

3차원 Confocal Imaging과 생체 영상 분석

이 임 결
정보전자연구부, 한국과학기술연구원
(전화) 02-958-5720
(FAX) 02-958-5789
E-mail: ykl@david.kist.re.kr

Three Dimensional Confocal Imaging and Biomedical Image Analysis

Yim-Kul Lee
Division of Information and Electronics
Korea Institute of Science and Technology (KIST)

Abstract

Confocal laser scanning microscopy (CLSM)는 기존의 coherent or incoherent microscopic imaging 보다 횡축 방향 (lateral direction)으로 고해상도를 가지며, 종과 축 사이를 구분하는 광축 방향 (axial direction)의 optical sectioning에 의해 샘플의 3D 구조를 고해상도로 영상화함으로써 3D 구조 및 생체 기능 분석을 가능하게 해 준다. 본 논문에서는 CLSM에 의한 3D 영상화 원리와 초점면 부근에서 얻어지는 광세기 분포, 얻어진 2D slice 영상의 시각화 및 응용에 대해 논의된다.

1. 서론

과거에는 조직의 3D 영상화를 위해 microtome을 사용하는 physical sectioning에 의해 샘플을 여러 개의 얇은 단층 (slice)으로 잘라내어 죽은 조직을 보게 됨으로 살아 있는 조직의 생체 기능 (functioning)을 관찰할 수 없었다. 또한 기존의 microscopic imaging은 광축 방향으로 out-of-focus된 샘플면으로 부터의 영상 신호가 in-focus 된 영상 신호와 함께 광검출기에 검출되므로 optical sectioning을 기대할 수 없고 3D 조직의 세부 특징 (feature) 들을 고해상도로 영상화할 수 없게 된다.

최근에 미세 조직의 3D 관찰을 위해 많은 관심을 가지고 연구 및 활용되고 있는 CLSM 영상화 기술은 physical sectioning 없이 noninvasive optical sectioning에 의해 높은 depth discrimination 으로 미소 생체 조직의 3D 영상화를 가능하게 해 준다. 또한 횡축 및 광축 방향에서 얻어지는 고해상도에 의해 생체 조직의 영상화 및 기능 분석을 위해 매우 유용한 광영상화 기술이다[1-3]. 이러한 특성으로 인해 confocal fluorescence mode나 confocal reflection mode (반사식) 등에 의해 신경조직, 세포군의 세부구조 및 기능, 암세포의 형성 및 발전과정 등에 관한 유용한 정보를 얻을 수 있게 된다. 특히 세포의 다른 그룹들 사이의 상관 구조를 조사할 때 3D 분석이 필요하고 또한 서로 다른 세포군을 구분하기 위해 여러 가지의 트레이서 (tracer)를 사용하게 된다.

2. CLSM 영상화의 원리

그림 1은 CLSM의 영상화 원리를 설명하기 위한 반사식 광학 구성도이다. 그림 1(a)에서 점광원 (point source) PS에서 나오는 레이저빔이 빔분할기 (beam splitter: BS)와 렌즈를 거쳐 스캔하고자 하는 샘플의 한 점을 비추고, 이 점으로부터 얻어지는 반사광이 BS에서 반사되어 핀홀 (pinhole)을 앞에 가지는 광검출기 (PHD)에 입력된다. 광검출기에 입력되는 반사빔의 세기가 매우 약하기 때문에 보통 증폭률이 큰 PM tube (photomultiplier tube)를 광검출기로 사용한다. 한 순간에 PS

에 의해 샘플의 한 점만이 영상화되므로 샘플의 한 단면에서 나타나는 전체 영상을 얻기 위해 광축과 수직인 단면상에서 x-y 스캐닝이 되고, 샘플을 3차원으로 영상화하기 위해 광축 (=z) 방향으로 스캐닝하는 과정이 수행되어야 한다. 스캐닝은 빔을 광축에 위치시키고 샘플 슬라이드가 놓여 있는 stage가 x-y로 스캔되는 stage 또는 objective lens scanning 방법 또는 샘플은 광축과 수직으로 고정해 두고 galvanometer[4]와 같은 스캐닝 거울 (mirror)을 사용하여 x-y로 스캔하는 빔스캐닝 (off-axis beam scanning) 방법에 의해서 할 수 있다.

그림 1(b)는 CLSM의 3차원 영상화를 위한 optical sectioning 능력을 보여주는 것으로 샘플의 표면에서 광축으로 거리 d만큼 떨어진 샘플의 단면은 out-of-focus 되어 이 단면으로부터 반사되어 나오는 빛은 PHD의 작은 핀홀 PS 의해 차단되기 때문에 오직 in-focus 되는 단면에 있는 한 점만 선명하게 맺히게 된다. 반사식인 경우에는 반투명한 거울 (semi-transparent mirror)을 광분할기 (beam splitter)로 사용하고, fluorescence mode인 경우 dichroic beam splitter를 사용하여 레이저로부터 나오는 짧은 여기파장은 통과시키고 샘플로부터 반사되어 나오는 긴파장의 형광광 (fluorescence light)은 광검출기로 반사시킨다. In-focus된 평면에 대해 x-y로 스캐닝함으로써 해당되는 2D 영상 slice를 얻을 수가 있으며, 또한 광축으로 이동하면서 in-focus 평면 내의 각 점에 대해 같은 과정을 반복함으로써 원하는 것수의 2D slices 영상을 얻어 컴퓨터에 저장한다. 보통 air-cooled argon ion 레이저가 사용되며, 출력은 10-50 mW 정도이고, 458nm부터 514nm 영역에서 fluorescein이나 rhodamine 같은 형광 색소 (fluorophores)를 여기 (exciting) 시키기에 적당한 파장을 제공한다.

3. 3D CLSM 광영상화와 특성

그림 2는 기존의 영상화 방법과 CLSM 영상화 방법을 비교한 것이다. 그림 2(a)는 두 렌즈 영상화 시스템으로 전단은 source optics 부분으로 optical source를 object에 조사하기 위한 구성부이고, 후단은 스캔된 object을 광검출기 (optical detector)에 영상화하기 위한 광검출 광학부 (detector optics)이다. 전단의 임펄스 응답을 $H_s(x_s, x)$, 후단의 임펄스 응답을 $H_d(x, x_d)$, 그리고 스캔되어 영상화될 object를 $O(x)$ 라 할 때, incoherent source를 광원으로 사용하는 incoherent imaging인 경우 출력 광세기는 식 (1)와 같이 표현된다. Source optics부의 impulse response의 절대값의 제곱, 즉 point spread function (PSF)과 object intensity와의 convolution으로 표현된다[5]. Coherent imaging인 경우는 출력 amplitude는 impulse response와 object과의 convolution이고 이 값의 제곱으로 출력 광세기가 식 (2)와 같이 얻어진다. 기존의 두 가지 영상화와

는 달리 CLSM 영상화인 경우에는 effective impulse response $H_{eff}(x_s, x_d)$ 가 그림 2(a)의 전단과 후단의 impulse response의 곱인 $H_s(x_s, x)H_d(x, x_d)$ 로 주어져 출력 amplitude는 $H_{eff}(x_s, x_d)$ 와 object $O(x)$ 의 convolution으로 주어지고 광세기는 1D인 경우 이 값의 제곱으로 식 (3)와 같이 주어진다.

- (1) Incoherent 경우: $I(x) = |H_s(x_s, x)|^2 \otimes |U(x)|^2$.
- (2) Coherent 경우: $I(x) = |H_s(x_s, x) \otimes U(x)|^2$.
- (3) CLSM 경우: $I(x) = |[H_s(x_s, x)H_d(x, x_d)] \otimes U(x)|^2$.

앞에서 기술한 영상화 특성을 비교하기 위해 하나의 point object이 주어졌을 경우 PSF를 구해보면, 기존의 영상화의 경우 식 (4)와 같은 PSF를 얻지만, 그림 2(a)에서 두 렌즈가 같은 CLSM 영상화인 경우에는 전자에서 얻어진 PSF의 제곱꼴로 얻어진다. 그림 2(b)는 실선으로 기존의 영상화 시스템의 PSF와 dashed line으로 표시된 CLSM 영상화 시스템의 PSF를 보여주는 것으로 v 는 식 (4)와 같이 횡축공간주파수 (lateral spatial frequency)를 나타내는 공간좌표이다. 그림 3(b)에서 볼 수 있듯이 CLSM 출력영상의 중앙 부분의 광세기 분포 폭이 훨씬 좁고 sidelobe이 낮은 영상을 얻을 수 있어 고 해상도의 영상을 얻을 수 있게 된다. 1D인 경우 입력이 $U(x) = \delta(x)$ 이면 식 (5)와 식 (6)과 같은 출력을 얻는다.

- (4) $v = \frac{2\pi}{\lambda} r_3 \sin \alpha = \frac{2\pi}{\lambda} r_3 NA$
- (5) $I(v) = \left(\frac{J_1(v)}{v} \right)^2 = |H_s(x_s, x)|^2 = PSF$.
- (6) $I(v) = \left(\frac{J_1(v)}{v} \right)^4 = |H_s(x_s, x)H_d(x, x_d)|^2 = PSF$.

그림 3은 반경이 a 인 렌즈 aperture 또는 exit pupil을 지나 는 구형파가 수렴하면서 초점 O 부근에서 형성하는 diffraction pattern의 3D 광세기 분포를 구한다. 그림 3에서 d_2 는 파면 W의 반경으로 렌즈 aperture로부터 기하초점 (geometrical focal point) O까지의 거리, s는 점 Q로부터 출력면의 한 점 P까지의 거리, 벡터 R은 O에서 P까지의 공간벡터, q는 OQ 방향으로의 단위벡터, aperture 또는 pupil 면에서의 좌표계는 (x_p, y_p, z_p) , 출력면의 좌표계는 (x, y, z) 이다. 공간상에서 광파의 전달을 구하기 위해 Huygens-Fresnel principle을 적용하면 점 P에서의 광파의 wave amplitude는 식 (7)과 같이 표현된다. 식 (7)을 극좌표에 의해 표현하고 Bessel함수의 관계식등을 사용하여 기하초점 부근에서의 3D 광세기 분포를 구하면 식 (8)과 같이 얻어진다. 식 (8)에 있는 각 항은 식 (9)와 같이 Bessel 함수로 표현되고, I_0 는 $u=v=0$ 즉 기하초점에서의 광세기이다 [6].

- (7) $U(P) = -\frac{jA \exp^{-jkf}}{\lambda f} \int \int_w \frac{e^{jks}}{s} dS$.
- (8) $I(u, v) = \left(\frac{2}{u} \right)^2 [U_1^2(u, v) + U_2^2(u, v)] I_0$.
- (9) $U_n(u, v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{u}{v} \right)^{n+2s} J_{n+2s}(v)$
- $V_n(u, v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{v}{u} \right)^{n+2s} J_{n+2s}(v)$.
- (10) $I_0 = \left(\frac{\pi a^2 A}{\lambda^2} \right)^2$.

3D 공간에서의 광세기의 분포인 식 (8)에 focal plane에 해

당되는 $u=0$ 값을 대입하면 식 (11)이 얻어지고 2D Fourier optics 모델로부터 얻은 결과인 식 (5)와 같으며 이 값이 coherent 영상화 시스템의 PSF이 된다. CLSM인 경우 점광 원에 대한 영상화 시스템의 PSF 식 (12)와 같이 식 (11)의 제곱꼴이 된다. 또한 optical sectioning 능력을 보기 위해 광축을 따라서 나타나는 광세기를 분포를 구하는 것이 중요하다. 광축에 따른 광세기를 얻기 위해 식 (8)에 $v=0$ 를 대입하면 식 (13)과 같은 sinc 함수의 제곱으로 나타난다. 이것은 기존의 coherent imaging 시스템에서 얻은 PSF_{CH}에 해당되고, CLSM인 경우 coherent imaging 시스템에서 얻은 PSF_{COH}의 제곱인 PSF_{CONF}으로 식 (14)과 같이 얻어진다. 식 (13)와 (14)에서 0 값을 갖는 첫번째 zero point는 $u_0 = 4\pi$ 에 해당하고 식 (15)와 같이 얻어진다. 광원이 HeNe 레이저인 경우 파장 $\lambda=0.6328\mu m$, $d_2=10mm$, $a=5mm$ 일 때, $z_0=5\mu m$ 에서 첫번째 zero point가 생긴다. CLSM 영상화인 경우 zero point까지의 직경이 출력영상의 피크 (peak) 세기의 50%에서 coherent imaging 경우보다 약 1.4배 정도 향상됨을 알 수 있다.

- (11) $I(0, v) = I(v) = \left[\frac{2J_1(v)}{v} \right]^2 I_0$.
- (12) $I(0, v) = I(v) = \left[\frac{2J_1(v)}{v} \right]^4 I_0$.
- (13) $I(u, 0) = I(u) = \left(\frac{\sin u/4}{u/4} \right)^2 I_0 = PSF_{COH}$.
- (14) $I(u, 0) = I(u) = \left(\frac{\sin u/4}{u/4} \right)^4 I_0 = PSF_{CONF}$.
- (15) $u = 4\pi = \frac{2\pi a^2}{\lambda^2} z \Rightarrow z = \pm \frac{2\lambda^2}{a^2}$.

그림 4는 식 (8)에서 얻은 3D 광세기 분포를 contour map으로 표현한 것으로 상단에 있는 각 contour의 숫자는 초점면의 최대광세기 I_0 로 normalized한 광세기로 I_0 의 1%인 0.01까지 표시하였다. 가로축인 u 축은 3D 공간의 광축 방향의 공간주파수 좌표이고, v 축은 광축으로부터 radial 방향으로의 좌표이다. 또한 그림 4의 하단에 있는 영상은 상단의 광세기 분포를 256 gray levels를 가지는 영상으로 표현한 것으로 우측의 CLSM가 좌측의 기존의 영상화의 경우보다 중심부에 에너지를 집중하면서 좀더 작은 크기를 가지고 높은 해상도로 영상화할 수 있음을 보여준다. 이 그림의 u 축 및 v 축 방향으로의 세기 변화를 관찰함으로써 각 2D slice 간의 간격과 광축과 수직인 방향으로의 해상도를 분석할 수 있고, 실제 CLSM 광학 시스템의 설계 및 분석을 가능하게 해준다.

CLSM에서는 작은 핀홀 또는 aperture (e.g., 5 μm in diameter)에 의해 stray light이 차단되므로 횡축 해상도 (lateral resolution)를 높이고, numerical aperture (NA) 값이 큰 microscope objective (MO)를 사용하여 광축 해상도 (axial resolution), 즉 optical sectioning 능력을 향상시키면서 3D 영상의 질을 높일 수 있다. 그림 1(b)에서 레이저빔이 각 α 로 샘플에 입사되는 경우 $NA = \sin \alpha$ 가 되고, 보통 $NA \geq 1.0$ 인 경우 CLSM의 특성을 충분히 활용할 수 있게 된다. 해상도 (resolution limit)는 같은 밝기를 가지는 두 점을 구분할 수 있는 최소분해거리 (=d)인 Rayleigh criterion에 의해 표현된다. 종래의 incoherent microscopy인 경우 횡축 해상도는 $d = 0.61\lambda/NA$ 이고, CLSM인 경우 $d = 0.46\lambda/NA$ 로 되어 CLSM의 경우 32%가 높은 해상도를 갖는다. 여기서 λ 는 사용되는 레이저의 파장이고 NA는 numerical aperture이다. 예를 들어 $NA=1.4$ 인 objective를 사용할 때 resolution limit은 전자인 경우 $d=0.44\lambda$, 후자인 경우 $d=0.33\lambda$ 이 된다.

Optical sectioning 능력 또는 광축 해상도는 무시할 정도의 두께 (infinitely thin)를 가진 얇은 층으로부터 반사되는 빛을 측정함으로써 비교할 수 있다. 기존의 현미경에서는 optical sectioning 능력이 없으나 CLSM인 경우에는 in-focus된 층으로부터 벗어나 out-of-focus될 때 신호의 급격한 감소가 있게 되어 광축 방향으로 샘플의 층과 층을 구분하는 sectioning 능력을 가지게 된다. CLSM 반사형 모드인 경우 FWHM (full width half maximum)에 의해 표시하면 식 (16)과 같이 된다. 식 (16)에서 n은 샘플이 담겨있는 immersion medium의 굴절률 (refractive index) 이고 α 는 $NA=n\sin \alpha$ 로부터 구해진다. Fluorescence CLSM인 경우는 FWHM이 약 50% 정도 증가한다. 식 (16)의 FWHM은 dry objective인 경우 $NA=0.95$, oil immersion인 경우 $NA=1.4$ 정도의 값까지 16% 오차내에서 정확한 값을 예측해준다. 식 (15)과 (16)에서 알 수 있는 것처럼 횡축 해상도는 NA에 역비례하지만 CLSM인 경우 광축 방향으로 optical thickness는 NA에 근사적으로 역비례한다. 광축 방향으로 얇은 층으로 영상화 하기 위해서는 NA가 큰 objective 를 사용하여야 하지만, NA가 클수록 objective lens의 동작 거리 (working distance)는 감소하므로 스캔될 수 있는 샘플의 첫번째 층과 마지막 층까지의 거리 즉 최대 샘플 두께 (maximum sample thickness)가 제한된다. 실제 영상화할 때 렌즈에 의한 수차 (aberration) 를 고려해야 하는데 수차에 의해 해상도가 떨어지게 된다. CLSM인 경우 이 수차는 광축 방향으로의 분해능에 특별히 영향을 주게 된다.

$$(16) \quad FWHM = \frac{5.6\lambda}{8\pi n \sin^2(\frac{\alpha}{2})}$$

샘플로부터 얻은 신호를 받아 컴퓨터에서 2D 또는 3D 영상으로 복구하게 되는데 고해상도의 영상을 얻기 위해 샘플점 (points) 간의 거리가 충분히 짧아야 한다. Nyquist rate이 허용하는 범위에서 횡축 샘플점간 거리 δ_h 는 식 (17)와 같이 얻어진다. $\lambda=632nm$, $NA=1.3$, $M=40$ 인 경우 $\delta_h=0.06\mu m$ 이 된다. 반면에 샘플로부터 얻어지는 sections 사이의 거리 δ_z 는 식 (30)과 같이 표현된다. 예를들어 $NA=n\sin \alpha$, $\lambda=632nm$, $NA=1.3$, $n=1.5$ 인 경우 $\delta_z=0.21\mu m$ 가 된다. 식 (17)와 (18)에서 알 수 있는 것처럼 He-Ne 레이저를 광원으로 하고, 고굴절률 objective 렌즈와 샘플 슬라이드 사이에 굴절률 매칭용 oil immersion ($n=1.5$)을 사용하여 주어진 샘플을 스캔할 때 횡축 (x-y 축) 으로 $0.06 \mu m$ 간격으로, 또한 샘플의 깊이 방향인 광축 방향으로 $0.21\mu m$ 간격으로 2D 영상을 얻을 수 있게 됨을 알 수 있다.

$$(17) \quad \delta_h = \frac{\lambda}{8 NA}$$

$$(18) \quad \delta_z = \frac{\lambda}{8n\sin^2(\frac{\alpha}{2})}$$

4. CLSM 영상시각화

CLSM 광영상화에 의해 얻어진 2D slices 영상을 3D 영상 시각화 및 분석을 위해 컴퓨터에 저장한다. 대개의 경우 2D slice 만으로는 원하는 정보를 얻을 수 없으나, 얻어진 2D slices를 extended focus method (EFM), auto-focus method (AFM), surface profiling method (SPM) 방법을 활용하여 2D 영상을 재구성함으로써 기존의 microscope으로는 불가능했던 조직의 3D 관찰이 가능하다. 2D discrete domain (이산영역)에서 (i,j) 가 lateral 방향으로의 이산좌표이고 얻어진 K개의 2D slices 중에서 k번째 2D slice를 $I(i,j,k)$ 라 할 때, EFM은

식 (31)에서처럼 광축방향으로 스캔하면서 각 voxel (3D 화소 단위)의 값을 더해서 2D 영상 $I(i,j)$ 를 구한다.

AFM 방법은 식 (8)과 같이 한 횡축 위치 (x,y) 에 대해 2D slices를 광축으로 스캔하면서 최대 voxel 값으로 이루어지는 $I(i,j)$ 값을 찾는다. AFM도 EFM처럼 표면의 형상 (profile)을 동시에 기록할 수 있어 반사도와 표면높이 정보를 처리하여 스테레오 영상쌍 (stereo image pair)을 얻을 수 있다. EFM과 AFM은 육안으로 보기에 비슷한 결과를 주며 depth of focus를 크게 향상시키고 기존의 microscopy 보다 좋은 횡축 해상도를 유지한다. AFM이 EFM보다 선명도 (contrast)는 좋은 반면에 잡음 (noise)을 제거하는 필터링 효과는 EFM이 유리하다. 샘플의 표면이 완만하게 변하는 경우에는 EFM은 partially coherent imaging 특성을 보이게 된다.

SPM은 식 (8)에서 일정한 위치 (i,j) 에 대해 광축으로 스캔하면서 최대 화소값을 주는 slice의 깊이 (k) 또는 거리를 찾는다. 최대값의 깊이가 $k=1$ 이면 0으로, 깊이 $k=K$ 이면 255 (8 bits인 경우)인 gray-value로 디스플레이한다. 또한 pseudo color 기법으로 SPM에 의한 결과를 보강하기도 한다. 또한 AFM에서 얻어지는 값과 SPM에서 얻어지는 값이에 관한 정보를 함께 활용하는 isometric projection 방법도 있다.

3D로 형상학적 정보 (morphological information)를 시각화 하기 위해 CLSM 광영상화에 의해서 얻어진 2D slices를 앞에서 설명한 방법에 의해 재구성한다. 보편적인 방법으로 스테레오 시각화 방법을 사용하게 되는데, 3D stereo pair (스테레오 쌍)을 컴퓨터에서 구성하여 모니터에서 디스플레이한다.

가장 간단한 경우 pixel shifting 방법을 이용하는데 viewing angle을 중심으로 right view는 우측으로, left view는 좌측으로 1 pixel 또는 2 pixels을 이동하면서 EFM 또는 AFM 방법에 의해 좌우측 스테레오쌍을 구한다. 임의의 각도에서 스테레오쌍을 얻기 위해서는 일반적인 projection 방법을 이용하게 되는데, 임의의 각도에서 물체를 통해 기준화면에 projection 되는 스테레오쌍을 구하여 디스플레이한다.

CLSM에 의한 광영상화 예로 3T3 mouse fibroblast cell을 사용하였다. 이 세포의 S-phase에서 DNA 복제 (replication)가 진행되는 동안에 Brdu를 첨가하고 anti-Brdu antibody로 결합시킨 후 single channel에서 FITC (fluorescein isothiocyanate) (또는 Texas-red conjugated goat/sheep anti rat/mouse)로 표식 (labelling) 하여 Olympus CLSM에 의해 CLSM 영상을 얻었다. 샘플로부터 $0.5\mu m$ 간격으로 7개의 2D slices를 얻었고, 세포 샘플로부터 얻은 핵의 상단으로부터 7개의 1024×768 pixel 크기의 2D slice 영상을 얻고 이 영상들을 반으로 down sampling한 512×384 pixels의 7개 slice 영상을 얻었다. 그림 5는 상단으로부터 6개의 2D 슬라이스 영상을 보여준다. 각 영상에서 타원형의 큰 부분은 핵 (nucleus)이고 핵안의 밝은 부분은 labelling된 DNA에 해당하고, 좌측하단에 검게 나타난 부분은 인 (nucleoid)에 해당한다. 그림 6은 AFM에 의해 얻은 512×384 pixels 크기의 스테레오쌍 영상으로 상단은 left view이고 하단에 있는 영상은 right view이다. 그림 7은 lily pollen 샘플로부터 얻은 영상으로 그림 7(a)는 샘플의 상단으로부터 광축 방향으로 30개의 2D 슬라이스 영상이고, 그림 7(b)는 3D 영상들을 2D 평면으로 projection하여 얻은 영상이다.

5. 결론

3D CLSM 영상화 기술은 생체학, 광영상화, 디지털 영상처리 기술이 종합된 기술이라 할 수 있는데 관찰하고자 하는 샘플의 3D 영상시각화를 고속으로 하며, 생체 조직의 시간에 따른 기능 분석, 3D volume 측정, 조직의 내부부 3D 영상화 및 측정, 관련 3D 영상처리 알고리즘 개발이 매우 중요하다[7]. Microscopic field에서의 활용을 위한 CLSM 연구활동이 아직

미약한 상태이나 생명공학 분야 및 생체 의료 부분에서 생체 조직의 다차원 시각화 및 영상신호 분석을 통해 조직 기능의 분석을 가능하게 해 주므로 앞으로 국내에서 CLSM 영상화 연구 활동 및 활용이 크게 활성화 되리라 기대한다.

참고 문헌:

1. M. Minsky, "Microscopy Apparatus" U.S. Patent 3013467 (1961).
2. T. Wilson, *Confocal Microscopy*, London: Academic Press, 1990.
3. A. Kriete, *Visualization in Biomedical Microscopies: 3-D Imaging and Computer Applications*, VCH: New York, 1992.
4. Galvanometer scanner catalogue: General Scanning Inc., USA.
5. J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, New York: McGraw-Hill, 1968.
6. M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics*, 6th Ed., Pergamon Press: New York, 1980.
7. 이임걸, "3차원 confocal 영상화 기술 및 응용," 월간전자부품. pp. 21-35 (01/1995).

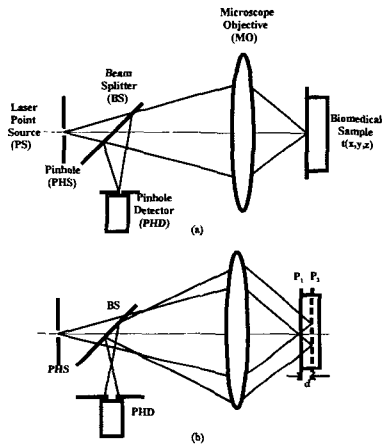


Figure 1. Schematic diagram of confocal laser scanning microscopy (CLSM): (a) basic principle; (b) optical sectioning nature which rejects lights from out of focus region.

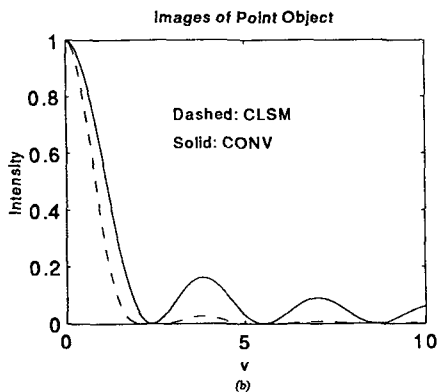
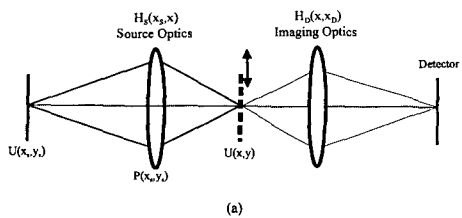


Figure 2. Two-lens imaging system and its point spread function; (a) imaging system where $H_S(x_s, x)$ and $H_I(x, x_d)$ are the impulse responses of source and imaging optics, respectively; (b) PSFs of CLSM (dashed line) and conventional imaging (solid line) systems.

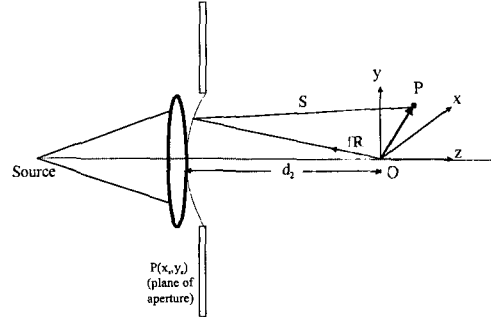


Figure 3. Diffraction imaging model to study the 3D distribution of light intensity near geometrical focus O.

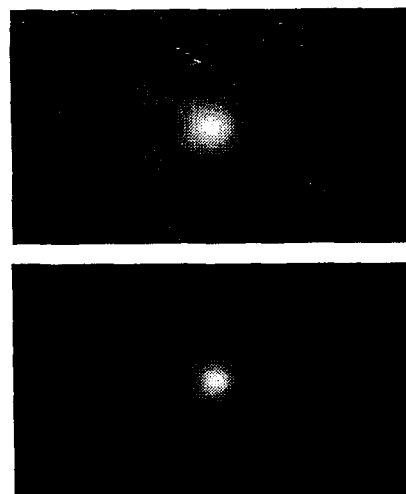


Figure 4. Image intensity (or PSF) corresponding to a point source near the focal plane: (top) contour maps for conventional and CLSM imaging; (bottom) 2D image maps.

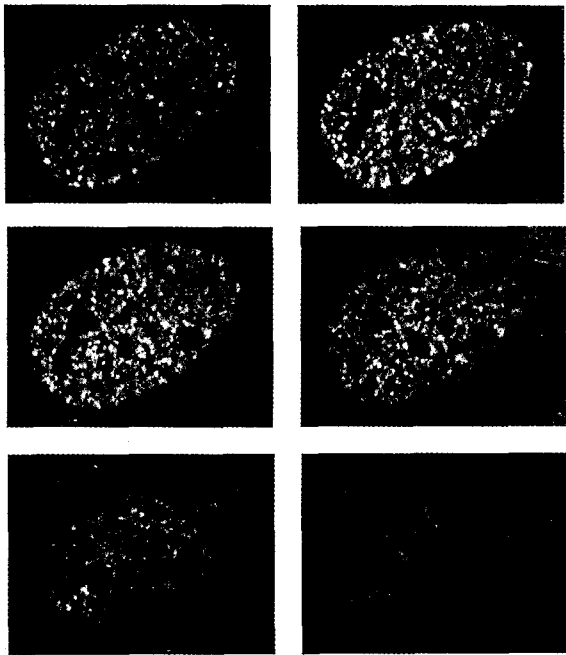


Figure 5. 2D slice images obtained by CLSM imaging where the upper left is the top slice and the lower right the bottom one.

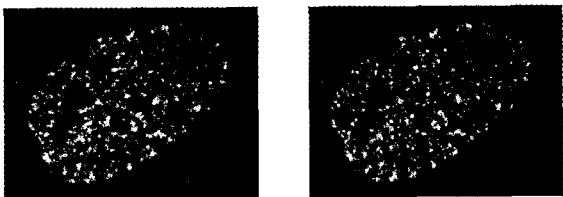


Figure 6. Left and right views of a stereo pair generated from the images in Fig. 5.

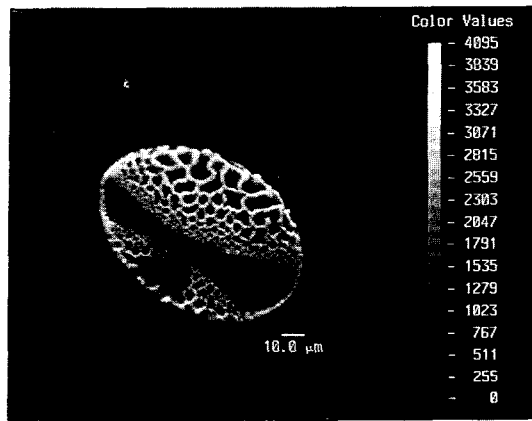
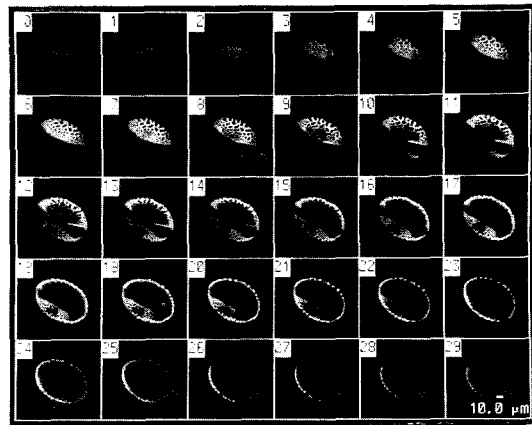


Figure 7. CLSM images obtained from lily pollen: (a) 30 slice images, each having 200x200 pixels (top); (b) 2D projection of 30 slices image in (a).