

## 형광 이미징 시스템의 패키징 및 강도 특성 연구

김태훈<sup>1</sup> · 조상욱<sup>2</sup> · 박찬식<sup>2</sup> · 이학근<sup>2</sup> · 김두인<sup>3</sup> · 정명영<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 인지메카트로닉스공학과

<sup>2</sup>나우비전 기술연구소

<sup>3</sup>부산대학교 BK21+나노융합인지메카트로닉스공학 사업단

### A Study on the Fluorescence Imaging System Packaging and Optical Intensity Characteristics

Taehoon Kim<sup>1</sup>, Sang Uk Cho<sup>1</sup>, Chan Sik Park<sup>2</sup>, Hak-Guen Lee<sup>2</sup>, Doo-In Kim<sup>3</sup> and Myung Yung Jeong<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Cogno?Mechatronics Engineering, Pusan National University, Geumjeong-gu, Busan 46241, Korea

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

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

(Received September 7, 2016: Corrected September 22, 2016: Accepted September 27, 2016)

**초 록:** 본 논문에서는 긴 작동거리(working distance, WD)를 가지는 근적외선 형광 이미징 시스템을 소개하고, gain, 노출시간, 작동거리, 확대배율 등 측정 변수에 의한 형광 영상의 차이에 대해 분석하였다. 노출시간이 길수록, 확대배율이 클수록 형광신호는 더욱 강해지고, gain이 클수록 형광신호도 강해지지만, 배경신호도 함께 증가하여 SBR은 나빠질 수 있다. 제한한 시스템은 레이저 조사 방식으로 인해 작동거리가 짧은 경우 레이저 조사 영역의 강도 분포가 균일하지 못해서 형광신호가 약해지며, 그에 따른 해결방안을 제안하였다.

**Abstract:** In this paper, we introduced a near infrared fluorescence imaging system that has long working distance and analyzed on the effects of measurement variables such as gain, exposure time, working distance, magnification. Fluorescence signal intensity is growing up according to exposure time and magnification increasing, and it is getting stronger according to increase of gain, but the background signal intensity is getting stronger together. It causes low SBR. Due to a laser irradiation method, laser intensity distribution of the introduced system is not uniform and it makes fluorescence signal weak. So, we proposed a solution.

**Keywords:** Fluorescence, Microscope, Fluorescence Imaging, Signal to background ratio, Signal Intensity

## 1. 서 론

다양한 의료용 영상기기가 개발되고, 성능이 발전하면서 초기 진단이 어려웠던 질병들을 조기에 발견하고, 진단하여, 치료할 수 있게 되었다. CT (Computed tomography), MRI (magnetic resonance imaging), SPECT (single photon emission computed tomography), PET (positron emission tomography) 등 여러 의료용 영상 시스템들이 실제 질병의 진단에 활용되고 있다.<sup>1-4)</sup> 하지만 기존의 의료용 영상기기는 여러 한계점을 가지고 있는데, CT는 영상을 획득하기 위해 환자가 매우 강한 방사선에 노출되어야 하고, MRI는 강한 자기장을 사용하여 촬영하며, 영

상을 획득하기 위한 시간이 매우 길고, 데이터 처리속도가 낮다.<sup>5,6)</sup> PET는 악성 세포와 단순한 염증을 비교하는 것이 어렵고, 병변부위의 정확한 위치정보를 얻기가 힘이 들며, SPECT는 신체 내부의 기능적 변화는 알 수 있으나 해부학적 영상을 획득할 수는 없어, 병변부위의 위치 판별에 한계가 있다.<sup>5,6)</sup> 또한, 이들 의료용 영상 장치들은 영상을 획득하기 위한 시간이 길어 실시간으로 사용할 수 없고, 진단을 위해 여러 번 의료기관을 방문하여야 하는 등 불편함이 있었으며, 영상의 판독에 의사의 경험적인 지식에 의존하게 되는 단점이 있다.<sup>1-4)</sup> 이러한 기존 의료용 영상 기기의 단점을 개선하기 위해서 민감도가 높고, 비교적 빠른 영상구현이 가능한 광학영상 기법

<sup>†</sup>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.

을 활용한 생체 영상 획득에 관한 연구가 진행되고 있다. 대표적인 광학영상 방법은 생물발광 영상(bioluminescence imaging)과 형광 영상(fluorescence imaging)등이 있으며, 이들에 대한 다양한 기법의 연구들이 활발하게 진행되고 있다.<sup>6)</sup> 특히 형광 영상의 핵심 기술은 생체에서 발현되는 특정 파장의 형광을 획득하여 영상화하는 기술로, 생체 조직의 자가 형광 autofluorescence)과 획득하고자 하는 형광 신호를 구분해 영상으로 구현하는 것이 매우 중요하다.<sup>4)</sup> 최근에는 근적외선(near infrared, NIR) 영역의 빛을 이용한 형광 영상 획득에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 그 이유는 기존의 자외선 영역의 빛을 이용한 형광 영상 기술은 생체 내 조직이나 장기에 의한 자가 형광 신호의 발생으로 인해, 배경 신호를 증가시켜 신호 대 잡음비(signal to background ratio, SBR 혹은 signal to noise ratio, SNR)를 나쁘게 만들기 때문이다.<sup>4,5)</sup> 생체 조직에 특정 파장의 광원을 조사하면 조직 내에 존재하는 형광 물질이 형광 신호를 방출한다. 이로 인한 자가 형광 신호와 형광 영상 획득을 위해 투여된 형광 dye에 의해 방출된 형광영상이 혼재되어 있어서 SBR이 매우 나빠지고, 그로 인해 대조영상을 얻는 것을 어렵게 한다.<sup>1,2)</sup> 또한 생체 내에 대부분을 차지하는 물로 인한 빛의 흡수 및 산란의 영향으로 인한 손실을 최소화해야 선명한 고해상도 의료용 영상 구현이 가능하다. 근적외선 영역의 광원을 이용한 FLARE™(fluorescence-assisted resection and exploration) 등의 영상 장치가 개발되어 사용되고 있다.<sup>7,8)</sup> 그에 따라 국내에서도 영상 유도 수술용 다채널 근적외선 형광 이미징 시스템이 개발 중이다.<sup>7)</sup> 본 논문에서는 이 시스템을 이용하여 여러 측정변수가 영상에 미치는 영향에 대해 분석하고, 성능 향상 방안을 제안한다.

## 2. 형광 이미징 시스템의 측정 변수

현재 개발 중인 Fluorescence Imaging Assisted Theragnostic-Lux(FIAT-L) 형광 이미징 시스템의 성능을 분석하기 위하여 각종 변수별로 형광 영상을 촬영하고, Image J를 이용하여 분석하였다. FIAT-L 시스템은 영상 유도 수술 및 동물실험, 임상실험 등의 목적으로 제작되고 있기에 영상 장치와 형광체 시료 사이에 넓은 작업공간을 필요로 한다. 현재 시료표면부터 광학계까지 약 100 mm부터 500 mm 이내의 작동거리(working distance, WD)에서 영상 촬영이 가능하도록 제작되었다. 또한, 두 개의 형광 영상 채널과 한 개의 컬러 영상, 두 개의 형광 영상 채널의 신호를 컬러 영상에 합하여 보여주는 한 개의 채널, 총 네 개의 영상 채널로 구성되어 있다. 두 개의 형광 영상 채널에서 형광 신호를 각각 확보하기 위한 두 개의 레이저 모듈, 이 레이저 광원이 반사되어 인식되는 것을 막기 위한 필터, 여러 채널을 사용하기 위해 신호를 분리하는 색선별거울(dichroic mirror) 등이 사용되었다. 두 개의 레이저는 더 넓은 영역에 조사할 수 있도록 각각 네 가닥의 광

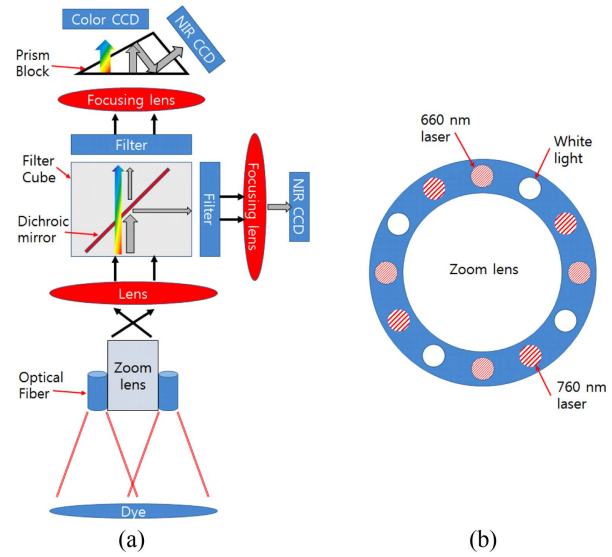


Fig. 1. (a) schematic diagram of FIAT-L system, (b) bottom view of the luminary head.

섬유를 묶은 bundle fiber를 사용하였다. 네 가닥의 광섬유가 묶인 쪽을 레이저 다이오드(laser diode, LD)에 연결되고, 각각 갈라져서 광학계의 중심에서 같은 거리에 동일 간격으로 배치하였다. 형광체를 여기시키기 위한 두 개의 레이저는 각각 660 nm와 760 nm의 중심파장을 가

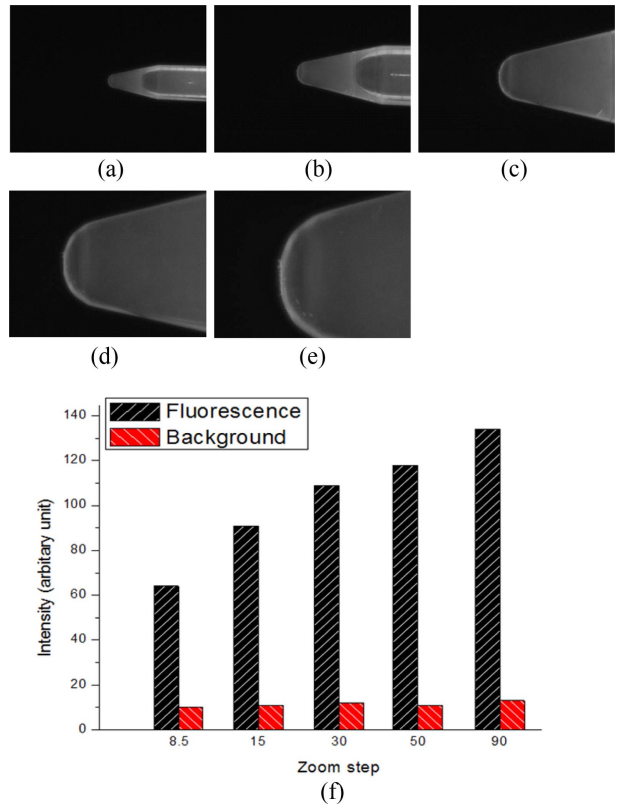
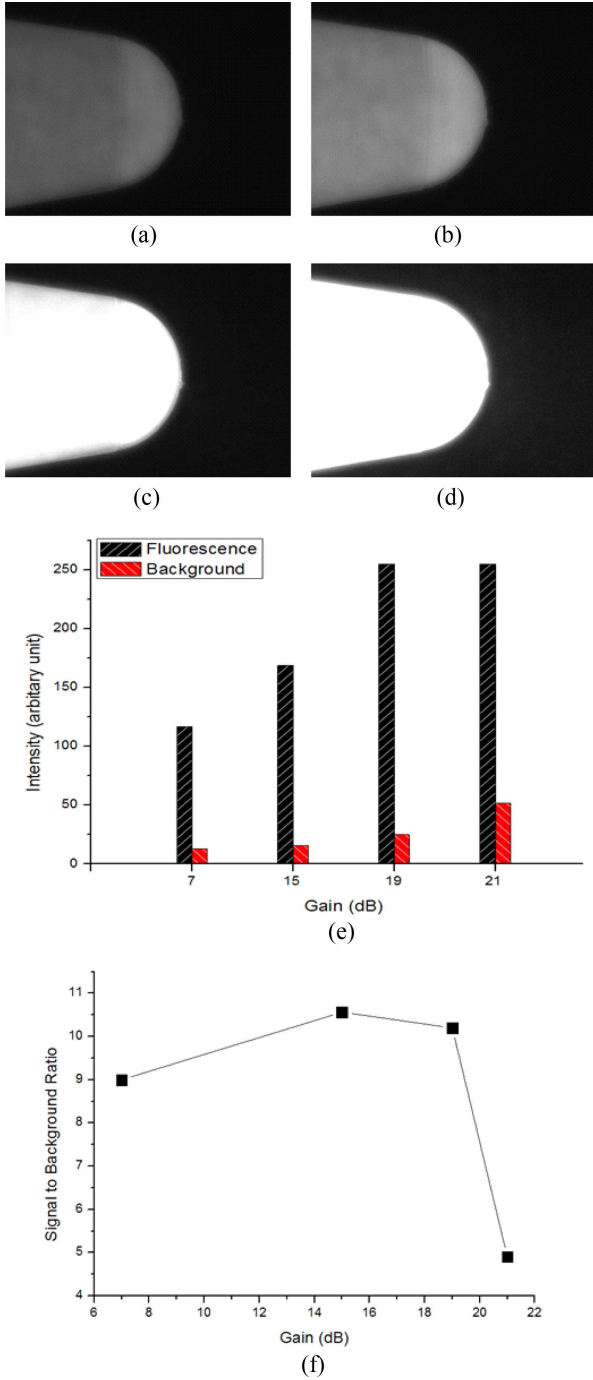


Fig. 2. Fluorescence and background signal according to magnification (a) 8.5x, (b) 15x, (c) 30x, (d) 50x, (e) 90x, (f) fluorescence and background signal intensity, where the sample is 30 μM indocyanine green in DMSO, 25.83 ms of exposure time.

진다. 이는 약 700 nm에서 900 nm 사이에서 생체 흡수율이 비교적 낮아 생체의 자가형광으로부터 형광신호를 구별하는데 용이하기 때문이다.<sup>8)</sup> 이 시스템의 구성 및 개략도를 Fig. 1에 나타내었다.

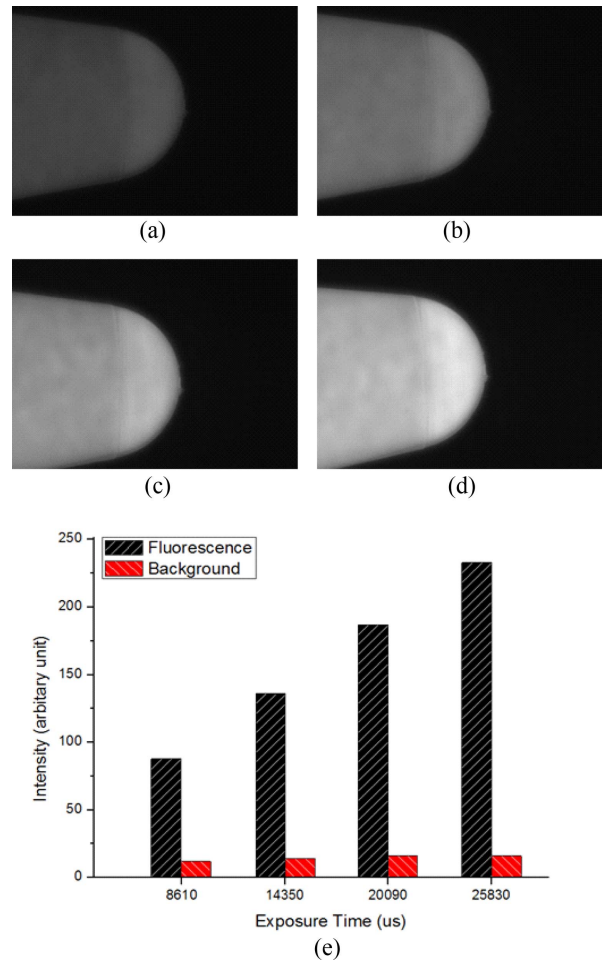
제작된 형광 이미징 시스템을 이용하여 영상을 촬영할 때, 사용자가 제어할 수 있는 변수는 시스템의 WD, 카메라의 노출시간(exposure time, ET)과 증폭(gain), 줌렌즈의



**Fig. 3.** Fluorescence and background signal according to gain (a) 7 dB, (b) 15 dB, (c) 19 dB, (d) 21 dB, (e) fluorescence and background signal intensity, (f) SBR, where the sample is 30  $\mu$ M indocyanine green in DMSO, 90x magnification, 25.83 ms of exposure time, about 229 mm WD.

확대배율 등이 있다. 이 변수들을 조절하며 영상을 촬영하고, 형광 영상의 세기와 배경신호의 세기, 형광 신호와 배경신호 세기의 비를 측정하였다. 첫 번째는 최대 90배까지 확대가 가능한 줌렌즈를 장착하여 확대 배율에 따른 형광 신호 세기 차이를 확인하고, Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2의 (f) 그래프를 살펴보면 확대 배율이 증가한 경우 배경신호의 차이는 거의 없으나, 형광 신호의 세기는 점점 증가하는 것을 확인할 수 있다. 두 번째는 카메라의 gain과 형광 신호의 세기에 대해 측정하고, Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 3의 (e) 그래프로부터 gain이 증가함에 따라서 형광신호와 배경신호가 모두 증가하는 것을 볼 수 있다. 현재 제작된 시스템은 이미지를 8 bit로 저장하기 때문에 나타낼 수 있는 최대 gray value는 255로 제한되고, gain이 19 dB인 (c)에서 이미 형광신호가 최대로 나타나고 있고, (d)에서 배경신호만 증가하였다. 그에 따라 형광신호와 배경신호의 비로 주어지는 SBR은 크게 나빠진 것을 (f)의 그래프를 통해 알 수 있다. 세 번째로 카메라의 노출



**Fig. 4.** Fluorescence and background images according to exposure time of camera (a) 86.1 ms, (b) 14.35 ms, (c) 20.09 ms, (d) 25.83 ms, (e) signal intensity, where the sample is 30  $\mu$ M indocyanine green in DMSO, about 229 mm WD, 90x magnification.

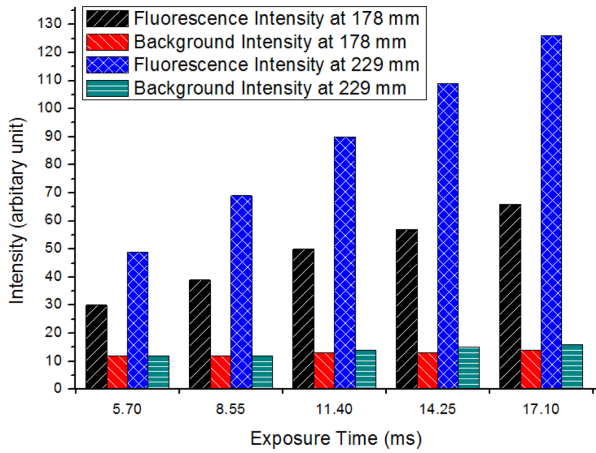


Fig. 5. Fluorescence and background signal intensity according to working distance.

시간과 형광신호 및 배경신호의 관계에 대해 확인하고, Fig. 4에 나타내었다. 카메라의 노출시간이 긴 경우, 카메라에서 형광신호를 더 오래 받으므로, 더 선명하고 강한 형광 영상을 얻을 수 있지만, 사진 촬영의 속도가 느려지고, 동영상의 경우 끊김이 발생하므로, 최대 노출시간을 30 ms 이하로 제한해 두었다. Fig. 4의 (e) 그래프로부터 카메라의 노출시간이 길어지면 CCD(charge coupled device)에서 검출되는 형광량이 많아지고, 형광신호의 세기가 증가하는 것을 알 수 있다. 다음으로 작동거리에 따른 형광신호 및 배경신호의 세기 변화를 관찰하고 Fig. 5에 나타내었다. 일반적으로 빛은 진행하면서 분산되고, 강도가 약해지기 때문에 작동거리가 더 짧은 경우가 형광신호의 세기가 더 강해야 한다. 하지만 Fig. 5의 결과를 살펴보면, 오히려 작동거리가 더 긴 경우 형광 신호가 더 강한 것을 볼 수 있다. 이러한 결과가 나타나는 이유를 분석하여 개선하면 형광 이미징 시스템의 성능 개선이 이루어질 수 있을 것이다.

### 3. 작동거리에 따른 형광신호 강도 분석

카메라의 gain 및 노출시간, 렌즈의 확대, 작동거리에 따른 형광신호 및 배경신호의 강도에 대해서 분석하였다. gain, 노출시간, 확대에 따른 신호세기 변화는 일반적으로 생각할 수 있는 거동을 보이고 있으나, 작동거리에 따른 형광신호의 세기는 일반적으로 생각할 수 있는 결과와 전혀 반대의 것이다. 원인을 분석하기 위해 형광체 시료에 조사되는 레이저의 강도 분포를 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6의 (a)에 중심파장이 660 nm인 레이저의 강도를 영상을 기준으로 9개 지점에서 Ophir사의 Nova laser power meter를 이용하여 측정하여 나타내었고, (b)에 중심파장이 760 nm인 레이저를 측정하여 나타내었다. 각각의 레이저 강도 분포가 최대 55% 이상 차이가 나는데, 강도가 강한 곳에 놓인 형광체의 형광신호가 더 강할 수밖에 없다. 선명한 형광 영상을 얻기 위해서는 강한 레이

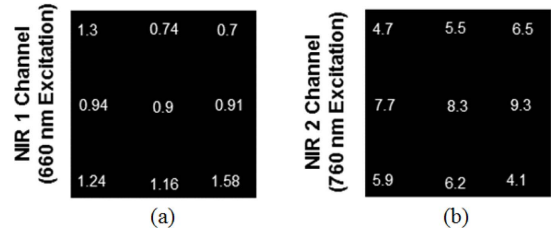


Fig. 6. Laser power distribution at 300 mm working distance (a) 660 nm laser field, (b) 760 nm laser field where unit is mW/cm<sup>2</sup>.

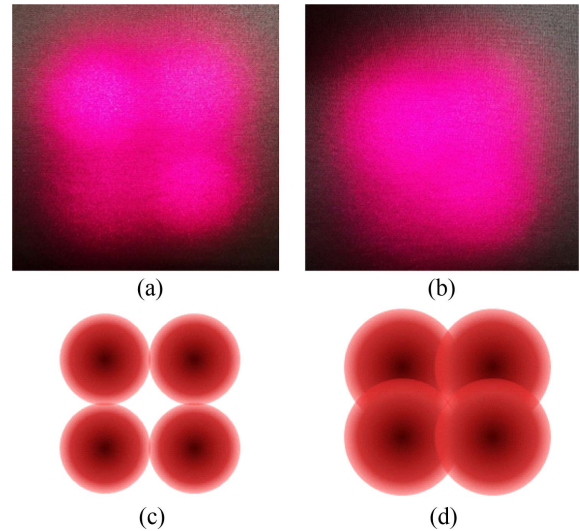


Fig. 7. Laser field at about (a) 178 mm, (b) 229 mm working distance, schematic diagram of laser field at about (c) 178 mm, (d) 229 mm working distance.

저가 형광체에 조사되어야 하기에 diffuser의 사용을 제한하였고, 보다 넓은 영역에 조사하기 위해 Fig. 1에 나타난 것처럼 bundle 광섬유를 사용한 것으로 인해 광섬유 끝단에서 수직인 부분의 광 강도는 더 강하고, 그 이외의 부분은 약한 것이다. Fig. 7에 작동거리가 약 178 mm 일 때와 약 229 mm 일 때의 사진에서도 레이저 강도 분포가 불균일한 것을 확인할 수 있다. 레이저가 광섬유 끝단에서 방출된 후 전파되어 갈 때, 일정한 각도로 분산되고, 작동거리가 가까운 경우, 4개의 광섬유에서 방출된 레이저가 서로 겹쳐져 비교적 균일한 강도 분포를 만들지 못하고, 광섬유의 끝단과 수직인 부분과 비교적 인접한 영역에만 레이저가 조사되게 된다. 그 결과 Fig. 7의 (c) 및 (d)에 나타낸 것처럼 작동거리가 가까울수록 중심부에는 레이저가 덜 조사되게 되고, 형광량도 적어지게 되어 Fig. 5와 같은 결과가 나온다.

Diffuser를 사용하지 않으면서, 비교적 균일한 레이저 강도 분포를 만들기 위해서 개구수(numerical aperture, NA)가 큰 광섬유를 이용하여 레이저가 광섬유 끝단에서 방출될 때 분산되는 각도를 크게 하거나, 작동거리별로 광섬유 끝단이 중심을 바라보도록 회전시켜 중심부에 보다 균일하게 레이저가 분포되도록 할 수 있다. 혹은 줌렌즈의 둘레를 따라 광섬유를 통해 방출되는 레이저를 사

용하는 대신, 고출력 LED와 필터를 통해서 레이저를 사용하는 것과 유사한 효과를 얻을 수 있을 것이다. 다만, 이 경우에도 LED가 줌렌즈의 둘레를 따라 균일하게 배치되어야 하고, LED에서 발생하는 열을 원활하게 배출할 수 있도록 하는 방열기술 및 패키징 기술이 필수적으로 접목되어야 한다. 작동거리에 따라 레이저의 조사각을 조절할 수 있도록 제작하거나, 고출력 LED를 사용할 수 있도록 제작하면, 더 짧은 작동거리에서 보다 좋은 형광영상을 획득할 수 있을 것이고, 고배율 줌렌즈를 이용하여, 현재 약 300 mm의 작동거리에서 약 100  $\mu\text{m}$  수준의 분해능을 더 작은 구조까지 관찰할 수 있는 시스템으로 발전시킬 수 있을 것이다.

#### 4. 결 론

형광 이미징 시스템의 gain, 노출시간, 작동거리, 확대배율에 따른 형광신호의 강도 차이를 측정하고 분석하였다. Gain이 클수록 형광신호가 증가하지만, 배경신호도 함께 증가하여 너무 큰 gain을 사용하는 경우 SBR이 나 빠질 수 있음을 확인하였고, 노출시간이 길수록 형광신호를 받아들이는 시간이 길어져 더 선명한 영상을 얻을 수 있는 것을 확인했지만, 동영상으로 촬영하는 경우 끊김이 발생할 수 있다. 작동거리가 가까운 경우 형광신호가 더 약했으나, 그에 따른 원인을 분석하고, 해결방안을 제시하였다. FIAT-L 형광 영상 시스템은 영상 유도 수술 및 동물실험 등의 목적으로 사용하기 위해 넓은 작업공간을 확보하였다. 하지만 필요에 의해 근거리에서 사용할 경우 레이저 조사에 의한 문제가 발생할 수 있는 것을 확인하고, 해결방안을 제시하였다. 이를 통해 수 cm에서 고배율 줌렌즈를 통한 수  $\mu\text{m}$  수준의 구조 관찰부터 수백 mm에 이르는 구조물의 관찰까지 가능한, 더 넓은 목적으로 사용할 수 있는 시스템의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

#### 감사의 글

본 연구는 중소기업청의 창업성장 기술개발사업의 일환으로 수행하였음. [S2324017, 다채널 바이오 이미징용 마이크로스코프 개발]

#### References

1. J. G. Jeong, "General perspectives for molecular nuclear imaging", *The Korean Society of Nuclear Medicine*, 38(2), 111 (2004).
2. J. H. Lee, G. Park, G. H. Hong, J. Choi and H. S. Choi, "Design considerations for targeted optical contrast agents", *Quant. Imaging. Med. Surg.*, 2(4), 266 (2012).
3. J. V. Frangioni, "In vivo near-infrared fluorescence imaging", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7(5), 626 (2003).
4. 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).
5. 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).
6. A. M. De Grand and J. V. Frangioni, "An operational near-infrared fluorescence imaging system prototype for large animal surgery", *Technol. Cancer. Res. Treat.*, 2(6), 553 (2003).
7. T. Kim, S. U. Cho, C. S. Park, H. Lee, D. Kim and M. Y. Jeong, "A study on fluorescence imaging system characteristics depending on tilting of band pass filter", *J. Microelectron. Packag. Soc.*, 23(2), 85 (2016).
8. S. L. Troyan, V. Kianzad, S. L. Gibbs-Strauss, S. Gioux, A. Matsui, R. Oketokoun, L. Ngo, A. Khamene, F. Azar and J. V. Frangioni, "The FLARE™ Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging System: A First-in-Human Clinical Trial in Breast Cancer Sentinel Lymph Node Mapping", *Annals of Surgical Oncology*, 16(10), 2943 (2009).