

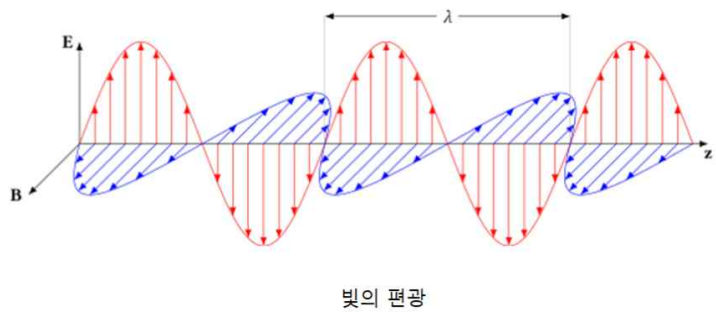
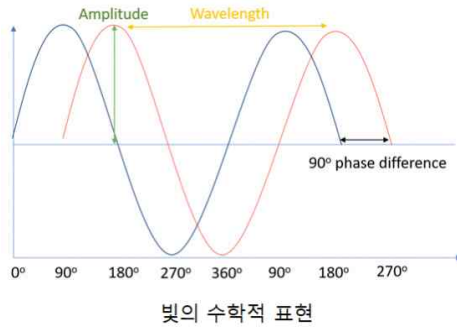
## [현미경의 과학] 광학 현미경 이모저모 (2) - 비표지 광학 현미경

### 비표지 광학 현미경의 발전 및 장단점

17세기 들어 레벤후크 (Antony van Leeuwenhoek) 와 로버트 훅 (Robert Hooke)에 의해 초기 광학 현미경이 개발되어 사람의 눈으로 관찰할 수 없었던 미생물과 같은 작은 대상을 관측할 수 있게 되었다. 19세기에 조지 비델 에어리 (George Biddell Airy)와 에른스트 아베 (Ernst Abbe) 등의 과학자에 의해 빛의 회절 현상과 현미경의 해상도에 관한 이론적 배경이 밝혀지며 현대에 활용하는 현미경의 형태가 등장한다. 표지자는 1990년대 이후 활발히 응용이 되었기 때문에 그 이전에 개발된 현미경을 대부분 빛의 특성을 활용해 시편을 관찰하는 비표지자 광학 현미경이었다. 지난 연재에서 표지자를 활용한 현미경을 먼저 설명했기 때문에 본 연재에서 소개하는 광학 현미경은 표지자를 활용하지 않는 비표지자 광학 현미경으로 표현하겠다. 비표지자 광학 현미경의 장점은 표지자를 활용하지 않기 때문에 시편의 특별한 준비과정이 필요하지 않는 점이고, 표지자를 활용할 때 발생할 수 있는 문제점이 없다는 점 역시 장점이라 할 수 있다.

지난 연재에서 광학 현미경 종류 중 형광 물질과 같은 표지자를 활용한 여러 종류의 형광 현미경을 소개하며 표지자의 원리와 응용에 대해서 설명하였다. 표지자를 활용하면 복잡한 환경 속에서 관찰하고자 하는 특정 대상만 선별적으로 관측할 수 있어 생체 기능 연구, 질병 연구, 신약 개발 등 형광 현미경 기술은 다양한 의생명 연구 분야에서 핵심 기술로 활용되고 있다. 관측 대상에 표지자를 붙여 선별적으로 관찰하는 것이 표지자 활용의 가장 큰 장점이지만, 표지자를 활용함으로써 발생할 수 있는 단점도 존재한다. 살아있는 대상을 표지자로 관찰하는 경우 추가적인 표지자가 붙어 생체 기능이 변화될 수 있고, 이는 관측 대상 본연의 기능 연구에 방해가 될 수 있다. 또한, 표지자는 빛을 흡수해 전자가 들뜬 상태로 되었다가 다시 전자가 안정적인 상태로 내려가며 빛을 방출하는데, 반복적인 전자의 에너지 흡수 및 방출 과정에서 전자가 산소와 결합하게 되면 세포나 조직에 손상을 줄 수 있는 활성산소 (oxygen free radical)를 생성하는 광독성 (phototoxicity)의 부작용이 발생할 수 있다. 이런 단점은 표지자를 활용한 오랜 시간 시편을 관찰할 때 문제를 일으킬 수 있고, 측정된 결과로부터 생명현상 및 생체기능 분석할 때 정밀도를 낮추게 된다.

비표지 광학 현미경은 앞서 언급한 표지자 활용의 단점이 없어 살아있는 시편을 관찰할 때 특별한 제한 사항이 없다. 비표지 광학 현미경이 시편을 관찰하기 위해서는 빛의 세기, 위상, 편광 등의 성질을 활용한다. 빛은 파동의 특성을 갖기 때문에 수직적으로 진폭과 위상으로 표현 가능하고, 빛이 진행할 때 진동 방향에 따라 수직과 수평 성분의 편광으로 구분된다.



**그림 . 빛의 특성 [1,2]**

따라서 시편을 지난 빛이 세기, 위상, 편광 등의 빛의 특성이 변화되면 배경의 빛과 차이가 생겨 시편을 관찰할 수 있게 된다. 명시야 현미경 (bright-field microscopy), 위상차 현미경 (phase-contrast microscopy), 암시야 현미경 (dark-field microscopy) 등이 대표적인 비표지자 광학 현미경이다. 빛의 특성만을 활용하여 세포와 같은 투명한 시편을 직접 눈으로 관측할 수 있는 장점으로 현재 세포를 이용하여 연구를 수행하는 모든 실험실에는 세포 관측을 위한 비표지 광학 현미경이 구비되어 있다.

비표지자 광학 현미경은 특별한 시편의 준비과정이 필요하지 않고 직관적으로 시편을 관찰할 수 있는 장점이 있지만, 관측 대상의 구조가 복잡해지면 굴절 및 산란에 의해 광경로가 많이 변하여 시편의 선명한 영상을 얻기 어렵다는 단점이 있다. 또한, 기존의 비표지자 광학 현미경은 2차원 정성적인 관찰만 가능하고 3차원 정량 정보 측정은 어렵다는 한계가 있다. 그 이유는 빛을 통한 시편과 배경을 구분하는 원리에서 찾을 수 있다. 빛의 파동성에 의해 시편을 지난 빛은 시편과 배경의 굴절률 차이에 의해 시편을 지나는 빛과 배경을 지나는 빛의 진행 속력이 바뀐다. 그 결과 시편을 통과한 빛과 배경을 지난 빛은 위상의 차이가 발생하는데 사람의 눈을 통해 대상을 관측하거나 카메라를 활용해 대상의 영상을 촬영하는 것은 모두 빛의 위상 차이를 정량적으로 측정할 수 없고 진폭의 제곱에 해당되는 빛의 세기 정보만 측정하기 때문이다.

빛을 통해 시편의 3차원 정보를 얻을 수 있는 한 가지 방법은 시편을 지난 빛과 배경을 지난 빛이 카메라에 도달하는 시간 혹은 위상 차이를 정확히 측정하는 것이다. 예를 들어 빛이 시편을 지나게 되면 시편의 굴절률이 공기보다 크기 때문에 빛의 속력은 느려지게 된다. 따라서 광원으로부터 나온 빛이 카메라에 도달할 때 시편을 지난 빛은 공기를 지난 빛보다 속력이 느려져 늦게 도착하게 된다. 100미터를 거리를 두 사람이 달릴 때 도착하는 시간을 측정하면 두 사람의 속력을 계산할 수 있는 것과 같은 원리와 마찬가지로 빛이 시편의 두꺼운 부분과 얇은 부분을 지난다고 하면 얇은 부분을 통과한 빛이 카메라에 더 빨리 도착하기 때문에 빛이 시편을 투과하는데 걸린 시간을 측정하면 시편의 3차원 두께 정보를 계산할 수 있다.

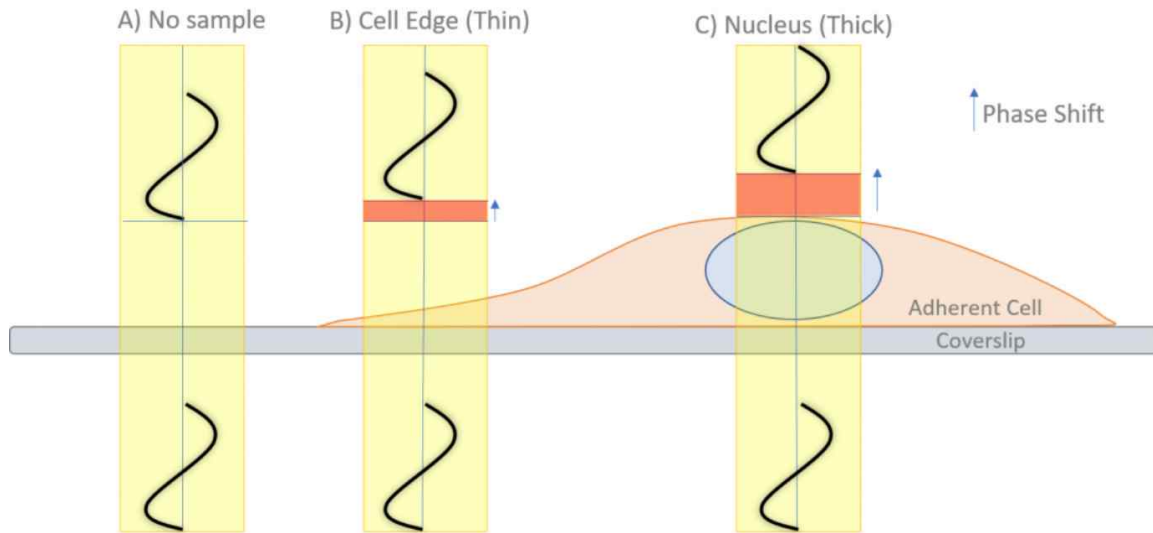


그림 . 시편을 지나는 빛의 위상 지연 [1]

다만 세포와 같은 시편은 두께가 대략  $10\ \mu\text{m}$ 이고 빛의 속력은 대략  $3.0 \times 10^8\ \text{m/s}$ 이기 때문에 시편의 두께에 따라 카메라에 도착한 빛의 시간 차이를 측정하는 것은 매우 어렵다. 이런 이유로 사람의 눈 혹은 카메라로 측정한 영상은 위상 정보 없이 일정 시간 동안 누적된 빛의 세기만 측정을 하게 되어 시편의 3차원 정보를 획득할 수 없게 된다. 비표지자 광학 현미경이 관측 대상의 3차원 정량적인 정보를 획득하기 어렵기 때문에 표지자를 활용한 광학 현미경이 정량 분석이 필요한 경우 많이 활용되었다. 최근에는 광학기술 및 영상 분석기술이 발전하며 홀로그래피 (holography) 기술을 활용한 정량 위상 현미경이 개발되어 기존의 비표지자 광학 현미경으로 측정이 불가능했던 단점을 극복하여 세포 및 조직의 3차원 영상을 획득할 수 있어 여러 의생명 연구에 활용되고 있다.

## 비표지 광학 현미경의 종류와 원리

다음으로는 대표 비표지 광학 현미경 기술에 대한 원리와 그 응용을 간단히 소개하겠다.

### 1) 명시야 현미경

명시야 현미경 혹은 복합 현미경 (compound microscope)은 광원에서 나온 빛이 시편을 지나 눈 혹은 카메라를 통해 시편을 관찰할 수 있는 간단한 구조로 구성되어 있다. 집광렌즈 (condenser)를 통해 광원에서 나온 빛을 시편에 전달하고, 시편과 상호작용한 빛을 대물렌즈 (objective)를 통해 모으고 대안렌즈 (eyepiece)를 통해 대물렌즈를 통해 생성된 실상을 확대해 눈 혹은 카메라로 관찰하게 된다. 집광렌즈를 통해 모인 빛이 시편을 지나며 빛의 투과, 흡수, 반사, 굴절 등에 의해 배경과 구분되어 시편을 관찰할 수 있다. 시편이 염료와 같이 색을 갖는 경우 특정 파장의 빛이 흡수되어 배경과 뚜렷하게 구분되어 더 선명하게 관찰할 수

있다. 세포나 조직 같은 경우 배경과 시편의 굴절률 차이가 크지 않아 투명한데 염료를 사용하여 시편을 염색을 한 후 관찰하기도 한다. 가장 간단한 형태의 현미경이지만 시편을 간편하게 관찰할 수 있고 디지털카메라 및 영상 분석 기술과 결합하여 최신 기술 적용이 가능해 현재도 많이 활용되고 있다. 반면, 염료를 사용하지 않는 경우 매우 얇고 투명한 시편은 명시아 현미경을 활용해서 관찰하기 어려운 단점이 있다. 투명하다고 하는 것은 주위 배경과 시편의 굴절률 차이가 적은 것을 의미하고, 얇은 조건은 빛의 세기 변화가 충분히 일어나지 않는 것을 뜻하기 때문에 배경과 시편을 지난 빛의 잘 구분되지 않는다. 따라서 세포와 같이 얇고 투명한 시편은 염색 없이 명시아 현미경만으로 관찰하기 어려운 한계가 존재한다.

## 2) 위상차 현미경

위상차 현미경은 명시아 현미경을 통해 염색 없이 투명한 시편을 관찰할 수 있는 현미경이다. 1930년대 프리츠 제르니커 (Fritz Zernike)가 회절격자의 영상에 관한 연구를 수행하다 개발된 위상차 현미경은 명시아 현미경의 단점을 극복하고 투명한 시편을 선명하게 관찰할 수 있다. 위상차 현미경은 명시아 현미경과 유사한 구조로 구성되어 있지만 광원 앞 고리 모양의 조리개 (annular ring)와 대물렌즈 뒤 위상 플레이트 (phase plate)가 있다는 점이 다르다. 광원에 위치한 고리 모양의 조리개는 집광렌즈를 통해 좁은 영역에 빛이 모였다가 대물렌즈를 통해 위상 플레이트의 고리 형태에 해당되는 위치를 지나간다. 시편이 놓인 경우 일부 빛이 시편에 의해 굴절 혹은 산란이 되며 광경로가 달라지게 되고 대물렌즈를 통과 후 위상 플레이트의 고리 모양 위치가 아닌 곳을 지나게 된다. 위상 플레이트는 시편에 의해 광경로가 변형되지 않은 빛이 통과하는 부분과 시편에 의해 광경로가 바뀐 부분이 지나가는 영역의 두께를 다르게 하여 인위적으로 시편에 의해 광경로가 바뀐 부분과 바뀌지 않은 부분의 위상 차이를 반파장 ( $\lambda/2$ ) 만큼 나게 한다.

세포와 같은 투명한 시편은 배경과 굴절률 차이가 적어 시편을 지난 빛의 위상 지연 현상이 매우 작기 때문에 시편을 관찰하기 어려운데, 위상차 현미경의 고리 모양의 조리개를 통한 조명 방식과, 위상 플레이트를 통한 인위적으로 빛의 위상 차이를 만들면 시편에 의해 광경로가 변한 빛과 변하지 않은 빛이 상쇄 및 보강 간섭을 일으켜 시편을 선명하게 관찰할 수 있게 된다. 위상차 현미경을 통해 투명한 세포를 뚜렷하게 볼 수 있게 된 공로로 프리츠 제르니커는 1953년 노벨상을 수상하게 된다. 현재도 위상차 현미경은 세포와 같이 투명한 시편을 관찰하는데 활발히 활용되고 있다.

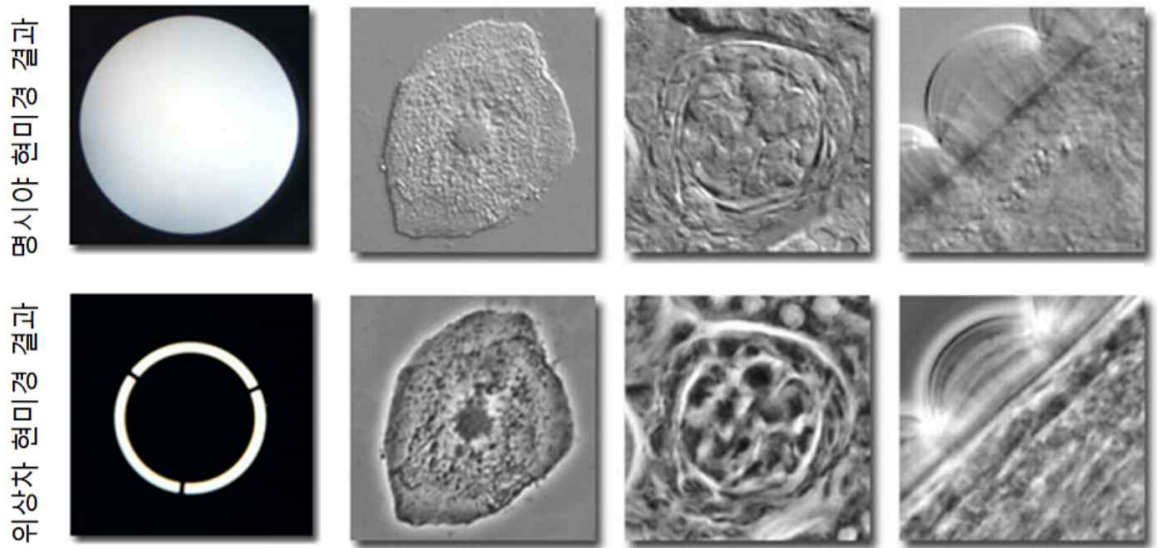
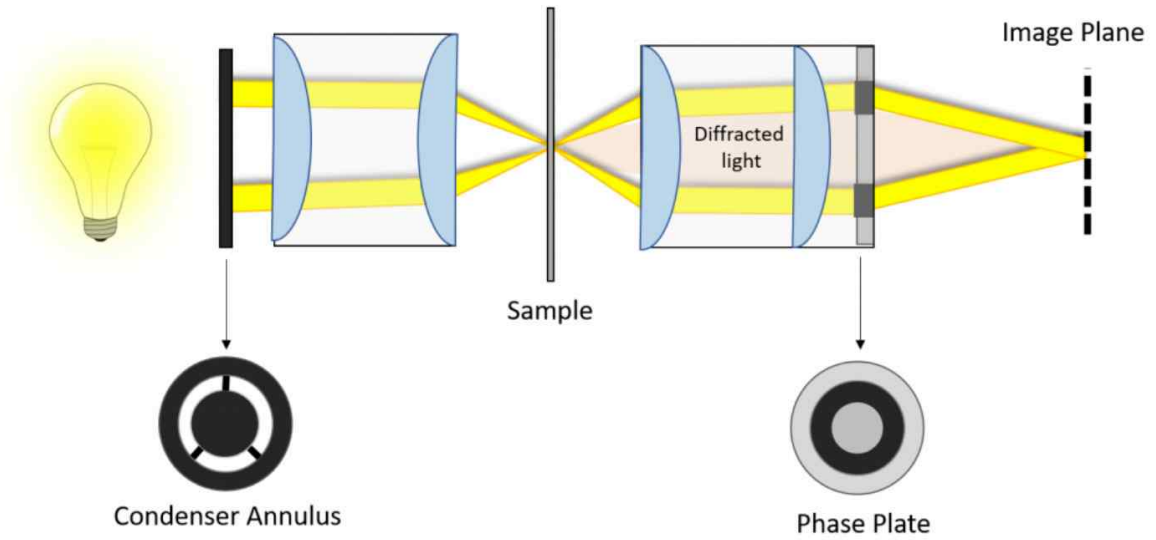


그림 . 위상차 현미경의 원리 및 측정 결과 [1]

### 3) 암시야 현미경

암시야 현미경은 배경을 어둡게 하여 시편을 선명하게 관찰할 수 있도록 개발된 현미경이다. 특히, 시편의 가장자리, 굴절률의 변화가 발생한 곳, 미세한 크기의 입자를 선명하게 볼 수 있는 장점이 있다. 암시야 현미경의 구조는 명시야 현미경과 유사하다. 광원에서 나온 빛이 집광렌즈를 통해 시편에 조사되고, 대물렌즈를 통해 시편에서 나온 빛을 관찰한다. 다만 암시야 현미경은 집광 렌즈 앞 고리 모양의 조리개를 두어 속이 빈 원뿔 형태의 조명을 만든다. 이렇게 생성된 조명은 시편 위치에 모였다가 모두 대물렌즈 밖으로 지나가 시편이 없는 경우 광원으로부터 전달된 빛이 대물렌즈로 전혀 전달이 안되기 때문에 측정된 영상은 빛이 없어 어둡게 나타난다. 시편이 놓인 경우 시편에 의해 투과, 굴절, 산란에 의해 광경로가 변화되어 대물렌즈로 적은 빛이 들어가게 된다. 이렇게 관측된 빛은 모두 시편에 의해 발생하였기 때문에 어두운 배경에 시편이 선명하게 보이게 된다. 암시야 현미경은 배경이 어둡고

시편에 의해 빛의 경로가 변화된 것들만 측정되기 때문에 마치 밤하늘 별을 관측하는 것과 비슷한 영상을 획득할 수 있고 예술적으로 보이는 영상을 보여주기도 한다. 굴절률의 변화가 있는 곳에서 빛의 경로가 많이 바뀌기 때문에 암시야 현미경을 통해 투명한 시편의 가장자리나 윤곽을 선명하게 관찰할 수 있다. 또한 나노 입자와 같이 미세한 크기의 입자를 관찰할 때도 암시야 현미경이 유용하게 활용된다.



그림 . 암시야 현미경의 원리 및 측정 결과 [3]

이 외에도 빛의 편광 특성을 활용하여 광학적으로 이방성인 매질의 복굴절 (birefringence) 특성을 잘 측정할 수 있는 편광 현미경 (polarization microscopy) 이 있고, 노마스키-윌러스턴 (Normarski Wollaston) 프리즘을 활용하여 조명 빛을 수직 및 수평 편광으로 나누며 두 빛의 광경로 차이가 발생하고 시편을 통과하며 수직 및 수평 성분의 명시야 영상을 얻은 후 두 편광을 회전을 통해 같은 편광 상태로 만들어 수직 및 수평 편광으로 획득한 두 빛을 간섭시켜 투명한 시편을 선명하게 관찰할 수 있는 차등 간섭 대조 현미경 (differential interference contrast (DIC) microscopy)도 있다. 이처럼 빛의 세기, 위상, 편광 등의 특성을 이용하여 투명한 시편을 선명하게 관찰할 수 있는 여러 형태의 현미경이 개발되었고 현재도 산업 및 학계에서 많이 활용되고 있다.

### 정량 위상 현미경의 등장

정량 위상 현미경은 최근 빠르게 발전하고 있는 기술로써 기존의 위상차 현미경에서 측정할 수 없던 시편의 3차원 정량 정보를 획득할 수 있는 기술이다. 앞서 설명한 것처럼 시편이 배경과 굴절률 차이가 적고 두께가 매우 얇으면 시편을 지난 빛을 배경과 구분하기가 매우 어렵다. 시편과 배경을 지나는 빛의 시간 차이를 구하면 빛의 속력을 계산해 시편의 3차원 두께 정보를 획득할 수 있지만 빛의 속력이 매우 빠르게 때문에 두 빛의 시간 차이를 구하는 것은 사실상 불가능하다.

이런 한계를 극복하기 위해서 간섭계를 활용한다. 간섭계는 여러 형태가 존재하는데 기본적으로 정보를 알고 있는 빛과 관측하고자 하는 빛을 한곳에 만나게 하여 보강 및 상쇄 간섭을 일으킨다. 아래 그림은 간섭계를 통해 얻을 수 있는 상쇄 및 보강 간섭 결과에 대해서 보여준다.

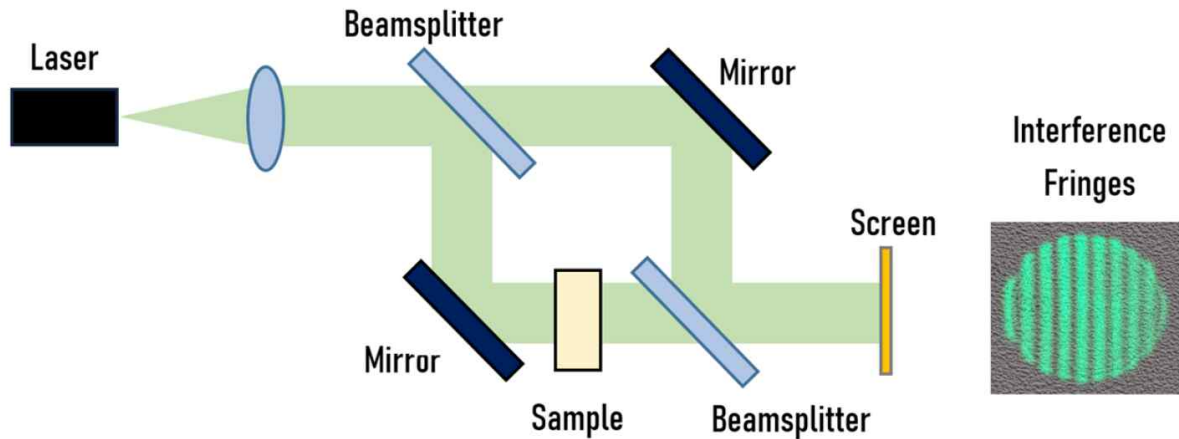


그림 . Mach-Zehnder 간섭계 [4]

이처럼 정보를 알고 있는 참조용 빛과 관측된 결과를 활용하면 수학적으로 어떤 특성의 빛이 간섭을 일으켰는지 계산할 수 있고, 이것이 관측하고자 하는 빛의 정보이다. 간섭계를 활용하면 시편을 지난 빛과 배경을 지난 빛의 도달 시간 차이가 빛의 위상의 차이로 나타나기 때문에 간섭무늬를 분석하면 시편을 통과하는데 걸린 시간을 파악할 수 있고, 이를 통해 3차원 두께 정보를 획득할 수 있는 것이다. 이론적으로는 한 장의 간섭무늬를 찍으면 시편의 3차원 정보가 포함되어 있기 때문에 이를 홀로그래피라고 부르기도 한다. 실제 시편은 균일하지 않고 복잡한 물질로 구성되어 있기 때문에 굴절률 분포가 발생하여 단순히 한 장의 간섭무늬 영상을 통해 3차원 정보를 획득할 수 없다. 이를 극복하기 위해 여러 각도에서 홀로그램 영상을 획득한 후 빛의 위상 정보를 분석하기 위해 수학적으로 역문제 (inverse problem)를 푸는 방법이 개발되었다. 이 방법은 영상 측정 조건과 측정된 결과값을 가장 잘 나타낼 수 있는 3차원 굴절률 분포를 컴퓨터를 활용해 복원하는 것이다. 이 과정은 수많은 컴퓨터 계산이 필요하여 복원에 오랜 시간이 걸린다는 단점이 존재하였었는데, 최근 영상 기술, 영상 분석 기술, 컴퓨터 성능의 향상으로 매우 빠르게 실시간으로 3차원 영상을 획득하는 것이 가능해졌다. 또한 세포와 같은 비교적 단순한 시편뿐만 아니라 조직같이 복잡한 구조의 3차원 영상 획득도 가능 해졌다.

정량 위상 현미경 기술의 빠른 발전은 기존의 정성적인 정보만 획득할 수 있었던 비표지 광학 현미경의 한계와 표지자를 활용하며 발생할 수 있는 단점을 극복할 수 있기 때문에 살아있는 세포 본연의 기능을 오랜 시간 정량적으로 관찰할 수 있게 되었다. 또한, 기술 개발과 더불어 상용화도 빠르게 이뤄져 광학계 및 영상 분석을 전문적으로 하는 연구실이 아니더라도 정량 위상 현미경을 활용할 수 있게 되어 의생명 분야에서 점점 관심이 높아지고 기존 현미경으로는 측정하기 어려웠던 현상들을 관측할 수 있다는 사례 보고가 늘어나며 그 응용이 점점 늘어나고 있다.

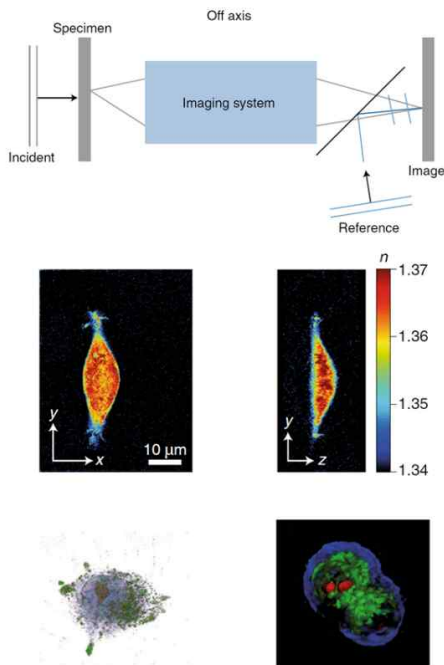


그림 . 정량 위상 현미경 기술을 통해 획득된 세포의 3차원 영상 [5]

### 광학 현미경과 인공지능의 활용

지난 몇 년간 인공 지능 기술의 발전은 급격히 이뤄졌고 일상생활 모든 부분에 많은 영향을 미쳤다. 인공지능 기술의 발전은 광학 현미경 발전에도 많은 기여를 하고 있다. 인공지능은 영상의 품질 향상, 영상 일부 대체, 영상 해석 등 영상 관련 분야에서 많은 연구가 이뤄졌고, 영상과 관련된 여러 분야에서 널리 활용되고 있다. 영상과 관련된 인공지능 기술의 발전은 광학 현미경 영상 획득 방법 및 분석 기술의 변화와 발전을 일으키게 되었다. 비표지 광학 현미경 영상은 표지자가 없기 때문에 시편을 뚜렷하게 구분하는 것이 어렵다는 한계가 있는데 인공지능 기술을 활용하면 마치 표지자를 활용한 것 같은 영상으로 변환이 가능하다. 이런 인공지능의 응용을 통해 비표지자 광학 현미경을 비표지 및 표지자 활용의 장점을 동시에 갖는 기술로 진화 시켰다. 또한, 3차원 정량 정보 획득을 위해 위상 정보를 획득할 수 있는 간섭계를 활용하였는데, 인공지능 기술의 발전으로 간섭계 없이 학습을 통해 2차원 정성적인 영상으로부터 3차원 정량 정보를 갖는 영상으로 변화시킬 수 있게 되었고, 이는 복잡하고 비싼 광학계를 저렴한 광학계 대체할 수 있게 하였다. 나아가 전통적으로 현미경에 사용되는 렌즈를 사용하지 않고 시편과 상호작용한 빛의 세기정보를 인공지능을 통해 해석하여 현미경 영상을 획득할 수 있는 기술도 개발되었다. 이처럼 인공지능 기술의 발전은 광학 현미경을 새로운 차원으로 기술을 더 높이는데 활용되고 있다.



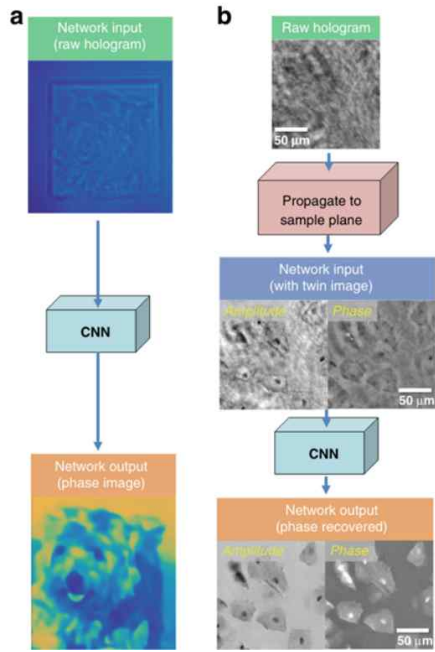


그림 . 인공지능을 활용한 정량 위상 현미경 영상 복원 기술 [6]

### 맺음말

지난 연재와 본 연재를 통해 여러 광학 현미경에 대한 내용을 살펴보았다. 광학 현미경은 표지자의 활용 유무에 따라 크게 구분이 되었는데 각각 장단점이 뚜렷하게 존재하기 때문에 실험 및 관측 목적에 따라 적합한 현미경을 활용해야 한다. 여기에 최근 급격히 발전하고 있는 인공지능 기술이 광학 현미경과 접목되어 광학 현미경 기술의 수준과 그 응용성을 대폭 늘리고 있다. 앞으로 인공지능 기술이 더욱 빠르게 발전할 것으로 기대되기 때문에 이를 활용하여 광학 현미경 분야도 새로운 발전을 이룰 수 있을 것이라 기대된다.

### 참고문헌

- [1] <https://www.photometrics.com/learn/microscopy-basics/phase-contrast-microscopy>
- [2] [https://en.wikipedia.org/wiki/Polarization\\_\(waves\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Polarization_(waves))
- [3] <https://www.uib.no/en/rg/biomaterial/65681/ultrahigh-resolution-dark-field-microscopy>
- [4] <https://www.edmundoptics.co.kr/>
- [5] YK Park et al, Nature Photonics 12, 578-589, 2018
- [6] Y Rivenson et al, Light: Science & Applications 8(85), 2019