

ORIGINAL ARTICLE

방사광 위상차 현미경을 이용한 여성 유방 조직의
미세 구조 영상정영주 · 봉진구 · 김홍태¹ · 김종기² · 전상훈³ · 윤화식⁴ · 박성환대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실 · ¹해부학교실 · ²의공학과, ³서울대학교 의과대학 흉부외과학교실,
⁴포항공과대학교 포항가속기연구소Synchrotron Radiation Imaging of Female Breast Tissues Using Phase
Contrast TechniqueYoung Ju Jeong, Jin Gu Bong, Hong Tae Kim¹, Jong Ki Kim², Sang Hoon Jheon³, Hwa Shik Youn⁴, Sung Hwan ParkDepartments of Surgery, ¹Anatomy, ²Radiology and Biomedical Engineering, College of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu;
³Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Seoul National University, Seoul; ⁴Pohang Accelerator Laboratory, Pohang
University of Science and Technology, Pohang, Korea

Purpose: X-ray microscopy with synchrotron radiation might be a useful tool for novel x-ray imaging in the clinical and laboratory settings. This technique provides detailed images of internal structures non-invasively. It also has the potential to resolve some of the limitations of conventional breast imaging. We evaluated high resolution synchrotron imaging of breast tissues from normal breasts and breasts with fibroadenomas and cancer.

Methods: A new x-ray microscope was installed on the 1B2 beamline of a Pohang Light Source, at a third generation synchrotron radiation facility in Pohang, Korea. The phase contrast x-ray energy was set at 6.95 keV and the x-ray beam was monochromatized by a W/B4C monochromator. Formalin-fixed or unfixed female breast tissue from normal breast as well as breasts with fibroadenomas and carcinoma were attached onto the Kapton film. The sample was positioned 25 m away from the beam source. The x-ray image of the sample was converted into a visual image on the CsI (TI) scintillation crystal, and magnified 20 times by the microscopic objective lens. After an additional 10 fold digital magnification, this visual

image was captured by a full frame CCD camera.

Results: The monochromated x-ray microscopic images of female breast tissue from normal breast, fibroadenoma and carcinoma cases were evaluated. The total magnifying power of the microscope was $\times 200$. This synchrotron radiation imaging enabled us to observe detailed structures of breast tissue without sample preparation such as staining or fixation.

Conclusion: Using monochromated synchrotron radiation, the x-ray microscopic images of the normal breast and breasts with fibroadenomas and cancer were obtained. From the images obtained, the x-ray microscopic imaging of breast tissue with synchrotron radiation appears to have great potential for clinical and research purposes such as oncology studies, early detection of cancer and as an aid to the pathological diagnosis in the future.

Key Words : Breast, Microscopic imaging, Phase contrast imaging, Synchrotron radiation

중심단어 : 유방, 미세 영상, 위상차 현미경, 방사광

책임저자 : 박성환

705-718 대구광역시 남구 대명4동 3056-6, 대구가톨릭대학교 의과대학 외과
Tel: 053-650-4055, Fax: 053-624-7185

E-mail : shwpark@cu.ac.kr

접수일 : 2007년 11월 21일 게재승인일 : 2008년 1월 29일

*본 논문의 요지는 2006년 6월 17일 2006년 한국유방암학회 춘계학술대회에서 포스터 발표 및 2007년 3월 14일 10th Saint Gallen Oncology Conference에서 포스터 발표되었음.

서 론

유방암은 전 세계적으로 암으로 인한 사망의 주요 원인 질환 중 하나로 2005년 세계보건기구(World Health Organization, WHO) 보고에 따르면 매년 전 세계적으로 120만 명에서 유방암이 발생하고 있다. 우리나라의 경우 2003년 보건복지부 암 등록

보고서에 따르면 정기 검진에 대한 관심의 증가, 서구화된 생활양식, 출산율 및 수유율 감소 등에 따라 유방암의 발생률이 점차 증가하여 여성 전체 암 발생의 16.8%로 위암을 추월하여 여성의 악성 종양 중 1위를 차지하였다.(1)

유방암은 조기에 진단하여 치료할 경우 비교적 예후가 양호하여 유방암의 조기 발견은 유방암으로 인한 사망률을 낮추는 중요한 역할을 한다. 유방암을 조기 발견, 진단하기 위하여 많은 발전이 있었으며, 현재 유방조영술이 가장 좋은 진단 검사 방법으로 널리 사용되고 있다. 이외에 유방 초음파나 유방 자기공명영상(Magnetic Resonance Imaging, MRI), 양전자방출단층촬영(Positron Emission Tomography-Computed Tomography, PET-CT) 등의 방사선 영상학적 기법들이 유방암의 진단을 위해 사용되고 있다. 진단 기기의 발전으로 비교적 해상도가 높은 디지털 유방조영술이나 고해상도의 유방 초음파 등이 개발되어 유방 질환의 진단에 도움을 주고 있으며, 최근에는 유방조영술이나 컴퓨터단층촬영 등에 방사광(synchrotron radiation)을 이용함으로써 유방 질환 진단 방법을 개선하려는 연구들이 진행되고 있다.(2-4)

1895년 뢰트겐이 엑스선(x-ray)을 발견한 이후 엑스선은 유방조영술을 비롯해 여러 가지 의학적 영상을 얻는 데 사용되어 왔다. 그러나 지금까지 사용되어 온 엑스선 영상 기법은 주로 물질의 엑스선 흡수도(absorption) 차이에 의한 대비영상(contrast image)을 제공하기 때문에 공간 분해능이 제한적이며, 따라서 유방조영술로 얻을 수 있는 정보는 결정성 음영, 선형 음영, 석회화 음영 등으로 제한되어 유방에 발생할 수 있는 여러 가지 병변을 감별하고 진단하는 데는 한계가 있다.

최근 서구 유럽의 여러 보고들에서 유방암의 집단 검진 방법으로 자기공명영상의 유용성에 대한 발표가 있지만,(5) 자기공명영상으로 얻을 수 있는 공간 분해능에는 제한이 따르며, 증식성 병변이나 섬유선종, 미만성 염증 변화, 유두종, 섬유낭성 변화 등에서 유방암과 유사한 소견을 보이는 등 특이도가 높지 않은 점 등의 단점이 있다.(6)

반면 방사광을 이용한 위상차 현미경은 분해능이 수십 nm에 이르며 내부가 보이지 않는 물체의 미세 구조 관찰에 유용하여 유방을 비롯한 여러 조직의 병변을 관찰에 사용될 수 있다. 또한 조직 고정이나 염색 없이 비침습적으로 조직의 미세구조를 관찰함으로써 유방 질환의 진단에 도움을 줄 수 있으며, 단색광 추출장치(monochromator)를 사용하여 특정 파장대의 엑스선만을 이용한 단색광을 사용함으로써 방사선 조사량을 줄일 수 있다. 따라서 현재 방사광 위상차 현미경을 이용한 다양한 의학 연구들이 진행 중이며, 모기와 같은 곤충이나 인체의 머리카락, 쥐의 관절, 폐 조직 등을 관찰한 연구들이 발표된 바 있다.(7-9)

본 연구에서는 포항방사광가속기(Pohang Light Source, PLS)

의 1B2 빔라인(beamline)에서 개발한 방사광 위상차 현미경을 이용하여 여성 유방의 정상 조직과 섬유선종, 그리고 유방암 조직의 고해상도의 영상을 얻고, 유방암을 포함한 다양한 유방 조직의 미세 구조의 변화를 관찰하고자 하였다.

방 법

포항 가속기 연구소에 위치하고 있는 포항방사광가속기는 제3세대 방사광 가속기로 크게 세 부분으로 구성되는데, 전자빔을 거의 빛의 속도로 가속시켜 이것을 저장링(storage ring)으로 입사하는 선형가속기(linear accelerator), 입사된 전자빔을 정해진 궤도상에서 장시간 동안 계속 회전하도록 하여 전자빔이 커브를 돌 때마다 빛을 방출하게 하는 저장링, 그리고 방출된 빛을 실험장치까지 이끌고 기타 필요한 장치들을 갖춘 빔라인(beamline)으로 구성되어 있다. 포항방사광가속기는 2.5 GeV의 에너지를 가진 방사광을 낼 수 있으며, 방사광은 저에너지 영역부터 고에너지 엑스선 영역까지 연속적인 에너지 분포를 갖는 매우 강력한 백색광으로, 엑스선 단색광 추출장치(monochromator)를 이용하게 되면 다양한 파장 범위의 엑스선을 추출하여 사용할 수 있다. 본 연구에서는 방사광 엑스선 미세영상을 얻기 위한 광원으로 포항방사광가속기의 1B2 빔라인을 이용하였다.

본 연구에서 방사광 에너지는 6.95 keV로 조절하였으며, 빔라인에서 발생된 방사광은 W/B₄C 단색광 추출장치를 이용하여 단색광으로 추출하였다. 빔라인에서 나오는 빔은 여러 겹으로 구성된 두 개의 W/B₄C 단색광 추출장치 사이를 통과하면서 50 Å의 파장을 가진 단색광으로 추출되고, 측정하고자 하는 물체를 투과하게 된다. Fig 1은 본 연구에 사용한 실험장치의 개념도를 나타낸 것이다. 광원과 실험 조직 샘플 사이의 거리는 25 m이며, CsI(Tl) 섬광 결정(scintillation crystal)은 샘플의 뒤쪽으로 5 cm 거리에 위치하였다.

표본은 폐경 전 여성 중 섬유선종에 대해 수술받은 환자의 조직

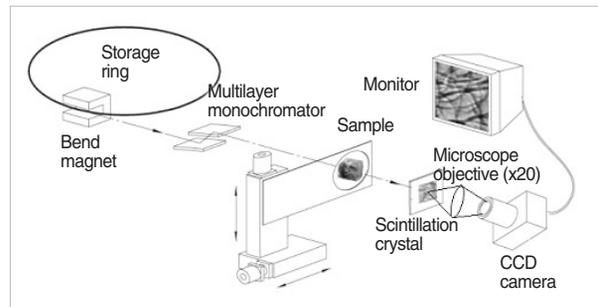


Fig 1. The layout of the 1B2 beamline optics. A x-ray microscope was installed on the 1B2 beamline of a Pohang Light Source, at a third generation synchrotron radiation facility in Pohang, Korea.

과 폐경 후 여성 중 유방암에 대해 수술받은 환자에서 채취하였으며, 정상 조직은 섬유선종 환자의 수술 후 절제된 조직 중 정상 유방 부위에서 채취하였다. 정상 조직과 섬유선종, 유방암 조직은 포르말린에 고정한 것과 고정하지 않은 것으로 나누어 각각 2개씩의 조직 절편을 만들었으며, 각 조직은 병리조직 절제용 칼을 이용하여 정상 조직과 섬유선종 조직은 30 μm 두께로, 유방암 조직은 10 μm 두께로 자른 뒤 염색하지 않은 채 조직 자체를 Kapton 필름에 부착하였다.

엑스선은 조직을 통과하면서 조직 내부의 구조에 따라 위상차(phase contrast) 정보를 제공하게 된다. 이러한 위상 정보를 가진 엑스선 빔이 섬광방출기(scintillator)라는 일종의 결정을 통과하게 되면 우리가 볼 수 있는 가시광선 빛으로 바뀌게 된다. 이러한 위상차 정보를 가지고 있는 가시광선은 대물렌즈에 의해 20배 확대되고 추가로 10배 더 확대된 뒤 Charge-Coupled Device 카메라(CCD Camera; Redlake ES310/T, $9 \times 9 \mu\text{m}$, 648×484 pixels)에 영상이 맺히게 된다.

CCD 카메라로 관찰할 수 있는 영역의 크기(field of view)는

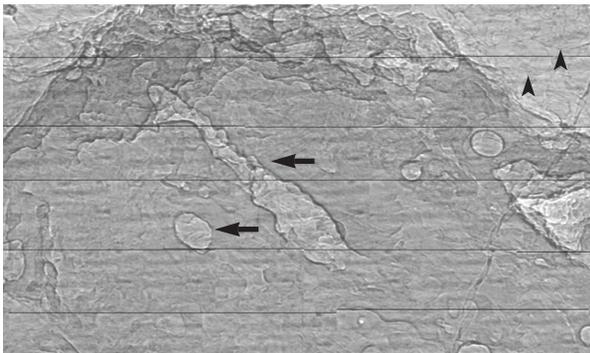


Fig 2. Normal breast tissue. This is the monochromated synchrotron image of normal breast of premenopausal woman. It shows normal ductal structures (arrows), fat tissue (arrowheads) and supporting fibrous stroma. The specimen is 2.7×1.6 mm in size, $30 \mu\text{m}$ thick, unfixed.

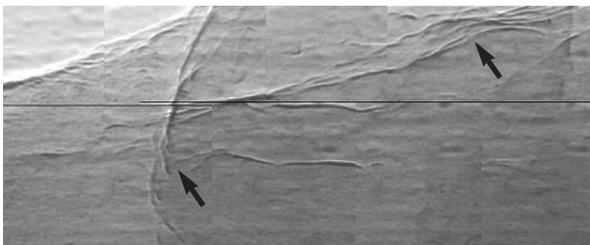


Fig 3. Fibroadenoma. This is the monochromated synchrotron image of fibroadenoma of premenopausal woman. It shows homogeneous densities with characteristic fibrous connective tissues (arrows) and stromal proliferation. The specimen is 1.2×0.4 mm in size, $30 \mu\text{m}$ thick, unfixed.

CCD 칩의 크기와 광학 확대의 정도에 따라 결정되는데, 본 연구에서 사용된 CCD 카메라는 648×484 pixels의 공간분해능을 가지고 있으며, 관찰 영역의 크기는 $640 \times 480 \mu\text{m}$ 이었다.

CCD 카메라에 맺힌 영상은 Video Cassette Recorder (VCR)로 전송하여 비디오 테이프에 저장 후 이미지 파일로 변환한 뒤 각각의 영상을 좌표에 맞추어 재배열하여 각 조직 표본에 대한 전체 이미지를 얻었다.

결 과

다양한 상태를 보이는 유방 조직의 미세 구조를 관찰하기 위하여 포항방사광가속기의 1B2 빔라인에 설치된 방사광 위상차 현미경을 이용하여 정상 유방 조직과 섬유선종, 유방암 조직의 영상을 얻었다.

방사광 위상차 현미경으로 얻은 각 표본 조직 3개의 영상은 비교적 내부 구조가 잘 나타났다.

정상 유방조직의 영상에서는 정상적인 종말 유선관과 지방 조직 및 기질 조직이 관찰되었으며(Fig 2), 섬유선종 조직의 영상에서는 특징적인 섬유성 결합조직과 함께 기질 성분이 증식되어 균질한 음영으로 나타났다(Fig 3). 유방암 조직의 영상에서는 불규칙한 간질의 증식과 침윤, 관구조의 소실, 주위 지방 조직으로의 암세포의 불규칙한 침윤 등 특징적인 유방암 조직의 병리조직학적 특징이 관찰되었다(Fig 4). 취득한 영상의 크기는 각각 2.7×1.6 mm, 1.2×0.4 mm, 2.3×1.4 mm이었다.

고 찰

방사광은 엑스선 영상 기법의 새로운 광원으로 현재 의료 및 연

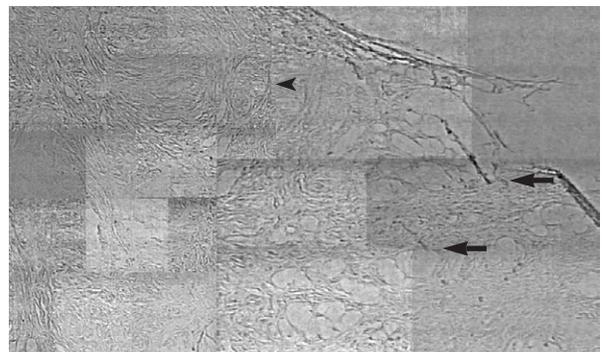


Fig 4. Breast cancer. This is the monochromated synchrotron image of breast cancer of postmenopausal woman. It shows typical histopathologic findings of breast cancer such as stromal proliferation (arrowhead), loss of ductal structure, infiltrating tumor cells into adjacent fat tissues (arrows). The specimen is 2.3×1.4 mm in size, $10 \mu\text{m}$ thick, formalin-fixed.

구용으로 널리 사용되고 있는 엑스선과 달리 그 세기가 강하고 퍼짐이 작으며 원하는 파장을 마음대로 선택해서 이용할 수 있는 장점을 지니고 있다. 또한 고휘도와 높은 공간 분해능 또는 집속 능력을 가지고 있어서 극히 작은 물체에 대한 정밀한 영상을 제공할 수 있으며, 펄스의 형태로 나타나는 특성, 파동의 진동에 있어 방향성을 가진 편광성 등의 특징을 가지고 있어, 영상 진단 기술을 비롯한 여러 연구들에 중요한 광원으로 이용되고 있다.(10)

특히 유방조영술에서 방사광은 유용한 광원이며, 1995년 Burrattini 등(4)이 방사광을 이용한 유방 영상 기법에 대해 발표한 이후 여러 가지 기법으로 유방 조직의 영상을 얻으려는 연구들이 이루어지고 있다. Phase-contrast imaging (PCI), diffraction-enhanced imaging (DEI), phase-interference contrast (PIC), super magnification imaging (SMI), x-ray dark-field imaging (XDFI), x-ray fluorescence (XRF) 등 여러 가지 기법이 연구되고 있는데(11) 본 연구에서 사용한 방사광 위상차 현미경(phase-contrast imaging)도 그 중 하나이다. 국내에서도 방사광을 이용하여 유방의 영상을 얻은 연구들이 있기는 하지만 그 수가 많지 않으며 구체적으로 논의된 바 없어 국내에서 새롭게 시도한 기법으로서 본 연구의 의의가 있다고 하겠다.

방사광 위상차 현미경은 엑스선 빔이 물체를 통과하면서 생기는 빛의 위상차를 이용하여 물체 내부 형태를 가시화하게 된다. 기본 원리는 원자크기 정도의 매우 짧은 파장의 엑스선 빛이 물체를 지날 때 생기는 굴절(refraction)과 회절(diffraction)에 기초하고 있으며, 회절하는 성분과 회절하지 않는 성분이 중첩되어 물체의 모서리에서 생기는 간섭 현상을 찾아내어 영상화하게 된다(12). 간섭 현상은 물체의 바로 뒤에서 생기므로 물체와 탐지기 간의 거리가 너무 가까우면 영상을 얻기가 힘들어진다. 따라서 적절한 공간 해상도를 가지도록 물체와 탐지기 간의 거리를 맞추어야 한다.(13) Fulvia 등(3)은 물체와 탐지기 간의 거리를 2 m로 하였으며, Michiel 등(14)은 0.7-2.5 m 사이로 조절하였다. 두 연구에서는 탐지기로 필름을 사용하여 영상을 얻은 경우이나, 본 연구에서는 섬광방출기를 이용하여 가시화된 영상을 CCD 카메라로 촬영하였으며, 표본과 섬광 결정과의 거리를 5 cm로 설정하여 이전의 연구(3, 14)에서보다 짧은 거리에서도 영상을 얻을 수 있었다.

본 연구에서는 단색광 엑스선과 아날로그 방식의 CCD 카메라 렌즈가 유방의 미세 구조를 관찰하기 위해 사용되었다. 엑스선은 섬광방출기를 통해 가시적 영상으로 변환한 후 현미경 대물렌즈를 이용하여 20배 확대하고 디지털로 10배 더 확대된 영상을 얻을 수 있었으며, 기존의 유방조영술과 방사광을 이용한 유방조영술을 비교하여 이전의 연구들에서 얻은 영상(2, 3, 14)보다 고해상도의 영상을 얻을 수 있었다.

본 연구에서 얻은 영상의 해상도는 1.2 μm 로 수백 μm 해상도

의 전산화단층촬영이나 자기공명영상보다 훨씬 더 높은 해상도이며, 0.2 μm 해상도의 광학현미경에 근접한 해상도를 가져 유방 조직의 미세 구조물을 보여주기에도 충분하다고 할 수 있다.

섬유선종, 섬유낭성변화, 유방암 등 유방에 생기는 대부분의 질병은 유방의 유관, 유방 실질 등에서 생기며 이런 상태는 콜라겐 섬유의 증대, 섬유화, 낭포성 변화, 세포의 증식 등 여러 가지 다양한 형태학적 변화를 동반한다. 따라서 형태적 변화가 생기는 초기 단계에 이러한 미세한 구조들의 영상의 병리 상태를 진단하는 것은 임상적으로 매우 중요하다고 할 수 있다. 또한 기존 전자현미경이나 광학현미경의 촬영기법은 표본을 자르고 염색하는 등의 많은 조작이 필요하지만 방사광을 이용한 위상차 현미경은 표본 조작 과정이 거의 없어 조직 내부를 원래의 상태 그대로 촬영할 수 있다는 점에서 중요한 의의를 지닌다고 하겠다.

방사광을 이용해 위상차 영상을 얻을 경우 기존의 흡수 영상에 비해 방사선 조사량을 낮출 수 있는데, Longo 등(2)은 방사광으로 유방조직을 촬영했을 때의 방사선 조사량이 기존의 유방조영술에서 흡수되는 방사선 조사량에 비해 현저하게 낮았다고 하였으며, Arfelli 등(3)은 방사광 위상차 영상에서의 방사선 조사량이 0.6 mGy로 기존 유방조영술의 조사량에 비해 25% 감소되었다고 하였다. 본 연구에서는 방사선 조사량을 직접적으로 측정하지는 못하였으나, 기존 유방조영술에 비해서 방사선 조사량이 적을 것으로 생각되며, 향후 정확한 조사량의 측정과 정량적인 분석이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 촬영한 유방조직 표본의 두께는 10 μm 와 30 μm 로 전체 유방조직을 촬영한 이전의 연구(3)보다 두께는 얇지만, 조직의 미세 구조를 촬영할 수 있었다는 점에서 의의가 있다. 높은 해상도는 유지하면서 더 두꺼운 조직에서의 영상을 얻기 위한 연구가 진행 중에 있으므로 가까운 미래에 전체 유방조직의 미세 구조영상을 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

결론

포항방사광가속기의 1B2 빔라인에 설치된 방사광 위상차 현미경을 이용하여 폐경 전 여성의 정상 유방 조직과 섬유선종, 폐경 후 여성의 유방암 조직의 영상을 획득하였다. 방사광을 이용하여 획득한 영상은 기존의 엑스선을 이용한 영상에 비해 고해상도, 고대조도의 영상을 제공하여 주었으며, 이 영상으로 조직 내부의 미세 구조를 관찰할 수 있었다. 방사광 엑스선 위상차 현미경 기술은 아직 연구 단계에 있지만, 이를 이용하면 여러 표본의 내부 구조에 대한 조직학적 정보 및 병리학적 정보를 얻을 수 있으므로 임상적으로나 여러 연구 목적으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

엑스선 위상차 현미경 기술을 비롯한 방사광을 이용한 영상 기법은 방사광 장비 실용화의 어려움으로 광범위한 임상 적용에는 한계가 있으나, 현재 임상 적용이 시도되고 있는 방사광 관상동맥 촬영술에서처럼 새로운 비파인의 개발로 유방 촬영의 문제점을 해결할 수 있을 것이다. (15) 또한 현재 연구 중인 방사광 단층촬영술(16, 17)에서와 같이 전산화단층촬영이나 자기공명영상의 단면 영상 획득 기술이나 3D 영상의 재구성 기법을 적용하면 유방 질환의 진단 및 연구에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Ministry of health and welfare, Republic of Korea. Annual report of the central cancer registry in Korea (2002.1.-2002.12.), 2003.
2. Longo R, Pani S, Arfelli F, Dreossi D, Olivo A, Poropat P, et al. Morphological breast imaging: tomography and digital mammography with synchrotron radiation. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A 2003;497:9-13.
3. Arfelli F, Bonvicini V, Bravin A, Cantatore G, Castelli E, Palma LD, et al. Mammography with synchrotron radiation: Phase-detection techniques. Radiology 2000;215:286-93.
4. Burattini E, Cossu E, Maggio CD, Gambaccini M, Indovina PL, Marziani M, et al. Mammography with synchrotron radiation. Radiology 1995;195:239-44.
5. Lee CH, Weinreb JC. The use of magnetic resonance imaging in breast cancer screening. J Am Coll Radiol 2004;1:176-82.
6. Orel SG, Schnall MD. MR imaging of the breast for the detection, diagnosis, and staging of breast cancer. Radiology 2001;220:13-30.
7. Youn HS, Jung SW. Observations of a human hair shaft with an x-ray microscope. Phys Med Biol 2005;50:5417-20.
8. Choi CH, Kim HT, Choe JY, Kim JK, Youn HS. Application of synchrotron radiation imaging for non-destructive monitoring of mouse rheumatoid arthritis model. AIP Conference Proceedings 2007;879:1952-5.
9. Jheon SH, Youn HS, Kim HT, Choi GH, Kim JK. High-resolution x-ray refraction imaging of rat lung and histological correlations. Microsc Res Tech 2006;69:656-9.
10. Arfelli F. Synchrotron light and imaging systems for medical radiology. Nucl Instrum Meth Phys Res A 2000;454:11-25.
11. Ando M, Bando H, Chen Z, Chikaura Y, Choi CH, Endo T, et al. 2D and 3D refraction based x-ray imaging suitable for clinical and pathological diagnosis. AIP Conference Proceedings 2007;879:1899-902.
12. Hwu Y, Hsieh H, Lu MJ, Tsai WL, Lin HM, Goh WC, et al. Coherence-enhanced synchrotron radiology: Refraction versus diffraction mechanisms. J Appl Phys 1999;86:4613-8.
13. Arfelli F, Assante M, Bonvicini V, Bravin A, Cantatore G, Castelli E, et al. Low dose phase contrast x-ray medical imaging. Phys Med Biol 1998;43:2845-52.
14. Michiel MD, Olivo A, Tromba G, Arfelli F, Bovicini V, Bravin A, et al. Phase contrast imaging in the field of mammography. In: Medical applications of synchrotron radiation: Springer-Verlag; 1998.p78-82.
15. Dill T, Dix WR, Hamm W, Jung M, Lohmann M, Reime B, et al. Intravenous coronary angiography with synchrotron radiation. Eur J Phys 1998;19:499-511.
16. Longo R, Pani S, Arfelli F, Dreossi D, Olivo A, Poropat P, et al. Morphological breast imaging: tomography and digital mammography with synchrotron radiation. Nucl Instrum Meth in Phys Res 2003;497:9-13.
17. Betz O, Wegst U, Weide D, Heethoff M, Helfen L, Lee WK, et al. Imaging applications of synchrotron X-ray phase-contrast microtomography in biological morphology and biomaterials science. I. General aspects of the technique and its advantages in the analysis of millimetre-sized arthropod structure. J Microsc 2007;227:51-71.