

마이크로 전자빔 개별 세포 조사 장치 개발

Development of the Electron Microbeam System for Individual Cell Irradiation

선광민, 정진원*, 송기백, 이동훈, 박승우**, 김은희, 최희동*

원자력의학원

서울 노원구 공릉동

* 서울대학교 원자핵공학과

서울 관악구 신림동

** 인하대학교 전자공학과

인천시 남구 용현동

요 약

저선량 방사선 영향 평가를 위한 마이크로 전자빔 개별 세포 조사 장치가 원자력의학원에 건설 중이다. 조사 장치는 전자빔 발생 장치, 빔 전송 장치, 세포 조사대와 세포 영상 획득 및 세포 위치 제어 장치로 구성된다. 본 논문에서는 빔 계측 장치를 중심으로 조사 장치의 특성을 기술하였다. 표적 세포에 입사하는 전자빔속 및 에너지 검출 방안을 제시하였고, 전자빔 발생 장치와 빔 전송 장치의 기능성을 검증하였다.

Abstract

A new electron microbeam system for cell study is under construction at Korea Institute of Radiological and Medical Science (KIRAMS) on purpose of the low-dose radiation effect. The system consists of electron-emission system, a beam transport chamber, a cell-irradiation stage, and an image acquisition and position control system of the cells. In this paper, the characteristics of the system by giving a special attention on the beam detection system are described. A detection method for the electrons incident upon the cell has been suggested. The electron gun and the beam transport chamber have been confirmed in their function.

1. 서 론

방사선의 인체 상해 효과를 규명하는 것은 방사선 방호 분야의 오랜 숙제로서 그동안 축적된 방사선의 생물학적 영향에 대한 연구 결과는 방사선 안전 규제나 법규 설정 시 반영되어 왔다. 그러나 방사선의 결정적 효과가 나타나는 중·고선량에서의 생물학적 영향에 대해서는 비교적 잘 알려진 반면 확률적 효과가 중요해지는 저선량 또는 극저선량에서의 방사선 효과와 관련하여서는 아직 여러 가지 가설이 양립하고 있는 것이 사실이다. 저선량 방사선에 대하여는 유의한 영향이 있는 것인가 하는 근본적인 것으로부터 영향성이 관찰되더라도 그 자료가 통계적 유의성을 가질 정도의 반복적이고 안정적인 실험이 가능한가 하는 등의 다양한 질문이 제기되고 있다. 이러한 상황에서 최근, 세포의 방사선 피폭 여부를 확인하고 개별 세포의 방사선 피폭량을 정량적으로 조절할 수 있는 획기적인 방사선 조사 장치가 개발됨으로써 저선량 방사선의 생물학적 영향 연구에 활용되고 있다.

마이크로빔 조사 장치 개발은 1920년 Tschachotin에 의해 X선과 자외선을 성계알과 개구리 알에 조사시키는 연구로부터 시작되었다.¹⁾ 1953년 Zirkle과 Bloom 등에 의해 장치에 대한 구체적 설계와 개발이 수행되었고,²⁾ 이 장치에서는 반테그라프 가속기로부터 생성된 빔 직경 2.5 μm 의 2 MeV 양성자 빔을 사용하였다. 하지만 세포에 입사하는 입자 개수 측정이 불가능하였기 때문에 세포 흡수선량을 정확히 평가하기 어려웠다. 이후 알파, 양성자, 중양자 및 헬륨 빔 등을 이용한 다양한 장치들이 시도되었고 1963년에 4배 광학 렌즈의 출현과 함께 새로운 빔 집속 시스템이 개발됨으로써 한 단계 진보하였다.³⁾ 1970년에는 처음으로 주사 양성자 마이크로프로브(microprobe)가 개발되었으며 그로부터 10년 후 중이온 마이크로프로브가 개발되어 세포 관찰이 용이하게 되었다.

현재 미국 Columbia 대학교 RARAF,⁴⁾ Texas A&M 대학교,⁵⁾ 영국 Gray 연구소⁶⁾에서 마이크로빔 세포 조사 장치가 방사선 영향 연구에 이용되고 있고 일본과 유럽 여러 나라에서 십여 개의 장치 개발이 진행되고 있다. 상기한 미국과 영국의 세 기관에서 운영하고 있는 마이크로빔 세포 조사 장치는 high-LET 방사선인 알파선과 양성자 빔을 사용하고 있고 영국의 Gray 연구소는 X선 마이크로빔 조사 장치도 운영하고 있다. Low-LET 방사선인 전자빔에 의해서도 주변 세포 효과(bystander effect)와 유전적 불안정성(genomic instability)이 관찰될 것인가에 대한 세계 연구진의 관심이 지대한 가운데 마이크로 전자빔 세포 조사 장치의 완성에 대해서는 아직 발표된 바가 없다. 전자빔의 특성상, 빔 수송 시 자장에 의한 영향을 크게 받고 세포 입사 전자의 수를 실시간으로 측정하기 어려운 점등 전자빔을 이용한 개별 세포 조사 장치 구축 과정에서 해결해야 할 문제들이 산재한 것이 사실이다.

마이크로 전자빔 세포 조사 장치는 in-vitro 상에서 세포를 선택적으로 조사할 수 있는 저에너지, 저속 전자빔 조사 장치로서 0.2 Gy 이하의 저선량 방사선의 세포에 대한 영향성 연구에 사용될 목적으로 제작되고 있다.⁷⁾ 본 논문에서는 표적 세포에 입사하는 전자빔 속 및 에너지 측정 방안과 전자빔 발생 장치 및 빔 전송 장치의 기능성 검증 내용을

기술하였다.

2. 마이크로 전자빔 개별 세포 조사 장치 개요

마이크로 전자빔 개별 세포 조사 장치의 개략적 구성은 그림 1과 같다.^{8,9)} 장치의 구성 요소는 (1) 전자빔 발생 장치인 전자총(electron gun), (2) 전자빔 전송용 진공함(beam transport chamber), (3) 세포 조사대(cell-irradiation stage) 및 (4) 세포 영상 획득 제어(cell image acquisition) 및 세포 위치 제어(cell position control) 장치로 구성된다. 전자총의 기능 특성은 표 1과 같다. 10 keV ~ 100 keV 영역의 가용 에너지를 제공하는 전자 선원 장치에 대한 요건은 타 학술지에 게재된 논문에서 설명한 바 있다.¹⁰⁾ 전자총은 펄스 발생기를 이용하여 펄스 모드로 운전 가능하다. 진공함에는 패러데이컵(Faraday cup), 직경 2 mm의 일차 시준기(1st collimator)가 설치되어 있으며, 진공함 전반부에 선택적으로 micro-channel plate (MCP)가 삽입될 수 있도록 제작하였다.⁹⁾ 진공함 출구에는 직경 5 μm pin-hole이 설치되어 최종 인출 빔의 크기를 결정한다. 전자총과 진공함에는 각각 30 ℓ/sec 용량의 터보분자펌프(turbo molecular pump)가 부착되어 있다. 장치의 기본 진공도는 전자총에서 3.0×10^{-7} torr, 진공함에서 2.4×10^{-6} torr를 유지한다. 전자총 및 진공함 구성에 대하여는 참고문헌 [8]에서 상세히 기술하였다. 세포 조사대에는, 바닥 물질이 마일라로 제작된 세포 배양 용기(cell culture dish)가 놓이고 세포 용기 내 세포의 영상을 CCD 카메라로 인식하여 각 세포의 빔에 대한 상대 위치를 기록한다. 조사 표적 세포들을 전자빔 출구 상단에 순서대로 이동하고 정한 크기의 빔 속을 조사하는 작업은

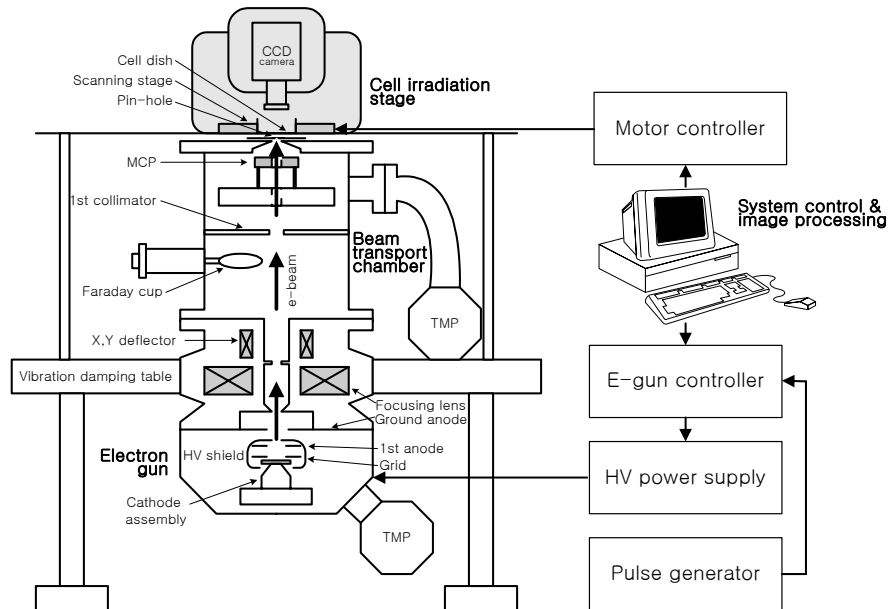


Fig. 1. Schematic diagram of the electron microbeam cell-irradiation system.

Table. 1. Specification of electron gun.

Parameter	Specification
Provider/model	Kimball Physics, Inc./EGH-8102B
Gun dimension	length : 750 mm, diameter : 151 mm
Cathode type	Thoria-coated (thorium oxide, ThO ₂) iridium
Beam energy	1 ~ 100 keV (independently adjustable)
Beam current	100 pA ~ 100 nA
Spot size	500 μm ~ 1 cm
Pulse capability	pulse width 2 μs to DC, repetition rates up to 1 kHz
Beam focusing and deflection	magnetostatic

개인용 컴퓨터에 설치된 자동 제어 프로그램을 통해 이루어진다.

3. 세포 입사 전자빔 계측 방안

세포에 입사하는 전자빔속의 측정에는 두 가지 방법을 이용한다. 첫 번째 방법은, passivated implanted planar silicon (PIPS) 반도체 검출기를 진공함 출구 즉, 진공 창 외부의 세포 배양 용기 위치에 설치하여 용기 바닥에 분포하는 세포를 향하여 입사하는 전자빔 특성을 측정하는 것이다. 두 번째 방법은, 진공함 출구 전단에 놓인 이차전자 발생 물질에서 방출된 이차 전자를 MCP로 측정하는 방법이다.⁹⁾ 전자(前者)는 세포 위치에서 진공창과 세포 배양 용기를 통과한 후 세포에 입사하는 전자의 수와 에너지를 직접 측정함을 통하여 세포 입사 빔의 특성 확인에 보다 유용하다. 그러나 세포 조사 실험을 위해서는 PIPS 검출 장치를 제거하여야 하므로 이는 세포 조사 실험 전후의 빔 특징과 그 통계적 변동성만을 확인해 줄 뿐이다. 반면 후자는 이차 전자빔속 측정을 통하여 세포 입사 전자빔속을 간접적으로나마 실시간 모니터링할 수 있는 장점이 있으나, 이차 전자 방출 물질의 표면 조건 변화 등으로 인한 이차 전자 발생 수율 변화에 대한 보정 요구 등 불확실 요소는 여전히 존재한다.

4. 전자빔 발생 장치 기능성 검증

전자총의 성능을 확인하기 위하여 주요 운전 변수들을 조정하면서 빔 인출 특성을 조사하였다. 전자총의 emission current는 음극의 source current에 의해 결정된다. 그림 2는 빔 에너지가 50 keV인 경우 source current에 따른 emission current의 변화를 보여준다. 그림 3은 빔 에너지에 따른 source current를 일정하게 유지한 상태에서 emission current와 진공함에 설치된 패러데이컵에서 측정한 beam current를 보여준다. Beam

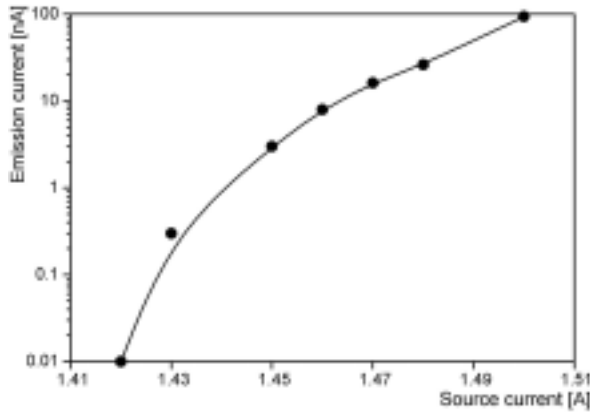


Fig. 2. Variation of the emission current according to the source current with the beam energy of 50 keV.

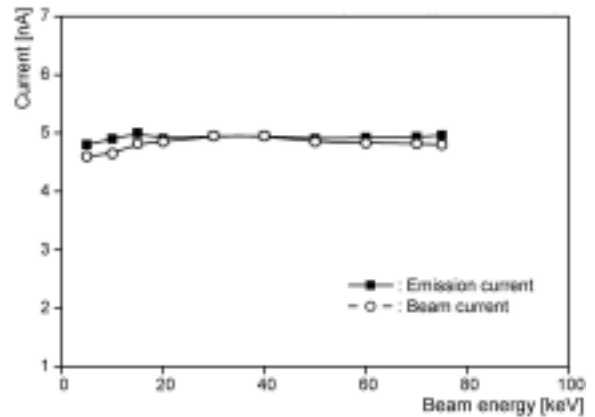


Fig. 3. The effect of beam energy on emission and final beam current(with anode and lens varied for optimum beam).

current 측정에 있어서 1st anode voltage, focusing lens current 및 X, Y-deflector current 등을 빔 에너지 별로 조정하여 전자총으로부터 인출되는 전자가 전부 포집되도록 하였다. Source current를 일정하게 유지한 상태에서 빔 에너지 변화와 무관하게 거의 동일한 emission current가 발생함이 확인되었다. 그러나 beam current의 경우 15 keV 이하 또는 60 keV 이상의 에너지 영역에서 beam current의 감소가 관찰되었다. 이는 high voltage shield나 다른 전자총 구조물에 의한 빔 손실에 기인한다. 그림 4는 전자총의 grid voltage 증가에 따른 emission current의 감소 현상을 보여 준다. Emission current가 완전히 사라진 grid voltage를 cut-off voltage라고 하며 이는 다른 운전 변수 특히, 1st anode voltage에 의해 영향을 받는다. 전자총의 펄스 모드 동작을 위해 cut-off voltage 이상의 값으로 grid voltage가 설정되어야 한다. 그림 5는 세포 위치에 세포 입사 전자 계측 계통을 구성하고 전자총을 펄스 모드로 동작시키면서 multi-channel scaler (MCS)를 이용하여 시간에 따른 빔 인출 상황을 조사한 것이다. 펄스 발생기에서 발생한

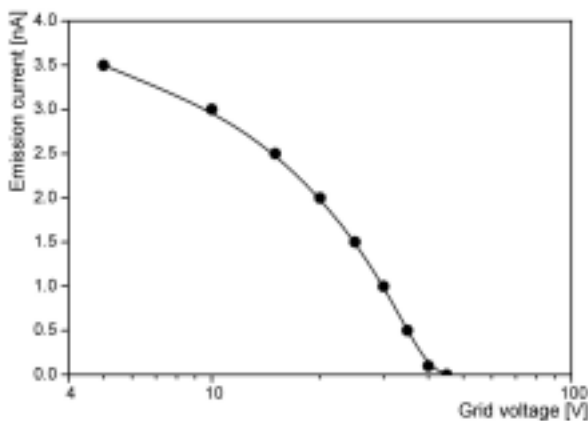


Fig. 4. Variation of the emission current according to grid voltage.

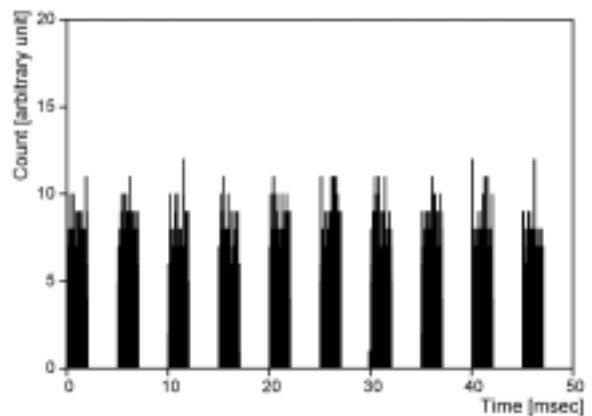


Fig. 5. E-gun operation in pulse mode (beam width : 2 msec, frequency : 200 Hz).

펄스의 진동수는 200 Hz이고, 빔 시간 폭은 2 msec이었다. 펄스 시간 폭은 최소 2 μ sec 까지 가능하다.

전자총에서 방출된 전자는 진공 중을 진행할 때 자장에 의한 영향을 크게 받는다. 따라서 전자빔 장치 운영에서 주변 자장을 상쇄하거나 제거하는 문제는 심각한 주제이다. 특히, 본 연구에서 사용한 전자총 및 진공함을 비롯하여 대부분의 진공 부품은 비자장 (non-magnetic) 물질인 스테인리스 스틸로 제작되어있어 주변 자장에 대한 평가가 중요하였다. 이를 위하여 우선 가우스미터를 이용하여 실험실 내 자장 분포를 측정하여 전자총 분포와 주변 장치 및 환경으로부터 기인하는 특이 자장원을 파악하였다. 장치 부품으로는 냉음극 진공게이지와 터보분자펌프가 주요 자장원이었다. 이후 자장원 부품을 제거 또는 비자장원 부품으로 대체하거나 적절히 차폐한 후 진공함 내부 자장은 지구 평균 전자장보다 다소 작은 200 mG였다. 그림 6은 진공 내 진행 거리에 따라 빔이 진행 방향에 대하여 수직으로 휘 거리를 계산한 자료이다. 진공함의 길이가 45 cm이므로 70 keV 전자는 약 2 mm 정도 휘 것으로 예상된다. 이는 X, Y-deflector를 이용하여 충분히 보상 가능한 정도이다. 진공함 끝단에 TV 브라운관에서 얻은 형광막을 장착하여 전자총과 진공함의 동축 배열 및 자장에 의한 빔 휘 정도를 확인하였다. 그림 7은 진공함 중심에 맺힌 상을 디지털 카메라로 촬영한 것이다. 일차 시준기를 제거한 상태에서 X, Y-deflector를 이용하여 진공함 중심에 빔을 맞춘 후 focusing lens를 조절하여 빔 반경을 확대하거나 축소하면서 모양을 관찰한 결과 빔이 동심원을 그리며 변하는 것을 통하여 전자총과 진공함의 동축 배열을 확인하였다. 이후 일차 시준기를 재설치하여 빔의 모양과 시준을 관찰한 결과 자장에 의한 휨 영향을 X, Y-deflector로 적절히 보상할 수 있음을 확인하였다. 그러나 전자빔의 경우 주변의 사소한 자장 변화에도 빔 진행이 영향 받을 수 있으므로 외부 자장이 진공함으로 침투할 가능성을 방지하고자 향후 진공함을 자장 물질인 mu-metal 재질로 다시 제작할 예정이다.

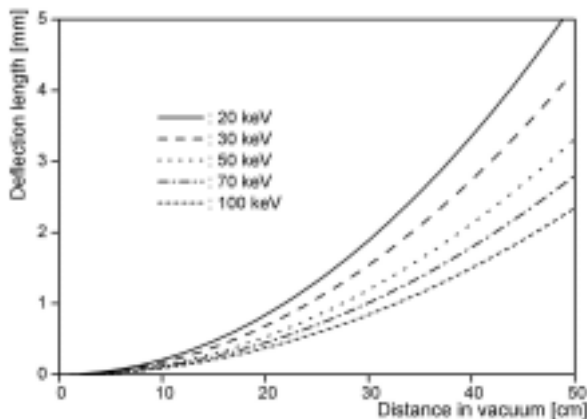


Fig. 6. Variation of the deflection length according to the beam transport distance in vacuum. B = 200 mG.

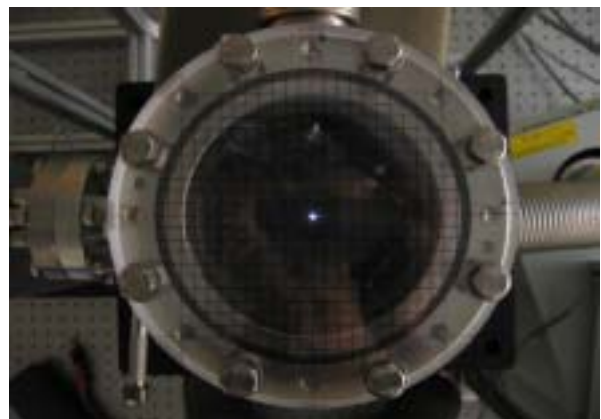


Fig. 7. Illumination of the fluorescent material (ZnS, ZnCdS) for the observation of the electron beam alignment.

5. 세포 영상 획득 및 세포 위치 제어 장치

세포 영상 획득 및 위치 제어 장치는 그림 8과 같이 구성된다. 세포 영상 획득을 위해 칼자이스사의 Axiotech100 현미경, CCD 카메라 및 영상 그래버를 이용한다. 세포를 μm 단위 정확도로 전자빔 출구로 자동 위치시키기 위해서 MCU-28 DC 모터 컨트롤러 및 XY 스테이지($65 \times 50 \text{ mm}$)를 구성하였다. 방사선의 생물학적 영향 평가에 유의한 통계성을 확보하기 위해서는 조사되는 세포의 수가 만개 이상이 되어야하고 실험 세포의 수명 및 방사선 피폭 후 영향 발현 관찰 시기 등을 고려할 때 시간당 만개 이상의 세포 조사가 요구된다. 만개 이상의 세포 조사를 위해서는 $64 \mu\text{m} \times 48 \mu\text{m}$ 범위 내에 20개 정도 분포하는 프레임을 500번 이상 이동하여야 한다. 따라서 효율적인 조사 알고리즘을 이용한 세포 자동 인식과 위치 제어를 구현하여야 한다. 세포핵 인식을 위한 과정은 다음과 같다. 현미경과 CCD 카메라로 획득한 세포의 회색 영상을 3×3 메디안 필터링(median filtering)을 사용하여 잡음 제거와 이미지 평활(image smoothing) 처리를 한 후 thresholding 기법¹¹⁾으로 세포핵 부분만을 추출해 낸다. Thresholding 기법은 일정 임계값을 이용하여 영상을 이진화하는 방법으로 간단하고 처리 속도가 빠르지만 복잡한 영상의 경우 정확한 영역 분할이 어려울 수 있다. 하지만 세포 영상의 명암 히스토그램이 세포핵, 세포질, 배경을 구분하므로 이를 이용하여 세포 중심 좌표를 비교적 정확히 얻을 수 있었다. 추출된 좌표는 세포 위치 제어를 위한 데이터베이스에 저장된다. 세포 위치 제어를 위한 스테이지는 PID 제어법¹²⁾에 의해 구동하는 두개의 DC 모터와 모터 컨트롤러로 구성된다. PID 제어법은 비례(P), 적분(I), 미분(D) 제어의 결합으로 각 제어 변수의 이득을 조정하여 최적의 작동 조건을 설정한다. 스테이지는 LabView로 작성한 프로그램으로 제어한다.

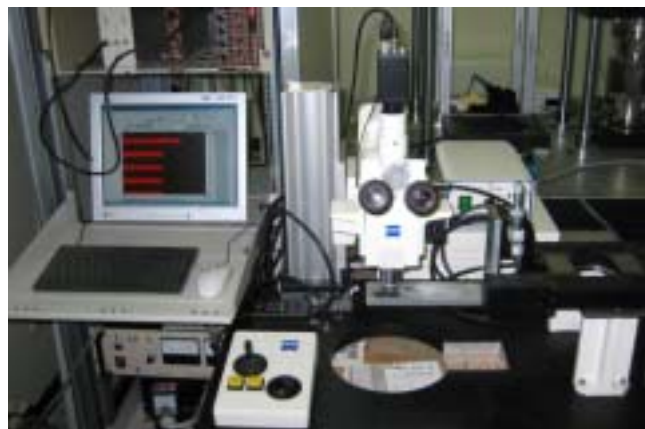


Fig. 8. Cell image acquisition and movement system.

6. 결론

마이크로 전자빔 세포 조사 장치는 low-LET 저선량 방사선의 세포 영향 평가를 위해 요구되는 장치이고 국외의 몇 개 기관에서 장치 개발이 진행되고 있으나, 성공적인 세포 조사 실험에 근거하는 장치의 실질적 완성에 대하여는 아직 전 세계적으로 발표된 바 없다. 원자력의학원 연구진은 마이크로 전자빔 세포 조사 장치를 구현함에 있어서 구성 장치의 특성 조사, 세포 영상 획득 및 위치 제어 장치 계통의 시험 운영을 완수하였다. 향후 세포 입사 전자빔의 통계적 특성을 확인하고 세포 조사 시 실시간 빔 측정 장치를 설치함과 동시에 세포 영상 획득 장치의 영상 인식의 정확성과 세포 위치 제어의 정밀도를 향상시킴으로써 0.2 Gy 이하의 저선량 전자빔을 세포에 조사하는 체계를 완성할 예정이다.

7. 결론

본 연구는 과학기술부가 지원하는 원자력중장기연구개발사업의 일환으로 수행되고 있음을 밝힙니다.

참고 문헌

- [1] S. Tschachotin, C.R. Soc. Biol. 83 (1920) 1593.
- [2] R.E. Zirkle and W. Bloom, "Irradiation of parts of individual cells", Science 117 (1953) 467.
- [3] A.D. Dymnikov, L.P. Ovsyannikova and S.Ya. Yavor, Sov. Phys. Tech. Phys. (USA) 4 (1963) 293.
- [4] G. Randers-Pehrson, C.R. Geard, G. Johnson, C.D. Elliston and D.J. Brenner, "The Columbia university single-ion microbeam", Radiat. Res., 156 (2001) 210.
- [5] L.A. Braby, L.A. Brooks and N.F. Metting, "Cellular effects on individual high-linear energy transfer particles and implications for tissue response at low doses", Radiat. Res. 148 (1997) S-108.
- [6] K.M. Prise, O.V. Belyakov, M. Folkard and B.D. Michael, "Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam", Int. J. Radiat. Biol. 74 (1998) 793.
- [7] 김은희, "저선량에서 미시적 선량분포 특성화", 원자력 중장기 연구개발 사업 과제 계획서, 원자력의학원, 2002.

- [8] Myoung-Cheol Choi, Eun-Hee Kim, Ki-Baek Song, Dong-Hoon Lee and Seung-Woo Park, "Design and operation specification of an electron microbeam system for investigating cellular radiation effect", Journal of Nuclear Science and Technology, in press.
- [9] 정진원, 선광민, 최희동, 김은희, 최명철, 송기백 "마이크로 전자빔 개별 세포 조사 실험 장치에서의 검출 계통", 2003년 한국원자력학회 추계학술회의 논문집.
- [10] Eun-Hee Kim, Mee Chang, Chang-Soon Kang and Myeong-Cheol Choi, "Dosimetric aspects of the electron microbeam irradiation system for use in low-dose radiation effect study", J. of Nucl. Sci. and Tech., in press.
- [11] Digital image processing, R.C. Gonzalez and R.E. Woods, Addison-Wisley, 2001.
- [12] 모터제어기술, 이왕현, 성안당, 1992.