

3차원 홀로그래픽 현미경의 원리와 응용

Principles and Applications of
Three-Dimensional Holographic Microscopy

김규현¹ · 신승우¹ · 박용근^{1,2} | Kyoohyun Kim¹ · Seungwoo Shin¹ · YongKeun Park^{1,2}

¹Department of Physics, Korea Advanced Institute of Science and Technology,
291, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 31414, Korea

²Tomocube Inc. F721 KAIST Munji Campus,
Munjiro 193, Yousung-gu, Daejeon 34051, Korea
E-mail: yk.park@kaist.ac.kr

1. 서론

17세기 안톤 반 레벤후크(Anton van Leeuwenhoek)가 광학 현미경을 만든 후, 수백 년 동안 광학 현미경은 생명과학, 의학, 공학 등 다양한 분야에 사용되어 왔다. 특히 광학 현미경은 마이크로 미터 크기의 작은 시편을 비파괴, 비침습 방식으로 관찰할 수 있다는 큰 장점이 있다.

일반 광학 현미경은 시편에서 빛의 흡수도를 영상화 하기 때문에 투명한 물체를 관찰하기 어렵다는 한계가 있다. 이로 인해 세포와 조직 같은 생체 시편이나 플라스틱이나 액정 같은 투명 시편들을 관찰하기가 어려웠다. 이 문제를 해결한 기술이 위상차 현미경(phase contrast microscopy)이다. 1950년대 Fritz Zernike는 일반 광학 현미경에 위상 필터를 추가하는 방식으로 빛의 간섭 현상을 이용하여, 시편을 지난 빛의 위상 정보를 밝기 정보로 변환하는 위상차 현미경 기술을 개발하여 노벨상을 수상하였다. 이 기술을 이용하면 간단한 장비만으로 투명한 시편의 윤곽을 쉽게 영상화 할 수 있어서, 현재에도 다양한 과학 기술 분야에서 폭넓게 사용되고 있다.

위상차 현미경이 추가 염색 과정 없이 투명한 시편을 관찰할 수 있게 해주었지만, 시편의 윤곽만 정성적으로 보여주는 점, 2차원 영상만 획득 가능한 한계가 있었다. 이 두 문제를 해결한 것은 정량 위상 현미경(quantitative phase microscopy) 기술이다.^{1,2} 2000년대 중반 들어 2차원 디지털 홀로그래피 기술을 이용하여 레이저 간섭 패턴을 측정함으로서 시편의 위상 지연 정보를 정량적으로 측정할 수 있었다. 따라서, 단순히 시편의 윤곽 정보

Author



김규현

2011 KAIST 물리학과 (학사)
2011–현재 KAIST 물리학과 석박통합과정



신승우

2014 KAIST 물리학과 (학사)
2014–현재 KAIST 물리학과 석박통합과정



박용근

2010 Harvard-MIT (박사)
2010–현재 KAIST 물리학과 조교수, 부교수
2015–현재 토모큐브 CTO

뿐만 아니라, 두께 정보 역시 측정할 수 있었다. 하지만 2차원 홀로그래피 방식으로는, 시편 내부가 균일 하다는 가정하에서만 두께 정보를 측정할 수 있다는 한계가 있었다. 이를 극복한 기술이 3차원 홀로그래피 기술이다. 본 총괄 논문에서는, 3차원 홀로그래피 현미경의 기본 원리를 소개하고, DMD(dynamic micromirror device)를 이용한 가장 발전된 형태의 3차원 홀로그래피 현미경 기술을 설명한다. 또한 3차원 홀로그래피 현미경 기술의 장점과 한계, 그리고 응용분야에 대해서 논한다.

2. 본론

2.1 3차원 홀로그래피 현미경의 원리

3차원 홀로그래피 현미경 또는 광회절 단층 촬영(optical diffraction tomography, ODT)의 기본 원리는 엑스선 전산화 단층 촬영(X-Ray CT)의 원리와 유사하다. X-Ray CT의 경우, 시편에 여러 각도로 X-Ray 빔을 조사하고, 촬영된 여러 장의 2차원 영상을 복원하여 3차원 흡수율 분포 영상을 얻게 된다.^{3,5}

X-Ray는 전자기파의 한 종류이고 X-Ray CT에 사용되는 지배방정식은 단일 파장 파동방정식인 헬름홀츠 방정식(Helmholtz equation)이기 때문에, X-ray CT 원리를 가시광선 영역에서도 그대로 적용할 수 있다. 차이점이라면 X-ray CT는 주로 생체 조직의 X-ray 흡수율 분포를 측정하는데 반해, ODT의 경우 시편의 3차원 굴절률을 획득하게 된다.

X-Ray는 파장이 시편의 크기에 비해 매우 짧기 때문에, X-Ray를 조사하여 측정한 2차원 영상을 단순 사영(projection)이라 가정하여, 역투영 복원 방식을 사용할 수 있다. 하지만 가시광선의 경우 파장이 시편의 크기와 비슷하여 시편에 의한 굴절 및 회절이 발생한다. 따라서 시편에 의한 빛의 굴절과 회절 등을 고려한 복원 알고리즘이 주로 사용된다.

광회절 단층 촬영은 1969년 E. Wolf에 의해 이론적으로 제안되었고,⁶ 70년대 후반 실험적으로 구현되었다.⁷ 2000년대 초반 CCD 카메라의 발전, 컴퓨터 계산 능력의 향상 등에 힘입어 세포 등 다양한 시편의 3차원 굴절률 분포를 별도의 형광 표지를 사용하지 않고 측정할 수 있는 기술로 발전되었다.⁸⁻¹¹

물리적인 관점에서 ODT 기술은 여러 입사각에 따른 시편에 의한 광 산란을 측정하여, 시편의 굴절률 분포를 3차원으로 재구성하는 것이다. 시편의 산란 정도가 상대적으로 적은 경우 근사를 통해 푸리에 회절 이론을 얻게 된다. 이에 따르면 특정 각도로 빛을 입사했을 때 시편에 의해 회절 된 광학장의 2차원 푸리에 스펙트럼(그림 1a)은 3차원 푸리에 공간상에서 구면으로 사영(mapping)될 수 있다(그림 1b). 다양한 각도로 시편에 빛을 입사시켜 광학장을 측정하고, 3차원 푸리에 공간 상에 사영하고, 이를 3차원 역 푸리에 변환하면 시편의 3차원 굴절률 분포를 얻게 된다(그림 1c).

2.2 DMD를 이용한 광회절 단층 촬영

기존 3차원 홀로그래피 기술에서는 입사각을 제어하기 위해 시편을 돌리거나, 회전 거울을 이용하는데, 이 방식들은

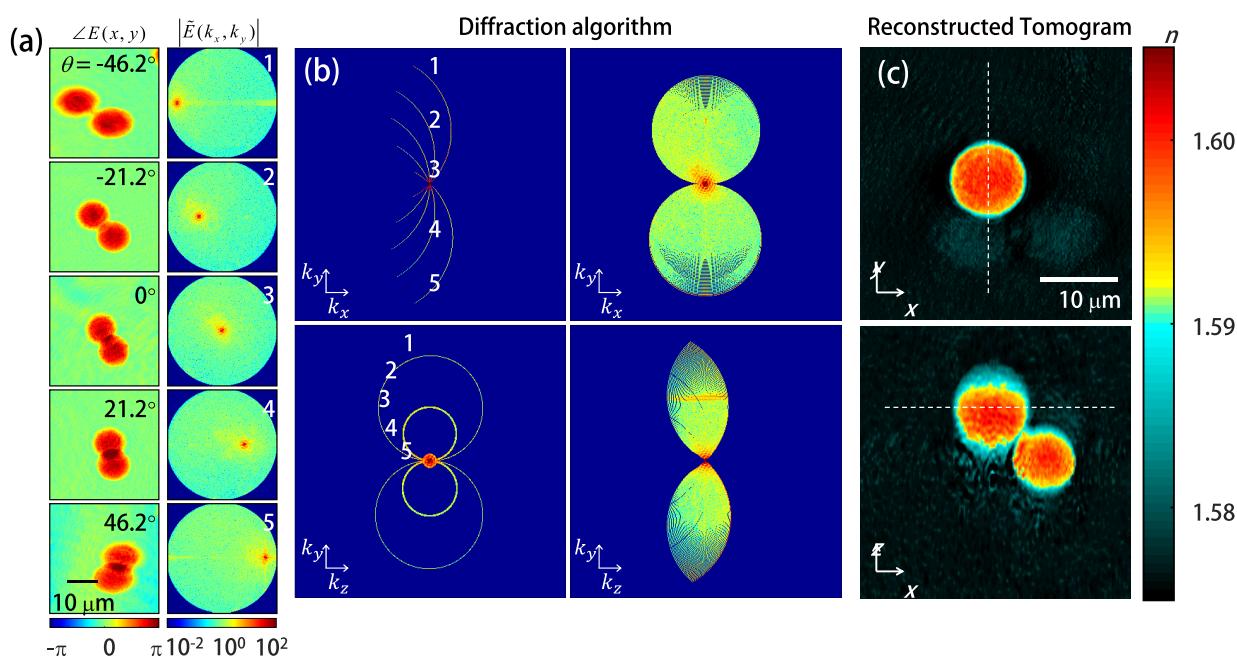


그림 1. (a) 두 polystyrene bead에 서로 다른 각도의 레이저 빔을 입사했을 때 광학장의 위상 지역 및 2차원 Fourier 스펙트럼, (b) Fourier 회절 이론에 의해 2차원 Fourier spectrum들을 3차원 Fourier 공간에 사영한 결과, (c) 복원한 3차원 굴절률 분포.

회전에 의한 측정 결함이 발생하며, 광학 시스템이 불안정해 미세한 보정이 필요하다는 한계가 있었다. 이 문제를 해결하기 위해 본 연구진은 디지털 미소거울장치(digital micromirror device, DMD)를 이용한 3차원 홀로그래피 현미경 기술을 개발하여,¹² 최근 상용화에 성공하였다.

DMD는 마이크로미터 크기의 수백만 개의 거울을 개별적으로 작동시켜, 반사광의 패턴을 빠르게 제어하는 장치이다. 각각의 미소 거울은 $\pm 12^\circ$ 로 기울어질 수 있고, 각 미소 거울의 각도는 반사되는 빛의 세기의 on/off 상태에 대응하게 된다. 또한 미소거울에서 반사된 빛의 세기를 다양하게 표현하기 위해 각 미소 거울을 동적으로 고속 제어하기도 한다.

본 연구실에서는 이러한 DMD의 특성을 활용하여, 안정된 3차원 홀로그래피 현미경 기술에 적용하였다. 핵심 기술의 원리는 회절 격자(diffraction grating)에 의해 레이저가 회절 되는 각도가 격자의 간격에 반비례하다는 점과 유사하다. DMD에 회절 격자 패턴을 넣어주면 입사광의 방향과 각도가 회절 격자 패턴의 방향과 간격에 의해 조절된다는 점을 이용하여, 시편에 다양한 각도로 레이저를 입사할 수 있다.

DMD에서 제어한 빛이 시편에 정확히 입사되고, 시편에서 회절된 파면이 기록될 수 있도록(그림 2)와 같이 광학계를 구성하였다. 2×2 단일모드 광섬유 커플러에서 갈라진 두 빔이 각각 시편 빔과 기준 빔이 되어 간섭계를 이루고, 시편 빔은 입사각 제어를 위해 DMD에 입사된다. DMD에서 제어된 빛은 2개의 렌즈를 거쳐 시편에 입사되게 된다. 시편을 투과한 빛은 렌즈들을 거쳐 카메라에 전달되고, 기준 파면과의 간섭으로 형성된 이미지가 카메라에 기록된다. 이렇게 기록된 간섭 이미지에서 디지털 홀로그래피 기술을 이용하면 시편을 통과한 파면만을 다시 복원할 수 있게 된다.¹³ DMD 화면을 연속적으로 제어하여 시편에 입사되는 빛의 각도를 바꾸고, 이에 대응하는 2차원 홀로그래피 정보들을 ODT 원리를 이용하여 시편의 3차원 굴절률 분포를 구할 수 있다.³

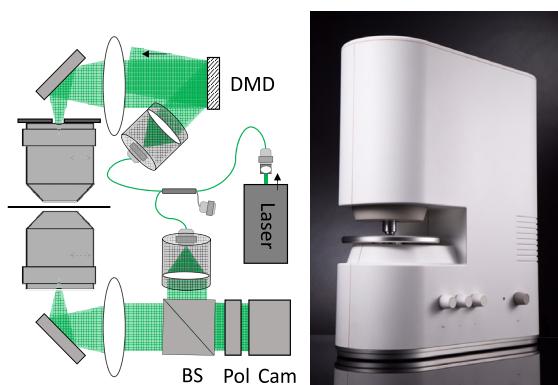


그림 2. DMD를 이용한 ODT 기술 구현을 위한 광학계 구성. 2×2 단일모드 광섬유 커플러를 통해 시편 및 기준 파면으로 레이저 빔이 갈라져서 Mach-Zehnder 간섭계를 구성. DMD를 이용한 3차원 홀로그래피 현미경의 상용화 모습.

거울을 기계적으로 회전시키는 기존 방식에 비해 DMD를 이용하는 방식은 진동이 크게 줄어들어 정밀한 측정이 가능하고, 광 경로 정밀 제어가 가능하며, 또한 거울 회전 방식에 비해 저렴하게 제작이 가능하다는 장점이 있다. DMD를 이용한 3차원 홀로그래피 기술은 구조적으로 단순하고, 역학적으로 움직이는 부분이 없다. 본 연구실에서는 개발한 기술의 이러한 장점을 활용하여, 시편의 3차원 굴절률을 정밀하고 안정적으로 측정할 수 있는 3차원 홀로그래피 현미경을 상용화하였다.¹⁴

3. 응용 분야

3.1 세포의 3차원 굴절률 분포 측정

3차원 홀로그래피 현미경을 이용하면 세포를 염색하지 않고 세포의 형광과 내부 세포소기관들을 관찰할 수 있다. 공초점 현미경(confocal microscopy)이나 다광자 현미경(multi-photon microscopy) 등 세포를 3차원 영상으로 관찰할 수 있는 기존 기술들은 세포를 염색해야 한다는 제약이 있었다. 형광 단백질, 유기 염료, 또는 양자 점(quantum dot)을 이용해서 세포를 염색하는 기존 기술들은 염색 과정 자체가 시간과 노력이 소요될 뿐만 아니라, 염색 과정 자체가 세포의 본래 생명 현상에 영향을 주는 문제가 발생할 수도 있다. 또한, 줄기세포나 면역세포 등 다시 체내로 주입이 필요한 응용분야의 경우 염색 과정 사용이 불가능하다는 한계도 있다. 이에 비해 세포가 본래 가지고 있던 광학 성질인 굴절률 자체를 측정하는 3차원 홀로그래피 기술은, 염색 과정이 필요 없기 때문에 위해서 언급한 문제들을 해결할 수 있다.

또한 굴절률 자체를 정량적으로 측정할 수 있다는 장점은 세포의 질량을 측정할 수 있게 해준다. 용액의 굴절률은 농도에 비례하기 때문에, 세포질의 굴절률은 세포내 단백질 등 구성성분의 농도에 비례하게 된다.¹⁵ 3차원 영상 정보에서 부피를 알 수 있고, 굴절률 값에서 농도를 측정 할 수 있기 때문에 질량을 계산할 수 있는 원리이다.

따라서 3차원 홀로그래피 현미경 측정을 통해 생명 시편의 부피, 질량, 단백질 농도 등을 정량적으로 측정할 수 있다.²

그림 3a는 말라리아에 감염된 인간 적혈구의 3차원 굴절률 분포 측정 영상이다. 인간 적혈구에 침입한 말라리아 기생충은 감염된 인간 적혈구의 구조적, 화학적 성질을 변화시키는데, 3차원 홀로그래피 측정을 통해 말라리아 기생충이 인간 적혈구 내부의 헤모글로빈(hemoglobin) 단백질을 물질 대사하고, 페생물로 만들어 내는 헤모조인(hemogzoin)과 액포(parasite vacuole) 등의 3차원 구조를 고해상도로 측정할 수 있다.¹⁶ 또한 3차원 굴절률 분포 측정을 통해 감염 단계에 따른 감염 적혈구와 기생충의 부피, 질량 변화 등을 정량적으로 추출 가능했다. 향후 말라리아 감염 여부 진단, 말라리아

치료제 개발 등에 활용될 것으로 기대된다.¹⁷ 이 밖에 바베시아, 혈액관련 유전병, 겸상적혈구 등 다양한 적혈구 관련 질병 연구에 응용되었다.¹⁸⁻²²

3차원 홀로그래피 기술은 적혈구뿐만 아니라 백혈구와 같이 더 복잡한 내부 구조를 가진 진핵 세포에도 적용될 수 있다.²³ 그림 3b-c는 최근 상용화된 제품(HT-1, TomoCube, Inc., Republic of Korea)으로 측정한 유핵 세포(eukaryotic cell)의 괴사(necrosis) 및 세포 사멸(apoptosis) 영상이다.¹⁴ 3차원 홀로그래피 현미경을 통해 세포의 괴사 및 사멸 과정을 별도의 형광 표지 없이 고속으로 측정할 수 있었다. 세포 사멸 및 괴사는 발생(development), 암세포 사멸, 약물 반응 등에 큰 연관이 있는 바, 실제 의료 및 생명 공학 연구 현장에서 다방면으로 활용될 수 있을 것이다.

3.2 유체 내 교질 입자의 3차원 운동 분석

교질(colloidal) 입자는 유체 내에서 분자들간의 상호 작용에 의해 복잡한 3차원 브라운 운동(Brownian motion)을 하게 된다. 교질 입자의 3차원 운동을 분석함으로써 교질 입자와 주변 유체의 점성을 측정할 수 있으며, 입자의 크기와 모양에 따른 3차원 운동 양상의 분석은 연성물질물리학(soft matter physics), 화학공학분야에서 활발하게 논의되고 있다.

기존 연구에서는 마이크로 미터 크기의 폴리스티렌 구슬(polystyrene bead)과 같이 모양과 크기가 잘 알려진 교질 입자의 3차원 운동 분석이 주로 이루어졌으나, 광축(axial) 방향으로의 해상도가 제한되었고, 구형이 아닌 복잡한 교질 입자의 3차원 운동의 경우 입자의 위치뿐만 아니라 방향 성분도 추가되므로 분석에 어려움이 있었다. 하지만 3차원 홀

로그래피 측정의 경우 입자의 모양과 광학적 특성에 상관 없이 3차원 굴절률 분포를 측정할 수 있으므로 교질 입자의 3차원 브라운 운동을 분석하는 데에 활용 가능하다.

DMD를 이용한 3차원 홀로그래피 현미경 기술을 통해 폴리스티렌 구슬의 3차원 굴절률 분포를 고속(1초당 100장)으로 측정하였으며, 폴리스티렌 구슬의 차원 움직임을 분석하여 주변 유체의 점성을 측정할 수 있었다(그림 4a-b).¹² 또한 석영 이량체(silica dimer)와 같이 모양이 복잡한 교질 입자의 3차원 운동을 실시간으로 측정하여 위치 및 방향 변화를 분석할 수 있었다.²⁴

그림 4c는 교질 입자를 홀로그래피 광집계(holographic optical tweezers)로 포획하여 복잡한 3차원 운동을 인가하고, 이 때의 운동 양상 및 구조 변화를 3차원 홀로그래피 현미경으로 분석한 결과이다.²⁵ 여러 개의 교질 입자가 광축 방향으로 정렬한 경우에도 교질 입자의 3차원 위치와 화학 조성을 정밀하게 측정할 수 있었다. 홀로그래피 광집계와 광회절 단층 촬영 기술을 결합하여 다양한 모양의 교질 입자의 복잡한 3차원 브라운 운동을 분석할 수 있으며, 생체 시편과 교질 입자의 상호 작용을 분석하여 생체 시편이 가하는 힘을 측정하는 등의 미세유변학(microrheology) 분야에 활용될 수 있을 것이라 기대된다.

3.3 광학 플라스틱 렌즈의 굴절률 측정

핸드폰 등에 내장되어 있는 카메라 렌즈는 광학 고분자(optical polymer)를 사출 성형하여 제작한다. 렌즈를 사출 성형할 때 사용하는 금형이 매우 정밀하게 제조되었다고 하더라도, 플라스틱을 용융하고 금형 내에서 고체화하는 동안 금형 온도의 비균일성, 플라스틱 원료의 순도 등에 따라 제조

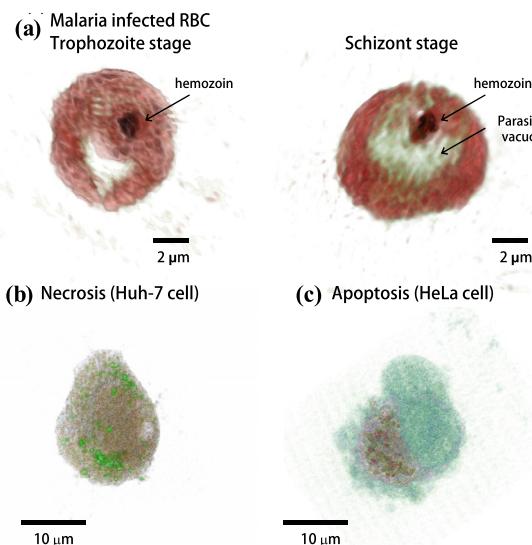


그림 3. (a) 말라리아에 감염된 인간 적혈구, (b) 간세포 (Huh-7) 세포 괴사 및 (c) HeLa 세포 사멸 3차원 굴절률 분포.

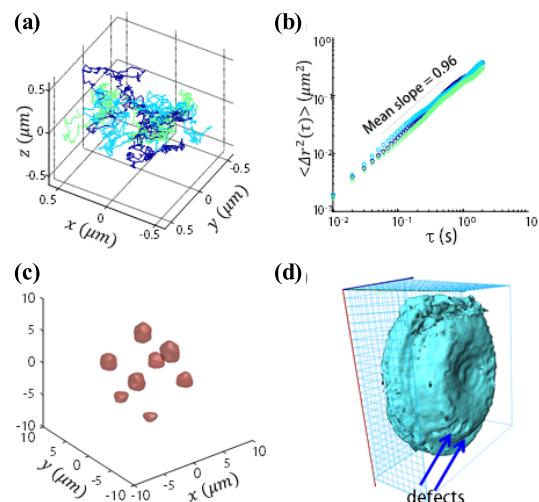


그림 4. (a) 광회절 단층 촬영한 polystyrene bead의 3차원 Brownian 운동 궤적. (b) polystyrene bead의 3차원 Brownian 운동 궤적의 Mean square displacement. (c) 홀로그래피 광집계로 포획한 silica bead의 3차원 굴절률 분포. (d) 광학 고분자로 제조된 플라스틱 렌즈의 3차원 굴절률 영상.

렌즈의 3차원 굴절률 분포가 고르지 못하거나 형태가 달라져 렌즈의 수차가 발생할 수 있으며, 이에 따라 렌즈의 성능이 저하될 수 있다.

기존에는 핸드폰 렌즈의 품질 검사를 위해 렌즈에 의해 맷 힌 이미지를 분석하거나, 렌즈 표면의 영상을 측정하였다. 하지만 이러한 방법들은 렌즈의 정밀한 품질 검사에는 어려움이 있었으며 나아가 렌즈의 불량 원인을 찾아 제조 환경을 개선하는 데에 제한이 있었다.

3차원 홀로그래피 현미경을 이용해 플라스틱 렌즈 전체의 3차원 굴절률 분포를 측정함으로써 렌즈의 표면뿐만 아니라 내부의 물질 분포를 측정할 수 있었으며, 렌즈에 발생한 흠집, 불량의 3차원 위치를 특정할 수 있었다(그림 4d).²⁶

4. 결론

본 총설에서는 3차원 홀로그래피 현미경 기술과 관련된 현미경의 간단한 역사에서 시작하여, 3차원 홀로그래피 현미경의 원리, 기술의 구현 방법을 설명하였다. 또한, 3차원 홀로그래피 현미경을 이용한 다양한 시편의 측정 예와 앞으로의 응용 가능성에 대해서 소개하였다.

3차원 홀로그래피 기술은 40여 년 전에 최초 시작되었으나 오랜 기간 동안 제한적으로 활용되고 있었다. 앞서 소개한 것처럼 2000년대에 들어서야 본격적으로 기술 구현 수준이 높아지고, 다양한 응용분야에 적용되기 시작하면서 다시 활발하게 연구되고 있다.

기술적인 부분에서도 최근 다양한 새로운 광학 기술이 개발되어 응용의 폭을 넓히고 있다. 다양한 파장에서 3차원 영상을 측정하는 초분광(hyperspectral) 기술을 굴절률의 파장 상관도를 통해 제한적인 수준의 문자 정보 획득이 가능해 졌으며,^{27,28} graphics processing unit(GPU)를 이용해서 ODT 계산을 신속하게 처리하는 기술도 실용화에 큰 도움을 주었다.²⁴

시편을 염색하지 않고도, 마이크로 미터 크기의 시편을 형상과 내부 정보를 정량적으로 측정 가능한 3차원 홀로그래피 현미경 기술은 앞으로도 다양한 새로운 응용 분야로 확장될 수 있을 것이다. 또한, 최근 들어 상용화가 이루어지면서 더 많은 연구 분야에 폭넓게 활용될 수 있을 것이라 기대한다.

참고문헌

- G. Popescu, *Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues*, McGraw-Hill Professional, New York, 2011.
- K. Lee, K. Kim, J. Jung, J. Heo, S. Cho, S. Lee, G. Chang, Y. Jo, H. Park, and Y. Park, *Sensors*, **13**, 4170 (2013).
- K. Kim, J. Yoon, S. Shin, S. Lee, S.-A. Yang, and Y. Park, *arXiv preprint arXiv:1603.00592* (2016).
- T. Kim, R. Zhou, L. L. Goddard, and G. Popescu, *Laser Photon. Rev.*, **10**, 13 (2016).
- J. Lim, K. Lee, K. H. Jin, S. Shin, S. Lee, Y. Park, and J. C. Ye, *Opt. Express*, **23**, 16933 (2015).
- E. Wolf, *Opt. Commun.*, **1**, 153 (1969).
- A. F. Fercher, H. Bartelt, H. Becker, and E. Wiltschko, *Applied Opt.*, **18**, 2427 (1979).
- V. Lauer, *J. Microsc.*, **205**, 165 (2002).
- T. Kim, R. Zhou, M. Mir, S. D. Babacan, P. S. Carney, L. L. Goddard, and G. Popescu, *Nat. Photonics*, **8**, 256 (2014).
- Y. Cotte, F. Toy, P. Jourdain, N. Pavillon, D. Boss, P. Magistretti, P. Marquet, and C. Depeursinge, *Nat. Photonics*, **7**, 113 (2013).
- K. Kim, Z. Yaqoob, K. Lee, J. W. Kang, Y. Choi, P. Hosseini, P. T. C. So, and Y. Park, *Opt. Lett.*, **39**, 6935 (2014).
- S. Shin, K. Kim, J. Yoon, and Y. Park, *Opt. Lett.*, **40**, 5407 (2015).
- M. Takeda, H. Ina, and S. Kobayashi, *J. Opt. Soc. Am. A*, **72**, 156 (1982).
- S. Shin, K. Kim, T. Kim, J. Yoon, K. Hong, J. Park, and Y. Park, *Proc. SPIE*, **9718**, 971814 (2016).
- G. Popescu, Y. Park, N. Lue, C. Best-Popescu, L. Deflores, R. R. Dasari, M. S. Feld, and K. Badizadegan, *Am. J. Physiol. Cell Ph.*, **295**, C538 (2008).
- K. Kim, H. Yoon, M. Diez-Silva, M. Dao, R. R. Dasari, and Y. Park, *J. Biomed. Opt.*, **19**, 011005 (2014).
- S. Cho, S. Kim, Y. Kim, and Y. Park, *Trends Biotechnol.*, **30**, 71 (2011).
- H. Park, T. Ahn, K. Kim, S. Lee, S. Y. Kook, D. Lee, I. B. Suh, S. Na, and Y. Park, *J. Biomed. Opt.*, **20**, 111208 (2015).
- H. Park, S. H. Hong, K. Kim, S. H. Cho, W. J. Lee, Y. Kim, S. E. Lee, and Y. Park, *Sci. Rep.*, **5**, 10827 (2015).
- H. Park, M. Ji, S. Lee, K. Kim, Y.-H. Sohn, S. Jang, and Y. Park, *arXiv preprint arXiv:1506.05259* (2015).
- Y. Kim, H. Shim, K. Kim, H. Park, J. H. Heo, J. Yoon, C. Choi, S. Jang, and Y. Park, *Opt. Express*, **22**, 10398 (2014).
- Y. Kim, H. Shim, K. Kim, H. Park, S. Jang, and Y. Park, *Sci. Rep.*, **4**, 6659 (2014).
- J. Yoon, K. Kim, H. Park, C. Choi, S. Jang, and Y. Park, *Biomedical Opt. Express*, **6**, 3865 (2015).
- K. Kim, K. S. Kim, H. Park, J. C. Ye, and Y. Park, *Opt. Express*, **21**, 32269 (2013).
- K. Kim, J. Yoon, and Y. Park, *Optica*, **2**, 343 (2015).
- K. Kim, J. Yoon, and Y. Park, *Opt. Lett.*, **41**, 934 (2016).
- J. Jung, K. Kim, J. Yoon, and Y. Park, *Opt. Express*, **24**, 2006 (2016).
- J. Jung, K. Kim, H. Yu, K. Lee, S. Lee, S. Nahm, H. Park, and Y. Park, *Appl. Opt.*, **53**, G111 (2014)