

파장 코딩된 실시간 슬릿 공초점 현미경의 설계

김정민*(한국과학기술원 기계공학과), 강동균(한국과학기술원 기계공학과),
권대갑(한국과학기술원 기계공학과)

Design of spectrally encoded real-time slit confocal microscopy

Jeongmin Kim(Mechanical Eng. Dept., KAIST), DongKyun Kang(Mechanical Eng. Dept., KAIST),
DaeGab Gweon(Mechanical Eng. Dept., KAIST)

ABSTRACT

New real-time confocal microscopy using spectral encoding technique and slit confocal aperture is proposed and designed. Spectral encoding technique, which encodes one-dimensional spatial information of a specimen in wavelength, and slit aperture make it possible to obtain two-dimensional lateral image of the specimen simultaneously at standard video rates without expensive scanning units such as polygon mirrors and galvano mirrors. The working principle and the configuration of the system are explained. The variation in axial responses for the simplified model of the system with normalized slit width is numerically analyzed based on the wave optics theory. Slit width that directly affects the depth discrimination of the system is determined by a compromise between axial resolution and signal intensity from the simulation result. On the assumption of the lateral sampling resolution of 50 nm, design variables and governing equations of the system are derived. The system is designed to have the mapping error less than the half pixel size, to be diffraction-limited and to have the maximum illumination efficiency. The designed system has the FOV of 12.8 $\mu\text{m} \times 9.6 \mu\text{m}$, the theoretical axial FWHM of 1.1 μm and the lateral magnification of $\times 367.8$.

Key Words : Confocal microscopy (공초점 현미경), Real-time (실시간), Spectral encoding (파장 코딩), Slit (슬릿)

1. 서론

공초점 현미경은 광원과 광검출기 앞에 조명 개구와 공초점 개구를 각각 두어 점광원, 점검출 역할을 하게하고 이들이 대물렌즈 초점과 공초점을 이루도록 구성되어 있다. 때문에 시편에서 대물렌즈 초점 외의 정보는 공초점 개구에서 대부분 물리적으로 차단된다. 이처럼 공초점 현미경은 초점 정보만을 검출하기 때문에 기존의 광학 현미경에 비해 광학적 분해능이 향상되고 광축 방향으로 깊이 분별력(depth discrimination)을 가진다. 따라서 시편의 내부를 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 3 차원 형상 복원 능력을 가지는데 이 때문에 세포 생물학, 생물의학 등의 생명기술(BT) 분야에서 실시간 공초점 현미경의 요구 및 응용 사례가 늘고 있다.^{1,2}

공초점 현미경에서 2 차원 이상의 정보를 얻으려면 초점을 이동시키는 주사 장치가 필요하다. 기

존의 실시간 측정이 가능한 공초점 현미경의 경우 주사 장치로 음향 광학 편향기, 다각 거울, 갈바노 거울 등을 사용하고 있는데 이 경우 시스템 구성이 복잡하고 고가이다. 또한 주사 장치의 진동으로 인해 측정 영상의 질이 저하될 수 있는 문제점이 있다. 반면에 무수한 공초점 개구가 나선형으로 배열된 Nipkow 디스크를 이용한 실시간 공초점 현미경의 경우 조명 효율이 매우 낮고 홀 간의 cross talk 때문에 분해능이 저하되는 문제점이 있다.³ 이를 해결하기 위한 한 방법으로 시편의 일차원 공간 정보를 과장으로 인코딩시키는 파장 코딩 기술을 적용한 공초점 현미경이 제안된 바 있다.⁴

본 논문에서는 기계적인 주사 장치가 없는 새로운 형태의 실시간 공초점 현미경을 제안하고 설계하는 것을 목적으로 한다. 제안된 시스템의 원리를 설명하고, 시스템의 광축 응답 특성을 시뮬레이션 하며 이로부터 제안된 시스템을 설계하기로 한다.

2. 광학 시스템의 제안 및 구성

2.1 시스템의 원리 및 특징

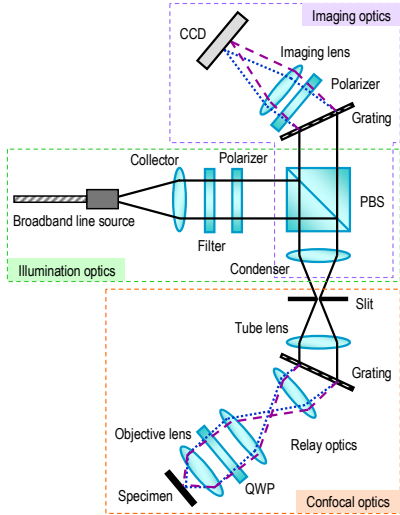


Fig. 1 Configuration of the proposed confocal microscopy

제안된 시스템의 개념도는 Fig. 1 과 같다. 공초점 개구로 편홀이 아닌 슬릿을 사용하여 시편의 일차원 공간 정보를 한 번에 획득한다. 그리고 광대역 광원과 투과형 회절격자를 이용하여 파장 코딩 기술을 구현하며 시편에서 슬릿의 폭에 해당하는 방향으로의 일차원 공간 정보를 각기 다른 파장으로 인코딩시킨다. 따라서 시편을 2 차원으로 조명하면서 슬릿의 폭에 해당하는 방향으로 공초점 효과가 발생하여 분해능이 향상된다.

제안된 시스템은 기계적인 운동부가 없으면서 직시(direct view) 기능을 가지므로 실시간 측정에 유리하다. 또한 시스템이 단순하고 소형화될 수 있으며 저가로 구현 가능하다.

2.2 시스템 구성

제안된 시스템의 구성을 크게 조명 광학계, 공초점 광학계, 결상 광학계로 나눌 수 있다.

조명 광학계는 광대역의 선광원을 제공하는데 광원은 컬렉터와 컨덴서의 초점거리 비로 슬릿 상에 축소 조명된다. 이때 빛의 편광 특성을 이용하여 슬릿을 통과하지 못하고 반사된 빛이 바로 결상 광학계에 도달하는 것을 차단시킨다.

공초점 광학계는 시편을 2 차원으로 조명하고 동시에 시편의 정보를 슬릿에서 공초점 효과를 내면서 획득하는 역할을 한다. 회절격자가 광원의 분산 및 인코딩을 담당한다. 사분파장판(QWP)은 공

초점 신호를 P 편광으로 만들어 결상 광학계에 도달할 수 있도록 한다. 고분해능을 얻기 위해 시스템의 통과대역 중심 파장을 405 nm 로하고 대물렌즈의 수치구경(NA)을 공기중에서 최대값인 0.95 로 한다.

결상 광학계는 공초점 신호를 디코딩하고 CCD 에 확대 결상하는 역할을 한다. 회절격자를 이용하여 디코딩하고, 순차주사 방식의 CCD 카메라를 이용하여 30 frames/sec 의 속도로 2 차원 영상을 획득한다. CCD 카메라의 화소(pixel) 크기는 7.4 $\mu\text{m} \times 7.4 \mu\text{m}$ 이고, 영상의 크기는 640 \times 480 이다.

3. 공초점 광학계의 파동 광학적인 분석

3.1 모델링 및 강도 점퍼집함수

공초점 광학계에서 슬릿의 폭은 광축 응답 특성에 직접적인 영향을 미치므로 이론적인 분석을 요한다. 광축 응답 특성을 시뮬레이션하려면 광학계의 모델링 및 강도 점퍼집함수(IPSF) 계산이 선행되어야한다.

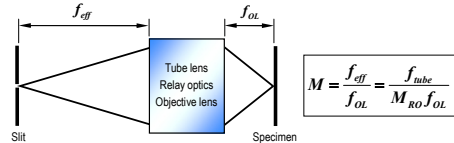


Fig. 2 An equivalent single lens model of confocal optics

빛의 편광 특성을 무시하고 중심 파장(λ_{CWL})만을 고려할 경우 공초점 광학계를 Fig. 2 와 같이 모델링할 수 있다. 모델링된 광학계의 횡배율(M)은 튜브렌즈 초점거리(f_{tube}), 중계 광학계 각배율(M_{RO}), 대물렌즈 초점거리(f_{OL})에 의해 결정된다.

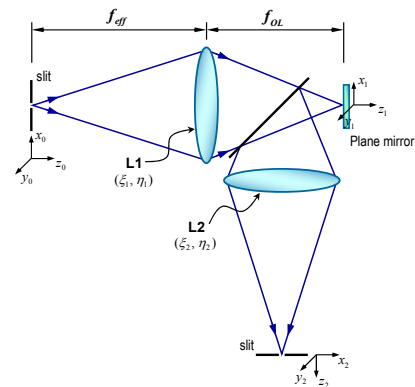


Fig. 3 Schematic diagram for axial response simulation

Fig. 3 의 렌즈 L1, L2 는 각각 빛이 입사할 때와 반사할 때에 해당한다. x_1, y_1, z_1 공간의 광학적 좌표계

(optical coordinate, (v_x, v_y, u))를 기준좌표계로 하고 프레넬 회절공식을 이용하면⁵ 회전대칭성이 있는 L1, L2의 IPSF는 (1)식과 같이 동일하게 표현된다. 여기서 $P(\xi_1, \eta_1)$ 은 정규화된 동공함수이다.

$$IPSF_{L1, L2} = \left| \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} P(\xi_1, \eta_1) e^{-\frac{i}{2}u(\xi_1^2 + \eta_1^2)} e^{i(\xi_1 v_x + \eta_1 v_y)} d\xi_1 d\eta_1 \right|^2 \quad (1)$$

3.2 광축 응답 특성 시뮬레이션

Fig. 3에서 슬릿으로 입사한 빛이 반사율 1인 평면거울에서 반사된 후 슬릿에 다시 도달했을 때의 이론적인 강도 분포는 다음과 같다.

$$I_{slit}(v_x, v_y, u) = S(v_x, v_y) \otimes_3 IPSF_{L1} \otimes_3 IPSF_{L2} \quad (2)$$

여기서 $S(v_x, v_y)$ 는 결어긋난 광원의 강도 감도(intensity sensitivity)로 조명 개구의 형상과 개구를 통과하는 빛의 강도 분포를 나타내고, \otimes_3 는 컨벌류션을 의미한다. 이때, 슬릿의 폭 역시 광학적 좌표계로 변환한 폭(v_w)을 이용하는데 실제 슬릿 폭과 다음과 같은 관계에 있다.

$$w = M \frac{\lambda_{CWL}}{2\pi NA} v_w \quad (3)$$

슬릿을 통과한 빛을 모두 더하면 (4)식과 같이 u 만의 함수로 표현되며 이는 광학계의 광축 응답 특성을 나타낸다.

$$I_{signal}(u) = \int_{-\frac{v_w}{2}}^{\frac{v_w}{2}} \int_{-\frac{v_w}{2}}^{\frac{v_w}{2}} I_{slit}(v_x, v_y, u) dv_x dv_y \quad (4)$$

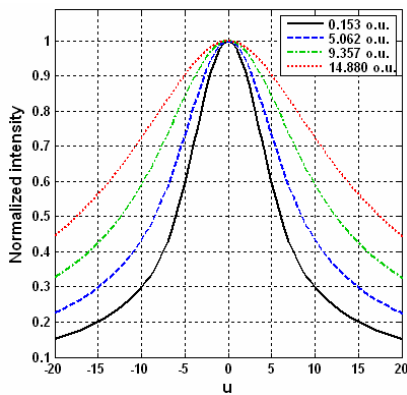


Fig. 4 Simulation result of normalized axial responses with normalized slit width

광학적 좌표계에서 슬릿의 폭을 변화시켜가며 광축 응답 곡선을 시뮬레이션한 결과는 Fig. 4와 같다.

3.3 종방향 분해능 및 신호 강도

광축 응답 곡선으로부터 슬릿 폭이 증가함에 따른 종방향 분해능 감소 및 측정 신호 강도 증가를 계산할 수 있다. (Fig. 5)

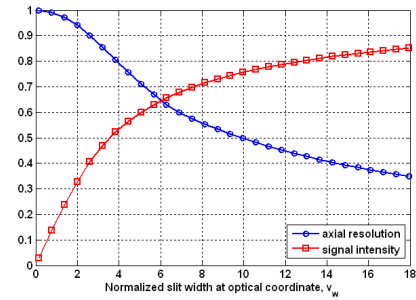


Fig. 5 Normalized axial resolution and signal intensity with normalized slit width (simulation result)

실제에서 슬릿의 폭은 분해능 감소와 신호 강도 크기의 절충으로 정해지는데⁶ 종방향 분해능이 10% 감소(FWHM = 15.507 o.u.)하고, 신호 강도 크기가 40%되는 폭($v_w = 2.61$ o.u.)을 선택한다. 이때 슬릿의 폭은 다음과 같은 관계를 만족한다.

$$w = 0.415 \frac{\lambda_{CWL}}{NA} \frac{f_{tube}}{f_{OL} M_{RO}} \quad (5)$$

4. 광학 시스템 설계

4.1 공초점, 결상 광학계 설계

Table 1 Design variables of confocal and imaging optics

Design variable	Notation
Slit width	w
Slit length	L
Tube lens focal length	f_{tube}
Full field angle caused by L and the tube lens	$\theta_{full_field_L}$
Source bandwidth	$\Delta\lambda$
Grating groove density	G
Grating diffraction angle at λ_{CWL}	θ_d
Grating dispersion angle	$\theta_{full_field_Grating}$
Relay optics angular magnification	M_{RO}
Imaging lens focal length	$f_{imaging}$

Table 1 은 공초점 및 결상 광학계의 설계 변수를 보여준다. 광학계의 샘플링 분해능을 50 nm 로 했을 때 요구되는 횡배율은 -370 이고 이를 만족시키는 지배 방정식은 다음과 같다.

- Grating dispersion angle required

$$\theta_{full_field_Grating} = \frac{\theta_{full_field_OL}}{M_{RO}} \quad (6)$$

- Field of view (FOV) matching

$$\theta_{full_field_L} = \frac{3}{4} \theta_{full_field_Grating} \quad (7)$$

- Full field angle cause by L and the tube lens

$$\theta_{full_field_L} = \frac{L}{f_{tube}} \quad (8)$$

- Diffraction angle at the center wavelength

$$\theta_d = \sin^{-1} \left(\frac{G \lambda_{CWL}}{2} \right) \quad (9)$$

- Grating dispersion angle generated

$$\theta_{full_field_Grating} = \frac{G}{\cos \theta_d} \Delta \lambda \quad (10)$$

- Imaging lens focal length required

$$f_{imaging} = \frac{4.736}{\theta_{full_field_Grating}} \quad (11)$$

설계 변수 10 개와 (5)식을 포함하여 지배 방정식 7 개를 얻었다. (9), (10)식은 회절 격자 방정식⁷으로부터 도출할 수 있다. w , G , M_{RO} 를 여분의 설계 변수로 하고 각각 값을 지정해주면 모든 설계 변수 값이 결정된다. (6), (7), (8), (11)식으로부터 슬릿 개구의 종횡비가 항상 54.26 임을 알 수 있는데 이를 만족하는 상용 슬릿은 폭이 50 μm , 길이가 3 mm 이다. 회절격자 홈밀도(G)는 2400 lines/mm로 한다. M_{RO} 값은 다음에 정의되는 사상(mapping) 오차 기준으로 선정한다.

제안된 광학계에서 요구되는 횡배율은 -370 으로 일정하지만 실제 광학계는 FOV 내의 위치나 파장에 따라 횡배율이 변화하므로 시편 평면의 한 지점이 CCD 이미지 센서에서 검출될 때는 의도하지 않은 화소에서 검출될 수 있다. 때문에 FOV 내의 모든 지점에 대해 CCD 면에서의 이상적인 결상 위치와 실제 결상 위치와의 거리 오차 중 최대치를 사상 오차로 정의하고, 이 값이 화소 크기의 반 이

하가 되도록 한다. ZEMAX 를 이용하여 몇 가지 M_{RO} 값에 대해 사상 오차를 구하였다. (Fig. 6) 이때 각 요소품 간의 거리는 RMS 파면 수차를 최소화 하는 거리들로 최적화되었다. 사상 오차 시뮬레이션 결과로부터 M_{RO} 값을 0.19 로 하며, 이때 광학계는 회절 한계 성능을 가진다. (Fig. 7) Table 2 는 선정된 설계 변수 값들을 정리한 것이다.

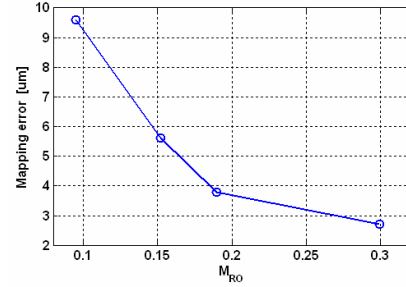


Fig. 6 Simulated mapping error variations with M_{RO}

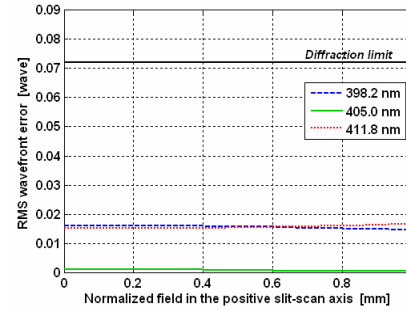


Fig. 7 Diffraction-limited performance at $M_{RO} = 0.19$

Table 2 Designed values of confocal and imaging optics

Design variable	Value
w	50 μm
L	2.713 mm
f_{tube}	100 mm
$\theta_{full_field_L}$	1.607°
$\Delta \lambda$	13.62 nm
G	2400 lines/mm
θ_d	29.1°
$\theta_{full_field_Grating}$	2.143°
M_{RO}	0.19 (= 19 mm/100 mm)
$f_{imaging}$	125 mm

4.2 조명 광학계 설계

조명 광학계에서는 크기가 200 $\mu\text{m} \times 20$ mm 이고 시야각이 $\pm 20^\circ$ 인 선광원이 50 $\mu\text{m} \times 2.713$ mm 인 슬

릿에 최대한 많은 광량을 통과시키는 컬렉터 초점 거리를 찾아야한다. 조명 효율을 (11)식과 같이 정의하고 광선 추적(ray tracing)법을 이용하여 조명 효율을 시뮬레이션해본 결과 초점거리가 150 mm 일 때 조명 효율이 0.7%로 가장 높았다. 이는 컬렉터 초점 거리가 150 mm 보다 짧으면 선광원의 축소율이 충분하지 않아서 슬릿을 통과하지 못하는 빛이 많아지고, 150 mm 보다 길면 비네팅(vignetting)에 의한 광손실이 많아지기 때문이다.

$$\text{Illumination efficiency} = \frac{\text{rays detected}}{\text{all rays launched}} \times 100 \quad (11)$$

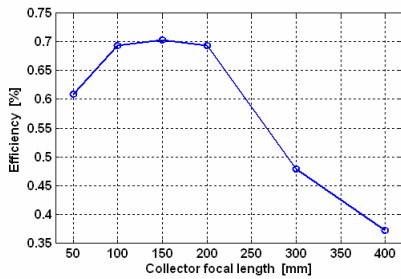


Fig. 8 Maximum illumination efficiency at the collector focal length of 150 mm (simulation result)

설계된 광학계의 요소품 간 거리는 Fig. 9 와 같다.

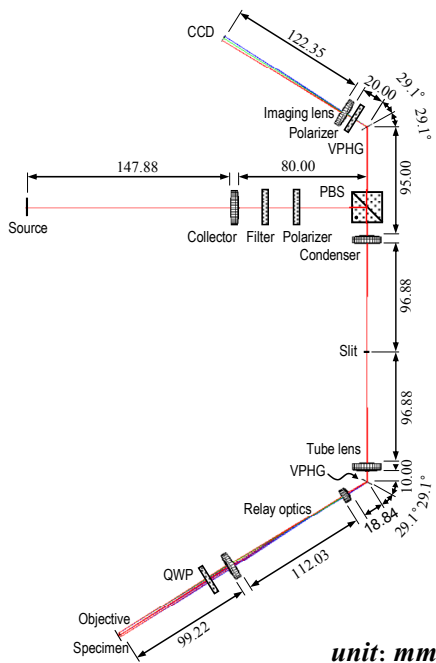


Fig. 9 Designed geometry of the proposed system

5. 결론

과장 코딩 기술과 슬릿 개구를 이용한 공초점 현미경은 주사 장치에 의한 측정 속도의 제약이 없기 때문에 실시간 영상을 얻기 위한 좋은 방법이 될 수 있다. 뿐만 아니라 그러한 시스템은 저가로 구현 가능하고 소형화될 수 있다는 장점이 있다.

제안된 시스템의 성능에 가장 중요한 영향을 미치는 인자는 슬릿의 폭과 사상 오차이다. 본 논문에서는 시스템의 설계 기준으로 슬릿의 폭을 정규화된 종방향 분해능이 10% 감소하고 신호 강도 값이 40%가 되는 폭으로 하였고, 사상 오차 값이 CCD 화소 크기의 반이 되도록 하였다.

설계된 시스템은 회절 한계 성능을 갖고, 이론적인 종방향 FWHM 이 1.1 μm 이다. FOV 는 12.8 μm \times 9.6 μm 이고, 황배율은 -367.816 이다.

후 기

본 연구는 산업자원부와 한국산업기술재단에서 시행한 지역전략산업 석박사 연구인력 양성사업의 연구비 지원으로 수행되었으며 관계자 분들께 감사드립니다.

참고문헌

1. T. Wilson, B. R. Masters, "Confocal microscopy", Appl. Opt., Vol. 33, pp. 565 - 566, 1994.
2. I. Krohne, T. Pfeifer, F. Bitte, M. Zacher, R. Meier, "New method for confocal microscopy and its endoscopic application", Novel optical instrumentation for biomedical applications, Vol. 2003, pp. 281 - 288, 2003.
3. J. B. Pawley, "Handbook of biological confocal microscopy", 2nd ed., Plenum, 1995
4. G. J. Tearney, M. Shishkov, B. E. Bouma, "Spectrally encoded miniature endoscopy", Opt. Lett., Vol. 27, pp. 412 - 414, 2002
5. Min Gu, "Principle of three-dimensional imaging in confocal microscopy", World Scientific, 1996
6. C. J. R. Sheppard, D. M. Shotton, "Confocal Laser Scanning Microscopy", BIOS scientific, 1997
7. J. W. Goodman, "Introduction to Fourier Optics", 3rd ed., Roberts & Company, 2005