

대역통과필터의 기울임에 따른 형광 이미징 시스템 특성 분석 연구

김태훈¹ · 조상욱¹ · 박찬식² · 이학근² · 김두인³ · 정명영^{1,†}

¹부산대학교 인지메카트로닉스공학과

²나우비전 기술연구소

³부산대학교 BK21+나노융합인지메카트로닉스공학 사업단

A Study on Fluorescence Imaging System Characteristics depending on Tilting of Band Pass Filter

Taehoon Kim¹, Sang Uk Cho¹, Chan Sik Park², Hak-Guen Lee², Doo-In Kim³ and Myung Yung Jeong^{1,†}

¹Department of Cogno-Mechatronics Engineering, Pusan National University, Geumjeong-gu, Busan 46241, Korea

²Nawoo Vision Corporation R&D Group, Miryang-si, Gyeongsangnam-do 50430, Korea

³BK21+Nano-integrated Cognomechatronics Engineering, Pusan National University, Geumjeong-gu, Busan 46241, Korea

(Received June 17, 2016: Corrected June 20, 2016: Accepted June 28, 2016)

초 록: 본 논문에서는 형광 이미징 시스템의 대역통과필터의 회전에 의한 특성 변화를 관찰하였다. 이론적 모델을 통해 대역통과필터의 투과율 및 대역폭이 회전각에 따라 변한다는 것을 알 수 있고, 회전각에 따른 파장별 투과율 측정을 통해 이를 입증하였다. 그러므로 대역통과필터의 회전에 따른 특성변화를 이용하면 바이오 영상 장치를 정밀하게 조절하여 시스템의 형광 신호를 더욱 강하게 하고, 양질의 영상을 얻을 수 있다.

Abstract: In this paper, we studied effects of tilting angle of band pass filter on the characteristics of fluorescence imaging system. Theoretical modeling showed that transmittance and filtering range are highly dependent on the tilting angle. Measurements on transmittance as a function of wavelength confirmed that changes in transmittance and the band filter range are in good agreement with theoretical prediction. Therefore, characteristics of band pass filter can be precisely tuned by altering tilting angle of band pass filter in order to enhance fluorescence signal in bio imaging system.

Keywords: Fluorescence, Microscope, Band Pass Filter, Fluorescence Imaging, Angle Tuned Band Pass Filter

1. 서 론

의료용 영상기기의 발전으로 진단이 어려웠던 다양한 질병들을 조기에 발견하고, 치료할 수 있게 되었다. Computed tomography(CT), magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography(PET), single photon emission computed tomography(SPECT) 등 다양한 의료용 영상기기가 활용되고 있다.¹⁻⁴⁾ 하지만 기존의 의료용 영상기기인 CT는 매우 강한 방사선에 노출되고, MRI는 강한 자기장을 사용하며, 영상을 획득하기 위한 시간이 매우 길며, 데이터 처리속도가 낮고, PET는 암과 단순한 염증을 비교하는 것이 어려우며, 병변부위의 정확한 위치 정보를 얻기가 힘들고, SPECT는 몸 속의 기능적 변화는

알 수 있으나 해부학적 영상을 획득할 수는 없어, 병변부위의 위치 판별에 한계가 있다.⁶⁾ 또한, 이들 의료용 영상 기기들은 영상을 획득하기 위한 시간이 길어, 진단을 위해 여러 번 의료기관을 방문하여야 하는 등 불편함이 있었고, 영상의 관독에 경험적인 지식에 의존하게 되는 단점이 있었다.¹⁻⁴⁾ 이러한 기존 의료용 영상 기기의 단점을 개선하기 위해 최근 생체영상의 민감도가 높고, 비교적 빠른 영상구현이 가능한 광학영상 기법에 관한 연구가 진행되고 있다. 대표적인 광학영상 방법은 생물발광 영상 (bioluminescence imaging)과 형광영상(fluorescence imaging)을 이용한 것이며, 이들에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다.⁶⁾ 이러한 광학영상의 핵심 기술은 생체 외부로 발광하는 특정 파장의 빛을 획득하여 영상화하는 기

[†]Corresponding author

E-mail: myjeong@pusan.ac.kr

© 2016, The Korean Microelectronics and Packaging Society

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

술로, 생체 조직의 자가 형광(autofluorescence)에 의해 발생하는 영상 획득의 한계를 극복하는 것이 매우 중요하다.¹⁾ 최근 근적외선(near infrared, NIR) 영역의 빛을 이용한 형광 영상 획득에 대한 연구가 활발하게 진행되는 이유는 기존의 자외선 영역의 빛은 생체 내 조직이나 장기에 의한 자가 형광 신호의 발생으로 인해, 배경 신호를 증가시켜 신호 대 잡음비(signal to background ratio, SBR 또는 signal to noise ratio, SNR)를 나쁘게 만들기 때문이다.^{1,6,8)} 생체 조직에 광원을 조사하면, 조직 내에 분포하는 형광 물질이 형광 신호를 방출한다. 이로 인한 형광 신호와 형광 영상 획득을 위해 투여된 형광 dye에 의해 방출된 형광영상이 혼재되어 있어, SBR이 매우 나빠지며, 그로 인해 대조영상을 얻는 것이 어렵다.^{2,8)} 또한 생체 내에 대부분을 차지하는 물로 인한 빛의 흡수 및 산란의 영향으로 인한 손실을 최소화해야 의료용 영상 구현이 가능하다. 이로 인해서 기존 의료용 형광 현미경들은 특정 파장 대역의 형광 신호에 맞춰 필터를 구성하여 효율을 극대화 하는 전략을 사용하여 왔다. Methylene blue, indocyanine green 이외에도 많은 종류의 형광염료(fluorescent dye)가 존재하고, 이들이 내는 형광 신호의 파장은 각각의 형광염료의 특성이나, 이들을 여기시키는 광원에 따라 다르다. 이들을 여기시키기 위한 광원에 비해 형광 신호는 매우 희박하여 이를 영상화하기 위해서는 대역통과 필터의 사용이 필수적이다. 그로 인해, 사용하는 형광체가 바뀌는 경우, 필터구성이나 형광체를 자극하기 위한 광원의 파장 역시 바뀌어야 하는 문제가 있었다. 이런 단점을 해결하기 위해서 광대역광원을 필터를 이용하여 선택적으로 형광체에 조사하는 방법이나, 파장 가변 레이저(tunable laser)를 이용하는 방법들이 연구되고 있다.⁹⁾ 반면, 형광신호를 자가 형광신호나 배경 잡음 신호로 분리하기 위한 대역통과필터는 상황에 맞게 다른 대역통과 필터로 바꾸어서 사용하는 실정이다. 따라서 본 논문에서는 근적외선 의료영상 획득이 가능한 다채널 근적외선 형광 현미경 시스템을 구성하고, 대역통과필터의 회전에 의한 입사각 변화를 통해 대역통과 특성의 변화를 관찰하며, 이를 적용한 형광 현미경을 통해 형광 영상의 변화를 관찰하는 연구를 수행하고, 이를 적용하여 미세조정이 가능한 형광 영상 시스템을 제안하였다.

2. 대역통과필터 입사각에 따른 필터 특성 분석

대역통과필터는 특정 대역의 파장만 선별적으로 통과시키는 필터이다. 본 연구에서는 710 ± 20 nm 대역통과 필터를 이용하여 실험을 진행하였다. 먼저, 광학 시뮬레이션을 통해 대역통과필터에 입사하는 빛의 입사각에 따라서 대역통과필터의 특성이 변화하는지 확인하였다. 미국 Semrock 사에서 제공하는 filter 관련 시뮬레이션 프로그램을 이용하여 대역통과필터를 회전시키며 대역통과 특성 변화를 관찰하였다. Fig. 1에 나타난 것처럼 입사각

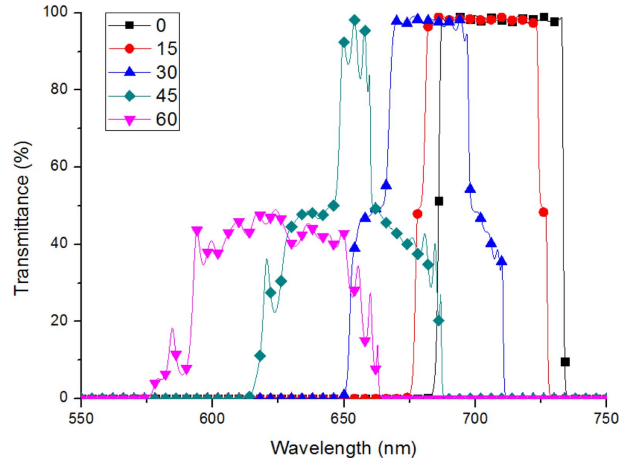


Fig. 1. Simulation results according to tilted angle of band pass filter.

이 0도 일 때는 710 ± 20 nm의 투과특성을 나타내지만, 15도, 30도, 45도, 60도로 대역통과필터에 입사하는 빛의 입사각에 따라서 대역통과필터의 중심파장이 점점 짧은 파장 쪽으로 이동하는 것을 확인하였다.

입사각에 따른 투과파장의 변화 특성은 Fabry-Perot 간섭계의 원리에 기초하고 있다. Fig. 2의 Fabry-Perot multi-beam 간섭에서 두 개의 광선만 생각하면, 두 광선의 광 경로 차이는 다음의 식과 같다.

$$A = n_f(\overline{AB} - \overline{BC}) - n_2\overline{AD} = 2n_f d \cos \theta_i \tag{1}$$

n_1, n_2 는 Fig. 2 우측 그림에서 얇은 필름 좌우측 매질의 굴절률이며, n_f 는 얇은 필름의 굴절률이다. 이때, 발생하는 위상차는

$$\delta = k_0 A = 4\pi \frac{n_f}{\lambda} d \cos \theta_i \tag{2}$$

여기서 보강간섭을 일으키기 위한 조건은 $\delta = 2N\pi$ 가 되어야 하므로, θ_i 와 파장 λ 의 관계식을 도출할 수 있다.

$$n_f d \cos \theta_i = \frac{1}{2} N \lambda \tag{3}$$

빛이 수직으로 입사하는 경우($\theta_i = \theta_t = 0^\circ$ 인 경우), λ 를 λ_0 로 두면, 다음 식과 같이 표현된다.

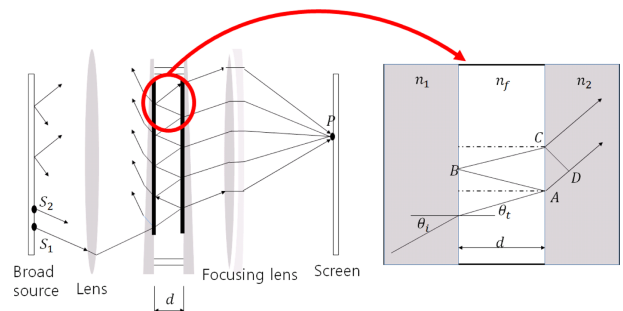


Fig. 2. Fabry-Perot etalon.

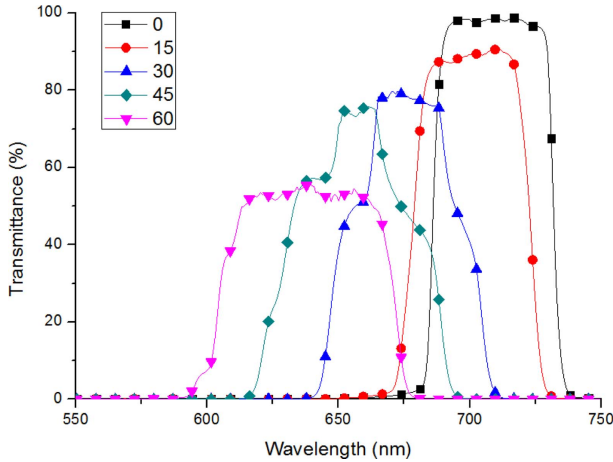


Fig. 3. Experiments results according to tilted angle of band pass filter.

$$n_f d = \frac{1}{2} N \lambda_0 \tag{4}$$

(3)과 (4) 두 식으로부터,

$$\lambda = \lambda_0 \cos \theta_t = \lambda_0 \sqrt{1 - \sin^2 \theta_t} \tag{5}$$

여기서 Fig. 2 우측의 n_1 과 n_2 매질을 공기로 가정하고($n_1 = n_2 = 1$), n_f 를 얇은 필름들의 유효굴절률 n_{eff} 라고 두면, Snell의 법칙에 의해

$$\sin \theta_t = n_{eff} \sin \theta_i \tag{6}$$

(6) 식을 (5) 식에 대입하면, 다음과 같은 관계식을 얻을 수 있다.⁵⁾

$$\lambda(\theta) = \lambda(0) \sqrt{1 - \frac{\sin^2 \theta_t}{n_{eff}^2}} \tag{7}$$

빛의 입사각도에 따른 대역통과필터 파장 특성 변화에 대한 이론 및 시뮬레이션 결과를 검증하기 위하여 710 ± 20 nm의 대역통과필터를 사용하여 투과 스펙트럼을 측정하였고, 이를 Fig. 3에 나타내었다. 실제 측정결과, 시뮬레이션결과와 유사하게 입사각이 커질수록 대역통과필터의 투과파장은 점점 더 짧아지는 것을 확인하였다.

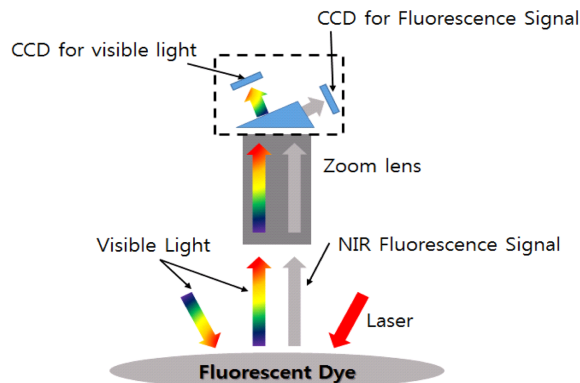


Fig. 4. Schematic diagram of fluorescence imaging system.

3. 대역통과필터 기울임에 따른 형광 현미경 특성 분석

현재 개발 중인 실시간 in-vivo 형광 이미징 시스템을 이용하여 대역통과필터의 기울임에 따른 형광 영상의 차이를 확인하였다. 형광 이미징 시스템은 카메라와 형광체를 여기하기 위한 레이저 광원, 이 레이저 광원이 형광체의 형광 신호와 함께 카메라에서 검출되는 것을 막기 위한 대역통과필터, zoom lens, halogen lamp 등으로 구성되어 있다. 영상유도 수술용으로 개발하기 위하여 본 형광 이미징 시스템은 zoom lens 끝단과 형광체 사이에 30 cm 이상의 작동거리(working distance, WD)를 갖도록 제작되었다. 근적외선 여기 광원 및 백색 광원을 시편에 고정 조사할 수 있도록 각각 하나의 광원에서 발생한 빛을 하나의 광섬유로 진행시킨 후 1×4 splitter를 이용하여 4개의 광섬유로 분할하고 이를 일정한 간격으로 배치하여 비교적 균일하게 조사되도록 하였다. Fig. 4, Fig. 5에 이 시스템의 개략도 및 사진을 나타내었다.

앞서 확인한 대역통과필터의 빛의 입사각에 따른 특성 변화를 형광 이미징 시스템에 적용하기 위해서는 zoom lens와 카메라 사이에 필터를 설치하기 위한 공간이 필요하다. 필터를 45° 가량 회전시키기 위해 lens와 카메라 사이에 많은 공간이 필요하고, 그에 따라 별도로 광학계를 구성하였다. 별도로 구성된 광학계는 색 선별 거울(dichroic mirror)을 이용하여 파장 650 nm 이하의 빛은 그대로 투과시키고, 650 nm 이상의 빛은 반사하도록 하였

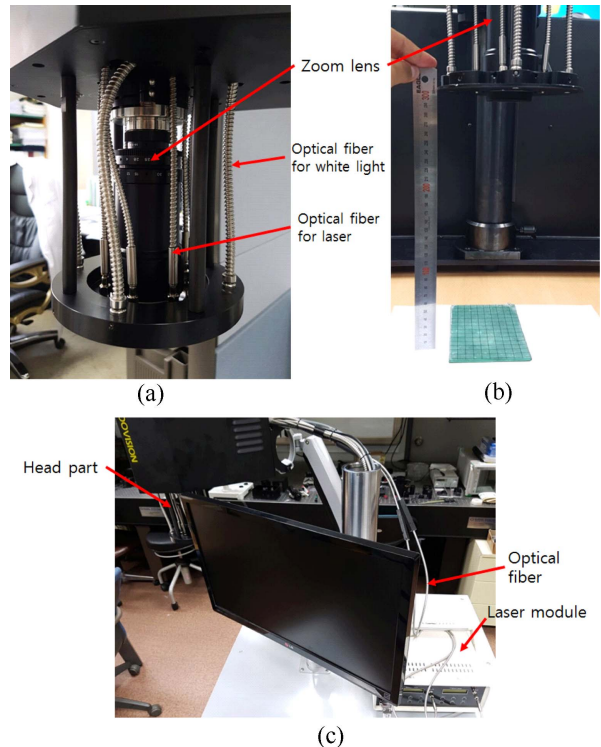


Fig. 5. (a) Head part of the fluorescence imaging system, (b) WD of the system, (c) Fluorescence imaging system.

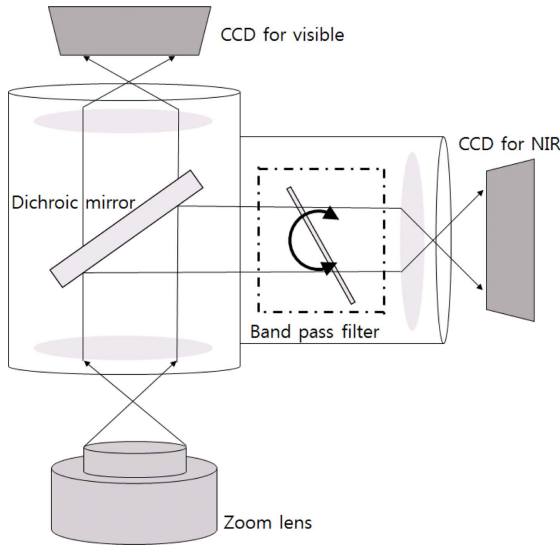


Fig. 6. Schematic diagram of optics part for fluorescence imaging system using tilted band pass filter.

다. Zoom lens에서 나온 빛은 기존 카메라의 CCD가 있던 위치에서 초점이 맺히게 되지만, 색 선별 거울 및 필터를 설치하기 위한 공간으로 인해 CCD까지 거리가 더 멀어졌고, zoom lens에서 나온 빛의 초점거리를 늘려줘야 원활하게 영상을 획득할 수 있다. 대역통과필터가 회전하더라도 굴절에 의한 영향이 최소화 되도록 하고, zoom lens에서 진행해 나온 빛의 초점거리가 길어질 수 있도록 zoom lens에서 나온 빛을 평행광으로 만들 수 있게 collimation lens를 zoom lens와 대역통과필터 사이에 설치하고, CCD에 초점을 맺을 수 있도록 대역통과필터와 CCD 사이에 focusing lens를 설치하였다. 이에 대한 개략도를 Fig. 6에 나타내었다.

대역통과필터의 회전에 따라 형광 영상 차이를 확인하기 위하여, 실제로 $780 \pm 10 \text{ nm}$ 대역 형광 신호에 맞추어진 형광 이미징 시스템에 800 nm 대역통과필터를 장착

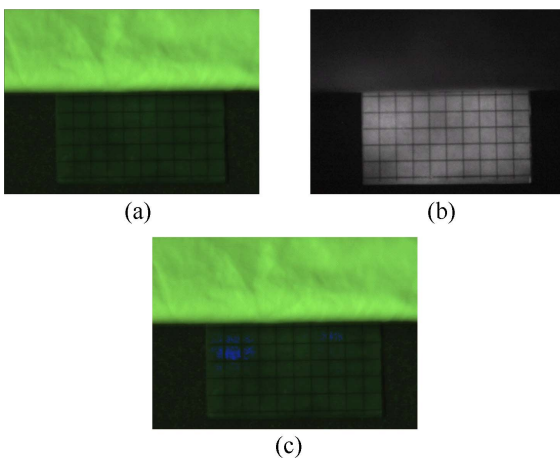


Fig. 7. (a) Color image, (b) NIR fluorescence image, (c) Merged image where the band pass filter is set parallel between CCD and zoom lens.

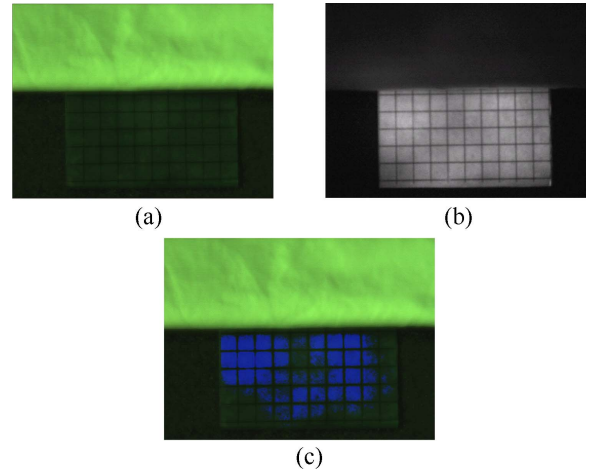


Fig. 8. (a) Color image, (b) NIR fluorescence image, (c) Merged image where the band pass filter is set in 45° angle.

하고, 이를 회전시켜 780 nm 대역의 형광 신호가 잘 받아들여지는지를 확인하였다. 이를 Fig. 7과 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 7은 대역통과필터가 빛의 진행방향에 수직하게 놓여 있는 상태이고, Fig. 8은 45°로 기울여진 상태이다. Fig. 7 및 Fig. 8에서 (a)는 컬러영상, (b)는 근적외선 형광영상, (c)는 이 두 영상 신호를 결합한 것이다. Fig. 7 및 Fig. 8의 (c)는 (b)영상에서 형광 신호를 추출하여 (a) 영상에 덧입힌 것이다. 영상을 덧입히는 과정에서 Fig. 7 및 Fig. 8 (b)의 그레이 스케일(gray scale)을 추출하고 최초 설정한 기준을 초과하는 신호를 (c)에 파란색으로 덧입혀지도록 하였다. 780 nm에서 가장 강한 형광 신호가 발생하는 형광체에 800 nm 대역통과필터를 사용하였기에 Fig. 7에서 형광신호가 비교적 약하고, Fig. 8에서 형광신호가 더욱 강해진 것을 (c)의 비교를 통해서 확인할 수 있다. 다만, (b) 형광 신호 영상에서, 형광체가 시편에 고루 분포하고 있기에, 시편 전체에서 형광 영상 신호가 고르게 검출될 것으로 기대하였으나, 조사되는 광원이 집중되는 곳에서 형광 신호가 더욱 강하게 나타났다. 이는 본 연구에서 제어한 대역통과필터와는 무관하게 형광 이미징 시스템 제작 상에서, 하나의 레이저 다이오드(Laser Diode, LD)에서 나오는 레이저를 4개의 광섬유로 분할하는 과정에서의 불균일성에서 기인된 것으로 생각된다. 추후 연구를 통해 광 도파로 설계 및 제작, 패키징 기술 등을 접목하여^{6,7)} 균일하게 레이저를 분할하고, 광섬유 끝단에 레이저를 산란시켜 시편에 보다 고르게 분포할 수 있도록 diffuser를 장착하는 방안 등을 고려하고 있다. 또한, 광대역, 고출력 백색광원을 활용하여 in-vivo system 및 intra-operative image guided surgery 시스템 등에서 필수적으로 필요한 조도를 확보함과 동시에 다양한 형광체를 자극하여 형광신호를 내도록 하는 특정 파장대역에서의 광출력을 확보하고, 본 연구에서 제안한 대역통과필터의 특성을 적용할 수 있도록 구성하여, 한 대의 형광 이미징 시스템으로 매우 다양한 종류의 형광염료에 사용할

수 있는 형광 이미징 시스템의 제작에 대한 연구를 진행할 예정이다.

4. 결 론

본 연구를 통해서 일반 대역통과필터의 입사각도 조절을 이용하여 형광 이미징 시스템의 필터링 특성을 변화시켜 영상을 획득할 수 있음을 확인하였고, 이를 이용하여 보다 간단하게 미세조정이 가능한 형광 이미징 시스템을 구축할 수 있는 가능성을 확인하였다. 대역통과 필터의 설계 및 제작에 있어서, 수 nm 단위로 통과 대역을 제어하는 일은 매우 어려운 일이기 때문에 상용 대역통과필터를 이용하여 형광 이미징 시스템을 구성하는데, 정확히 일치하는 파장대역의 대역통과필터를 제작하는데 한계가 있지만, 본 연구에서 수행한 대역통과필터의 회전에 따른 특성변화를 활용하면, 유사한 통과대역을 가진 필터의 미세한 각도조절을 통해 형광 이미징 시스템의 영상 품질을 향상시킬 수 있다.

사용자의 충분한 작업공간 확보를 위해 형광 이미징 시스템의 작동거리가 30 cm에 달하는 경우에도 영상 획득이 가능하고, 그뿐만 아니라, 대역통과필터 각도 조절을 통한 미세 조절로 더욱 양질의 영상을 획득할 수 있음을 확인하였다. 다양한 시도를 통한 형광 이미징 시스템의 발전으로 의료 목적의 병변부위 영상화, 미용 목적의 인체 주입물 분포 및 존재여부 확인, 동물실험 등 다양한 목적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청의 창업성장기술개발사업 [S2324017, 다채널 바이오 이미징용 마이크로스코프 개발]과 2016년도 밀양시의 재원으로 재단법인경남테크노

파크의 지원을 받아 수행된 나노융합 신규연구개발사업의 일환으로 수행하였음.

References

1. J. Choi, S. U. Cho, D. Kim, H. Lee, H. S. Choi and M. Y. Jeong, "A Study on Characteristics Analysis of Multichannel Filter Module for Near-infrared Fluorescence Imaging", *J. Microelectron. Packag. Soc.*, 23(1), 29 (2016).
2. J. G. Jeong, "General perspectives for molecular nuclear imaging", *The Korean Society of Nuclear Medicine*, 38(2), 111 (2004).
3. J. H. Lee, G. Park, G. H. Hong, J. Choi and H. S. Choi, "Design considerations for targeted optical contrast agents", *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2(4), 266 (2012).
4. J. V. Frangioni, "In vivo near-infrared fluorescence imaging", *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(5), 626 (2003).
5. P. Yeh, "Optics Waves in Layered Media", *Wiley series in pure and applied optics*, pp.161-162, Wiley, New York(1988).
6. A. W. Yang, S. U. Cho, M. Y. Jeong and H. S. Choi, "NIR Fluorescence Imaging Systems with Optical Packaging Technology", *J. Microelectron. Packag. Soc.*, 21(4), 25 (2014).
7. D. M. Kim, J. H. Ryu and M. Y. Jeong, "Optical Packaging and Interconnection Technology", *J. Microelectron. Packag. Soc.*, 19(4), 13 (2012).
8. A. M. De Grand and J. V. Frangioni, "An operational near-infrared fluorescence imaging system prototype for large animal surgery", *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2(6), 553 (2003).
9. C. Dunsby, P. M. P. Lanigan, J. McGinty, D. S. Elson, J. Requejo-Isidro, I. Munro, N. Galletly, F. McCann, B. Treanor, B. Onfelt, D. M. Davis, M. A. A. Neil and P. M. W. French, "An electronically tunable ultrafast laser source applied to fluorescence imaging and fluorescence lifetime imaging microscopy", *Journal of Physics D: Applied Physics*, 37, 3296 (2004).