 초음파 조영제의 평균 크기

	Albumin(Vol)	Albumin(Num)	Lipid(Vol)	Lipid(Num)
P-Value	0.000998	0.004313	0.029752	0.042115

표 4.3 T-test 분석 결과

입도 분석기를 통한 분포 자료를 바탕으로 filter를 사용하여 제작된 초음파 조영제와 filter를 사용하지 않은 초음파 조영제의 미세기포의 평균 크기 및 표준 편차를 계산하고 이것을 토대로 T-TEST를 실시 하였다.

결과를 보면 filter를 사용하지 않는 albumin shell의 미세기포의 크기는 40um 정도 이고, Lipid shell의 미세기포의 크기는 80um 정도이다. 하지만 filter를 사용했을 경우 albumin shell의 미세기포의 크기는 12um 정도 이고, Lipid shell의 미세기포의 크기는 4um 정도 이다. 또한 T-TEST 결과 P-Value ≤ 0.05 로 위의 분석은 유의함을 나타낸다.

제 5 장 결 론

초음파 조영제는 초음파 진단에 새로운 혁신을 가져올 것으로 큰 주목을 받고 있다. 초음파 조영제를 사용하여 그 동안 불가능할 것으로 여겨졌던 모세 혈관의 영상화가 가능해지고 유사 조직간의 B-모드 영상의 대비도를 획기적인 개선하고 있다. 초음파 조영제를 이용한 하모닉 영상 기법의 개발로 진단의 폭을 더욱 넓히고 있다. 초음파 조영제는 초음파 영상의 질을 개선하는데 사용될 뿐 아니라 치료용으로도 활용이 가능하다. 조영제 내에 약물을 주입하고 혈관이나 조직내의 특정 위치에서 조영제를 과열시켜 국부적으로 약물을 투여할 수 있다.

이 방식은 종래 혈전 치료를 위해 혈관 내에 관을 삽입하던 방식보다 안전하고 효율적인 것으로 평가 받고 있다. 종양 조직에 선택적으로 흡수되는 표적용 조영제를 이용한 항암제 투여는 항암 치료에 매우 효율적으로 사용될 것으로 기대되고 있다. 또한 조영제는 초음파 공동 현상을 조절할 수 있기 때문에 파괴적인 공동 현상을 이용하는 초음파 수술의 시너지 효과를 얻는 증진제로 사용될 수 있다.

또한 현재 다양한 초음파 조영제가 개발되어 있으며 체내에 따라 조영 증감 기전 및 효과적인 조영 증가 시간이 다르므로 검사 목적과 검사 기기뿐만 아니라 조영제 종류에 따라서도 검사 방법이 달라져야 하며 이러한 검사방법이 보편적으로 널리 사용되기 위해서는 임상적 검증을 토대로 조영제 제작에

따른 효과적인 조영 증강 시기 및 조영 증강 기간 등이 규명되어야 할 필요가 있다. 현재 여러 형태의 기체 및 피복 제제를 이용한 다양한 초음파 조영제가 개발되어 있으며, 초음파 조영제에 의한 에코 증강이 조영 혈관의 검출 및 특성화에 도움이 된다는 보고들이 잇따르고 있으나 대부분의 연구자들은 정성적인 분석에 머물고 있으며 정량적 분석에 기초한 임상적 문헌 보고는 국내외적으로 드물다. 최근에는 도플러 초음파나 하모닉 출력 도플러 초음파 등 최신 초음파 기기 및 초음파 조영제를 이용하여 종괴 내의 미세 혈류 형태를 역동적으로 파악하려는 시도가 증가하는 추세이므로 이런 조영 증강 초음파 검사법의 보편화를 위해서는 종괴 내 조영 증강을 나타내는 신호를 정량화하여 객관적으로 분석할 필요가 있다. 그러나 이러한 디지털 영상에서 한 화소에 신호를 컴퓨터로 정량화 하는 방법은 많은 변수로 인하여 제한점을 갖고 있어 이에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 상용화 되어있는 초음파 조영제인 Definity와 Sonovue, 그리고 제작된 Lipid shell의 초음파 조영제와 Albumin shell 초음파 조영제의 평가를 비교한 결과 Definity의 경우 제작된 Lipid shell의 초음파 조영제와 그 반사신호 및 미세기포의 크기의 분포가 유사하게 측정되었으며, Sonovue의 경우 제작된 Albumin shell 초음파 조영제와 유사하게 측정되었다. 또한 다양한 평가로 미루어 볼 때 제작된 Lipid shell의 미소기포는 Definity와 비슷한 수준의 density를 가지고 있으며, Albumin shell의 미소 기포는 Sonovue 수준의 density를 가지고 있음을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 시도한 초음파 조영제가 효과적으로 제작되었다고 할 수 있다.

추후 제작 시 고려되어야 할 점은 Perfluoro-carbon gas의 선택이다. Perfluoro-carbon gas는 일반적으로 기화점이 낮아 신체내부에서 미세기포의 안정성을 유지하여 기포가 빠르게 파괴되는 것을 막아준다. 또한 초음파 조영제마다 Perfluoro-carbon gas의 기화점 차이 때문에 제작 방법 및 보관 방법이 다를 수 있다. 따라서 각 shell의 특성에 맞는 Perfluoro-carbon gas는 사용하여 제작하는 것이 기포의 안정성을 유지하는 효율적인 방법이라고 할 수 있다.

또한 광학현미경으로 기포의 크기 및 형태를 관찰 할 경우 Activation 후의 안정된 상태에서 syringe를 사용하여 뽑아야 한다. 안정되지 않는 상태에서 뽑은 후 관찰하게 되면 흔들리는 동안 생성된 거품과 조영제의 기포가 현미경 상에서 똑같이 관찰 되기 때문에, 가능하면 제작 후 바로 관찰 하는 게 좋다. 또한 slide 및 slide glass 에는 어떤 이물질이 있어서는 안된다. 4가지 조영제의 밀도가 다르기 때문에 비슷한 희석되는 양도 고려 되어야 한다.

조영제 제작과정 중 shell을 구성하는 물질과 Perfluoro-carbon gas를 혼합할 때 shaker를 사용하게 되는데 우리가 사용한 shaker의 경우 ∞ 의 모양대로 vial을 흔들고, 흔들는 속도 및 시간도 정해져 있다. 하지만 흔들는 형태, 속도, 시간에 따라 shell의 탄성도 및 형태, 그리고 크기가 변할 수 있기 때문에 추후 연구를 통해 확인되어야 한다.

추후 연구를 통해서 원하는 크기의 기포를 제작 할 수 있는 filter system 제작 및 AFM을 통한 shell의 탄성도 측정, 또한 shell의 특성이 미소기포 형성에 어떤 영향을 주는지에 대한 더 많은 연구가 필요하다.

참고 문헌

- [1] M. O'Donnell et al., Real-time phased array imaging using digital beam forming and autonomous channel control, Ultrasonics Symposium, pp. 1499-1502, 1990.
- [2] S.W Smith, Henry G, Pavy, jr., and O. T. von Ramm, High-Speed Ultrasound Volumetric Imaging System – Part I: Transducer Design and Beam Steering, IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr., vol. 38, No. 2, pp. 100-108, 1991.
- [3] O. T. von Ramm, S.W Smith, and H. G. Pavy, Jr, High-Speed Ultrasound Volumetric Imaging System – Part II: Parallel Processing and Image Display, IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr., vol. 38, No. 2, pp. 109-115, 1991.
- [4] Tai K. Song and Song B. Park, A new digital array system for dynamic focusing and steering with reduced sampling rate, Ultrasonic Imaging vol. 12, pp. 1-16, 1990.
- [5] Simon, R. H., Ho, S. Y., Lange, S. C., Uphoff, D. F., and D'Arrigo, J. S., Application of lipid-coated microbubble ultrasonic contrast to tumor

- therapy, *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 19, No. 2, pp. 123-125, 1993.
- [6] C. Harvey, J. Pilcher, R. Eckersley, M. J. K biomlet and D. O. cosgrove, *Advances in ultrasound, Clin. Radiol.*, vol. 57, pp. 157-177, 2002.
- [7] R. Gramiak and P.M Shah, *Echocardiography of the aortic root, Invest. Radiol.* vol. 3, pp. 356-366, 1968.
- [8] P. J. A. Frinking, A. Bouakz, J. Kirhorn, F. J. Ten Cate and N. de jong, *Ultrasound contrast imaging: current and new potential methods, Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 26, no. 6, pp. 965-975, 2000.
- [9] M. J. Choi, *Application of Ultrasound in Medicine : Therapeutic Ultrasound and Ultrasound Contrast Agent . The Korean Society for Noise and Vibration Engineering Bimonthly, Journal of KSNVE*, vol.10, no.5, pp. 743-751, 2000.
- [10] Crum L. A., and Fowlkes J. B., *Acoustic Cavitation Generated by Microsecond pulses of Ultrasound, Nature*, vol. 391, pp. 52-54, 1986.
- [11] Forsberg, F., Shi, W. T., and Goldberg, B. B., *Subharmonic imaging of contrast agents, Ultrasonics*, vol. 38, pp. 93-98, 2000.
- [12] Andrew Wabb, *Introduction to biomedical imaging*, pp. 107-153, 2003.

- [13] Franscesca Cavalieri, Meifavh Zhou, Muthupandian Ashokkumar, The design of Multifunctional Microbubbles for Ultrasound Image-Guided Cancer Therapy, Current Topic in Medicinal Chemistry 2010.
- [14] Natalya Rapoport, Zhonggao Gao, Anne Kennedy, Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy, J Natl Cancer Inst, vol 114, pp. 89-99, 2007.
- [15] Goldberg BB, Raichen JS, Forsberg F, Ultrasound Contrast Agent: Basic principles and clinical application 2nd ed. Martin Dunitz 2001.
- [16] Kilbanov AL. Targeted delivery of gas-filled microspheres. contrast agents for ultrasound imaging. Adv. Drug Deliv. Rev. vol. 37, pp. 139-157, 1999.
- [17] Katherine Ferrara, Rachel Pollard, Mark Borden, Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery, Annual Review of Biomedical Engineering vol. 9, pp. 415-447, 2007.
- [18] Definity, Bristol-Myers Squibb Medical Imaging, <http://www.definityimaging.com> 2007.
- [19] Burns P. Harmonic imaging with ultrasound contrast agent, Clin Radiol, vol. 51, pp. 50-55, 1996

- [20] Abramowicz, J. S., Ultrasound contrast media and their use in obstetrics and gynecology, *Ultrasound in Medicine & Biology*, Vol. 23, No. 9, pp. 1287-1298, 1997.
- [21] Shankar, P. M., Krishna, P. D. and Newhouse V. L., Advantages of subharmonic over second harmonic backscatter for contrast-to-tissue echo enhancement, *Ultrasound in Medicine & Biology*, Vol. 24, No. 3, pp. 395-399, 1998.
- [22] S. S. Hong, *The Usefulness of Contrast-Enhanced US in Patients with Benign Ovarian Lesions and Malignant Ovarian Tumors: Emphasis on Characterization and Differential Diagnosis*. 2010.
- [23] Tranquart F., Eder V., Grenier N., Pourcelot L., Clinical use of harmonic image, *Ultrasound Med Biol*, vol. 25, pp. 889-894, 1999.
- [24] F. W. Kremkau, *Diagnostic ultrasound: principle and instruments*, W. B. Saunders Company, 1998.
- [25] Abildgard A., Klow N. E., Jakobsen J. A., Eggs T. S., Ereksten M. Effect of ultrasound contrast medium in color Doppler and power Doppler visualization of blood flow in canine kidneys, *Acta Radiol*, vol. 38, pp. 445-453, 1997.

- [26] Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA. Noninvasive MRImaging-guided Focal Opening of the Blood-Brain Barrier in Rabbits. *Radiology*, vol. 220, pp. 640-646, 2001.
- [27] Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Kosuke Hagisawa, Kumiko Tanaka, Kaori Sawamura, Naoki Utoguchi, Toshihiko Nishioka, Kazuo Maruyama, Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound, *Journal of controlled release*, pp. 130-136, 2007
- [28] M. D. Santin, D. A. King, J. Foiret, A. Haak and W. D. O'Brien, Jr, S. L. Bridal, Encapsulated contrast microbubble radial oscillation associated with postexcitation pressure peak, *J. Acoust Soc.Am*, 127(2), 2010.
- [29] Everbach, E. C., Makin, I. R. S., Francis, C. W., and Meltzer R. S., Effect of acoustic cavitation on platelets in the presence of an echo-contrast agent, *Ultrasound in Medicine & Biology*, Vol. 24, No. 1, pp. 129-136, 1998.
- [30] Tankred Stuckensen, Adorjan F. Kovacs, Stephan Adams, Richard P. Baum, Staging of the neck in patients with oral cavity squamous cell carcinomas: a prospective comparison of PET, ultrasound, CT and MRI, *Journal of Cranio-Maxillofacial surgery*, vol. 28, pp. 219-324, 2000

- [31] Correias J., Bridal L., Lesavre A., Mejean A., Claudon M., Helenon O.,
Ultrasound contrast agent: properties, principles of action, tolerance
and artifacts, *Eur Radiol*, vol. 11, pp. 1316–1328, 2001
- [32] Uhlendorf. V., Scholle. F. D., and Reinhardt M., Acoustic Behaviour of
Current Ultrasound Contrast Agent, *Ultrasonics*, vol 38, pp. 81–86, 2000
- [33] Morse, P. M., and Ingard, K. U., *Theoretical Acoustics*, McGraw Hill,
New York, 1968.
- [34] Parker, K. J., Tuthill, T. A., Lerner, R. M., Violante, M. R., A
particular contrast agent with potential for ultrasound imaging of liver,
Ultrasound in Medicine & Biology, Vol. 13, No. 9, pp. 555–566, 1987.
- [35] Forsberg, F., Shi, W. T., and Goldberg, B. B., Subharmonic imaging of
contrast agents, *Ultrasonics*, Vol. 38, pp. 93–98, 2000.
- [36] Leighton TG. *The Acoustic Bubble* Academic Press 1994.
- [37] Samir Mitragotri, Healing sound: the use of ultrasound in drug
delivery and other therapeutic applications, *nature reviews drug
discovery*, vol. 4, pp. 255–260, 2005.
- [38] M. Laschinger and B. Engelhardt, Interaction of $\alpha 4$ -integrin with
VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to

- brain endothelium but not in their transendothelial migration invitro, J. Neuroimmunol, vol. 102 No.1 pp. 32-43, 2000.
- [39] J. R. Lindner, J. Song, J. Christiansen, A. L. Klibanov, F. Xu and K. Ley, Ultrasound Assessment of Inflammation and renal Tissue Injury With Microbubbles Targeted to P-Selectin, Circulation, vol. 104, no. 17, pp. 2107-2112, 2001.
- [40] P. A. Schumann, J. P. Christiansen, R. M. Quigley, T. P. McCreery, R. H. Sweizer, E. C. Unger, J. R. Lindner and T. O. Matsunaga, Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb IIIa receptors of platelet thrombi, Invest Radiol, vol. 37, no. 11, pp. 587-593, 2002.
- [41] S. Hernot and A. L. Klibanov, Microbubble in Ultrasound-triggered Drug and Gene Delivery, Adv Drug Deliv Rev, vol. 60, no. 10, pp. 1153-1166, 2008.
- [42] Jong. N. de, Frinking, P. J. A., Bouakaz, A., and Cate. F. J. T., Detection Procedures of Ultrasound Contrast Agents. Ultrasonic, vol. 38, pp. 87-92, 2000.
- [43] Yiyao Liu, Hirokazu Miyoshi, Michihiro Nakamura, Encapsulated ultrasound microbubbles: therapeutic application in drug/gene delivery, Journal of controlled release, vol. 114, pp. 89-99, 2010.

- [44] A. Hamilton, S. L. Huang, D. Warnick, A. Stein, M. Rabbat, T. Madhav, B. Kane, A. Nagaraj, M. Klegerman, R. MacDonald and D. Mcpherson, Left ventricular thrombus enhancement after intravenous injection of echogenic immunoliposomes: studies in a new experimental model, *Circulation*, vol. 105, no. 23, pp. 2772–2778, 2002.
- [45] Shengping Qin, Katherine W Ferrara, Acoustic response of compliant microvessels containing ultrasound contrast agent, *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, pp. 5065–5088, 2006.
- [46] P. Li, L. Q. Cao, C. Y. Dou, W. F. Armstrong and D. Miller, Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: an in vivo dose response study of delivery mode, pressure amplitude and contrast dose, *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 29, pp. 1341–1349, 2003.
- [47] P. Li, W. F. Armstrong and D. L. Miller, Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: comparison of three different contrast agents, *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 30, pp. 83–91, 2004
- [48] D. M. Skyba, R. J. Price, A. Z. Linka, T. C. Skalak and S. Kaul, Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue, *Circulation*, vol. 98, pp. 290–293, 1998.

- [49] D. L. Miller and J. Quddus, Diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies induces capillary rupture in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, pp. 10179–10184, 2000.
- [50] D. L. Miller and R. A. Gies, Gas-body-based contrast agent enhances vascular bioeffects of 1.09MHz ultrasound on mouse intestine, *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 24, pp. 1201–1208, 1998.
- [51] T. Ay, X. Havaux, G. Van Camp, B. Campanelli, G. Gisellu, A. Pasquet, J. F. Denef, J. A. Melin and J. L. Vanoverschelde, Destruction of contrast microbubbles by ultrasound: effects on myocardial function, coronary perfusion pressure, and microvascular integrity, *Circulation*, vol. 104, pp. 461–466, 2001.
- [52] ShaShank Sirsi, Jameel Feshitan, James Kwan, Shunichi Homma, Mark Borden, Effect of microbubble size on fundamental mode high frequency ultrasound imaging in mice, *Ultrasound in Med & Biol.*, vol. 36, pp. 935–948, 2010.
- [53] Mesiwala, A. H. et al., High-intensity focused ultrasound selectively disrupts the blood brain barrier in vivo, *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 28, pp. 389–400, 2002.

- [54] A. Lawrie, A. F. Brisken, S. E. Francis, D. I. Tayler, J. Chamberlain, D. C. Crossman, D. C. Cumberland and C. M. Newman, Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro, *Circulation*, vol. 99, pp. 2617–2620, 1999.
- [55] Katherine W. Ferrara, Mark A. Borden, Hua Zhang, Lipid-Shelled Vehicles: Engineering for ultrasound molecular imaging and drug delivery, *Accounts of chemical research*, vol. 43, pp. 881–892, 2009.

ABSTRACT

Fabrication and verification of ultrasound contrast agent.

Park, Jin-Gam

Dept. of Biomedical Engineering

The Graduate School

Yonsei University

In this study, ultrasound contrast agents were constructed and we assess the effectiveness of ultrasound contrast agents by a variety of analyzes. Ultrasound imaging is difficult to observe the organs such as pancreas which distant from the skin. So, ultrasound contrast agents have been developed in order to solving the problem that maximize the contrast of reflection signal. Thus, ultrasound can be seen from a deeper organs and made accurate diagnosis. Ultrasound contrast agent enhances the signal-noise ratio (SNR) by the linear and nonlinear characteristics and helps to more accurately diagnose the internal organs and blood vessels.

Commercially ultrasound contrast agents consist of microbubbles that

most of the 2-10 μm size range. Microbubbles are protected by the shell to stability. Shell materials were made biocompatibility protein, lipid, polymers. Inside gas of microbubble has no physical side effects in the body, inert perfluorocarbon-gas is used. Perfluorocarbon-gas play a role to maintain the stability of microbubble and to prevent rapidly destruction.

In this study, Albumin shell and lipid shell ultrasound contrast agent were fabricated using perfluorobutane. And we compared with commercially ultrasound contrast agents Definity, Sonovue to assess the effectiveness.

Key word : Ultrasound Contrast Agent (UCA), Ultrasound Imaging, Microbubble, Ultrasound, Perfluorocarbon gas, Shell material