

기관고유연구사업 최종보고서

(과제번호 : 1010060)

근적외선 나노 형광 물질 탑재 형광 클립 장치 개발

Development of fluorescence clip devices with near-infrared
fluorescence nanomaterials

과제책임자 : 손 대 경

국립암센터

근적외선 나노 형광 물질 탑재 형광 클립
장치 개발

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구
사업 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시
국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야
합니다.

(14 pont, 고딕체)

↑
6cm ↓

↑
5cm
↓

과
제
명

국
립
암
센
터

↑
3cm
↓

제 출 문

목 차

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “근적외선 나노 형광 물질 탑재 형광 클립 장치 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2011. 12 . 16

국립암센터

과 제 책 임 자 : 손 대 경

연 구 원 : 최용두, 김광기, 남경원, 장보승

제1세부과제명(과제책임자) : 손 대 경

< 요약 문 >

(한글)	-----	1
(영문)	-----	3
1. 연구의 최종목표	-----	5
2. 연구의 내용 및 결과	-----	8
3. 연구결과 고찰 및 결론	-----	24
4. 연구성과 및 목표달성도	-----	26
5. 연구결과의 활용계획	-----	28
6. 참고문헌	-----	29
7. 첨부서류	-----	31

< 요약 문 >

연구분야(코드)	I-2		과제번호	1010060
과 제 명	근적외선 나노 형광 물질 탑재 형광 클립 장치 개발			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2010년 01월 01일~2011년 12월 31일	160,000	
	1차년도	2010년 01월 01일~2010년 12월 31일	80,000	
	2차년도	2011년 01월 01일~2011년 12월 31일	80,000	
과제책임자	성 명	손 대 경	소 속	대장암연구과
	전화번호	031-920-1636	진 자 우 편	gsgsbal@ncc.re.kr
색인단어	국문	형광 표시 장치, 내시경 클립, 형광 나노 물질		
	영문	luorescence identification device, endoscopic clip, fluorescence nano-material		
◆ 연구목표 <최종목표> - 수술시 종양 부위를 정확하고도 용이하게 식별할 수 있도록 하기 위한 형광물질 탑재 클립 장치 개발 <당해년도 목표> : - 형광 클립의 안전성 및 효용성 평가 - 클립 장치 성능 평가 및 개선 - LED 광원 장치 시작품 설계, 제작				
◆ 연구내용 및 방법 < 1차년도 (2010년) > - 형광염료가 코팅된 형광 클립의 제조 ; 형광염료 선택 - Rhodamine 6G(대장), ATTO 647N(위) ; 형광염료 코팅 - Poly-methyl methacrylate (PMMA)를 유기용매에 녹여 사용 - 개발된 형광 클립의 안정성 평가 ; 제조된 형광 클립내의 형광 염료의 안정성을 수용액 버퍼에서 테스트함 - 형광 클립의 ex vivo 및 in vivo 성능 평가 ; 돼지 위 및 대장 절편을 이용한 ex vivo test 시행 ; 실험시 개복 수술 및 복강경 수술을 고려하여 펠터안경과 복강경 카메라를 이용하여 측정 - 새로운 구동원리의 클립 스테이플 장치 및 클립 개발 ; 생체클립 및 클립과지장치의 독자 개발 및 관련 지식재산권을 확보 ; 기존 내시경을 통해 이용 가능해야 함 ; 가능한 다연발 클립 파지 가능하도록 설계				

< 2차년도 (2011년) >

가. 형광 dye의 종류 및 용매에 따른 특성 평가

- 형광 dye의 종류에 따른 형광 투과 특성 평가
- Ethylene oxide가스 살균이 형광특성에 미치는 영향 분석
- 클로로포름 용매를 사용하여 코팅두께 조절

나. 클립 장치 성능 평가 및 개선

- 제작된 클립장치 시작품의 파지 성능 평가
- 다연발 파지 성능 평가

다. LED 광원장치 시작품 제작

- LED 및 LED 제어장치 선정, 구매
- LED 광원장치 시작품 설계 및 제작

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	2/3	66.7
IF 합	4.4/12	36.7
기타 성과:	특허 출원(국내 1건, 해외 2건) 기술 이전 (2011, 태웅메디칼)	100%

-정성적 성과

1) 논문 발표

- "Small-Dose India Ink Tattooing for Preoperative Localization of Colorectal Tumor" (J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 2010; 20(9): 731-734 (SCI: IF1.012 (2009))
- "A Novel Endoscopic Fluorescent Clip for the Localization of Gastrointestinal Tumours"(Surg Endosc. 2011; 25: 2372-7 (SCI: IF 3.436 (2010))
- "A Novel Endoscopic Fluorescent Clip for the Localization of Gastrointestinal Tumours" (대한외과학회 추계학술대회 구연발표 2010-11-19)

2) 특허 출원

- "수술용 형광 표시 클립(Fluorescent Indication Clip for Surgery)" (10-2009-0058067)
; 유럽 (EP10153203.4)2010-02-10 , 중국 (201010218020.8) 2010-06-28
- 의료용 다연발 클립과 이를 적용하는 클립 건 및 이들을 이용하는 클리핑 방법 (국내출원, 10-2011-0057878, 2011-6-15)

3) 기술 이전

- "의료용다연발클립"; 태웅메디칼 (2011-12-12)

◆ 참여연구원 (최종년도 참여인원)	성	명	손대경, 김광기, 최용두, 남경원, 장보승

Project Summary

Title of Project	Development of fluorescence clip devices with near-infrared fluorescence nanomaterials
Key Words	fluorescence identification device, endoscopic clip, fluorescence nano-material
Project Leader	Sohn Dae Kyung
Associated Company	None
<p>◆ Research Background</p> <p>Accurate tumor localization is essential during gastrointestinal surgery, particularly because of the rapidly increasing incidence of early gastric or colonic cancer worldwide. Exact tumor localization can help achieve a shorter operation time, minimal tissue loss, and fast recovery after surgery. Recently, fluorescence imaging in the near-infrared (NIR) spectrum (600 - 900 nm) has been shown to have great potential for the noninvasive detection of disease sites in vivo. Light penetration through biological tissues is maximized, whereas tissue autofluorescence is minimized in the region; therefore, target sites could be visualized optically with a high target/background ratio. In addition, NIR fluorescence imaging is well known as a highly sensitive technique in which nanomolar concentrations of fluorochromes can be detected in vivo with a spatial resolution from micrometers to millimeters.</p> <p>◆ Research Objective</p> <p>- Development of fluorescent dye-loaded clips for noninvasive, rapid and exact visualization of tumor sites during surgery procedures.</p> <p>◆ Methodology</p> <ul style="list-style-type: none"> - Preparation of the fluorochrome-coated clips <ul style="list-style-type: none"> ; Fluorescent dyes - Rhodamine 6G, ATTO 647N, and ATTO dye series ; Polymer matrix - Poly (methyl methacrylate) (PMMA): highly transparent, stable under acid and basic conditions ; Organic solvents - Tetrahydrofuran, chloroform - Stability test of the prepared fluorescent clips <ul style="list-style-type: none"> ; Test of the fluorochrome release from the fluorescent clips under different pH conditions - Ex vivo and in vivo study <ul style="list-style-type: none"> ; Ex vivo studies using the segmented porcine colon (wall thickness about 1.1~2.6 mm) and stomach (wall thickness about 6.4~8.9 mm) ; In vivo study using porcine animal model 	

<ul style="list-style-type: none"> - Development of new types of clips and clip gun <ul style="list-style-type: none"> ; Design and preparation of novel clips which can be localized to target sites multiple times - LED as a light source <ul style="list-style-type: none"> ; Preparation of the LED equipment and LED controller
<p>◆ Results</p> <ul style="list-style-type: none"> - When the surface of the colon was illuminated and screened with a 530-nm diode laser in vivo, we could rapidly identify three red spots with high contrast within seconds. - The locations of the fluorescent clips inside the folded porcine stomach tissue were clearly identified from the fluorescence image in real time. - Fluorescence property was not damaged during EO gas sterilization - Thickness of the coating could be controlled by using chloroform as a solvent - Multiple clips were prepared and operated well.
<p>◆ Product</p> <p>1) Paper publication and Presentation</p> <ul style="list-style-type: none"> - "Small-Dose India Ink Tattooing for Preoperative Localization of Colorectal Tumor" (J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 2010; 20(9): 731-734 (SCI; IF1.012 (2009)) - "A Novel Endoscopic Fluorescent Clip for the Localization of Gastrointestinal Tumours"(Surg Endosc. 2011; 25: 2372-7 (SCI; IF 3.436 (2010)) - "A Novel Endoscopic Fluorescent Clip for the Localization of Gastrointestinal Tumours" (Annual conference of The Korean Surgical Society, 2010-11-19) <p>2) Patent Application</p> <ul style="list-style-type: none"> - "Fluorescent Indication Clip for Sugery" (10-2009-0058067) ; EU(EP10153203.4) 2010-02-10, China (201010218020.8) 2010-06-28 - Medical Multiple Clips, Clip Gun Applying the same, Clipping Method using the same (Korea, 10-2011-0057878, 2011-6-15) <p>3) The Transfer of Technical Know-How</p> <ul style="list-style-type: none"> - "Medical Multiple Clips"; Tae-Woong Medical (2011-12-12)

1. 연구의 최종목표

수술시 종양 부위를 정확하고도 용이하게 식별할 수 있도록 하기 위한 형광물질 탑재 클립 장치 개발

1. 1. 연구의 필요성 및 이론적 배경

- 본 연구 과제의 목표는 암 조직의 복강경 수술을 위하여 수술 전 클립으로 표지해 놓은 병변 부위를 복강경 수술 시에 정확하고 빠르게 감지해 낼 수 있는 장치를 개발하고, 이를 통하여 수술로 제거되는 장기의 정상 조직의 범위를 최소화하여 수술의 부작용을 줄이고자 함임
- 복강경 수술은 양성질환은 물론 악성질환의 치료를 위해서 광범위하게 적용되고 있으며, 최근에는 이러한 복강경 수술을 응용한 로봇수술 등이 도입됨에 따라 복강경 수술은 외과 술기의 기본으로 받아들여지고 있음. 개복술에 비하여 복강경 수술이 갖는 장점으로 수술 후 통증 감소, 환자의 조기회복, 입원기간 단축 등이 잘 알려져 있으며, 단점으로는 개복술과 달리 수술 중 종양부위 및 복강내 장기를 손으로 직접 촉지하여 확인하는 것이 불가능하다는 단점이 지적되어 왔음
- 특히, 조기위암이나 조기대장암의 경우에는 복강경 수술시 병변을 직접 관찰하는 것도 어렵기 때문에 수술 전에 미리 종양의 위치를 표시해 두는 것이 매우 중요함. 조기대장암의 경우, 수술 전 현재 사용되고 있는 병변의 위치 표시법은 바륨관장법, 대장내시경 하 문신법, 병변 주위 클립의 장착, 그리고 수술 중 대장내시경 관찰 등이 있음
- 바륨관장법은 항문을 통해서 작은 튜브를 삽입한 후 조영제인 바륨(barium)과 공기를 같이 넣어서 부풀려진 대장의 접막에 바륨이 묻게 한 후 방사선 촬영을 하여, 대장의 이상을 확인하는 검사방법임. 대장내시경 검사에 비해서 환자에게 부담이 적은 장점이 있기는 하지만, 대장내에 남은 분변과 공기방울 등과 용종을 구분하기가 힘들다는 단점이 있고, 비교적 작은 병변이나 용종절제술 후 추가적인 대장절제를 위하여 병변 위치를 찾는 경우에는 정확도 및 민감도가 매우 낮은 단점이 있음

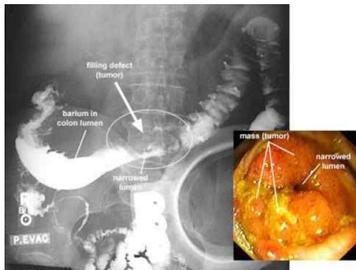


그림 1-1. 바륨관장 검사상 대장암이 의심되는 소견 (큰 이미지 원내)과 대장 내시경 소견 (작은 이미지)

- 대장내시경하 문신법은 (그림 1-2) 대장내시경을 통하여 확인된 병변에 내시경 주입바늘을 통하여 원위부 정상점막 부위에 인디아 잉크를 주입하여 병변 부위를 표시하는 것으로서, 지금까지 비교적 좋은 결과를 보였으나, 사용되는 약제인 인디아잉크가 복강내로 번지거나, 근층에 잉크가 잘못 주입되는 경우에는 나타날 수 있는 합병증 등이 치명적일 수 있는 것으로 알려져 있음
- 수술 중 대장내시경의 관찰은 대장내로 공기가 지나치게 많이 주입되어 수술을 어렵게 만들 수 있는 단점이 있음. 따라서, 1988년 Tabibian 등은 수술 전 대장내시경 검사 시 점막 클립을 이용하여 병변을 미리 표시하고, 수술 중 초음파 검사 등으로 병변의 위치를 확인할 수 있다고 보고하였으나, 수술 중 병변 표시 부위를 탐지하기 위하여 초음파 검사를 이용하는 경우는 경험이 풍부한 검사자가 필요하고, 비용 및 시간이 많이 소요될 수 있다는 점 때문에 널리 일반화되지 못하고 있음



그림 1-2. 인디아 잉크로 표지된 대장 병변 부위의 모습

- 수술 전 병변을 표지하기 위하여 사용되는 생체 클립은 별도로 제작된 클립 조작 장치에 장착되어 (그림 1-3) 대장 내 목적 위치로 이송된 후 생체 조직을 클립평함으로써, 조직 절제 시 위치표시를 위한 마킹 등을 행하게 됨. 그러나, 생체 클립이 대장 내의 시술 부위에 클립평된 상태이기 때문에 수술 시에 시술자가 대장 바깥측에서는 육안으로 생체 클립을 직접 볼 수가 없으며, 최근 증가되고 있는 복강경 수술 등에서는 생체 클립을 직접 만져볼 수도 없기 때문에, 시술 시 절개하려는 부위의 정확한 위치를 쉽게 찾을 수 없음. 따라서, 시술의 정확성이 떨어지고 과도한 절개로 인한 수술 부작용의 위험이 크다는 문제가 있음.

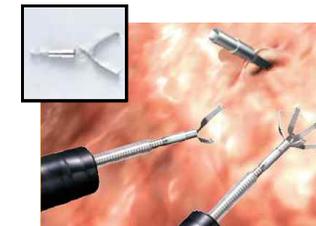


그림 1-3. 수술 전 병변 부위를 표지하기 위하여 사용되는 생체 클립 (작은 이미지) 및 stapler를 이용한 클립의 장착 장면

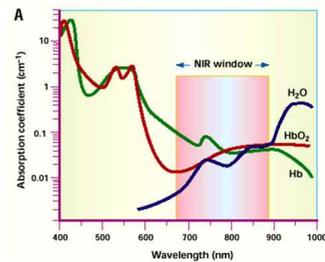
- 따라서 본 연구에서는 상기와 같은 클립 사용 시의 문제점을 해결하기 위하여, 생체 클립에 광반응성 근적외선 형광물질을 탑재하여 위치표시자로서의 기능을 강화함으로써 체내 시술 부위의 정확한 위치를 쉽고 빠르게 찾을 수 있도록 하여 시술의 정확성을 높이고 과도한 절개로 인한 부작용을 최소화할 수 있는 수술용 형광 표시 클립을 개발하는데 그 목적이 있음.

- 형광 물질은 특정 파장의 빛에 노출이 되면 photobleaching에 의해서 형광 신호가 없어지기 전까지 지속적으로 강한 형광을 방출하게 되므로, femtomole의 적은 양만 있어도 높은 감도로 형광 물질의 존재 위치를 감지해 낼 수 있음. 이러한 이유로 형광 물질은 오랜 세월 동안 세포 실험에서 중요한 연구 수단으로 사용되어 왔음.

- 최근 들어서는 근적외선 형광 물질을 이용한 생체 분자 영상 분야가 큰 발전을 보였는데, 근적외선 파장 영역 (650~900nm)에서는 생체 조직에 의한 빛의 흡수가 가장 적기 때문에 근적외선 파장의 빛은 생체 조직을 잘 통과하며, 생체 조직 자체에 존재하는 내인성 형광 물질에 의한 자가 형광 신호의 발생도 가장 낮아 신호-대-잡음 비가 낮은 것으로 알려져 있음 (그림 1-4).

- 근적외선 형광 물질을 사용하면 빛 조사 시에 생체의 1cm 깊이에 존재하는 형광 물질에서 나오는 형광 신호를 외부에서 감지할 수 있는 것으로 실험을 통하여 증명되어 왔으며, 따라서 클립에 적합한 형광 물질을 장착한다면 대장안에 표지된 형광 물질에서 나오는 형광 신호를 대장 밖에서도 관찰할 수 있음.

(A) 파장에 따른 생체 조직에 의한 빛 흡수 정도



(B) 파장에 따른 빛의 생체 조직 투과 능력

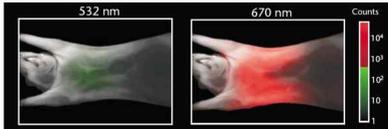


그림 1-4. (A) 빛의 파장에 따른 생체 조직에 의한 빛 흡수 정도, (B) 670nm 파장의 빛과 532nm 파장의 빛을 mouse의 등에서 비추었을 때 동물을 몸체를 통과하여 나온 빛의 양의 차이를 보여주는 사진. 670nm의 경우가 100배정도 많은 photon이 생체 조직을 투과할 수 있음을 알 수 있음.

2. 연구의 내용 및 결과

2.1. 형광염료가 코팅된 형광 클립의 제조

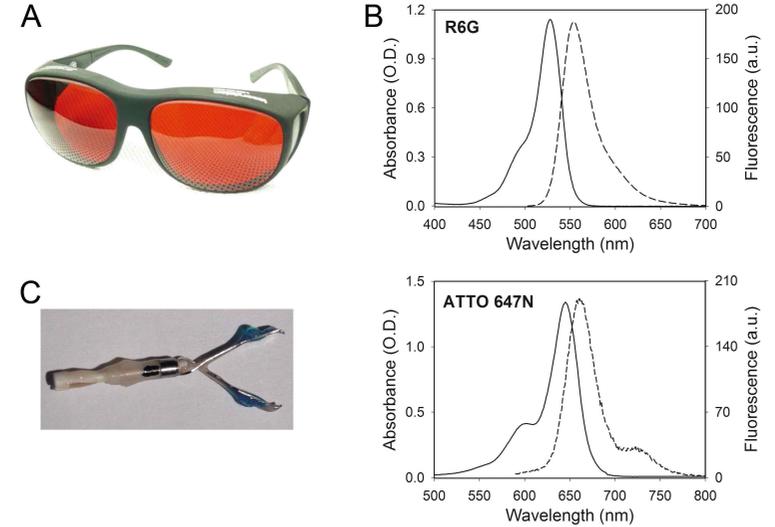


그림 2-1. A 형광 필터기능이 있는 안경의 모습. 보호경은 190~578nm 파장 영역의 빛을 차단함. B. Rhodamine 6G 및 ATTO647N 형광염료의 UV/visible 흡광 (실선) 및 형광 (점선) 스펙트럼. C. 제조된 형광 클립의 사진.

- 형광염료를 클립에 코팅하기 위하여 Poly(methyl methacrylate) (PMMA, 분자량 65 kDa)와 형광염료를 유기용매인 THF에 녹이고 클립의 앞쪽 부위에 코팅을 실시 하였음. PMMA는 우수한 투명성, 내화학성, 및 강도 특성을 갖고 있는 고분자이기 때문에 형광염료의 코팅을 위하여 사용되었음.
- 형광염료로는 대장 과지용으로서 Rhodamine 6G를 선택하였고, 대장 및 위장에 사용하기 위해서는 ATTO 647N을 선택하였음.
- 코팅시 형광 물질의 농도는 50 μ M이 되도록 하였음.

2.2. 개발된 형광 클립의 안정성 평가

- 제조된 형광 클립내의 형광 염료가 코팅고분자로부터 빠져나오지 않고 얼마동안 안정적으로 탑재되어 있는 지를 수용액 버퍼에서 시험하였음.

○ R6G는 pH 7.4의 인산버퍼 수용액(50 mM)에 첨가하고 4일 동안 수용액상으로 방출되는 형광 염료의 양을 분석 하였으며, ATTO 647N이 코팅된 형광 클립은 pH 3.8의 아세트이트 버퍼 (50 mM) 및 pH 7.4의 인산 버퍼수용액에 첨가하고 3일 동안 수용액상으로 방출되는 형광 염료의 양을 분석 하였음. 시험 결과, 3일 또는 4일 동안 코팅된 형광 염료의 방출량이 무시할 만한 수준이었으며, 이 결과로부터 형광염료가 고분자 지지체 내에 안정적으로 포집된 상태를 유지할 수 있음을 확인하였음.

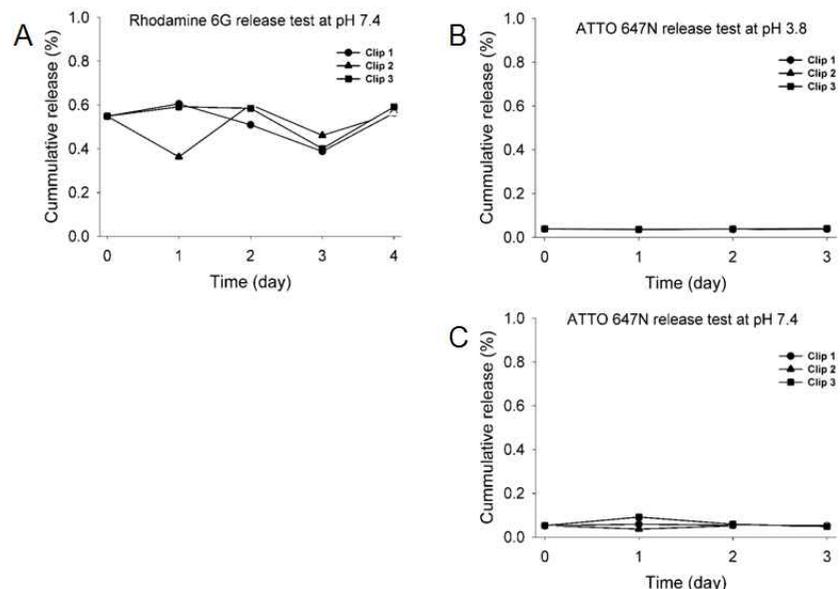


그림 2-2. 형광 염료 방출 그래프. A. Rhodamine 6G이 코팅된 형광클립으로부터 형광염료의 누적 방출량을 인산버퍼 수용액에서 (50mM, pH 7.4)에서 측정된 그래프. ATTO647N이 코팅된 형광클립으로부터 형광염료의 누적 방출량을 (B) 아세트이트 버퍼 (50mM, pH3.8) 및 (C) 인산버퍼 (50mM, pH7.4) 수용액에서 방출 시험한 결과.

2.3. R6G가 코팅된 형광 클립의 ex vivo 및 in vivo 성능 평가

■ 돼지 대장 절편을 이용한 ex vivo 성능 평가

○ 돼지 대장 조직 절편 (두께, 약 1.1~2.6 mm)를 수돗물로 세척한 후에, R6G가 코팅된 형광 클립을 대장의 내부 점막 표면에 파지하였음. 이후에 대장을 풀딩시켜 형광클립이 대장 안쪽에 가려지도록 하고, 대장의 바깥쪽 표면에 530nm 파장의 레이저를 조사하였음.

○ 그림 2-3C에 보이는 것처럼 대장 표면에 레이저를 조사하면서 육안으로 관찰했을 때는 레이저가 반사된 빛만이 보였으나, 580nm보다 장파장의 빛만을 투과시키는 보호경을 통하여 관찰한 결과 대장내의 형광 클립의 위치가 선명하게 붉은색으로 식별되었음.

○ 돼지 대장 절편을 이용한 실험으로부터, 형광 영상법을 통하여 대장 안쪽 점막층에 파지된 형광클립의 위치를 비침습적으로 확인할 수 있음을 확인한 후에 실험용 돼지를 이용하여 동물 실험을 실시하였음.

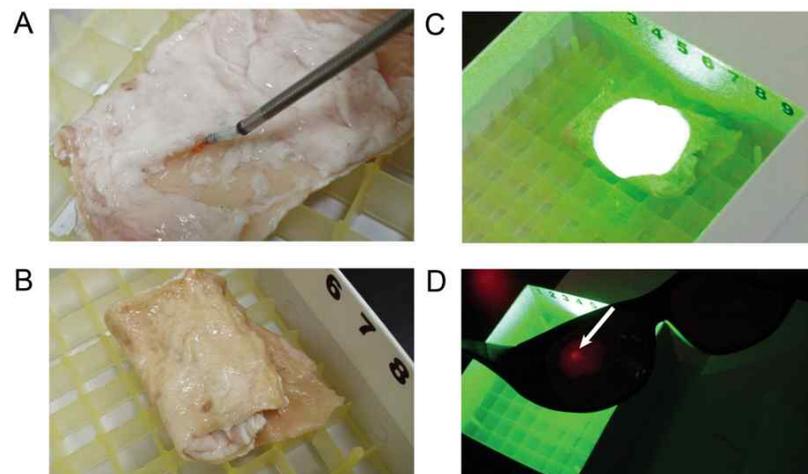


그림 2-3. 돼지 내장 절편에서의 형광클립의 효능 평가. A. 돼지 대장의 점막 표면에 클립을 파지시키는 사진. B. 형광클립 파지 후 대장 절편을 풀딩시킨 사진. C. 풀딩된 대장 절편위로 530nm 파장의 레이저 빛을 조사했을 때 육안으로 관찰되는 장면. 육안으로는 대장 절편 표면에서 반사된 녹색 빛만 보임을 알 수 있다. D. 보호경을 통하여 관찰했을 때 모습. 화살표는 형광클립이 위치를 가리킨다.

■ 실험용 돼지를 이용한 in vivo 성능 평가

○ 대장 내시경 시행시에 R6G가 코팅된 형광클립 3개를 돼지 sigmoid colon 안쪽의 점막 표면에 파지 하였다. 대장 내시경을 빼내고, 시술자는 필터기능이 있는 보호경을 쓰고, 돼지 내장의 바깥쪽 표면에 532nm 레이저 빛을 조사하면서 (빛 조사 직경 6 cm, 레이저 파워밀도 0.35 mW/cm²) 형광 클립의 위치를 확인하였음.

○ 대장 표면위로 레이저를 스캔한지 수초 내에 형광클립으로부터 발생되는 형광에 의한 3개의

선명한 붉은 색 형광 spot을 발견하였음. 이로서, R6G가 코팅된 형광 클립이 돼지 내장내에 파지된 클립의 위치를 비침습적으로 확인하는데 매우 유용함을 확인하였음.

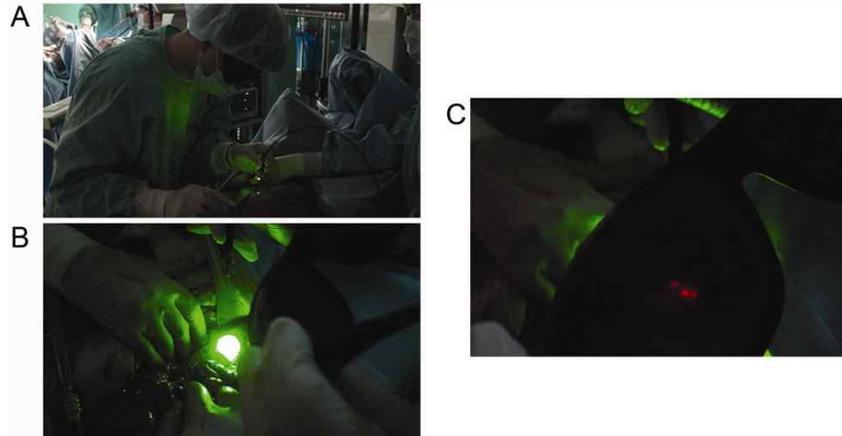


그림 2-4. 실험 돼지에서의 형광클립의 in vivo 효능 평가. A. 시술자가 돼지 대장의 점막 표면에 530nm 빛을 조사하면서 대장을 관찰하고 있는 사진. B. 돼지 내장에 빛을 조사했을때 육안으로 보여지는 사진. C. 돼지 내장에 빛을 조사하면서 보호경을 통하여 관찰한 사진. 대장의 안쪽에 파지시킨 3개의 클립이 선명하게 보임을 알 수 있다.

- R6G가 코팅된 형광 클립이 위와 같은 두꺼운 조직에서도 사용될 수 있는 지를 추가로 평가하였다. 내시경을 이용하여 실험용 돼지의 위의 내부 점막에 형광 클립을 파지한 후에, 돼지 위의 530nm 파장의 빛을 조사하면서 보호경을 통하여 형광 신호를 관찰하였으나, 이 경우에는 붉은색 형광을 검출할 수 없었음.

2.4. 돼지 위 절편을 이용한 개발된 형광 클립의 ex vivo 성능 평가

- 돼지 위에서의 형광클립 효능 평가를 위하여, 생체조직에서 빛의 투과 효능이 더 우수한 근적외선 형광 물질 ATTO647N을 이용하여 형광클립을 제조하고 평가를 실시하였음.
- 돼지 위 조직 절편 (두께, 약 6.4~8.9 mm)를 수돗물로 세척한 후에, ATTO647N이 코팅된 형광 클립을 위 내부 점막에 위치시키고 650nm 레이저 빛을 조사하면서 (빛 조사 직경 7 cm, 레이저 파워밀도 0.7 mW/cm²) 형광 영상을 촬영하였음. 형광 영상은 CCD 카메라를 이용하여 얻었으며, 형광 카메라에는 696~736nm 파장영역의 빛만을 투과시키는 band-pass 발광필터를

장착하여 사용하였음.

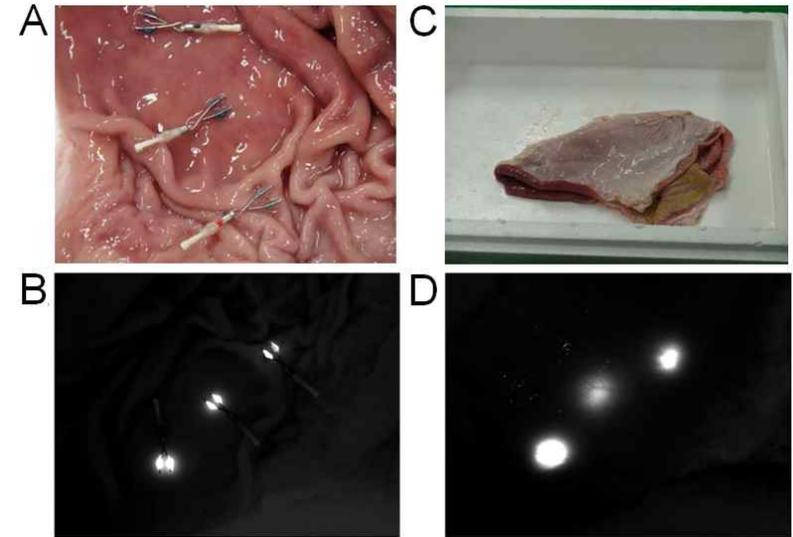


그림 2-5. 돼지 위절편을 이용한 형광클립의 ex vivo 효능 평가. A. 돼지 위 절편의 점막층 위에 각각 다른 농도의 형광염료가 탑재된 클립을 위치시킨 사진. 형광클립 제조시에 ATTO647N의 농도는 50, 30, 10 μM 농도로 하여 제조하였음. B. A의 위에서 650nm파장의 레이저를 조사하면서 형광 카메라로 촬영한 형광. C. 형광클립을 위치시킨 위 절편을 형광클립이 안쪽에 숨도록 하여 폴딩 시킨 상태의 사진. D. 폴딩된 위 절편의 바깥쪽 표면에 650nm레이저 빛을 조사하면서 카메라를 통하여 얻은 형광 영상.

- 그림 2-5B에 보이는 것처럼 코팅내에 존재하는 ATTO647N의 농도가 증가함에 따라서 더 밝은 형광이 발생하는 것을 알 수 있으며, 폴딩된 위 조직으로부터 얻어진 형광 영상에서도 강한 형광 신호가 발생되므로 클립의 위치를 비침습적으로 파악할 수 있음을 알 수 있음.
- 광원으로 650nm 레이저 대신에 복강경에 포함된 제논 램프 (model 5131; Richard Wolf GmbH)를 이용한 실험을 수행하였음. 제논램프의 광원 부분에 635~675nm파장 영역의 빛만 통과시키는 band-pass 필터를 장착하고, 이 빛을 폴딩된 위 절편 위로 조사 하였을 때에도 (빛 조사 직경 7 cm, 레이저 파워밀도 2.18 mW/cm²) 형광 클립의 위치를 형광영상을 통하여 확인할 수 있었음.

2.5. Ethylene Oxide (EO) 가스 살균의 영향

- 살균과정이 형광염료의 형광 특성에 영향을 미칠 수 있는지를 알아보기 위하여 Rhodamine 6G 형광염료가 담지된 PMMA 고분자 필름을 0.5 mm 두께로 제조하고, EO 가스 살균을 거친 샘플과 살균을 하지 않은 샘플의 형광을 관찰함. 그림 2-6에 보이는 것처럼 EO 가스 살균과정 후에도 형광 신호 강도의 변화가 없음을 통하여, 형광 dye가 살균과정동안 손상을 입지 않음을 확인 할 수 있었음.



그림 2-6. Rhodamine 6G 형광염료가 담지된 PMMA 고분자 필름의 형광 사진 (excitation: 530nm 레이저, emission: 561nm long-pass filter 사용)

2.6. 코팅 두께의 조절 연구

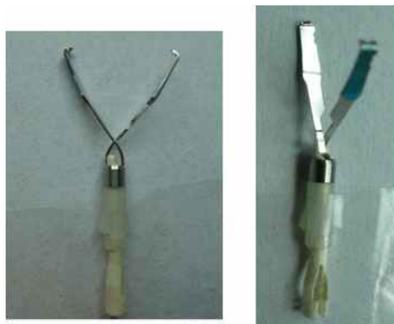


그림 2-7. 클로로포름을 용매로 사용하여 형광염료와 PMMA 고분자 지지체를 녹인 후, 클립 표면에 코팅을 한 사진.

- 형광염료와 PMMA 고분자 지지체를 녹이는 유기용매의 종류에 따른 코팅두께 조절 가능성을

점검하였음. 클로로 포름을 유기용매로 사용하여 클립을 코팅하는 경우에는 그림 2-7에서 보는 것처럼 코팅두께를 얇게 조절할 수 있었을 뿐만 아니라, 용해 시킬수 있는 형광 dye의 농도도 30 μM 에서 200 μM 이상으로 높일 수 있었음. 형광 방출 세기는 200 μM 까지도 지속적으로 증가하였음.

2.7. 새로운 구동원리의 클립 스테이플 장치 및 클립 개념 설계

- 클립 스테이플 장치 시작품 설계 및 제작
 - ; 향후의 기술 이전 등을 고려할 경우 생체클립 및 클립파지장치를 모두 독자적으로 개발하고, 관련된 지식재산권을 확보할 필요가 있음
 - ; 본 연구에서 설계한 생체클립 장치에서는 장치의 1회 삽입으로 여러 개의 클립을 순차적으로 파지할 수 있는 다연발 파지 기능을 구현하는 것을 목적으로 하였으며, 이를 위해 기존의 고정링을 통해 파지상태를 유지하는 방식이 아닌 스프링의 복원력을 이용하여 생체클립의 파지상태를 유지하는 새로운 방식의 클립 장치를 고안함
 - ; 기존의 상용 생체클립의 경우 파지가 이루어진 상태에서 고정링을 말단 체결부의 휘어진 부분으로 밀어넣어 파지 상태를 유지시키는 방식이 일반적인 반면, 본 연구에서 고안한 생체클립에서는 압축 상태에 있던 스프링이 늘어나는 복원력을 이용하여 말단 체결부의 파지 상태가 계속 유지되도록 설계

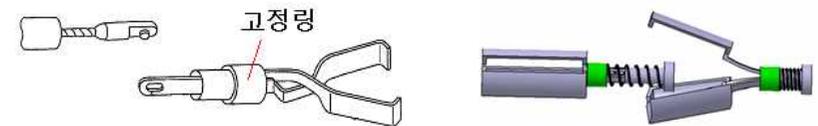


그림 2-8. 기존의 상용 생체클립 (좌. HX-610-090L, 올림푸스 社) 과 본 연구에서 제안한 스프링 방식의 생체클립 (우) 개념도

- ; 기존의 생체클립 장치의 경우 체결장치 하나에 생체클립 하나만을 장착할 수 있으므로, 클립을 파지한 이후에는 체결장치를 외부로 뽑아내고 또 다른 생체클립을 체결장치에 장착한 다음, 체결장치를 몸 안으로 재이송하여 클립을 파지하는 등의 불편함
- ; 반면, 본 연구에서 고안된 클립장치의 경우, 하나의 체결장치에 복수 개의 클립을 동시에 장착하여 하나씩 순차적으로 사용할 수 있으므로, 시술이 간편해지는 장점을 가짐
- ; 구동 원리는 다음과 같음
 - 클립 체결장치의 말단부에 복수 개의 생체클립을 순차적으로 장착

- 이 때 후단에 있는 생체클립의 체결부가 전단에 있는 생체클립의 스프링 몸체를 감싸도록 서로 맞물려 장착

- 각 생체클립의 체결부는 자기 확대성을 가지도록 설계되어 체결장치 외부로 돌출될 경우 체결부가 바깥쪽으로 벌어지도록 설계

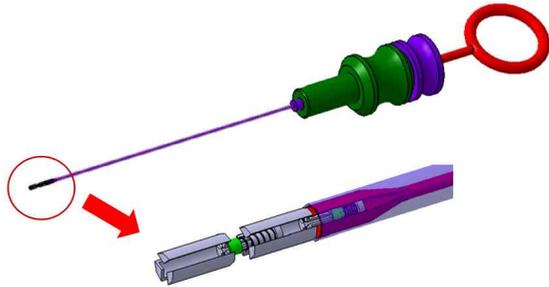


그림 2-9. 스프링 방식 다연발 생체클립 장치를 위한 체결장치 개념도

- 초기 장착이 완료되면, 체결장치를 내시경 장비 혹은 복강경 투관침을 통해 파지하고자 하는 부위로 이동

- 체결장치의 위치를 잡은 이후에, 체결장치의 손잡이를 조작하여 최전단부에 장착되어 있는 클립의 체결부가 체결장치 외부로 돌출되도록 함

- 이 때, 외부로 돌출된 클립 체결부는 자기 확대성에 의해 바깥쪽으로 확대

- 체결장치 전체를 이동시켜 클립 체결부가 파지할 부위를 물도록 하고, 그 상태에서 체결장치를 추가 조작하여 두 번째 클립의 체결부가 자기 확대성에 의해 확대되도록 함

- 두 번째 클립의 체결부가 물고 있던 스프링이 외부의 압축력을 상실하게 되어 스스로의 복원력에 의해 신원되면서, 스프링의 복원력에 의해 파지된 클립이 파지상태를 계속 유지됨

- 이와 같은 과정을 통해 하나의 클립의 파지가 완료되면, 다음 파지 부위로 체결장치를 이송한 후 동일 과정을 거쳐 다음 번 클립의 파지 작업을 수행

- 이러한 메커니즘을 통해 체결장치 내부에 탑재된 복수 개의 클립을 순차적으로 파지 가능

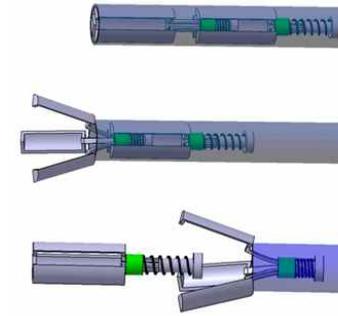


그림 2-10. 본 연구에서 고안된 스프링 방식 다연발 생체클립 장치의 구동 메커니즘

2.7. 새로운 구동원리의 클립 스테이플 장치 및 클립 시제품 개발

○ 기존 상용 클립

- 기존 클립은 단발 장치로 클립 건의 조작 와이어와 클립이 직접 연결되는 구조(그림 2-11)

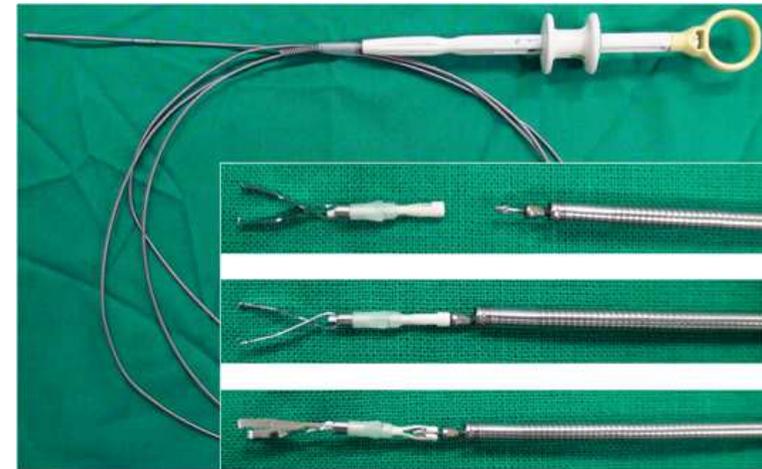


그림 2-10. 기존 클립 및 클립 건(올림푸스社)

○ 개발한 시제품 클립 특징

- 본 연구에서는 클립을 여러 개 장착한 상태로 체내로 투입된 후 여러 번의 클리핑을 수행할 수 있는 다연발 클립 장치를 개발하고자 함

- 다연발을 구현하기 위해서는 클립 건의 직선 선단부인 격납관에 여러 개의 클립을 수용해야 하며 클립 간의 관계 또한 다연발이 가능하도록 구성함

- 격납관 내의 위치를 기준으로 최외측 클립이 가장 먼저 클리핑되도록 조작되어야 하나, 조작 와이어는 격납관 내부 공간(Ø2)상 최외측 클립과 직접적으로 연결될 수 없음
- 격납관의 내부 공간이 너무나 협소하기 때문에 최외측 클립을 클리핑하기 위한 별도의 조작 장치를 클립 건의 선단부에 설치하는 것에도 어려움이 있음
- 기존 클립 건의 조작 와이어 방식을 그대로 채택하되, 적재되어 있는 각 클립은 최외측 클립이 되기 전에는 클립 건의 일부로서 역할을 하도록 클립 간의 관계를 설계함
- 설계 개념의 타당성을 단시일에 검증하기 위해 시제품 개발 방향을 그림 2-10의 기존 클립 건을 사용해서 다연발을 구현하는 것으로 함
- 확대된 상태에서 두 클립 암 사이의 간격(그림 2-11)이 기존 클립과 비교하여 동등 이상의 수준이 되도록 클립 암의 굽힘 각도를 선정



그림 2-11. 두 클립 암 사이의 간격

○ 1차 클립 설계 및 시제품 개발

- 다연발 클립, 연결부, 간이 클립 건으로 구성되는 1차 시제품(그림 2-12) 클립 꼬리 부분(그림 2-13)은 격납관 내에서 클립들이 뒤틀림 없이 일렬로 정렬되게 하며 후미 클립의 파지조(把持爪)에 지지되어 스프링의 안정적인 압축에 도움이 될 것으로 예상했으나 제작 후 실험해 본 결과 후미 클립의 두 클립 암 사이에 끼어 전방 클립이 격발되는 것을 방해하여 되어 제거함
- 클립의 교환 상태를 유지시키는 것은 기본적으로 스프링의 복원력이나 예상할 수 없는 외력이 발생하여 스프링을 순간적으로 압축시키게 되면 클립이 빠지게 되므로 걸림턱(그림 2-14)을 설치하여 이를 방지하고자 하였으나 간이 금형으로는 가공이 어려워서 시제품 가공에서는 구현하지 못함



그림2-12. 다연발 클립 1차 시제품

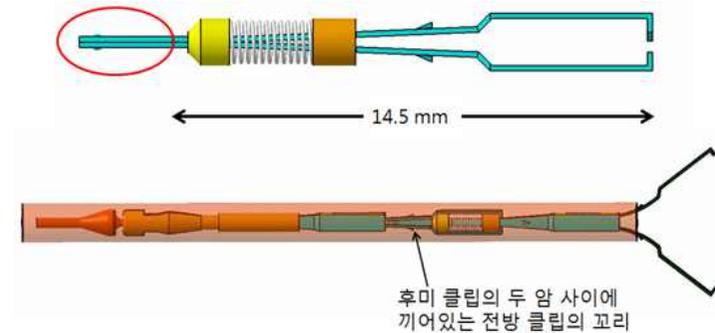


그림2-13. 클립 꼬리 부분

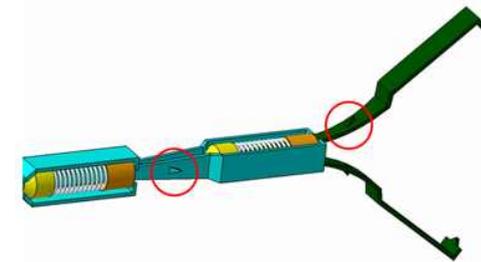


그림2-14. 조임링 걸림턱

- 그림2-15은 1차 시제품으로 두 개의 클립을 연사하여 두 위치를 클리핑한 장면을 보여주고 있다. 실험 결과 스프링의 복원력을 이용하여 여러 개의 클립을 연사하겠다는 기본 설계 개념이 실현됨을 알 수 있음



그림2-15. 1차 시제품 연사 실험

○ 1차 클립 시제품 개선점

- 두 클립 암 사이의 간격이 설계 목표인 5 mm에 미치지 못 함(그림2-16)
- 기대했던 발사 동작이 구현되지 않는 경우가 발생했는데, 그 원인 중 하나는 그림2-17에 나타난 스프링의 뒤틀림 현상에 기인하는 것으로 판단됨.
- 스프링이 뒤틀리며 압축되면 설계했던 복원력이 형성되지 못하므로 이로 인해 발사 동작이 원활하게 구현되지 못한 것으로 사료됨
- 그림2-18은 전방 클립의 조임링이 후미 클립의 파지조에 걸리는 현상을 보여주고 있는데, 이러한 경우에도 발사 동작이 잘 구현되지 않음.

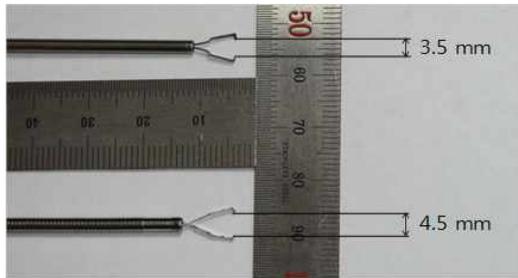


그림2-16. 1차 시제품의 두 클립 암 사이의 간격



그림2-17. 스프링의 뒤틀림

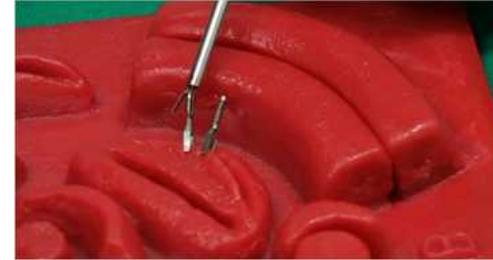


그림2-18. 전방 클립의 조임링이 후미 클립의 파지조에 걸리는 현상

○ 2차 클립 설계 및 시제품 개발

- 기대했던 발클립 암의 굽힘 방식을 그림 2-19 같이 변경
- 클립 암이 자가 확대성을 갖도록 클립 암을 굽힐 때 1차 시제품에서는 베이스로부터 완만하게 굽혔으나 2차 시제품에서는 조임링에 의해 굽힘이 제한되지 않도록 조임링으로부터 완만하게 굽히는 것으로 설계를 변경함

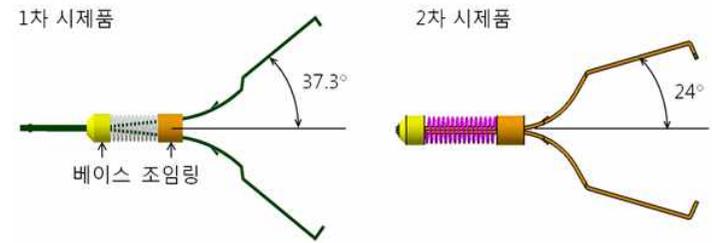


그림2-19. 클립 암의 굽힘 방식 변경

- 클립 암의 스프링 장착 구간의 폭을 0.5 mm에서 0.7 mm로 변경하여 스프링이 압축되면서 뒤틀리는 현상이 감소되도록 함(그림2-20)

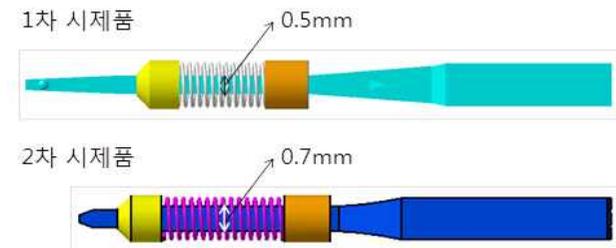


그림2-20. 클립 암의 스프링 장착 구간 폭 변경

- 클립 암의 파지조 절곡 각도를 90°에서 100°로 변경하여 전방 클립의 조임링이 후미 클립의 파지조에 걸리는 현상이 감소되도록 함(그림2-21)

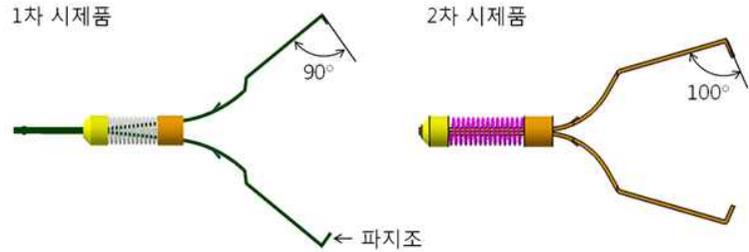


그림2-20. 클립 암의 파지조 절곡 각도 변경

- 클립 암의 스프링 격납 구간의 길이(그림2-22)를 4.5 mm에서 5.6 mm로 변경하여 스프링의 복원력이 증대되도록 함
- 클립 암의 스프링 장착 구간의 폭과 파지조의 크기를 동시에 증대하기 위해서 클립의 적재 방식(그림2-23)을 90° 엇갈리게 적재하던 방식에서 90° 엇갈림 없이 나란하게 적재하는 방식으로 변경
- 전방 클립의 조임링 지지 면적을 증대시키며 전방 클립의 클립 암을 안정적으로 지지함으로 클립뒤틀림 현상을 줄이기 위해 클립 암 파지조의 크기를 크게 하고 형상을 변경 (그림2-24)

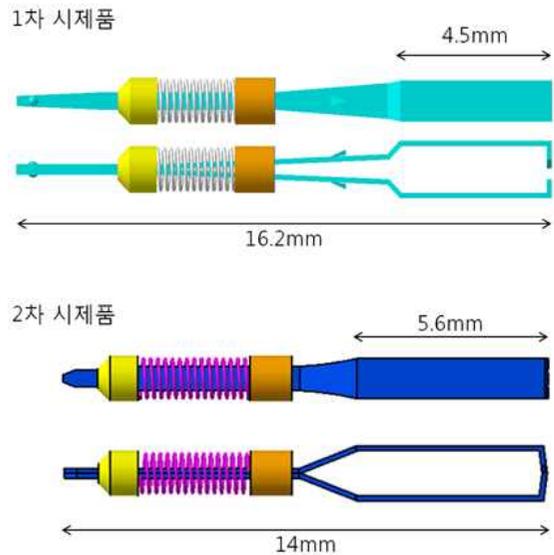


그림2-22. 클립 암의 스프링 격납 구간 길이 변경

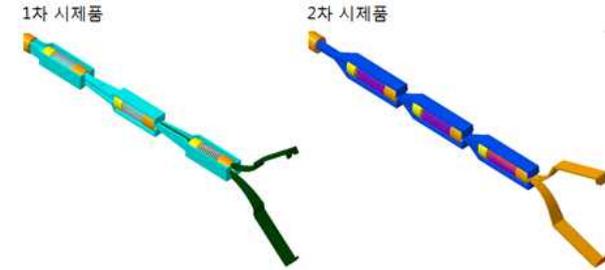


그림2-23. 클립의 적재 방식 변경

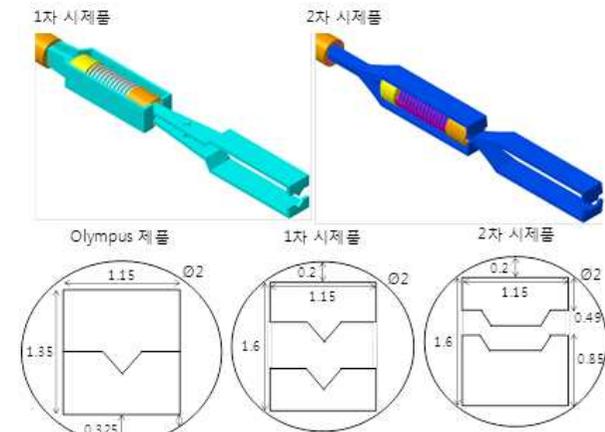


그림2-25. 클립 암 파지조의 크기 및 형상 변경

- 2차 시제품으로 세 개의 클립을 연사하여 세 위치를 클리핑한 장면(그림2-26)
- 클립 2차 시제품을 실험해 본 결과 발사 동작은 1차 시제품에 비해 개선된 것을 확인
- 클립 암의 재질로 STS와 BeCu 두 가지를 시험 제작하여 평가하였는데, STS의 경우는 일단 격납관 내에 적재한 후 다시 격납관 밖으로 토출시키면 두 클립 암 사이의 간격이 BeCu만큼 확보되지 않음

○ 2차 클립 시제품 개선점

- 2차 시제품의 두 클립 암 사이의 간격을 보여주고 있는데, 3~4 mm 정도로 여전히 설계 목표에는 미치지 못하고 있음(그림2-27)

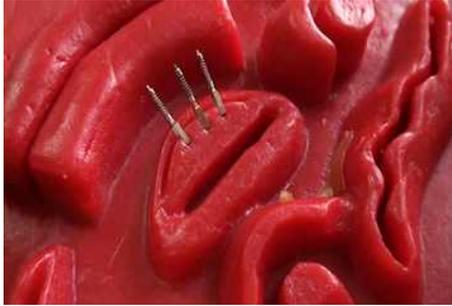


그림2-26. 2차 시제품 연사 실험

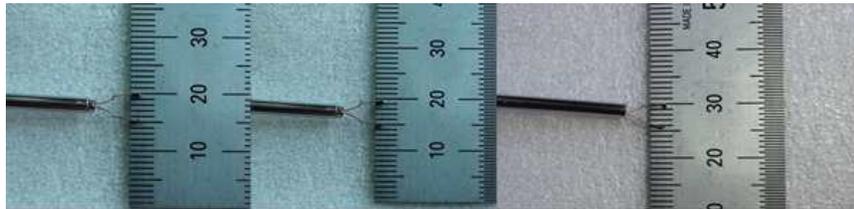


그림2-27. 2차 시제품의 두 클립 암 사이의 간격

3. 연구결과 고찰 및 결론

- 그림 2-5B 기존의 금속 클립을 이용한 수술부위 표지방법은 대장 표면을 수술자가 촉지함으로써 위치를 찾기 때문에 중앙 위치의 정확한 파악이 힘들었을 뿐 아니라, 복강경등의 최소 침습적 시술 방법에는 적용할 수 없는 단점이 있었음.
- 최근들어서는 Zako등이 무기 Er-doped yttrium oxide 나노입자를 이용한 ex vivo 중앙 표지 실험을 보고 하였음. 이들이 합성한 나노입자는 여기와 발광이 각각 980nm와 1550nm이었기 때문에, 형광영상을 얻기 위하여 특별한 광학 장치를 필요로 하는 번거로움이 있음.
- 그림 2-5B 본 연구에서 사용된 R6G 형광염료의 경우에는 높은 몰 흡광계수 ($115,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 탁월한 광학 안정성, 높은 형광 수율 (0.95)의 특성을 갖고 있음. 530nm의 레이저 광원을 사용하고 580nm long-pass 필터를 사용 하였을 때, 붉은색 형광을 필터 안경을 통하여 관찰할 수 있었음.
- 그림 2-5B 또한, R6G가 함유된 PMMA 필름을 EO 가스 살균 처리한 결과, 살균 후에도 형광 발광 특성에 전혀 손상을 입지 않음을 확인 할 수 있었음.
- 높은 광 투과성을 보이면서도 뛰어난 내산/내염기성 특성을 갖고 있는 PMMA 고분자는, 형광 물질의 코팅을 위한 지지체로서 적합하다는 것이 실험을 통하여 증명 되었음.
- R6G가 코팅된 형광 클립을 이용한 ex vivo 및 in vivo 동물 실험으로부터, 형광 클립이 클립 부위를 형광영상으로부터 빠른 시간 내에 정확히 식별될 수 있음이 증명 되었으며, 이러한 형광클립의 형광 영상법은 복강경등의 최소 침습 시술에도 적용될 수 있음을 알 수 있었음. 특히, R6G가 코팅된 형광클립의 경우에는 단순히 필터기능 안경을 착용하거나, 또는 기존의 복강경 장비를 이용하여서도 표지 부위를 식별할 수 있는 커다란 장점이 있음.
- ATTO647N등을 이용한 보다 장파장의 형광 dye를 사용하는 경우에는, 근적외선 형광을 잘 검출할 수 있는 CCD 카메라 장비를 필요로 하지만, 위장과 같이 약 1cm 정도 두께의 조직의 표지에도 유용하게 사용될 수 있음을 ex vivo 실험으로부터 증명되었음.
- R6G 및 ATTO647N이 코팅된 형광클립으로부터 형광 dye가 방출되는지를 평가한 결과, 최소한 3일 동안은 형광 dye의 방출이 없는 것으로 확인되어 안정성이 일부 증명 되었음.

- 형광 dye와 PMMA 고분자를 녹이는데 사용되는 유기용매를 클로로 포름으로 사용하는 경우에는 코팅 두께의 조절이 용이하고, 담지 할 수 있는 형광 dye의 농도도 7배 이상 높일 수 있음을 확인하였음.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(I.F.)	Year: Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Small-Dose India Ink Tattooing for Preoperative Localization of Colorectal Tumor	손 대 경 (교신)	J Laparoendosc Adv Surg Tech A (1.012)	2010 ; 20(9): 731-4	국외 SCI	0710362 0910520
A novel endoscopic fluorescent clip for the localization of gastrointestinal tumors	손 대 경 (교신)	Surg Endosc (3.436)	2011 ; 25(7): 2372-7	국외 SCI	0910520

1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동

2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

3) 지원과제번호(Acknowledgement)

- 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
A novel endoscopic fluorescent clip for the localization of gastrointestinal tumors	손 대 경 (제1)	대한외과학회 추계학술대회	국내	0910520

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허	Fluorescent Indication Clip for Surgery	국립암센터 (손대경외)	유럽	EP10153203.4
발명특허	Fluorescent Indication Clip for Surgery	국립암센터 (손대경외)	중국	201010218020.8
발명특허	의료용 다연발 클립과 이를 적용하는 클립 건 및 이들을 이용하는 클리핑 방법	국립암센터 (손대경외)	대한민국	10-2011-0057878

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)	
			연차	최종
수술시 종양 부위를 정확하고도 용이하게 식별할 수 있도록 하기 위한 형광물질 탑재 클립 장치 개발	1차년도	형광 나노입자를 탑재한 생체 클립 시제품 설계, 제작	100	80
		개발된 생체 클립의 파지를 위한 클립 스테이플 장치 시제품 설계, 제작		
		개발된 형광 클립의 in vivo release test 수행		
	2차년도	개발된 형광 표지 장치의 성능 평가를 위한 ex vivo 실험 수행	80	
		형광 클립의 특성 최적화조건 탐색		
		클립 장치 성능 평가 및 개선		
	LED 광원 장치 시제품 설계, 제작			

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
530~630 nm 사이의 특정 파장 조명하에서 강한 형광을 방출	사용한 형광 물질인 Rhodamine6G와 ATTO647N 모두 고분자와 함께 클립에 코팅된 후에, 빛 조사시 강한 형

하는가 여부	광을 발생하는 것을 확인함.
개발된 클립이 ex vivo 실험에서 안정된 체결성을 나타냈는가 여부	개발된 클립이 ex vivo 및 in vivo 실험에서 안정된 체결성을 갖는 것으로 확인됨. 2차 년도에는 장기간 체결 안정성에 대한 시험을 실시할 예정임.
개발된 스테이플이 클립의 이송 및 체결을 정상적으로 수행하는가 여부	새로운 스테이플 장치 및 클립의 설계를 완료하였으며, 현재 업체의 의뢰하여 시제품을 제작 중에 있음. 시제품이 제작되는대로 성능평가를 수행할 예정임
돼지 내장 조각에 클립을 파지하고 외부에서 조명을 조사했을 때 클립의 위치를 육안으로 확인할 수 있는가 여부	돼지 내장조직 및 위조직을 이용한 ex vivo 실험으로부터 클립의 위치를 형광영상으로부터 빠른 시간내에 용이하게 확인할 수 있었음. 1차년도에 동물 실험을 추가로 실시하였으며, 돼지 내장 내에 파지된 형광 클립을 형광 영상으로부터 확인하는 데 성공 하였음.
LED 광원장치를 이용하여 형광클립 위치를 찾아낼 수 있는지 여부	LED 광원을 이용하여 돼지 위 및 대장조직을 이용한 형광 클립 위치 확인 실험시 기존의 레이저를 광원으로 사용하였을 때와 같이 형광을 검출할 수 있는 것을 확인함. 하지만 기존 복강경시스템을 이용하였을 때는 빛의 손실이 많아 검출되지 않는 문제점을 확인함.

5. 연구결과와 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재		
산업재산권 등록	2 건	1. 의료용 다연발 클립과 이를 적용하는 클립 건 및 이들을 이용하는 클리핑 방법 (국내) 2. Fluorescent Indication Clip for Surgery (대한민국, 일본, 미국, 유럽, 중국)
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

- 조기암 환자 치료 시 빠른 시간에 정확하게 종양의 표지 부위를 확인 할 수 있으므로, 수술 시간의 획기적 단축을 기대 할 수 있을 뿐 아니라, 절개 부위의 최소화로 암 환자의 시술 후 회복기간 단축 및 삶의 질 향상을 기대할 수 있음.
- 대장암 수술 예정 부위의 표지 뿐 아니라, 위를 포함한 신체 내 다른 부위의 표지를 위한 용도로 사용 가능하며, 다양한 외과적 시술에 적용 가능함
- R6G 본 연구로부터 축적된 노하우를 바탕으로 형광 영상 법을 이용한 암 제거 수술에

적용하고자 함.

○ 형광클립 및 다연발 클립 기술이전 및 국산화를 통한 국내 시장 확보 및 수출 가능성 확보

6. 참고문헌

1. Montorsi M, Opocher E, Santambrogio R, Bianchi P, Faranda C, Arcidiacono P, Passoni GR, Cosentino F (1999) Original technique for small colorectal tumor localization during laparoscopic surgery. *Dis Colon Rectum* 42:819-822
2. Park JW, Sohn DK, Hong CW, Han KS, Choi DH, Chang HJ, Lim SB, Choi HS, Jeong SY (2008) The usefulness of preoperative colonoscopic tattooing using a saline test injection method with prepackaged sterile India ink for localization in laparoscopic colorectal surgery. *Surg Endosc* 22:501-505
3. Cho YB, Lee WY, Yun HR, Lee WS, Yun SH, Chun HK (2007) Tumor localization for laparoscopic colorectal surgery. *World J Surg* 31:1491-1495
4. Beretvas RI, Ponsky J (2001) Endoscopic marking: an adjunct to laparoscopic gastrointestinal surgery. *Surg Endosc* 15:1202-1203
5. Park DJ, Lee HJ, Kim SG, Jung HC, Song IS, Lee KU, Choe KJ, Yang HK (2005) Intraoperative gastroscopy for gastric surgery. *Surg Endosc* 19:1358-1361
6. Price N, Gottfried MR, Clary E, Lawson DC, Baillie J, Mergener K, Westcott C, Eubanks S, Pappas TN (2000) Safety and efficacy of India ink and indocyanine green as colonic tattooing agents. *Gastrointest Endosc* 51:438-442
7. Weissleder R, Ntziachristos V (2003) Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med* 9:123-128
8. Muller MG, Georgakoudi I, Zhang Q, Wu J, Feld MS (2001) Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption. *Appl Opt* 40:4633-4646
9. Ntziachristos V, Ripoll J, Wang LV, Weissleder R (2005) Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat Biotechnol* 23:313-320
10. Hyung WJ, Lim JS, Cheong JH, Kim J, Choi SH, Song SY, Noh SH (2005) Intraoperative tumor localization using laparoscopic ultrasonography in laparoscopic-assisted gastrectomy. *Surg Endosc* 19:1353-1357
11. Fu KI, Fujii T, Kato S, Sano Y, Koba I, Mera K, Saito H, Yoshino T, Sugito M, Yoshida S (2001) A new endoscopic tattooing technique for identifying the location of colonic lesions during laparoscopic surgery: a comparison with the conventional technique. *Endoscopy* 33:687-691
12. Sawaki A, Nakamura T, Suzuki T, Hara K, Kato T, Kato T, Hirai T, Kanemitsu Y, Okubo K, Tanaka K, Moriyama I, Kawai H, Katsurahara M, Matsumoto K, Yamao K (2003) A two-step method for marking polypectomy sites in the colon and rectum. *Gastrointest Endosc* 57:735-737
13. Askin MP, Wayne JD, Fiedler L, Harpaz N (2002) Tattoo of colonic neoplasms in 113 patients with a new sterile carbon compound. *Gastrointest Endosc* 56:339-342
14. Zako T, Hyodo H, Tsuji K, Tokuzen K, Kishimoto H, Ito M, Kaneko K, Maeda M, Soga K. Development of near infrared-fluorescent nanophosphors and applications for cancer diagnosis and therapy. *Journal of Nanomaterials* [doi:10.1155/2010/491471] 2010
15. Magde D, Rojas GE, Seybold PG (1999) Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes. *Photochem Photobiol* 70:737-744
16. Vallittu PK, Ekstrand K (1999) In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *J Oral Rehabil* 26:666-671
17. Vallittu PK (1995) A review of methods used to reinforce polymethyl methacrylate resin. *J Prosthodont* 4:183-187

A novel endoscopic fluorescent clip for the localization of gastrointestinal tumors

Yongdo Choi · Kwang Gi Kim · Joa Kyum Kim ·
Kyoung Won Nam · Hyun Ho Kim ·
Dae Kyung Sohn

Received: 8 September 2010 / Accepted: 13 December 2010 / Published online: 7 February 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract

Background Accurate tumor localization is essential for gastrointestinal surgery, especially in cases of early cancer. This study was designed to develop a novel fluorescent clip for rapid and exact visualization of tumor sites.

Methods A transparent polymer matrix containing highly bright fluorochromes was coated on the front end of endoscopic clips. The fluorescent clips were placed on the mucosal surface of a porcine colon and stomach, and the operator then attempted to identify the fluorescent clips from the outer serosal side of the colon and stomach. A 532-nm diode laser and filter glass were used for visualizing the fluorescence signals through the colonic tissue. A 650-nm diode laser and a digital charge-coupled device (CCD) camera equipped with a bandpass emission filter were used for the imaging of the fluorescent clips through the thick stomach tissue.

Results When a green light from a 532-nm diode laser (power density = 0.35 mW/cm²) was applied on the serosal surface of the porcine colon, we could identify all clips that had been placed endoscopically on the mucosal surface of the inner colonic wall. By using the light from a 650-nm diode laser (power density = 0.7 mW/cm²), we identified all fluorescent clips through the stomach wall in real time. Similar results were also obtained with the filtered xenon lamp.

Conclusion An endoscopic fluorescent clip can be useful for the rapid and exact localization of tumors, and this technique can also be useful during laparoscopic surgery.

Keywords Endoscopic clip · Fluorescence imaging · Colorectal neoplasm · Localization

Accurate tumor localization is essential during gastrointestinal surgery, particularly because of the rapidly increasing incidence of early gastric or colonic cancer worldwide [1–3]. Exact tumor localization can help achieve a shorter operation time, minimal tissue loss, and fast recovery after surgery. Several methods for the localization of gastrointestinal tumors have been introduced, including barium imaging study, a combination of preoperative endoscopy with fluoroscopy and intraoperative endoscopy, tattooing, and the use of endoscopic clips [2–6]. Each of these methods has its drawbacks, including inaccurate localization, the use of radiation, bowel distension, faint or diffused tattoo, and invisibility of the clips outside the bowel.

Recently, fluorescence imaging in the near-infrared (NIR) spectrum (600–900 nm) has been shown to have great potential for the noninvasive detection of disease sites in vivo [7]. Light penetration through biological tissues is

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00464-010-1557-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Y. Choi · J. K. Kim
Molecular Imaging and Therapy Branch, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Korea

K. G. Kim · K. W. Nam · H. H. Kim
Biomedical Engineering Branch, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Korea

D. K. Sohn (✉)
Colorectal Cancer Branch, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, 111 Jungbalsan-ro, Bundang-gu, Gyeonggi-do, Goyang 410-769, Republic of Korea
e-mail: ggsbdl@ncc.re.kr

Small-Dose India Ink Tattooing for Preoperative Localization of Colorectal Tumor

Mi Ri Hwang, MD, Dae Kyung Sohn, MD, Ji Won Park, MD, Byung Chang Kim, MD,
Chang Won Hong, MD, Kyung Su Han, MD, Hee Jin Chang, MD, and Jae Hwan Oh, MD

Abstract

Introduction: India ink tattooing is widely used for tumor localization; however, the tattooing procedure is not yet standardized. This study aims to evaluate the efficacy of small-dose tattooing with sterile India ink using a saline test-injection method.

Patients and Methods: Between April 2009 and August 2009, 20 patients underwent colonoscopic tattooing with prepackaged sterile India ink before resection of colorectal tumor. We injected 0.5 cc of India ink at three circumferential sites at the distal tumor using a saline test-injection method. Observation and leakage of India ink were evaluated during laparoscopic surgery, and the diameter of tattooing in the specimen was assessed.

Results: Tattoos were observed intraoperatively in 18 patients (90%). In 2 patients, tattoos were not observed on the serosal surface but were detected on the mucosal surface. Localized leakage of ink was identified during surgery in 1 patient (5%), without fever or abdominal pain. Mean tattoo diameter was 2.1 cm on the serosal surface and 2.0 cm on the mucosal surface.

Conclusions: Small-dose tattooing with sterile India ink using a saline test-injection method is effective for tumor localization.

Introduction

ACCURATE TUMOR LOCALIZATION is essential for colorectal resection in colorectal cancer, especially early cancer. The use of endoscopic procedures such as endoscopic mucosal resection (EMR) and endoscopic submucosal dissection has increased rapidly with advances in techniques and instrumentation. After endoscopic resection, additional surgical resection is needed for cases with a high risk of lymph node metastasis, such as poorly differentiated or angiolymphatic invasion. Colonic tattooing is widely used for localization of the EMR site in these cases.

Colonoscopic tattooing is currently considered one of the most effective methods of tumor localization, with a previous study reporting observation and leakage rates of 80%–100% and 0%–14.3%, respectively.^{1–6} The procedure of India ink tattooing, however, has yet to be standardized. Our group reported previously that preoperative colonoscopic tattooing using a saline test-injection method with prepackaged, sterile India ink is a safe and effective method for tumor localization in laparoscopic colorectal surgery.⁷ In the present study, we attempt to identify the appropriate amount of ink because

spillage is greater at high injection volumes. This pilot study aims to evaluate the efficacy of small-dose tattooing with sterile India ink using a saline test-injection method.

Materials and Methods

This study enrolled 20 patients who underwent preoperative colonoscopic tattooing at the National Cancer Center, Korea, between April 2009 and August 2009. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and informed consent was obtained from all patients. The protocol was approved by the institutional review board of our hospital (NCCNCS-09-298).

Four expert endoscopists with over 7 years of specialist experience performed the preoperative colonoscopic tattooing. Patients were prepared with mechanical bowel preparation before colonoscopic tattooing. The patients received either two 45 mL doses of sodium phosphate (Fleet[®]; C.B. Fleet Co., Inc., Lynchburg, VA) or 4 L of polyethylene glycol solution (Colyte-F[®]; Taejoon Pharm, Seoul, Korea) and underwent colonoscopy under conscious sedation with midazolam.

The abstract of this study was presented at the 12th World Congress of Endoscopic Surgery in 2010, National Harbor, Maryland, Center for Colorectal Cancer, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Korea.

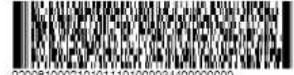


9200200014531011101000001900000000

특허출원서

【참조번호】 0001
【출원구분】 특허출원
【출원인】
【명칭】 국립암센터
【출원인코드】 1-2000-036786-6
【대리인】
【성명】 양문욱
【대리인코드】 9-2002-000146-3
【포괄위임등록번호】 2011-022531-2
【발명의 국문명칭】 의료용 다연발 클립과 이를 적용하는 클립 건 및 이들을 이용하는 클리핑 방법
【발명의 영문명칭】 Medical Multiple Clips, Clip Gun applying the same, Clipping Method using the same
【발명자】
【성명의 국문표기】 손대경
【성명의 영문표기】 SOHN Dae Kyung
【주민등록번호】 721124-1056619
【우편번호】 137-907
【주소】 서울특별시 서초구 잠원동 63-2번지 신반포형구아파트 102-1607
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 김광기
【성명의 영문표기】 KIM Kwang Ki

2-1



9200610002101011101000034400000000

특허출원서

【참조번호】 9010
【출원구분】 특허출원
【출원인】
【명칭】 국립암센터
【출원인코드】 1-2000-036786-6
【대리인】
【명칭】 특허법인 이상
【대리인코드】 9-2008-100021-0
【포괄위임등록번호】 2009-022385-6
【발명의 국문명칭】 수술용 형광 표시 클립
【발명의 영문명칭】 FLUORESCENT INDICATION CLIP FOR SURGERY
【발명자】
【성명의 국문표기】 손대경
【성명의 영문표기】 SOHN, DAE KYUNG
【주민등록번호】 721124-1056619
【우편번호】 410-769
【주소】 경기도 고양시 일산동구 장발산로 111
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 김광기
【성명의 영문표기】 KIM, KWANG GI
【주민등록번호】 710916-1335015
【우편번호】 143-900
【주소】 서울특별시 광진구 중곡3동 166-10

3-1

