

### 1. 서론

스타워즈에서부터 마이너리티 리포트까지 SF 영화의 단골 소재로 3차원 디스플레이의 미래를 상징하는 홀로그램의 기원은 놀랍게도 현미경이다. 1948년 Gabor는 렌즈 없이 미소 물체(microscopic object)의 상을 얻기 위해 물체로부터 투과된 회절 패턴의 간섭패턴을 촬영했고 이를 복원해 물체의 상을 얻었다 [1]. 이것이 최초의 홀로그램이었다. 미래 3차원 디스플레이의 대명사가 되어있는 홀로그램의 기원이 현미경이었다는 것을 되짚어 보는 일은 재미있는 일이다. 특히 홀로그램의 3차원 현미경 응용에 대한 논의가 활발히 이뤄지고 있는 작금의 기술동향을 살펴보면 더욱 그렇다. 진술한 것처럼 최초의 홀로그램은 미소물체의 상을 얻는 현미경이었고 따라서, 홀로그램 기술 출현 바로 그 최초의 시기부터 홀로그

나라 그의 응용도 깊고 넓다. 이런 생체 형광 영상의 장점에 따라, 최근에는 형광체의 홀로그램을 촬영하는 방법으로 광 해테로다인 스캐닝 방법을 이용한 광 스캐닝 홀로그램 현미경 그리고 자기 간섭법을 이용한 FINCHSCOPE이 개발되었다[2,3,4]. 저자가 아는 한 최초로 촬영된 형광 물체의 홀로그램은 1997년 광 스캐닝 홀로그램을 이용해 혼탁 매질 내에 위치한 형광체를 촬영한 것이었다 [2,3]. 특히, 광 스캐닝 홀로그램 촬영기법의 신호 검출과정은 전통적인 홀로그램 영상 시스템과 달리 해테로다인 변-복조를 통한 인코히어런트 방식으로 이뤄짐에 따라 스페클, 쌍영상 그리고 배경잡음 없이 물체의 홀로그램을 촬영할 수 있다는 장점이 있다[4]. 자세히 설명하면, 시간에 따라 빛의 세기를 변-복조하는 과정 즉 해테로다인 검출과정을 통해 쌍영상 및 배경 잡음 없이 물체의 홀로그램을 촬영할 수 있었으며, 인코히

# 특집 | Optical Microscopy & Biomedicine

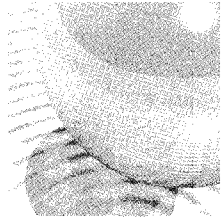
## 광 스캐닝 홀로그래피 현미경

김태근\*

램의 생체 현미경 응용에 대한 다양한 연구와 촬영 방법론이 제안되고 논의되었다. 홀로그램 현미경 응용은 그만큼 역사가 길고 심층적이다. 하지만 스페클, 쌍영상 그리고 배경 잡음의 문제로 홀로그램 기법의 생체 현미경 응용은 극히 제한적이었다. 또한 홀로그램 촬영 방식의 기존 인코히어런트 영상 시스템과 구분되는 가 간섭성의 요구로 형광체의 홀로그램 촬영이 원리적인 차원에서 불가능하다고 여겨지게 되었다. 하지만, 형광체의 영상은 배경 분리, 높은 대비, 선택적 염색, 형광 마커 영상 등 생체 현미경에서 중요한 부분을 차지하고 있을 뿐 아

어런트 광 검출 방식의 특징에 따라 스페클 노이즈 없이 형광체의 홀로그램을 촬영할 수 있다. 이와 같이 최근에 형광 물체의 홀로그램을 쌍영상, 배경 잡음 그리고 스페클 없이 촬영하는 기법이 개발됨에 따라, 홀로그램 현미경의 실제 생체영상 응용을 목전에 두고 있다[2,3,4]. 홀로그램은 단일 촬영으로 물체의 3차원 정보를 추출하는 방식으로 물체의 3차원 영상을 단일한 2차원 영상인 홀로그램을 촬영해 얻을 수 있게 할 뿐 아니라 빛의 크기와 위상을 동시에 추출함으로써 수치적 방법으로 수치를 제거하거나, 단층 영상을 추출하는 등 다양한 디지털 후처리

\* 세종대학교 광전자공학과



연구의 원천을 제공할 수 있을 것으로 기대한다[5]. 본 고에서는 이와 같이 생체 형광 현미경 응용을 목전에 두고 있는 광 스캐닝 홀로그래프 기법에 대해서 재고하고 홀로그래프 영상 신호를 수치적 방법으로 처리해 단층영상을 얻어내는 방법에 대해서 개관하며, 구면파의 중첩으로 스캔 빔 패턴을 형성하는 방법을 이용해 기존 Rayleigh 한계를 극복한 연구 그리고 수치적 방법으로 광학계의 수차를 제거한 연구에 대해 소개하고자 한다.

## 2. 광 스캐닝 홀로그래피 현광 현미경

광 스캐닝 홀로그래프는 1979년 Poon과 Kopel에 의해서 제안된 홀로그래프 레코딩 방식으로 물체광과 기준광의 간섭의 세기 패턴을 레코딩하는 기존의 홀로그래프 레코딩 방식과 달리 물체광에 해당하는 구면파와 기준광에 해당하는 평면파의 간섭으로 형성된 간섭패턴 즉 프레넬 윤대판의 세기 패턴으로 물체를 스캐닝하는 방식으로 물체에서 반사 혹은 투과된 빛의 세기패턴 즉 물체의 세기패턴과 프레넬 윤대판이 인코딩된 패턴을 획득하는 인코히어런트 영상 촬영 방법이다 [6,7]. 구체적으로 그림 1을 참고하여 설명하면, 광 스캐닝 홀로그래프는 마하젠더 간섭계 부분과 전자 처리 부분으로 나뉜다. 마하젠더 간섭계 부분은 시간적으로 변조된 프레넬 윤대판을 형성하여 갈바 스캐너에 전달하고 갈바 스캐너는 스캐닝 거울의 회전각을 스캐닝하는 방식으로 프레넬 윤대판을 편위하여 대상 물체를 스캐닝하고 대상 물체에서 반사, 투과 또는 형광 된 빛은 공간 직접 광 검출기 (space-integrating photo-detector)에 전달된다. 공간 직접 광 검출기는 집광된 빛의 세기에 따른 전류를 형성해 동위상과 사분위상 출력을 갖는 락인 증폭기(lock-in Amp.)로 전달한다. 락인 증폭기는 물체의 복소수 홀로그래프의 실수 부분과 허수부분을 출력으로 제공하며, ADC (analog to digital converter)는 이를 디지털 신호로 변환하여 컴퓨터로 전달하고 디지털 컴퓨터는 이 디지털 신호를 복소수 더하기 방법으로 물체의 복소수 홀로그래프 정보를 합성해 저장한다. 광 스캐닝 홀로그래프의 기존 홀로그래프 촬영 방식에 대비되는 특징은:

1. 간섭에 의한 세기 패턴으로 대상 물체를 스캔 하는

인코히어런트 영상 시스템으로 스페클 노이즈가 없고 형광체의 홀로그래프 촬영이 가능해 특별히, 의료 및 생체 현미경 응용에 있어 기존 홀로그래프 촬영 기법으로 불가능 했던 형광체의 홀로그래프 촬영이 가능하다.

2. 시간에 따라 변 복조하는 헤테로다인 검출법을 사용함으로 광 노이즈에 대해서 굳건하며, 동 위상 신호와 사분 위상 신호를 동시에 검출함으로 쌍 영상 잡음이나 배경 잡음 없는 복소수 홀로그래프를 직접 추출할 수 있다.

기존 홀로그래프 촬영 방식에 대비되는 위와 같은 특징으로 광 스캐닝 홀로그래피의 의료 및 생체 부분에 응용가능성은 막대하다. 1997년에는 광 스캐닝 홀로그래피를 이용하여 혼탁 매질내에 위치한 형광체의 복소수 홀로그래프 촬영이 최초로 시연됐다[2,3].

광 스캐닝 홀로그래피를 이용한 형광체의 홀로그래프 촬영 방법을 그림 1을 참조하여 설명하면, 마크젠더 간섭계를 이용해 간섭광 합성 시, 간섭계의 위 경로와 아래 경로에 음향-광 변조기를 설치하고 음향-광 변조기를 각각, 40MHz, 40.01MHz로 변조하여 간섭광은 시간에 따라 10KHz로 변조되게 하였다. 10KHz는 형광체의 라이프 타임의 역수보다 현격히 낮은 주파수라 형광 빛은 10KHz에 동조하여 형광하게 된다. 광학실험에서는 그림 2 에서 처럼 혼탁매질인 Polystyrene입자가 용해된 물

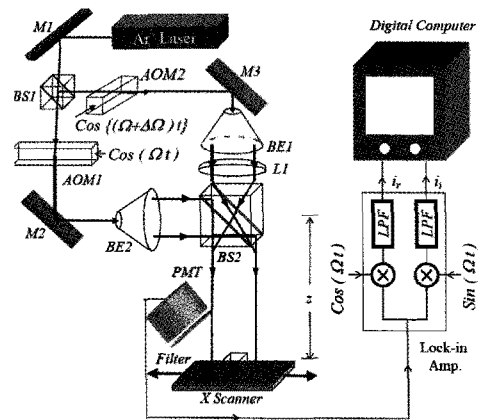
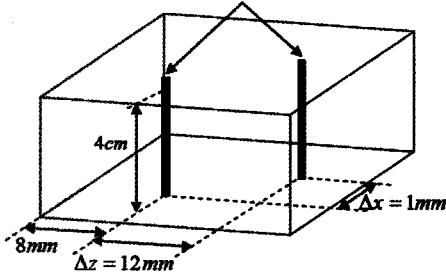


그림 1. 광 스캐닝 홀로그래피 현미경 (M1,2,3: 거울, BS1,2: 빔 분할기, AOM1,2: 음향 광 변조기, BE1,2: 빔 확장기, L1: 렌즈, PMT: 광 증대 튜브, Filter: 색 필터(600nm), LPF: 저 대역 통과 필터)

속이 빈 광섬유  
(외경 / 내경 120mm / 400mm)  
코팅을 벗겨내고 속이 빈 코어에 Rhodamine 6G를  
채움)



혼탁매질: Polystyrene 입자가 용해된 물 (측정 소  
멸 거리는 1.5cm)

그림 2. 혼탁매질 내에 위치한 형광체

에 공동 광 섬유(hollow core fiber)의 코어(core)에 Rhodamine 6G를 채운 광 섬유를 위치시키고 광 스캐닝 홀로그래피를 이용해 스캔 한다[2,3].

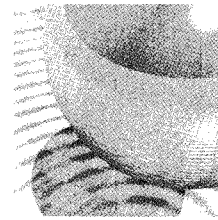
참고문헌 2,3에서는 이와 같은 방식으로 혼탁 매질 내에 위치한 형광체의 홀로그래프를 얻었으며, 이를 복원해 물체의 수평 위치뿐 아니라 깊이 위치도 얻을 수 있었다[2,3]. 참고문헌 2,3의 실험에서 혼탁매질 내에 위치한 물체의 영상을 비교적 깨끗하게 얻을 수 있었던 이유는 혼탁 매질의 산란체에 의해서 흩어지지 않는 광자인 탄도광자(ballistic photon)를 공간 가 간섭성에 따른 홀로그래프 탄도광자 선택추출, 시간 가 간섭성을 이용한 해테로다인 탄도광자 선택추출 그리고 색 필터를 이용한 형광 선택 추출의 절차에 따른 것으로 이해된다[3]. 홀로그래프 탄도광자 선택 추출에 대해서 구체적으로 설명하면, 혼탁 매질을 통과해 광 섬유내에 위치한 형광체에 도달하는 스캔 빔은 크게 혼탁 매질에 의해서 흩어지지 않는 탄도광자(ballistic photon)와 산란체에 의해서 흩뜨려진 확산 광자(diffused photon)로 나뉜다. 이때 탄도광자에 의해서 형성된 패턴이 프레넬 존 패턴의 공간적 분포를 왜곡 없이 갖기 때문에 탄도 광자가 홀로그래프 정보 형성에 기여하게 됨을 기대할 수 있다[3]. 따라서, 확산 광자에 의한 산란된 영상은 홀로그래프 복원과정에서 제거된 것으로 이해된다. 여기에 더해 해테로다인 변복조 과정은 산란의 과정을 통해 시간에 따라 왜곡된 변조 신호를 갖는 확산광자를 복조시 제거 했던 것으로 이해된다[3]. 마지막으로 산란체에서 산란된 스캔 빔의 파장과 형

광 된 빛의 파장이 다르므로 광 검출기 앞에 형광 빛만을 선택적으로 투과 시키는 색 필터를 삽입하는 방식으로 산란체에 의해서 산란된 빛을 효과적으로 차단한 것으로 이해된다[3].

홀로그래프를 이용한 3차원 현미경은 2차원 영상을 추출해 물체의 3차원 영상을 복원할 수 있다는 장점 그리고 위상 정보를 동시에 추출함으로 수차나 위상 왜곡을 수치적인 방법으로 보정 할 수 있다는 장점이 있으나 기존 공 초점 스캐닝 현미경(confocal scanning microscopy)과 달리 물체의 3차원 정보를 동시에 검출하고 복원과정에서 각각의 깊이 위치에 대한 단면영상을 재현하는 방식으로 물체의 3차원 영상을 얻어냄으로, 단면영상은 탈 초점 노이즈에 의해 심하게 오염된다는 단점이 있다[8]. 이는 영상정보의 검출방식이 근본적으로 공 초점 현미경과 다르기 때문이다. 즉, 공 초점 현미경의 경우 탈 초점 영상 정보는 공초점 게이트 (confocal gating) 절차를 통해 탈 초점 노이즈가 검출전에 제거되는 반면, 홀로그래프 영상법은 물체의 3차원 정보를 모두 검출 후 복원과정에서 초점을 맺는 절차로 단면영상을 복원하기 때문이다 [8]. 따라서 홀로그래프를 이용한 3차원 현미경 응용에서 탈 초점 노이즈 제거에 대한 연구가 필수적이다 [8]. 홀로그래프로부터 복원된 단면영상의 위상에는 물체의 초점 맺은 영상 정보 뿐 아니라 탈 초점 된 영상의 위상 정보가 같이 혼재되어 있음으로 탈 초점 노이즈의 위상 특징을 추출해 홀로그래프로부터 복원된 단면영상으로부터 탈 초점 노이즈를 제거하는 수치적 연산법이 제안되었고 최근에는 실험적으로 검증되었다[8,9]. 다음 절에서는 탈 초점 노이즈를 제거하는 연산법을 개괄한다.

### 3. 탈 초점 노이즈 제거와 단면영상 추출

전술 한 것처럼, 홀로그래프의 3차원 현미경 응용에 있어서 탈 초점 노이즈의 제거는 필수적이다. 탈 초점 노이즈는 초점 맺은 영상과 상이한 위상 특징을 갖게 되며 홀로그래프는 회절 광의 크기뿐 아니라 위상 정보를 가지고 있어 홀로그래프의 위상 특징으로부터 탈 초점 노이즈에 대한 정보를 추출할 잠재 가능성이 있다. 이에, 참고문헌 8에서는 광 스캐닝 홀로그래프로 얻은 홀로그래프를 복원하여 단면영상을 얻는 경우, 단면영상의 실수 부분에는 초



점 맺은 단면의 정보와 함께 탈 초점 된 영상의 정보가 들어있는 반면, 단면영상의 허수 부분에는 탈 초점 영상에 대한 정보만이 들어 있다는 점에 착안하여 복원된 단면영상의 허수 부분으로부터 탈 초점 노이즈의 정보를 추출하고 이를 Wiener 필터의 노이즈 정보로 제공하는 방식으로 Wiener 필터를 제작하여 탈 초점 노이즈를 제거하는 기법을 제안하고 컴퓨터 시뮬레이션을 통해 구현 가능성을 검증했으며 최근에는 역 필터(inverse filter)를 이용해 탈 초점 노이즈가 제거됨을 실험적으로 보였다 [8,9].

광 스캐닝 홀로그래피에서 스캐닝 빔의 패턴은 일반적으로 임의의 패턴을 갖게 할 수 있다. 이에 따라 역 곡률을 갖는 구면파의 중첩으로 스캔 빔을 형성하면, 대물렌즈의 수치구경을 넘어서는 분해능을 얻을 수 있다. 이는 기존의 대물렌즈의 Rayleigh 한계를 극복하는 것이다. 다음 절에서 서로 다른 곡률을 갖는 구면파의 중첩으로 수평 분해능을 증가시킨 광 스캐닝 홀로그래피에 대해서 개괄한다.

#### 4. Rayleigh 한계의 극복과 수차의 수치적 제거

광 스캐닝 홀로그래피에서 서로 다른 방향의 곡률을 갖는 빔을 중첩시켜 스캔 빔을 형성하면 곡률이 서로 더해져서 곡률은 각각 빔의 곡률이 같은 경우 두 배로 증가한다 [10]. 이렇게 형성된 프레넬 운대판의 프레넬 수는 대물렌즈에 의한 프레넬 수의 두 배가 된다. 따라서, 위의 스캔 빔으로 스캐닝하여 얻은 홀로그래피의 수평 분해능은 구면파와 평면파의 간섭으로 형성된 기존의 스캔 빔으로 스캔하여 얻은 홀로그래피 보다 2배 증가된다. 대물렌즈에 의해 한정되는 Rayleigh 한계에 따른 분해능을 2배 증가시킬 수 있는 것이다 [10]. 이에 더해 전술 할 것처럼 홀로그래피는 빛의 크기뿐 아니라 위상을 동시에 검출함으로써

수치적인 방법으로 광학계의 수차를 제거할 수 있다. 이에 대한 연구와 실험이 진행되어 광학계의 수차를 수치적인 방법으로 제거할 수 있음을 보였다 [11]. 위의 연구에서는 광학계의 분해능 이하의 크기를 갖는 핀홀의 홀로그램을 추출하고 이를 홀로그램 광학계의 점 전개 함수(point spread function) 로 이용하여 홀로그램을 복원함으로써 광학계의 수차를 서로 상쇄하여 제거할 수 있음을 보였다 [11]. 이는 분해능 이하의 점 물체의 복소수 홀로그램을 추출함으로써 실제 제작된 광학계의 점 전개함수를 직접 추출한 것으로 이 점 전개함수는 실제로 제작된 광학계의 정렬상의 오차, 렌즈에 의한 수차 등에 의한 위상 왜곡에 대한 정보를 가지고 있어 이를 이용해 홀로그램을 복원하는 경우 실제로 제작된 광학계의 수차가 서로 상쇄되어 제거된다. [11]

#### 결론

본 글에서는 광 스캐닝 홀로그래피의 3차원 현미경 응용에 대한 연구를 개괄하였다. 광 스캐닝 홀로그래피는 인코히어런트 광 검출 특징으로 형광체의 홀로그램 촬영이 가능하며, 스페클 노이즈가 없고 해태로다인 추출을 통해 쌍 영상 잡음이나 배경잡음 없이 회절 광의 온전한 위상정보를 포함한 복소수 필드 정보를 전기신호 형태로 추출한다. 이에 따라 광학계의 수차 등을 수치적 방법으로 제거할 수 있음은 물론 초점 맺은 영상과 상이한 위상 특징을 갖는 탈 초점 노이즈를 제거해 단층영상을 추출할 수 있는 등 위상 정보의 조작을 통한 다양한 영상처리 가능성을 가지고 있다. 특별히 광 스캐닝 홀로그래피의 경우, 스캔 빔 패턴을 조작하는 방법으로 분해능을 향상시키는 등 다양한 그리고 현미경 응용에 의미 있는 조작 가능성이 있어 생체 및 의료 영상에 대한 응용 연구가 활발히 이뤄질 것으로 기대한다.

## 참고 문헌

1. D. Gabor, "A new microscope principle," Nature, 161, pp777-778 (1948).
2. G. Indebetouw, T. Kim, T.-C.-Poon and B. Schilling, "Three-dimensional location of fluorescent inhomogeneities in turbid media by scanning heterodyne holography", Optics Letters, vol.23, no.2, pp.135-7 (1998).
3. T. Kim, "Optical Scanning Holography for 3-D Imaging of Fluorescent Objects in Turbid Media," M.S. thesis, Dec. 1997, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia.
4. G. Indebetouw, P. Klysubun, T. Kim and T.-C. Poon, "Imaging properties of scanning holographic microscopy," JOSA A, Vol. 17, No.3 pp. 380-390 (2000).
5. J. Rosen and G. Brooker, "Non-scanning motionless fluorescence three-dimensional holographic microscopy," Nat. Ph. 2, 190~195 (2008).
6. T.-C. Poon and A. Korpel, "Optical Transfer Function of an Acousto-Optic Heterodyning Image Processor," Optics Letters 4, 317-319, (1979).
7. T.-C. Poon. "Scanning Holography and Two-Dimensional Image Processing by Acousto-Optic Two-Pupil Synthesis," J. Opt. Soc. Am. A, 2, 621-627, (1985).
8. T. Kim, "Optical Sectioning by use of Optical Scanning Holography and Wiener Filter," Appl. Opt. Vol. 45, No. 5, pp. 872-879 (2006).
9. X. Zhang, E. Y. Lam, T. Kim, Y. S. Kim and T.-C. Poon, "Blind sectional image reconstruction for optical scanning holography," Opt..Lett. Vol. 34, No. 8, pp. 1231~1233 (2009)
10. G. Indebetouw, A. E. Maghnouji, and R. Foster, "Scanning holographic microscopy with transverse resolution exceeding the Rayleigh limit and extended depth of focus," JOSA A, Vol. 22, Issue 5, pp. 892-898 (2005).
11. G. Indebetouw, and Wenwei Zhong, "Scanning holographic microscopy of three-dimensional fluorescent specimens," JOSA A., Vol. 23, Issue 7, pp. 1699-1707 (2006).

## 학 력



### 김 태 군

- 2007년 3월 - 현재 세종대학교 광전자공학과 부교수
- 2003년 3월 - 2007년 2월 세종대학교 광전자공학과 조교수
- 2001년 3월 - 2003년 2월 세종대학교 광전자공학과 전임강사
- 2000년 8월 - 2000년 12월 삼성종합기술원 전문연구원
- 1998년 1월 - 2000년 7월 Virginia Tech., Electrical and Computer Eng., 공학박사
- 1996년 8월 - 1997년 12월 Virginia Tech., Electrical and Computer Eng., 공학석사
- 1991년 3월 - 1996년 2월 경희대학교 전자공학과, 공학사