

생체조직 진단용 선 주사 방식의  
고속 공초점 현미경 개발

연세대학교 대학원  
의 공 학 과  
박 화 준

생체조직 진단용 선 주사 방식의  
고속 공초점 현미경 개발

지도 김 범 민 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004년 12월 일

연세대학교 대학원

의 공 학 과

박 화 준

# 박화준의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2004년 12월 일

## 감사의 글

먼저 지금까지 항상 함께 해주시고 지켜주신 주님께 감사를 드립니다. 이 논문이 나오기 까지 2년간 너무도 부족한 저에게 많은 지도와 격려를 아끼지 않으셨던 김법민 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 가운데 시간을 내주셔서 부족한 논문을 읽어주시고 부족한 점을 지적하여 주신 이경중 교수님, 김동윤 교수님께도 감사드립니다. 학부 4년 대학원 2년 동안 많은 가르침으로 저를 이끌어 주신 윤형로 교수님, 이운선 교수님, 윤영로 교수님, 김영호 교수님, 신태민 교수님, 김한성 교수님, 김경환 교수님께 감사드립니다. 또한 과를 위해 열심히 일하시는 안종수 선생님께도 감사드립니다.

항상 큰형과 같은 모습으로 연구실의 모범이 되어주시고 저의 어리광도 너무나 잘 받아주시고 항상 멋지신 임강빈 교수님, 지금은 미국에서 꿈을 펼치고 계신 오정택 박사님, 예쁜 형수님과 귀여운 애기랑 알콩달콩 살고 계신 현이형, 푸근하고 구수한 동수형, 연구실의 카리스마 상원이, 부족한 저를 너무도 많이 도와준 수민이형, 투덜거리지만 정이 넘치는 상륜이, 예쁜 신부와 새록새록 사랑을 키워가는 새신랑 용희, 순수한 청년 문식이, 항상 미안해하는 성빈이, 그리고 영상 획득 프로그램을 멋지게 짜주신 동선이형에게도 감사의 말을 전합니다.

이제 4학년이 되어서 열심히 논문을 쓸 귀여운 동생 상준이, 힘들어도 항상 웃고 다니는 현진이, 2년간 룸메이트 성원이를 비롯한 유쾌한 96 동기들, 멀리서 힘이 되어준 의사 선생님이 될 인혁이, 새신랑 효열이, 얼굴 보기 힘든 용재, 중빈이, 성준이, 민준이, 근석이, 함께 찬양하고 기도했던 한울림 성가대, 학부 4년간 그리고 그 이후에도 즐거움을 준 다살이 살판 식구들에게 감사를 드립니다.

마지막으로 언제나 저를 믿어주시고 사랑해주시는 부모님, 이제는 성실한 가장

의 모습으로 변한 형, 시험 때문에 고생을 많이 한 동생에게 진심으로 감사의 말을 전합니다.

2004년 12월  
박화준 올림

# 차 례

그림 차례 . . . . .	iii
표 차례 . . . . .	v
국문 요약 . . . . .	vi
제1장 서론 . . . . .	1
제2장 공초점 현미경 . . . . .	3
2.1 공초점 현미경의 원리 . . . . .	3
2.2 공초점 현미경의 장점 . . . . .	3
2.3 공초점 현미경의 종류 . . . . .	5
2.3.1 투과형, 반사형 공초점 현미경 . . . . .	5
2.3.2 형광 공초점 현미경 . . . . .	5
2.3.3 시편 이동방식, 광선 편향 방식 . . . . .	7
2.4 공초점 점주사 현미경과 공초점 선주사 현미경 . . . . .	8
2.5 공초점 현미경의 성능 . . . . .	9
2.5.1 횡방향 분해능 . . . . .	9
2.5.2 축방향 분해능 . . . . .	9
2.5.3 점주사 방식과 선주사 방식의 분해능 비교 . . . . .	10
제3장 시뮬레이션 . . . . .	14
3.1 광학계의 구성과 분해능의 관계 . . . . .	14
3.1.1 공초점 현미경의 광학계 . . . . .	14
3.1.2 광선 크기와 분해능 . . . . .	15
3.1.3 주사렌즈의 변화에 따른 분해능 . . . . .	16
3.1.4 편향각 변화와 분해능 . . . . .	17
3.1.5 시료의 두께와 굴절률 변화 . . . . .	18
3.2 선주사 방식의 공초점 현미경 . . . . .	19

제4장 공초점 선주사 현미경 광학계의 구성 . . . . .	21
4.1 시스템 구성 . . . . .	21
4.2 각 세부구조 . . . . .	22
4.2.1 광원 . . . . .	22
4.2.2 광선 확장기 . . . . .	22
4.2.3 편광 광선 분배기, $\lambda/4$ 파장판, 음향광학 편향기와 물체측 원통형 렌즈 . . . . .	24
4.2.4 주사렌즈와 전달렌즈, 대물렌즈 . . . . .	26
4.2.5 상측 원통형렌즈와 슬릿, 영상 원통형렌즈, line CCD . . . . .	27
4.2.6 영상 재생 장치 . . . . .	28
제5장 실험 . . . . .	30
5.1 축방향 분해능 측정 . . . . .	30
5.1.1 20배 대물렌즈로 축방향 분해능 측정 . . . . .	30
5.1.2 50배 대물렌즈로 축방향 분해능 측정 . . . . .	33
5.2 측정된 영상 . . . . .	37
제6장 결론 . . . . .	40
참고 문헌 . . . . .	41
영문 요약 . . . . .	43

## 그림 차례

그림 2.1 공초점 현미경의 원리 . . . . .	4
그림 2.2 시료면에서 발생하는 광원의 비교 . . . . .	5
그림 2.3 투과형 공초점 현미경과 반사형 공초점 현미경 . . . . .	6
그림 2.4 시편에 초점이 맺히는 모양 . . . . .	8
그림 2.5 일반적인 주사 현미경의 기하도 . . . . .	10
그림 2.6 공초점 점주사 현미경의 분해능과 선주사 현미경 축에 따른 분해능 비교 . . . . .	12
그림 2.7 공초점 점주사 현미경과 선주사 현미경의 분해능 비교 . . . . .	13
그림 3.1 시뮬레이션 모식도 . . . . .	14
그림 3.2 대물렌즈의 뒤구멍에 입사되는 광선의 크기와 분해능, 초점에서의 광선의 세기 . . . . .	15
그림 3.3 f1값에 따른 Airy disk반지름의 크기와 광선 세기의 변화 . . . . .	16
그림 3.4 편향각에 따른 Airy disk반지름과 광선의 세기 변화 . . . . .	17
그림 3.5 시료 두께 변화와 굴절률 변화에 따른 초점면에서 광선의 세기 변화 . . . . .	18
그림 3.6 상측 원통형렌즈에 따라 달라지는 광 경로 . . . . .	19
그림 4.1 선주사 공초점 현미경의 실험장치도 . . . . .	22
그림 4.2 광선 확장기의 대략도 . . . . .	23
그림 4.3 음향광학 편향기의 동작 원리 . . . . .	25
그림 4.4 음향광학 편향기의 각도에 따라 변하는 편향 효율 . . . . .	26
그림 4.5 주사렌즈와 전달렌즈의 역할 . . . . .	27
그림 4.6 영상을 보여주는 프로그램의 구동 모습 . . . . .	29
그림 4.7 영상 데이터의 흐름 블록 다이어그램 . . . . .	29



그림 5.1 20X 대물렌즈로 측정된 축방향 분해능 . . . . .	31
그림 5.2 슬릿 크기별 축방향 분해능 변화 (20X) . . . . .	31
그림 5.3 슬릿 크기별 반치폭의 변화 (20X) . . . . .	32
그림 5.4 슬릿 크기별 측정되는 광선의 최대 세기 (20X) . . . . .	32
그림 5.5 슬릿 위치에 따른 광선의 세기 (20X) . . . . .	33
그림 5.6 50X 대물렌즈로 측정된 축방향 분해능 . . . . .	34
그림 5.7 슬릿 크기별 축방향 분해능 변화 (50X) . . . . .	34
그림 5.8 슬릿 크기별 반치폭의 변화 (50X) . . . . .	35
그림 5.9 슬릿 크기별 측정되는 광선의 최대 세기 (50X) . . . . .	36
그림 5.10 슬릿 위치에 따른 광선의 세기 (50X) . . . . .	36
그림 5.11 일반 광학 현미경과 공초점 선주사 현미경의 영상 비교 . . . . .	37
그림 5.12 원자 현미경과 전자 현미경으로 찍은 micro structure 영상 . . . . .	38
그림 5.13 선주사 공초점 현미경으로 찍은 micro structure 영상과 3차원 재구성한 영상 . . . . .	39

## 표 차례

표 2.1 광학 편향기의 특징 . . . . .	7
표 3.1 zemax와 계산식에서의 l값 비교 . . . . .	20

## 국문 요약

### 생체조직 진단용 선주사 방식의 고속 공초점 현미경 개발

생체조직 진단용 고속 영상획득 공초점 현미경을 설계하고 제작하였다. 시뮬레이션으로 수차가 최소가 되는 선주사 방식의 공초점 현미경을 설계하였고 기존의 선주사 공초점 현미경들과는 다르게 음향 광학 편향기, 선모양의 CCD를 사용하여 선주사 공초점 현미경을 제작하였다. 제작한 선주사 공초점 현미경은 초당 60frame의 영상 획득 속도를 얻을 수 있었고, 20배 대물렌즈로는  $7.7\mu\text{m}$ , 50배 대물렌즈로는  $3\mu\text{m}$ 의 축방향 분해능을 구할 수 있었다. 미세구조를 측정하여 깊이별 영상을 얻고 3차원 재구성을 해 보았다.

---

핵심되는 말 : 공초점, 현미경, 선주사, 씨씨디, 슬릿, 3차원 영상

# 제 1장 서 론

본 논문에서는 주사 속도가 빠르면서 시스템의 가격도 저렴하고 해상도도 좋은 선주사 공초점 현미경을 설계하고, 광학계를 구성하여 영상을 얻는 것을 목표로 하였다.

현미경은 여러 과학 분야에서 매우 중요한 측정 수단이 되고 있다. 현미경은 특히 생물학, 지질학, 임상 의학, 반도체 등에 매우 우수한 성능을 나타낸다.<sup>[1-4]</sup> 광학 현미경의 우수성은 성능에 비해 간단한 구조에 있다. 현미경은 영상을 생성하지만 복잡한 검출기나 비싼 간접 장비들을 필요치 않는다. 현미경은 근본적으로 입사되는 파장과 대물렌즈에 의해 분해능이 결정되어 일정한 크기 이하의 단위는 측정하기가 어렵다.<sup>[1,3]</sup> 뿐만 아니라 광학현미경으로는 보기 힘든 현상을 볼 필요성이 생기거나 좀더 작은 구조를 측정해야 하는 일이 늘어나면서, 새로운 방법의 현미경이 필요하게 되었다. 이러한 원인의 결과로 전자 현미경(SEM), 원자 현미경(AFM), 공초점 현미경 등, 새로운 기능의 현미경들이 개발 되었다.

공초점 현미경은 1957년 Minsky에 의해 발명된 이후로 많은 특징을 갖는 공초점 현미경들이 개발이 되어 여러 분야에서 쓰이고 있다.<sup>[1-5]</sup> 공초점 현미경의 가장 중요한 특징은 깊이방향 측정(depth of field)이 가능하다는 것이다. 일반 광학 현미경과는 다르게 초점이 안 맞는 상은 번짐(blur) 현상이 일어나는 것이 아니라 사라지게(disappear) 된다. 이 현상으로 인하여 시료를 얇게 자르는 효과(optical biopsy)가 나타나고, 원하는 깊이의 영상을 얻을 수 있다. 뿐만 아니라 초점에서 나오는 광선만을 검출기에서 검출하기 때문에 횡방향 분해능(lateral resolution)도 같이 증가하게 되고 공초점 현미경 영상은 경계선이 좀더 명확하고 그에 따른 명암의 비교가 더 쉽다.<sup>[1-3,6-7]</sup>

생물학 분야에서의 공초점 현미경은 좀더 중요한 의미를 지닌다. 위에서 언급한 깊이 방향 측정이 가능하기 때문에 비침습적으로 세포 내부를 측정하는 것이 가능하다. 즉 눈과 같이 조직 검사를 할 수 없는 부분이나 세포 내부에 은 비침습적 검사가 무엇보다 중요 하기 때문에 큰 의미를 지닌다. 공초점 현미경은 그 종류와

사용 방법에 따라 여러 가지 종류로 나뉘고 가격도 성능에 따라 여러 가지로 나뉘게 된다. 공초점 현미경의 특성상 측정하고자 하는 곳에 광선을 주사(scanning)를 해야 하는데 움직이지 않는 반도체나 마이크로 구조물 같은 경우는 크게 상관이 없지만, 안구와 같은 움직임이 빠르거나 고유 진동이 있는 시료를 측정하기 위해서는 빠른 주사 속도가 필수적이다. 현재 나와 있는 공초점 현미경은 해상도가 좋은 반면 주사 속도가 느리거나 주사 속도가 빠르면 가격이 올라가는 단점이 있다. [1-3,6-7]

본 연구에서는 시뮬레이션을 통하여 선주사 공초점 현미경의 타당성을 검토해보고 원통형렌즈(cylindrical lens)와 음향광학 편향기(acousto-optical deflector), 그리고 line CCD를 사용해서 선주사방식의 고속 공초점 현미경을 구성하였다. 공초점 현미경에서 주사 속도가 빨라지면 영상을 얻는 속도도 빨라지게 되고 그러면 움직임이 있는 물체도 영상화 하는데 유리하다.

본 논문의 2장에서는 공초점 현미경의 일반적인 원리와 특징에 대해서 설명하였고, 3장은 광학설계 프로그램으로 공초점 현미경을 시뮬레이션 하였고, 4장은 빠른 영상 획득을 위한 선주사 공초점 현미경의 광학계와 광학 부품에 대해서 설명하였다. 5장은 설계한 광학계를 이용하여 얻은 영상을 다른 종류의 현미경들과 비교, 분석하였다.

## 제 2장 공초점 현미경 (Confocal Microscope)

이번 장에서는 공초점 현미경의 원리와 종류에 대해서 알아보고 일반 광학 현미경에 비하여 특징적인 공초점 현미경의 장점에 대해서 조사해 보았다. 또한 선주사 방식(line scanning) 공초점 현미경과 점주사 방식(point scanning) 공초점 현미경의 차이점 및 선주사 방식 공초점 현미경의 활용 방안에 대해서 알아보겠다.

### 2.1 공초점 현미경의 원리

공초점 현미경의 원리는 그림 2.1과 같다. 광원(light source)에서 나온 광선 (beam)이 광선 분할기 (beam splitter)에 의해 반사되어 광선이 대물렌즈를 향하게 된다. 대물렌즈를 통과한 광선은 시료에 있는 초점면 (focal plane)에 맺히게 되며 초점면에 맺힌 광선은 시료의 특성에 따라 반사, 투과 혹은 굴절을 하게 된다. 이러한 광학 현상에 의해 초점면이 아닌 다른 위치에서도 광선이 나오게 된다. 시료 상에서 반사되는 광선들은 다시 대물렌즈를 거쳐서 광선 분할기를 통과 하여 검출기 (detector) 방향으로 가게 된다. 이 때, 초점과 공액점 (conjugate point) 상에 존재한 공간 여과기 (spatial filter)에 의해 초점면에서 반사된 광선(——)만이 검출기에 도달하게 되고, 그 외 다른 곳에서 반사된 광선(-----)들은 공간 여과기에 의해서 제거가 된다. 공초점 현미경은 한 점에서 나오는 광선만을 수집하기 때문에 일정한 범위의 영상을 얻기 위해서는 광선이나 시료를 움직여야 한다.<sup>[1-3]</sup>

### 2.2 공초점 현미경의 장점

일반적인 광학 현미경은 그림 2.2(a)와 같이 넓은 범위에 광원이 조사되고 반사되거나 투과되어 나온 광선을 검출기로 받아서 영상화 한다. 따라서 그림 2.2(a)와 같이 초점면이 시료 안에 위치하게 되면 초점면뿐만 아니라 초점면 아래나 위에

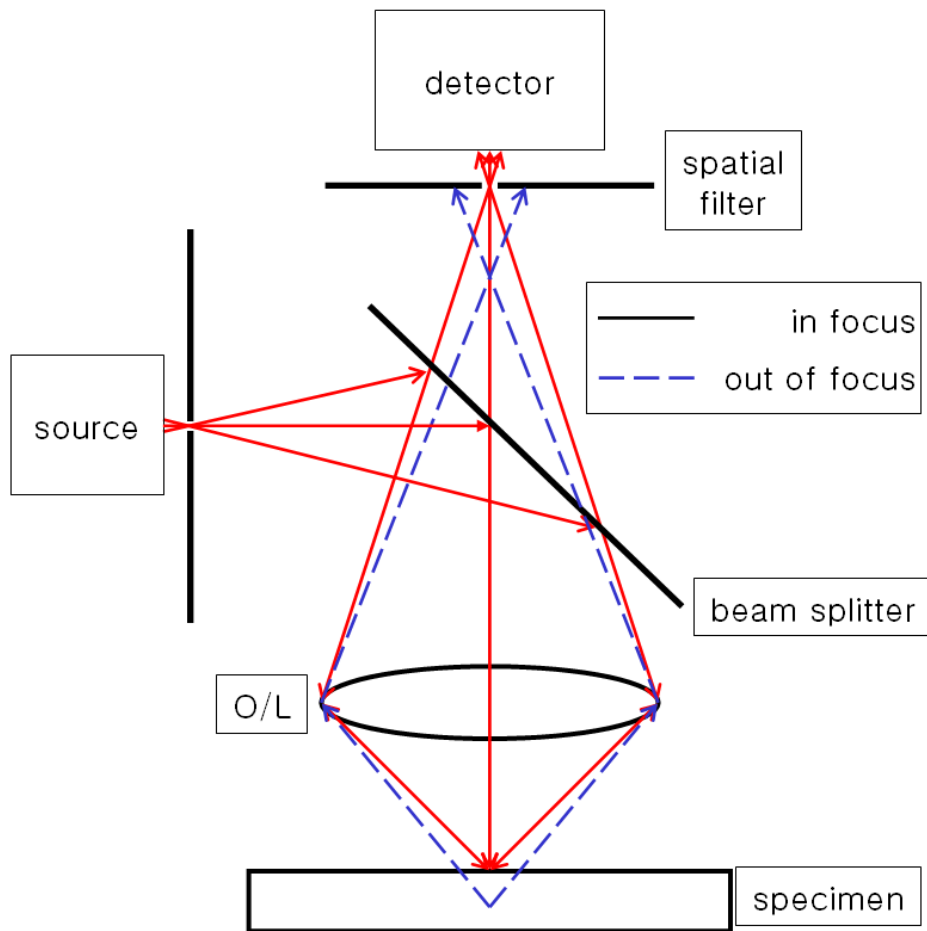


그림 2.1 공초점 현미경의 원리

서도 반사광선이 들어오기 때문에 영상이 흐려지게 된다. 반면 공초점 현미경은 위에서 언급한 것과 같이 초점과 공액인 위치에 공간 여과기를 설치하여 초점 이외에서 들어온 광선은 여과를 시킴으로서 일반 광학 현미경보다 횡축 분해능이 약 1.4배 좋아지게 된다. 또한 광선이나 혹은 시료를 주사 하여 초점면의 영상만을 얻을 수 있기 때문에 광학적 절편(optical sectioning)이 가능하다. 광학적 절편을 이용하면 시료를 절단하지 않고 3차원으로 재구성 할 수 있다.<sup>[1-3,6-7]</sup>

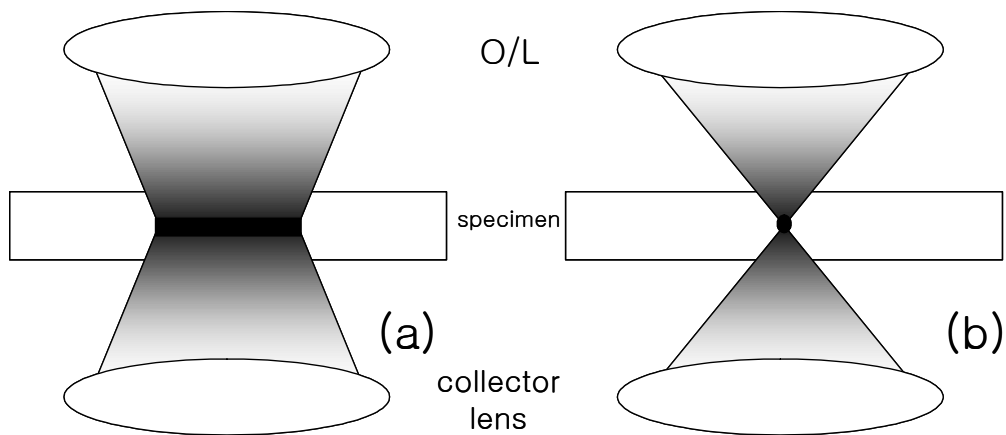


그림 2.2 시료면에서 발생하는 광원 비교 (a)일반 광학 현미경 (b)공초점 현미경

## 2.3 공초점 현미경의 종류

공초점 현미경은 입사광과 투과 혹은 반사광의 가간섭성에 따라 분리 되고, 광선의 편향 방식에 따라, 주사 방식에 따라 분류를 할 수 있다.

### 2.3.1 투과형, 반사형 공초점 현미경

그림 2.3은 투과형(a)과 반사형(b)의 개략적인 모양이다. 투과형 공초점 현미경은 시료를 투과한 광선을 집광렌즈(collector lens)로 모아서 영상화 한 것이고 반사형 공초점 현미경은 시료에서 반사된 광선을 영상화 한 것이다. 일반적으로 투과형 보다는 반사형이 많이 쓰이는데 투과형은 시료를 선택하는데 제약을 받기 때문에 주로 생물학 분야에서만 쓰이고 반사형은 생물학뿐만 아니라 임상의학, 재료학, 환경학 등에 이용된다.<sup>[1-3]</sup>

### 2.3.2 형광 공초점 현미경

형광이란 시료에 레이저를 조사 했을 때 형광 물질(fluorophore)이 레이저를 흡



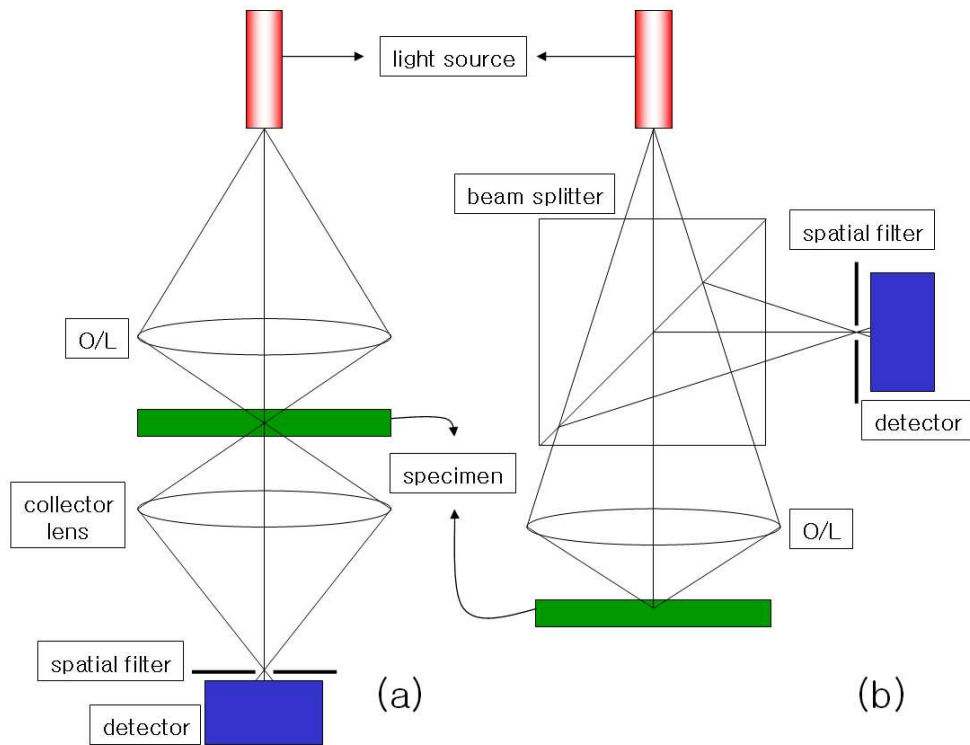


그림 2.3 (a)투과형 공초점 현미경과 (b)반사형 공초점 현미경

수하여 흥분 상태(excited state)가 되었다가 기저 상태(ground state)로 되돌아 오면서 입사된 레이저보다 긴 파장의 광선을 내보내는 현상이다. 따라서 시료에 조사되는 광선의 파장과 되돌아 나오는 광선의 파장이 서로 다르다. 형광 공초점 현미경은 이러한 형광 광선만을 검출하여 영상화 하는 것이다. 일반 공초점 현미경과 형광 공초점 현미경의 광학계에서 가장 큰 차이점은 광선 분할기와 이색거울(dichroic mirror)이라고 할 수 있다. 이색 거울은 특정한 파장의 광선만을 통과 시키는데 형광 파장에 맞는 이색거울을 사용하게 되면 초점에서 나오는 형광 성분만을 통과 시켜 검출기로 보내게 되고 공간 여과기를 사용하여 초점에서 발생한 형광 성분만은 영상화 한다.<sup>[2-3]</sup>

### 2.3.3 시편 이동 방식, 광선 편향 방식

2.1절에서도 언급했듯이 공초점 현미경은 공간 여과기를 이용하여 초점에서 나오는 광선만 받기 때문에 주사가 필수적이다. 시편 이동 방식은 가장 처음으로 제안된 방법으로 공초점 현미경의 광학계는 고정되어 있고 시료의 측정하고자 하는 범위만큼 움직여서 영상화하는 방법이다. 이 방법은 초점이 고정되어 있기 때문에 광학적 수차가 적게 발생하지만 시료를 움직일 때 기계적인 진동이 생기고 움직임이 일정치 않으면 상의 왜곡이 생기게 되고, 영상을 얻는데 시간이 오래 걸리는 단점이 있다.<sup>[5]</sup>

광선 편향 방식은 시료는 고정되어 있고 광학 편향기를 사용해서 대물렌즈에 입사되는 광선의 각도를 변화시켜서 시료를 주사하는 방법이다. 이 방법은 광학 편향기의 종류에 따라 영상 획득 속도가 틀려지나 시편 이동 방식보다는 매우 빠른 영상 획득 속도를 얻을 수 있다. 광학 편향기로는 갈바노 미러(galvano mirror), 레조넌트 스캐너(resonant scanner), 다각 거울(polygon mirror), 음향광학 편향기(acousto-optic deflector, AOD) 등이 있고 성격은 조금 다르지만 마이크로 렌즈를 써 시료를 측정하는 닙코우 디스크(nipkow disk)방식이 있다.<sup>[1-3]</sup> 각각의 특징은 표 2.1에 구분하였다.

표 2.1 광학 편향기의 특징

	주사 시간	최대 주사 각	장점	단점
갈바노 미러	2s	7	좋은 반사 효율, 선형적인 주사 속도	기계적인 진동, 주사속도가 느림
레조넌트 스캐너	64ms	7	빠른 주사 속도	소음, 주사 속도가 비선형적임
다각 거울	0.25s	48	선형적인 주사 속도	주사 각도 고정, 주사 속도와 영상과의 동기화가 힘들
음향광학 편향기	10ms	2.35	빠른 주사 속도	투과 효율이 떨어짐, 회절된 후 퍼짐 현상

## 2.4 공초점 점주사 현미경과 공초점 선주사 현미경

일반적인 공초점 현미경은 대물렌즈에 의해 시료에 점모양의 초점이 맺히고(점주사 방식) 시료와 공액점이 되는 위치에 핀홀(pin hole)을 사용하여 한 점에서 나오는 광선만을 측정하여 영상화를 하게 된다. 이 방식은 해상도는 매우 좋지만 x축과 y축, 그리고 3차원 구성을 하려면 z축까지 주사를 하여야 되고 하나의 영상을 얻는데 수초의 시간이 걸리기도 한다.<sup>[1-3]</sup> 시료가 반도체나 고정된 세포 같은 경우는 이런 방법으로도 충분히 영상화를 할 수 있지만, 시료가 살아있는 생물체라면 동잡음(motion artifact)이 발생하여 점주사 방식으로는 동일한 지역의 영상을 얻는데 어렵게 된다. Nipcow 디스크방식으로는 빠른 속도로 영상화 하는 것이 가능하지만 디스크와 마이크로 렌즈가 고가의 장비여서 가격이 상승하게 된다.<sup>[1,3]</sup> 그림 2.4는 이 논문에서 제안할 선주사 방식에 대한 설명을 한 그림이다. 공초점 현미경의 광학계를 적절히 구성하면 대물렌즈를 통하여 나온 광선이 그림 2.4(b)와 같은 선모양이 된다. 점주사 방식은 핀홀을 사용했지만 선주사 방식은 슬릿 slit을 사용하게 된다. 따라서 슬릿에 의해 공간 여과 기능을 받지 못하는 축의 해상도는 점주사 방식보다 떨어지게 되지만 매우 빠른 영상 획득 속도를 얻을 수가 있어서 동잡음이 있는 생물체를 측정하거나 비디오 레이트보다 빠른 움직임을 확인하는데 유리하다.

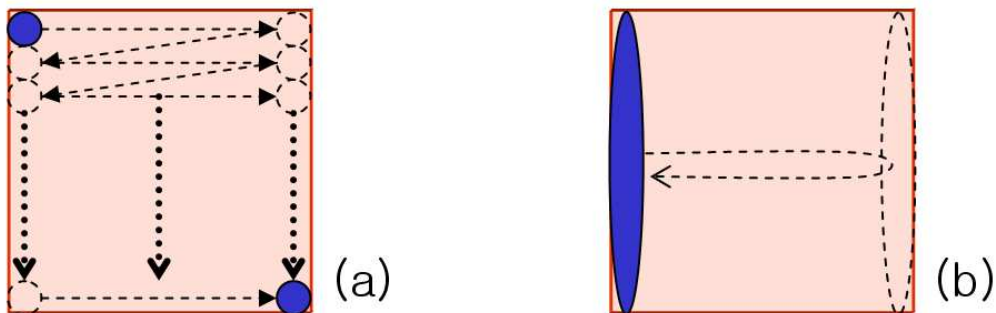


그림 2.4 시편에서 초점이 맺히는 모양 (a)점주사 방식 (b)선주사 방식

## 2.5 공초점 현미경의 성능

### 2.5.1 횡방향 분해능(lateral resolution)

일반적으로 현미경의 분해능을 정의할 때 레일리 기준(Rayleigh's criterion)에 따른다. 무한히 먼 물체에서 출발한 광선이 렌즈를 통과하고 결상이 될 때 렌즈가 완벽하다 하더라도 광선의 회절에 의해서 밝은 부분과 어두운 부분이 주기적으로 나타나는 에어리 원판(Airy pattern)이 나타나게 된다. 레일리 기준이란 두개의 밝기가 같고 비가간섭성(incoherent)인 점이 분리가 되기 위해서는 한 개의 에어리 원판의 중심이 다른 점의 에어리무늬의 첫 번째 어두운 부분에 위치해야 한다는 것이다. 입사되는 광선의 파장을  $\lambda$ 라 하고 대물렌즈의 개구수(numerical aperture)를 NA라 할 때, 에어리 원판의 크기  $r_{\text{Airy}}$ 는

$$r_{\text{Airy}} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA} \quad (2.1)$$

가 된다. 따라서  $r_{\text{Airy}}$ 는 횡방향 분해능의 크기가 된다. 식에서도 알 수 있듯이 입사되는 광선의 파장이 짧을수록 대물렌즈의 개구수가 커질수록 분해능은 점점 커진다.<sup>[8]</sup>

### 2.5.2 축방향 분해능

대물렌즈의 굴절률을  $n$ 이라 하고, 입사되는 광선의 파장을  $\lambda$ , 대물렌즈의 개구수를 NA라 하면, 공초점 현미경의 축방향 분해능  $z_{\text{min}}$ 은

$$z_{\text{min}} = \frac{2 \cdot \lambda}{(NA)^2} \quad (2.2)$$

로 주어진다.<sup>[1-3,9]</sup> NA에 제공한 값으로 나눠주기 때문에 축방향 분해능보다 NA값의 영향을 많이 받게 된다.

### 2.5.3 점주사 방식과 선주사 방식의 분해능 비교

그림 2.5는 일반화된 주사 현미경의 기하도이다. 이 그림에서  $t=1$ (모든 시료에 조사된 광선은 매질에 의한 산란과 반사가 없이 전부다 투과)라고 가정하면, 일반적인 검출기면에서 점퍼짐 함수(point spread function)는 소스의 세기와 입사렌즈계 세기의 콘볼루션과 검출기의 감도  $D$  와 투과렌즈계 세기의 콘볼루션의 곱으로 나타낼 수 있다.

$$I(v, w) = \{S(v, w) \otimes |h_1(v, w)|^2\} \{D(v, w) \otimes |h_2(v, w)|^2\} \quad (2.3)$$

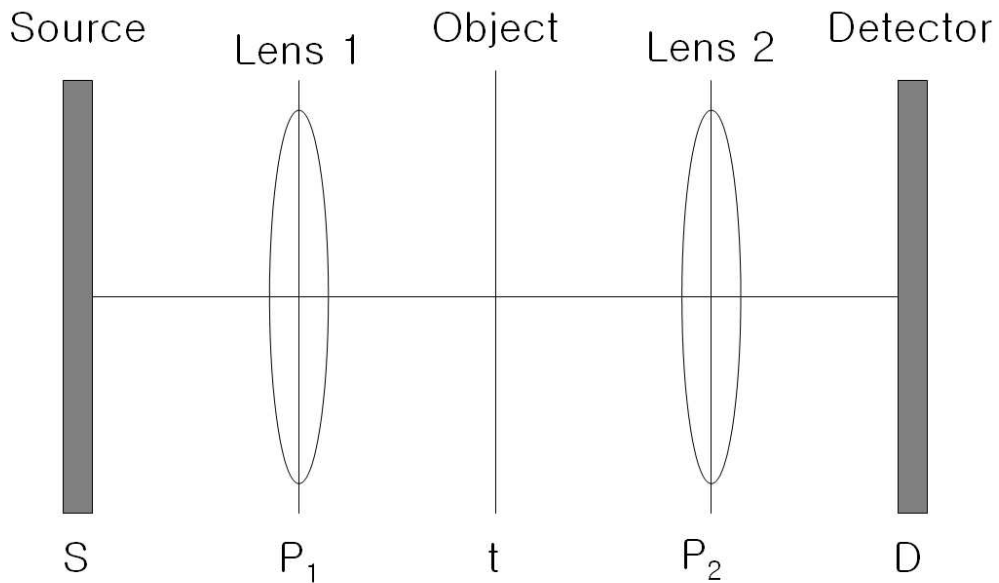


그림 2.5 일반적인 주사 현미경의 기하도

여기서  $h_{1,2}$ 는 렌즈1, 2의 점퍼짐함수 진폭이다.

$$h_{1,2}(v, w) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} P_{1,2}(\zeta, \eta) \exp[j(\zeta v + \eta w)] d\zeta d\eta \quad (2.4)$$

$P_{1,2}$ 는 렌즈1, 2의 입사동 함수(pupil function)이고,  $v, w$ 는  $x, y$ 좌표를 광학 좌표로 바꾼 것이다.

수차가 없는 대물렌즈를 사용하고 점광원과 광역 검출기를 사용한 광학계의 광선의 세기를 구해보면,

$$I(v, w) = \left\{ \frac{2J_1[(v^2 + w^2)^{1/2}]}{v^2 + w^2} \right\}^2 \quad (2.5)$$

이와 같이 나타난다. 만약 대물렌즈와 같은 렌즈를 사용하여 공초점 현미경을 꾸몄으면,

$$I(v, w) = \left\{ \frac{2J_1[(v^2 + w^2)^{1/2}]}{v^2 + w^2} \right\}^4 \quad (2.6)$$

와 같은 값으로 나타난다. 여기서 검출기를 바꿔서 선모양의 검출기로 측정을 하게 되면

$$I(v, w) = \left\{ \frac{2J_1[(v^2 + w^2)^{1/2}]}{v^2 + w^2} \right\}^2 \frac{3\pi H_1(2w)}{8w^2} \quad (2.7)$$

와 같은 결과를 얻게 된다.

그림 2.6은 위의 식 (2.6)과 (2.7)을 그림으로 그린 것이다. 공초점 점주사 현미경의 분해능( $\cdots$ )과 공초점 선주사 현미경의 분해능( $\text{---}$ ,  $\text{- -}$ ) 비교해 보면 슬릿에 의해 공간 여파가 이루어지는 축(vertical direction,  $\text{- -}$ )은 일반 공초점 현미경과 분해능이 비슷하다. 하지만 그와 수직인 축(horizontal direction,  $\text{---}$ )은 일반 광학 현미경과 분해능이 비슷하다는 것을 확인 할 수 있다.

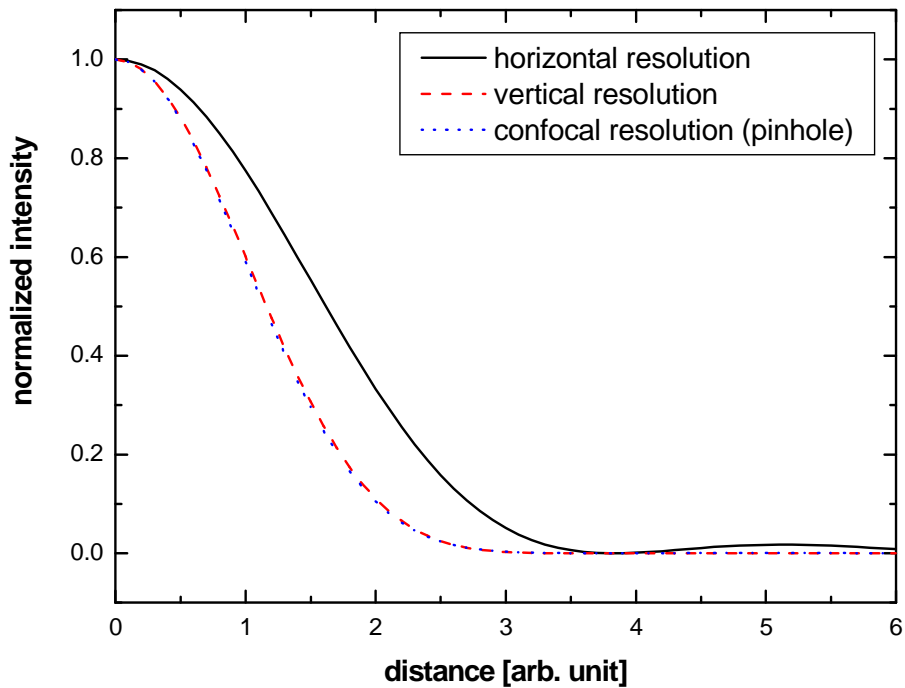


그림 2.6 공초점 점주사 현미경의 분해능과 선주사 현미경 축에 따른 분해능 비교

그림 2.7은 그림 2.6을 점주사 방식과 선주사 방식으로 나누어서 3차원적으로 분해능을 비교한 그래프이다. 선주사 방식의 vertical resolution이  $w$ 축, horizontal resolution이  $v$ 축이 되는 것을 알 수 있다. (a)그림은 양쪽축의 분해능이 일정하지만 선주사 방식의 그래프는  $v$ 방향으로 해상도가 낮아진 것을 쉽게 알아볼 수 있다. 선주사 방식은 그림 2.7(b)와 같은 세기를 갖는 광선이 시료면에  $v$ 축 방향으로

평행하게 입사되고 검출기에서 동일한 모양의 광선이 검출되게 된다.<sup>[10-14,17-18,20]</sup>

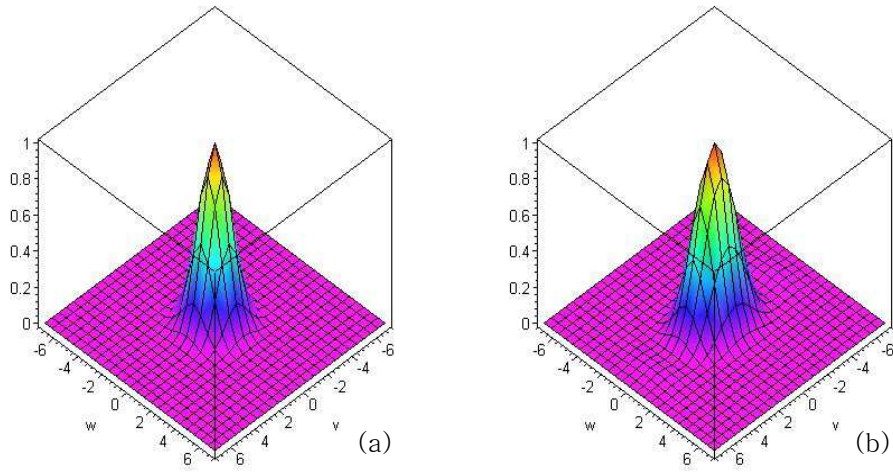


그림 2.7 공초점 점주사 현미경(a)과 선주사 현미경(b)의 분해능 비교



## 제 3장 시뮬레이션

이 장은 상용 광학 설계 프로그램 Zemax를 사용하여 광학계 구성에 따른 분해능의 변화와 선주사 공초점 현미경의 광학계를 시뮬레이션 해 보았다.

### 3.1 광학계의 구성과 분해능의 관계

#### 3.1.1 공초점 현미경의 광학계

그림 3.1은 시뮬레이션한 광학계의 모식도이다. 공초점 현미경은 2장에서도 말했듯이 초점면에서의 정보만을 얻기 때문에 광선의 주사가 필수적이다. 분해능의 저하 없이 주사되는 광선을 시료면에 전달하기 위해서는 그림과 같이 대물렌즈 이외에 2개의 렌즈를 더 사용해서 대물렌즈의 뒤구멍에 광선을 전달 하여야 한다. 시뮬레이션의 실행 조건으로 입사광(x)의 지름을 변화시키고 대물렌즈의 뒤구멍은 8.1mm, 대물렌즈는 20X 0.5 N.A 로 설정하고 시뮬레이션 하였다. 확대비는 x의 값에 따라서 변화도록 시뮬레이션 하였다.

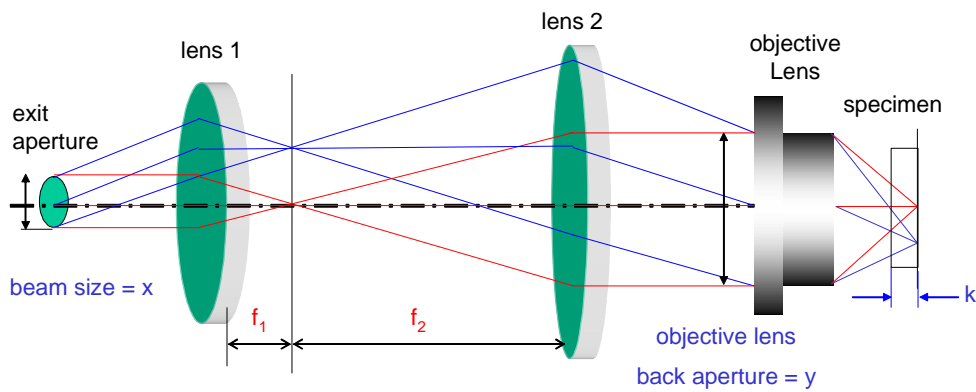


그림3.1 시뮬레이션 모식도

그림을 보면 알 수 있듯이 x값과 확대비가 정해지면  $f_1$ 이 결정이 되고, 자연스럽게  $f_2$ 는 결정이 되게 된다. 즉  $f_1$ 에 따라 공초점 현미경 렌즈군이 형성이 된다.

### 3.1.2 광선 크기와 분해능

그림32는 대물렌즈의 뒤구멍에 입사광선의 크기가 분해능과 신호대 잡음비에 어떤 영향을 미치게 되는지를 시뮬레이션 한 결과이다. 원으로 표시한 부분이 입사광의 지름이 8.1mm가 되는 지점으로 분해능이 가장 좋고, 되돌아오는 광선의 세기도 가장 세다. 따라서 8.1mm 즉 대물렌즈의 뒤구멍의 크기에 딱 맞게 광선이 들어올 때 현미경의 분해능이 가장 좋아지고, 신호대 잡음비도 가장 좋을 수 있다.

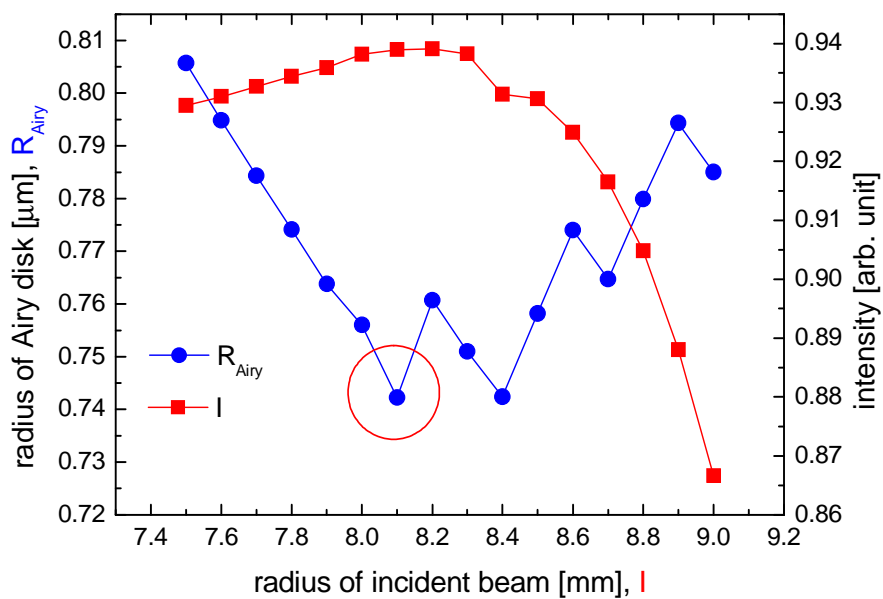


그림 3.2 대물렌즈의 뒤구멍에 입사되는 광선의 크기와 분해능, 초점에서의 광선의 세기

### 3.1.3 주사렌즈의 변화에 따른 분해능

$f_1$ 값이 변화하면 이에 따라  $f_2$ 값이 결정이 되고 결국, 렌즈군이 형성 된다. 그림 3.3은 이러한  $f_1$ 의 변화가 분해능과 초점면에서 광선의 세기에 어떤 영향을 미치는지를 시뮬레이션 한 결과이다.  $f_1$ 이 너무 작은 경우, 렌즈에 의한 수차가 커져서 광선이 한곳에 초점을 맺히지 못하고 광축에 따라 여러 곳에 맺히게 된다. 따라서 초점면에서의 광선의 세기가 작아짐을 알 수 있다. 이렇게 되면 분해능은 좋아 보일수 있지만 신호대 잡음비가 떨어지게 되어 좋은 영상을 얻을 수가 없다. 따라서 적당한 airy disk 크기와 초점면에서의 광선의 세기가 높은 4개의 렌즈군( $f_1=16, 21, 36, 48$ )을 선택하여 추후의 시뮬레이션에 이용하였다.

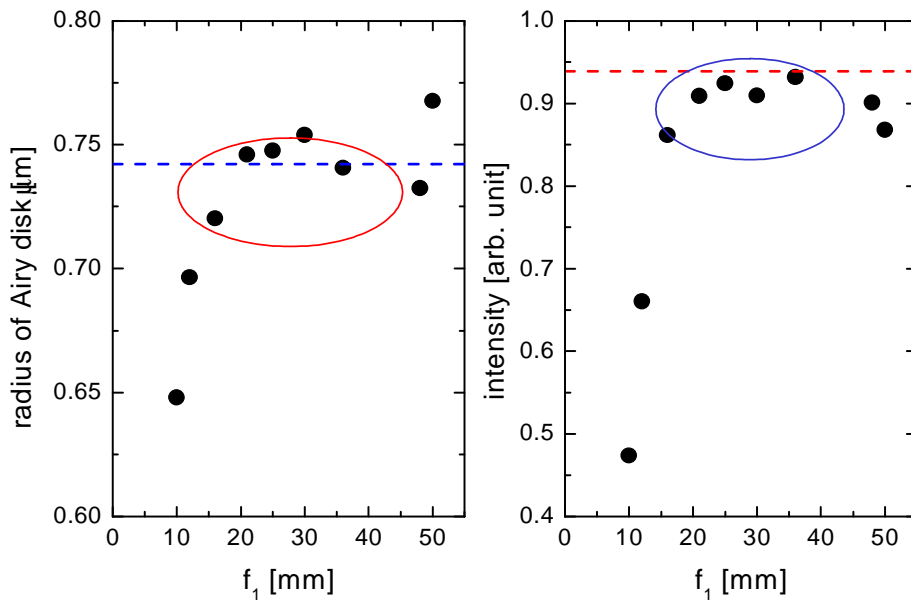


그림 3.3  $f_1$ 값에 따른 Airy disk반지름의 크기와 광선 세기의 변화

### 3.1.4 편향각 변화와 분해능

그림 3.4는 편향각 변화에 따른 분해능의 변화를 시뮬레이션 한 그림이다. 그림 3.3에서 선택된 4개의 렌즈군에 대해서 시뮬레이션 하였다. 광축을 기준으로 각도가 많이 변할수록 수차에 의해 airy disk 크기가 커지게 되고, 초점면에서의 광선의 세기는 작아지는 것을 알 수 있다. 편향각이 0.5도 일때까지는  $f_1=21$ 인 렌즈군이 가장 좋은 성능을 나타내지만 각도 편향이 커질수록 광선의 세기가 센  $f_1=48$ 이 신호대 잡음비 때문에 유리함을 알 수 있다.

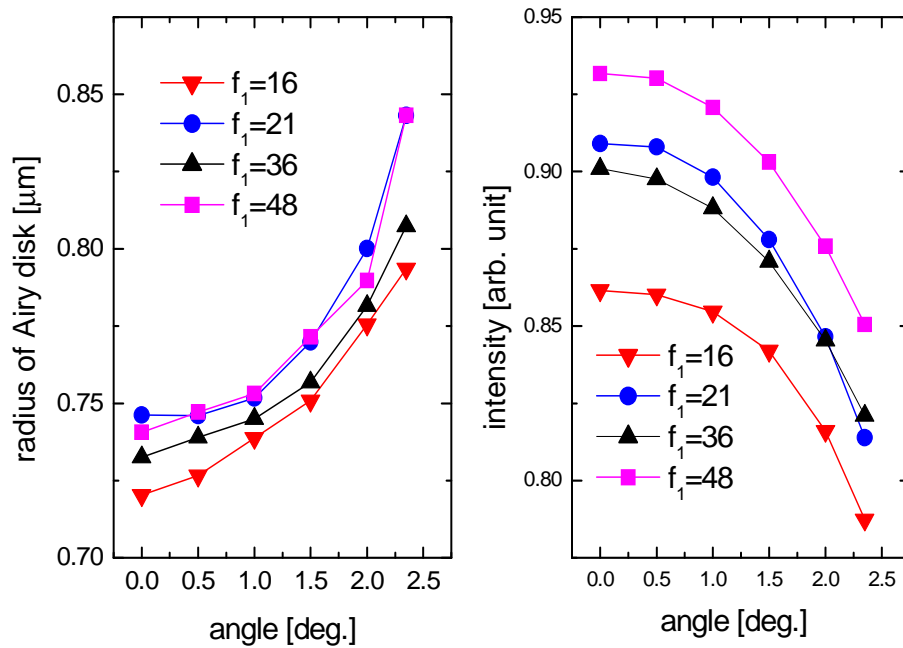


그림 3.4 편향각에 따른 Airy disk반지름과 광선의 세기 변화

### 3.1.5 시료의 두께와 굴절률 변화

그림 3.5는 시료 깊이에 따라 초점에 맺히는 광선의 세기와 시료의 두께는 고정시키고 시료의 굴절률( $n$ )값을 변화시켰을 때 초점에 맺히는 광선의 세기를 비교한 그래프이다. 시료의 두께가 두꺼워질수록, 굴절률이 커질수록 초점면에서의 광선 세기가 감소함을 알 수 있다. 그래프에서는 시료의 두께에 덜 민감한  $f_1=48$ 이 가장 좋은 성능을 나타냄을 알 수 있다.

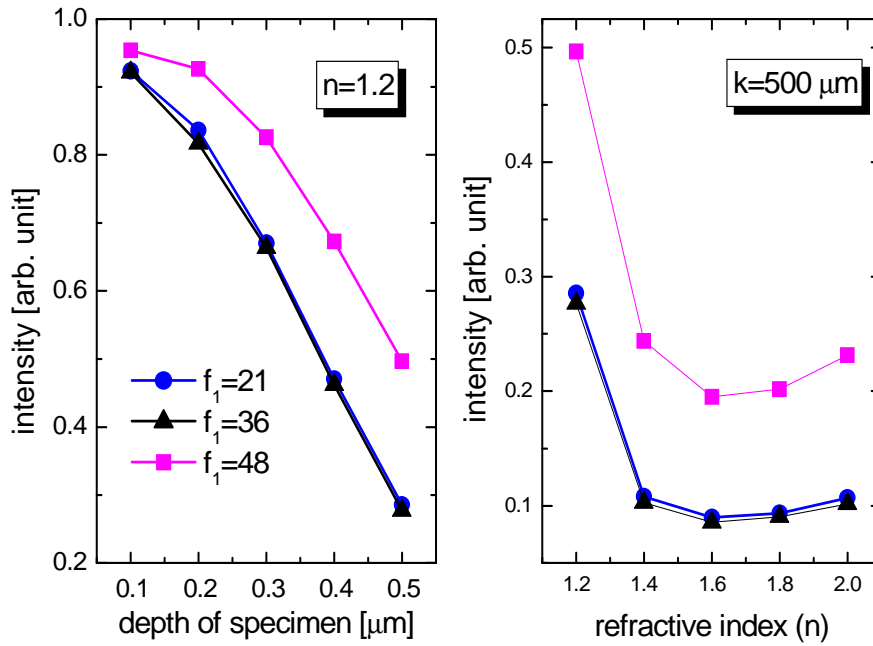


그림 3.5 시료 두께 변화와 굴절률 변화에 따른 초점면에서 광선의 세기 변화

### 3.2 선주사 방식의 공초점 현미경

그림 3.6은 원통형렌즈를 사용하여 초점면에 선모양의 광원이 맺히는 방법을 시뮬레이션 한 것이다. 원통형렌즈는 그림에서도 나와 있는 것처럼 수평(x)축에 대해서는 일반 유리와 같은 역할을 하고 수직(y)축에 대해서는 초점거리를 갖는 렌즈의 역할을 하게 된다. 각 축에 대한 광선을 추적해 보면 그림에서 나온 것처럼 대물렌즈 이후 2개의 초점이 맺히게 된다. 두 번째 초점 위치에 시료를 위치시키고 레이저를 입사하게 되면 y축으로 선 모양의 광선이 x축으로는 일반 공초점 현미경과 같은 초점이 맺히게 된다.

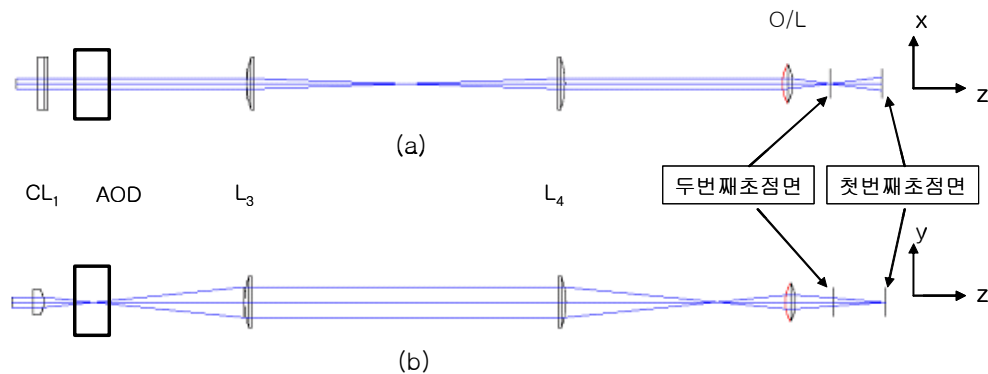


그림 3.6 상측 원통형렌즈에 의해 달라지는 광 경로 (a) 위에서 본 모양 (b) 옆에서 본 모양

그림 3.6 (b)을 통하여 두 번째 초점에서 선의 길이  $l$  값을 구할수 있다. 모든 렌즈를 굴절률만 있고 두께가 없는 렌즈로 단순화 시키면 입사된 광선의 지름  $x$ 가  $CL_1$ 에 의해서 한번 초점이 맺히게 되고  $L_3$ 에 의해 직진화가 된다.  $L_3$ 에 의해 변하는 광선의 지름을  $x_2$ 라고 할때,

$$x_2 = \frac{x \cdot f_3}{cf_1} \quad (3.1)$$

가 된다. 입사되는 광선의 지름과  $L_4$ 의 초점 거리  $f_4$ 를 알고 있으면

$$l = \frac{x_2 \cdot f_{ob}}{f_4} \quad (3.2)$$

가 된다.<sup>[21]</sup> 여기서  $f_{ob}$ 는 대물렌즈의 초점 거리이다. 식(3.1)과 (3.2)에 의해서

$$l = \frac{x \cdot f_3 \cdot f_o}{c f_1 \cdot f_4} \quad (3.3)$$

이 된다.

표 3.1은 시뮬레이션한 값과 직접 손으로 계산한 값을 비교한 것이다. 주사 영역은 광학 편향기의 주사 각도인 2.35도로 하였고, Zemax는 시뮬레이션 한 결과를 모니터를 통해서 확인한 값이고 계산 식은 논문에 나온 값을 활용하여 계산하였다.<sup>[22]</sup> 실제 대물렌즈는 여러장의 렌즈가 조합된 구조라 단순화 하였을 때와 시뮬레이션 했을 때의 값이 많이 차이가 나는 것을 알 수 있다.

표 3.1 zemax와 계산식에서의 l 값과 확대비의 비교

	초점에서의 선 길이 (l)	확대비	주사 영역
Zemax	240 $\mu$ m	57	322 $\mu$ m
계산	94 $\mu$ m	146	64 $\mu$ m

## 제 4장 공초점 선주사 현미경 광학계의 구성

이번 장에서는 원통형 렌즈(cylindrical lens)와 음향광학 편광기, 슬릿, line CCD를 이용하여 제작한 반사형 선주사 공초점 현미경의 구조와 각 부분에 대한 설명을 하였다.

### 4.1 시스템 구성

그림 4.1은 구성한 선주사 공초점 현미경의 실험장치도이다. 광선의 전달 경로는 광원에서부터 실선(—)으로 조사 되어서 시료에서 반사되어 점선(-----)의 방향으로 나가게 된다. 광원은 He-Ne laser를 사용하였고 광선 확장기(beam expander,  $L_1$ ,  $L_2$ )를 사용하여 광선의 폭을 확대하였다. 편광 광선 분배기(polarization beam splitter)와  $\lambda/4$  편광판( $\lambda/4$  wave plate)을 사용하여 광선의 편광 효율을 최대화 시켰다. 물체측 원통형렌즈(cylindrical lens,  $CL_1$ )를 사용해서 시료면에 광원이 x축 방향으로 선 모양이 되도록 했으며 음향광학 편광기를 이용해서 광선을 y축 방향으로 주사하였다. 주사렌즈(scan lens,  $L_3$ )와 전달렌즈(transfer lens,  $L_4$ )를 이용해서 주사된 광선이 대물렌즈 뒤개구(back aperture)에 전달되도록 구성하였으며 시료에 맞고 산란된 광선은 다시 대물렌즈를 통과하고 편광 광선 분배기에 의해서 경로가 바뀌게 된다. 상측 원통형렌즈( $CL_2$ ,  $CL_3$ )와 공간 여과기인 슬릿(S)에 의해서 초점에서 산란된 광선만 통과하게 되고 영상 원통형렌즈( $CL_4$ )에 의해서 line CCD에 시료의 반사광이 맺히게 된다.



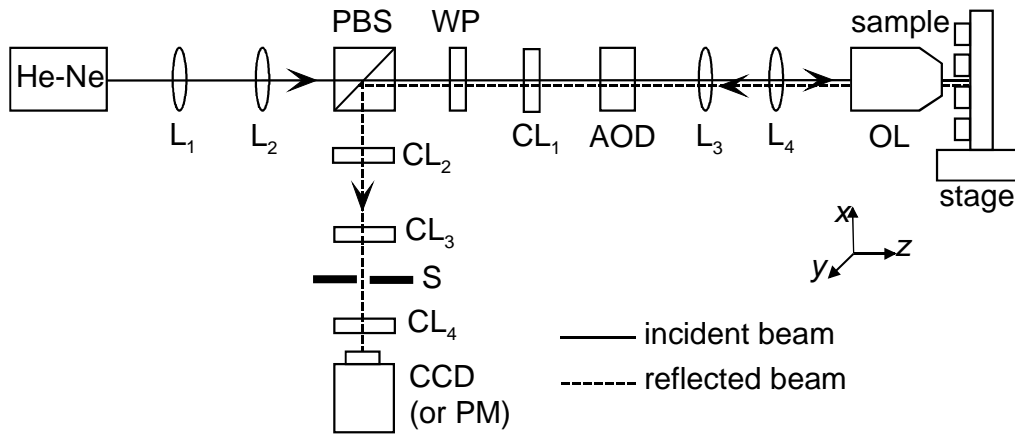


그림 4.1 선주사 공초점 현미경의 실험장치도

## 4.2 각 세부구조

### 4.2.1 광원

대부분의 선주사 공초점 현미경들은 할로겐 램프나 제논 램프 등의 백색광원을 사용하여 슬릿이나 기타 광학 부품을 이용하여 선모양의 광원을 만들고 선모양의 광선을 대물렌즈에 직접 조사하는 방식으로 구성하였지만 본 현미경은 레이저를 사용하여 점모양의 광선으로 광학계를 구성하였다. 레이저를 사용하게 되면 백색광원을 사용했을 때보다 색수차가 줄어들어서 분해능이 높아지는 효과가 있다. 사용한 레이저는 TEM<sub>00</sub>모드인 He-Ne laser( $\lambda = 632.8\text{nm}$   $P_{\text{max}} = 7\text{mW}$ )이다.

### 4.2.2 광선 확장기(beam expander)

광선 확장기는 그림 4.2와 같이 레이저의 지름을 키우는 두개의 볼록렌즈로 구성하거나 오목렌즈와 볼록렌즈로 구성된 광학계이다. 오목렌즈와 볼록렌즈 조합을 사용하면 두개의 볼록렌즈를 사용할 때 보다 거리가 줄어드는 효과가 나타나지만 광원의 모양(shape)이 좋지 않을 때 사용하는 공간 여과기와 같은 필터를 설치할

수가 없다.<sup>[2-4]</sup> 따라서 본 광학계는 볼록렌즈 2매를 사용하여 광선 확장기를 구성하였다. 레이저의 지름을 키우는 이유는 분해능과 관련이 있기 때문이다. 광선 확장기로 입사되는 레이저의 지름은  $r_1$ 이라고 하고 광선 확장기를 통과하여 나오는 레이저의 지름을  $r_2$ 라고 할때  $r_1$ 과  $r_2$ 는 기하 광학적으로 아래의 수식과 같은 관계를 만족하게 된다.<sup>[8]</sup>

$$r_2 = \frac{r_1 \cdot f_2}{f_1} \quad (3.1)$$

본 광학계에서는 볼록 렌즈 2매( $f=35\text{mm}$ ,  $f=200\text{mm}$ )를 사용하여 지름이 0.8mm인 레이저 광선을 4.6mm의 광선으로 확장하여 사용하였다.

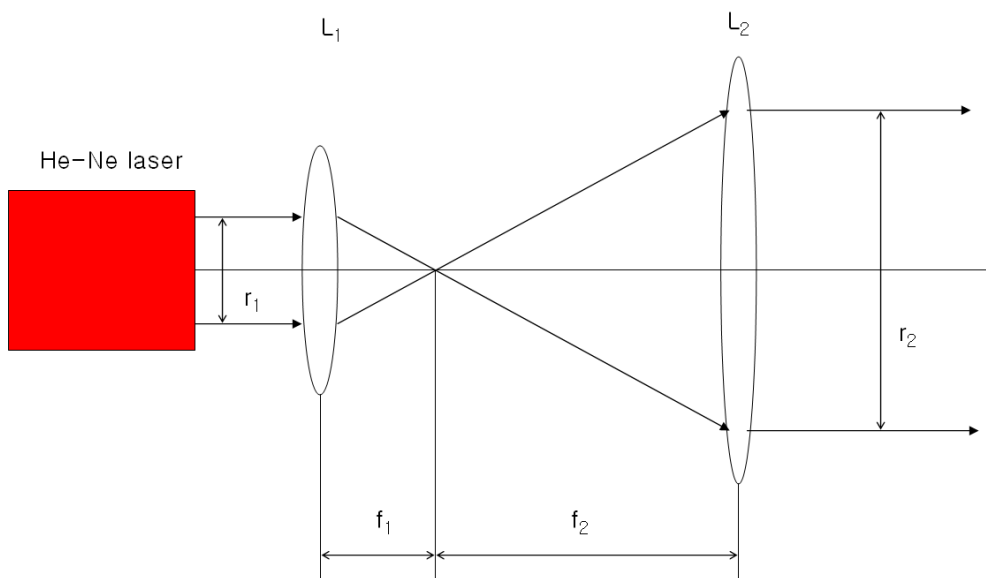


그림 4.2 광선 확장기의 대략도

4.2.3 편광 광선 분배기(polarized beam splitter),  $\lambda/4$  편향판(quarter wave plate), 음향 광학 편향기(Acousto-Optical Deflector)와 물체측 원통형렌즈(cylindrical lens)

편광 광선 분배기는  $\lambda/4$  편향판과 짝을 이루어 광선이 효율적으로 전달되도록 하는 역할을 한다. 레이저의 편광을 조절하여 편광 광선 분배기에서 투과하는 방향으로 맞춰 놓으면  $\lambda/4$  편향판을 거치고 입사된 광선이 시료에 맞고 반사되어 돌아올 때 다시  $\lambda/4$  편향판을 통과하게 되면 편광 광선 분배기에 반사하는 편광 성분을 가진 광선으로 바뀌게 된다.

$\lambda/4$  편향판은 음향광학 편향기와 편광 광선 분배기 사이에서 되돌아오는 광선의 효율을 높일 뿐만 아니라 음향광학 편향기의 효율을 최대화 하는 역할을 한다.<sup>[15,19]</sup>

음향광학 편향기의 작동 원리는 다음과 같다. 음향파가 광학적으로 등방성인 크리스탈에 가해지게 되면 크리스탈의 유전을 변화로 인해 굴절률의 변화가 일어나게 되고 이 굴절률의 변화로 인하여 입사된 광선은 회절을 하게 된다. 그림 3.3은 이러한 음향 광학 편향기의 동작 원리를 나타낸 그림이다. 음향 광학 편향기에 전압이 인가되면 음향 광학 편향기 내부의 크리스탈이 투과형 회절격자(grating)의 역할을 하여 입사되는 광선이 0차 광선, 1차 광선, 2차광선 등으로 나누어지게 된다. 0차 광선은 입사된 광선과 같은 축의 광선으로 움직이지 않기 때문에 사용할 수 없고 1차 광선은 인가되는 전압에 의해서 회절각과 속도가 결정 되므로 1차 광선을 이용하여 광학 편향기를 구성하였다.

입사광의 파장을  $\lambda$ 라 하고 PZT로 들어가는 RF 신호의 대역폭을  $\delta f$ , 음향파의 속도를  $v$ 라 하면 1차 회절광선의 최대 주사각  $\theta_{scan}$ 은 아래와 같은 식으로 구할 수 있다.

$$\theta_{scan} = \frac{\lambda \cdot \delta f}{v} \quad (4.2)$$

1차 회절광선의 최대 효율을 얻기 위해서는  $\theta_{\text{avg}}$ 를 구해야 하는데 그 식은 아래와 같다.

$$\theta_{bragg} = \frac{\lambda \cdot fc}{2v} \quad (4.3)$$

여기서  $fc$ 는 입사되는 광선의 중심 주파수를 말한다.<sup>[15]</sup>

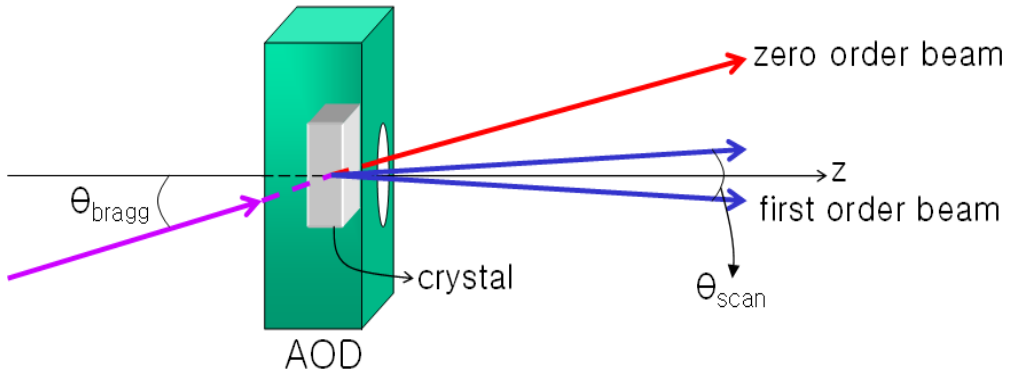


그림 4.3 음향 광학 편향기의 동작 원리

그림 44는 음향 광학 편향기의 효율을 측정한 그래프이다. 음향 광학 편향기는 입사되는 광선의 각도에 따라 1차 회절광선의 회절 효율이 0.85%까지 변하게 되어 있다. 정확한 회절 효율을 측정하기 위해서 각도를 변화 시키면서 효율을 측정 하였다. 65도 일 때 1차 회절광선의 효율이 80.7%로 최대가 되고, 0차 광선은 최소가 되는 것을 볼 수 있다. 그래프의 10도 이상의 값을 보면 0차 광선의 효율이 떨어지는 것에 반해 1차 회절광선 세기는 그대로 멈춰진 것을 볼 수 있는데, 이것은 그림 31의 x축을 기준으로 축대칭인 부분에 1차 회절광선이 생기고 그 회절광선의 효율이 최대가 되었음을 나타낸다.<sup>[6]</sup>

상측 원통형렌즈는 선주사 공초점 현미경의 광학계에서 매우 중요한 역할을 한다. 원통형렌즈는 그림 3.6에서 나와 있는 것처럼 수평(x)축에 대해서는 일반 유리 와 같은 역할을 하고 수직(y)축에 대해서는 초점거리를 갖는 렌즈의 역할을 하게 된다. 각 축에 대한 광선을 추적해 보면 그림에서 나온 것처럼 대물렌즈 이후 2개의 초점이 맺히게 된다. 두 번째 초점 위치에 시료를 위치시키고 레이저를 입사하게 되면 y축으로 선 모양의 광선이 x축으로는 일반 공초점 현미경과 같은 초점이

맷히게 된다.

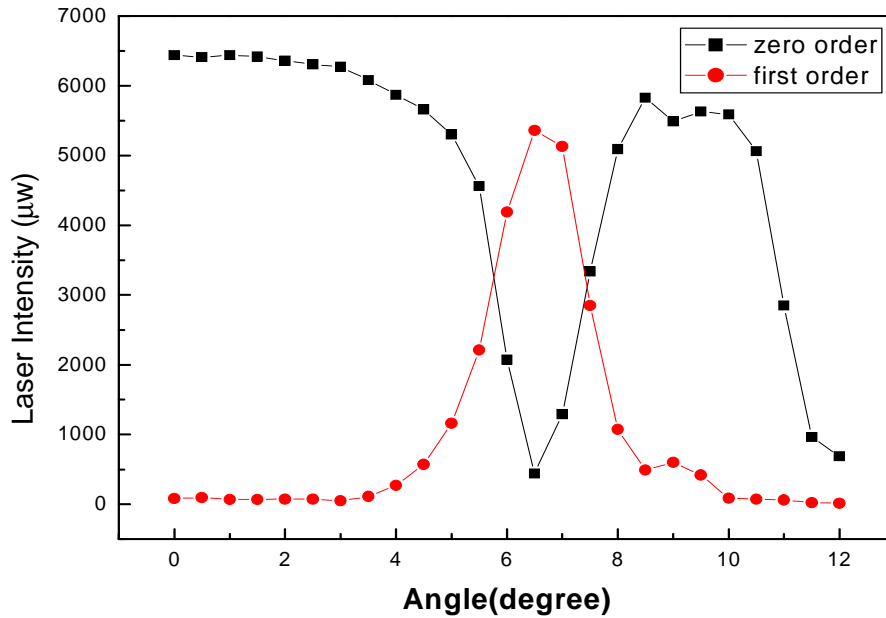


그림 4.4 음향광학 편향기의 각도 변화에 따라 변하는 편향 효율

#### 4.2.4 주사렌즈와 전달렌즈, 대물렌즈

주사렌즈와 전달렌즈의 역할은 그림 4.5처럼 음향광학 편광기에 의해 회절된 광선을 손실 없이 대물렌즈에 전달하고 수차를 최소화하기 위해서 쓰인다. 두 렌즈의 초점 거리에 따라서 광선 확장기와 같은 역할도 수행할 수 있다. 광학계를 구성할 때 초점거리가 같은 두 렌즈를 사용하여 광선의 확대는 없는 주사렌즈와 전달렌즈를 구성하였다.

대물렌즈는 현미경의 분해능을 결정하는데 가장 중요한 구성성분이다. 일반적으로 대물렌즈의 개구수(numerical aperture, NA)가 클수록, 배율이 높을수록 분해능

이 향상되나 측정영역(field of view)이 작아지는 단점이 있다.<sup>[1-3]</sup> 측정하려는 시료의 특징과 측정하려는 범위에 따라서 대물렌즈의 선택을 해야 한다.

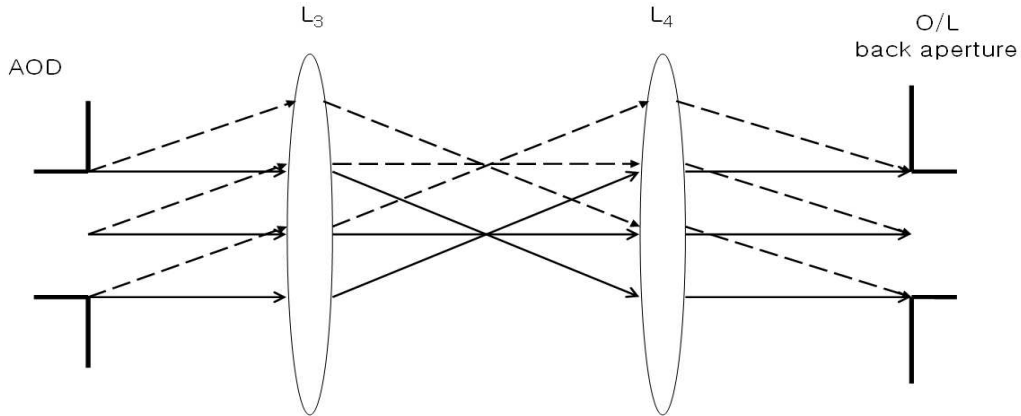


그림 4.5 주사렌즈와 전달렌즈의 역할

#### 4.2.5 상측 원통형렌즈와 슬릿, 영상 원통형렌즈, line CCD

상측 원통형렌즈는 그림 4.1에서 편광 광선 분배기 아래에 있는 광학 장비들로서 서로 수직인 두개의 원통형렌즈로 구성되어 있다. 하나는 물체측 원통형렌즈와 짝을 이루어 광선을 퍼트리는 역할을 하고(CL<sub>2</sub>) 다른 하나는 슬릿의 여과기능을 충족시켜주기 위한 렌즈(CL<sub>3</sub>)역할을 한다. 슬릿은 공간 여과기로 초점에서 반사된 광선 이외의 광선은 제거해주는 역할을 한다.<sup>[1-3,10-12]</sup>

영상 원통형렌즈(CL<sub>4</sub>)는 슬릿을 통해 나오는 퍼지는 광선을 line CCD의 CCD소자에 결상이 되도록 광선을 모아주는 역할을 한다. line CCD는 음향광학 편향기와 함께 동기 신호를 맞추어서 되돌아오는 광선을 영상화 시켜주는 역할로 사용한다. 초점에서 맞는 광선의 모양이 선모양이기 때문에 line CCD를 이용하면 한꺼번에 초점에서 돌아오는 광선을 받아들일 수 있기 때문에 영상을 획득하는 속도가 매우 빨라진다. line CCD는 512개의 CCD 소자가 일렬로 늘어선 모양을 하

고 있다. 각 소자의 크기는  $14\mu\text{m}$ 로서 화면에 표시되는 최소의 화소 크기를 결정한다.

#### 4.2.6 영상 재생 장치

line CCD에서 나온 신호는 PC에 있는 matrox meteor-II/Digital board(프레임 그레버:frame grabber)로 전송이 되고 visual C++를 이용하여 그림 4.6과 같은 입력된 신호를 사용한 영상 재생 프로그램에 의하여 화면에 나타난다. 음향광학 편향기와 동기화를 맞추기 위해서 프레임 그레버는 2 채널 함수발생기에서 둘 중 한 채널은 CCD로 넣어 CCD의 노출속도를 결정해 주는 TTL 신호로, 다른 한 채널은 음향광학 편향기로 램프 파를 넣어 이 두 파형의 위상을 같게 동기화(synchronization) 시켜 주어야만 화면상에 샘플로부터 온 정보가 정확하게 한 프레임을 만들어 화면으로 보여준다. 본 시스템은 60Hz의 속도로 영상을 재생하도록 설계하였고, 최대 131 frames/sec까지 지원을 할 수 있다.

그림 4.7는 영상 데이터의 흐름을 나타는 블록 다이어그램이다. CCD에 맺힌 시료의 영상은 정해진 신호에 따라 프레임 그레버로 line 신호를 넘기게 되고 컴퓨터에서 여러개의 line 신호를 하나의 프레임으로 만들어서 화면(screen)에 영상으로 보여준다.

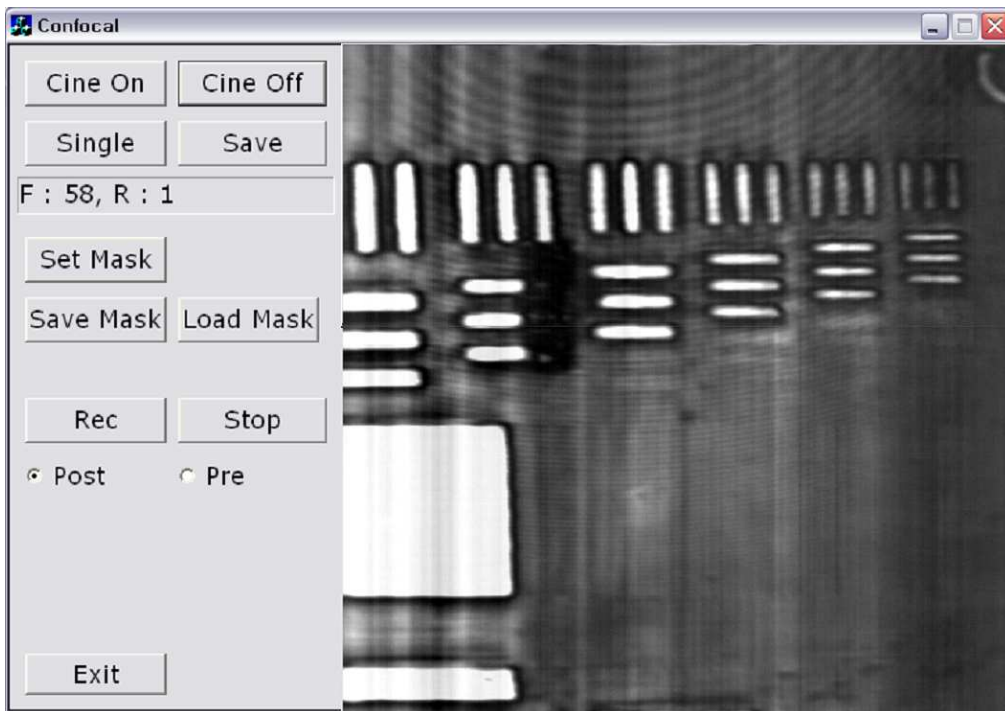


그림 4.6 영상을 보여주는 프로그램의 구동 모습

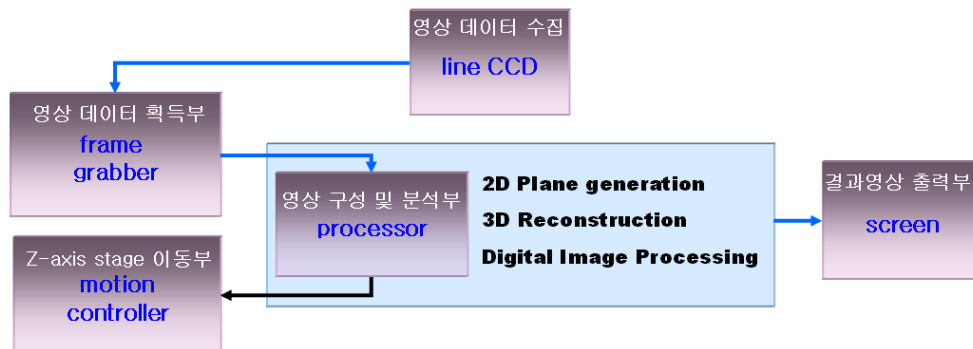


그림 4.7 영상 데이터의 흐름 블록 다이어그램



## 제 5장 실험

### 5.1 축방향 분해능(axial resolution) 측정

공초점 현미경의 특징인 축방향 분해능을 측정하였다. 축방향 분해능에 따라 광학적 절편을 얼마나 세밀하게 만들 수 있느냐가 결정 되기 때문에 시료의 두께를 측정할 수 있는 매우 중요한 요소이다. 시료는 거울을 사용하였다.<sup>[4,9]</sup>

#### 5.1.1 20배 대물렌즈로 축방향 분해능 측정

그림 5.1은 20배 대물렌즈를 사용하여 슬릿의 크기를  $10\ \mu\text{m}$ 로 고정하고 측정한 축방향 분해능이다. 축방향 분해능은 보통 반치폭(Full Width Half Maximum, FWHM)으로 측정하는데, 반치폭이란 측정된 광선의 세기를 정규화(normalizaon)했을 때, 세기가 0.5가 되는 지점이다. 측정한 데이터에서는 반치폭이  $7.7\ \mu\text{m}$ 로 나타났다.

그림 5.2는 20배 대물렌즈를 사용하여 슬릿의 폭을 바꿔가면서 측정한 축방향 분해능이다. 슬릿의 크기를  $10\ \mu\text{m}$ ,  $20\ \mu\text{m}$ ,  $40\ \mu\text{m}$ ,  $60\ \mu\text{m}$ 으로 변화시켰을 때 반치폭은  $7.7\ \mu\text{m}$ ,  $9.9\ \mu\text{m}$ ,  $14.6\ \mu\text{m}$ ,  $21.4\ \mu\text{m}$ 의 크기로 변화하였다. 슬릿의 변화율과 반치폭의 변화율은 그림 5.3의 그래프로 그려보았더니 기울기가 약 0.27인 1차원 직선으로 표현되었다.. 따라서 슬릿의 크기에 따라 축방향 분해능이 변하고 그 변화율은 슬릿의 크기와 비례한다는 것을 알 수 있었다.

슬릿의 크기가 커지면 되돌아오는 광선의 세기가 틀려진다. 그림 5.4은 슬릿 크기별 되돌아오는 광선의 최대 세기를 그래프로 그린 것이다. 슬릿을 작게 하면 할수록 축방향 분해능은 좋아지지만 되돌아오는 광선의 세기는 줄어들게 된다. 따라서 시료를 측정할 때, 원하는 분해능과 되돌아오는 광선의 세기를 고려하여 슬릿의 크기를 선택하여야 한다. 그림 5.5는 슬릿의 위치를 광축과 수직하는 방향으로 움직였을 때 되돌아오는 광선의 세기를 측정한 그래프이다. 슬릿의 위치를 잘못

맞추게 되면 되돌아오는 광선의 세기가 약해져서 영상을 얻기가 힘들어진다.

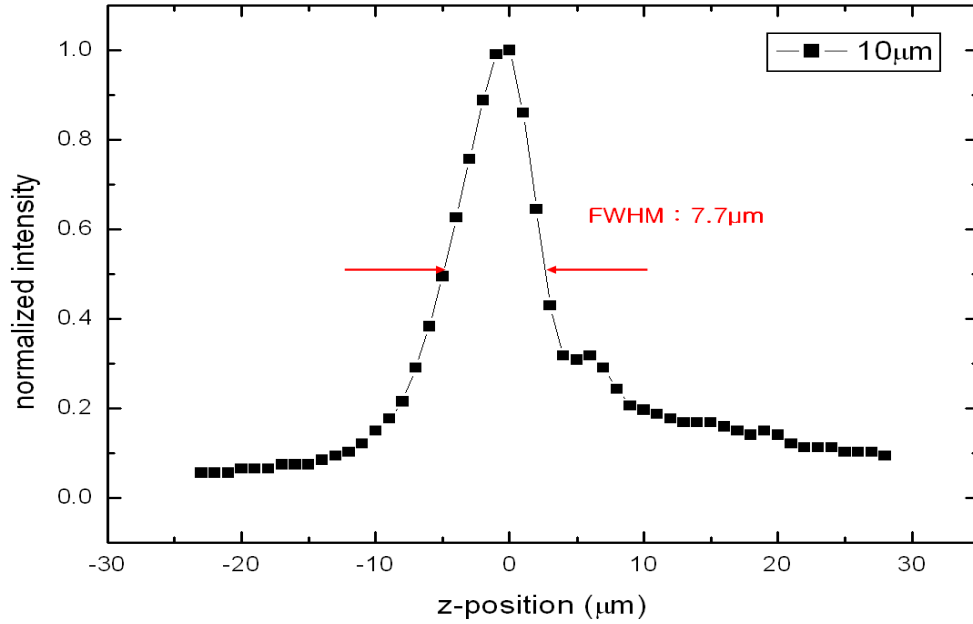


그림 5.1 20X 대물렌즈로 측정된 축방향 분해능, 슬릿 크기는 10 μm, 반치폭 7.7 μm

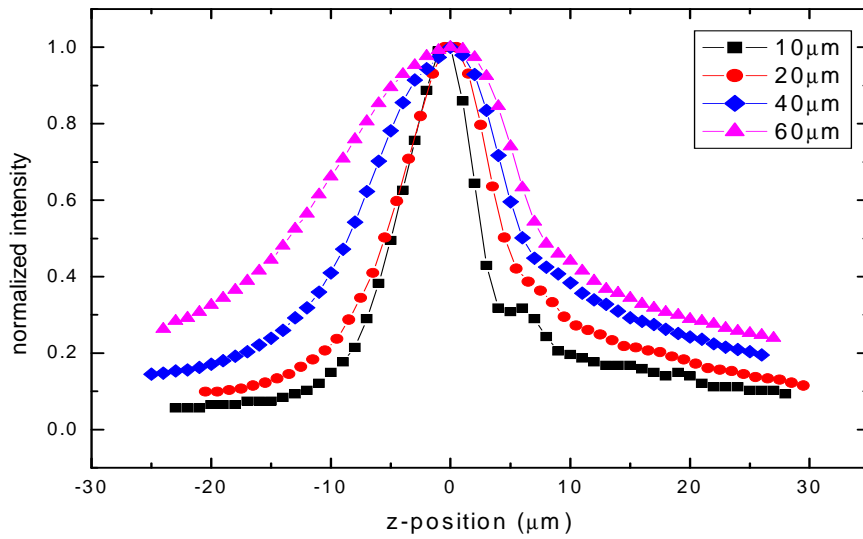


그림 5.2 슬릿의 크기별 축방향 분해능의 변화 (20X)

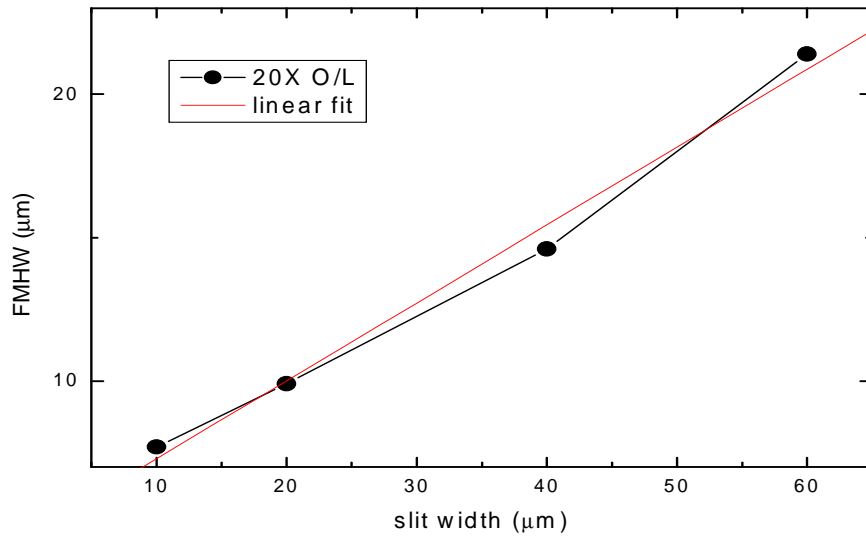


그림 5.3 슬릿의 크기별 반치폭의 변화 (20X)

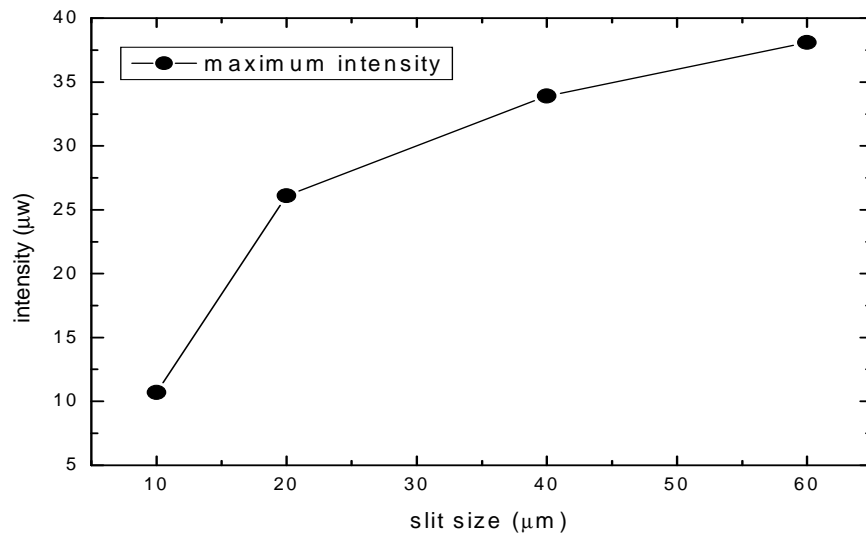


그림 5.4 슬릿 크기별 측정되는 광선의 최대 세기 (20X)

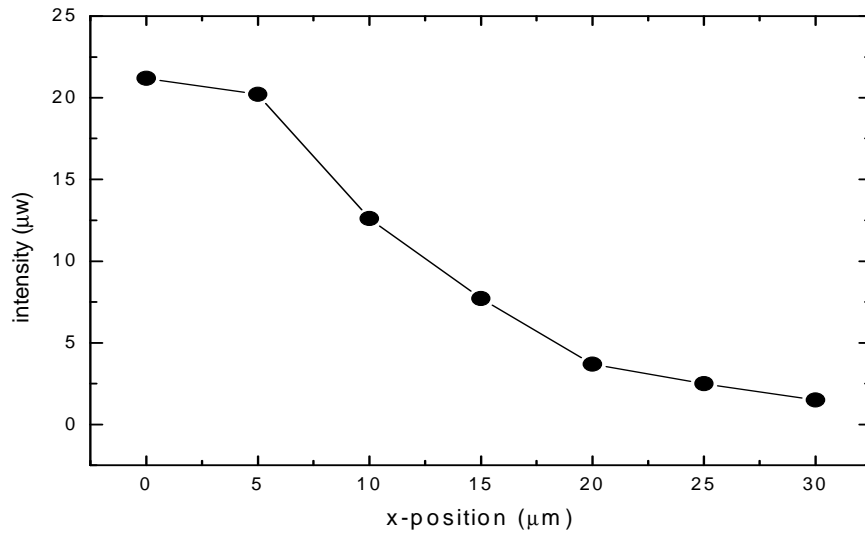


그림 5.5 슬릿 위치에 따른 광선의 세기 (20X)

### 5.2.2 50배 대물렌즈로 축방향 분해능 측정

그림 5.6부터 5.10까지는 20배 대물렌즈 축방향 분해능을 측정했던 것과 똑같은 방법으로 50배 대물렌즈를 사용하여 측정한 그림이다. 먼저 그림 5.6는 축방향 분해능을 측정한 그림으로 슬릿의 크기는  $10\mu\text{m}$ 이고 반치폭은  $3\mu\text{m}$ 이다.

그림 5.7에서 슬릿 각 크기별로 측정한 반치폭은  $10\mu\text{m}$ ,  $20\mu\text{m}$ ,  $30\mu\text{m}$ ,  $40\mu\text{m}$ 인 경우  $3\mu\text{m}$ ,  $3.5\mu\text{m}$ ,  $5.3\mu\text{m}$ ,  $6.2\mu\text{m}$ 으로 측정되었다. 슬릿의 변화율과 반치폭의 변화율을 그래프로 그려보니 그림 5.8에서와 같이 기울기가 약 0.06인 1차원 직선이 그려졌다. 20배 대물렌즈와 비교해보면 기울기가 더 작은 것을 알 수 있다.

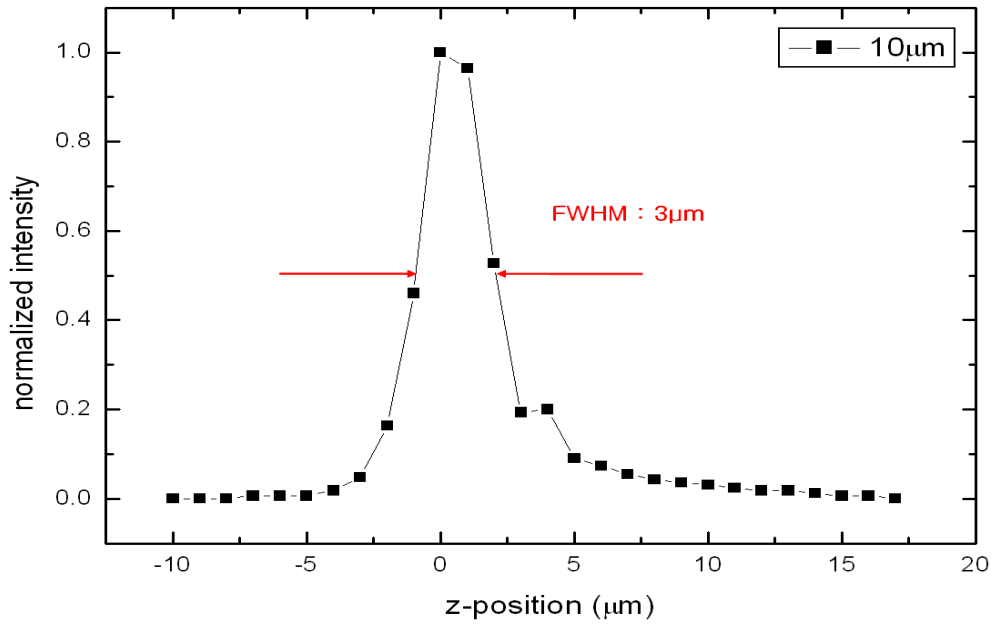


그림 5.6 50X 대물렌즈로 측정한 축방향 분해능, 슬릿 크기는  $10\ \mu\text{m}$ , 반치폭  $3\ \mu\text{m}$

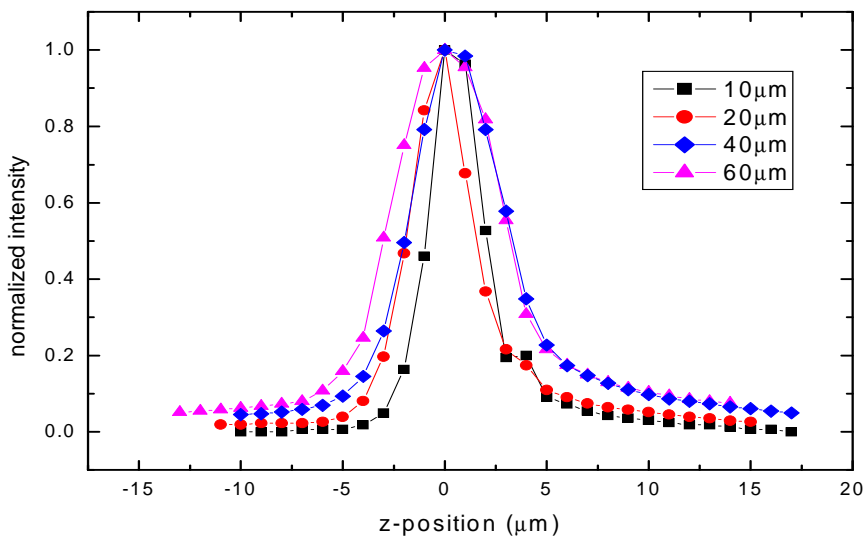


그림 5.7 슬릿의 크기별 축방향 분해능의 변화 (50X)

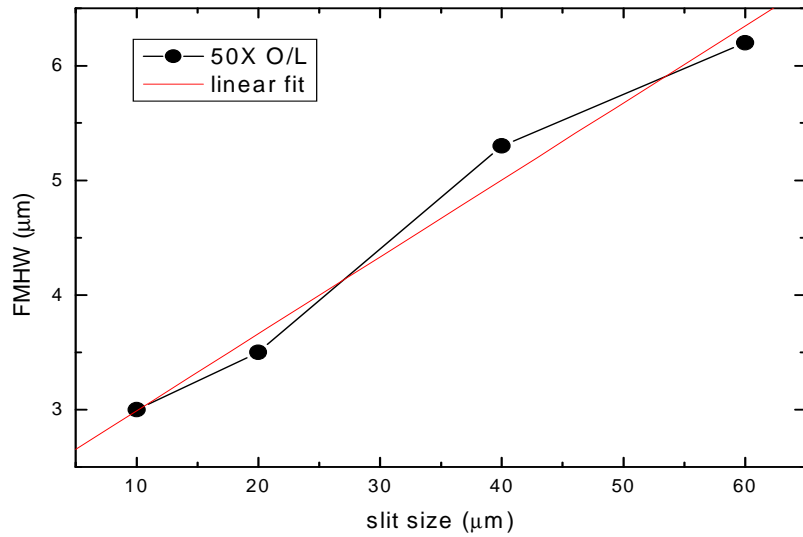


그림 5.8 슬릿의 크기별 반치폭의 변화 (50X)

그림 5.9은 슬릿 크기별 되돌아오는 광선의 최대 세기를 그래프로 그린 것이다. 20배 대물렌즈의 그래프와 비교해보면 같은 크기의 슬릿일 때 되돌아오는 광선의 세기가 20배 대물렌즈 세기보다 더 높을 것을 알 수 있다. 이 결과는 개구수와 관계된 값이라 할 수 있다. 개구수가 높으면 광의 직접도도 높아지기 때문에 그만큼 슬릿을 통과하는 광선이 많아지기 때문이다.

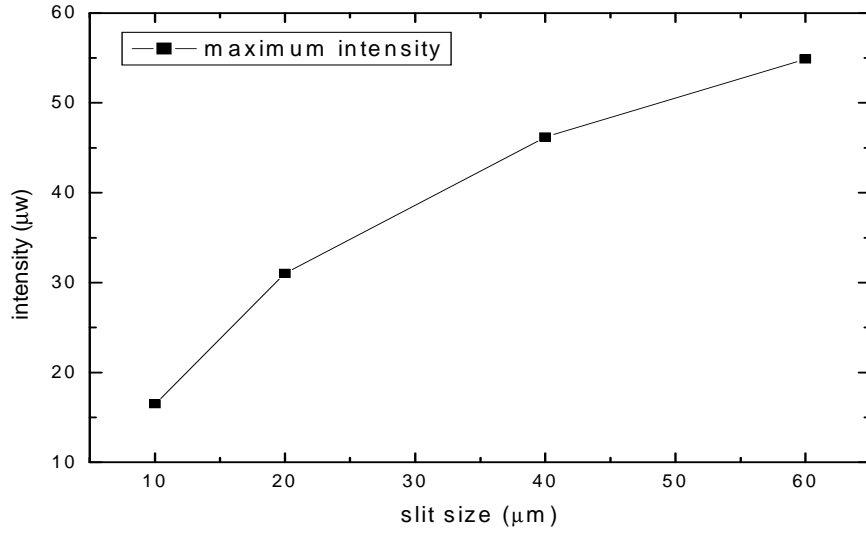


그림 5.9 슬릿 크기별 측정되는 광선의 최대 세기 (50X)

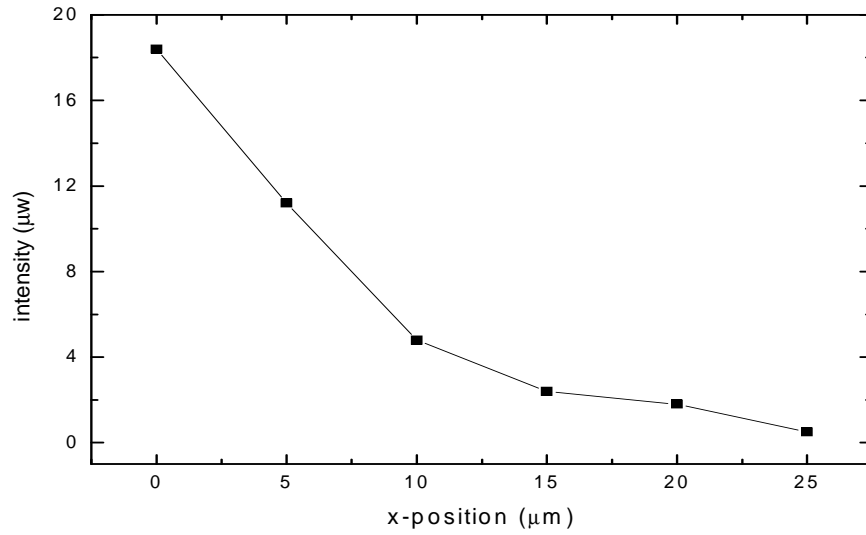


그림 5.10 슬릿 위치에 따른 광선의 세기 (50X)

## 5.2 측정 한 영상

그림 5.11은 일반 광학 현미경과 공초점 현미경의 영상을 비교한 것이다. 공초점 현미경은 해상도가 좋아진 반면 측정영역은 (a)의 점선영역으로 줄어드는 것을 확인 할 수 있다.

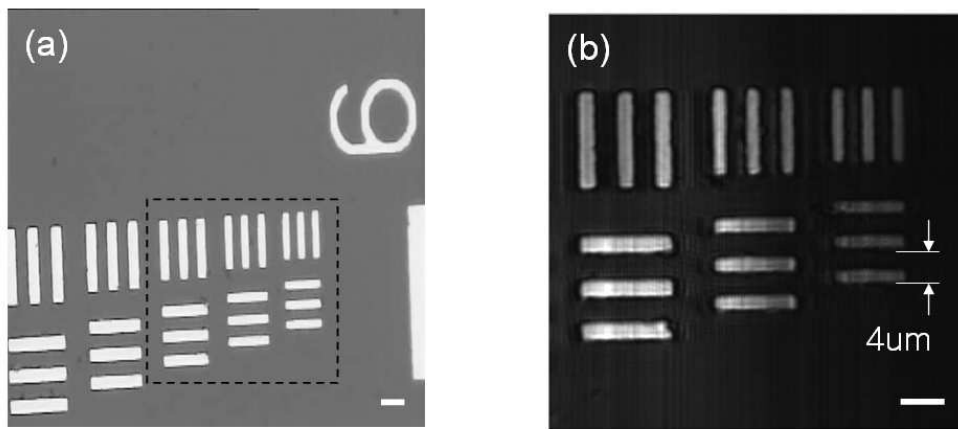


그림 5.11 (a)일반 광학 현미경과 (b)공초점 선주사 현미경의 영상 비교

20배 대물렌즈를 사용하여 시료를 측정하였을때 보이는 영역이 광학 현미경에서는  $280\mu\text{m} \times 280\mu\text{m}$  이였으나 공초점 현미경에서는  $120\mu\text{m} \times 120\mu\text{m}$ 로 약 43%정도 보이는 영역이 줄어들었고 50배 대물렌즈를 사용하였을때는  $80\mu\text{m} \times 80\mu\text{m}$ 에서  $53\mu\text{m} \times 53\mu\text{m}$ 로 66%정도 보이는 영역이 줄어들었다. 표 3.1에서 시물레이션 한 값에 의하면 20배 대물렌즈를 사용하였을 때 1값이  $240\mu\text{m}$ 정도로 스캔이 되어야 하는데  $120\mu\text{m}$ 로 나타난 것은 x, y축의 비례를 맞추어 영상을 구하다 보니 CCD소자로 들어가지 못하는 광선이 생겨서 스캔 범위가 줄어들었다. CCD의 크기를 늘리면 좀 더 넓은 범위의 영상을 한꺼번에 잡을 수 있을 것이다.

그림 5.12는 micro structure를 원자 현미경(AFM)과 전자 현미경(SEM)을 이용하여 구한 영상이다. 가운데가 패인 모양의 패턴이 연속적으로 위치하고 있는 것



을 알 수 있다.

그림 5.13은 5.12에서 측정된 micro structure를 z축 방향으로 움직이며 선주사 공초점 현미경으로 얻은 영상이다(a)~(c). 위치에 따라서 영상의 밝은 부분이 다른 것을 볼 수 있는데 이것은 그림 5.12에서 보이는 시료의 높이차에 의해서 초점이 맞는 부분에서만 광선이 돌아오기 때문에 높이가 맞는 부분만 밝게 보이는 것이다. (d)는 측정 한 영상을 Bionix 프로그램을 이용하여 3차원 재구성한 영상이다. 아직까지는 SEM이나 AFM과 같이 정밀하게 측정하지는 못하지만 어느 정도 비슷한 영상을 구할 수 있었다.

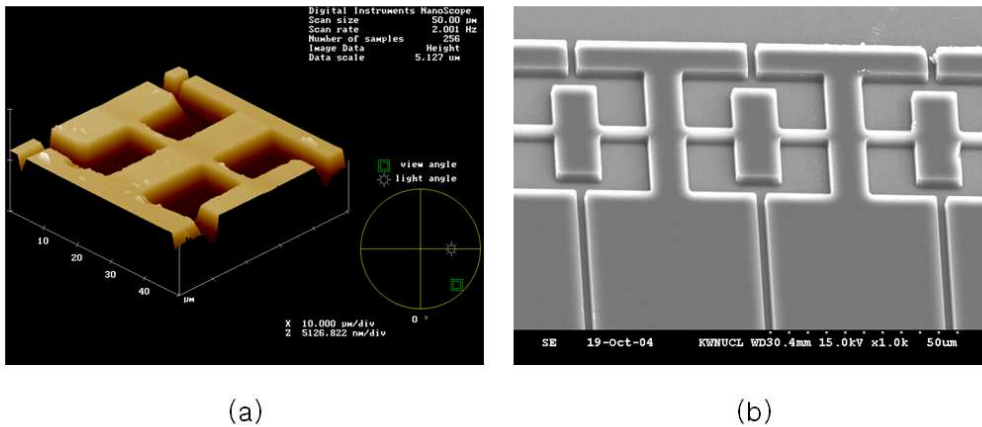


그림 5.12 (a)원자 현미경과 (b)전자 현미경으로 찍은 micro structure 영상

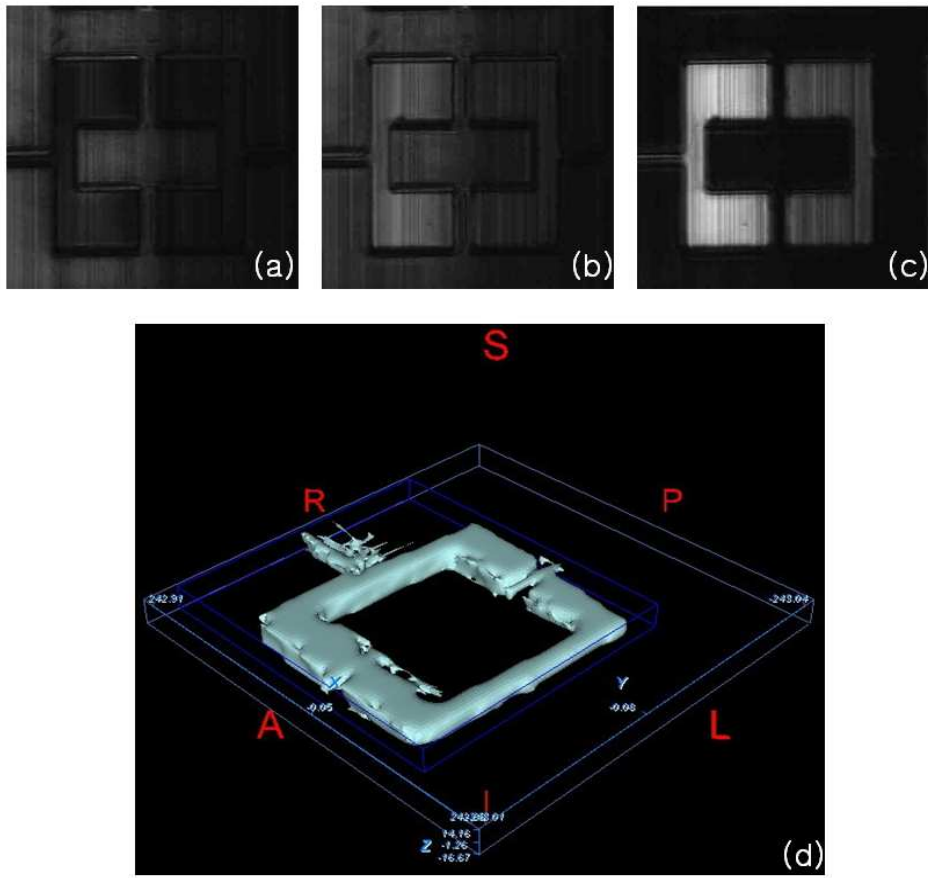


그림 5.13 선주사 공초점 현미경으로 찍은 영상(a)~(c), 3차원 재구성한 영상 (d)

## 제 6장 결론

본 논문에서는 가격이 저렴하면서 영상 획득 속도가 빠른 선주사 공초점 현미경을 설계하고 제작하여 영상을 얻었다. 일반적으로 선주사 공초점 현미경에서 많이 쓰는 백색광원을 쓰지 않고 He-Ne 레이저를 광원으로 사용하였고, 회절효율은 약간 떨어지나 주사 속도가 빠르고 기계적 진동이 없는 음향광학 편향기를 사용하여 광선을 주사했으며, 원통형렌즈를 사용해서 초점면에 선 모양의 광선이 맺히도록 광학계를 구성하였다. 슬릿을 사용하여 선모양의 초점에서 나오는 광선만이 검출기에 들어갈 수 있도록 하였으며, line CCD를 사용해서 검출의 효율성을 개선시키고 초당 60프레임의 영상을 얻을 수 있었다. 얻은 영상은 컴퓨터를 통해서 바로 화면으로 볼 수 있도록 프로그래밍 하였다. 이렇게 구축한 시스템과 20배 대물렌즈와 50배 대물렌즈를 사용하여  $7.7\mu\text{m}$ ,  $3\mu\text{m}$ 의 축방향 분해능을 얻을 수 있었다. air force target의 영상을 구하여 일반 광학 현미경과 해상도 비교를 하고, micro structure를 측정하여 다른 현미경과 영상을 비교하고 깊이방향 측정을 하여 3차원 재구성을 해 보았다. 일반 광학 현미경보다 횡방향 분해능이 개선되고, 깊이 방향 측정도 가능하다. 하지만 3차원 재구성 영상은 다른 3차원 측정 현미경에 비해서 정밀도가 조금 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

그러나 아직까지는 살아있는 각막 세포의 모양을 측정하는 것은 힘들다. 동잡음 보다는 영상화가 제대로 안 되기 때문이다. 여러 가지 문제가 존재하지만 가장 먼저 각막 세포의 반사도가 너무 낮아서 돌아오는 광선의 세기가 약한거 같다. 선주사 공초점 현미경을 좀더 보완한다면 실시간으로 토끼 각막 내피 세포를 영상화할 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

- [1] Corle. Timothy Rechar, "Studies in confocal scanning optical microscopy", Stanford university, 1989.
- [2] C. J. R Sheppard and D. M. Shotton, "Confocal Laser Scanning Microscopy", Springer, 1997.
- [3] Timothy R. Corle, Gordon S. Kino, "Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems", Academic Press, 2003.
- [4] Paul C. Lin, Pang-Chen Sun, Lijun Zhu, and Yeshaiahu Fainman, "Single-shot depth-section imaging through chromatic slit-scan confocal microscopy", Appl. Opt. 37, 6764, 1998.
- [5] M. Minsky, "Microscopy apparatus," U.S. patent 3,013,467, 1961.
- [6] Yashvinder S. Sabharwal, Andrew R. Rouse, LaTanya Donaldson, Mark F. Hopkins and Arthur F. Gmitro, "Slit-scanning confocal microendoscope for high-resolution in vivo imaging", Appl. Opt. 38, 7133, 1999.
- [7] B. R. Masters and A. A. Thaer, "Real-time scanning slit confocal microscopy of the *in-vivo* human cornea", Appl. Opt. 33, 695, 1994.
- [8] Eugene Hecht, "Optics, Fourth edition", Addison Wesley, 2002.
- [9] T. R. Corle, C. H. Chou, and G. S. Kino, "Depth response of confocal optical microscope", Opt. Lett. 11, 770, 1986.
- [10] C. J. R. Sheppard and X. Q. Mao, "Confocal microscopes with slit apertures", J. Mod. Opt. 25, 1169, 1998.
- [11] T. Wilson, "Optical sectioning in confocal Fluorescent microscopes", Journal of Microscopy, 154, 143, 1989.
- [12] T. Wilson and S. J. Hewlett, "Imaging in scanning microscopes with slit-sharped detectors", Journal of Microscopy, 160, 115, 1990.
- [13] C. J. R. Sheppard and T. Wilson, " Effects of high angles of convergence on  $V(z)$

- in the scanning acoustic microscope“, Appl. Phys. Lett. 38, 858, 1981.
- [14] Max Born, Emil Wolf, A. B. Bhatia, P. C. Clemmow, D. Gabor, A. R. Stokes, A. M. Taylor, P. A. Wayman and W. L. Wilcock “Pinciples of Optics“, Pergmon Press, 1964
- [15] Milton Gottlieb, Clive L. M. Ireland, John Martin Ley, “Electro-Optic and Acousto-Optic Scanning and Deflection“, Marcel Dekker, 1983.
- [16] Lothar Kador, Tobias Schittkowski, Markus Bauer, and Yuwei Fan, “Three-dimensional materials analysis by confocal Raman microspectroscopy“, Appl. Opt. 40, 4965, 2001
- [17] C. J. R. Sheppard and T. Wilson, “ Image formation in scanning microscopes with partially coherent source and detector“, Optica Acta, 25, 315, 1978
- [18] T. Wilson and A. R. Carlini, “Depth discrimination criteria in confocal optical systems“, Optik, 76, 164, 1987
- [19] Dungdo Cha, Paul C. Lin, Lijun Zhu, Pang-Chen Sun, and Yesaiahu Fainmen, “ Nontranslational three-dimensional profilometry by chromatic confocal microscopy with dynamically configurable micromirror scanning“, Appl. Opt. 39, 2605, 2000
- [20] Tony Wilson, S. J. Hewlett, and C. J. R. Sheppard, “Use of objective lenses with slit pupil fuctions in the imaging of line structures“, Appl. Opt. 29, 4705, 1990
- [21] M. Ivanda and K. Furic, “Line focusing in micro-Raman spectroscopy“, Appl. Opt. 31, 6371, 1992
- [22] Robert M. Simmons, Jeffrey T. Finer, Steven Shu, and James A. Spudich, “Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap“, Biophysical Journal, 70, 1813, 1996

## ABSTRACT

Development of high speed confocal line scanning microscope for imaging of biological tissues

Park Hwa-joon  
Dept. of Biomedical Engineering  
The Graduate School  
Yonsei University

A high speed confocal microscope for imaging of biological tissues is designed and developed. The optical system of line scanning confocal microscope is designed to minimize the aberration. We make A high speed confocal line scanning microscope using acousto-optical deflector and a line CCD. The image acquisition speed of our system is 60 frame/sec and the axial resolution is measured  $7.7\ \mu\text{m}$  for 20X objective lens and  $3\ \mu\text{m}$  for 50X objective lens. The confocal images of a micro-structure are obtained at various depths and three dimensional image is reconstructed by using the confocal images.

---

Key words : confocal, microscope, line scan, CCD, slit, 3D image