

고속 선주사 공초점 레이저 현미경의 개발

Development of high-speed line scanning confocal laser microscope (HLS-CLM)

한수민, 임강빈, 박화준, 김법민
 연세대학교 보건과학대학 의공학과
 pico1213@hanmail.net

공초점 현미경은 안구검사, 안질의 조기 진단, 치료중의 질병의 추이나 발전 정도를 관측하는데 상당히 유용하다[1]. 특히 각막 내피세포는 감염으로 인한 손상시, 재생 불가능한 조직으로 조기 진단이 중요하다. 안구는 1°~10°(0.1~2.0mm까지)와 100~800°/s(22~170mm/s)의 속도로 상당히 빠른 안구 운동을 한다. 안구의 빠른 움직임 때문에 각막 내피세포를 고속, 고해상도로 이미지를 얻을 수 있는 in-vivo 공초점 현미경이 필요하다.

일반 공초점 주사 현미경은 크게 두 가지 방식으로 구성된다. 첫째, 레이저로 샘플에 초점을 맺는 점주사 방식은 두개의 resonant 갈바노미터(~15 frames/sec)나 polygon(~4 frames/sec)을 주사 장치로 쓰고, CCD나 PMT 등으로 빛을 검출한다. 둘째, 현재 frame rate가 가장 빠른 Nipkow disk(~360 frames/sec)는 다수의 마이크로 렌즈를 사용한 주사장치로 2차원 CCD로 검출한다. 레이저 점주사 방식은 분해능은 Nipkow disk에 비해 상대적으로 높으나 파장에 제한을 받고 갈바노미터의 scan rate로 인해 영상 재생 속도에 제한을 받고, Nipkow disk는 다 파장의 백색광원을 사용하나 광원의 손실이 커 분해능이 감소하고, 장착된 다수의 고가의 마이크로 렌즈를 채택하여 상당히 고가이고, 데이터 획득 속도의 제한으로 실제 frame rate는 video rate 정도 밖에 안 된다. 또한 이 두 방식은 입사빔과 광검출기 사이의 동기화를 위한 다수의 고가 장비가 요구된다. 본 연구에서는 이러한 장·단점들을 적용·보완하여 그림 1과 같이 HLS-CLM 방식을 제안하고, 그림 2에서 mirror를 사용해 반치폭(FWHM)이 5.67um으로 시스템 성능을 평가하였다.

그림1의 HLS-CLM의 광원인 He-Ne(633nm)는 실선을 따라 scanner인 AOD(Acousto-optic deflector)[3]에 의해 수평 주사 되고, 다시 Cylindrical 현미경 광학계에 의해 선광원으로 초점을 맺어 샘플에 조사된다. 샘플에서 반사된 빛은 점선을 따라 AOD와 PBS를 거쳐 슬릿을 통과한 빛만이 line scan CCD에서 검출된다. CCD에서 검출된 이 신호를 frame grabber를 이용하여 영상 획득 장치를 구

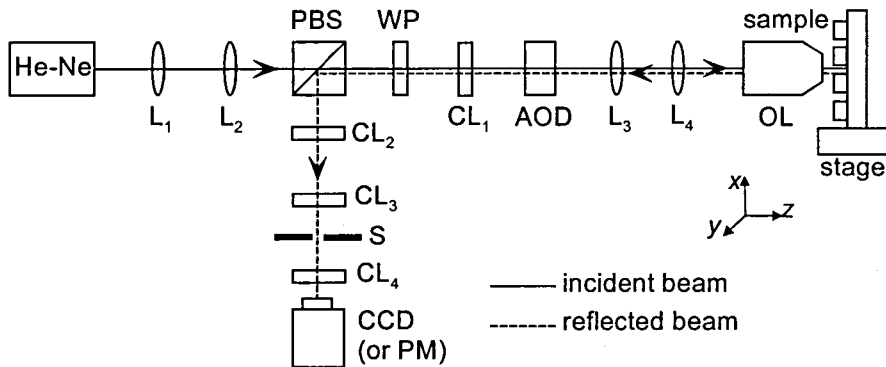


그림 1 Schematics of the HLS-CLM

현했으며, line CCD의 frame rate는 67KHz로 약 60 frame/s(512 pixel by 512 pixel), 약 130 frame/s(512 pixel by 256 pixel)의 실시간 영상을 획득하였다. 본 연구는 이러한 고속, 고해상도 영상 형성 장치 및 방법을 개발 하였고, 그림3의 우측 영상은 깊이차가 3 μ m인 미세구조를 본 시스템으로 획득 영상이며, 그림3의 좌측 상단은 획득한 영상으로 삼차원 재구성한 것이고, 좌측 하단은 SEM과 광학 현미경으로 얻은 미세구조 영상이다..

현재 토끼 안구를 이용한 동물 실험이 진행 중이며, 지속적인 시스템 평가를 통하여 시스템 최적화가 진행 중이다.

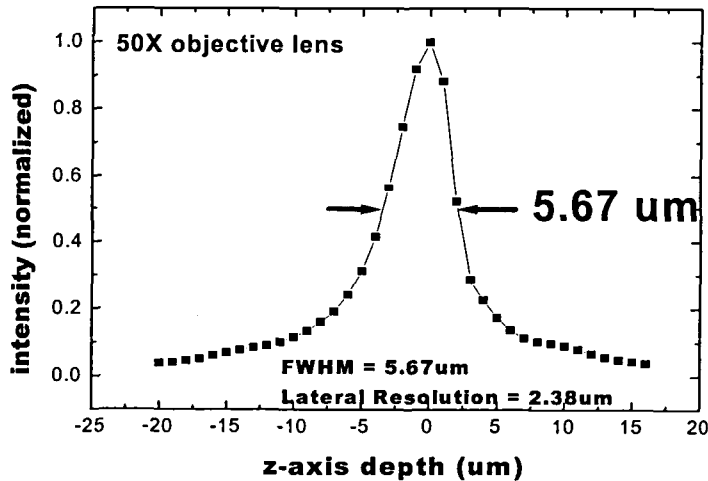


그림 2 Measurement of Axial resolution

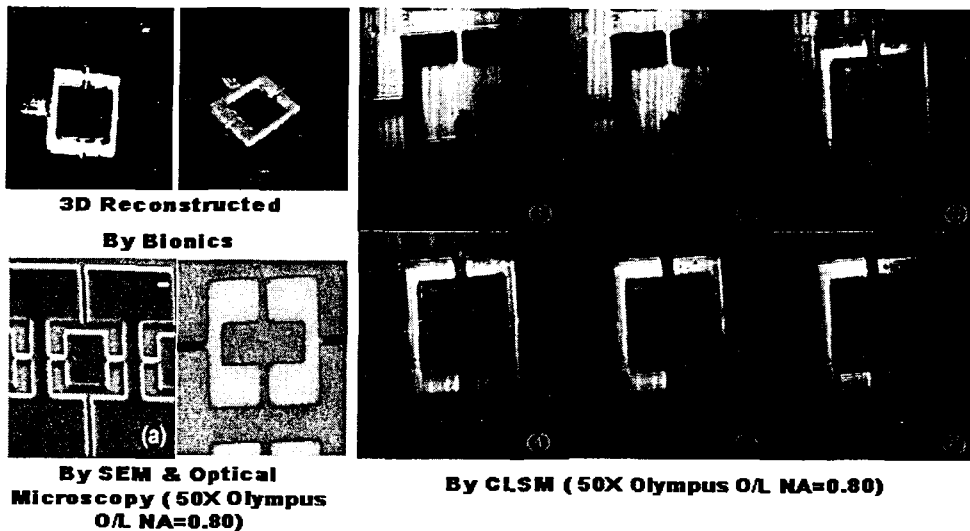


그림 3 After optical sectioning, 3D Reconstruction of Images

- [1] Matthias Bohnke, Barry R. Masters Progress in Retinal and Eye Research Vol. 18, No. 5, pp. 553 to 628, 1999
- [2] Robert H Webb Rep. Prog. Phys. 59 (1996) 427-471.
- [3] Milton Gottlieb "Electro-Optic and Acousto-Optic Scanning and Deflection"