

Phantom에서 Laser Induced Fluorescence의 스펙트라에 관한 연구

김기준 · 성기천

대진대학교 공과대학 화학공학과
(1999년 11월 23일 접수 : 1999년 12월 7일 채택)

A Study on Spectra of Laser Induced Fluorescence in Phantom

Ki-Jun Kim · Ki-Chun Sung

Dep. of Chemical Eng., Daejin Uni., Pochun 487-711, Korea
(Received November 23, 1999 : Accepted December 7, 1999)

Abstract : The influences of fluorophor, scatterer, and absorber in turbid material by light scattering were interpreted for the scattered fluorescence intensity and wavelength. The molecular properties have been studied by laser induced fluorescence spectroscopy in phantom. It has been found that the effects of optical properties in scattering media could be investigated by the optical parameters(μ_s , μ_a , μ_t). Experimental and Monte Carlo Simulation method for modelling light transport in tissue was applied. The experimental results using a phantom were discussed and compared with those obtained through Monte Carlo Simulation. It may also aid in designing the best model for oil chemistry, medicine and application of medical engineering.

1. 서론

오늘날 종양에 대한 분자생물학적인 연구와 면역학의 발전에 따른 원인과 치료법은 끊임없이 연구되고 있으나 외과적인 수술시 종양조직을 완전히 제거하지 못할 뿐만 아니라 방사선 치료와 약물요법에서 항암제의 대부분이 높은 독성을 가지고 있기 때문에 종양세포 뿐만 아니라 정상세포에도 작용하여 부작용을 줄 수 있다.¹⁻³ 이러한 문제점을 해결하기 위하여 항암제를 암조직에만 선택적으로 수송하여 치료함은 물론, 정상조직에 영향을 미치지 않게 하려는 연구들이 많이 진행되고 있다.⁴⁻⁶

이에 1985년 Dougherty가 Photodynamic Therapy (PDT)에서 인체에 생기는 많은 종양에 대해 새로운 치료 모델링⁷을 제안 하였으나, 지금까지 이 분야에 대한 연구는 그 필요성 때문에 주로 생의학 분야에서 활발히 진행되고 있으나 아직 초기 단계에 있다. 따라서 이 분야에 대한 기초를 정립하여 급격히 발전하게 될 Laser induced fluorescence (LIF) spectroscopy의 biomedical 응용에서 종양의 진단 및 치료에 효과적으로 이용할 수 있도록 모델링을 세우기 위해 본 연구를 수행하게 되었다.

산란 매질에서 빛 에너지 전파가 diagnostic spectroscopy의 발전과 therapeutic laser delivery의 dosimetry에서, PDT의 임상실험과 photobiology 등의 여러 분야에 응용되나, 특히 살아 있는 tissue에서의 비파괴적 흡수 및 산란성질의 측정은 광학적 특성을 결정하는 데 가장 중요한 문제이다.^{8,9} 40°C에서 50°C사이에는 효소들과 단백질의 작용기에서 변질과 비가역적 뭉침이 일어나고, 60°C에서 70°C사이에서는 교원질 변질이 생기며 부차적인 결손이 일어난다고 보고된 바 있다. 따라서 정확한 량의 빛을 쏘여 주어도 조직에 전달된 빛 중에서 약간의 차이에 따라 효과적일 수도 있으며, 또는 비효과적, 치명적인 손상을 입히게 되는 치료가 될 수도 있다.¹⁰

이에 본 연구의 제 일차목적은 scattering media에서의 fluorescenced spectral lineshape가 산란체, 형광체, 흡수체의 성질, optical geometry에 대한 토대를 세우기 위해 실험과 Monte Carlo simulation¹¹을 하여 비교 분석하는 것이다. 부차적으로 수반되는 목적은 laser와 광섬유와의 연결기술 개발¹²⁻¹⁵, 또한 광섬유를 이용한 light delivery 등을 개발하는 것이다.

II. Scattering 실험

인체의 세포조직은 lipid가 주성분으로 산란체이고, 흡수체(melanin, hemoglobin)가 함유되어 있으며, 항암제가 대부분 형광물질이기 때문에 형광체로 hematoporphyrin derivative (HPD)와 Rhodamine 6G (RA-6G)를 사용했다. 실험은 single line mode의 argon ion laser를 사용하였고 (미국 Coherent社, Innova70 파장 514.5 nm) 형광은 520 부터 900 nm 사이에서 측정하였다. Laser beam을 산란체(intralipid), 형광체(RA-6G), 흡수체(india ink)가 들어 있는 모의 시스템에 비추며, 광섬유(4 mm 직경)를 사용하여 측정된 빛을 모아서 photomultiplier로 검출하며, photon counter로 photon intensity를 측정하였다. 실험장치는 Fig. 1과 같다. 산란된 빛은 광섬유를 통하여 neutral density

scattering coefficient, μ_s 는 total attenuation coefficient, 즉 $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ 이며, μ_a 는 absorption coefficient이다. Monte Carlo simulation을 이용하여 μ_s , μ_a 등의 변수들을 체계적으로 변화시키며 산란광의 행적을 조사했다. Scattering process에 대한 Monte Carlo simulation의 model geometry는 Fig. 2와 같다.

Model geometry는 인체 치아에서 치관을 덮는 조직인 에나멜에 비교된다. 튼튼한 에나멜은 투명하나, 초기의 충치는 에나멜 안쪽의 구조적 변화가 일어나 에나멜에 검은 반점이 생긴다. 치아의 광학 parameters의 측정은 충치 과정의 단계를 나타낸다.¹⁶⁾

Monte Carlo simulation의 computer program은 광자의 산란에서 행동을 관측하기 위한 simulation이다. Computer program은 크게 scattering simulation

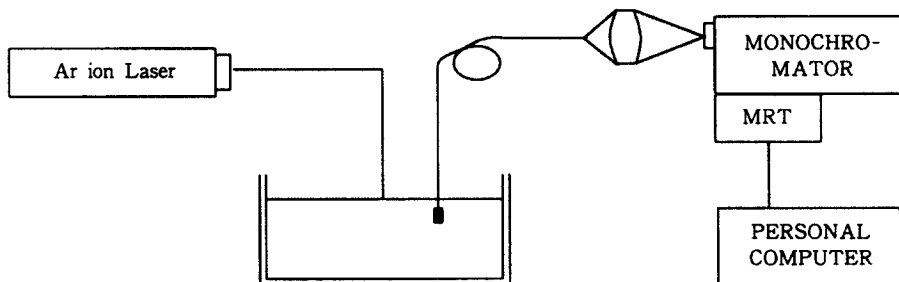


Fig. 1. Diagram of experimental apparatus

filter를 지나 Monochromator(SPEX, model 1870, 50cm focal, length, groove 1800개/mm)에 들어가는데 Monochromator의 파장은 minidrive(SPEX, model 1872)로 작동하며, Monochromator에 연결된 Photo multiplier tube(products for Research사, model RCA31034A)의 thermal noise를 줄이기 위해 수냉식과 DC power supply를 이용하여 -20°C를 유지해 주었다.

III. Monte Carlo Simulation

Monte Carlo simulation을 이용하여 광자의 행적, 성질, 생성, 소멸 등을 albedo ($a = \mu_s / [\mu_s + \mu_a]$)와 photon source geometry를 변수로 이용하여 확산에 의한 computer simulation을 하는 방법을 사용하였다.^{16, 17)} 빛의 전송부분에 있어서 광자들이 산란되거나 흡수되는 경로를 기록하는데, 여기서 μ_s 는

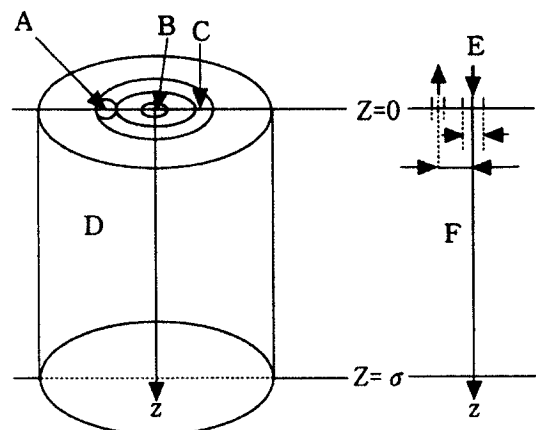


Fig. 2. Geometry to measure the reflected light as a function of the distance to an incident beam
A: measuring area, B: source, C: detection ring, D: scattering volume, E: incident beam, F: scattering medium

program들과 image processing부분으로 나눌 수 있는데, 본 program은 C언어로 작성하였으며 산란, 형광과 흡수에 대한 photon flux의 transport 과정을 다룬다.

본 연구에서 scattering simulation program의 code는 약 1,400줄로 작성하였으며, scattering program의 설계원리는 다음과 같다.

첫째: 초기의 입사광의 성질을 결정한다. Source로 부터 입사되는 광자는 등방적 phase function으로부터 통계적으로 방향 등에 대한 광자의 성질을 부여한다. Random number는 0과 1사이 값을 갖는다.

둘째: 한번 산란되는 구간을 정한다. 매질로부터 광자가 이탈되는 것을 고려하면 광자는 처음 위치에서 충돌에 의해 다음 산란체가 있는 위치로 진행할 때 거리의 함수로서 나타낼 수 있다. 입자간의 거리를 나타내는 평균 자유 행로(mean free path)의 stepsize는 total attenuation coefficient의 역이다.

산란된 구간을 다음식으로 나타낼 수가 있는데,

$$\Delta S = \frac{1}{\mu_t} = \frac{1}{\mu_a + \mu_s} \quad (1)$$

stepsize가 모의 계에서 아주 작아지면 광자는 상호작용(산란과 흡수)을 못한다. 광자는 진행하는 방향에 따라 3개의 공간좌표와 2개의 방향 각도로 설명할 수 있으며, (x, y, z)위치에서 ΔS가 움직인 거리 (μ_x, μ_y, μ_z)에 따라 새로운 좌표 (x', y', z')에 의해 나타내면 아래와 같다.

$$\begin{aligned} x' &= x + \mu_x \cdot \Delta S \\ y' &= y + \mu_y \cdot \Delta S \\ z' &= z + \mu_z \cdot \Delta S \end{aligned} \quad (2)$$

셋째: 진행된 빛의 세기, 비행거리, 위치등을 계산한다. 빛이 입사됨에 따라 매질에서 광자의 순수한 흡수가 일어나며 최초의 광자의 질량을 1로 간주하면 경로에 따라 감소한다. 광자가 경계를 통해 매질에 입사됨에 따라 굴절률이 다른 영역에서 내부 반사(internal reflection)가 일어난다. 이는 Fresnel reflection 방법에 의해 아래와 같이 주어진다.

$$R(\theta) = \frac{1}{2} \left\{ \frac{\sin^2(\theta_i - \theta_t)}{\sin^2(\theta_i + \theta_t)} + \frac{\tan^2(\theta_i - \theta_t)}{\tan^2(\theta_i + \theta_t)} \right\} \quad (3)$$

윗 식에서 θ_i = cos⁻¹(μ_z)는 경계에서 입사각이고 θ_t는 Snell 법칙에 의한 반사된 각도이다.

$$n_i \sin \theta_i = n_t \sin \theta_t \quad (4)$$

광자가 내부적 반사를 하지 않으면 광자는 phantom을 빠져 나가거나 backscattering light나 transmitted light가 된다. 또한 광자가 내부반사를 하면 광자의 위치와 방향이 변하며, phantoms geometry에서 x, y 방향은 무한이고, z 방향에서 두께만이 변한다. 내부적으로 반사된 광자는 현 광자 위치 (x', y', z')에서 새로운 광자의 위치 (μ_x, μ_y, -μ_z)로 진행함에 따라 (x', y', z') = (μ_x, μ_y, -μ_z)와 같이 나타낼 수 있다.

네째: 광자의 위치가 산란체 밖이거나 세기가 0이 되면 비행을 중지 한다. 대부분 표면반사(surface reflection)에 따른 확산이 일어나지 않는 조건은 매질의 두께 d에서 표면 z = 0 과 바닥 z = d를 경계조건이라 간주하면 다음 식으로 나타낼 수 있다.¹⁰⁾

$$\int_{2\pi, \mu' > 0} L_d(r, s)(s, z) d\omega = 0 \quad (5)$$

윗 식에서 경계조건 밖이란 산란체 밖을 의미하며 광자의 경로 길이는 0이 된다. 광자의 weighting scheme은 매질에서 순수한 absorption을 설명할 수 있으며, 질량은 1이고 광자가 경로에 따라 순수한 흡수가 감소됨을 감안한다. 광자 packet는 흡수와 산란 두 부분으로 구분하며, 흡수되는 packet의 분율은 다음 식으로 주어진다.

$$\text{fraction absorbed} = \frac{\mu_a}{\mu_a + \mu_s} = 1 - \frac{\mu_s}{\mu_a + \mu_s} = 1 - a \quad (6)$$

여기서 a는 입자의 albedo이다. 새로운 광자의 질량 ω' = a · ω, 이는 새로운 단계에서 산란되어진 packet의 분율을 나타낸다. 즉 흡수는 흡수된 빛의 량과 위치에 관계됨을 알 수 있지만 특히, 광자는 (1 - a) · ω가 0이 될 때까지 비행한다.

다섯째: 광자는 현재의 위치, 방향 및 계의 성질에 의해 새로운 산란구간을 진행한다. 광자의 위치와 운동 방향은 공간 좌표에 의해 다음과 같이 주어진다.

$$\begin{aligned} \omega &= \cos(\theta) = \text{reldir}[2] \\ v &= \cos(\varphi)\sin(\theta) = \text{reldir}[1] \\ u &= \sin(\varphi)\sin(\theta) = \text{reldir}[0] \end{aligned} \quad (7)$$

현재의 광자위치 (x, y, z)와 새로운 광자의 위치 (x', y', z')는 아래 식으로 나타낼 수가 있다.

$$\begin{aligned} x' &= x + \Delta S \cdot u \\ y' &= y + \Delta S \cdot v \end{aligned} \quad (8)$$

$$z' = z + \Delta S \cdot \omega$$

광자는 (x, y, z) 위치와 방향 (θ, ϕ)에서 새로운 위치 (x', y', z')와 방향 (θ', ϕ')으로 산란에 의해 진행함을 알 수 있다. 광자가 현재의 산란되는 점에서 광섬유에 도달하는 확률밀도 IP는 다음식과 같다.

$$IP = \omega \cdot P(\mu_0) \cdot d\omega_0 \cdot \exp[-(\rho\sigma_s + a) \cdot z_0] \quad (9)$$

여기서 ω=photon의 질량, P(μ₀)=phase function, μ₀는 산란되기 전 광자의 방향사이 cosine각도로 표현 z=0에 수직이고, dω₀는 시료에서 검출기의 solid angle z₀=scattering의 depth를 뜻한다. 따라서 exp[-(ρσ_s + a) · z₀]는 현재 위치에서 산란, 흡수되지 않고 검출기에 도달하는 확률이다.

여섯째; 세번째의 과정으로 돌아간다. 광자 무게가 거의 영(0)에 도달하면 비행을 중지하고 산란에 의해 광자 무게가 회복되어 순환을 계속하게 되는 기법을 Roulette라고 한다. 이러한 일련의 Roulette 결과에 의해 매질에 입사된 빛이 광섬유에 검출되어 광자 세기를 나타낸다.

결론적으로 확산이론은 광자 flux가 산란체를 확산해 가는 것으로 확산방정식을 분석적으로 푸는 방법이다.¹⁵⁾ 다음 식은 collimated pulsed light 빔이 semi-infinite 또는 finite의 균일한 입자의 매질에 입사된 경우에서 확산 식으로 다음과 같다.

$$\frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} (\phi(r, t)) - D \cdot \nabla^2 \phi(r, t) + \sigma_a \cdot \phi(r, t) = S(r, t) \quad (10)$$

여기서 φ(r, t)는 diffuse photon fluence rate로 source-detector 간의 거리(r)와 시간(t)의 함수로 나타내며, c는 이 매질에서의 광속도이며, σ_a는 linear absorption coefficient을 뜻한다. D는 diffusion coefficient로서 다음과 같다.¹⁹⁾

$$D = [3(\sigma_a + \mu_s)]^{-1} \text{ 이고} \quad (11)$$

μ_s = (1-g)σ_s, transport scattering coefficient

σ_s = linear scattering coefficient

g = scattering angle의 평균 cosine

S(r, t) = photon source

산란계의 행동을 관측하기 위한 본 프로그램은 광자가 시료 속에서 생성되어 진행되는 산란, 흡수, 형광에 의해 생성되거나 소멸되고 내부적으로 반사, 투과된 진로에 따라 광자의 세기, 비행거리, 위치 등을 계산하였다. Scattering process에 대한 Monte Carlo simulation의 program process는

Fig. 3과 같다.

IV. 결과 및 고찰

산란체인 intralipid의 scattering coefficient를 결정하기 위해 intralipid의 농도 변화에 따라 산란되지 않은 빛의 양을 측정 하였으면, Added Absorber Technique¹⁴⁾을 사용하여 total attenuation coefficient(μ_t)는 산란 입자만 존재하기 때문에 scattering coefficient(μ_s)에 일치한다. 전체 attenuation coefficient측정은 single scattering만이 일어나도록 하기 위해 매우 묽은 농도에서 실험하였고, 산란되지 않고 나오는 light detection의 각도를 작게 하기 위해 iris를 사용하였다.

μ_s를 측정하기 위한 공식은 다음과 같다.

$$I = I_0 \exp(-\mu_s C d) \quad (12)$$

여기에서 C는 농도를 뜻하고, d는 cuvette의 직경, I는 irradiance (W/m²), I₀는 입사 irradiance를 뜻한다. 그러므로 scattering coefficient μ_s는 다음 식으로 나타낸다.

$$\mu_s = \frac{1}{d} \cdot \frac{\partial \ln(I/I_0)}{\partial C} \quad (13)$$

HPD는 정상세포에 비해 세포분열이 왕성한 종양세포 및 종양세포가 전이된 세포에 특이적으로 결합하는 능력이 있다.

자외선이나 빛을 쬐어 활성화시키면 특이한 형광을 발생하므로 종양 및 종양세포가 전이된 곳의 위치를 확인할 수 있다.

광활성 작용이란 어떤 물질이 빛을 흡수하여 산화될 수 있는 조건(oxidative condition: dye + light + oxygen)하에서 biological molecule system을 변화시키거나 파괴시키는 작용을 뜻하며 singlet oxygen에 의해 photodynamic therapy(PDT)결과를 얻어 낼 수가 있다.¹⁵⁾ Singlet oxygen의 메커니즘은 아래와 같다.

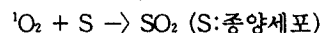
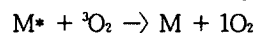


Fig. 4는 항암제인 HPD를 산란체(intralipid)와 HPD, HPD+산란체+india ink가 들어 있는 phantom 속에서 산란 세기를 측정하여 도시한 것이다. Beer

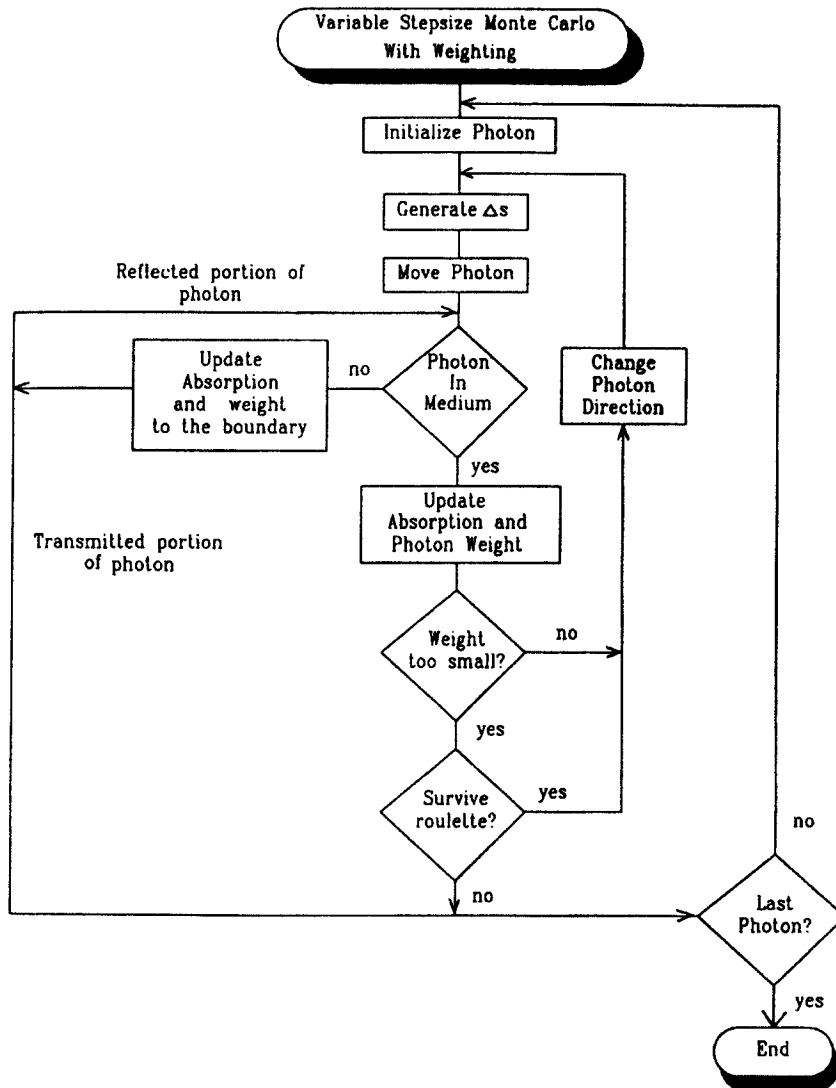


Fig. 3. Monte Carlo simulation program process

범칙에서 벗어난 결과로서 산란체의 입자가 많을수록 광자 세기가 증가하였고, 이는 backscattered retroreflectance의 영향이라고 사료된다.

실험과 비교 분석할 수 있는 simulation방법은 일정한 geometry에서 입사하는 광자의 방사를 측정하여 얻을 수 있다. 굴절된 광자가 매질성질에 의해 산란되거나 흡수가 되고, 광자가 내부 반사를 하지 않으면 계 밖으로 이탈함으로 소멸된다. 따라서 Program은 특정시간이나 공간에서 산란된 광자들의 위치와 방향, 또는 흡수된 광자들의 위치를 알려주게 된다(Fig 5).

Fig. 5는 광자 100개가 윗면으로부터 거리

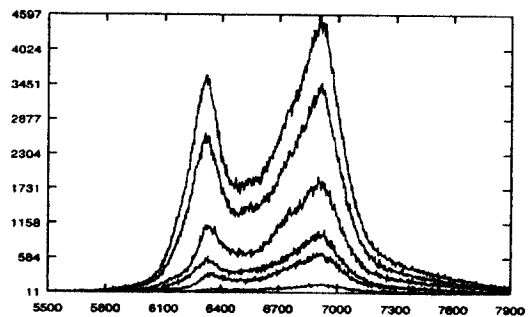


Fig. 4. Fluorescence lineshapes of phantoms as a function of depth (Y axis : Intensity, X axis: Wavelength).

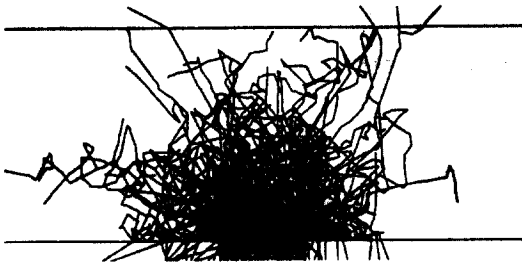


Fig. 5. Propagation pattern of photons(number of photons, 100) in scattering media. ($\mu_s = 25.0\text{mm}^{-1}$, $\mu_a = 3.0\text{mm}^{-1}$, $z = 1.0\text{mm}$)

0.5mm에 입사하여 진행되는 과정을 나타낸다. 광자 하나가 입사하면 산란계수와 흡광도에 의하여 결정되는 albedo와 난수발생기(random number generator)에 의해 진행된다. 한번의 진행 후 광자의 세기는 흡광도에 따라 감소하게 되며 다시 산란계수와 흡광도, 현재의 진행 방향 및 난수발생기의 숫자에 따라 정해지는 방향과 길이로 진행하게 된다. 일정한 세기로 감소할 때까지 광자는 계속 산란, 흡수 과정을 진행한다. 일정한 세기 이하로 내려가면 그 후의 광자는 산란과 흡수 중 하나로 선택해서 광자가 완전 흡수되거나 산란계 밖으로 빠져 나올 때까지 반복한다. Fig.5는 Monte Carlo simulation에 의해 광자가 intralipid의 phantom속에 입사 될 때부터 검출기에 닿을 때까지의 깊이에 대하여 레이저를 이용한 광원과 광섬유간의 거리를 1.0cm로 고정해 놓고, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0cm의 길이에서 광자수가 동시에 혼탁매질에 입사되는 경우의 simulation 결과이다. 이때 총 입사된 광자의 수는 10,000개이며, 그 중 8,906개, 89%는 흡수되었다. 1,094개가 위쪽에 있는 광섬유에 잡혔으며, 내부반사는 10,081개로 나타났다. 이들의 광자에 대한 분포를 조사하면 매질에서 깊이가 가까우면 산란 세

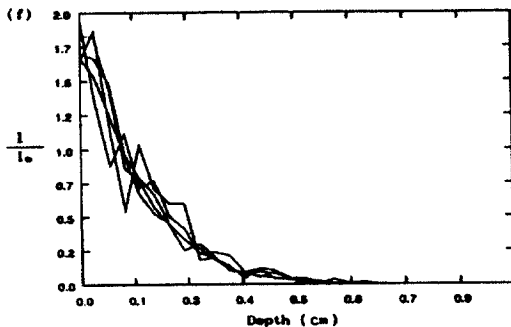


Fig. 6. The Simulation Scattered light versus depth to show image processing of total energy fluence rate.

기가 증가하고, 깊이가 커지면 산란 세기가 감소함을 알 수 있다. 따라서 광자수를 많이 simulation의 대상으로 할수록 편차가 적고 정확도가 커짐을 알 수 있다.

Scattering media 안에서 광원과 광검출을 하는 광섬유까지 광분포를 분석한 결과 거의 일치함을 알 수 있었다. Fluorescence lineshape의 변화는 이론 및 실험 두 방법에서 거의 일치함을 알 수 있었다.

V. 결론

Phantom속에 레이저 빛이 입사됨에 따라 광원으로 부터 광자를 검출하는 광섬유까지 거리나 깊이가 가까울수록 산란세기가 증가하였다. 산란체, 흡수체 및 광증감제인 HPD에서 스펙트럼의 선모양은 광학적 파라미터의 경향을 알 수 있으며 산란체가 증가할수록 광자세기가 증가하였다. Monte Carlo simulation에 의해서 계산된 값과 실험결과가 일치함을 보였다. 따라서 의공학분야에서 레이저와 광섬유의 연결기술 개발 및 light delivery의 개발 등에 기초를 세울 수 있다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 대전대학교 교내연구의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. R. R. Meier, J-S. Lee and D. E. Anderson, *Appl. Opt.*, **17**(20), 3216(1978).
2. J. Langerholm, *ibid.*, **18**(13), 2286(1979).
3. W. E. Meader and W. R. Weaver, *ibid.*, **18**(8), 1204(1979).
4. L. O. Svaasand and Reinold Ellingsen, *Photochem. photobiol.*, **39**(3), 293(1983).
5. P. S. Mudgett and L. W. Richards, *Appl. Opt.*, **10**(7), 1485(1971).
6. L. G. Henyey and J. L. Greenstein, *Astrophysical J.*, **93**, 70(1941).
7. T. J. Dougherty, *Clin. Chest. Med.*, **6**, 219(1985).
8. L. O. Svaasand, C. J. Gomer, and A. E. Profio,

- Appl. Opt.*, **28**(12), 2250(1989).
9. S. L. Jacques, C. A. Alter, and S. A. Prahl., *Las. L. Sci.*, **1**(4), 309(1987).
 10. S. L. Jacques, and S. A. Prahl, *Las. Surg. Med.*, **6**, 494(1987).
 11. R. G. Giovanelli, *Opt. Acta.*, **3**(3), 127(1956).
 12. R. A. J. Groenhuis, H. A. Ferwerda, J. J. T. Bosch, *Appl. Opt.*, **22**(16), 2456(1983).
 13. R. A. J. Groenhuis, H. A. Ferwerda, J. J. T. Bosch, *ibid.*, **22**(16), 2463(1983).
 14. V. L. Balykin, V. S. Letokhov, V. L. Mishin, and V. A. Semchishen, "Laser Detection of Single Atom Fluorescence", *JETP Lett.*, **26**(6), 357-361 (1977).
 15. Chares J. Gomer and Thamas J. Dougherty, "Determination of [H]-and [14C] Hematoporphyrin Derivative Distribution in malignant and Normal Tissue", *Cancer Research* **39**, 146-151 (1979).
 16. W. A. G. Bruls and J. V. Leun, *Photochem. Photobiol.*, **40**(2), 231(1984).
 17. R. R. Anderson and J. A. Parrish, *J. Inv. Derm.*, **77**, 13(1981).
 18. R. E. Wharen, R. E. Anderson, and E. R. Laws, *Neurosurgery* **12**, 446(1983).
 19. R. Richards-Kortum et al., *Spectrochim. Acta* **45A**, 87(1989).