

1. 서론

다광자 현미경 (multiphoton microscopy)은 비선형형광 현상인 다광자 여기 (multiphoton excitation of fluorephores)를 바탕으로 하는 3차원 해상도를 가지는 형광현미경 기술이다. 다광자 현미경은 이광자 형광 현미경 (two-photon microscopy), 삼광자 형광 현미경 (three-photon microscopy) 등의 형광현미경을 포함한다. 다광자 현미경은 펄스 레이저 개발에 힘입어 1990년 코넬대 웹 그룹에서 최초로 현미경 영상 기술로 사용될 수 있음을 보인 이후[1], in vivo deep tissue imaging에 적합한 기술임이 알려지면서 neuro-biology, immunology, cancer biology등에서 사용되면서 폭발적인 성장세를 보였다. 현재는 기술적으로 메이저 현미경 회사들이 상업적 제품을 판매하는 성숙기에 도달하였고,

(two-photon excitation)를 바탕으로 한다 [1-3]. 그림 1은 형광을 설명하기 위한 형광물질의 전자 에너지 준위를 보여준다. 일반적인 형광에서는 여기광의 에너지가 충분하여 흡수를 통해 바닥상태의 전자를 여기상태로 만들 수 있다. 이를 단광자 여기 (one-photon excitation)라 한다. 반면에 이광자 여기에서는 단광자 여기보다 장파장의 여기광을 사용하여, 여기광자 한 개로는 에너지가 부족하고 두 개의 여기광자들이 동시에 흡수해야 한다. 한 개의 여기광자를 흡수할 확률을 p 라 하면 두 개의 여기광자를 흡수할 확률은 p^2 가 되어 확률적으로 매우 낮아지고 또한 흡수확률은 여기광 밀도의 이차함수가 된다. 그러므로 이광자여기 현상은 여기광의 밀도가 높은 3차원 초점에서만 선택적으로 발생하여 3차원 해상도를 가진다. 영상 촬영을 위해서는 낮은 이광자 흡수확률을 극복해야 하는데 이를 위해 약 100 펨토초의 펄스폭을

특집 ━ Optical Microscopy & Biomedicine

다광자 현미경의 개발 및 응용

김기현*

이 성숙된 다광자 현미경 기술을 바탕으로 생물학 연구 분야가 더 확대 되어가고 있다. 여기서는 다광자 현미경의 원리 및 과거 20년간의 개발 및 응용분야, 그리고 현재 진행 중인 개발 및 미래 방향에 대해 논의한다.

2. 다광자 현미경의 원리 및 응용분야

2.1 다광자 현미경의 원리 및 기술

다광자 현미경은 비선형 형광현상인 이광자 여기

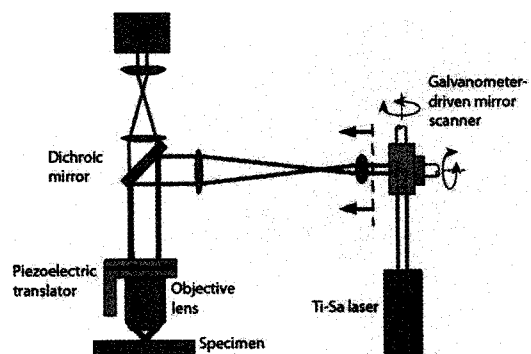


그림 1. 이광자 현미경의 개략도. 광원으로는 파장 변환이 가능한 Ti-Sapphire 펄스 레이저를 사용하고, 광센서로는 photomultiplier tube (PMT)를 사용한다. 여기광과 형광광을 각각 적색, 녹색으로 표시하였다.

* 포항공과대학교 기계공학과/융합생명공학부

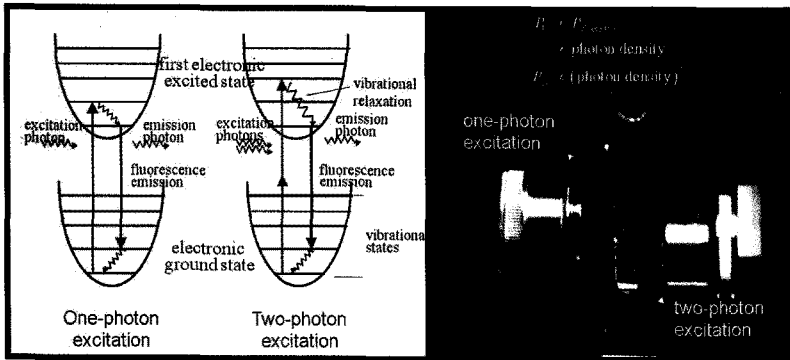
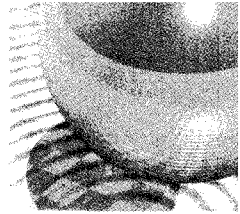


그림 2. 이광자 여기 원리를 일반적 형광인 단광자 여기와 비교설명: 왼쪽은 형광분자의 Jablonski energy diagram이고 오른쪽은 형광액 (fluorescein solution)에 여기광을 대물렌즈로 초점을 맞추었을 때 발생하는 형광을 보여주는 사진

가지는 펄스 레이저를 사용하고 고구경을 가지는 대물렌즈로 회절한계의 초점을 맞추어야 한다. 일반적 다광자 현미경은 파장 가변 Ti-Sapphire 펄스 레이저를 사용한다. 3차원 초점에서 발생한 형광광은 photomultiplier tubes (PMTs)로 집속하고, 여기광 초점의 스캔을 통해 영상을 획득한다.

다광자 현미경은 in-vivo tissue 영상에 적합한 두 가지 특징들을 가지고 있다. 영상촬영에서 형광발생과 관련된 조직에 대한 광손상이 최소화 되고, 불투명한 생체 조직에서도 약 500 마이크로미터 정도의 높은 촬영깊이를 가진다. 형광발생 과정에는 광손상이 동반되는데, 다광자 현미경에서는 초점 이외에서는 형광이 발생하지 않으므로 광손상이 최소화 된다. 현미경 기술에서는 생체조직에서의 촬영깊이가 광산란에 의해 제한된다. 다광자 현미경에서는 촬영깊이가 여기광과 형광광의 산란에 영향 받는다. 여기광의 경우는 산란에 의해 초점에 도달하는 여기광의 양이 줄어 발생하는 형광광 양도 줄어든다. 또한 초점에서 발생한 형광광은 생체조직을 나와 대물렌즈에 집속되는데, 생체조직을 지나면서 산란되어 대물렌즈에 집속된 형광광은 초점 한 위치에서 나온 것 보다는 퍼져있게 된다. 다광자 현미경에서는 형광광이 여진광의 3차원 초점에서만 발생된다는 것을 알고 있으므로 샘플에서 발생하는 형광광을 모두 집속할 수 있도록 넓은 광검출 면적을 가지는 PMT를 사용한다. 이를 통해 다광자 현미경의 경우는 형광광 산란의 영향이 최소화되어 높은 촬영깊이를 가진다. 균일한 조직인 뇌의 경우는 약 500 마이크로미터 정도이고, 층구조를 가지는 다른 생체조직의 경우는 약 300~400 마이크로미터의 촬영깊이를 가

진다.
 다광자 현미경은 1990년 코넬대 웹 그룹에 의해 처음으로 영상기술로 이용될 수 있음이 보여졌다 [1]. 이는 펨토초 펄스 레이저를 사용해 충분한 다광자 신호를 얻을 수 있기 때문이었다. 이후 다광자 현미경이 샘플에 여기하는 광손상이 매우 적다는 것을 Embryo 성장과정을 촬영하여 보였고[4], 높은 촬영깊이를 가진다는 것을 여

러 생체조직 촬영에서 보였다 [5]. 이를 바탕으로 다광자 현미경은 in vivo deep tissue 촬영에 사용되었다.

다광자 현미경은 여진광과 형광광의 파장 차이가 커서 서로 분리하기가 용이하다. 이를 바탕으로 자가형광 (autofluorescence) 촬영이 가능함을 보였고, 자가형광을 내는 조직 구성물질들이 분광특성과 형태정보를 바탕으로 구분될 수 있음이 피부 연구를 통해 보여졌다 [7]. 다양한 형광발현 물질을 구분하기 위해 여러 방법이 복합적으로 고안되었다. 이들에겐 여진 분광, 형광 분광, 그리고 형광 반감기 (fluorescence lifetime) 측정 등이 있다.

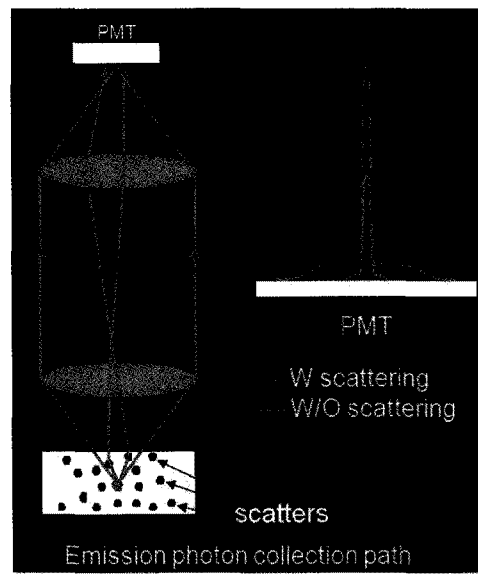


그림 3. 형광광의 생체조직 안에서의 산란을 보여주는 그림. PMT가 imaging plane에 있는 경우 산란되지 않은 형광광은 초점이 맞춰지거나 산란된 형광광은 퍼져 있음을 보여준다.

다광자 현미경은 미약한 형광신호를 바탕으로 촬영하므로 가장 민감한 관측법인 photon counting을 사용하여 촬영속도가 약 1 frame/s 정도였다. 이의 촬영속도를 극복하기 위하여 다양한 고속 다광자 현미경 방법들이 고안되었다. 여기서는 크게 두 가지 방법을 소개한다. 첫 번째 방법은 고속 스캐닝과 형광신호 탐지를 analog mode로 하는 방법이다 [8-9]. 이는 고속 스캔에 따른 신호 감소를 보상하기 위해 여진광의 파워를 높여야 하므로 형광광 신호의 포화로 해상도가 감소하는 단점이 있다. 그리고 여진광 파워 증가에 따른 광손상의 위험이 더 클 수 있다는 우려도 있다. 이를 극복하기 위하여 두 번째 고속 다광자 현미경 기술이 개발되었는데 이는 한 개의 여진광 초점으로 전 샘플 영역을 스캔하는 것이 아니라 여러개의 여진광 초점들을 만들어 동시에 스캔하므로 한 개의 초점으로 스캔하는 방법에 비해 스캔 속도를 초점 개수만큼 올릴 수 있는 장점이 있다 [10-12]. 이 방법은 여진광의 파워를 올리지 않아도 되므로 첫 번째 방법의 단점을 피할 수 있다. 하지만 이 방법은 생체조직에서 촬영깊이가 높지 않다는 단점이 있다. 여진광의 다초점에서 발생하는 형광광을 동시에 측정하려면 기존의 single pixel PMT가 아니라 다중 픽셀을 갖고있는 CCD 카메라로 촬영이 필요하다. 하지만 이는 형광광 산란의 영향을 받게 되므로 촬영깊이가 줄어드는 단점이 있다. 다중 여진광 초점의 장점을 살리면서도 형광광 산란에 의한 촬영깊이 감소의 단점을 극복하는 방법이 개발되었는데 이는 CCD 이미지 센서 대신 multianode PMT를 사용하는 방법으로 이 multianode PMT는 픽셀 개수가 CCD 이미지 센서에 비해 훨씬 작아서 각 픽셀이 샘플에서 공간적으로 퍼져나오는 형광신호도 잘 집속할 수 있게 되었다 [12].

2.1 다광자 현미경의 응용

(a) neuro-biology

다광자 현미경의 in vivo tissue imaging 특성을 이용해 뇌 속 뉴런들을 연구하였다 [13-16]. 주로 뉴런의 형태 정보와 뉴런 신호전달 측정을 위한 칼슘 레이블을 이용해 기능성을 연구할 수 있었는데, 형태 정보를 바탕으로 외부 자극에 대한 뉴런의 형태 변화를 관찰하여 기억과 관련된 plasticity를 관찰하였다. 그리고 칼슘 레이블을 통해 뉴런 네트워크의 기능성을 관찰하였다. 뉴런의 기능 연구 이외에도 다광자 현미경은 동물 질병 모델에



그림 5. in vivo neuron expressing green fluorescent protein within a mouse brain

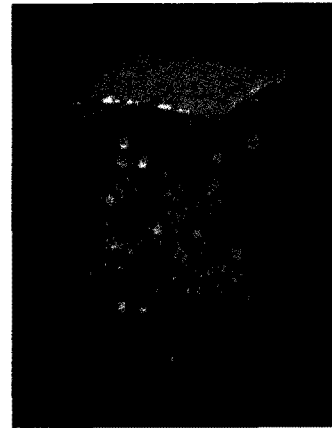


그림 6. ex vivo lymph node image, 림프구 속 면역세포와 주변의 콜라겐들이 보임. 400마이크론까지 촬영가능

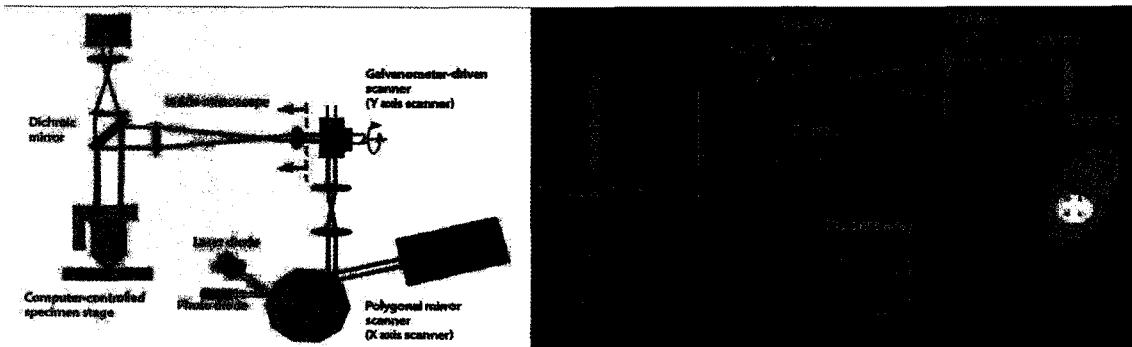
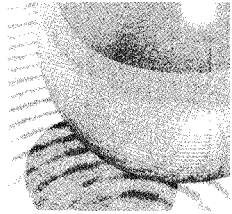


그림 4. 고속 다광자 현미경 개념도. 왼쪽은 고속 스캐너 (polygonal mirror scanner)를 이용한 방법, 그리고 오른쪽은 다중 여기광 초점들을 이용하여 동시에 스캔하는 방법.



서 질병의 기전, 약물 효과의 연구에 이용되었는데 그중 하나가 치매의 일종인 Alzheimer's Disease이다. 여러 가지 동물모델에서 플라크의 성장과정, 면역세포들과의 상호 작용 등이 연구되었다 [17].

(b) immunology

면역 시스템은 인체를 외부 내부 병원인자로부터 보호하는 매우 중요한 기능을 한다. 면역 시스템은 다양한 종류의 면역세포들의 상호작용이 필요한데 이 상호작용은 3차원 생체조직 내에서 일어난다. 그러므로 면역세포들의 거동을 생체조직 내에서 촬영하는 것이 중요하다. 다광자 현미경은 높은 촬영깊이를 갖고 있어 생체 조직 또는 기관 내 면역세포들의 상호작용을 관찰하였다 [18].

(c) cancer biology

암세포 암조직의 성장과정 및 다양한 치료법의 효능을 이해하기 위해서는 in vivo 암조직 영상촬영이 필요하다. 다광자 현미경은 암조직 내 암세포 및 혈관분포를 촬영할 수 있어 암조직의 성장환경에 대한 정보를 얻을 수 있고, 치료법의 효능 검사 및 이해에 도움이 된다. 다광자 현미경으로 암조직 내 혈관 분포, 혈관 형태, 혈류 변화 및 백혈구 흐름 등을 측정할 수 있어 이를 바탕으로 암 조직의 성장과정, 항암약물에 대한 반응 등을 연구하였다 [19].

(d) autofluorescence imaging

자가형광은 외부적인 형광표지 없이 촬영가능하다는 장점으로 인체에 적용이 가능하다. 자가형광을 바탕으로 피부 또는 다른 병변조직 샘플들이 연구되었다. 세포의 경우는 자가형광이 주로 cytoplasm에서 발생하므로 세포의 형태나 자가형광의 분광분석으로 구성물질에 분석되었고, 조직 구성물질인 collagen, elastin의 자가형광으로 피부의 노화, 약물의 효능 검증, 그리고 관련 질병 연구 등이 수행되었다.

3. 다광자 현미경의 현재 및 미래

다광자 현미경은 초기에는 물리학 실험실에서 자체 제작되었는데, 최근 메이저 현미경 회사들이 제품을 판매

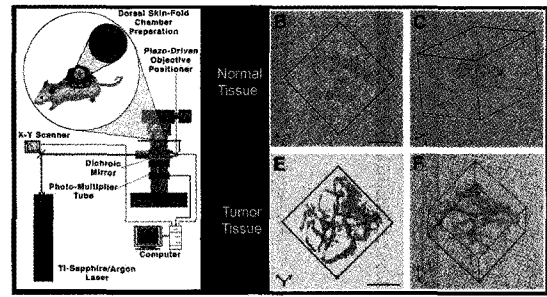


그림 7. mouse tumor dorsal model에서 암조직 내 혈관분포, 정상과 비교하여 혈관밀도가 높고 비정상적으로 자란 것이 보인다.

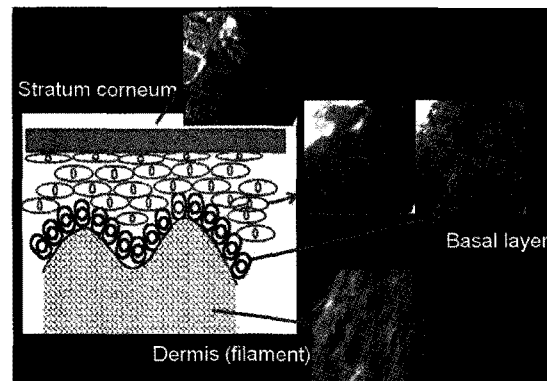


그림 8. 피부 조직의 자가형광 그림. 표피의 세포와 진피의 콜라겐들은 외부 표지자 없이 관찰할 수 있다.

하고 있고 물리학 배경지식이 없는 생물학 연구자도 쉽게 사용할 수 있게 되었다. 그러므로 다광자 현미경 기술은 개발 보다는 응용범위가 확장되는 성숙기에 들어섰다고 할 수 있다. 다광자 현미경은 형광표지 기술의 발전과 함께 다양한 동물모델이 개발되고 있어 동물모델 기반 연구는 계속 더 확장될 것으로 예상된다.

다광자 현미경이외에 다양한 비선형광학 영상기술이 개발되고 있다. 펄스 레이저를 이용하여 다광자 형광 이외에 second and third harmonic generation (SHG, THG) 이 가능하여 이를 이용하여 생체 조직의 더 많은 정보를 제공하고 있다. 예를 들면 SHG의 경우는 생체조직의 구조적지지 역할을 하는 콜라겐 정보를 제공하고 [20], THG의 경우는 굴절율의 변화가 있는 세포막의 분포를 제공한다 [21]. 이 두가지 coherent 기술은 생체 조직으로 광자 에너지 흡수가 없으므로 비침습적 영상이 가능하다.

형광 바탕이 아니라 라만신호를 증폭하는 다양한 비선형 현미경 기술들이 개발되었는데, 이들은 coherent Anti-Stokes Raman scattering (CARS) 현미경과

stimulated Raman scattering (SRS) 현미경 등이 있다 [22, 23]. 이들 기술은 intrinsic 라만 분광을 바탕으로 하므로 인위적 표지 없이도 세포 및 조직 구성물질들의 분자 정보를 제공한다. 다광자 현미경 기술이 위의 기술과 결합하면 생체조직의 다양한 정보를 함께 제공할 수 있어 이들의 결합기술 개발과 증가된 분자 정보를 바탕으로 더 많은 연구가 진행될 것으로 예상된다.

다광자 현미경이 기존 현미경에 비해 촬영깊이를 증대시켰지만 촬영깊이의 한계는 아직 생물학 응용연구에 지대한 제한을 준다. 그러므로 deep tissue imaging에 관한 연구는 계속되고 있다. 촬영깊이는 산란에 의해 제한을 받으므로 산란의 영향을 줄일 수 있는 긴 파장을 이용하기 위하여 근적외선 형광표지자 등이 개발되고 있다. 일례로 1280 nm 여기광을 사용하면 780 nm를 사용하는 경우보다 약 2배의 촬영깊이 (~1mm)를 얻을 수 있다는 것을 보였다 [24]. 형광광은 초점에서 isotropic 하게 발생하는데 대물렌즈에 의해 집속된 형광광 이외에 조직 바깥으로 빠져나온 형광광 집속을 통해 신호를 증대할 수 있는 방법이 개발되었다 [25]. 또한 적응제어 (adaptive optics)법을 적용하여 적층구조의 생체조직 촬영에서 발생하는 수차를 교정하여 촬영깊이를 높일 수 있는 방법도 개발되었다 [26].

자가형광 (autofluorescence) 영상: 자가형광 영상은 생체조직에서 여기 분광정보와 형광 분광정보를 제공하는 기술이다. 자가형광은 인위적으로 넣는 형광표지자에 비해 형광발생율이 매우 낮아 촬영이 어렵지만, 인공 표지자 적용과 관련된 어려움 또는 적용범위의 한계를 극복할 수 있다. 예로서 자가형광 영상은 조직에서 직접 optical 생검을 하거나 생검 조직에서 염색없이 질환 유무 파악등 적용가능한 범위가 있다.

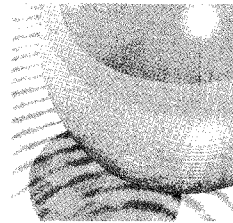
기존의 in-vivo imaging은 주로 마취상태에서 bulk 현미경을 이용해 진행하는 데 반해, 소형화를 통한 implantable probe을 이용하면 깨어있는 동물에서 세포나 분자정보의 변화를 관찰할 수 있다. 소형 implanted 다광자 현미경이 개발되었고 기술의 진보를 통한 더 많은 truly in vivo 영상이 기대된다.

4. 결론

다광자 현미경은 이미 in vivo deep tissue imaging에 최적기술로서 조직 내 세포거동 및 분자 정보 제공에 커다란 기여를 했다. 미래에도 다광자 현미경은 레이저 기술 발전과 엔지니어링 기술 발전에 힘입어 더 많은 기술 발전과 연구영역 확대가 예상된다.

참고문헌

- [1] Denk, W., Strickler, J.H. & Webb, W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76 (1990).
- [2] P. T. C. So, C. Y. Dong, B. R. Masters and K. M. Berland, "Two-photon excitation fluorescence microscopy" *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2(399-429 (2000)
- [3] W. R. Zipfel, R. M. Williams and W. W. Webb, "Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences," *Nat. Biotechnol* 21(11), 1369-1377 (2003)
- [4] J. M. Squirrell, D. L. Wokosin, J. G. White and B. D. Bavister, "Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability," *Nature Biotech.* 17(8), 763-767 (1999)
- [5] V. E. Centonze and J. G. White, "Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging," *Biophys. J.* 75(4), 2015-2024 (1998)
- [6] P. T. C. So, H. Kim and I. E. Kochevar, "Two-photon deep tissue ex vivo imaging of mouse dermal and subcutaneous structures," *Opt. Express* 3(9), 339-350 (1998)
- [7] B. Masters and P. T. C. So, "Confocal microscopy and multi-photon excitation microscopy of human skin in vivo," *Opt. Express* 8(1), 2-10 (2001).
- [8] K. H. Kim, C. Buehler and P. T. C. So, "High-speed two-photon scanning microscope," *Appl. Opt.* 38(28), 6004-6009 (1999)
- [9] G. Y. Fan, H. Fujisaki, A. Miyawaki, R.-K. Tsay, R. Y. Tsien and M. H. Ellisman, "Video-Rate Scanning Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy and Ratio Imaging with Cameleons," *Biophys. J.* 78(2412-2420 (1999)



- [10] J. Bewersdorf, R. Pick and S. W. Hell, "Multifocal multiphoton microscopy," *Opt. Lett.* 23(9), 655-657 (1998)
- [11] A. H. Buist, M. Muller, J. Squier and G. J. Brakenhoff, "Real time two-photon absorption microscopy using multi point excitation," *J. Microsc.-Oxf.* 192(217-226 (1998)
- [12] K. H. Kim, C. Buehler, K. Bahlmann, T. Ragan, W.-C. A. Lee, E. Nedivi, E. Heffer, S. Fantini and P. T. C. So, "Multifocal multiphoton microscopy based on multianode photomultiplier tubes," *Opt. Exp.* 15(18), 11658-11678 (2007)
- [13] W. Denk, K. R. Delaney, A. Gelperin, D. Kleinfeld, B. W. Strowbridge, D. W. Tank and R. Yuste, "Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser-scanning microscopy," *Journal of neuroscience methods* 54(2), 151-162 (1994)
- [14] F. Helmchen, K. Svoboda, W. Denk and D. W. Tank, "In vivo dendritic calcium dynamics in deep-layer cortical pyramidal neurons," *Nature Neuroscience* 2(11), 989-996 (1999)
- [15] J. Grutzendler, N. Kasthuri and W.-B. Gan, "Long-term dendritic spine stability in the adult cortex," *Nature* 420(19), 812-816 (2002)
- [16] W. C. Lee, H. Huang, G. Feng, J. R. Sanes, E. N. Brown, P. T. C. So and E. Nedivi, "Dynamic Remodeling of Dendritic Arbors in GABAergic Interneurons of Adult Visual Cortex," *PLoS Biol.* 4 (2), e29 (2005)
- [17] R. Christie, B. Bacskai, W. Zipfel, R. Williams, S. Kajdasz, W. Webb and B. Hyman, "Growth arrest of individual senile plaques in a model of Alzheimer's disease observed by in vivo multiphoton microscopy," *J. Neurosci.* 21(858-864 (2001)
- [18] M. Cahalan, I. Parker, S. Wei and M. Miller, "Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light," *Nat. Rev. Immunol.* 2(872-880 (2002)
- [19] T. P. Padera, B. R. Stoll, P. T. C. So and R. K. Jain, "Conventional and High-Speed Intravital Multiphoton Laser Scanning Microscopy of Microvasculature, Lymphatics, and Leukocyte-Endothelial Interactions," *Molecular Imaging* 1(9-15 (2002)
- [20] S. W. Teng, H. Y. Tan, J. L. Peng, H. H. Lin, K. H. Kim, W. Lo, Y. Sun, W. C. Lin, S. J. Lin, S. H. Jee, P. T. C. So and C. Y. Dong, "Multiphoton autofluorescence and second-harmonic generation imaging of the ex vivo porcine eye," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47(3), 1216-1224 (2006)
- [21] D. Yelin and Y. Silberberg, "Laser scanning third-harmonic-generation microscopy in biology," *Opt. Express* 5(8), 169-175 (1999)
- [22] A. Zumbusch, G. R. Holtom and X. S. Xie, "Vibrational microscopy using coherent anti-Stokes Raman scattering," *Phys. Rev. Lett.* 82(4014 (1999)
- [23] C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang and X. S. Xie, "Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy," *Science* 322(1857-1861 (2008)
- [24] D. Kobat, M. E. Durst, N. Nishimura, A. W. Wong, C. B. Schaffer and C. Xu, "Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation," *Opt. Express* 17(16), 13354-13364 (2009)
- [25] C. A. COMBS, A. V. SMIRNOV, J. D. RILEY, A. H. GANDJBAKHCHÉ, J. R. KNUTSON and R. S. BALABAN, "Optimization of multiphoton excitation microscopy by total emission detection using a parabolic light reflector," *J. Microsc.* 228(Pt 3), 330-337 (2007)
- [26] N. Ji, D. E. Milkie and E. Betzig, "Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues," *Nat. Methods* 7(2), 141-147 (2009)

약 력



김기현

- 2009년 1월-현재 포항공과대학교 기계공학과/융합생명공학부 조교수
- 2005년 6월 Harvard Medical School/Massachusetts General Hospital, Postdoctoral Research Fellow
- 2005년 4월 Massachusetts Institute of Technology 기계공학과, 공학 박사
- 1996년 2월 서울대학교 기계설계학과, 공학 석사
- 1994년 2월 서울대학교 기계설계학과, 이학사