

광섬유의 직접 구동에 의한 공초점 현미경

김종배 · 류광현 · 박두성 · 노정은 · 권남익[†]

한국외국어 대학교 물리학과

⑨ 449-791 경기도 용인시 모현면 왕산리 산 89번지

(2002년 9월 9일 받음, 2002년 12월 5일 수정본 받음)

두 가지의 다른 방법으로 광섬유를 직접 구동하여 공초점 현미경을 제작하였다. 압전소자와 투닝 포크는 광섬유를 진동시킨는데 사용하였다. 6 frame의 640×480 픽셀 영상을 압전소자 진동으로 1초 동안 얻었고, 1 frame의 640×480 픽셀 영상을 투닝 포크 진동으로 1초 동안 얻었다. 이러한 광섬유의 진동은 confocal 영상에 일그러짐을 주지 않았다.

주제어 : scanning confocal microscope, oscillation of optical fiber, tuning fork.

I. 서 론

공초점 현미경(SCM: Scanning confocal microscope)은 광원에서 나온 광속이 접속 렌즈에 의해 시료 표면을 조사하고, 시료깊이의 변화를 빛의 세기의 변화로 검출하여 영상으로 구현하는 주사형 현미경이다. 1940년대 말에 Robert와 Young^[1]에 의해 단순한 형태의 공초점 현미경이 제작되면서부터 본격적인 연구가 시작되었다. Marvin Minsky^[2]가 1957년 stage scanning confocal optical system을 이용한 현미경특허를 출원한 이후 보다 발전된 형태의 공초점 현미경이 제안되고 실험되어졌다. 1980년대에 접어 들면서 Tony Wilson^[3]에 의해 활발한 연구가 시작되어, 더욱 좋은 영상을 얻기 위해 바늘구멍 대신 슬릿^[4]이나 광섬유(Optical fiber)^[5]를 이용한 공초점 현미경 등이 개발되었다. 또한 국내에서도, 탐침의 크기가 1.2 mm×2.5 mm×6.5 mm인 소형 공초점 현미경^[6]뿐만 아니라, 4분할 광검출기(photo diode)^[7]나 마이켈슨 간섭계^[8] 및 광섬유^[9] 등을 이용한 공초점 현미경이 개발되었다.

이러한 공초점 현미경이 가지고 있는 장점은 기존의 광학현미경에 비해 초점심도가 낮기 때문에 초점을 벗어난 영상을 제거할 수 있으므로 선명하고 감도 높은 영상을 얻을 수 있고,^[10] 조직에 대한 침해 없이 광학적인 절편영상(optical section)을 만들기 때문에 기존의 전자현미경 기법에서 문제가 되는 물리적인 절편제작과정에서 발생하는 artifact를 없앨 수 있다. 또한 광학적인 절편영상을 만들 때 수평면뿐 아니라 수직면으로도 단면의 영상을 얻을 수 있기 때문에 현미경의 광축에 평행한 영상을 얻을 수 있다. 이러한 기술은 시료를 옆에서 보는 효과를 주기 때문에 시료의 높이 변화를 관찰할 수 있다.^[11]

이와 같이, 공초점 현미경은 표면의 3차원 영상을 얻을 수 있는 장점 때문에 반도체, 금속 등의 표면 측정뿐만 아니라 세포기관, 세포골격, RNA, DNA 또는 단백질 같은 거대분자의 세포 내구조, 조직 내에서 특정세포의 이동 관찰, 세포 내 단백질 또는 이온의 정량적 변화나 반응현상 등과 같이 생

명현상을 연구하려는 응용분야를 점차적으로 넓혀가고 있다.

일반적으로 살아있는 생명체의 내부를 보기 위해서는 CT나 MRI를 이용하여 낮은 분해능으로 관찰해야하며, 높은 분해능으로 보기 위해서는 세포를 떼어 내어서 광학 현미경이나 공초점 현미경을 이용하여야 했다. 그러나 공초점 현미경의 특징을 잘 이용하면 어느 정도의 깊이 까지는 살아있는 피부 속을 관찰할 수 있다.^[12,13] 근 적외선의 레이저 빛은 피부를 어느 정도 통과하며, 세포의 경계면이나 혈액의 세포면에 초점이 맞으면 반사량이 많으므로 피부의 투과율이 높은 파장의 빛과 빠르고 효율적인 광 검출기를 사용하면 피부 속의 영상을 얻을 수 있다.

생명체의 피부는 신체의 구조상 한정되어 있어, 손이나 팔 같은 부분은 탁상형 현미경에 올려놓을 수 있으나 다리나 겨드랑이 목 같은 부분은 곤란하다. 그래서 살아있는 생명체의 피부를 관찰하는 내시현미경은 손에 잡을 수 있도록 작아야 하고, 작게 만들기 위해서는 광섬유를 직접 구동하는 방법이 좋다. 광섬유를 사용할 경우, 광섬유가 핀홀(pinhole)의 역할을 대신하여^[14] 공초점 현미경의 헤드 크기를 줄임으로 다양한 목적으로 사용될 수 있다.

본 실험에서는 두 가지의 다른 방법으로 광섬유를 직접 구동하였다. 하나는 압전소자를 이용하여 광섬유를 직접 구동하는 방법이고, 다른 하나는 얇은 금속판에 광섬유와 작은 영구자석을 붙여 투닝 포크로 광섬유를 직접 구동시키는 방법이다. 이 방법들은 모두 광섬유를 사용하여 헤드의 크기가 작아지고, 또한 수 nm 이하의 종방향 분해능과 높은 횡방향 분해능을 가지게 된다. 현재 투닝 포크 방법으로 호주의 Optiscan에서 9만 달러 정도에 내시현미경을 시판중인데 헤드의 크기가 지름 2.5 cm에 길이 18 cm정도이다. 또한 영상 취득속도는 1024 line에 1초가 소비되고, line 수를 감소시킬수록 시간이 짧아진다.

II. 실험

시료 표면에 대해 레이저빔을 주사하게 되면 시료의 표면이 정확히 대물렌즈의 초점에 있을 때 가장 많은 빛이 광 검출기

[†]E-mail: namic@hufs.ac.kr

예 검출되고, 시료의 앞이나 뒤에 있으면 검출되는 빛의 양이 줄어든다. 종방향(z축 방향)에 따라서 반사광의 세기를 측정하면 반사광의 세기 변화 곡선을 얻을 수 있다. 이 반사 신호의 반치폭은 종방향 분해능의 기준이 되고 반치폭이 작을수록 종방향의 분해능은 향상된다. 측정되는 빛의 세기는 정규화 좌표 u 에 대하여 다음과 같이 표현된다.^[14]

$$J(u) = \left| \frac{A(1 - e^{-(A+iu)})}{(1 - e^{-A})(A + iu)} \right|^2$$

$$u = (8\pi/\lambda)z \sin^2(\alpha/2)$$

$$A = (2\pi a_0 r_0 / \lambda d)^2$$

z 는 실제 좌표이며, A 는 차원이 없는 변수로서 광섬유의 정규화된 spot size이다. u 와 A 의 표현식에서 보면 α 는 NA와 관계되어 있는 $\alpha = \sin^{-1}(NA)$ 의 값이고 a_0 는 대물렌즈의 반경, d 는 점 광원과 대물렌즈 사이의 거리이며, r_0 는 광섬유의 spot size이고 λ 는 광원의 파장이다. 분해능은 빛의 회절 한계 때문에 대략 레이저의 파장 정도이다. 또한 일반적인 공초점 현미경에서 반치폭은 빛의 파장과 NA의 값에 크게 의존한다.^[15,16] 하지만 광섬유를 이용한 공초점 현미경에서는 광원과 NA뿐만 아니라 대물렌즈의 반경, 광섬유의 spot size인 core의 크기, 점 광원과 대물렌즈까지의 거리가 반치폭을 결정하는 변수가 된다. 본 실험에서는 광섬유를 이용한 공초점 현미경 헤드의 소형화를 위해 CD Pick up 장치의 actuator에 있는 대물렌즈를 사용하였다 때문에 점 광원과 대물렌즈 사이의 거리가 반치폭을 결정하는 중요한 변수가 된다.

전체적인 실험장치는 광섬유를 직접 구동하는 beam scanning 타입의 공초점 현미경으로 구성하였다. 사용한 광원은 780 nm이고, 반경이 3 mm인 대물렌즈를 사용하였다. 편광 유지 단일모드 광섬유(single mode polarization maintaining fiber)는 0.45 NA에 core 크기가 $5.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 이다. 파장이 780 nm인 반도체 레이저로부터 방출된 선형 편광된 빛은 PBS(Polarization Beam Splitter)를 지나고 렌즈에 의해 편광유지 단일모드 광섬유에 입사하게 된다. 이때 수평편광인 상태로 입사된 레이저 빛은 QWP(quarter wave plate)를 통해 원형 편광으로 바뀌어 되고 x-y scanner에 의해 시료를 scan한다. 시료 표면에서 반사된 빛은 회전 방향이 반대인 원형 편광인 상태로 바뀌어 다시 QWP를 지나 수직 편광인 상태로 광섬유에 재 입사된다. 이 반사광에는 레이저 빛이 광섬유에 입사하거나 나올 때 발생한 산란 빛이 포함되어 있지만, PBS를 사용하므로 거의 모든 산란빛을 제거시킬 수 있다. 이렇게 PBS에 반사되어 광검출기로 검출된 아날로그 신호는 frame grabber board를 통해 디지털 신호로 변환되어 영상화된다.

반사신호를 이용하여 영상을 획득하는데 있어서 Variable scan 방식의 frame grabber board를 사용하였다. Variable scan 방식은 frame의 시작이나 line을 표현하는 시간 및 y축 방향의 line 수, x축 방향의 line 픽셀 수 등을 임의로 변화시켜 scan 할 수 있어서, 실험에 사용하는 하드웨어의 scan 속도에 맞게 조절할 수 있다. 일반적으로 NTSC방식의 Video에서는 1/60 초당 1 frame을 interlaced 방식으로 odd 또는 even을 주

사하게 된다. interlaced 방식은 odd 혹은 even을 먼저 주사하고 나머지를 주사하는 방식이다. 본 실험에서는 non-interlaced 방식인 연속적(순차적인) 주사 방식을 사용하여 고화질의 영상을 획득하는데 사용하였다. 영상을 얻기 위한 scan은 x축 scanner에 사인파를, y축 scanner는 톱니파를 공급하고 각기 나오는 동기 신호(Synchronization pulses)를 이용하여 수평 동기 신호(H-Sync)는 새로운 Line의 시작을, 수직 동기 신호(V-Sync)는 새로운 Frame이나 새로운 Field의 시작을 맞추는데 사용하였다.

이렇게 구성된 공초점 현미경의 광섬유를 직접 구동시키기 위하여 두 가지 다른 방법을 사용하였다. 첫 번째 방법은 광섬유를 압전소자에 붙여 직접구동 시키는 방법으로, 실험에서는 얇은 압전 세라믹 원판의 양면에 전극용 은박을 붙이고, 한쪽 면을 스테인레스 스틸이나 황동으로 된 얇은 원판에 접착한 압전 소자를 사용하였다. 이 압전소자의 양면에 교류전압을 걸어주면 전압변화에 따라 광섬유가 상하로 진동하여 x축을 scan하게 된다. 그림 1-a는 압전소자를 이용하여 구성한 공초점 현미경의 헤드부분을 도식화한 것이다. 압전소자 자체의 공명주파수는 8 kHz로 측정되었고, 여기에 광섬유를 붙이면 질량이 증가하여 공명주파수가 6 kHz로 감소하였다. 이때

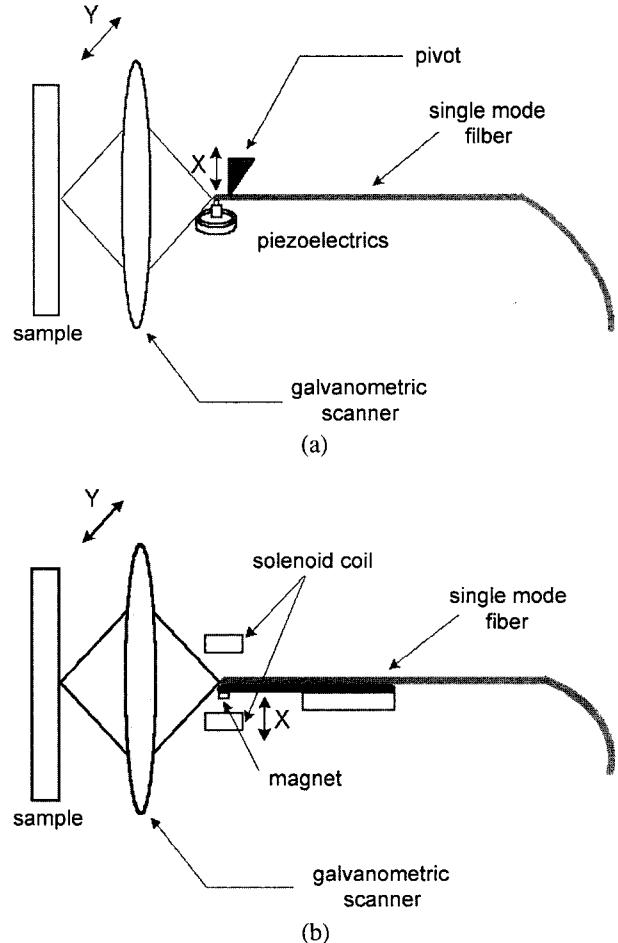


그림 1. (a) 압전소자를 이용한 공초점 현미경의 헤드부분, (b) 튜닝 포크를 이용한 공초점 현미경의 헤드부분.

압전소자와 광섬유의 접촉면적을 작게 하고, 광섬유가 진동할 수 있는 각도를 크게 하면 scan 범위를 증가시킬 수 있다. 그래서 압전소자에 작은 광섬유를 붙이고 그 위에 다시 광섬유를 붙여 접촉면적을 작게 해주었고, 압전소자에서 1 mm 떨어진 위치에 Pivot을 구성하여 광섬유가 큰 각도로 진동할 수 있도록 제작하였다. 대물렌즈는 $\varphi = 6 \text{ mm}$, 0.45 NA인 렌즈를 사용하였고, galvanometric stage로 y축을 구동하였다. 여기서, 대물렌즈와 galvanometric stage가 모두 포함되어 있는 CD pick-up의 actuator를 사용함으로 헤드의 크기를 줄일 수 있었다. 이렇게 구성한 광섬유의 scan 범위는 45 μm 정도이고, 6 kHz의 속도로 x축을 scan하여 640×480 픽셀의 영상을 초당 6 frame 얻을 수 있었다.

두 번째는 얇은 금속판에 영구자석과 광섬유를 붙이고 이것을 두 개의 솔레노이드 코일사이에 두어 직접 구동시키는 방법이다. 솔레노이드 코일에 교류전류를 공급하게 되면 변화하는 자속과 금속판의 영구자석이 상호 작용하게 되고, 이렇게 형성된 튜닝 포크에 의해 광섬유가 x축으로 진동하게 된다. 튜닝 포크의 공명 주파수와 scan 범위는 금속판의 길이와 두께에 매우 민감하게 변화한다. 금속판의 길이를 줄이거나, 더 두꺼운 금속판을 사용하면 공명주파수가 증가하여 영상을 얻는 시간이 줄어들게 되지만, 상대적으로 scan 범위가 급격하게 줄어드는 단점이 있다. 반대로 공명주파수를 감소시키면 scan 범위는 증가하게 되지만, 영상을 얻는 시간이 줄어들게 된다. 이러한 원인때문에 Optiscan에서도 scan 속도를 1 kHz이상 증가시키지 못하였다. 본 실험에서는 금속판의 길이를 6 mm, 두께는 0.25 mm로 제작하여 1.24 kHz의 x축 scan 속도와 250 μm 정도의 scan 범위를 얻을 수 있었다. 그림 1-b는 튜닝 포크를 이용하여 구성한 헤드부분을 나타낸 것이다. 이렇게 구성한 광섬유의 scan 범위는 250 μm 정도이고, 1.24 kHz의 속도로 x축을 scan 할 수 있어서 640×480 픽셀의 영상을 초당 1 frame 얻을 수 있었다.

III. 결 과

먼저 구성된 공초점 현미경의 종방향 분해능을 파악하기 위해 평면 거울을 사용하여 반사신호를 측정하였으며, 그 결과는 그림 2에 나타나 있다. 종방향으로 200 μm 움직이면서 측정한 반사신호로 점 광원에서 대물렌즈 사이의 거리는 7 mm로 설정하여 측정하였다. 그림에서 보면 반사 신호는 초점을 기준으로 하여 거리의 제곱의 형태로 비례하여 변화하고 있으며 반치폭은 약 45 μm 로 이는 이론적으로 계산한 반치폭과 약 5 μm 정도 오차가 나고 있다. 반사신호의 곡선을 보면 100 μm 에서 intensity의 최대값이 나타나고 있는데 이곳이 시료 표면에 초점이 위치한 경우이다. 초점에서 영상을 얻는 경우, 초점에서는 같은 거리만큼 올라오거나 내려가 있는 곳에서 검출되는 반사신호의 크기가 같아지게 되어 초점 전후의 다른 높이도 같은 높이로 처리하게 되는 문제가 있다. 그렇기 때문에 초점 조금 전이나 조금 후에 위치한 선형적으로 증감하는 구간에서 반사신호의 거리에 따른 변화를 이용하여 영상을 취득해야 한다.

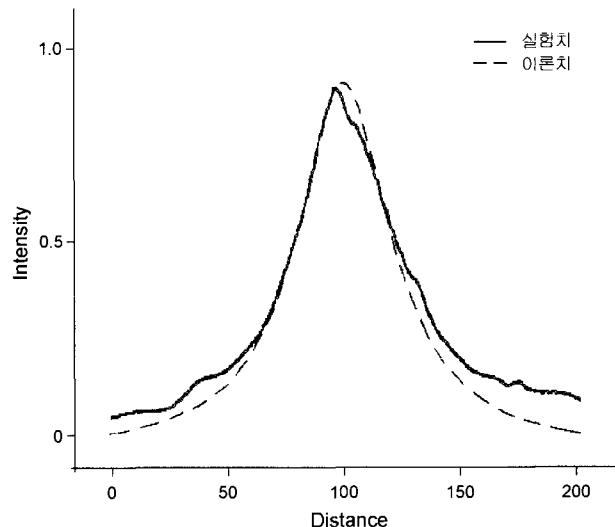


그림 2. 거울을 시료로 하여 종방향으로 200 μm 움직이면서 광검출기(Photo diode)로 측정한 반사신호의 실험값과 이론값.

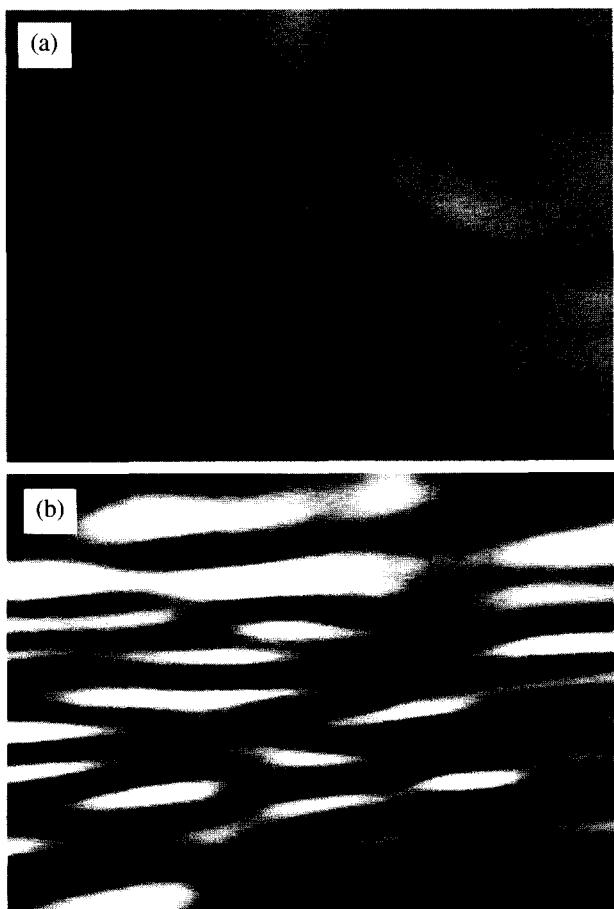


그림 3. (a) 압전소자를 이용하여 6 kHz의 속도로 찍은 silicon wafer 표면의 영상. 640×480 픽셀의 영상으로 전체크기는 45×30 μm^2 이다. (b) 압전소자를 이용하여 6 kHz의 속도로 찍은 CD 표면의 영상. 640×480 픽셀의 영상으로 전체크기는 10×15 μm^2 이다.

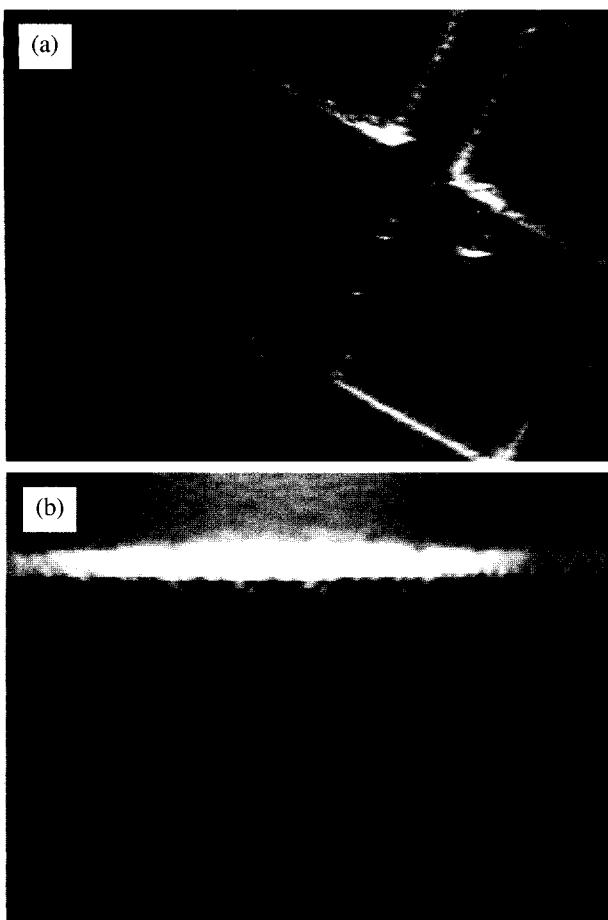


그림 4. (a) 튜닝 포크를 이용하여 1.24kHz의 속도로 찍은 grid 표면의 영상. 640×480 픽셀의 영상으로 전체 크기는 250×250 μm^2 이다. (b) 튜닝 포크를 이용하여 1.24 kHz의 속도로 찍은 CD 표면의 영상. 640×480 픽셀의 영상으로 전체 크기는 250×250 μm^2 이다.

이러한 분해능을 갖는 공초점 현미경의 x축 scanner를 압전소자와 튜닝 포크를 이용하여 영상을 획득하였다. 압전소자를 이용하여 영상을 얻을 경우, x축 scan 범위는 45 μm 정도로 1 frame의 영상을 얻는데, 480 line은 1/6초, 240 line은 1/12초, 120 line은 1/24초가 소비되었다. 그림 3-a는 압전소자를 이용하여 6 kHz의 속도로 x축 scan하여 찍은 실리콘 웨이퍼 영상으로 640×480 픽셀을 초당 6 frame을 획득할 수 있었다. 전체 영상의 크기는 45×30 μm^2 으로 중앙에 두 개의 타원형인 흠을 볼 수 있는데, 왼쪽에 있는 타원형의 흠은 크기가 4×2 μm^2 이고 오른쪽에 있는 타원형의 흠은 6.5×2.5 μm^2 크기이다. 그림 3-b는 같은 방법을 이용하여 6 kHz의 속도로 x축 scan하여 CD 표면을 찍은 영상으로 640×480 픽셀의 영상을 초당 6 frame 얻을 수 있었다. 전체 영상의 크기는 10×15 mm^2 이다.

튜닝 포크로 광섬유를 직접 구동한 경우, scan 범위는 약 250 μm 이고 640×480 픽셀의 영상을 얻는데 약 1초의 시간이 걸렸다. 이렇게 얻은 영상이 그림 4에 나타나 있다. 압전소자를 이용했을 경우와 비교해보면, x축 scan 속도가 1/6배로 감소하여 영상을 얻는데 걸리는 시간이 1/6배로 감소하고,

scan 범위는 5배 증가하는 것을 볼 수 있다. 그럼 4-a는 한 격자의 크기가 125 μm 인 grid 표면을 찍은 것으로 전체 크기는 250×250 μm^2 이고, 튜닝 포크를 1.24 kHz의 속도로 구동시켜 초당 1 frame의 영상을 얻을 수 있었다. 그림 4-b는 같은 방법으로 CD 표면을 찍은 것으로 전체 크기는 250×250 μm^2 이고 1.24 kHz의 속도로 구동시켜 초당 1 frame의 영상을 얻을 수 있었다.

IV. 토 의

이와 같이, 광섬유의 직접 구동에 의한 두 가지 다른 방식의 공초점 현미경을 구성하였다. 광원은 780 nm 반도체 레이저를 사용하였고, 편광유지 단일모드 광섬유가 핀홀의 역할을 대신하여 현미경 헤드의 크기를 줄일 수 있었다. 또한 광섬유를 직접 구동하였어도 영상의 일그라짐이나 깊이 정보의 변화가 없음을 확인할 수 있었다. 이러한 공초점 현미경의 광섬유를 압전소자로 직접 구동하면 scan 범위는 작지만 빠른 속도의 영상을 얻었을 수 있었고, 튜닝 포크로 직접 구동하면 압전소자 방식에 비해서 영상 획득 속도는 6배정도 느리지만 scan 범위가 5배 더 큰 영상을 얻을 수 있었다. 그러므로 빠른 속도의 영상을 원한다면 압전소자를 이용한 방식을 사용하면 되고, 보다 넓은 영역의 영상을 원한다면 튜닝 포크를 이용한 방식을 사용하면 될 것이다.

광섬유를 직접 구동한 공초점 현미경은 크기가 작아 노트북에 연결하면 야외에서도 사용 가능하여 다양한 목적으로 폭넓게 활용이 가능하다. 생물학 분야에서는 세포간의 상호작용, 빛과 세포의 상호작용 등의 연구에 활용할 수 있고 피부를 잘 투과하는 광장의 레이저를 사용하면 피부를 떼어내지 않고 피부 속 0.5 mm 정도를 볼 수 있는 현미경이 될 것이다.

현재 본 실험실에서는 피부 속을 보기 위한 공초점 현미경을 개발하기 위한 하나의 단계로서 형광 신호를 이용한 공초점 현미경을 구성할 계획이다. Dichroic 거울과 Color filter를 이용하여 반사되어 돌아오는 빛을 선택적으로 검출할 수 있게 하고, 매우 약한 형광빛을 검출하기 위하여 광검출기 대신 APD(Avalanche Photodiodes)를 사용할 것이다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 지역대학우수과학자 지원연구비(R02-2001-00105) 지원으로 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- [1] J. Z. Young and F. Robert, *Nature*, vol. 167, p.231 (1951).
- [2] T. V. Higgins, "Microscopes probe the imperceptible," *Laser Focus World*, vol. 31, no. 3, pp. 89-95, 1995.
- [3] T. Wilson, ed., *Confocal Microscopy* (Academic Press, London, 1990).
- [4] S. Kimura and C. Munakata, "Three-dimensional optical transfer function for the fluorescent scanning optical microscope with a slit," *Appl. Opt.*, vol. 29, no. 7, pp. 1004-1007,

- 1990.
- [5] R. Ju kaitis, N. Rea, and T. Wilson, "Fiber-optic based confocal remote scanning microscopy using laser detection," *Opt. Commun.*, vol. 99, pp. 105-113, 1993.
 - [6] 이진서, 유석진, 조정석, 권남익, "반도체 레이저를 이용한 Scanning Confocal Microscope," *응용물리*, 제 9권 4호, pp. 440-443, 1996.
 - [7] 유석진, 김수철, 이진서, 권남익, "4분할 photodiode를 이용한 scanning confocal microscope," *한국광학회지*, 제 8권 2호, pp. 165-168, 1997.
 - [8] 김경신, 권남익, "마이크로 간섭계형 현미경의 특성 연구," *한국광학회지*, 제 10권 5호, pp. 369-372, 1999.
 - [9] 김대찬, 이승걸, "광섬유 공초점 간섭 현미경과 위상 변위 법을 결합한 표면 검색," *한국광학회지*, 제 10권 3호, pp. 201-207 1999.
 - [10] T. Wilson and C. J. R Sheppard, *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (Academic Press, London, 1984).
 - [11] T. Wilson, "Optical Sectioning in Confocal Fluorescent Microscopes," *J. Microsc (Oxford)*, vol. 154, pp. 143-156, 1989.
 - [12] C. Bertrand and P. Corcuff, "In vivo spatio-temporal visualization of the human skin by real time confocal microscopy," *Scanning*, vol. 16, pp. 150-154, 1994.
 - [13] M. Rajadhyaksha and J. M. Zavislan, "Confocal laser microscope images tissue in vivo," *Laser Focus World*, vol. 33, no. 2, pp. 119-127, 1997.
 - [14] M. Gu, C. J. R. Sheppard, and X. Gan, "Image formation in a fiber optical confocal scanning microscope," *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 8, no. 11, p. 1755, 1991.
 - [15] M. Bass, ed., *Handbook of Optics*, Vol. II (McGraw Hill Press, New York, 1995), Chap 17.
 - [16] A. B. Marchant, *Optical Recording* (Addison Wesley Press, New York, 1990), Chap 5.

Scanning confocal microscope by direct oscillation of an optical fiber

Jong-Bae Kim, Kwang-Hyun Ryu, Doosung Park, Jung-Eun Noh, and Namic Kwon[†]

Department of Physics, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin 449-791, KOREA

[†]E-mail: namic@hufs.ac.kr

(Received September 9, 2002, Revised manuscript December 5, 2002)

We have constructed a scanning confocal microscope by directly oscillating an optical fiber in two different ways. Either a piezoelectric transducer or a tuning fork was used for the oscillation. Six frames of 640×480 pixel image were obtained in a second with piezoelectric oscillation and only one image of the same size was obtained in a second with tuning fork oscillation. Oscillation of optical fiber did not cause any distortion of confocal images.

Classification code : SM.020.