

## 공초점 광학현미경에서의 side-lobe 감소방안에 대한 연구

김억봉 · 류재연 · 최치규 · 김두철<sup>†</sup> · 유영훈

제주대학교 물리학과, 기초과학연구소

Ⓣ 690-756 제주도 제주시 아라1동 1번지

(2001년 5월 22일 받음, 2001년 8월 20일 수정본 받음)

공초점 현미경에서 광축 방향의 상을 얻을 때 잡음으로 작용하는 side-lobe의 영향을 조사하였다. 이러한 side-lobe는 Herschel 조건을 만족시킴으로써 최소화시킬 수 있다. 본 연구에서는 side-lobe에 대한 영향을 전산 시뮬레이션하였고, 이 결과를 실험에 적용하여 Herschel 조건에 의해 위상 보정을 함으로써 side-lobe가 최소화됨을 확인하였다.

분류코드 : FO.050, SM.020.

### I. 서 론

현재 광학 현미경은 매우 광범위한 자연과학 영역에서 이용되고 있다. 현재 생명과학분야에 대한 연구가 활발해지고 있는 추세에서 살아있는 세포의 2차원 및 3차원 구조를 조사하는 것은 매우 중요하다.

시료의 3차원적인 구조를 보기 위해서는 전자현미경인 TEM(tunneling electron microscope)과 AFM(atomic force microscope) 등이 사용되고 있지만, 이들은 매우 고가이며, 투과성인 막의 아래층을 볼 수가 없다는 단점이 있다. 특히 세포에 전자를 조사하는 경우에는 세포들이 손상을 입기 때문에 살아 있는 세포를 조사하거나 연구하는 데는 적절치 못한 방법이다. 이를 극복하기 위하여, 광학적인 방법으로 3차원을 관찰할 수 있는 공초점 광학현미경(confocal microscope)이 제안되어,<sup>[1]</sup> 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>[2-9]</sup> 공초점 현미경의 원리는 1975년 Minsky에 의하여 보고되었으며, 1976년 Egger와 Petran은 이 방법을 사용해서 염색되지 않은 신경조직을 관찰하는데 성공했다.<sup>[10,11]</sup> 공초점 현미경에서 공초점의 의미는 조명과 상의 형성이 시료의 동일 지점에 형성된 초점을 통해 이루어지는데서 유래한다. 이와 같이 공초점 광학 현미경에서는 해상도가 주로 반사된 신호나 형광된 신호의 반치폭에 의해서 결정되고, 반치폭은 광원의 파장과 집적 렌즈의 조리개수(numerical aperture)에 의해서 결정된다.<sup>[12]</sup>

그러나 입사한 레이저 빛이 렌즈에 의해 물체에 초점이 형성될 경우에 렌즈의 왜곡과 광 경로에 의한 위상 오차 때문에 광축상과 평면상에 side-lobe가 발생하게 되고 이것은 횡 방향(lateral direction)에 대해서는 평면 해상도를 저하시키고 광축 방향(axial direction)에 대해서는 3차원 상을 얻는데 잡음으로 작용하여 해상도를 떨어뜨린다. 이러한 side-lobe를 제거하여 공초점 현미경의 해상도를 높이려는 연구가 많이 진행되고 있다.<sup>[13-21]</sup> 본 연구에서는 렌즈의 왜곡과 시료의 특성에 의해 발

생하는 광축상의 side-lobe 효과를 감쇄시키는 방법을 이론적, 실험적으로 조사하였다.

#### 1.1. 이론적 고찰

공초점 현미경에서 그림 1과 같은 시료에서 반사되어 검출기에 도달하는 빛의 세기는 다음과 같이 주어진다.<sup>[3]</sup>

$$I(z) = \left| \int_0^\alpha R(\theta_1) P^2(\theta_1) \exp(2ikzn_1 \cos \theta_1) \sin \theta_1 \cos \theta_1 d\theta_1 \right|^2 \quad (1)$$

여기서  $\alpha$ 는 광축과 렌즈를 통해 들어오는 빛 사이의 각이고,  $z$ 는 초점으로부터 멀어지는 거리이며,  $k$ 는 파수를 나타내고  $P(\theta_1)$ 는 pupil 함수이고  $R(\theta_1)$ 는 반사 계수로 그림 1과 같이 입사한 빛이 Fresnel 방정식에 의해  $R(\theta_1) = \frac{r_{\parallel} + r_{\perp}}{2}$ 로 주어진다. 렌즈의 왜곡이 없을 때는 pupil 함수  $P(\theta_1) = 1$ 이므로 빛의 세기는

$$I(z) = \frac{1}{4} \int_{\cos \alpha}^1 \left[ \exp(2i(\tan^{-1}(\frac{c}{n\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}) \times \tan(h\sqrt{1-n^2(1-c^2)})) + kzn_1c) + \exp(2i(\tan^{-1}(\frac{n\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}{nc}) \times \tan(h\sqrt{1-n^2(1-c^2)})) + kzn_1c) \right] c dc^2 \quad (2)$$

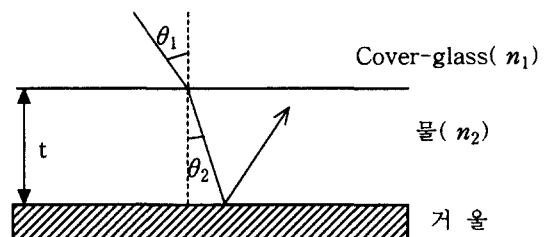


그림 1. 빛의 입사후 반사 과정.

<sup>†</sup>E-mail: dckim@cheju.cheju.ac.kr

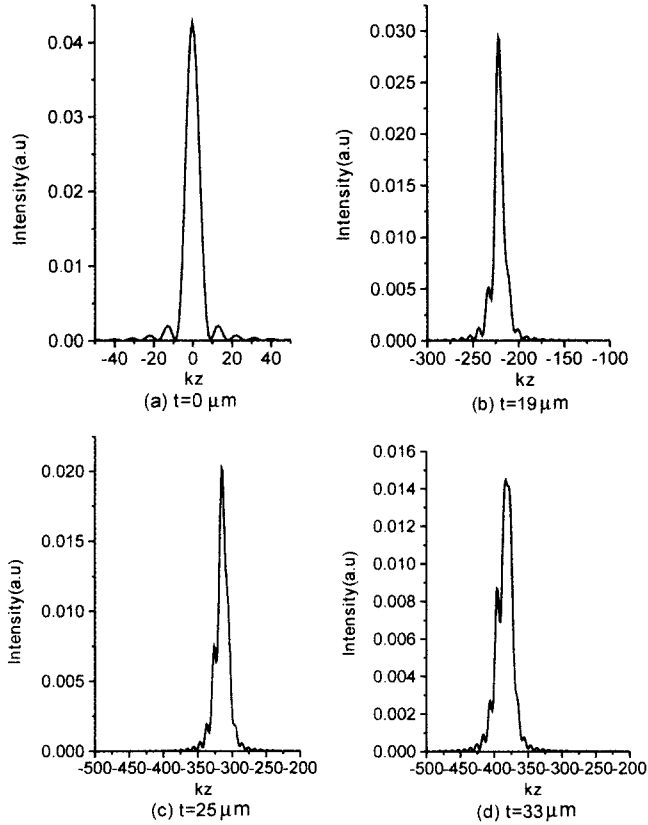


그림 2. 시료의 두께에 따른 side-lobe의 영향(t: 시료의 두께).

로 표현되며,<sup>[14]</sup> 여기서  $c = \cos \theta_1$ ,  $n = \frac{n_1}{n_2}$ ,  $h = kn_2 t$  이고  $t$ 는 시료의 두께이다. 따라서 반사광의 세기는 입사각, 시료의 굴절률과 두께 등에 의해 다르게 된다. 이러한 요인으로 인해 광경로의 변화가 발생할 수 있다.

본 연구에서는 시료의 두께 변화와 대물렌즈와 상까지 거리의 변화에 의한 반사광의 side-lobe 현상을 전산 시뮬레이션하였으며, 그 결과를 그림 2에 나타내었다. (a)는 시료(물)가 없는 경우, 즉 거울과 커버유리(cover-glass)만이 있을 경우로 빛의 세기가 가장 큰 부분을 중심으로 대칭형태를 이루고 있음을 볼 수 있고 side-lobe도 나타나고 있지 않음을 알 수 있다. (b)는 시료의 두께가 19 μm인 경우로 빛의 세기 분포가 왼쪽으로 이동하였는데 이는 공기 보다 물의 굴절률이 크기 때문에 유효 광경로(effective optical length)가 짧아져서 초점이 음의 방향으로 이동했기 때문이다. 또한 side-lobe의 영향으로 선폭도 더 넓어 졌음을 관찰 할 수 있다. (c)는 시료의 두께가 27 μm인 경우로 최대 빛의 세기도 낮아졌으며 side-lobe도 증가하였고 비대칭형태를 이루고 있음을 볼 수 있다. (d)는 시료의 두께가 33 μm인 경우로 side-lobe의 크기가 많이 증가하였으며 최대 빛의 세기도 낮아졌음을 볼 수 있다. 위의 결과에서 보듯이 시료의 두께가 증가함에 따라 경로차가 발생하게되고 이로 인한 위상 오차에 의해 side-lobe의 영향이 급격히 증가하는 현상을 보이고 있다.

이와 같은 반사광의 side-lobe 영향을 최소화하기 위해서는 Herschel 조건에 의한 광경로를 조절하여 위상차( $\psi$ )를 보정하

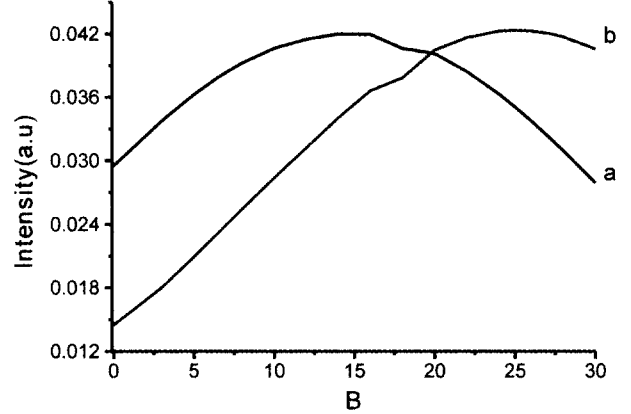


그림 3. 시료의 두께가 a = 19 μm, b = 33 μm일 때 광경로변화값 B의 변화에 따른 빛의 세기.

여 주어야 한다.<sup>[15,16]</sup>

$$\phi \approx -\frac{1}{2}kd^2\Delta\left(\frac{1}{l}\right)\tan^2\theta = B\tan^2\theta\left(B = -\frac{1}{2}kd^2\Delta\left(\frac{1}{l}\right)\right) \quad (3)$$

여기서  $d$ 는 대물렌즈에서 초점까지의 거리이고  $l$ 은 대물렌즈에서 상까지의 거리이다. 그리고,  $\Delta\left(\frac{1}{l}\right)$ 은 대물렌즈와 상까지의 거리 그리고 대물렌즈에서 초점까지의 거리변화에 의해 (2)식에 의한 위상 오차를 보정하여 줄 수 있다는 것이다. (3)식에 의한 위상 보정을 하여준 반사광의 세기는

$$I(z) = \frac{1}{4} \int_{\cos\alpha}^1 \left[ \exp\left(2i\left(\tan^{-1}\left(\frac{c}{n\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}\right) \times \tan(h\sqrt{1-n^2(1-c^2)})\right) + B\left(\frac{1}{c}-1\right) + kzn_1c\right) + \exp\left(2i\left(\tan^{-1}\left(\frac{n\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}{nc}\right) \times \tan(h\sqrt{1-n^2(1-c^2)})\right) + B\left(\frac{1}{c}-1\right) + kzn_1c\right) \right] c \, dc \quad (4)$$

이 된다.

(4)식을 이용하여 광경로차 조절에 의한 반사광의 세기 변화에 따른 전산시뮬레이션 결과가 그림 3과 같다.

그림 3은 시료의 두께에 따른 위상 오차를 광경로 변화값 B를 변화시킬 때 빛의 세기 변화를 나타낸 것이다. 시료의 두께(t)가 19 μm일 때(a)는 B의 값이 변함에 따라 빛이 세기도 증가하다가 B=16부근에서 빛의 세기가 가장 크게 나타나고 이보다 큰 값에서는 감소하고 있다. 이 결과는 광경로의 변화 값이 16일 때에 위상 오차가 보정되어 빛의 세기가 가장 크게 나타난 것으로 볼 수 있다. 또한 시료의 두께(t)가 33 μm인 경우(b)는 B의 값이 약 28일 때에 빛이 세기가 가장 크게 나타나고 있다.

그림 4는 시료의 두께의 변화에 따른 위상 오차를 광경로 변화값 B에 의해 위상 보정을 해주지 않았을 때(c)와 보정을 해주었을 때(d)의 빛의 세기 변화를 보여주고 있다. 위상 보정을 해주지 않았을 때는 시료의 두께가 증가함에 따라 광경로

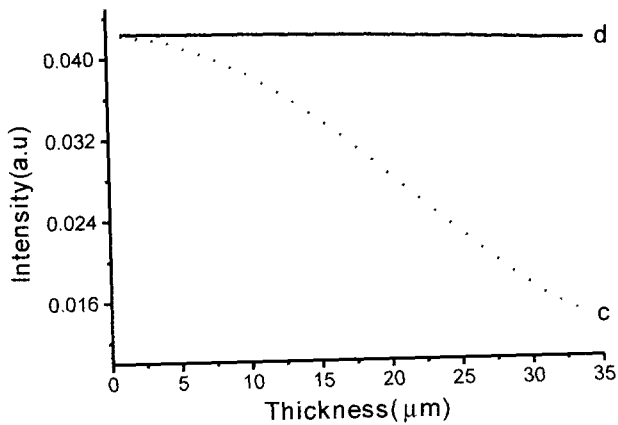


그림 4. 시료의 두께가 변할 때 위상보정을 해주지 않았을 때(c)와 위상보정을 해주었을 때(d)의 빛의 세기.

차에 의한 위상 오차가 점점 커지고 이로 인해 side-lobe가 증가하여 전체적인 빛의 세기가 점점 감소하고 있음을 보여주

고 있다. 반면에 위상 오차를 보정해 주었을 경우는 시료의 두께가 변화더라도 빛의 세기는 거의 일정하게 나타나고 있음을 알 수 있다.

그림 5에 (a)와 (b)는 시료(물)의 두께가 19 μm, 33 μm 일 때에 위상 보정 전과 보정 후의 광축 방향에 대한 빛의 세기 변화를 보여주고 있다. 그림(a)는 그림 3에서 빛이 세기가 가장 크게 나타내었던 B=16을 대입하여 위상 보정 전의 side-lobe를 최소화 시켰다. 이 결과 최대 빛의 세기는 증가하였고, 빛의 세기 분포가 최대 빛의 세기를 중심으로 대칭형태로 바뀌었다. 같은 방법으로 물의 깊이가 33 μm인 경우(b)에 B=28의 값을 적용하여 side-lobe를 감소시켰다.

## II. 실험 및 논의

### 2.1. 실험장치

시료의 굴절률과 두께에 따른 side-lobe의 변화와 이를 최소화할 수 있는 지점을 찾기 위한 실험 개략도는 그림 6와 같다. 광원으로는 파장이 633 nm인 He-Ne 레이저를 사용하였고,

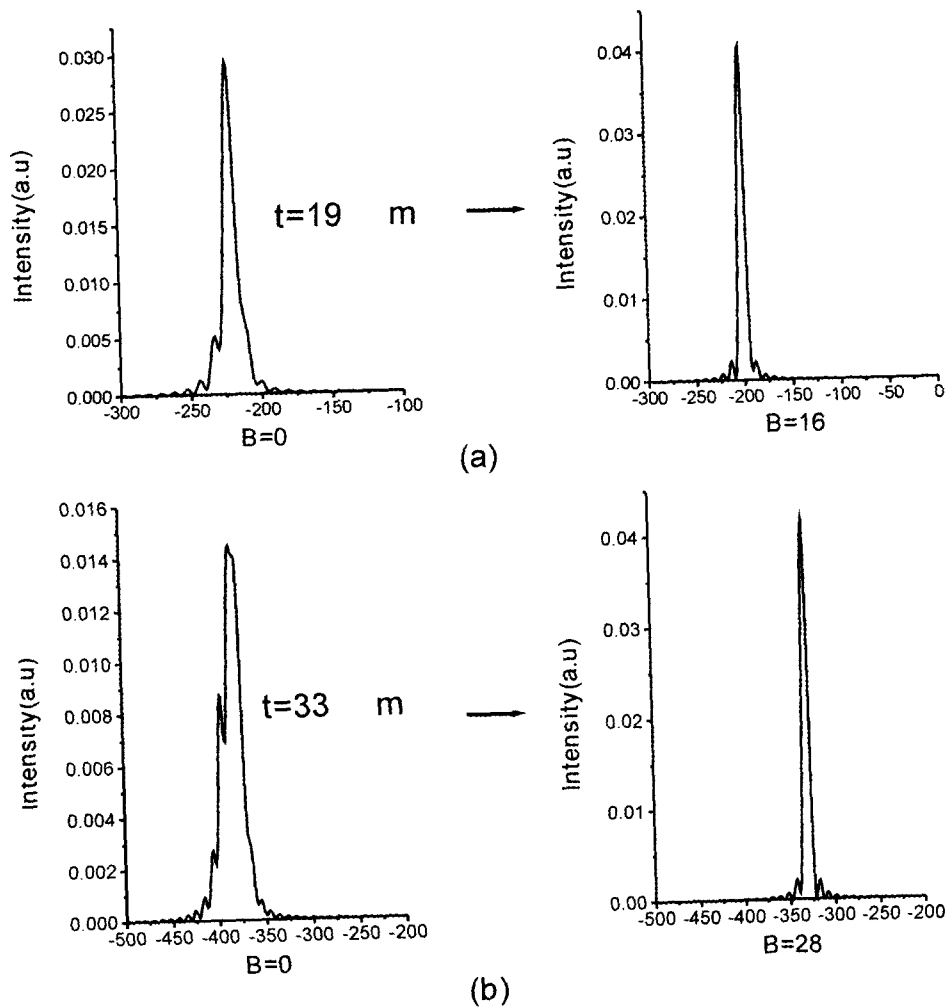


그림 5. 시료의 두께(t)가 19 μm, 33 μm의 경우에 위상 오차 보정 전(좌)·후(우)의 전산 시뮬 결과(t: 시료의 두께,  $B = -\frac{1}{2}kd^2\Delta\left(\frac{1}{l}\right)$ , d: 대물렌즈에서 초점까지의 거리, l: 대물렌즈에서 상까지의 거리).

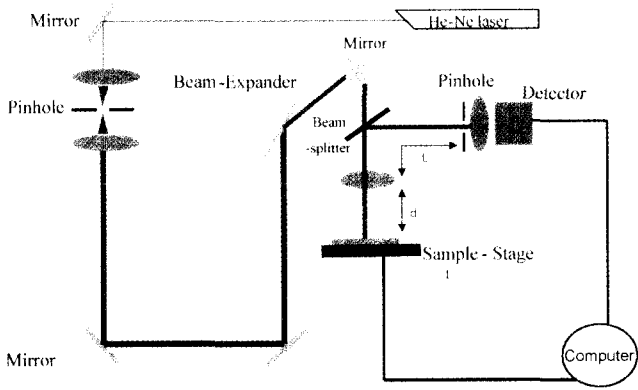


그림 6. 실험 개략도.

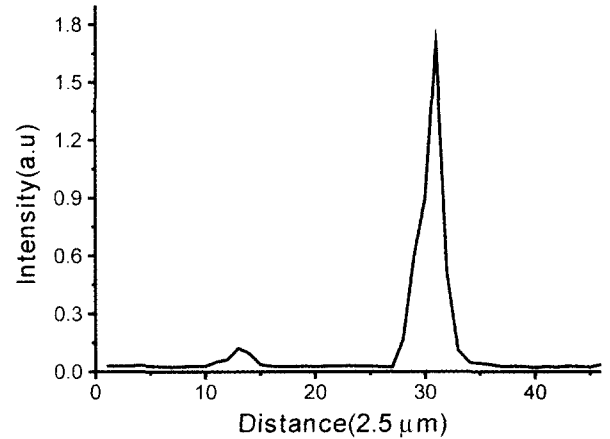


그림 7. 시료가 없는 경우에 거리에 변화에 따른 빛의 세기.

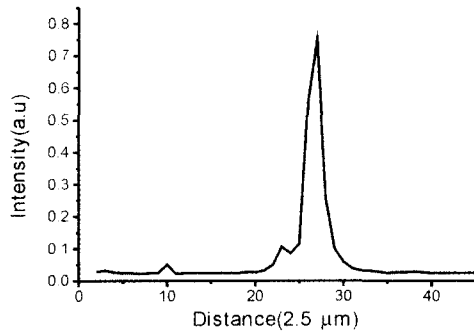
대물렌즈는 40X를 사용하였다. 시료가 놓여 있는 스테이지는 Z 방향으로 약  $2.5 \mu\text{m}$ 의 간격으로 이동하였고 검출부(pin-hole, collect lens, detector)를 일정한 간격으로 이동시키면서 빛의 세기 변화를 측정하였다. 검출기 앞에 있는 바늘 구멍(pin-hole)은 초점 외의 상을 제거하기 위하여 사용된 것이며, 검출기 앞의 렌즈는 바늘 구멍을 통과한 빛을 모으기 위한 것으로 초점거리가 약 3 cm인 렌즈를 사용하였다.

## 2.2. 논의

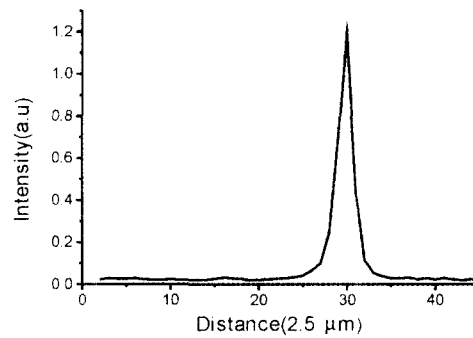
그림 7은 시료(물)가 없는 경우로 빛의 세기가 최대가 되고 side-lobe도 최소가 되는 지점을 광 경로 조절을 통해 찾은 실험

결과이다.

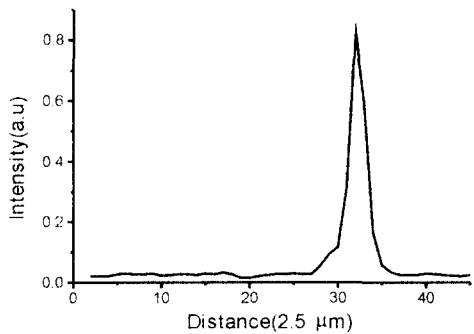
그림 8은 대물렌즈에서 상까지의 길이변화에 따른 side-lobe의 영향을 알아보기 위해서 두께가  $19 \mu\text{m}$ 인 시료(물)를 광축 방향으로  $2.5 \mu\text{m}$ 씩 이동하면서 측정된 빛의 세기 결과이다. (a)는 대물렌즈에서 시료까지의 거리(O)가  $980.0 \mu\text{m}$ 이고 대물렌즈에서 시료까지의 거리(I)가 20 cm로서 광경로의 차로 인한 side-lobe의 영향으로 전체적인 선폭이 넓게 분포하고 있고 빛의 세기도 다소 낮게 측정되었다. (b)는 O가  $987.5 \mu\text{m}$ 이고 I가 25 cm인 경우로 선폭이 많이 좁아 졌으며 빛의 세기도 증



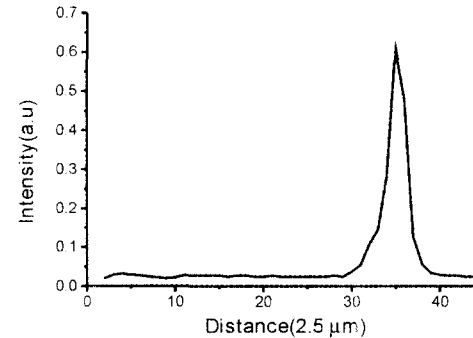
(a) O :  $980 \mu\text{m}$  , I : 20 cm



(b) O :  $987.5 \mu\text{m}$  , I : 25 cm



(c) O :  $992.5 \mu\text{m}$  , I : 30 cm



(d) O :  $1000 \mu\text{m}$  , I : 35 cm

그림 8. 시료의 깊이가  $19 \mu\text{m}$ 인 경우에 광경로 조절에 따른 빛의 세기 변화(O: 시료에서 대물렌즈까지의 거리, I: 대물렌즈에서 상까지의 거리).

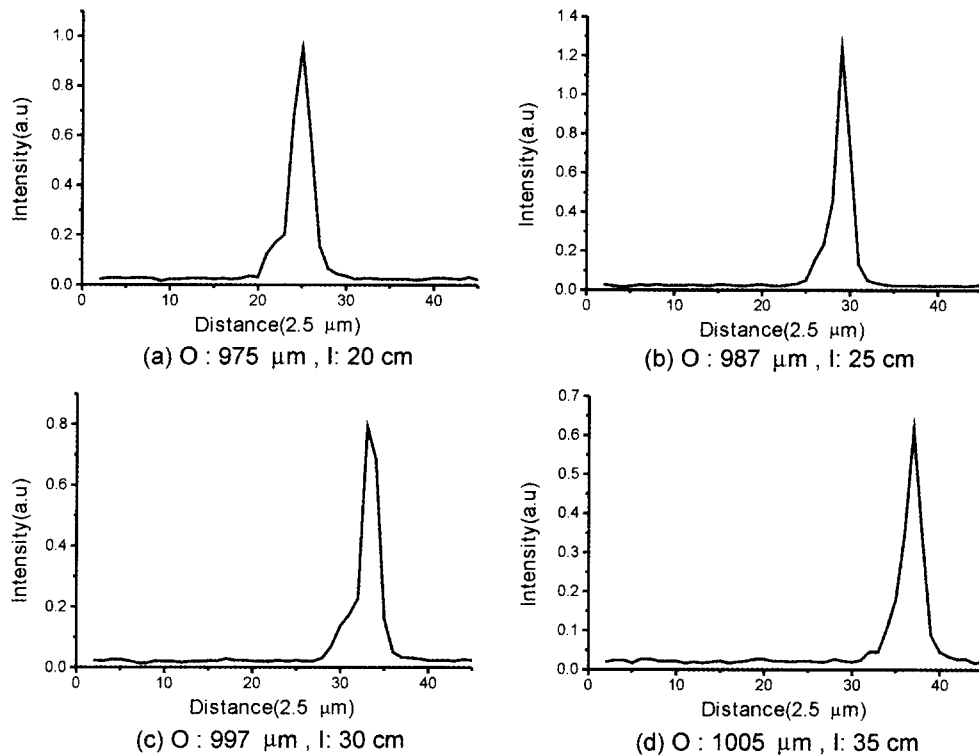


그림 9. 시료의 깊이가 33 μm인 경우에 광경로 조절에 따른 빛의 세기 변화.

가하였고, 또한 최대 빛의 세기를 중심으로 대칭형태에 가깝다. (c)는 O가 992.5 μm이고 I가 30 cm인 경우로 빛의 세기가 (b)와 비교해 많이 낮아졌고 선폭도 side-lobe의 영향으로 커지는 경향을 볼 수 있으며 O와 I를 더 증가시킨 (d)의 경우는 최대 빛의 세기가 더 감소하였고 선폭도 더 넓어 졌음을 알 수 있었다. 이 결과에서 보듯이 O가 987.5 μm이고 I가 25 cm인 경우에 전체적인 특징이 전산 시뮬을 통해본 데이터와 일치하므로 이 부분이 광 경로 차로 인해 발생하는 side-lobe의 영향을 최소화한 지점으로 볼 수 있었다.

또한 그림 3과 비교해 볼 때 위상 보정이 이루어 질수록 빛의 세기의 값은 증가하다가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

같은 방법으로 시료(물)의 두께가 33 μm일 때 실험결과를 나타낸 것이 그림 9이다. (a)는 O가 975.0 μm, I가 20 cm인 경우로 선폭의 넓이가 side-lobe의 영향으로 넓게 분포되어 있다. (b)는 O가 987.0 μm이고 I가 25 cm인 경우로 빛의 세기가 가장 크게 나타나고 있고, 빛의 세기분포도 대칭형태로 측정되었다. (c)와 (d)는 O와 I를 더 증가시키면서 측정된 결과로서 반치 폭의 크기가 더 넓어졌으며 최대 빛의 세기도 낮아졌다. 그리고 세기분포는 비대칭형태로 변화되는 현상을 보였다. 결과적으로 (b)는 전산시뮬데이터와 일치하는 특징을 가지고 있고 특히 시료(물)의 두께가 19 μm인 실험 데이터와 비교해 볼 때 빛의 세기의 분포가 더 왼쪽으로 이동하였음을 확인할 수 있다. 이는 그림5에서 시료의 두께가 증가할수록 빛의 세기 분포가 왼쪽으로 이동하는 모습을 보여준 전산시뮬 데이터와 일치하는 결과이다. 또한 그림4에서 볼 수 있듯이 위상 보정이 되었을 때는 두께에 상관없이 빛의 세기 값이 거의 일

정하게 나타나고 있음도 관찰 할 수 있다.

### III. 결 론

공초점 현미경에서 시료에서 반사되는 빛은 시료 두께의 변화에 따라 광경로의 차이가 발생하게 되고 이러한 원인으로 인해 광축 방향에 side-lobe가 발생하게 된다. Side-lobe는 완전한 상을 얻는데 잡음으로 작용하게 되므로 이를 최소화하기 위해서는 Herschel 조건을 만족시켜야한다. 따라서 본 연구에서는 side-lobe가 최소화되는 조건을 찾기 위하여 전산시뮬을 하였으며, 이 조건에 따른 실험을 하였다. Herschel 조건을 만족시키기 위해서 대물렌즈와 시료까지의 거리 그리고 대물렌즈와 상까지의 거리를 조절하여 광경로 차에 의한 위상 오차를 보정 하였다. 먼저 시료의 두께에 따른 광 경로 변화가 side-lobe에 미치는 영향을 알아보기 위해 시료의 두께에 따른 빛의 세기변화를 전산시뮬을 통해 알아보았다. 이때에 시료의 두께가 19 μm인 경우에 광경로 변화값 B=16을 적용하여 위상 오차를 보정 하였고, 시료의 두께가 33 μm일 때는 B=28을 적용하여 side-lobe의 영향을 최소화하였다. 실제 실험에서는 시료의 두께가 19 μm인 경우에는 O가 987.5 μm이고 I가 25 cm일 때, 그리고 33 μm인 경우에는 O가 987.0 μm이고 I가 25 cm인 경우에 side-lobe의 영향이 가장 적은 지점임을 알았다. 전산시뮬과 실험데이터를 비교해볼 때 시료의 두께가 두꺼워질수록 빛의 세기 분포가 오른쪽에서 왼쪽으로 이동하였고, 위상 보정 후의 빛의 세기는 보정 전 보다 증가하였고, 빛의 세기분포도 대칭형태를 이루고 있음을 볼 수 있었다.

## 참고문헌

- [1] T. R. Corle and G. S. Kino, *Confocal Scanning Optical Microscopy And Related Imaging System* (Academic press, New York, 1996), Chapter 3.
- [2] L. S. Yang, G. Y. Wang, J. G. Wang, and Z. Z. Xu, "Surface profilometry with a fibre optical confocal scanning microscope," *Measurement Science & Technology*, vol. 11, no. 12, pp. 1786-1791, 2000.
- [3] I. K. Ilev and R. W. Waynant, "A simple submicron confocal microscope with a fiberoptic output," *Review of Scientific Instruments*, vol. 71, no. 11, pp. 4161-4164, 2000.
- [4] T. Fukano and I. Yamaguchi, "Geometrical cross-sectional imaging by a heterodyne wavelength-scanning interference confocal microscope," *Opt Lett.*, vol. 25, no. 8, pp. 548-550, 2000.
- [5] K. Fujita, O. Nakamura, T. Kaneko, M. Oyamada, T. Takamatsu, and S. Kawata, "Confocal multipoint multiphoton excitation microscope with microlens and pinhole arrays," *Optics Comm.*, vol. 174, no. 1-4, pp. 7-12, 2000.
- [6] M. Schrader, S. W. Hell, and H. T. M. Vandervoort, "Three-dimensional super-resolution with a 4pi-confocal microscope using image restoration," *J. Appl. Phys.*, vol. 84, no. 8, pp. 4033-4042, 1998.
- [7] M. Ishihara and H. Sasaki, "High-speed surface measurement using a non-scanning multiple-beam confocal microscope," *Opti. Eng.*, vol. 38, no. 6, pp. 1035-1040, 1999.
- [8] M. D. Sharma and C. J. R. Sheppard, "Effects of system geometry on the axial response of the fibre-optical confocal microscope," *J. Mod. Opti.*, vol. 46, no. 4, pp. 605-621, 1999.
- [9] P. W. Nutter, and C. D. Wright, "Resolution issues in confocal magneto-optic scanning laser microscopy," *Japan. J. Appl. Phys.*, vol. 37, no. 4B, pp. 2245-2254, 1998.
- [10] M. Minsky, "Microscopy apparatus," U.S. patent #3013467 (19 December 1961).
- [11] D. M. Shotton, "Confocal scanning optical microscopy and its application for biological specimens," *J. Cell Sci.*, vol. 94, pp. 175-206, 1989.
- [12] P. C. Cheng, T. H. Lin, W. L. Wu, and J. L. Wu, *Multidimensional Microscopy* (Springer-Verlag New York Inc. 1994), Chapter 1.
- [13] C. J. R. Sheppard and T. Wilson, "Effect of high angles of convergence on V(Z) in the scanning acoustic microscope," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 38, no. 11, pp. 858-859, 1981.
- [14] C. J. R. Sheppard and M. Gu, "Axial imaging through an aberrating layer of water in confocal microscopy," *Opt. Comm.*, vol. 88, no. 2, pp. 180-190, 1992.
- [15] C. J. R. Sheppard and C. J. Cogswell, "Effect of aberrating layers and tube length on confocal imaging properties," *Optik*, vol. 87, no. 1, pp. 34-38, 1991.
- [16] C. J. R. Sheppard and M. Gu, "Aberration compensation in confocal microscopy," *Appl. Opt.*, vol. 30, no. 25, pp. 3563-3568, 1991.
- [17] C. J. R. Sheppard, "Aberrations in high aperture conventional and confocal imaging systems," *Appl. Opt.*, vol. 27, no. 22, pp. 4782-4786, 1988.
- [18] G. Boone, *Signal Processing Using Optics* (Oxford press, New York, 1998), pp. 106-111.
- [19] S. Lindek, C. Cremer, and E. H. K. Stelzer, "Confocal theta fluorescence microscopy with annular apertures," *Appl. Opt.*, vol. 35, no. 1, pp. 126-130, 1996.
- [20] C. J. R. Sheppard, M. Gu, K. Brain, and H. Zhou, "Influence of spherical aberration on axial imaging of confocal reflection microscopy," *Appl. Opt.*, vol. 33, no. 4, pp. 616-624, 1994.
- [21] C. K. Sieracki, C. G. Levey, and E. W. Hansen, "Simple binary optical elements for aberration correction in confocal microscope," *Opt. Lett.*, vol. 20, no. 10, pp. 1213, 1995.

## A study on the effect of side-lobe on axial image of confocal microscope

Ouk Bong Kim, Jai Yon Ryu, Chi Kyu Choi, Doo Chul Kim<sup>†</sup> and Young Hun Yu

Department of Physics and Research Institute for Basic Science, Cheju National University, Jeju 690-756, KOREA

<sup>†</sup>E-mail: dckim@cheju.cheju.ac.kr

(Received May 22, 2001 ; revised manuscript received August 20, 2001)

The effect of side-lobe on axial image is investigated. We show, using computer simulation and experimentally, that an optimized axial response can be achieved by minimized side-lobe according to the Herschel condition and that the appearance of sidelobes is decreased by balancing phase error.

Classification codes : FO.050, SM.020.