

방사광 위상차 현미경을 이용한 생체조직의 미세구조 영상

강보선*, 이동열**, 김기홍***

대구가톨릭대학교 보건과학대학 방사선학과*, 대구과학대학 안경광학과**, 경운대학교 안경광학과***

Synchrotron Radiation Imaging of Tissues Using Phase Contrast Technique

Bosun Kang*, Dongyeol Lee**, Kihong Kim***

Department of Radiological Science, Catholic University of Daegu, Department of Ophthalmic optics, Taegu science college**, Department of Visual Optics, Kyungwoon University****

요약

방사광 X-선 현미경은 임상실험에 유용한 도구로 높은 배율과 고 해상도로 동물 장기조직 시료의 세부 구조를 관찰할 수 있다. X-선 영상은 위상 대조도 메커니즘으로 설명할 수 있다. 우리는 쥐의 꼬리, 신경 및 허파의 in-vivo 및 in-vitro 위상 대조도 영상을 8 KeV mono 빔으로부터 10배 현미경대물렌즈와 CCD 카메라를 이용하여 얻었다. 기존의 흡수 X-선 영상 보다 SR 영상이 세밀한 구조의 높은 분해능 영상을 볼 수 있었다. SR 영상은 생물학, 재료 및 임상 연구에 무한한 가능성을 가지고 있다.

Abstract

X-ray microscopy with synchrotron radiation(SR) might be a useful tool for novel x-ray imaging in the clinical and laboratory settings. Microscopically, it enables us to observe detailed structure of animal organs samples with a great magnification power and an excellent resolution. The phase contrast mechanisms in image by X-ray are described. The phase-contrast X-ray imaging with SR from in-vivo and in-vitro mouse tail, rat nerve and rat lung were obtained with an 8 KeV monochromatic beam. The visual image was magnified using 10x microscope objective lens and captured using an digital CCD camera. The results showed more structural details and high resolution images with SR imaging system than conventional X-ray radiography system. The SR imaging system may have a potential for imaging in biological researches, material applications and clinical radiography.

Key word : Synchrotron radiation, Mouse tail, Nerve, Lung, X-ray

I. 서론

방사광(synchrotron light)은 빛의 속도에 매우 가깝게 빠른 속도로 운동하는 전자(또는 양전자)가 방향을 바꿀 때, 운동궤도곡선의 접선방향으로 방출하는 좁은 퍼짐의 빛을 말한다. 우리가 흔히 빛(light)이라 하며 파장이 약 4000 Å에서 6500 Å에 이르는 가시광선만을 뜻하나 가시영역은 전자파 스펙트럼 영역의 극히 일부분에 지나지 않는다. 넓은 의미로서 적외선에서 X-선에 이르기까지 전자파를 빛이라 부르며 이를 방사광 또는 싱크로트론 광(synchrotron light)라 한다. 전자파의 파동적 성질 때문에 물체를 관찰하려 할 때는 식별 가능한 한계, 즉 분해도(resolution)가 존재하며 분해도는 전자파의 파장과 밀접한 관계가 있다. 예를 들면 항공기나 전함을 식별하는 데는 파장이 미터단위의 마이크로웨이브를 이용한 레이더로도 관찰이 가능하지만, 세포를 관찰하려면 가시광선을 이용한 현미경을 사용해야 하며 원자수준의 물질의 미세구조를 조사하기 위하여 파장이 더욱 짧은 전자파인 X-선이나 전자현미경을 이용해야 그 목적을 달성할 수 있다¹⁾.

윈트겐에 의해 100 여년 전 부터 시작된 X-선을 이용한 영상법은 20세기말부터 가속기를 이용한 광원의 발달과 컴퓨터의 발달에 의해 실시간으로 높은 분해능의 영상을 얻는 것이 가능해져, 전세계의 많은 과학자들에 의하여 다양한 분야에서 활용되고 있다. 의료영상을 얻는 목적의 X-선 사용은 일반 촬영, 투시촬영, 골밀도 측정, 유방촬영, 컴퓨터 단층 촬영 등의 다양한 분야에 적용되고, 치료 목적의 X-선 사용도 꾸준히 증가하여 질병의 진단과 치료에서 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 기존의 X-선관을 이용하여 얻은 영상은 X-선관의 유한한 크기의 초점(focal spot)으로 인한 공간 분해능의 한계와 주로 투과되는 물체의 X-선 흡수도 차이에 의한 대조도로 영상화하기 때문에 유방 촬영술에서와 같은 감쇠계수(attenuation coefficient)가 비슷한 연조직(soft tissue)에서는 상세한 영상정보를 제공하는데 한계가 있는 것으로 알려져 왔다

최근 방사광을 이용한 영상이 소개되었는데 방사광은 빔의 세기가 크고, 퍼짐성이 작고, 파동의 진행방향이 일치하는 등의 우수한 여러 성질을 가지고 있다. 이러한 특성으로 방사광을 사용하여 고분해능의 영상 획득과 연조직의 경계부분에서 두드러지는 위상차 대조도 효과에 의한 높은 대조도의 영상을 얻는 방법이 연구되고 있다⁴⁻⁵⁾.

위상차 대조도 효과는 X-선에 의한 물질 투과 후 발생하는 위상차(phase shift)에 의한 효과를 이용하는 방법이다. X-선 영역에서 매질 사이에 굴절률은 $n=1-\delta-i\beta$ 이다. 여기서 i 는 복소수를 나타내며, β 는 X-선의 흡수에 관련된 항(absorption term)을 나타내며, δ 는 위상에 관련된 항(phase term)으로서 물질을 투과한 후 굴절과 관련된 양이다⁶⁾. 의학, 재료공학 등에서 오랫동안 이용되어 왔던 종전의 X-선 투과영상법(radiography)은 경X-선(≥ 6 keV) 영역에서 시료의 각 부분에서의 흡수계수의 차이에 의한 대조도에 의존하는 방법이며 산란이나 굴절된 X-선은 검출되지도 이용되지도 않는다. 밀도가 낮은 물체는 경X-선에 대하여 거의 투명하기 때문에 종전의 투과영상방법에서는 대조도를 얻을 수 없었다. 예를 들면 인체의 X-선 투영영상 사진을 보면 주로 밀도가 큰 뼈는 잘 보이지만 연한 조직에 대한 대조도는 약하여 정확한 식별이 어려울 때가 많다. 일반적으로 X-선 광에너지는 E 가 증가함에 따라 흡수는 급격히 작아지는데 반하여 위상에 의한 콘트라스트는 그것보다 천천히 떨어진다. 즉, $\delta \propto E^{-2}$ 인 데 비하여 흡수는 $\beta \propto E^{-4}$ 이며, 생체조직인 경우, 위상 변화항은 흡수항에 비하여 100배 가량 크다. 이러한 관점에서 밀도가 작은 물체에 대해서는 흡수에 의한 것 보다는 경X-선을 사용해서 위상 대조도, 즉 δ 에 의한 효과는 굴절에 의한 파면의 변형으로 나타나게 되고, 이러한 위상차이를 검출하기 위해 다양한 방법이 연구되고 있다. 위상차를 이용한 X-선 영상법은 현재 크게 간섭형(interferometry), 회절형(diffraction enhanced)과 위상차 대조도(phase contrast)형으로 나눌 수 있다. 간섭형은 X-선의 간섭을 얻기 위한 3개의 완전히 일치하는 결정체를 서로 평행하게 배치하고 입사

된 X-선은 각각의 결정체와 라우에 반사(Laue reflection)를 일으켜 분리되었다가 다시 합쳐지는데, 합쳐지기 전 한쪽에 측정하고자하는 물체를 놓으면 물체를 투과한 쪽의 X-선은 위상차가 생기거나 찌그러지게(distortion)되고, 빔이 합쳐질 때 한쪽의 아주 작은 변화만으로도 간섭 무늬패턴(fringe pattern)이 민감하게 반응함을 영상으로 얻는 방식이다. 회절형 X-선 영상법(diffraction enhanced imaging: DEI)의 특징은 단색 경X-선이 시료를 투과한 X-선은 분석기(analyzer)라 부르는 결정(crystal)으로 입사되어 반사되는데, 산란되고 위상이 변화한 X-선은 미세한 각도차이를 가지고 분석기에 입사되고, 분석기의 반사각도와 일치하는 빔과 일치하지 않는 빔을 미세한 각도변화로써 회절을 일으켜 영상을 얻는 방법이다. 위상차 대조도 영상법은 평행으로 시료에 입사한 X-선 빔이 시료/공기의 경계면에서 굴절하여 직진에서 약간 벗어나게 된다. 생물 시료의 경우 대략 10 ~ 30 keV의 X-선 에너지에서 1 ~ 10 μ rad의 작은각의 구부러짐이 생기며 이것은 시료에서 1 m 떨어진 곳에서 1 ~ 10 μ m의 매우 작은 비김을 가져온다. 이 비김은 시료표면과 공기의 경계면에서 뿐만 아니라 시료 내에서 약간의 굴절률의 차이가 있는 곳마다 생겨 X-선파 전면(wave front)의 부분 부분에 따라 달라지며 직진하는 X-선과와의 사이에 위상차로 인한 강한 간섭무늬가 생긴다. 검출기를 시료 바로 뒤에 놓으면 간섭무늬가 나타나지 않고 통상적인 흡수에 의한 투과윤곽 영상을 얻고, 시료와 검출기 사이의 거리가 증가함에 따라 각 부분으로 부터 간섭무늬는 점점 현저해져서 어느 적당한 거리에서는 시료로의 상을 선명하게 나타나는 영상정보를 얻는 방법이다. 이것은 흡수에 의한 것이 아닌 순전히 위상 변화에 의한 대조도이며 이때의 거리는 Fresnel 회절영역을 나타낸다. 이 거리는 시료와 X-선의 에너지에 따라 다른 값을 갖는다.

본 실험에서는 포항가속기연구소 PLS(Pohang Light Source) 1B2 빔 라인에서 위상차 대조도 영상법을 이용하여 동물 조직의 영상을 획득하여 그 특성을 비교 분석하고자 한다.

II. 재료 및 방법

본 연구에 사용된 빔은 포항가속기연구소 PLS 1B2 빔라인에서 제공하는 빔으로 적외선부터 경 x-선(0.1-2Å 파장영역)영역을 걸치는 white beam과 분광기(monochromator)를 통과한 8 keV(약 1.5Å 파장영역) 단파장영역의 빔(mono beam)을 사용하였다. White beam은 광의 세기는 매우 강하나 파장영역이 광대역이라 좋은 빔이라 할 수 없고, mono beam은 white beam의 파장영역 중에서 가장 세기가 큰 파장영역의 빛만을 뽑아낸 것으로 질이 좋은 단파장임에 반해 광의 세기가 white beam에 비해 상대적으로 약한 단점을 가지고 있다. 검출기 시스템은 신칠레이션 결정(scintillation crystal), Au 거울, 현미경 대물렌즈, CCD 카메라와 PC이다. 신칠레이션 결정은 표면을 0.1 μ m 이하의 표면조도를 갖도록 연마한 CdWO₄ 조각으로서, 0.475 μ m에서 최대방출 파장을 갖는다. 현미경 대물렌즈의 배율과 numerical aperture(NA)는 각각 10x과 0.25였다. 이들은 0.475 μ m 파장과 함께 7.6 μ m의 초점심도(depth of focus)를 줄 수 있다. 실험에 사용할 수 있는 CCD 카메라는 2종류가 있다. 하나는 디지털 출력 뿐만아니라 아날로그가 가능한 것으로 9 μ m 사각 픽셀을 갖는 1018 x 1018 픽셀들을 갖고 있으며, 다른 하나는 단지 아날로그가 가능한 7.4 μ m 사각 픽셀을 갖는 2047 x 2047 픽셀들을 갖고 있는 것이다. 10배의 현미경대물렌즈를 사용하기 때문에 실제 field of view는 각각 910 x 910 μ m²과 1520 x 1520 μ m²이 된다. 이와 같이 시료와 detector간의 거리를 조절하여 시료를 통과한 phase contrast 영상을 scintillator(CdWO₄)를 이용하여 X-선image를 가시광선 image로 전환하고, 현미경대물렌즈로 확대하여 마이크로 분해능이 가능하게 한 후, CCD camera를 통해 영상화한다. 이장치를 이용한 최고의 분해능은 1.2 μ m까지 가능하고, 그림 1은 본 실험에 사용되어진 실험장치의 개략도이다.

시료는 mouse의 꼬리, rat 좌골신경 및 rat 허파이며, 이는 절단하거나 염색하지 않고 조직자체를 X-Y-Z 이동 스테이지의 시료걸이에 고정 후 촬영

하였다. X-선이 시료를 통과하면서 조직내부의 구조에 따라 위상차 대조도 정보를 제공하는 SR 영상을 얻을 수 있다. 그리고 방사광으로 영상을 얻은 동일한 조직표본을 포르말린으로 고정 후 조직

처리 과정을 거친 후 프라핀 블록을 만들고 미세 절단기로 절단하고 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

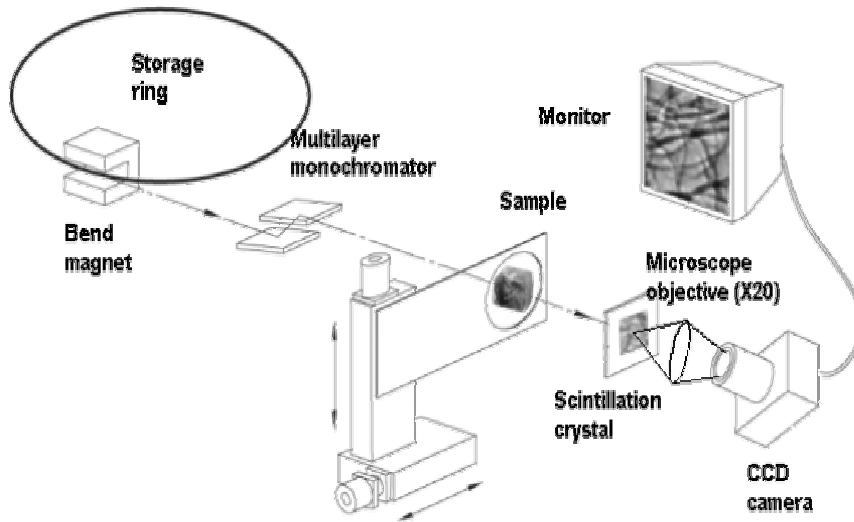
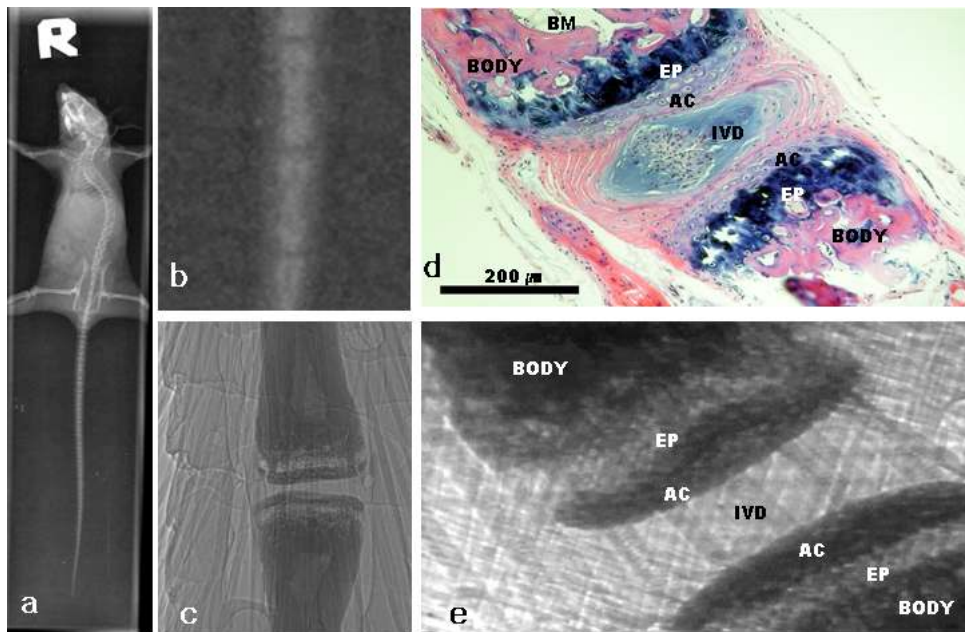


그림 1. The layout of the PLS 1B2 beamline optic. A X-ray microscope was installed on the 1B2 beamline of a Pohang Light Source, at a third generation synchrotron radiation facility in Pohang Korea.

III. 결과 및 고찰

본 연구에서는 방사광 mono beam(8keV)을 사용하여 여러 가지 생체 조직을 관찰하였다. 그림 2는 mouse의 꼬리부분으로 a와 b는 기존의 흡수대비법인 X-선 영상촬영 시스템을 사용하여 영상촬영한 것이고, c와 e는 위상대조도법으로 PLS 1B2에서 영상촬영한 것이다. 그리고 d는 조직을 고정 염색 후 광학현미경으로 관찰한 사진이다. 그림 c는 그림 b

에 비해 경계부분이 질게 이미징되며, 꼬리뼈 중앙의 두꺼운 부분을 통과하더라도 흡수에 기인하여 어두워지는 현상이 나타나지 않음을 알 수 있다. 그리고 그림 d의 현미경사진과 같이 epiphyseal plate(EP), articular cartilage(AC) 및 intervertebral disc(IVD)을 선명하게 구분할 수 있다. 이와 같이 SR 영상이 기존의 흡수대비법 보다 우수하다는 것과 번거로운 고정염색 후 영상을 얻는 광학현미경보다 더욱 간단하게 in-vivo 영상촬영을 할 수 있다는 것이다.



* EP: epiphyseal plate, AC: articular cartilage, IVD: intervertebral disc

그림 2. Tail bone of the mouse shown close relationship between conventional X-ray(a, b), Microscopic(d) and Synchrotron radiation(SR) image(c, e).

그림 3은 rat의 정상 신경(peripheral nervous)을 기존의 조직학적 기법으로 얻은 영상과 비교하였다. 직경이 1mm 정도 되는 손상을 받지 않은 정상적인 신경부분의 방사광영상은 일반적인 광학현미경에서 관찰되는 것과 같이 신경섬유(nerve fiber)들이 규칙적으로 평행하게 배열되어 있는 모양을 자세히 보여주고 있다. 신경섬유는 축삭(axon)과 신경집(neurilemma)으로 구성된다. 말초신경계통의 모든 축삭은 신경집을 갖고 있는데 이 신경집은 축삭의 시작부에서 약간 떨어진 곳에서부터 말초 가까이 까지 존재하며, 신경집속에 지질단백질복합체(lipoprotein complex)로 된 말이집(myelin sheath)이 축삭을 둘러싸고 있다. 정상좌골신경(sciatic nerve)의 위상차 대조도 SR영상에서 각 신경섬유의 말이집 형상들이 분명한 연속적 라인으로 잘 보이고 있다. 이는 기존의 흡수대비법인 X-선 영상촬영 시스템으로는 해당 영상을 얻기 어렵다. 왜냐하면 신경섬유에서 지질이 많이 함유하고 있는 말이집은

낮은 X-선 흡수 능력을 가지고 있기 때문이다. 그러나 3세대 방사광은 잘 collimated 된 빔, 매우 작은 입체각을 통하여 나오는 강도가 센 빔을 가장 효율적으로 사용할 수 있다⁷⁻⁸⁾. 따라서 절단이나 염색하지 않고 말초신경 전체 두께(직경 약 1mm)의 영상을 통하여 신경섬유 및 신경섬유의 배열들을 관찰 할 수 있었다. 위상차 대조도 방사광영상법은 인위적인 조작을 최소화한 상태에서 신경의 미세구조변화를 개체에서 곧바로 관찰 할 수 있다는 점에서 신경병변의 진단과 치료효과를 판단에 있어서 획기적인 방법으로 활용 될 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 신경섬유에서 축삭의 직경은 1.5 μm 이상이 되지 않기 때문에 SR영상에서는 축삭은 보이지 않았다⁹⁻¹⁰⁾. 이는 광학현미경에 비해 좀 더 SR 위상차대조도 방식을 잘 이해하고 관련 기술을 개발한다면, 생체 조직의 좀 더 세밀하게 직접적으로 가시화 할 수 있을 것이다.

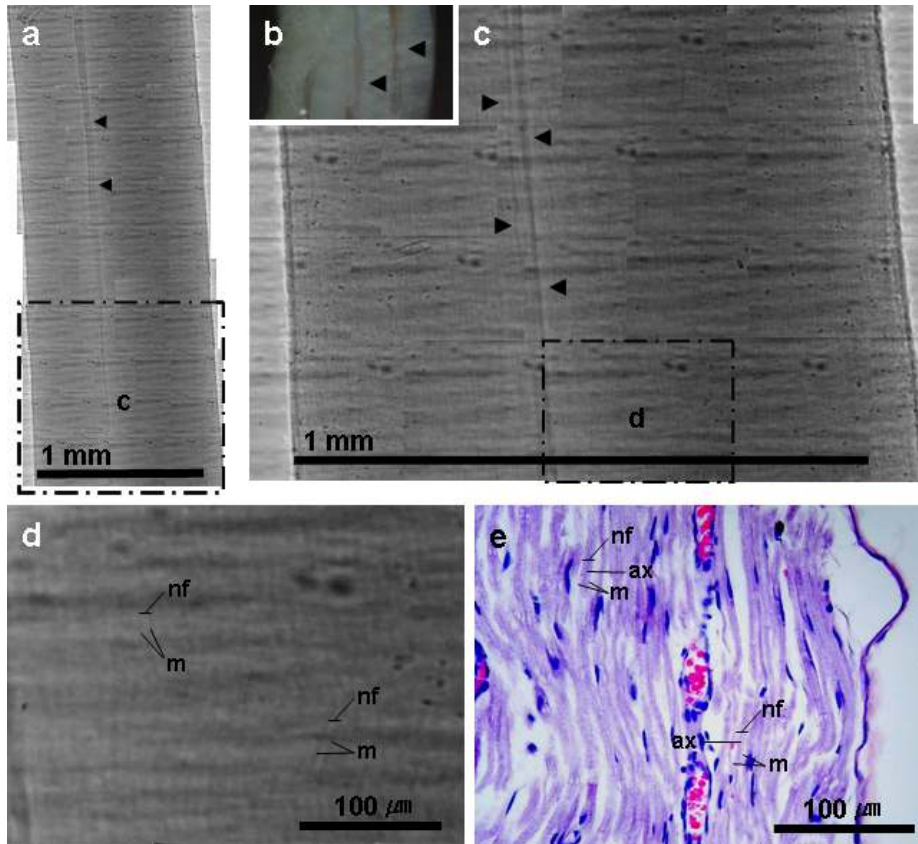


그림 3. Phase contrast synchrotron radiation micrographic images(a, c, d), photograph(b) and histologic image(e) of normal rat sciatic nerve. (a) and (b) Composite X-ray micrographs of whole thickness of a nerve sample show nerve fibers running regularly parallel and blood vessel (arrow head). (d) Single captured SR image of 320µm x 240µm field of view allows us to identify myelinated nerve fibers (nf) surrounded by a myelin sheath (m) as detail as histologic image (e), but axons (ax) are not readily visible on SR image^[11].

그림 4는 rat의 정상 허파(lung)조직의 주변구조(peripheral structures)의 SR 영상(a, b)와 광학 현미경 영상(c)을 나타내었다. 허파는 대부분 주머니 모양의 허파파리로 이루어지고 허파파리벽에 분포한 모세혈관의 혈액과 허파파리내의 공기 사이에 가스교환이 일어난다. 허파파리관(alveolar duct), 허파

파리주머니(alveolar sacculle)를 비롯하여 허파파리(alveolus) 및 모세혈관도 잘 관찰 되고 있다. 임 등이 연구한 미세 전산화 단층촬영(micro-CT) 영상이나 다검출기 전산화 단층촬영(MDCT) 영상보다 높은 분해능을 보여주었다^[12].

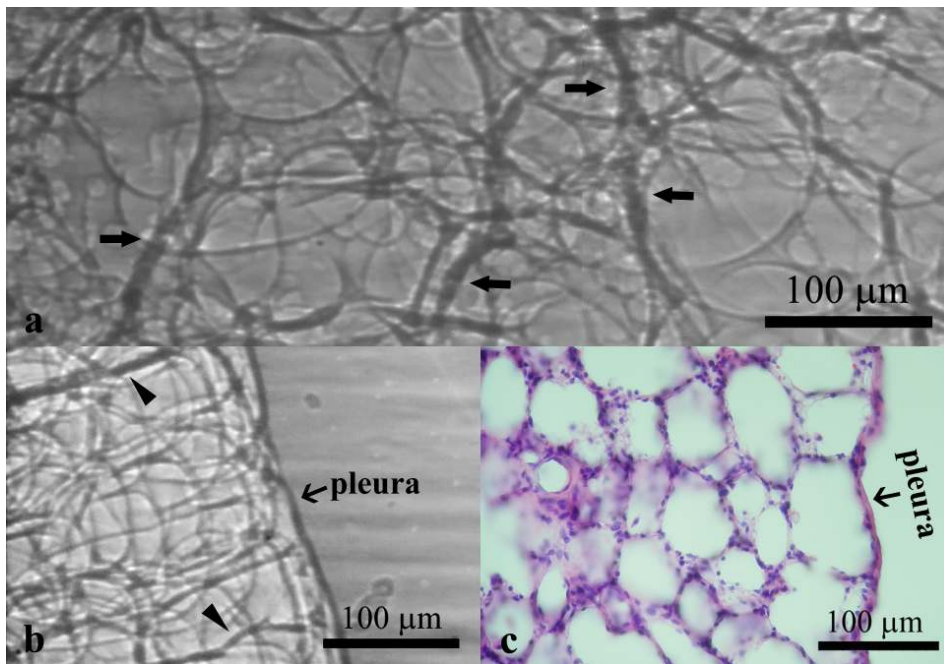


그림 4. Synchrotron radiation(SR) images(a,b) and an optical microscopic image(c) of the peripheral structures of normal rat lung. The SR images show well-developed perialveolar capillary network(thick arrows). Red blood cells in capillaries appear as dark spots(a). The venules(arrowheads) in the interlobular septum are clearly visualized(b)^[13].

본 연구에서 얻은 영상의 해상도는 1.2 μm 로 수백 μm 해상도의 전산화단층촬영이나 자기공명영상보다 훨씬 더 높은 해상도이며, 0.2 μm 해상도의 광학현미경에 근접한 해상도를 가져 생체조직의 미세구조를 보여주기에도 충분하다고 할 수 있다. 따라서 형태학적 변화가 생기는 초기단계의 미세한 구조들의 영상의 병리상태를 진단하는 것은 임상적으로 매우 중요하다고 할 수 있다. 또한 기존의 전자현미경이나 광학현미경의 촬영기법은 표본을 자르고 염색하는 등의 많은 조작이 필요하여 며칠 후에나 알 수 있었던 정보를 방사광을 이용한 위상차현미경은 표본조작 과정이 거의 없이 조직내부를 원래의 상태 그대로 촬영할 수 있다는 점에서 중요한 의의를 지닌다고 하겠다.

IV. 결 론

방사광 X-선을 이용하여 위상차 대조법으로 쥐의 꼬리, 좌골신경 및 허파 생체조직의 in-vivo 및 ex-vivo 영상을 촬영하였고, 기존의 흡수 X-선 영상 시스템에 비해 고 분해능 영상을 얻을 수 있었고, 미세한 병변에 대한 진단으로 기초의학 영상 연구 측면에서 많은 정보를 제공해 주었다. SR 영상장치는 앞으로 X-선 영상획득분야 및 해부학적, 병리학, 임상학적 영상의학 분야에 효과적으로 응용할 수 있을 것으로 기대된다. 이를 위하여 최적의 영상획득조건 확립, 영상획득 자동화 시스템 구축, 선량측정 및 노출시간을 정량적으로 조절할 수 있는 시스템 연구 및 수치적 영상 해석 연구가 지속적으로 계속되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

- [1] 이동녕, 신현준, 방사광과학입문, 청문각, 서울 2003.
- [2] Dance D. R, Diagnostic radiology with X-ray. In: Webb S, ed. The Physics of medical imaging , Bristol, England: Institute of Physics Publishing,1988, pp.20-26.
- [3] D. Chapman, W. Thomlinson, R.E.Johnston, et. al.: Diffraction enhanced X-ray imaging, Phys. Med. Biol. 42, 1997, pp.2015.
- [4] Longo R, Pani S, Arfelli F, Dreossi D, Morphological breast imaging: tomography and digital mammography with synchrotron radiation, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A, 497, 2003, pp.9-13.
- [5] Weisheng Y, Guilin Zhang, Ping Liu, Jianqi Sun, Yeukuang Hwu, Jung Ho Je, Mingguang Tan, Yan Li, Aerosol-induced lung injuries observed by synchrotron radiation X-ray phase-contrast imaging technique, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: 262(2), 2007, pp.304-312.
- [6] Fulvia Arfelli, Valter Bonvicini, Alberto Bravin et. al. "Mammography with synchrotron Radiation: Phase-detection techniques." Radiology 2000, 215, 200, pp.286-289.
- [7] Meuli R, Hwu Y, Je JH, Margaritondo G. . Synchrotron radiation in radiology: radiology techniques based on synchrotron sources. Eur Radiol 14, 2004, pp. 1550-1560.
- [8] Momose A. Recent advances in X-ray phase imaging. Jap J Appl Phys 44, 2005, pp 6355-6367
- [9] Chau W. K, So K. F, Tay D, Dockery P. 2000. A morphometric study of optic axons regenerated in a sciatic nerve graft of adult rats. Restor Neurol Neurosci 16, 2000, pp.105-116.
- [10] Kunii N, Goto N, Matsumoto K, Kawamura N. Morphometric comparison of the human optic nerve fiber with various other human nerve fibers. Neurol Med Chir 39, 199, pp.922-927.
- [11] B. I. Kim, K. H. Kim, H. S. Youn, S. Jheon, J. K. Kim and H. Kim, Microsc Res Tech 71, 2008, pp. 443-447
- [12] 임근영, 이현주, 이창현, 손규리, 서준범, 구진모, 임정기, 동물 폐 표본에서의 해부학적 구조물과 병리적 병변, 대한영상의학회지 54, 2006, pp.385-391.
- [13] S. Jheon, H. S. Youn, H. T. Kim, G. H. Choi, and J. K. Kim, Microsc. Res. Tech. 69, 2006, pp.656-659.