

위상 이동 디지털 홀로그래피 현미경을 이용한 위상 단층 촬영

Phase contrast tomography using phase-shifting digital holographic microscopy

전윤성, 강전웅, 정승준, 이정현, 홍정기

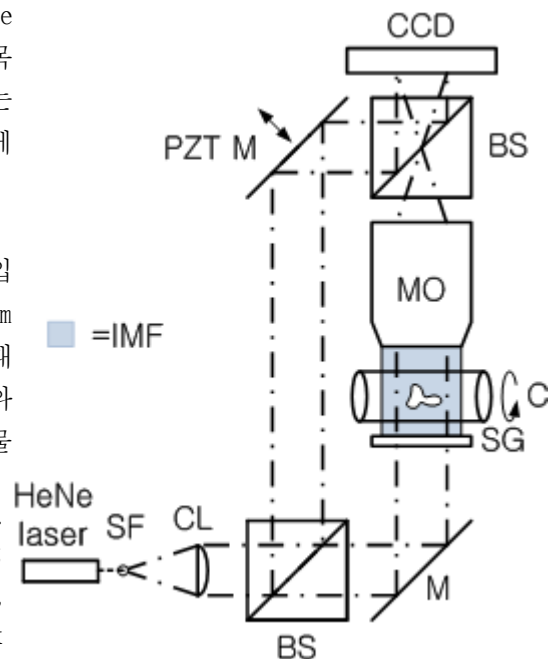
포항공과대학교 물리학과 응용 광학 실험실

artemis@postech.ac.kr

디지털 홀로그래피는 필름에 홀로그램을 기록한 후 기준광을 조사해서 상을 재생하는 고전적 홀로그래피와 달리 CCD를 이용해 홀로그램을 기록하고 계산을 통해 파면을 재생한다.⁽¹⁾ 이런 계산을 이용한 재생은 물체과의 위상 정보를 제공하며, 위상 정보에는 상대적인 광학 경로 차이를 포함한다. 광학 경로 차이의 원인은 굴절률과 길이이며, 주로 우리는 이 두 가지 정보 중 하나에 대한 사전 정보나 가정을 통해 알고자 하는 나머지 정보를 획득한다.⁽²⁾ 특히 길이와 굴절률의 상관 관계에 대한 고찰은 현재 생명 과학 분야에 대한 응용 가능성 때문에 많은 연구가 진행되고 있으며, 광학 시스템이 가진 회절 한계의 횡방향 분해능과 파장 이하의 축방향의 위상 정확도를 지니고 있다.⁽³⁾⁽⁴⁾ 그러나, 이러한 2차원의 위상 정보는 두께를 지닌 투명한 샘플을 투과한 후의 정보이기 때문에, 광학 축 방향에 대한 위상 분포가 모두 합산된 결과이다. 예를 들어 세포를 투과한 위상을 통해 길이 정보를 획득할 경우 그것은 세포의 모양이 아니라 두께의 분포로 그 한계를 지닌다.⁽³⁾⁽⁴⁾ 이에 3차원 광학 회절 단층 촬영 방법을 적용하여 굴절률의 3차원 분포를 결정할 수 있다. Wolf, Dändliker, Weiss는 측정 대상에 서로 다른 각도로 조사한 후 물체로부터 약하게 산란된 정보를 이용하여 측정 대상의 3차원 재생에 대한 연구를 수행하였으며 이론적 배경을 확립하였다.⁽⁵⁾⁽⁶⁾ F. Charrière는 off-axis 디지털 홀로그래피와 광학 회절 단층 촬영법을 접목하여 꽃가루의 굴절률 공간 분포를 측정하였다.⁽⁷⁾ 우리는 off-axis방법 대신에 위상 이동 방법을 홀로그래피 단층 촬영에 도입하여 더 나은 위상 정확도와 낮은 편차를 확보하고자 한다.

그림 1. 은 투명한 대상을 측정하기 위한 Mach-Zender 타입의 홀로그래피 현미경의 set-up이다. 광원으로는 파장이 632nm 인 10mW의 HeNe laser를 사용한다. 레이저로부터 나온 광선은 대물 렌즈(40× 0.65)와 편홀(10μm)로 구성된 spatial filter와 plano-convex 렌즈를 지나 평행광이 된다. Beam splitter에서 물

그림 1. 단층 촬영용 투과형 위상 이동 홀로그래피 현미경. SF, spatial filter; CL, colimating lens; BS, beam splitter; M, mirror; PZT M, piezo-translator attached mirror; SG, slide glass; C, capillary; MO, micro objective; IMF, index matching fluid.



체광과 기준광으로 나뉘지며, 기준광은 piezo-translator가 부착된 거울에서 반사되며, 물체광은 측정 대상을 투과 후 대물 렌즈를 통과한다. 기준광과 물체광은 beam splitter에서 합쳐져 CCD에 조사된다. 사용한 CCD는 1024×768 개의 화소를 가지며, chip 크기는 5.80×4.92 mm이고 영상 획득률은 최대 30Hz이다. 다른 조사 방향에서의 정보가 필요하므로 측정 대상이 들어 있는 모세관(C, capillary)은 180° 회전한다, 2° 의 차이를 가진 각도에서마다 위상 이동된 영상을 기록하며, 90개의 각도별 정보는 3차원 분포를 재생하기에 충분하다.

생물학적 측정 대상들은 대개 빛이 잘 투과되고 투과하는 동안에 회절이 크지 않다. 그리고, 측정 대상을 포함한 모세관도 IMF 내에 위치하므로 측정 대상을 투과하는 평면 물체광은 광학축에 평행하게 진행한다. 측정 대상의 3차원 굴절률 분포를 결정하기 위해서 2가지의 가정이 필요하다. 첫 번째는 물체광이 투과하는 SG와 MO사이의 두께가 균일해야 한다는 것이고 두 번째는 측정 대상을 제외한 나머지 투과 물질의 굴절률이 공간적으로 일정해야 한다는 점이다. 이러한 가정과 관계식 $\phi(x,y) = \int \frac{2\pi}{\lambda} n_o(x,y,z) dz$ 을 통해 측정 대상의 굴절률 평면 분포를 결정할 수 있다. $\phi(x,y)$ 는 홀로그램의 재생을 통해 획득한 측정 대상으로 인한 2차원 위상 분포이며, $n_o(x,y,z)$ 는 측정 대상의 3차원 굴절률 분포이다. 이러한 각기 다른 조사 각도에서의 2차원 굴절률 평면 분포를 inverse Radon transform을 이용하여 $n_o(x,y,z)$ 을 결정한다.

1. U Schnars and W. Jüptner, "Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction", Applied Optics Vol. 33, 179-181(1994).
2. Benjamin Rappaz, Pierre Marquet, Etienne Cuche, Yves Emery, Christian Depeursinge and Pierre J. Magistretti, "Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy", Optics Express Vol. 13, 9361-9373 (2005)
3. Pierre Marquet, Benjamin Rappaz, Pierre J. Magistretti, Etienne Cuche, Yves Emery, Tristan Colomb and Christian Depeursinge, "Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy", Optics Letters Vol. 30, 468-470 (2005)
4. Christopher J. Mann, Lingfeng Yu, Chun-min Lo and Myung K. Kim, "High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography", Optics Express Vol. 13, 8693-8698 (2005)
5. Emil Wolf, "Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data", Optics Communications Vol. 1, 153-156 (1969)
6. R. Dändliker and K. Weiss, "Reconstruction of the three-dimensional refractive index from scattered waves", Optics Communications Vol. 1, 323-328 (1970)
7. Florian Charrière et al, "Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy", Optics Letters Vol. 31, 178-180 (2006)