

회전원판식 공초점 현미경의 구성과 광학특성*

신은성 · 남기봉

한림대학교 물리학과, 이화학 학제간 연구센터

(1997년 2월 13일 받음)

본 연구에서는, Nipkow 원판을 사용하는 공초점 현미경을 구성하여 시료의 2차원 영상을 얻었으며, 이들을 간단한 알고리즘으로 연결하여 표면의 3차원 영상을 얻었다. 마이크로 필름으로 제작한 Nipkow 원판의 적절한 경로로 통과하는 빛의 투과율은 0.5% 정도였으며, 따라서 반사율이 높은 물체만을 관찰할 수 있었다. 광원으로는 파장 692.7 nm의 반도체 레이저를 사용하였다. 구성된 현미경으로 전산기용 기억소자 칩 표면에 식각된 회로의 깊이와 거칠기를 관찰할 수 있었다. 재생전용 compact disk(CD)도 표면의 보호막을 제거하였을 때 표면에 있는 pit들의 배열 구조가 관찰되었다.

I. 서 론

공초점 현미경(confocal microscopy)은, 시료를 물리적으로 절단하지 않고도 시료의 단면 및 3차원 영상을 얻을 수 있는 기술중의 하나로, Minsky^[1]가 1957년에 고안하였다. 그 원리는, 초점이 맺히는 면의 정보만을 선별하여 2차원 영상을 만들고, 이렇게 만든 2차원 영상들을 연결하여 3차원의 영상을 얻는 것이다. 칼로 자르지 않고도 시료내 임의 단면을 관찰할 수 있기 때문에, 이 기술을 optical sectioning이라 한다. 이 방법을 이용하면, 빛이 투과하는 시료는 시료 내부의 영상을 얻을 수 있고, 투과하지 못하는 시료라 하더라도 시료표면의 거칠기와 깊이를 관찰할 수 있다.

공초점 현미경은, 시료를 3차원으로 움직이며 정보를 얻는 stage scanning^[2,6], 거울로 입사광을 움직이며 정보를 얻는 beam scanning^[6-12], 회전원판(spining disk)이라는 공간필터를 사용하는 회전원판 기법^[13-16], 마이크로렌즈 사용법 등의 네 종류로 나눌 수 있다. 본 연구에서는 물체의 입체영상을 얻기 위한 용도로 사용할 공초점 현미경을 구성하고자 하였으며, 이들 공초점 현미경의 여러 가지 유형중 실시간 영상관찰이 가능한 회전원판식 중 단주사(monoscan)방식^[17-20]의 현미경을 설계, 구현하였다.

II. 공초점 현미경

공초점 현미경은 그림 1에 보인바와 같은 구조로 이루어진다. 보통의 광학현미경과 크게 다르지 않으나, 광검출기에 도착하는 빛이 직경 20~60 μm 의 바늘구멍(공간필터)을 거치는 점이 주요 차이점이다. 물론 이 경우 검출기에 나타나는 신호는 시료의 한 점에 해당하므로, 2차원적인 영상을 얻고자 하면 시료를 좌우전후로 이동시키고 이 이동신호와 영상신호를 전산알고리즘을 이용하여 합성하여야 한다. 시

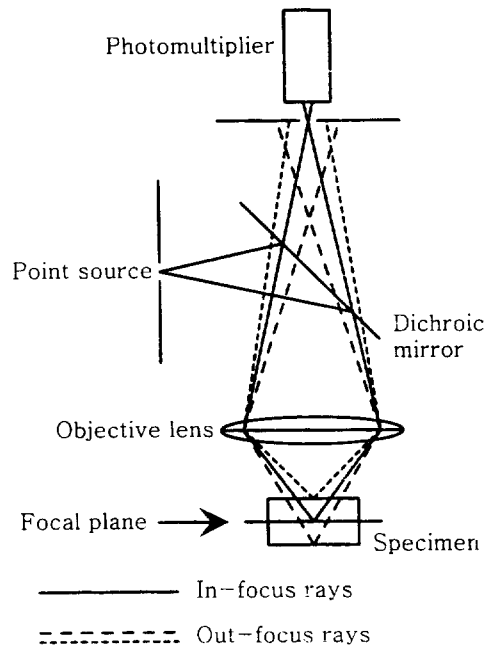


그림 1. 공초점 현미경의 원리.

료를 이동시키며 점대점(point-to-point)방식으로 신호를 기록하여야 하므로 영상을 도출할 때까지 소요되는 시간이 긴 특징이 있다.

이런 방식에 비하여 회전원판형 공초점 현미경은 CCD검출기와 원판에 배열된 바늘구멍들을 이용, 영상을 실시간으로 입력할 수 있는 장점을 가지고 있다. 이 원판, 즉 Nipkow 원판에는 일정한 패턴으로 구멍들이 있어, 이상적으로는 구멍 이외의 부분에서는 빛의 투과율 0%를 유지하여야 한다. 본 연구에서는 이상적인 성능은 아니지만 실험적으로 구현가능한 Nipkow 원판을 제작하고 이를 이용한 현미경을 구성하였다.

2.1. Nipkow 원판

Nipkow 원판상의 구멍은 한바퀴 회전하면서 시료의 초점면상 회전궤적에 대응하는 점들의 반사광을 CCD로 전달하

*본 논문은 1996년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

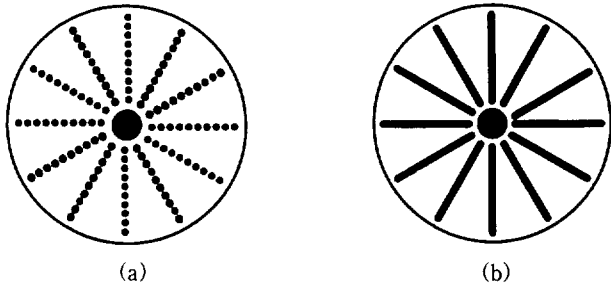


그림 2. 회전원판의 구조.

는 기능을 수행한다. 구멍들은 시료상에 그 궤적이 지나치게 중복되지 않도록 크기와 위치를 지정하여야 한다. 본 연구에서는 이에 준하는 원판모형을 Autocad로 작성하여 이를 마이크로 필름에 전사시키는 방식을 채택하였다. 그러나 제작된 원판의 신호광 투과율이 지나치게 낮았으며, 필름재질의 평편도(flatness)도 만족한 수준을 유지할 수 없어 적절한 영상을 얻을 수 없었다.

차선으로 바늘구멍대신 이들을 연결하는 직선을 세극(slits)으로 대체한 모델을 채택하였다. 이 모델은 그림 2 (b)에 보인 바와 같이 그림 2 (a)를 변형한 것으로, 방사방향의 영상 해상력 저하를 감수하여야 하지만, 바늘구멍방식보다 낮은 평편도에서도 영상을 얻을 수 있음을 알았다. 제작된 원판의 직경은 32 mm이고, 선(line)의 길이는 6 mm정도, 선폭은 30 μm , 선의 수는 30개(빛이 투과하는 면적은 디스크 총면적의 1.5%에 해당함)였다.

마이크로 필름은 입자의 입도가 높고 명암대비율이 높아 Nipkow 원판의 재료로 선택되기는 하였지만 검은색 부분의 투과도가 5% 정도로 추산되었다. 원판의 신호광 세기가 면적 비로 보아 1.5% 인 점을 고려하면, 원판의 검은색 부분(총 면적의 98.5%)을 지나오는 투과광은 허용수준을 지나치게 초과하고 있다. 실험에서는 이들 원판 2장을 겹침으로서 투과광량(DC 성분)을 적절한 수준으로 낮출 수 있었다. 이 과정에서 슬릿 일부분이 겹쳐져 실제 신호광량은 입사광량의 0.5% 수준으로 저하되었다.

2.2. 현미경의 구성

그림 3은 본 실험의 개략적인 실험장치 설비도이다. 대물렌즈의 수차를 무시할 수 있는 경우라면 공초점 현미경의 성능

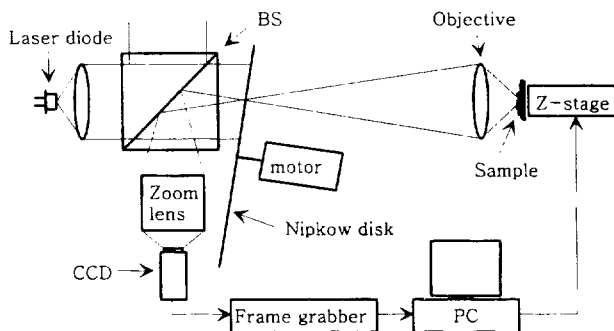


그림 3. 공초점 현미경의 설비도.

을 결정하는 초점의 크기는 입사광의 파장과 $f\#$ 에 의하여 결정된다. 그러나 실제로는 대물렌즈의 수차에 의한 효과를 무시할 수 없고, 그 중에서도 색수차에 의한 효과를 최소화 하기 위해서는 단색광의 광원이 요구된다. 백색광원을 필터로 선광하면 그 밝기가 크게 저하하므로, 단색광에 가까우면서도 휘도가 큰 광원으로 본 연구에서는 출력 20 mW, 파장 692.7 nm의 반도체 레이저를 사용하였다.

빛살가르개 (beam splitter)를 지나온 평행광은 회전하는 Nipkow 원판에 입사되는데, 이중 소량(0.5%)의 빛만이 세극을 통과하여 대물렌즈에 입사된다. 입사된 빛은 시료에 의해 반사되어 다시 Nipkow 원판으로 향한다. 그들 중 초점 면에서 반사된 빛만이 원판의 세극을 통과하게 되고, 통과한 빛은 줌렌즈를 통과하여 CCD 카메라에 도착한다. 이 과정에서 대물렌즈에 의해 확대된 시료의 영상은 Nipkow 원판면에 맺히고, 카메라는 줌렌즈를 통하여 원판면에 맺힌 시료의 확대된 상을 다시 확대하여 보게 된다. Nipkow 원판을 2400 rpm 이상의 속도로 회전시키면 시료의 초점 면을 바로 video monitor로 관찰할 수 있는데, 본 실험에서는 원시력에 의하여 원판이 평면을 유지하는 효과를 얻기 위하여 10,000 rpm 이상의 속도를 유지하였다.

시료는 z축 방향으로 일정한 간격으로 이동하도록 하였으며, 각 z 좌표점의 2차원 영상들을 모두 저장매질에 저장한 뒤 표면검색 알고리즘을 시행하였다. 이 과정에서는 검색 대상 영상의 2차원 데이터를 다음 영상의 2차원 데이터와 비교하게 되는데, 같은 x축과 y축 값을 갖는 점들의 밝기들을 z축값에 따라 비교하고, 이들 중 가장 높은 grey value를 갖는 영상의 z축 값을 시료의 표면점으로 지정하였다. 이 방법은 불투명시료에 대하여 적용할 수 있는 기법이며, 표면이 공초점 기하구조의 초점에 있을 때 가장 많은 양의 반사광이 Nipkow 원판의 세극을 통과한다는 원리를 이용한 것이다.

프레임 그래버가 받아들일 수 있는 총 512×512 픽셀 중에서 중심부의 128×128 픽셀만을 택하여 저장하였다. compact disk 상의 트랙과 트랙사이의 거리(문헌에 의하면 1.6 μm)를 관찰하여 기준으로 택했을때, 배율 40배의 대물렌즈를 사용할 경우, 한 pixel은 시료면의 가로 0.12 μm ×세로 0.12 μm 영역의 밝기를 측정할 값이 되고, 받아들이는 데이터 영역(128 픽셀×128 픽셀)은 시료의 표면 중 약 15.36 μm ×15.36 μm 에 해당된다. 이 장치에서 얻을 수 있는 최소 voxel의 크기는 0.12 μm ×0.12 μm ×0.156 μm 였다.

III. 결과 및 고찰

첫번째 시료로는 IBM 286 컴퓨터용 ROM 칩을 선택하였다. ROM 칩의 실제 회로부분은 약 3 mm×3 mm 크기를 가진다. 보호용 덮개 유리를 제거하고 회로 부분을 떼어내어 시료로 사용하였으며, 그림 4는 보통의 광학 현미경으로 얻은 사진이다. 시료의 제일 위에는 울퉁불퉁한 표면의 회로가 있고, 이 회로사이로 아래의 바닥층이 보인다.

그림 5는 z 방향으로 이동하면서 얻은 260장의 2차원 영상

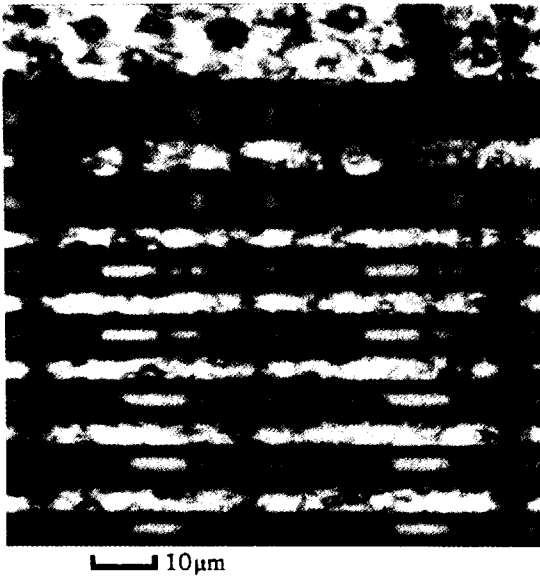


그림 4. 광학 현미경을 통해 본 ROM 칩의 표면.

들을 이용하여 만든 이 시료의 3차원 영상이다. 여기에서 매끈하게 나타나는 부분이 회로의 식각되지 않은 최상위 부분에 해당하는 평면이며, 수많은 작은 피크(peak)들이 포함되어 있는 부분은 바닥층에 해당한다. 이 부분은 사실상 적절한 결과가 나타나지 않고 있음을 볼 수 있는데, 이 골짜기의 중심부분은 평균적으로 낮은 위치에 있음이 관찰되나 회로의 경계면 근처에서 위치결정의 오차가 크게 도출되는 특이점이 관찰된다.

그림 6은 그림 5의 데이터를 골의 방향으로 높이값들을 평균한 것이다. 그림에 보이는 네곳의 높은 부분은 배경신호보다 확연히 높게 나타나서 물리적인 의미가 있는 높이값이라고 단정할 수 있다. 그림 5의 회로벽 경계면 근처에 해당되는 부분의 평균치는 그림 6에서 배경신호정도의 낮은값들로 관

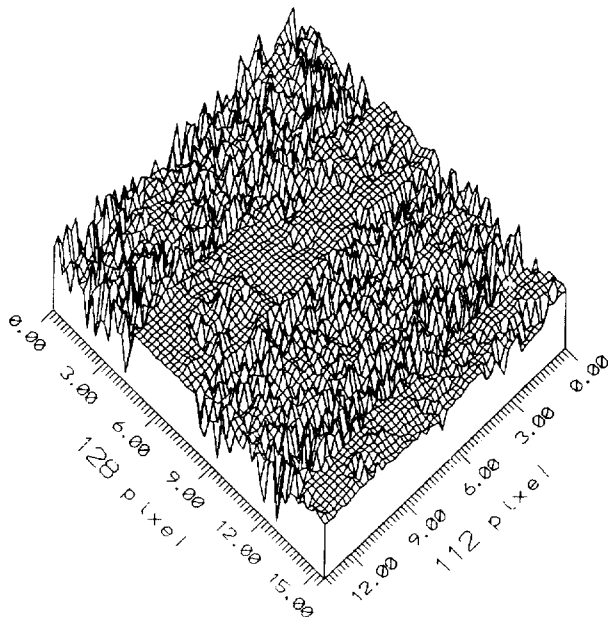


그림 5. ROM 칩의 3차원 공초점 영상 (단위 : μm).

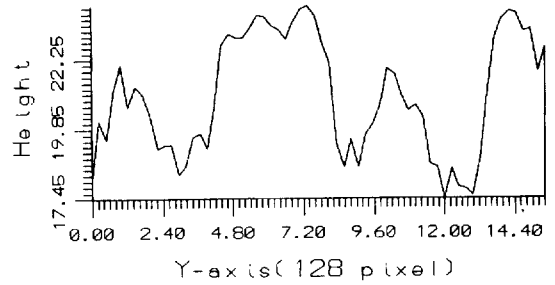


그림 6. 그림 5에서 골의 방향으로 구한 평균치 그래프 (단위 : μm).

찰된다. 그림 6이 112개 화소의 신호값을 평균한 결과임을 고려한다면 우리는 이 112개의 화소값들이 무작위(random) 값들을 가지기 때문이라고 가정할 수 있다. 무작위수들의 평균값은 0이다. 이 현상의 물리적 해석은 다음과 같다.

시료에 초점이 형성될때는 대물렌즈에서 초점을 향하여 빛이 원추형으로 진행한다. 초점이 시료 최 상위면에 위치할 경우는 이 빛의 cone이 100% 신호 발생에 사용된다. 이와 달리 칩의 바닥부분은 주위에 회로의 벽(식각된 3차원 구조물)이 위치하고 있으므로, 바닥의 초점을 향해 진행되는 빛 cone의 일부가 이 구조물에 의하여 차단된다. 그뿐더러 이 부위의 초점에서 반사된 빛의 cone도 역시 일부가 가려지므로 신호광을 더욱 약화시킨다. 신호광량이 작아지면 신호대 잡음비가 1이 되는 수준이 되면, 그 지점에 해당하는 최대밝기의 z좌표는 측정대역내에서 무작위(random)로 결정된다. 바닥을 이루는 골짜기의 중심부는 가장자리보다 이 차폐효과가 상대적으로 적기 때문에 나름대로 안정된 위치좌표가 얻어짐을 그림 5와 6에서 확인할 수 있다. 그러나 바닥(골짜기)에서 회로의 벽에 가까이 갈수록 그 z점에 이런 무작위 과정에 의하여 선정되어, 임의 높이의 피크가 분포되며 따라서 그 평균치가 배경신호 정도로 저하하는 것이다.

두번째 시료로 compact disk(CD)를 사용하였다. CD의 구조를 살펴보면, 직경 120 mm, 두께 1.2 mm의 투명 플라스틱(폴리카보네이트)의 원판위에 두께 200 μm의 알루미늄막이 증착되어 있는데, 이 알루미늄막에 깊이 0.12 mm정도의 pit들이 파여져 있다.

그림 7은 투명 플라스틱 보호막을 제거한 시료 표면의 현미경 영상이다. 초점이 맞은 표면은 밝게 나타나고 초점면 보다 낮은 pit의 바닥은 어둡게 나타난다. 트랙과 트랙 사이의 간격이 일정함을 볼 수 있고 pit의 형태를 짐작할 수 있다. 시료의 pit부분은 그림 8에 보이는 것과 같이, 실제 폭 0.6 μm, 깊이 0.12 μm, 길이 0.9-3.3 μm의 아주 작은 크기를 가지고 있다. 사용한 대물렌즈(배율 40배, NA=0.65)가 맺는 초점의 직경은 회절한계일 경우 1.3 μm 정도로 계산된다. 그러므로 이 렌즈로는 CD pit의 내부를 관찰할 수는 없음을 알 수 있다.

그림 9는 시료의 표면 주위의 112×128×35개의 voxel 부분을 scan하여 3차원으로 구성한 것이다. 본 실험 장치에서 한 voxel의 크기는 0.12 μm×0.12 μm×0.156 μm이므로, 실제 scan한 부분의 부피는 약 13.44 μm×15.36 μm×5.46 μm이다. 한 선과 다음 선의 간격은 두 pixel 이다. 시료의 표면위에 pit로 판단되는 홈들의 트랙을 따라 배열되어 있다. pit의 폭은 우

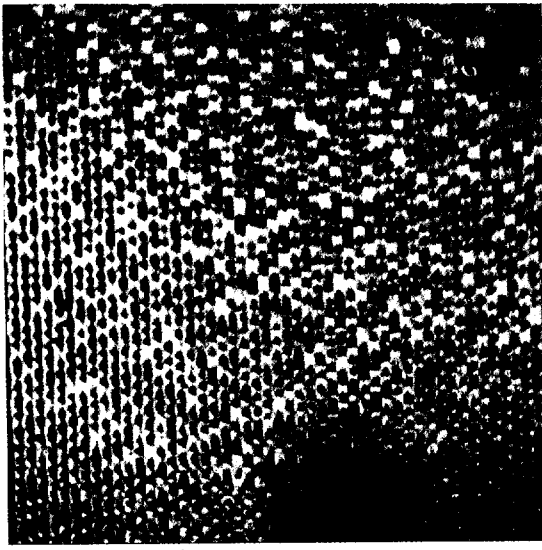


그림 7. compact disk 표면의 광학 현미경 사진.

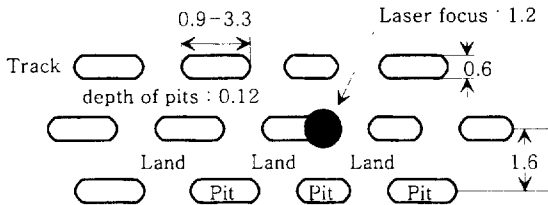


그림 8. compact disk 표면의 pit 배열 (단위 : μm).

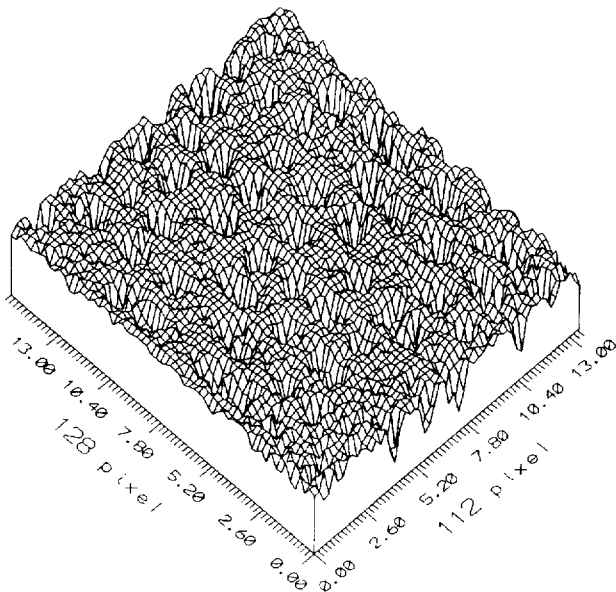


그림 9. compact disk 표면의 3차원 공초점 영상 (단위 : μm).

리가 알고 있는 크기인 $0.6 \mu\text{m}$ 보다 큰 $1.2 \mu\text{m}$ 정도로 측정되었다. 이 결과는 초점의 크기와 pit폭의 함수를 역상관(convolution)하는 모델로 설명이 될 수 있었다. 초점의 직경은 $1.3 \mu\text{m}$ 이지만 어림잡아 유효초점직경 $0.6 \mu\text{m}$, 외부의 빛들은 noise 수준에 해당한다고 가정하자(실제로 Nipkow 원판의 어두

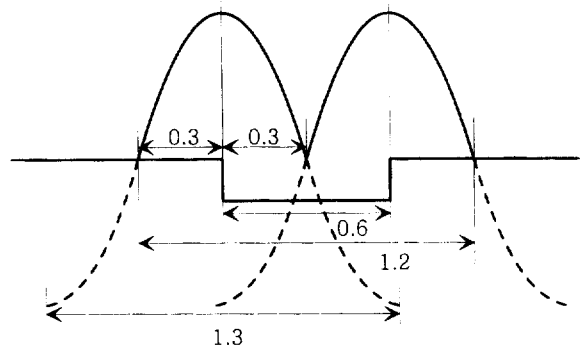


그림 10. 초점의 크기와 pit 폭의 함수를 역상관(convolution)하는 모델 (단위 : μm). pit의 넓이가 $1.2 \mu\text{m}$ 정도로 나타날 것이 예상된다.

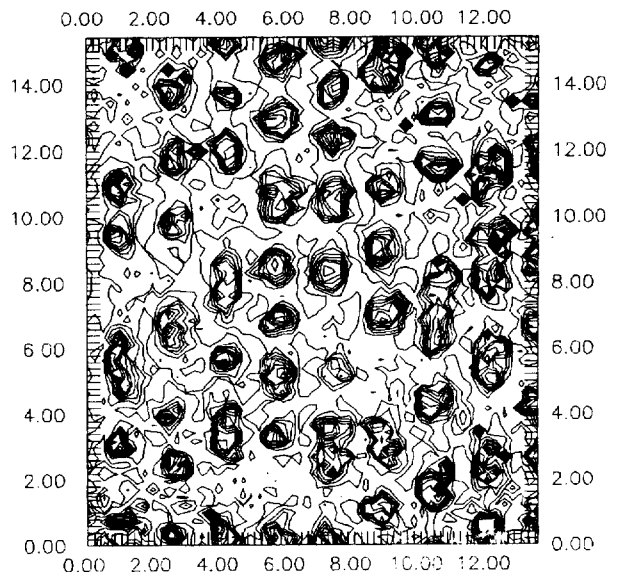


그림 11. compact disk 표면의 지형도 (단위 : μm).

운 부분을 통과한 빛의 세기정도). 이 직경의 빛이 폭이 $0.6 \mu\text{m}$ 인 pit와 역상관시키면 전체적으로 $1.8 \mu\text{m}$ 넓이의 상관결과가 얻어질 것이다. 이 중 초점함수의 절반 이상이 pit와 역상관하는 부분만이 의미있는 신호로 측정된다고 할 때 상관관계가 있는 범위는 $1.2 \mu\text{m}$ 로 산출된다. 그림 10에 이 과정을 보였다. 그림 11은 CD 표면의 높이에 따른 지형도로서 pit들의 크기와 모양을 조금 더 자세히 관찰할 수 있다.

일반적으로 공초점 현미경은 처리하여야 하는 자료의 양이 방대하여 실시간 측정이 어려운 것이 그 특징이다. 본 연구에서도 CD시료의 경우 35장의 2차원 영상을 읽어들이고 이를 이용하여 3차원 표면정보를 추출하는 과정에 40초 정도의 시간이 소요되었다. 실제로 시료의 3차원 정보를 얻는데 소요되는 시간은 사용하는 2차원 영상의 수에 비례하여 증가한다.

IV. 결 론

본 실험에서는 반도체 레이저를 이용한 단주사 방식의 회전원판식 공초점 현미경을 구성하여 2차원의 공초점 영상들

을 얻었으며, 이들로부터 시료의 3차원 형태를 재생하였다. 이것으로 일반 현미경으로는 관찰하기 힘든 시료면의 거칠기와 깊이를 제한된 범위내에서 관찰하였다 : 40배 대물렌즈를 사용하였을 경우 수평방향 0.6 μm , 수직방향 0.3 μm 의 물체들을 분리해 볼 수 있었다.

구성된 공초점 현미경의 성능은 광학소자에 의한 회절한계 외에도 Nipkow 원판의 특성에 의하여 영향이 나타나는 것이 관찰되었다. 성능향상을 위해서는 신호광의 광량을 늘리는 것이 급선무이며, 이는 광원의 출력을 올리는 것 만으로는 해결할 수 없고-배경신호도 커질 수 있기 때문에-Nipkow 원판에서 세극이외의 부분으로 투과하는 빛의 량을 최소화 할 수 있는 재질과 기법을 채택하여야만 해결이 가능할 것으로 판단된다. 아울러 CD시료에서 관찰된 바와 같은 역상관 영상을 deconvolution처리하여 시료 원래의 모습에더 가까운 영상을 얻을 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

[1] Minsky, M., U. S. Pat. 3,013,467 (1957).
 [2] Sheppard, C. J. R. and Choudhury, A. Opt. Acta **24**, 1051-1073 (1977).
 [3] Brakenhoff, G. J. J. Microsc. (Oxford) **117**, 233-242 (1979)
 [4] Wilson, T. and Sheppard, C. J. R. *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy*. Academic Press, New York. (1984).
 [5] Wijnaendts van Resandt, R. W., Marsman, H. J. B., Kaplan, R., Davoust, J., Stelzer, E. H. K. and Stricker, R. J. Microsc. (Oxford) **138**, 29-34 (1985).
 [6] Shotton, D. M. J. Cell Sci. **94**, 175-206 (1989).
 [7] Carlsson, K., Danielsson, P. E., Lenz, R., Liljeborg, A.,

Majlog, L. and Aslund, N. Opt. Lett. **10**, 53-55 (1985).
 [8] Wilke, V. Scanning **7**, 88-96 (1985).
 [9] White, J. G., Amos, W. B. and Fordham, M. J. Cell Biol. **105**, 41-48 (1987).
 [10] Gratton, E. and van de Ven, M. J. In *The Handbook of Biological Confocal Microscopy* (J. Pawley, ed.), pp. 47-59. IMR Press, Madison, Wisconsin. (1989).
 [11] Tsien, R. Y. and Waggoner, eA. In *The Handbook of Biological Confocal Microscopy* (J. Pawley, ed.), pp. 153-161. IMR Press, Madison, Wisconsin. (1989).
 [12] Haugland, R. P. In *Optical Microscopy for Biology* (B. Herman and K. Jacobson, eds.), pp. 143-157. Alan R. Liss, New York. (1990).
 [13] Paddock, S. W. J. Cell Sci. **93**, 143-146 (1989).
 [14] Wright, S. J., Walker, J. S., Schatten, H., Simerly, C., McCarthy, J. J. and Schatten, G. J. Cell Sci. **94**, 617-624 (1989).
 [15] Boyde, A., Jones, S. J., Taylor, M. L., Wolfe, A. and Watson, T. F. J. Microsc. (Oxford) **157**, 39-49 (1990).
 [16] Wright, S. J., Schatten, H., Simerly, C. and Schatten, G. In *Optical Microscopy for Biology* (B. Herman and K. Jacobson, eds.), pp. 29-43. Alan R. Liss, New York. (1990).
 [17] Xiao, G. Q. and Kino, G. S. Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng. **809**, 107-113 (1987).
 [18] Xiao, G. Q., Corle, T. R. and Kino, G. S. Appl. Phys. Lett. **53**, 716-718 (1988).
 [19] Kino, G. S. In *The Handbook of Biological Confocal Microscopy* (J. Pawley, ed.), PP. 92-97. IMR Press, Madison, Wisconsin. (1989)
 [20] Lichman, J. W., Sunderland, W. J. and Wilkinson, R. S. New Biol. **1**, 75-82 (1989).

Fabrication and studies on the properties of a spinning-disk confocal microscope

Eun S. Shin and Kie B. Nahm

Dept. of Physics and Interdisciplinary Research Center, Hallym University,
 Chunchon 200-702, Korea

(Received : February 13, 1997)

In this paper, the result of a performance study of a home-built spinning disk type confocal microscope is presented. The confocal microscope was fabricated with a Nipkow disk made of the microfilm. The throughput of the disk was 0.5%, allowing the observation of specimen with higher reflectivities only. A laser diode at 692.7 nm was used as the light source. The topographic structures of a PC ROM and the CD ROM were observed with sufficient reliability, while the effect of the convolution of the beam size with the finite object size was found dominant. Also the shadowing effect by the etched pattern was observed.