살아있는 생체 내부 깊은 곳을 볼 수 있는 고해상도 광학 현미경 연구

DOI: 10.3938/PhiT.26.009

최 원 식

Optical Imaging Deep within Biological Tissues

Wonshik CHOI

In the life sciences and biomedicine, optical imaging is extensively used to examine specimens and make diagnoses, as it allows for non-invasive investigations of living specimens and provides high spatial resolution. However, its imaging depth has remained extremely shallow because of multiple elastic light scattering events that irregularly change the propagation direction of the light waves carrying information about the object. In this Article, I briefly discuss the physical background on the effect of multiple light scattering on optical imaging. Recent studies, including my own group's work aiming at improving the imaging depth within the scattering medium, are introduced, and the future perspective for super-depth optical imaging is discussed.

들어가는 글

‘보는 것이 믿는 것이다’라는 격언이 말해주듯이 현상을 시각화하는 것은 그 현상을 이해하는 데 매우 중요한 역할을 한다. 이는 질병의 진단과 치료에 있어서도 마찬가지인데, 그 예로 초음파 이미징, CT, MRI 등의 이미징 기술들이 의료 시술 전반에 끼친 영향을 들 수 있다. 이들 기술들 덕분에 병변의 위치와 상태를 정확하게 파악할 수 있고, 의료 시술의 정밀도를 높일 수 있었다. 하지만 이 기술들은 분해능이 낮아 주로 질병이 어느 정도 진행되어 병변들의 크기가 커졌을 경우에만 시

Fig. 1. Images of various organs in mouse taken by two-photon microscope (Courtesy of Dr. Taejun Wang and Prof. Ki Hean Kim in POSTECH).

각화할 수 있다는 단점이 있다. 질병을 보다 더 조기에 발견하기 위해서는 높은 해상도의 이미징 기술이 필요한데, 빛을 이용한 광학 현미경이 그러한 역할을 해 줄 수 있다. 광학 현미경은 인체에 해를 주지 않으면서도 1 μm 정도의 분해능을 가지기 때문에 살아있는 생체의 세포 내부까지 볼 수 있다는 장점이 있다(그림 1). 덕분에 생명현상을 이해하는 생물학 연구에서 광범위하게 사용되고 있고, 최근에는 이를 질병 진단에 활용하는 연구가 활발히 진행 중에 있다.

이러한 장점을 가진 광학 현미경이 의료 현장에서 유용하게 사용되기 위해서는 반드시 해결해야 할 문제가 있는데, 그것은 생체 표면에서 0.1 ~ 0.2 mm 깊이까지만 자세히 볼 수 있고, 생체 내 깊은 곳에 있는 조직을 관찰하기 어렵다는 점이다. 생체조직은 광학적으로 불투명해 빛과 같은 파동이 지나갈 때 여러 번 방향이 꺾이는 다중 산란(multiple light scattering)을 일으킨다. 이해를 돕기 위해 안개 낀 날에 촬영한 사진을 보자(그림 2(a)). 사진을 찍는 관찰자와 가까운 곳에 있는 물체는 잘 보이지만, 멀리 있는 물체들은 안개에 가려서 보이지 않는다. 이는 멀리 있는 물체에서 반사되어 카메라로 들어오는 빛이 안개 때문에 다중산란을 겪어 원래의 이미지 정보가 왜곡되기 때문이다. 생체조직도 안개와 비슷한 역할을 하는데, 이

저자약력

최원식 교수는 2004년 서울대학교 물리학과에서 이학박사 학위를 취득하였고, MIT Spectroscopy Lab에서 박사후 연수를 마친 후 2009년부터 고려대학교 물리학과 교수로 재직 중이다. 2016년 7월부터는 IBS 분자 분광학 및 동력학 연구단의 부연구단장직을 수행 중이다. (wonshik@korea.ac.kr)

Fig. 2. The effect of multiple light scattering in biological tissues. (a) Photograph taken in a foggy day. (b) Light propagation within biological tissues. (c) Scattering mean free path (l_s) and transport mean free path (l_t) at various organs.

는 생체조직이 매우 복잡한 구조로 이루어져 있기 때문이다(그림 2(b)). 입사하는 빛이 생체조직에 들어가면 방향이 여러 번 꺾이게 되어 원래 입사했던 방향과는 전혀 다른 방향으로 진행하게 된다. 이 때문에 의도했던 초점에 제대로 집속이 되지 못하고, 따라서 광학 현미경의 상이 제대로 맺히지 못해 이미지가 획득이 어려워진다.

그렇다면 생체조직은 빛의 전파를 얼마나 왜곡시킬까? 이는 평균자유거리(scattering mean free path; l_s)로 이해할 수 있는데, 평균자유거리는 매질 속을 전파하는 빛이 한 번 산란을 겪은 뒤 그 다음 산란을 겪을 때까지 평균적으로 진행하는 거리를 의미한다(그림 2(b)). 생체조직의 종류에 따라 다르지만 평균자유거리는 대체로 $100 \mu\text{m}$ 정도인데(그림 2(c)), 빛은 이 거리를 진행할 때마다 이미지 정보를 급격히 잃어버린다. 생체조직 내부에서의 빛의 전파를 설명하는 또 다른 물리량으로 평균전달거리(transport mean free path: l_t)가 있는데, 이는 빛이 원래의 전파 방향을 완전히 잃어버릴 때까지의 평균 진행 거리를 의미한다. 생체조직 내부에서는 빛이 산란을 겪을 때 꺾이는 각이 크지 않기 때문에 여러 번의 산란을 겪어야 빛의 전파 방향이 충분히 크게 바뀐다. 대략 10번 정도의 산란을 겪어야 빛의 방향이 충분히 바뀌기 때문에 평균전달거리는 평균자유거리보다 10배 정도 길다(그림 2(c)). 빛이 원래 진행하던 방향을 잃어버리면 빛 에너지가 의도했던 방향으로 더 이상 전달되지 못한다. 따라서 평균전달거리를 지날 때마다 빛 에너지의 전달 효율이 급격히 떨어지고, 이는 빛을 이용한 치료와 센싱에 큰 제한을 주게 된다.

기존 연구 동향

앞서 설명한 생체조직에서의 빛의 다중산란 때문에 광학 현

Fig. 3. Imaging depth versus spatial resolution for various imaging modalities. STED/PALM/STORM: super-resolution microscopy, Confocal: confocal microscopy, SHG: second harmonic generation microscopy, AO: adaptive optics microscopy, OCT/OCM: optical coherence tomography/microscopy, 2P/MP: two-photon/multi-photon microscopy, PAT: photo-acoustic tomography.

미경의 분해능은 저하될 수밖에 없다. 이는 다양한 현미경 기술들의 이미징 가능 깊이와 해상도 사이의 상관관계 그래프(그림 3)에서 명확하게 확인할 수 있는데, 특히 분해능이 좋은 방법일수록 이미징 가능 깊이가 얕다는 것을 확인할 수 있다. 광학 회절한계에 해당하는 $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$ 의 분해능을 가지는 이미징 기술들의 경우 이미징 가능한 깊이가 수백 μm 인 것은 앞서 설명한 생체조직의 평균자유거리 때문인 것으로 이해할 수 있다. 반면에 광-음향 현미경과 같이 빛 에너지를 전달한 후 발생하는 초음파를 이용하는 기술들의 경우 이미징 가능 깊이는 상대적으로 깊지만 대신 그 해상도가 회절한계에는 훨씬 못 미친다.^[1] 이 기술의 경우 이미징 가능 깊이는 빛에너지의 전달에 의해 결정되기 때문에 평균전달거리에 해당하는 수 mm 정도로 결정된다.

광학 회절한계의 분해능을 가지는 고해상도 현미경의 경우 이미징 가능 깊이를 증가시키기 위해 흔히 사용되어온 방식은 파장이 긴 빛을 이용하는 것인데, 이는 파장이 길수록 평균자유거리가 길어지기 때문이다. 그 대표적인 예가 이광자/다광자 현미경이다.^[2,3] 예를 들면 파장이 $0.8 \mu\text{m}$ 인 빛보다 $1.3 \mu\text{m}$ 인 빛의 평균자유거리가 약 두 배 정도 더 길어 이미징 가능 깊이도 두 배 증가한다. 그러나 이 방식은 길어진 파장 때문에 분해능이 저하된다는 단점이 있고, 또 산란이 줄어들 뿐 아니라 대상 물체에서의 반사되는 신호도 같이 줄어든다는 단점이 있다. 보다 능동적으로 생체조직에 의한 이미지의 왜곡을 제거

REFERENCES

- [1] L. V. Wang, *et al.*, *Science* **335**, 1458 (2012).
- [2] W. Denk, *et al.*, *Science* **248**, 74 (1990).
- [3] N. G. Horton, *et al.*, *Nature Photonics* **7**, 205 (2013).

Fig. 4. Benefit of the time-resolved detection. (a) Types of scattered waves. S: single-scattered wave, which is scattered only by the target object. M and M': multiple-scattered waves whose time of flight is the same as and different from single-scattered wave, respectively. (b) Intensity of the scattered waves as a function of travel distance (or flight time). S and M exist at the same travel distance while M' is distributed over the other distances.

하려는 노력으로 적응광학이라는 방식이 많이 사용되어 왔는데, 이는 입사하는 빛의 공간적인 패턴을 조절하여 생체조직에 의한 빛의 왜곡시키는 것을 보정하는 방식이다.^[4,5] 하지만 이러한 기술들의 효과는 상대적으로 미미해서 회절한계를 유지할 수 있는 이미징 가능 깊이는 여전히 평균자유거리의 몇 배 정도에 머물러 있다. 생체조직 내부에서 발생하는 암과 같은 주요 병변을 현재 기술들보다 이른 시점에 진단을 위해서는 고해상도이면서 동시에 이미징 가능 깊이가 수 mm에 이르는 초고심도 이미징(super-depth imaging) 기술(그림 3)의 개발이 필수적인데, 아직껏 이러한 기술은 개발되지 못하였다. 아래에 기술하겠지만, 저자의 연구팀은 최근에 초고심도 이미징에 가장 근접한 형태의 현미경을 개발하였고, 이 기술을 더욱 발전시키려는 노력을 경주하고 있다.

초고심도 이미징으로 가는 길 I: 시분해 이미징

그림 4(a)와 같이 다중산란을 일으키는 산란매질 내부에 관찰 대상(target object)이 있는 경우를 생각해 보자. 이 샘플에 빛을 보내면 되돌아 나오는 빛은 크게 세 가지로 나뉘어진다. 그 중 하나는 관찰 대상에서만 반사되고 산란매질을 통과하는 동안에는 전혀 산란을 겪지 않는 빛인데, 단 한 번만 반사되었다고 해서 이 빛을 단일산란파(single-scattered wave: S)라고 한다. 단일산란파는 산란매질에서는 산란을 겪지 않기 때문에 마치 산란매질이 없었을 때 이미징을 하는 것과 같다. 따라서 이 단일산란파가 바로 물체의 정보를 가지고 있다고 할 수 있다. 이와는 달리 산란매질에서 여러 번 반사를 겪는 빛을 다중산란파(multiple-scattered wave)라고 하는데, 이 다중산란파는 크게 단일산란파와 진행거리가 같은 빛(M)과 그렇지 않은 빛(M')으로 나눌 수 있다. 이러한 다중산란파는 물체의 정보가 아예 없거나 물체에서 반사가 되었다 하더라도 이미 왜곡된

정보를 가지고 있다. 따라서 고해상도 이미징을 한다는 것은 어떻게 S파를 M과 M'파로부터 분리해 낼 수 있느냐의 문제이다.

본 연구팀에서는 단일산란파가 가지는 고유한 성질을 이용하여, 다중산란파를 배제시키고, 단일산란파만을 모을 수 있는 CASS 현미경(단일 산란 집단 추적 현미경, Collective accumulation of single-scattering microscope)을 개발하였다.^[6] CASS 현미경은 복잡한 산란 신호로부터 대상 물체에서 반사된 단일 산란파를 선택적으로 추출해 이미지 정보를 얻는다. 요컨대 안개 속 물방울에 산란된 빛만 골라서 제거한 뒤, 물체에서 산란된 빛만 남겨 짙은 안개 속에서도 물체를 볼 수 있는 것과 같은 원리다. 단일산란파가 가지는 두 가지 고유한 성질은 다음과 같다.

단일산란파의 첫 번째 성질은 반사된 빛이 카메라에서 측정되는 시간이 대상 물체의 깊이에 의해 결정된다는 것이다. 즉 대상 물체의 깊이가 깊어질수록 빛이 물체에 도달했다가 되돌아 나오는 거리가 증가하고, 따라서 전파 시간이 증가한다. 반면, 다중 산란파는 임의의 방향으로 산란되며, 다양한 경로를 거쳐 임의의 시간에 카메라에 도달한다. 따라서 관찰 대상의 깊이를 고려해 특정 시점에 도달한 빛만을 추출하면, 단일산란 성분만 남기고 다중산란 성분은 제거할 수 있다. 이러한 방법을 '시분해 측정'이라고 한다. 그림 4(b)는 되돌아 나오는 빛의 진행시간, 혹은 진행거리에 따라 그 세기가 어떻게 바뀌는지를 측정한 예시이다. 여기서 대상 깊이(target depth)라고 표시한 위치가 물체가 존재하는 깊이이다. 이 거리에 해당하는 신호만 선택을 하면 단일산란파와 전파시간이 다른 대부분의 다중산란파(M')는 제거할 수 있다. 이러한 시분해 이미징은 광단층 이미징 방식 등에서 폭넓게 이용되어 왔다.^[7,8] 그러나 단일 산란파와 같은 시간에 도달하는 다중산란파(M)가 여전히 존재해, 시분해 측정만으로는 이미징 가능 깊이를 충분히 늘릴 수 없다. 그렇다면 어떻게 M을 제거할 것인가?

초고심도 이미징으로 가는 길 II: 운동량 보존 법칙

단일산란파의 두 번째 성질은 운동량 보존법칙인데, 이를 이용하면 M을 제거할 수 있다. 쉬운 설명을 위해서 그림 5(a)와 같이 주기적인 구조를 가지는 대상 물체를 고려해 보자. (일반

REFERENCES

- [4] M. J. Booth, *Light: Science & Applications* 3, e165 (2014).
- [5] K. Wang, *et al.*, *Nature Methods* 11, 625 (2014).
- [6] S. Kang, *et al.*, *Nature Photonics* 9, 253 (2015).
- [7] D. Huang, *et al.*, *Science* 254, 1178 (1991).
- [8] D. C. Adler, *et al.*, *Nature Photonics* 1, 709 (2007).

Fig. 5. Momentum changes of single- and multiple-scattered waves. (a) Single-scattered waves having transverse momentum $\vec{k}_{\parallel}^i$ is reflected by an object with spatial period of Λ_x . The transverse momentum of the reflected wave becomes $\vec{k}_{\parallel}^r = \vec{k}_{\parallel}^i + \vec{k}_{\parallel}^s$. (b) and (c) The maps of $\vec{k}_{\parallel}^r - \vec{k}_{\parallel}^i$ for single- and multiple-scattered waves, respectively. (d-f) Same as (a-c), but the transverse momentum of incident wave is $\vec{k}_{\parallel}^{i'}$.

적인 물체는 주기적인 구조의 합으로 이해할 수 있기 때문에 하나의 주기적인 구조에 대한 설명은 일반적인 물체로 확장될 수 있다.) 이 경우 반사되는 빛의 각도(혹은 운동량)는 운동량 보존 법칙에 따라 입사하는 빛의 운동량과 대상 물체의 주기적인 구조가 결정하는 운동량 $\vec{k}^s$ 를 더한 것으로 결정된다. 따라서 반사되는 빛과 입사하는 빛의 운동량의 차이는 바로 $\vec{k}^s$ 로 주어진다(그림 5(b)). 그러나 다중산란파의 경우 반사되는 빛에 무작위적으로 운동량이 더해지고, 따라서 반사되는 빛과 입사하는 빛의 운동량의 차이는 그림 5(c)와 같이 무작위적인 패턴으로 주어진다.

그렇다면 입사하는 빛의 각을 바꿔서 실험을 하면 어떻게 될까? 그림 5(d)에서 보듯이 반사하는 빛의 운동량도 달라지지만, 반사하는 빛과 입사하는 빛의 운동량의 차이는 그림 5(e)에서 보듯이 여전히 대상 물체의 운동량으로 결정된다. 하지만 다중산란파의 경우에는 이전과는 전혀 다른 형태의 무작위적인 패턴으로 생성된다(그림 5(f)). 따라서 서로 다른 각도로 입사하는 두 경우에 대해 반사되는 빛과 입사하는 빛의 운동량의 차이를 보면 단일산란파는 그 값이 같고, 다중산란파는 전혀 다른 패턴이 된다.

실제 실험연구에서는 N 개의 서로 다른 입사각에 대해 N 개의 반사하는 빛에 대한 이미지를 획득하였고, 각각의 이미지에 대해 반사 빛과 입사 빛의 운동량의 차이를 구한 다음에, 이들을 모두 더하였다. 이 경우 단일산란파는 그 파의 진폭(amplitude)이 N 배가 되지만 다중산란파는 무작위적인 패턴의 합

Fig. 6. Schematic diagram of CASS microscope. The backbone of the setup is an interferometer using wide-band and low-coherence light source (Ti:Sa Laser). The output beam from the laser is splitted into incidence wave and reference wave, and the angle of incidence wave to the sample is controlled by spatial light modulator (SLM). Reflected wave from the sample is combined with reference wave at the CCD camera.

이기 때문에 $\sqrt{N}$ 배가 된다. 따라서 파의 세기(intensity)는 진폭의 제곱이기 때문에 단일산란파는 N^2 배, 다중산란파는 N 배가 되어 원래 단일산란파의 세기가 약했다더라도 이러한 운동량 보존법칙을 이용하면 단일산란파의 세기가 다중산란파의 세기보다 오히려 더 강해질 수 있다. 이러한 방식으로 대상 물체를 구성하고 있는 다양한 $\vec{k}^s$ 성분을 찾아내면 이로부터 물체의 영상을 획득할 수 있다.

CASS 현미경의 구조 및 실험 결과

앞에서 언급한 단일산란파의 두 가지 성질을 활용하기 위해 반사된 빛의 시분해 운동량을 측정할 수 있는 CASS 현미경을 개발하였다(그림 6). 시분해 측정을 통해 목표 깊이에서 돌아오는 빛만을 골라내었고, 간섭 현미경을 통해 빛의 운동량을 측정함으로써, 빛의 조직 내에서의 운동량 변화량을 측정할 수 있었다.

생체 조직 모형에 해당하는 산란매질을 제작하였고, 그 두께 Δz 를 바꾸어가면서 CASS 현미경의 성능을 테스트하였다(그림 7). 기존의 시분해 이미징 방법(Ordinary wide-field OCT)으로는 두께가 $\Delta z = 1.60 l_s$ 만 되어도 크기가 $1 \mu\text{m}$ 인 제일 작은 구조가 보이지 않게 되었고, 입사하는 빛의 각도를 바꾸어 $N = 2,500$ 장의 획득한 이미지들의 세기를 더했을 경우(Angular compounding OCT) 이 보다 결과가 좋아져서 두께가 $\Delta z = 6.52 l_s$ 까지는 작은 구조를 볼 수 있었다. 그러나 시분해 이미징과 운동량 보존 법칙을 이용한 CASS 이미징의 경우에는 두께가 $\Delta z = 11.5 l_s$ 인 경우까지도 미세구조를 이미징할 수 있었다. 따라서 기존 현미경에 비해 5배 이상의 깊이(1 mm 이상 깊이)에서도 $1 \mu\text{m}$ 의 고해상도 영상을 획득할 수 있었다. 이는 고해상도 반사 현미경의 영역에서 기록된 세계 최고 심

Fig. 7. The performance of CASS microscope when tissue phantoms with various thicknesses were placed on the top of a resolution target. (a) Wide-field image taken by conventional optical coherence tomography. (b) Incoherent addition of all the images taken at various incidence angles. (c) Images taken by CASS microscope.

도이고, 초고심도 이미징(super-depth imaging)에 가장 근접한 결과라고 할 수 있다.

향후 전망

생체조직과 같은 산란매질 내부 깊은 곳까지 고해상도 광학 이미징을 할 수 있게 하는 것은 암과 같은 주요 질병의 조기 진단이라는 측면에서 극히 중요한 의미를 지니고 있다. 초기

단계의 암세포는 생체조직 표면으로부터 1 mm 이상의 깊이에서 형성되며, 이때 특히 크기가 수 μm 인 세포핵의 크기 변화를 수반한다. 이러한 초기 암세포 발현은 기존에 개발된 의료 영상방법으로는 측정이 불가능하며, 암세포가 덩어리를 이루어 크게 자라난 이후에 용종 등의 형태로 나타날 때에 이르러서야 측정이 가능했다. 또한 진단된 암세포를 치료하는 과정에서, 전이된 작은 암세포 조직을 발견하기에도 어려움이 있어왔다. 초고심도 광학 현미경은 이러한 초기 단계의 암세포 진단 및 치료에 있어서 획기적인 진전을 가져올 수 있을 것으로 기대된다. 또한 척수에서 줄기세포가 어떻게 생겨나고 없어지는지, 혹은 뇌신경계가 어떻게 작동하는지에 대해 생체에 손상을 가하지 않고 관찰할 수 있기 때문에 줄기세포 연구나 뇌과학 연구에도 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 기대한다. 현재 미국 캘리포니아공대, 워싱턴대, 하워드휴즈연구소의 하나인 자넬리아 연구소(Janelia Research Farm)

등은 고심도 이미징을 뇌과학에 응용하는 연구에 박차를 가하고 있다. 비록 본 연구팀의 최근 연구가 초고심도 이미징에 한 발 다가서는 것이었지만, 아직 질병의 조기진단이나 뇌과학 응용 연구에 필요한 깊이까지는 도달하지 못하였다. 본 연구팀을 포함한 세계 우수 그룹의 연구팀들이 지속적으로 노력을 한다면 바이오 및 의학 응용에 큰 도움이 될 수 있는 초고심도 광학 현미경 개발에 점진적으로 다가갈 수 있을 것으로 기대한다.