

# 홀로그래픽 회절 토모그래피와 그 생물학적 응용

□ 강필성, 최원식 / 고려대학교

## 요약

디지털 홀로그래픽 현미경이나 정량적 위상 현미경(quantitative phase microscopy)과 같은 기존의 간섭현미경은 3차원 이미징 기술로 분류되는데, 이는 획득한 이미지의 복소장(complex field)을 계산을 통해 다른 깊이로 전파시킬 수 있기 때문이다. 그러나 엄밀한 의미에서는 하나의 복소장 이미지는 단지 2차원 맵이기 때문에 근본적으로는 샘플의 2차원 정보만을 가지고, 물체의 3차원 구조의 일부분을 측정하는 것에 지나지 않는다. 본 논문에서는 1969년에 Wolf가 제안한<sup>[1,2]</sup> 홀로그래픽 회절 토모그래피(Optical Diffraction Tomography: ODT)를 실험적으로 구현한 3차원 위상 현미경(Tomographic Phase Microscopy: TPM)을 소개하고자 한다. TPM은 샘플을 다양한 각도로 조명하여 서로 다른 입사각에 대해 복소장 이미지를 얻고, ODT를 통해서 샘플의 3차원 구조를 복원해내는 기술이다. 보다 구체적으로는 다양하고 독립적인 2차원 이미지들을 샘플의 3차원 푸리에 공간에 맵핑함으로써 샘플 단면의 흡수율과 굴절률을 복원할 수 있다. 굴절률은 분자 농도와 비례하기 때문에, 살아있는 세포에 대한 굴절률의 3차원 맵을 얻을 수 있으면 세포 내부의 분자 구성을 연구할 수 있고, 이를 통해 다양한 생의학적 응

용을 연구할 수 있다.

## 1. 서론

굴절률은 가시광선에 대해 거의 투명한 생체 세포를 이미징하는 데 있어서 중요한 역할을 한다. 그 예로 위상대비 현미경(phase contrast microscopy)<sup>[3]</sup>이나 DIC (differential interference microscopy) 현미경<sup>[4]</sup>에서는 굴절률의 차이에서 오는 빛의 위상 차이를 활용하여 생체세포를 시각화시킨다. 본질적으로 두 기술 모두 이미지의 선명도를 증가시키기 위해서 간섭광학계를 만들어 사용한다. 간섭계는 세포 내부에 이질적인 굴절률의 분포에 따라 유도되는 위상의 차이를 빛의 세기의 차이로 변환시킨다. 그러나 이 기술들에서는 측정된 빛의 세기로부터 빛의 위상의 차이를 정량적으로 얻을 수 없다.

디지털 홀로그래픽 현미경과 위상 이동 간섭현미경(phase-shifting interferometric microscopy)은 위상대비 현미경이나 DIC 현미경이 가지는 이러한 한계를 해결하였다. 이들 기술들은 세포와 상호작용을 한 빛의 복소장을 기록하는데, 복소장의 위상 부분은 빛이 세포의 굴절률 분포 때문에 겪는 위상의 변화에 해당한다[5-9]. 하지만 이러한 위상현미경 기술들은 세포 전체에 대해 평균적인 굴절률이나 두께는 제공하지만 세포의 자세한 3차원 구조는 제공하지 못한다. 기록된 복소장 이미지는 수치분석을 통해 다른 깊이에 해당하는 이미지로 변환시킬 수 있기 때문에 종종 3차원 이미지로 고려하기도 한다. 그러나 기록된 이미지는 물체의 3차원 정보 중 그 일부분에 해당하는 것으로 물체의 3차원 정보를 얻기 위해서는 샘플에 대한 추가 정보가 있어야만 한다.

정보량(Information capacity)의 관점에서 보면, 물체의 3D 이미지를 얻기 위해서는 다수의 독립적인 2D 이미지를 얻어야만 한다. 그 한 방법으로 1968년에 Wolf가 처음으로 여러 가지 다른 입사각에 대해 획득한 샘플의 2차원 복소장 이미지들로부터 그 물체의 3차원 푸리에 공간을 채우는 ODT 이론을 제안하였다[1,2]. 그 후로, 다수의 독립적인 2차원 복소장 이미지를 실험적으로 기록하는 많은 방법들이 제안되었다. 예를 들어, 광원의 파장을 변화시키는 방법[14-15]도 이에 해당한다. 파장 스캐닝의 경우 넓은 영역에 걸쳐 파장을 변환시켜야 고 해상도 이미지를 획득할 수 있지만, 파장이 바뀔 때 생기는 샘플이나 광학계에 의한 분산이 문제가 된다. 이를 감안하면 파장 스캐닝을 통해 물체의 푸리에 공간을 커버할 수 있는 범위는 일반적으로 각도 스캐닝 방식에 비해 좁다. 각도 스캐닝 방식[10-13]의 경우, 샘플에 대해 상대적으로 조명 각도를 바꿀

수 있는 방법으로 두 가지가 있다. 그 중 하나는 입사하는 빛을 고정시키고 샘플을 회전시키는 것이고, 다른 하나는 샘플을 고정하고 입사하는 빛을 회전시키는 것이다. 샘플을 회전시키면 모든 각도에 대하여 조명이 가능하기 때문에 축방향 해상도를 횡방향 해상도와 동일하게 얻을 수 있다. 하지만 살아있는 세포를 이미징 할 때에는 회전축을 고정시키는 것은 매우 어렵고, 회전을 시키는 과정에서 샘플을 역학적으로 왜곡시킬 개연성이 높다. 추가적으로, 샘플의 역학적인 회전속도가 데이터를 얻어내는 속도를 제한하게 된다. 따라서 샘플을 회전시키는 방식은 일반적으로 광섬유와 같은 비생물학적이고 단단한 물체[10,16]로 제한되고, 생체 세포의 이미징을 위해서는 특별한 준비가 필요하다[12,17].

입사하는 빛을 회전시키는 방식은 데이터를 얻는 중에 샘플에 어떠한 왜곡을 만들지 않는다는 장점이 있다. 따라서 살아있는 세포를 이미징할 때 적합하다[11,13]. 데이터를 얻는 속도도 살아있는 세포의 운동성을 연구할 수 있을 정도로 충분히 빠르다. 또한 입사하는 빛을 회전시키기 위해서 기존의 광학현미경에서 약간의 수정만 시키면 된다. 이 방법의 단점은 이미징 시스템의 제한된 개구수로 인하여 모든 각도로 빛을 입사시킬 수 없다는 것이다. 사실 일반적인 광학 현미경들은 모두 이러한 제약을 가지고 있다. 그 결과 축방향 해상도는 횡방향보다 좋지 못하다. 이러한 단점들은 보완하기 위한 방법으로, 샘플에 대한 사전 지식으로부터 측정하지 못한 입사각에 대한 정보를 얻어낼 수 있는 다양한 알고리즘이 개발되었다[18-20].

실험적으로 독립적인 2차원 이미지들을 기록하는 방식이 중요하지만, 획득한 이미지들을 이용하여 물체의 3차원 구조를 찾아내는 알고리즘도 3차

원 이미징의 공간 해상도와 굴절률의 정확도를 결정하는데 있어서 중요한 요소이다. 일반적으로 실험으로부터 얻어진 복소장 이미지를 해석하는 방법이 사용 될 알고리즘을 결정한다. 만약 샘플을 투과한 파의 위상을 빛이 전파하는 방향에 대한 굴절률의 선적분이라고 해석한다면, inverse Radon Transform을 기반으로 한 filtered back projection algorithm을 적용할 수 있다[21]. 이 방법은 생체 세포들과 같이 빛의 산란이 약한 경우에는 좋은 근사법이다[12,13]. 하지만 회절에 의한 영향을 무시했기 때문에 샘플의 두께가 이미징 시스템의 초점심도보다 큰 경우에는 초점 심도를 벗어나는 부분에 대해서는 해상도가 떨어진다.

회절의 영향을 고려한다는 점에서 볼 때 ODT가 보다 더 근본적인 접근법이라고 할 수 있다. 3차원 물체에 의한 빛의 회절은 매우 복잡하기 때문에, 회절의 효과를 고려하기 위해서는 근사가 필요하다. 이 중 Born 근사는 물체의 복소 굴절률과 복소장 간의 선형 관계를 만들기 위해 Wolf에 의해 처음 도입되었고 몇가지 실험 연구가 있었다[11,16,22]. 그러나 진폭의 감쇠가 무시할 정도에도 불구하고 샘플에 의한 빛의 위상 변화가  $\pi/2$ 에 가까워지면 Born 근사가 타당하지 않는 것으로 나타났다[21]. 이러한 이유로부터, 산란파의 complex phase를 근사시킨 Rytov 근사가 소개되었다[2,23]. Rytov 근사는 Born 근사보다 phase object의 이미징을 하는데 있어서 더 적절하다.

본 논문에서 우리는 살아있는 세포에 대해 정량적인 3차원 굴절률 분포를 얻을 수 있는 실험 방법인 TPM을 소개한다[13,24,25]. TPM은 1/30s의 짧은 시간에  $-70^\circ$  부터  $70^\circ$  범위의 입사각에 대해 샘플을 투과한 빛의 복소장 이미지를 측정할 수 있다. 데이터를 얻는 과정에서 샘플이 흔들리는 것을 방

지하기 위해 입사 빛을 회전시키는 방식을 이용하였고, 물체의 3D 복원을 위해 초창기에는 filtered back-projection과 함께 iterative constraint algorithm를 이용하였다.

그 후에, 살아있는 생물학적 세포를 이미징하고 정량적인 3D 굴절률 분포를 제공해 줄 수 있는 Rytov 근사를 처음으로 실험에 적용하였다. 이를 통해 Rytov 근사가 세포를 이미징 하는데 더 유효하고 반면에 Born 근사를 이용한 복원에서는 심각한 이미지 왜곡이 발생한다는 것을 보였다. 그리고 완전하게 모든 각도에 대해 데이터를 얻지 못한 것에 대한 효과를 최소화 하기 위하여 iterative constraint algorithm를 적용하였다. 형광 물질들을 첨가하지 않고 세포의 정량적인 굴절률 분포를 얻음으로써 세포 내부에서의 분자 농도를 정량화할 수 있었다[26].

## II. 홀로그래픽 회절 토모그래피 이론

일반적으로 대물렌즈를 스캔하여 얻은 대면적 형광 이미지들로부터 deconvolution 알고리즘을 적용하여 3차원 형광 이미지를 얻는 것은 비교적 간단하다. 이는 각각의 형광입자가 점광원의 역할을 하고 각 입자간의 간섭은 무시할 수 있기 때문이다. 반면에 흡수율이나 굴절률을 구하기 위한 3D deconvolution을 적용시키는 것은 훨씬 더 복잡한 문제이다. 형광 이미징과는 달리 샘플이 빛의 위상과 세기 모두에 영향을 미치기 때문에 반드시 두 가지 모두를 기록해야 한다. 게다가 산란 입자 사이의 간섭은 deconvolution 과정을 매우 복잡하게 만든다. 간섭의 영향을 제대로 기술하기 위해서는 파동 방정식을 완전하게 풀어야만 하고, 이 때문에 물체

의 3차원 구조를 복원하는 것은 매우 어렵다.

Born과 Rytov 근사는 이 문제를 상대적으로 쉽게 풀기 위해 고안되었다[2,21]. 이 근사에 따르면 물체의 3D scattering potential과 측정된 2D 복소장 이미지는 산란에 의해 생성된 빛의 세기가 입사하는 빛의 세기에 비해 매우 작다라는 가정을 통해 간략화 될 수 있다. Wolf는 Born 근사를 이용하여 2D 복소장 이미지에서 3차원 물체를 복원하는 공식을 유도하였다[1]. 각각의 각도에 대해서 2D 복소장 이미지를 푸리에 변환한 맵은 3차원 scattering potential의 주파수 축에서 구면에 할당이 되는데, 이 구면을 Ewald sphere라고 부른다. 이 절에서는 wolf의 원래 이론에 대해서 간략히 설명하고 1차 Rytov 근사를 적용한 Devaney's 의 접근법에 대해서 소개하겠다[23].

먼저 scalar field 가정에 따라 전파되는 light field를  $n(\vec{R})$ 로 나타내면, 매질을 지나는 빛은 아래의 파동방정식을 통하여 기술할 수 있다.

$$\nabla^2 U(\vec{R}) + k_0^2 n(\vec{R})^2 U(\vec{R}) = 0 \quad (1)$$

여기서  $k_0$ 는 진공에서의 파수로써 값은  $k_0 = 2\pi/\lambda_0$  이고, 여기서  $\lambda_0$ 는 진공에서의 빛의 파장이다. 그리고  $n(\vec{R})$ 은 물체의 3차원 복소굴절률이고, 바로 우리가 얻고자 하는 정보이다.  $n(\vec{R})$ 을 입사장  $U^{(I)}(\vec{R})$ 와 산란장  $U^{(S)}(\vec{R})$ 로 분해하면  $U(\vec{R}) = U^{(I)}(\vec{R}) + U^{(S)}(\vec{R})$ 로 쓸 수 있다. 이를 이용하면 파동방정식은 다음과 같이 쓸 수 있다.

$$(\nabla^2 + k_0^2 n_m^2) U^{(S)}(\vec{R}) = F(\vec{R}) U(\vec{R}) \quad (2)$$

여기서  $F(\vec{R}) = -(2\pi n_m / \lambda_0)^2 ((n(\vec{R})/n_m)^2 - 1)$  이고  $n_m$ 은 매질의 굴절률이다.  $F(\vec{R})$ 은 물체함수

라고 부른다. 그린의 정리에 따르면 식 (2)의 형식적인 해는 다음과 같다.

$$U^{(S)}(\vec{R}) = - \int G(|\vec{R} - \vec{R}'|) F(\vec{R}') U(\vec{R}') d^3 \vec{R}' \quad (3)$$

여기서  $G(r) = \exp(in_m k_0 r) / (4\pi r)$ 로 그린 함수이다. 여기서 적분 안에 있는  $U(\vec{R})$ 은 미지수이기 때문에 근사를 적용하여  $U^{(S)}(\vec{R})$ 를 얻을 수 있다. 1차 Born 근사는 우리가 산란필드가 입사필드보다 매우 약할 때 ( $U^{(S)} \ll U^{(I)}$ ) 사용할 수 있는 가장 간단한 근사이다. 1차 Born 근사를 적용하면 산란필드는 다음과 같아진다.

$$U^{(S)}(\vec{R}) \approx - \int G(|\vec{R} - \vec{R}'|) F(\vec{R}') U^{(I)}(\vec{R}') d^3 \vec{R}' \quad (4)$$

이 근사는 산란필드  $U^{(S)}(\vec{R})$ 과 물체함수 사이에 선형적인 관계를 제공한다. 위 식을 양변에 푸리에 변환을 하면 우리는 다음과 같은 푸리에 회절 정리 [1]를 얻을 수 있다.

$$\hat{F}(K_x, K_y, K_z) = \frac{ik_z}{\pi} \hat{U}^{(S)}(k_x, k_y; z^+ = 0) \quad (5)$$

여기서  $\hat{F}$ 와  $\hat{U}^{(S)}$ 는 각각  $F$ 와  $U^{(S)}$ 의 3차원과 2차원 푸리에 변환이다.  $k_x$ 와  $k_y$ 는 각각 이미지 평면의 횡단면의 공간좌표  $x$ 와  $y$ 의 공간주파수이고,  $z^+=0$ 는 실험에서 물체의 초점이 맺히는 평면의 광축 좌표이다.  $(K_x, K_y, K_z)$ 는 물체 좌표계의 공간주파수로써 입사파의 공간주파수 벡터  $(k_{x0}, k_{y0}, k_{z0})$ 와 공간주파수  $(k_x, k_y, k_z)$ 에 따라 상대적으로 결정된다. 여기서 공간주파수  $k_z$ 는  $k_z = \sqrt{(n_m k_0)^2 - k_x^2 - k_y^2}$ 으로 결정된다.

입사하는 빛의 각이 바뀌면 입사파 벡터가 바뀌고, 따라서  $(K_x, K_y, K_z)$ 도 바뀌게 된다. 그 결과 다

른 각도에서 획득한 2차원 복소장 이미지는 3차원 물체함수의 주파수 스펙트럼의 다른 부분을 채우게 된다. 2차원 복소장 이미지들을 이용한 맵핑이 완료되면,  $\hat{F}$ 의 역푸리에 변환을 통해서 복소굴절률의 3차원 분포를 얻게 된다.

시뮬레이션을 통해서 보면 Born 근사는 샘플에 의한 전체 위상 지연 값이  $\pi/2$ 보다 작아야만 유효하다[21]. 세포의 두께가 보통  $10\mu\text{m}$  정도 되는데 세포의 굴절률은 매질의 굴절률과 약 0.03 정도 차이가 있다. 따라서 세포에 의한 위상 지연 값은  $\lambda=633\text{nm}$ 의 파장에서 대략  $\pi$  정도 생기게 되며, 그 결과 Born 근사는 생체 세포 이미징에 적합하지 않다. 이 경우에는 Rytov 근사가 Born 근사보다 좀 더 적절한 방법이 된다. Rytov 근사는 샘플의 크기나 전체 위상 지연 값이 아니라 굴절률의 기울기에 민감하다. Rytov 근사는 다음과 같은 조건을 만족할 때 유효하다.

$$n_\delta \gg \left(\nabla\phi^{(s)} \frac{\lambda}{2\pi}\right)^2, \text{ with } \phi^{(s)} = \ln \frac{U(\vec{R})}{U^{(I)}(\vec{R})} \quad (6)$$

여기서  $n_\delta$ 는 물체 내부에서 파장 정도의 깊이 변화 당 생기는 위상의 변화 값이다. 이 조건은 근본적으로 Rytov 근사가 샘플의 크기에 독립적이고 단지 위상의 기울기  $\nabla\phi^{(s)}$ 에만 제한된다는 것을 보여준다. 약한 산란을 일으키는 생체 세포에서는  $n_\delta$ 가 1보다 훨씬 작은 0.03에서 0.04 정도이다. 따라서 Rytov 근사는 생체 세포를 이미징 하는데 적합하다.

Decaney의 제안에 따르면[23] Rytov 근사를 Fourier diffraction theorem에 적용하는 것은 Born 근사와는 다른 접근을 해야 한다. Decaney의 방법에 따르면 복소위상을  $\phi(\vec{R})$ 을  $U(\vec{R})=e^{\phi(\vec{R})}$ 와 같이 정의하고, 이를 식 (1)의 파동방정식에 대입한

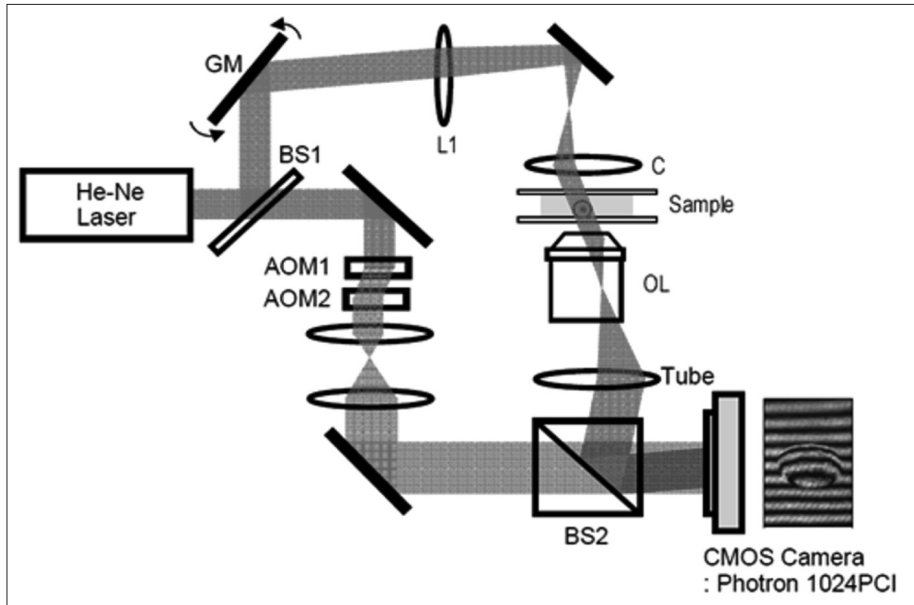
다. 그 후에 식 (6)의 근사를 적용하면 우리는 다시 식 (5)의 Fourier diffraction theorem을 얻을 수 있다. 그러나 여기에서  $U^{(s)}$ 는 다음과 같은  $U_{Rytov}^{(s)}$  식으로 교체된다.

$$U_{Rytov}^{(s)} = U^{(I)}(\vec{R}) \ln \left( \frac{U(\vec{R})}{U^{(I)}(\vec{R})} \right) \quad (7)$$

나머지 복원의 과정은 식 (5)를 따라 같은 과정이 된다.

### III. 실험 장치

TPM의 실험 장치는 <그림 1>과 같다. 현미경의 샘플 스테이지 위에 고정된 샘플에 대해 다양한 각도에서 빛을 조명하여 복소장 이미지를 기록할 수 있도록 만들어졌다[13]. 투과한 빛의 amplitude 이미지와 phase 이미지를 기록하기 위해 Heterodyne Mach-Zehnder interferometer[13]가 사용되었다. He-Ne 레이저(파장  $\lambda=633\text{nm}$ )를 두 개로 나누어 샘플 빔과 기준 빔으로 사용한다. 샘플로 전파되는 빔은 갈바노미터에 의해 조절되고 샘플을 통과한 이미지는 대물렌즈와 튜브렌즈에 의해 카메라로 전달된다. 두 개의 Acousto-optic modulator 들은 기준 빔의 주파수를 1.25kHz만큼 변화시키기 위하여 사용되었고 CMOS(Complementary Metal-Oxide Semiconductor) 카메라(Photron 1024PCI)는  $200\mu\text{s}$ 의 간격으로 이미지를 촬영한다. 각각 조명되는 각도에 대해서  $800\mu\text{s}$ 에 걸쳐 4개의 연속적인 간섭 이미지를 기록하고, phase-shifting 알고리즘을 이용하여 빛의 phase와 amplitude의 이미지를 얻는다. 조명하는 각도를 최대화하기 위해서 높은 NA의 condenser lens(Nikon, 1.4 NA)와 objective



〈그림 1〉 Tomographic phase microscope 실험장치. GM은 galvanometer scanning mirror이다. L1은 초점거리( $f=250\text{mm}$ )의 렌즈, C는 NA 1.4의 condenser lens이다. OL은 NA 1.4의 대물렌즈, Tube는 초점거리( $f=200\text{mm}$ )의 튜브렌즈이다. BS1과 BS2는 beam splitter이고, AOM들은 Acousto-Optic Modulator들이다. 주파수가 변화된 레퍼런스 빔은 파란색으로 보인다.

lens(Olympus, UPLSAPO, 1.4NA)를 이용하였다. 샘플 빔은  $0.23^\circ$  간격으로  $-70^\circ$ 에서  $70^\circ$ 까지 스캔할 수 있다. 이 각도범위에서 한 세트의 2차원 이미지들을 얻는데 약 10초 정도의 시간이 걸린다.

#### IV. ODT를 이용한 3차원 물체 복원

다양한 각도에서 조명하여 얻은 위상 이미지와 amplitude 이미지에 III절에서 설명하였던 홀로그래픽 회절 토모그래피 알고리즘을 적용하여 물체의 3D 구조를 복원할 수 있다. 각도  $\theta$ 에서 조명하여 얻은 이미지에서 각각 위상 값을  $\phi(x,y;\theta)$ , amplitude 값을  $A(x,y;\theta)$ 라고 하면 복소장 이미지는  $U(x,y;\theta)=A(x,y;\theta)e^{i\phi(x,y;\theta)}$ 라고 쓸 수 있다.

얻어진 이미지는 샘플에 의해 변화된 위상 값과 조명한 각도에 의해 생긴 위상 ramp로 구성되어 있다. 샘플이 없을 때 각 각도별로 기록한 복소장  $U_{bg}(x,y;\theta)=A_{bg}(x,y;\theta)e^{ik_x x + ik_y y}$ 를 입사파로 고려한다. 〈그림 2〉(a)는  $6\mu\text{m}$ 의 polystyrene bead (Polysciences Inc.) 샘플에 대해 입사각이 0도일 때 얻어진 phase image  $\phi(x,y;\theta=0)$ 이다. 〈그림 2〉(b)는 로그 스케일에서  $\hat{U}(k_x, k_y; \theta)$ 의 일반적인 amplitude 이미지를 나타낸다.

Fourier diffraction theorem을 적용하기 위해서 다음과 같이 우변의  $(k_x, k_y)$ 을  $(K_x, K_y)$ 로 변환한다.

$$\hat{F}(K_x, K_y, K_z) = \frac{i(K_z + k_{z0})}{\pi} \hat{U}^{(s)}(K_x + k_{x0}, K_y + K_{y0}; z^\dagger = 0) \tag{8}$$

여기서 scattering field는 측정된 복소장에서 Born 근사에서 정의된  $\hat{U}^{(s)}(k_x, k_y; \theta)$  또는 식 (7)의  $\hat{U}_{Rytov}(k_x, k_y; \theta)$ 를 사용한다. 공간주파수 공간에서 입사파에 의한 스펙트럼의 이동  $(-k_{x0}, -k_{y0})$ 는 식 (8)의 우변에 상응한다. 이는 실험데이터를 맵핑하는데 있어서 푸리에 공간에서  $\hat{U}^{(s)}(k_x, k_y; \theta)$ 를 이동시키는 입사파  $U_{bg}(x, y; \theta)$ 를 나눠주는 것과 동일하다. 다시 말하면 이 실험에서 Fourier diffraction theorem에서 쓰인 산란파는 다음과 같이 쓸 수 있다.

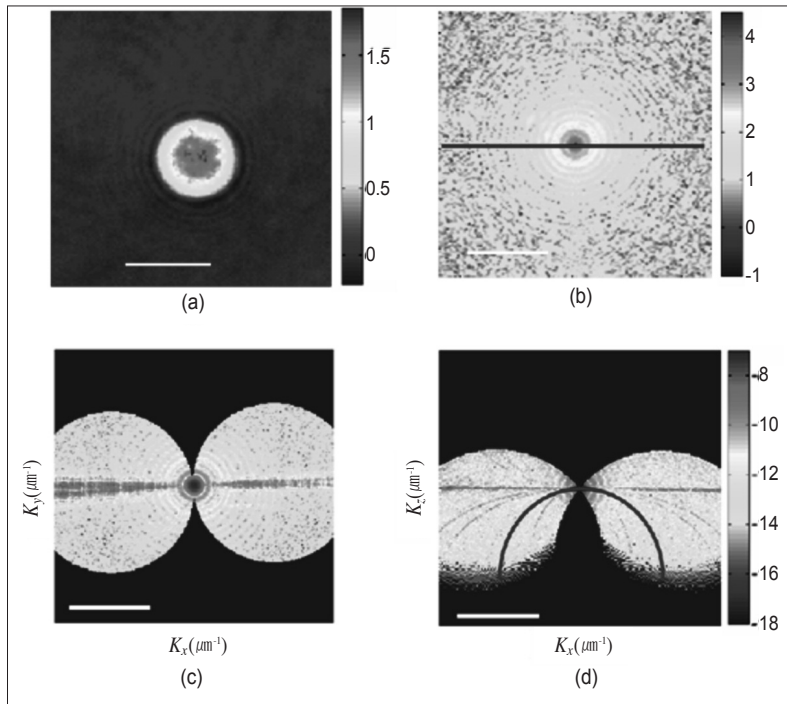
1차 Born 근사의 경우

$$\hat{U}^{(s)}(K_x + k_{x0}, K_y + k_{y0}; \theta) = (U(x, y; \theta) - U_{bg}(x, y; \theta)) / U_{bg}(x, y; \theta) \quad (9)$$

1차 Rytov 근사의 경우

$$\hat{U}^{(s)}(K_x + k_{x0}, K_y + k_{y0}; \theta) = \ln(U(x, y; \theta) / U_{bg}(x, y; \theta)) \quad (10)$$

〈그림 2〉(c)와 (d)는 물체의 푸리에 공간에서 각각  $(K_x, K_y, K_z=0)$ 와  $(K_x, K_y=0, K_z)$ 에 해당하는 이미지이다. 〈그림 2〉(b)에 있는 파란색 선에 있는 값이 〈그림 2〉(d)에  $(K_x, K_z)$  공간에 파란색 선으로 그려진 반원 위에 mapping 된다. 다양한 각도에서 얻은 이미지들이 서로 다른 공간에 mapping되고 이는 결국 물체 함수  $F(\vec{R})$ 의 푸리에공간  $(K_x, K_y, K_z)$ 의 대부분의 공간에 mapping이 된다. 〈그림 2〉(c)와 (d)를 보면 다양한 각도에서 획득한 이미지를 맵핑한 후에 구 모양의 샘플로부터 예측되었던 링패

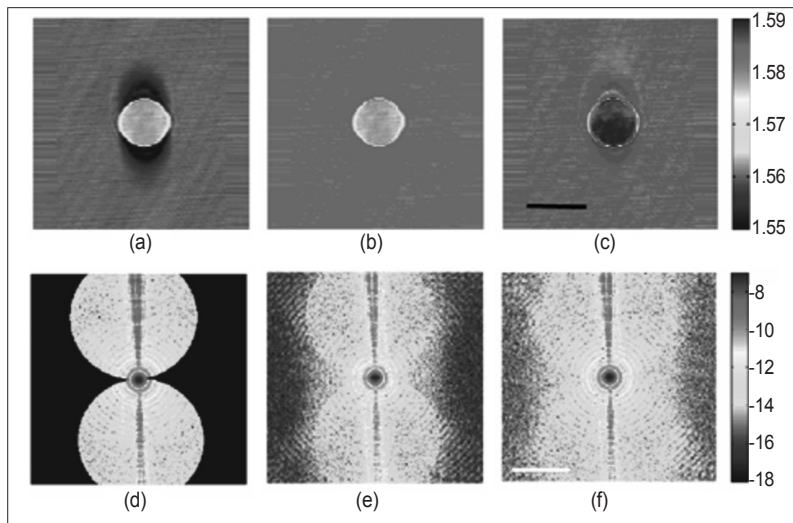


〈그림 2〉 물체 함수의 3차원 푸리에 공간에 complex E-field를 mapping. (a) 0° 각도에서의 6 $\mu$ m polystyrene bead의 정상적인 phase image. 컬러 막대는 라디안 단위의 phase를 보여준다. 스케일 막대, 5 $\mu$ m (b) 0° 각도에서의 푸리에 변환한 complex E-field 이미지의 로그스케일로 본 amplitude (c) 모든 각도에 대해 mapping한 후에 평면에서의 amplitude 분포 (d)  $k_x$ - $k_z$  평면에서의 amplitude 분포. 컬러 막대는 amplitude E-field에 상용로그를 취한 것이다. (b)-(d)의 스케일 막대는 2 $\mu$ m<sup>2</sup>을 나타낸다.

턴이 더 선명하게 보인다. mapping을 통해 얻어진 3차원 공간 스펙트럼을 inverse fourier transform 하면 물체의 굴절률 또는 흡수 계수의 분포를 얻을 수 있다.

High NA 대물렌즈와 컨덴서 렌즈를 사용하더라도, 최대  $\pm 70^\circ$ 의 입사각 내의 상만이 구해진다. 결과적으로 <그림 2>(c)와 (d)에 보이는 것처럼 frequency space의 전체가 채워지지는 못한다. 다른 말로 inverse problem을 완전히 풀지는 못했다고 할 수 있다. 따라서 복원의 첫 번째 단계로 측정하지 못한 각도에 해당하는 스펙트럼에 0 값을 대입한다. 이 후 복원한 물체 함수는 샘플 주위에 굴절률이 음의 값이 나타나거나 실제 값보다 낮게 나타난다(<그림 3>(a)). 이 문제를 최소화하기 위해서 살아있는 세포 내부와 주변 매질에서는 물체 함수가 음의 값이 나오지 않는다는 지식에 근거하여 iterative constraint algorithm [18,19]을 적용할 수 있다.

<그림 3>(d)와 같이 0의 값이 측정되지 못한 각도의 공간에 채워지고 그 다음에 inverse Fourier transform에 의해 3D 맵을 복원 한다. 복원된 이미지에서 매질의 값보다 작은 값을 가지는 픽셀들이 있다(<그림 3>(a)). 이 픽셀들의 값을 매질의 굴절률 값과 맞춰주고 수정된 이미지를 다시 Fourier transform한다. Fourier space에 있는 값이 0이었던 픽셀들은 더 이상 0이 아니고 측정하지 못한 각도에 대한 근사적 솔루션으로 얻어진다(<그림 3>(e)). 하지만 동시에 공간에 있는 측정된 자료의 값도 수정된다. 실험적으로 측정된 값이 정확하기 때문에, 수정된 값을 측정된 값으로 교체한다. 이 과정은 복원된 물체 함수가 수렴될 때까지 반복된다(<그림 3>(c)와 (f)). 따라서 음의 값으로 측정되는 모순은 사라지고 복원된 이미지는 더욱 정확해진다. iterative constraint algorithm을 적용하고 난 뒤에 측정된 polystyrene bead 굴절률의 오차값은



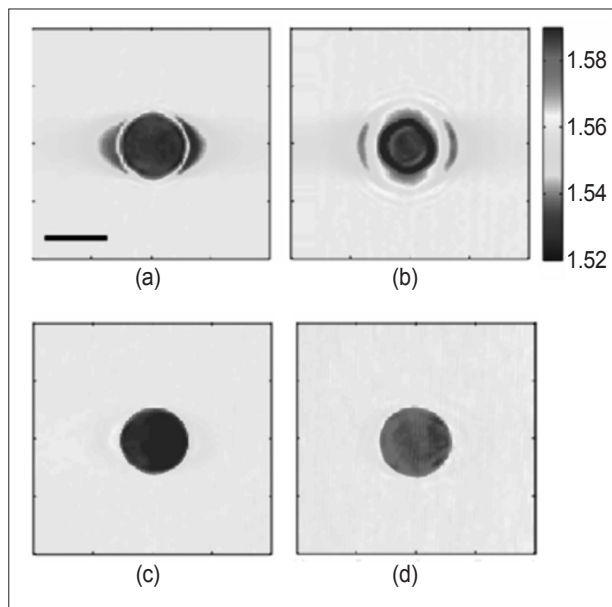
<그림 3> Iterative constraint algorithm, (a) constraint algorithm을 적용하기 전의  $6\mu\text{m}$  bead의 단면 이미지, (b) non-negative constraint를 적용한 후의 (a) 이미지, (c) constraint algorithm을 100 번 반복한 후의 (b) 이미지, 컬러 막대는  $633\text{nm}$ 에 해당하는 굴절률을 보여준다. 스케일 막대:  $5\mu\text{m}$ , (d) constraint algorithm을 적용하기 전의  $K_x-K_y$  평면의 amplitude 분포, (e) non-negative constraint를 적용한 후의 단면 이미지의 3차원 푸리에 변환, (f) constraint algorithm을 100번 반복한 후의 단면 이미지의 3차원 푸리에 변환, 컬러바는 E-field amplitude의 상용로그이다. 스케일 막대:  $2\mu\text{m}^{-1}$



0.001에 근접한다. iterative constraint algorithm을 적용하기 전(〈그림 3〉(d))과 후(〈그림 3〉(f))를 비교해보면 측정되지 않은 각도 부분에도 링 패턴이 생성된다. 이는 iterative constraint algorithm의 사용이 측정되지 않는 각도 부분에 대한 합리적인 정확한 해답이 될 수 있음을 암시한다.

일반적으로 x-ray 토모그래피에서는 빛의 회절을 고려하지 않는 Inverse Radon transform이 쓰이는데, 이 알고리즘과 ODT의 성능을 비교하였다. 이를 위해 두 개의 다른 초점 거리에서 1.56 reflective index oil에 6 $\mu$ m 비드를 담귀 두 세트의 angular E-field 이미지를 측정했다. 하나의 초점은 비드의 중앙에 해당하고, 다른 하나는 중앙에서 4 $\mu$ m 위에서 측정했다(〈그림 4〉). Inverse Radon transform을 적용했을 때 objective

focus가 비드의 중앙에 위치했을 때 비드 중앙에서의 단면의 굴절률이 일정하였다(〈그림 4〉(a)). 그러나 초점이 중앙위에 존재했을 때, 전파되는 빔의 회절로 인한 링 패턴이 비드의 가운데에 나타난다. 이것은 Inverse Radon transform이 회절에 대한 효과를 고려하지 않기 때문에 복원된 이미지에서 오차가 발생하는 것을 보여준다. 반면에 Rytov 근사에 기반한 ODT는 초점의 위치와 관련이 없었다. 〈그림 4〉(c)와 (d)는 각각 비드 중앙과 중앙으로부터 4 $\mu$ m 벗어난 위치에서 측정된 데이터를 가지고 ODT에 의해 복원된 단면 이미지이다. 두 이미지 모두 일정한 값의 분포를 가진 깨끗한 경계를 가진 비드가 보인다. 이는 Diffraction tomography가 회절에 대한 효과를 고려함을 보인다. 매질로 사용한 오일의 굴절률



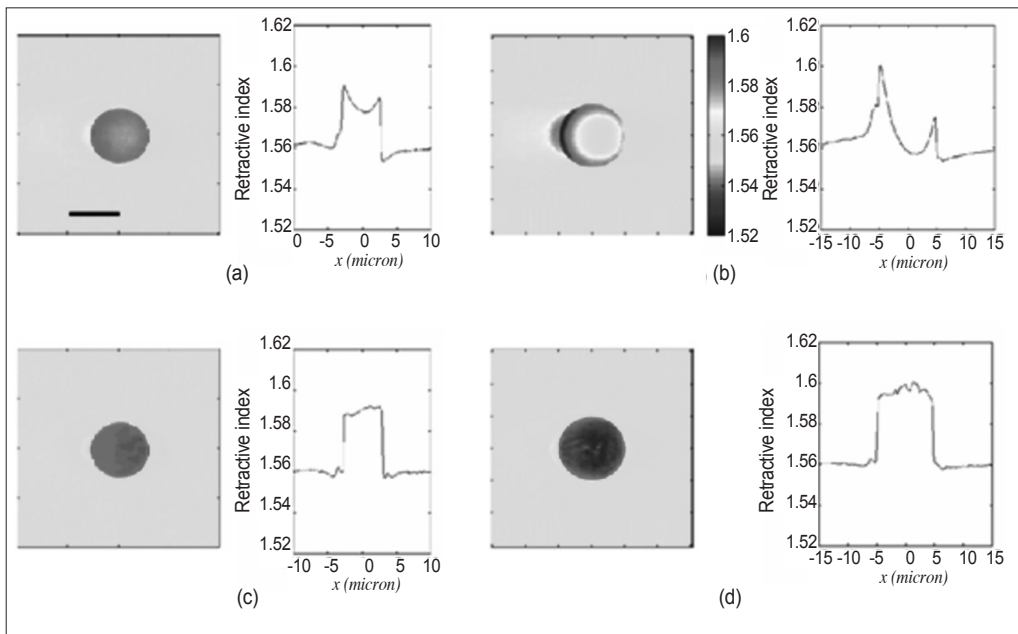
〈그림 4〉 filtered back-projection algorithm 과 Rytov 근사를 이용한 diffraction tomography의 비교. (a)와 (b) filtered back-projection algorithm으로 복원된 6 $\mu$ m bead의 단면 이미지로 bead 가운데에 초점을 맞춘 경우 (a)와 bead 가운데 면으로부터 4 $\mu$ m 위를 찍은 이미지 (b). (c)와 (d) Rytov 근사를 기반으로 한 diffraction tomography를 이용하여 복원한 (a), (b)와 같은 단면 이미지로 bead 가운데에 초점을 맞춘 경우(c)와 bead 가운데 면으로부터 4 $\mu$ m 위를 찍은 이미지(d). 컬러 막대는 633nm에 해당하는 굴절률을 보여준다. 스케일막대: 5 $\mu$ m.

값에 대한 비드의 상대적인 값이 0.03인데, 이 차이는 세포와 세포 배양액의 상대적 굴절률 차이에 매우 근접하다. 그러므로 Rytov 근사는 단일 세포 이미징에 적용할 수 있다.

다음으로 Rytov 근사와 Born 근사를 비교해 보았다. <그림 5>(a)와 (c)는 각각 Born 근사와 Rytov 근사를 이용하여 6 $\mu\text{m}$  비드의 단면 이미지를 복원한 것이다. Born 근사는 비드 가운데에서의 값이 작게 나온 반면에 Rytov 근사는 상대적으로 값이 일정하게 나왔다. 10 $\mu\text{m}$  비드에 대해서는 Born 근사는 비드 안쪽의 왜곡이 더 심해졌고, 반면에 Rytov 근사의 굴절률 단면 이미지는 여전히 일정했다. 이는 Born 근사는 물체의 크기에 많이 영향을 받는다는 점과 위상 지연 값이 3 rad에 가까운 10 $\mu\text{m}$  비드를

이미징하는데 적절하지 않음을 보여준다. 이는 10 $\mu\text{m}$  비드의 위상 지연값과 비슷한 값을 가지는 생물학적 세포를 이미징 하는데 사용 될 수 없음을 보여준다. 반면에 Rytov 근사는 물체의 크기에 덜 영향을 받고 굴절률 차이 0.03에 대해서 유효하다. 그러므로 Rytov 근사는 생물학적 세포를 이미징하는데 더 적절하다.

이제 ODT를 살아있는 결장 선암 세포인 HT29 세포 이미징에 적용하였다. 살아있는 세포를 이미징하기 위해서 특별히 고안된 imaging chamber에 세포를 준비했다. Chamber는 125 $\mu\text{m}$  두께의 plastic spacer에 의해 분리된 두 장의 coverslip으로 이루어져 있다. 세포는 Coverslip 표면에 충분히 부착되도록 측정 전에 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간동안 배양되

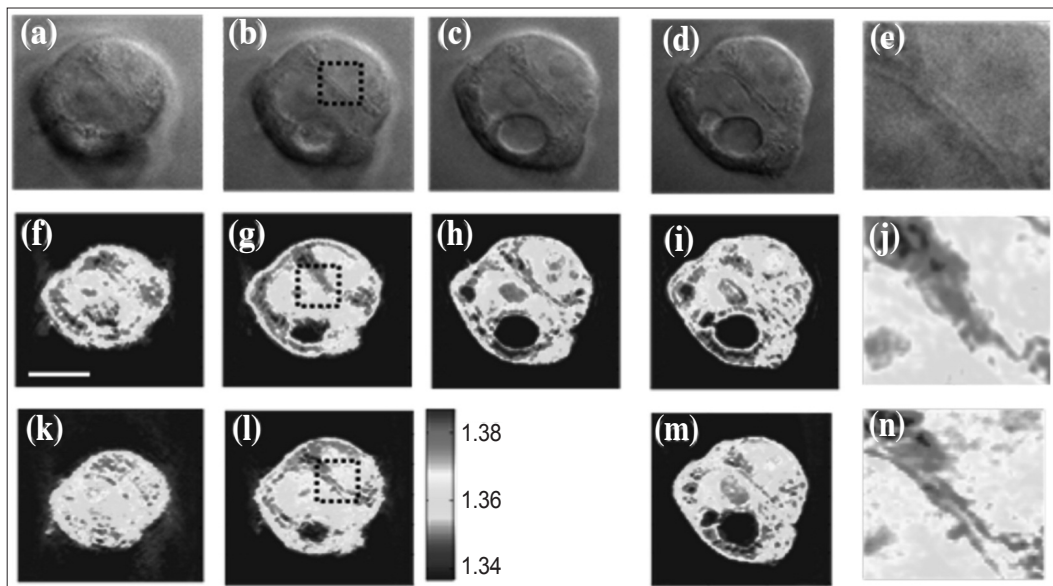


<그림 5> Born 근사와 Rytov 근사를 이용한 diffraction tomography 비교. (a)와 (c) 각각 Born 근사와 Rytov 근사를 이용하여 복원한 6 $\mu\text{m}$  bead의 단면 이미지. 각 이미지 옆에 있는 line profile은 bead의 중앙을 가로지르는 부분에 대한 profile이다. (b)와 (d)는 (a), (c)와 같은 방법으로 10 $\mu\text{m}$  bead를 이용하여 복원한 단면 이미지. 컬러 막대는 633 nm에 해당하는 굴절률을 보여준다.

었다. 초점이 고정된 상태에서 한 세트의 복소장 이미지를 얻었다.

〈그림 6〉(f)–(j)는 Inverse Radon transform을 이용한 tomogram image의 x-y 단면이다. 〈그림 6〉(k)–(n)은 각각 〈그림 6〉(f)–(k)에 대응되는 Rytov 근사에 기반한 diffraction tomography로 복원한 tomogram의 단면이다. 〈그림 6〉(h)는 objective focus plane에 대응하는 단면이고, 이것은 ODT를 통해 처리한 그림이 Inverse Radon transform으로 처리한 〈그림 6〉(h)와 비슷하다. 〈그림 6〉(g)와 (l)은 초점에서  $1.7\mu\text{m}$  위에 있는 단면이다. 〈그림 6〉(f)와 (k)는 초점에서  $2.9\mu\text{m}$  위에 있는 단면이다. 〈그림 6〉(j)와 (m)은 초점에서  $2.9\mu\text{m}$  아래에 있다. 〈그림 6〉(a)–(e)는 〈그림 6〉(f)–(j)와 같은 초점거리에서 측정한 brightfield image다. 양쪽 refractive index

tomogram의 구조는 brightfield image와 잘 매치가 된다. 그러나 초점에서  $1.7\mu\text{m}$  떨어져 있는 tomogram 단면을 자세히 비교해보면 두 tomogram에서의 차이를 볼 수 있다. 〈그림 6〉(e), (j) 그리고 (n)은 각각 〈그림 6〉(b), (g) 그리고 (l)의 검은 사각형 부분을 확대한 그림이다. Inverse Radon transform을 이용해 처리한 이미지를 Brightfield image와 비교해보면 세포질의 세세한 구조가 흐릿해지는 것을 볼 수 있다. 반면에 diffraction tomography를 이용한 경우에는 두 개의 핵을 분리하던 두 개의 선이 더 정확하게 일치한다. 이는 Rytov 근사가 생물학적 세포의 3D 굴절률 복원에서 diffraction의 효과를 감안하는 데에 적절함을 보여준다. 결론적으로 살아있는 단일 세포 전체의 3차원 구조의 이미지와 세포소기관의 굴절률을 정량화 할 수 있었다.



〈그림 6〉 HT29 세포에 대한 Brightfield image (a)–(e)와 filtered back-projection algorithm을 이용하여 복원한 3차원 단면이미지 (f)–(j) 그리고 Rytov 근사에 기반한 diffraction tomography (k–n). (h)는 물체에 정확히 초점을 맞춘 위치에서의 단면 이미지. (g)와 (l)은 원래 초점 위치보다  $1.7\mu\text{m}$  위에서의 단면이미지이고 (j)와 (k)는  $2.9\mu\text{m}$  위에서의 단면이미지이다. (i)와 (m)은  $2.9\mu\text{m}$  아래에 해당하는 단면 이미지이다. (a)–(e) brightfield image는 (f)–(j)와 같은 초점평면에서 얻은 이미지이다. (e), (j) 와 (n)은 각각 (b), (g)와 (l)에서의 사각형 범위를 확대한 것이다. 컬러 막대는  $633\text{nm}$ 에 해당하는 굴절률을 보여준다. 스케일 막대:  $10\mu\text{m}$ .

## V. 결론

지금까지 여러 입사각에 대해 샘플을 투과한 빛의 이미지들로부터 물체의 3차원 구조를 재현하는 방법을 알아보았다. 회절을 고려하지 않는 inverse Radon transform보다는 홀로그래픽 회절 토모그래피가 왜곡이 적은 3차원 객체 구현이 가능하였고, 특히 세포의 이미징에는 Rytov 근사가 Born 근사보다 더 적절하다는 것을 알 수 있었다. 최근의 연구를 통해 TPM 시스템에 고속 카메라를 이용하면 3차원 이미지를 30Hz의 속력으로 얻을 수 있는 연구를 진행하였고, 이를 통해 생체 세포의 내부 구조 변화를 실시간으로 관찰하는 연구가 있

었다[25].

생체 세포의 내부에서의 굴절률 분포를 이미지할 수 있는 홀로그래픽 회절 토모그래피는 여러 가지 바이오 메디칼 연구에 응용되고 있다. 예를 들면 말라리아에 감염된 적혈구에서 세포에 존재하는 헤모글로빈의 양을 정량적으로 측정할 수 있게 해주어, 질병의 진행 단계를 보다 정확하게 판별하게 해주었다[26]. 또한 최근에는 세포 내부에서의 염색체의 양을 형광물질의 도움 없이 정량적으로 얻을 수 있도록 하여, 염색체의 양이 비정상적으로 많은 암 세포를 구분하는 것을 가능하게 하였다[23]. 홀로그래픽 회절 토모그래피 기술은 앞으로도 많은 생명공학 연구에 도움을 줄 것으로 기대한다.

### 참고 문헌

- [1] E. Wolf, Three-dimensional structure determination of semi-transparent object from holographic data, *Opt. Commun.* 1(4) (1969) 153-156.
- [2] M. Born, E. Wolf, and A. B. Bhatia, *Principles of Optics : Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*, Cambridge University Press, Cambridge [England], New York, 1999.
- [3] F. Zernike, Phase-contrast, a new method for microscopic observation of transparent objects. Part I, *Physica* 9 (1942) 686-698.
- [4] G. Nomarski, Microinterferomètre différentiel à ondes polarisées, *J. Phys. Radium* 16 (1995) 9S-11S.
- [5] Y.K. Park, G. Popescu, K. Badizadegan, R. R. Dasari, M. S. Feld, Diffraction phase and fluorescence microscopy, *Opt. Express* 14(18) (2006) 8263-8268
- [6] G. Popescu, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, Observation of dynamic subdomain in red blood cells, *J Biomed. Opt.* 11(4) (2006) 040503.
- [7] C. Fang-Yen, S. Oh, Y. Park, W. Choi, S. Song, H. S. Seung, R. R. Dasari, and M. S. Feld, Imaging voltage-dependent cell motions with heterodyne Mach-Zehnder phase microscopy, *Opt. Lett.* 32(11) (2007) 1572-1574.
- [8] P. Marquet, B. Rappaz, P. J. Magistretti, E. Cuhe, Y. Emery, T. Colomb, and C. Depeursinge, Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy, *Opt. Lett.* 30(5) (2005) 468-470.
- [9] A. Barty, K. A. Nugent, D. Paganin, and A. Roberts, Quantitative optical phase microscopy, *Opt. Lett.* 23(11) (1998) 817-819.
- [10] A. Barty, K. A. Nugent, A. Roberts, and D. Paganin, Quantitative phase tomography, *Opt. Commun.* 175(4-6) (2000) 329-336.
- [11] V. Lauer, New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope, *J. Microsc.* 205(Pt2) (2002) 165-176.

- [12] F. Charriere, N. Pavillon, T. Colomb, C. Depeursinge, T. J. Heger, E. A. D. Mitchell, P. Marquet, and B. Rappaz, Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba, *Opt. Express* 14(16) (2006) 7005-7013.
- [13] W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, S. Oh, N. Lue, R. R. Dasari, and M. S. Feld, Tomographic phase microscopy, *Nat. Methods* 4(9) (2007) 717-719.
- [14] F. Montfort, T. Colomb, F. Charrière, J. Kühn, P. Marquet, E. Cuhe, S. Herminjard, and C. Depeursinge, Submicrometer optical tomography by multiple-wavelength digital holographic microscopy, *Appl. Opt.* 45(32) (2006) 8209-8217.
- [15] L. F. Yu, and M. K. Kim, Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method, *Opt. Lett.* 30(16) (2005) 2092-2094.
- [16] W. Gorski, and W. Osten, Tomographic imaging of photonic crystal fibers, *Opt. Lett.* 32(14) (2007) 1977-1979.
- [17] F. Charriere, A. Marian, F. Montfort, J. Kuehn, T. Colomb, E. Cuhe, P. Marquet, and C. Depeursinge, Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy, *Opt. Lett.* 31(2) (2006) 178-180.
- [18] K. C. Tam, and V. Perezmendez, Tomographical imaging with limited-angle input, *J. Opt. Soc. Am.* 71(5) (1981) 582-592.
- [19] B. P. Medoff, W. R. Brody, M. Nassi, and A. Macovski, Iterative convolution backprojection algorithms for image-reconstruction from limited data, *J. Opt. Soc. Am.* 73(11) (1983) 1493-1500.
- [20] Y. Sung, and R. R. Dasari, Deterministic regularization of three-dimensional optical diffraction tomography, *J. Opt. Soc. Am. A* 28(8) (2011) 1554-4561.
- [21] A. C. Kak, and M. Slaney, *Principles of Computerized Tomographic Imaging*, Academic Press, New York, 1999.
- [22] M. Debailleul, B. Simon, V. Georges, O. Haeberle, and V. Lauer, Holographic microscopy and diffractive microtomography of transparent samples, *Meas. Sci. Technol.* 19(7) (2008) 074009.
- [23] A. J. Devaney, Inverse-scattering theory within the Rytov approximation, *Opt. Lett.* 6(8) (1981) 374-376.
- [24] Y. J. Sung, W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging, *Opt. Express* 17(1) (2009) 266-277.
- [25] C. Fang-Yen, W. Choi, Y. J. Sung, C. J. Holbrow, R. R. Dasari, and M. S. Feld, Video-rate tomographic phase microscopy, *J. Biomed. Opt.* 16(1) (2011) 011005.
- [26] Y. K. Park, M. Diez-Silva, G. Popescu, G. Lykotrafitis, W. S. Choi, M. S. Feld, and S. Suresh, Refractive index maps and membrane dynamics of humal red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(37) (2008) 13730-13735.

## 필자소개



### 강필성

- 2011년 : 고려대학교 물리학과 학사

- 2011년 ~ 현재 : 고려대학교 물리학과 대학원 석박사통합과정

## 필자소개



### 최원식

- 2004년 : 서울대학교 물리학과 박사
- 2006년 ~ 2009년 : MIT의 G. R. Harrison Spectroscopy Laboratory 연구원
- 2009년 ~ 현재 : 고려대학교 물리학과 교수
- 2010년 9월 ~ 현재 : *Biomedical Optics Express*의 Associate editor
- 2013년 3월 ~ 현재 : *Journal of the Optical Society of Korea* 편집간사