광섬유 다발을 이용한 다초점 현미경

구영모 · 함효식 · 최성을[†]

인천대학교 자연과학대학 물리학과
☎ 406-840 인천광역시 연수구 송도동 12-1번지

(2009년 10월 26일 받음, 2009년 11월 25일 수정본 받음, 2009년 11월 27일 게재 확정)

공초점 현미경 중 하나로 각광받는 MMM(multi-focal multi-photon microscope)의 핵심부분인 미세렌즈 배열판을 광섬유 다발로 대체한 간단한 형태의 광섬유 다발 다초점 현미경을 구성하여 그 성능을 분석하였다. 이 현미경의 성능 분석을 위하여 세 종류의 시료를 사용하였으며, 두 개의 편광판과 편광 빔 분리기를 사용하여 노이즈를 제거한 뚜렷한 상을 얻을 수 있었다. 표준격자 시료를 사용하여 1차 대물렌즈의 배율을 63배와 20배로 달리하면서 광점 상의 FWHM를 구하였고, 광점 상들의 분포 속에서 물체의 상을 볼 수 있었으며, 분포가 조밀한 저배율의 1차 대물렌즈를 사용할 경우에 보다 선명한 시료의 상을 얻을 수 있었다. 광섬유 다발 다초점 현미경의 분해능을 시험하기 위해서 표준격자 시료보다 격자 간격이 작은 USAF 1951을 시료로 사용하여 상을 측정하여 얻은 시료 상의 FWHM와 주어진 시료의 선폭 값이 서로 잘 일치함을 볼 수 있었다. 광섬유 다발 다초점 현미경은 1개의 광섬유 다발을 사용함으로써 시스템을 간소화시켰고, 마이크론 이하의 분해능을 가지며, 광섬유의 개수인 1600개의 광점 상을 동시에 얻을 수 있었다.

Multi-focal Microscopic System Using a Fiber Bundle

Young-Mo Gu, Hyo-Shick Ham, and Sung-Eul Choi[†]

Department of Physics, College of Natural Sciences, University of Incheon,
12-1 Songdo-dong, Yeonsu-gu, Incheon 406-840, Korea

[†]E-mail: schoi@incheon.ac.kr

(Received October 26, 2009; Revised manuscript November 25, 2009; Accepted November 27, 2009)

We have constructed and analyzed the performance of a simple fiber bundle multi-focal microscope. The microscope had a fiber bundle substituted for micro-lens array that is the core part of MMM(multi-focal multi-photon microscope). The MMM is a type of confocal microscope. To analyze the performance and characteristics of the fiber bundle multi-focal microscope, three types of samples were used: a standard grating, USAF 1951(7, 3), and 1951(7, 6). Using two polarizers and a polarizing beam splitter, we eliminated noise and got clear images. We obtained the FWHM of fiber spot images with the standard grating using two different magnifier lenses which were 63X and 20X, and found an image of the sample as a distribution of fiber spot images. For this case we used the low magnification lens, which gives denser distribution, so that we could get clearer images. In order to test the resolution of the fiber bundle multi-focal microscopic system, we used the USAF 1951 sample which has a smaller line interval than that of the standard grating. The FWHM of the line width of the image coincides well with the real line width of the USAF 1951 sample. We confirmed the performance of a fiber bundle multi-focal microscopic system which is relatively simple but has submicron resolution and is able to get 1600 images at the same time.

Keywords: Multi-focal microscope, Optical fiber bundle, Confocal microscope

OCIS codes: (180.0180) Microscopy; (060.2350) Fiber optics imaging; (180.1790) Confocal microscopy

I. 서 론

최근 회절한계 이상의 분해능을 얻기 위한 현미경으로는 공초점 현미경(confocal microscope), 근접장 현미경(near-field

scanning optical microscope), 그리고 원자 현미경(atomic force microscope) 등이 있다. 이러한 현미경들 중 공초점 현미경은 비교적 간단한 구성으로도 높은 분해능을 지니고, 비접촉식이며, 실시간으로 3차원 상을 구현하는데 용이하여 생명공학이나 의료분야 등에서 널리 사용되고 있다. 그러나 대부분의 공초점 현미경은 이러한 여러 가지 장점에도 불구하고 상을

[†]E-mail: schoi@incheon.ac.kr

연는데 많은 시간이 소요된다는 단점이 있다.

그나마 빠른 상 획득이 가능한 일부 공초점 현미경으로는 현재 회전원판식 공초점 현미경^[1,2], AOD(acousto-optic deflector)를 이용한 공초점 현미경^[3], 그리고 MMM(multi-focal multi-photon microscope)^[4] 등이 있다. 회전원판식 공초점 현미경은 Nipkow 판과 미세렌즈 배열판(micro-lens array)을 함께 사용하는 두 원판 방식을 이용한다.^[5-7] Stefan W. Hell은 회전원판식 공초점 현미경의 두 원판 방식과는 달리 미세렌즈 배열판만을 사용한 MMM 시스템을 구현하였다.^[8] Stefan W. Hell의 MMM 방식은 그림 1(a)과 같이 모드잠금 레이저빔이 직경 460 μm 인 미세렌즈와 TMX를 지나면서 펄스들 사이에는 다른 시간지연을 갖는 다른 펄스들이 공간상의 한 평면 위에 다초점을 만들고 이들이 다시 발산되어 이색성 거울에서 반사된 빛이 시료렌즈를 통해 시료에 조사된다. 시료의 여러 점들에서 반사된 빛들이 이색성 거울을 투과해 CCD에 상을 맺게 되는데, 이때 CCD를 Z축 상으로 스캔함으로써 3차원 상을 얻는 방식의 공초점 현미경이다.

기존 S.H. Hell의 MMM 방식은 미세렌즈 배열판과 편환

배열판과의 정렬 및 미세렌즈 배열판의 교체 시 편환 배열판과의 간격 조정이 반드시 필요하다. 또한 두 disk를 고속으로 회전시키면서 정렬하기 위한 부가적인 초 정밀부품과 컨트롤 장치가 필요하다. 이러한 단점을 해결하기 위한 방법으로 미세렌즈 배열판과 편환 배열판을 광섬유 다발로 교체하여 구성한다면 1차 대물렌즈의 초점거리 조절만 필요하기 때문에, 기존 방법에 비해 구성이 훨씬 단순해 지고 구동 환경 또한 복잡한 컨트롤을 생략할 수 있을 것으로 예상된다.

본 연구에서는 다양한 형태의 공초점 현미경(confocal microscopes) 중의 하나인 MMM 시스템 구성요소의 주요 핵심부분인 미세렌즈 배열판을 광섬유 다발(optical fiber bundle)로 대체 응용한 간단한 형태의 다초점 현미경(multi-focal microscope)을 그림 1(b)와 같이 구성하여 그 성능을 분석하고자 하였다.

본 연구는 광섬유 다발을 이용한 공초점 현미경 개발을 위한 선행되어야 할 연구로서 시스템 설계 및 구성에 따른 확대된 여러 광점들이 시료의 여러 점들에서 반사되어 결상부의 CCD에 맺어지는 상의 해상도와 특성을 분석함으로써, 차후 3차원 상을 구현하는 광섬유 다발을 이용한 공초점 현미경 개발을 위한 기반을 위해 시도되었다. 광섬유 다발 다초점 현미경은 시스템이 비교적 간단하면서도 마이크로 이하의 분해능으로 광섬유 개수에 해당하는 2차원 상을 동시에 얻을 수 있으며, 살아있는 생물체 시료를 비접촉식으로 실시간으로 관찰이 가능하다는 장점이 있으나, 단점으로는 각각의 광점들을 충분히 확대하지 않으면 광점 상들이 시료에서 서로 중첩되어 뚜렷한 상을 얻지 못할 가능성이 있다는 것이다.^[9,10]

광섬유 다발 다초점 현미경의 성능 및 특성을 분석하기 위하여 표준격자 시료(격자간격이 10 μm , 격자의 선폭이 1.5 μm), USAF 1951 +7,3시료(161 lines/mm의 등간격 흑백 줄무늬), 그리고 USAF 1951 +7,6시료(228 lines/mm의 등간격 흑백 줄무늬) 등 세 개의 시료를 사용하였으며, 상의 대비(contrast)를 알아보기 위하여 레이저의 출력을 12.6 mW와 1.6 mW로 변화시켰으며, 광섬유 다발의 광점들 간의 간격을 확대하기 위하여 1차 대물렌즈의 배율을 63배, 20배로 달리하면서 실험을 하였다.

II. 실험

1. 시스템 구성

본 연구에서 설계한 광섬유다발 다초점 현미경의 전체적인 시스템의 구성도는 그림 2와 같으며, 이 시스템은 크게 4개의 주요 부분으로 나눌 수 있다. 첫째는 레이저 빔을 광섬유 다발로 집속하기 위한 레이저 광 집속부, 둘째는 광섬유 다발로 도파된 레이저 광이 광섬유들을 빠져 나온 광점들이 1차 대물렌즈에서 확대(63배 또는 20배)되어 거울에서 반사된 후 확대 광점면에 확대된 광점들을 맺어 시료 초점면에서 서로 중첩이 되지 않도록 만드는 확대 광점부, 셋째는 편광판,

FIG. 1. (a) MMM and (b) Fiber bundle multi-focal microscope.

FIG. 2. Schematic diagram of fiber bundle multi-focal microscopic system.

FIG. 3. Fiber bundle exit and objective lens(63x, 20x).

편광 빔 분리기, 평행광 렌즈, 시료용 대물렌즈, PZT에 연결되어 있는 시료대, 그리고 시료로 이루어져 있는 시료관측부, 넷째는 시료의 여러 점에서 반사된 광들이 다시 시료용 대물렌즈, 평행광 렌즈, 편광빔 분리기, 그리고 또 다른 편광판을 차례로 지난 후 CCD에 영상을 맺는 영상기록부가 있다.

2. 레이저 광 집속부

파장 488 nm인 아르곤 이온 레이저 광을 초점거리 50 mm인 양면 볼록렌즈를 이용하여 그림 3과 같이 집속시킨다. 광섬유 다발에 레이저 광을 집속시킬 때 렌즈에 의한 초점거리 및 위치를 정확히 하게 위해 3축 미세 조절기를 이용하였다. 본 연구에서 사용한 광섬유 다발은 직경이 210 μm 정도로 매우 가늘어서 3축 미세 조절기의 철재 고정대에 고정시킬 경우 광섬유 다발의 변형이나 손상을 초래할 수가 있으므로 광섬유 다발을 테프론 테이프로 두겹게 감은 후 육각기둥 모양의 고체형 테프론에 끼워서 3축 미세 조절기에 고정시켜 사용하였다.

본 연구에서 사용한 광섬유 다발은 Fujikura사의 FIGH-016-160S 이며 상면 원판(image circle) 직경이 140 μm 이고, 그 속에는 1600개의 가는 광섬유를 포함하며, 각 광섬유의 직경은 대략 3 μm 이다. 광섬유 다발을 감싸고 있는 silica jacket은

10 μm 두께로 코팅되어 있고, 그 위에 다시 두께 25 μm 인 플라스틱으로 코팅되어 있다. 광섬유 다발 속의 수많은 광섬유들은 무질서하게 배열이 되는 것이 아니라 광이 들어오는 입사부와 광이 나가는 출사부의 광섬유들의 배열이 같아서 입사 단면에서의 상을 그대로 출사 단면에 전달해주는 특성이 있다.

3. 1차 대물렌즈에 의한 광섬유의 광점 확대부

레이저 광 집속렌즈를 통해 초점에서 광섬유 다발에 집속된 레이저 광은 광섬유 다발속의 각각의 광섬유를 따라서 도파한 후 광섬유 다발의 출구부로 빠져 나오는데 이 때 각 광섬유의 단면인 광점에서는 NA 0.39로 확산되어 퍼져나간다.

광섬유 다발 속의 각각의 광섬유를 통해서 도파된 레이저 광들은 광섬유 다발의 단면에서 1600개의 광점들을 만들며, 이들은 1차 대물렌즈(배율 63배와 20배의 두 종류의 대물렌즈를 사용)에 의해 확대되면서 확대 광점면을 공간상에 형성한다. 그림 3은 1차 대물렌즈에 의한 광섬유 다발의 광점 확대장치를 나타낸 것이다. 확대 광점면과 평행광 렌즈 사이에는 1 inch(25.4 mm)의 편광 빔 분리기(PBS)가 들어가야 하기 때문에 둘 사이의 간격이 1 inch 보다는 길어야 한다. 따라서 1차 대물렌즈를 통해 광섬유 다발의 광점들 사이의 간격을 확대하였다.

시료용 대물렌즈의 N.A가 0.65, 초점거리 2.2 mm, 레이저 광의 파장이 488 nm이므로 Rayleigh의 규준에 따라 분해 한계치 q 는

$$q = 0.61 \times (\lambda / NA)$$

이므로 458 nm이다. 따라서 평행광 렌즈의 최소 초점거리는 14.4 mm가 되어야만 한다. 만일 초점거리가 14.4 mm보다 긴 시료용 대물렌즈를 사용할 경우에는 집속된 각각의 광점들 사이 간격이 분해 한계치보다 작아져서 각 광점에서 나온 레이저 광들이 시료에서 서로 중첩되어 뚜렷한 상을 얻을 수가 없게 된다.

광섬유 다발에서의 광점의 간격이 약 3 μm 이므로 1차 대물렌즈를 배율 63배와 20배를 사용할 경우 확대 광점면에서의 광점 상들 사이 간격은 각각 189 μm 와 60 μm 가 된다. 1차 대물렌즈의 배율을 정확히 적용하기 위해서는 1차 대물렌즈의 길이(초점거리+경통)인 160 mm를 일정하게 유지시켜야 한다. 확대 광점면과 평행광 렌즈간의 거리가 이 렌즈의 초점거리와 일치시켜 평행광을 만들어 시료용 대물렌즈로 보낸다.

4. 시료 관측부와 영상 기록부

광섬유 다발의 광점들이 1차 대물렌즈에 의해 확대된 광점면을 지나온 광들은 편광판을 지나면서 선편광되고 편광 빔 분리기에서 반사된 광은 평행광 렌즈를 지나 시료용 대물렌즈로 입사된다. 이 입사광들은 그림 2의 좌측-하단에 나타낸 것과 같이 각각 다른 각도로 입사되어 시료용 대물렌즈에 의

해 수렴되어 초점면에 놓인 시료의 여러 부분에서 반사된다. 이와 같이 시료의 여러 부분에서 반사된 광은 다시 시료용 대물렌즈로 들어가서 평행광으로 나오며 이것은 다시 평행광 렌즈에 의해 수렴되며 편광 빔 분리기와 또 다른 편광판을 지나 CCD에 시료의 상을 맺는다. 그림 4는 평행광 렌즈, 시료용 대물렌즈, PZT에 연결된 시료대, 그리고 시료를 나타낸 사진이다.

확대 광점면을 지나온 빔은 편광판을 지나면서 선형 편광된 빔이 만들어지며 이것이 반사되어 평행광 렌즈, 시료용 대물렌즈, 그리고 시료에 초점을 맺으며 난반사하게 된다. 이렇게 난반사된 빛은 다시 대물렌즈, 평행광 렌즈, 편광빔 분리기를 통과하여 처음 편광판과 통과축이 서로 수직인 다른 편광판을 지나서 CCD로 들어간다. 따라서 CCD에 들어간 빛은 초기에 들어왔던 빛의 편광과는 90° 편광된 빛만이 CCD에서 검출되게 된다.

두 개의 편광판과 편광 빔 분리기를 이용하는 이유는 시료에서 반사된 빛이 CCD로 검출될 때, 시료에 의해 빛의 편광 상태가 바뀐 것만을 검출하기 위함이다. 편광 상태가 바뀌지 않은 빛이 동시에 검출될 경우 CCD의 상은 심한 노이즈로 인하여 뚜렷한 상을 얻을 수가 없으므로 이를 제거하기 위해서 두 개의 편광판과 편광 빔 분리기를 사용하였다.

상을 검출하기 위한 CCD 검출기는 Synchron사의 Eagle AM-1400을 이용하였다. AM-1400에는 1380×1029 개의 CCD 픽셀(pixel)이 있으며, 각 픽셀의 크기는 $4.65 \times 4.65 \mu\text{m}^2$ 이다. CCD에서 검출된 상을 컴퓨터에서 분석하기 위해 CCD에 들어오는 아날로그 신호를 디지털 신호로 변환하는 frame grabber가 필요하며, 이를 위해 본 연구에서는 Matrox사의 meteor II를 사용하였다. 또한 frame grabber에서 디지털 신호로 변환된 정보를 모니터 상에서 상을 분석하기 위한 상 처리 프로그램으로는 Inspector 4.1을 사용하였다.

시료용 대물렌즈로는 Olympus사의 NA가 0.65, 작업거리가 0.56 mm, 그리고 초점거리가 2.2 mm인 볼록렌즈를 사용하였다. 시료용 대물렌즈의 초점에 시료를 정확히 맞추기 위해서는 시료가 놓여있는 시료대를 z축으로 미세 조정하여야 한다. 이를 위해 본 연구에서는 Spindler & Hoyer사의 SH-150

PZT driver를 사용하여 시료대의 z축을 변화시켰다. SH-150은 PZT에 가해지는 전압을 -10V~150V 범위 내에서 변화시켜주는 장치이며, 이를 자동으로 변화를 시켜주기 위해 PASCO사의 Science Workshop 750 Interface와 software인 Data Studio를 사용하였다.

III. 실험 결과

1. 배율 63배인 1차 대물렌즈에 의한 시료의 상

본 연구에서는 현미경용 표준격자를 시료로 사용하였으며, 이 표준격자는 그림 5와 같이 지름 5 mm의 알루미늄 코팅 중앙에 10 μm 의 일정한 간격으로, 선 폭이 1.5 μm , 길이 1 mm인 알루미늄 코팅이 에칭된 것이다.

그림 6의 결과를 얻기 위해 1차 대물렌즈로 배율이 63배인 대물렌즈를 사용하였다. 그림 6(a)는 백색광을 사용하여 얻은 표준격자의 상이다. 밝게 나타나는 부분이 알루미늄 코팅이 에칭된 부분이다. 그림 6(b)는 광섬유 다발 다초점 현미경으로 관측된 표준격자의 상이다. 실선으로 표시된 에칭된 부분이 그림 6(a)에서의 밝은 부분에 해당된다. 그림 중앙에 점선으로 표시된 밝은 점은 여러 광점들의 상 가운데 한 점이며, 이 광점 상의 FWHM(Full Width at Half Maximum)은 약 2.7 μm 이다.

그림 7은 PZT를 사용하여 시료를 z축으로 5 μm 씩 이동시켰을 경우 나타나는 광점들의 상이다. 초점면(c)에서는 광섬유 광점의 상이 확연히 관찰되는 것을 알 수 있으나 초점에서 벗어나 z축으로 $\pm$ 방향으로 이동되었을 때의 상(a, b, d, e)에서는 광섬유 광점의 상이 뚜렷이 관찰되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한 광점 상들 사이에 시료의 에칭된 선들의 상이 검은선으로 보이며 이들 선상에서는 밝아야 할 광점 상들이 사진의 네모점선으로 표시된 부분처럼 흐리게 나타나는 것을 볼 수 있다. 이것은 초점을 시료의 표면에 맞춘 것과 에칭된 부분에서는 빛이 주로 난반사를 일으키기 때문이다.

FIG. 4. Specimen support connected with PZT.

FIG. 5. Standard grating as specimen.

FIG. 6. Image of standard grating using (a) white light and (b) laser beam.

FIG. 7. Images of standard grating along z-axis.

2. 배율 20배인 1차 대물렌즈에 의한 시료의 상

이번에는 광섬유 다발의 광점을 확대시키는 1차 대물렌즈를 배율이 20배인 대물렌즈로 교체하고 평행광 렌즈도 초점거리가 175 mm인 것으로 교체 사용하여 현미경 표준격자를 관찰하였다.

배율이 20배인 1차 대물렌즈를 사용하여 측정된 상에서의 광섬유 다발의 광점들의 간격이 $0.75 \mu\text{m}$ 로 대물렌즈의 배율이 63배인 경우 $4 \mu\text{m}$ 인 것보다 더욱 작아졌으며, 이로 인해서 단위 면적당 광점의 수가 많아짐으로 인해 보다 선명한 상을 얻을 수 있었다.

평행광 렌즈의 초점거리와 1차 대물렌즈의 경통 길이를 맞추기 위해 이 두 렌즈 사이에 초점거리 +175 mm의 렌즈를 사용하였기 때문에, 광점 간격의 비율이 정확히 대물렌즈 배율의 비율과 같지 않다.

그림 8(a)는 레이저의 출력을 12.6 mW로 하였을 때의 표준격자의 확대된 상이며, A-B 두 점 사이를 스캔하여 얻은 빛의 강도 분포를 나타낸 것이 그림 8(b)이다. 여기서 확대된 광섬유의 하나의 광점 상의 초점에서의 FWHM은 약 $0.670 \mu\text{m}$ 임을 알 수 있다.

광점 상의 초점에서의 FWHM을 구하기 위해서 먼저 표준시료 격자에서 실제 격자 사이 간격과 CCD 상에서 구한 pixel의 수를 기준으로 삼았다. 표준시료의 격자간격이 $10 \mu\text{m}$

FIG. 8. (a) Magnified image of standard grating. (b) Intensity distribution and FWHM of spot image.

이고 CCD에서 나타난 격자($10 \mu\text{m}$) 상의 간격이 88 CCD pixel에 해당되므로 실제 시료에서 $1 \mu\text{m}$ 는 CCD 상에서는 8.8 pixel에 해당된다. 따라서 12.6mW 인 경우 광점 상의 FWHM은 5.9 CCD pixel이므로 FWHM의 평균은 약 $0.670 \mu\text{m}$ 이다.

광섬유 다발 다초점 현미경의 분해능을 시험하기 위해서 앞서 사용한 현미경용 표준격자 시료(격자 간격: $10 \mu\text{m}$)보다 격자 간격이 작은 USAF 1951 +7, 3(격자 간격: $6.212 \mu\text{m}$)과 1951 +7, 6(격자 간격: $4.386 \mu\text{m}$)을 시료로 사용하여 상을 측정하였다. 이 때 사용된 1차 대물렌즈는 배율 20인 대물렌즈이며, 시료용 대물렌즈는 Olympus사의 NA 0.65, 작업거리 0.56 mm , 초점거리 2.2 mm 인 대물렌즈를 사용하였고, 레이저 빔을 평행으로 만드는 평행광 렌즈는 초점거리 175 mm 인 평면 볼록렌즈를 사용하였다.

본 실험에서는 Edmund Optics사의 DA005E를 USAF 1951 시료로 사용하였다. USAF 1951의 group은 0부터 +7까지, element는 1부터 6까지 있으며, 그 중에서 시료로 사용한 것은 1951 +7, 3과 1951 +7, 6이다. 이때 Laser의 출력은 1.6 mW로 설정하였다.

그림 9(a)는 레이저 출력 1.6 mW로 USAF 1951의 +7, 3을 관찰한 상이며 세 개의 가로줄 무늬와 세 개의 세로줄 무늬가 보인다. 그림 9(b)는 그림 9(a)에서 세 개의 세로줄 무늬를 가로지르는 A-B 두 점 사이를 스캔하여 얻은 빛의 강도 분포와 FWHM을 나타낸 그래프이다. USAF 1951의 +7, 3은 1 mm 당 161개의 선을 가지므로 하나의 선폭 값은 $3.106 \mu\text{m}$ 이며 격자 간격은 $6.212 \mu\text{m}$ 이다. 그림 9(b)의 선 스펙트럼에서

FIG. 9. (a) Image of USAF 1951 +7, 3. (b) Intensity distribution and FWHM of USAF 1951 +7, 3 line.

FIG. 10. (a) Image of USAF 1951 +7, 6. (b) Intensity distribution and FWHM of USAF 1951 +7, 6 line.

흑백 줄무늬의 줄 하나의 선폭의 FWHM은 28개의 CCD pixel을 점유하고 있으므로 CCD에서 10 μm 의 크기는 88

CCD pixel에 해당되고 FWHM의 평균은 약 3.182 μm 이다. 이것은 위에서 주어진 격자 선폭의 크기인 3.106 μm 와 잘 일치함을 보여준다. 그리고 그림 9(b) 그래프에서 세 개의 피크는 USAF 1951의 +7, 3시료의 세 개의 밝은 줄무늬를 나타낸 것이다.

마찬가지로, 그림 10(a)는 레이저 출력 1.6 mW로 USAF 1951의 +7, 6을 관찰한 상이며 여기서도 세 개의 가로줄 무늬와 세 개의 세로줄 무늬가 희미하게 보인다. 그림 10(b)는 그림 10(a)에서 세 개의 세로줄 무늬를 가로지르는 A-B 두 점 사이를 스캔하여 얻은 빛의 강도 분포와 FWHM을 나타낸 그래프이다. USAF 1951의 +7, 6은 1 mm당 228개의 선을 가지므로 하나의 선폭 값은 2.193 μm 이며 격자 간격은 4.386 μm 이다. 그림 10(b)의 선 스펙트럼에서 흑백 줄무늬의 줄 하나의 선폭의 FWHM은 18개의 CCD pixel을 점유하고 있으므로 FWHM의 평균은 약 2.045 μm 이다. 이것 또한 위에서 주어진 격자 선폭의 크기인 2.193 μm 와 잘 일치함을 보여준다. 그리고 그림 10(b) 그래프에서 세 개의 피크는 USAF 1951의 +7, 6시료의 세 개의 밝은 줄무늬를 나타낸 것이다.

IV. 결 론

본 연구에서 구성한 광섬유 다발 다초점 현미경은 크게 레이저광 집속부, 광점 확대부, 시료관측부, 그리고 영상기록부 등의 4개의 주요 부분으로 이루어져 있다. 이것은 MMM으로 알려진 다초점 다광자 공초점 현미경의 주요 핵심부분인 미세렌즈 배열판을 광섬유 다발로 대체한 간단한 형태의 다초점 현미경이다.

광섬유 다발 다초점 현미경의 성능 및 특성을 분석하기 위하여 표준격자, USAF 1951 +7, 3, 그리고 USAF 1951 +7, 6 등 세 종류의 시료를 사용하였다.

장치 설계에서 투과 축이 서로 수직인 두 개의 편광판과 편광 빔 분리기를 사용하여 시료에서 반사된 빛의 편광 상태가 바뀐 것만을 검출함으로써 심한 노이즈를 제거한 뚜렷한 상을 얻을 수 있었다.

표준격자 시료의 상(image)을 광점 상들로부터 얻을 수 있었으며, 1차 대물렌즈의 배율에 따른 시스템의 특성을 조사하였다. 배율 63배와 20배인 1차 대물렌즈를 사용한 경우 광점 상의 FWHM은 각각 약 2.7 μm 와 0.682 μm 이고, 광점들 사이의 간격은 각각 약 4 μm 와 약 0.75 μm 로 측정되었다. 이것은 배율이 작은 1차 대물렌즈를 사용한 경우에 광점 상 하나하나의 크기는 작으나 광점 상들 사이 간격이 작아지며 이는 광점 상의 분포가 조밀하여 보다 선명한 시료의 상을 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 그렇다고 배율을 너무 작게하면 시료면 위에서 광점 상들이 서로 중첩되어 뚜렷한 상을 얻을 수 없으므로 적절한 배율의 1차 대물렌즈를 잘 선택하여야만 한다.

레이저의 출력에 따른 광점 상의 FWHM은 12.6 mW에서 약 0.670 μm , 1.6 mW에서 약 0.682 μm 로 나타나 출력에 따른 광점 상의 크기에는 별 차이가 없음을 알 수 있었으며,

이는 이론상의 분해능인 $0.458 \mu\text{m}$ 에 비해 대략 1.5배의 분해능에 해당되는 크기이다. 또한 측면 강도 분포를 비교해 봄으로써 출력이 큰 경우 명암대비가 큰 뚜렷한 상을 맺는다는 것을 확인할 수 있었다.

광섬유 다발 다초점 현미경의 분해능을 시험하기 위해서 표준격자 시료보다 격자 간격이 작은 USAF 1951을 시료로 사용하여 상을 측정하였다. laser의 출력은 1.6 mW로 설정하고 1차 대물렌즈는 배율 20배인 렌즈를 사용한 경우 USAF 1951 +7, 3과 USAF 1951 +7, 6의 각각의 측정된 선(line) 상(image)의 FWHM은 각각 약 $3.182 \mu\text{m}$ 와 약 $2.045 \mu\text{m}$ 이며, 이들 시료의 원래 주어진 선폭은 각각 $3.106 \mu\text{m}$ 와 $2.193 \mu\text{m}$ 이다. 따라서 측정값과 원래 주어진 값이 잘 일치한다고 볼 수 있다.

이 시스템은 1개의 광섬유 다발을 사용함으로써 시스템을 간소화시켰으며, 마이크론 이하의 분해능을 가지며, 광섬유의 개수에 해당하는 1600개의 2차원 상을 동시에 얻을 수 있다. 따라서 이 시스템을 이용하면 일반적인 공초점 현미경에서 한 점씩 상을 얻는 다른 방법에 비하여 매우 신속하게 상을 얻을 수 있다는 새로운 방법을 제시하였다고 할 수 있다. 또 비접촉 방법으로 측정이 이루어지므로 살아있는 생물체와 같은 시료 관측에 적합하지만, 그러나 간소화된 본 시스템으로는 아직 공초점 현미경의 특성인 3차원 상을 얻을 수 없다는 문제점이 있다.

하지만 z축 거리를 조절함으로써 z축 변화에 따른 상의 변화를 관찰 할 수 있었다. 만일 이 시스템을 기반으로 광섬유 다발의 광섬유들의 배열이 같은 두 개의 광섬유 다발을 일렬로 미세하게 정렬시킬 수 있다면, 공초점 현미경의 특성인 물체와 상의 1대 1 대응점을 만들 수 있으며, 시료를 z축으로 변화시키면서 상을 얻어 3차원 그래픽화하면 3차원 상을 신속하게 얻을 수 있는 광섬유 다발 공초점 현미경 개발이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 인천대학교 2007년도 자체연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

1. G. Q. Xiao, T. R. Corle, and G. S. Kino, "Real-time confocal scanning optical microscope," *Appl. Phys. Lett.* **53**, 716-718 (1988).
2. G. S. Kino, "Intermediate optics in Nipkow disk microscopes," in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd ed., J. B. Pawley, ed. (Plenum Press, New York, USA, 1995), pp. 155-165.
3. R. Y. Tsien and B. J. Bacskaï, "Video-rate confocal microscopy," in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd ed., J. B. Pawley, ed. (Plenum Press, New York, USA, 1995), pp. 459-478.
4. V. Iyer, B. E. Losavio, and P. Saggau, "Compensation of spatial and temporal dispersion for acoustic-optic multiphoton laser-scanning microscopy," *J. Biom. Opt.* **8**, 460-471 (2003).
5. M. Müller, *Introduction to Confocal Fluorescence Microscopy* (SPIE Press, 2006), pp. 36.
6. D. B. Murphy, *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging* (WILEY-LISS, 2001), pp. 229-230.
7. E. S. Shin and K. B. Nahm, "Fabrication and studies on the properties of a spinning - disk confocal microscope," *Hankook Kwanghak Hoeji (Korean J. Opt. Photon.)* **8**, 225-229 (2007).
8. A. Egner, V. Andresen, and S. W. Hell, "Comparison of the axial resolution of practical Nipkow-disk confocal fluorescence microscopy with that of multifocal multiphoton microscopy: theory and experiment," *J. Microsc.* **206**, 24-32 (2002).
9. J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3rd ed. (Springer Science & Business Media, New York, USA, 2006), pp. 550-559.
10. D. N. Fittinghoff, C. B. Schaffer, E. Mazur, and J. A. Squier, "Time-decorrelated multi-focal micro-machining and trapping," *IEEE J. Select. Topics Quantum Electron.* **7**, 559-566 (2001).