

현미경 영상처리시스템을 이용한 세포의 3차원 분석에 관한 연구

(A Study on 3-D Cell Analysis using Microscopic Image Processing System)

신동익*, 장준근**, 민병구***, 허수진*

*울산대학교 의과대학 서울중앙병원 의공학과,
서울대학교 기계설계학과, *서울대학교 의과대학

1. 서론

세포의 관찰이나 면역형광법 등에 널리 이용되는 현미경의 영상분석에는 35mm 카메라를 이용하여 사진으로 현상하고 이를 분석하는 방법이 널리 이용되고 있다. 그러나 작금의 연구들은 세포의 관찰에 있어 평면적인 분석을 초월하여 3차원적 정보를 요하는 경우가 많으며, 이 경우 기존의 광학 현미경은 그 한계를 뚜렷이 보인다.

본 연구에서는 고가의 Laser Confocal Microscope를 이용하지 않고도 기존의 광학현미경으로 세포의 3차원적 분석이 가능함을 보여주고자 한다.

광학현미경으로부터 3차원 정보를 추출하기 위하여 적절한 영상처리시스템과 현미경의 초점을 미세하게 제어하기 위한 초점조절 시스템을 개발하였으며 광학분야에서의 초점조절이론을 도입하였다.

3차원 정보추출의 타당성을 보이기 위하여 미세슬릿을 이용한 모의실험을 행하였으며 이로부터 상당히 유의한 결과를 얻을 수 있었다. 실험에 이용된 세포는 혈관내피세포로서 정상적인 상태에서의 높이 분포와 시약을 처리하여 모양이 변화된 상태에서의 높이 분포를 비교하였다.

2. 초점 조절 이론

광학적인 방법을 통하여 영상을 획득하는 시스템에서 광학적 초점의 의미는 매우 중요하다. 얻어진 영상이 대상체를 얼마나 충실히 재현하고 있는가는 바로 초점이 여하히 맞추어졌는가에 의존하기 때문이다. 특히, 현미경 영상과 같이 고배율의 광학 시스템은 수 μ m의 초점거리 변화에 의해 영상의 정확도가

좌우된다. 여기에서는 이러한 현상을 이용하여 자동 카메라 등에 적용되고 있는 초점 조절이론을 도입하여 3차원 정보추출에 적용하고자 한다.

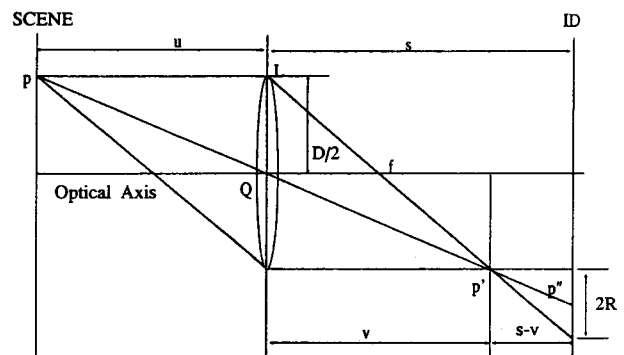
2.1 카메라 모델

그림 1은 볼록렌즈에 의한 상의 형성을 나타낸 것이다. 이때 실영상 p와 렌즈를 통한 영상 p'의 관계는 다음의 렌즈공식에 의해 결정된다.

$$1/f = 1/u + 1/v \quad (1)$$

거리 s, 초점거리 f, 렌즈 지름(aperture diameter) D를 카메라 변수 e라고 하며 다음과 같이 나타낸다.

$$e \equiv (s, f, D) \quad (2)$$



L: Lens Q: Principal Point D: Aperture Diameter
p: Object p': Focused Point f: Focal Length
ID: Image Detector p'': Blur Circle R: Blur Circle Radius

그림 1. 렌즈에 의한 상의 형성

2.2 점확산 함수(Point Spread Function)

그림 1에서 대상체 p가 초점이 맞지 않았을 경우 영상 소자 ID에는 퍼진(blur) 상 p"이 나타난다. p가 하나의 점으로 나타내어진다면 p"은 하나의 원모양으로 나타나는데 이때 원 내부는 균일한 밝기가 되고 원 밖은 밝기가 0인 상태가 된다. 이 원을 퍼짐원(blur circle)이라 한다.

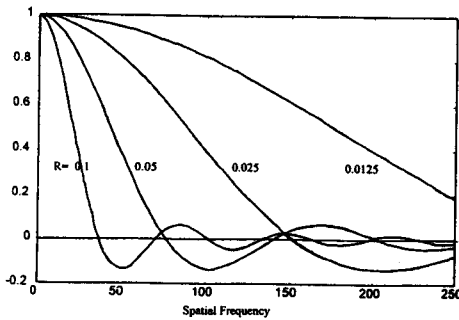


그림 2. 광학전달함수 H_a의 퍼짐원에 대한 모습

p로부터 렌즈를 통해 단위 노출시간 동안 입사되는 광에너지를 1이라고 하면, p가 퍼진 상은 카메라의 점확산함수(PSF ; Point Spread Function)가 된다. 이 PSF를 h_a(x,y)라고 나타낸다.

R을 퍼짐원의 반지름이라 하고 q를 배율 2R/D라 하면 그림 1에서 다음의 관계가 성립한다.

$$q = 2R/D = (s-v)/v = s(1/v - 1/s) \quad (3)$$

그러면 식(1)로부터 식(3)에 1/v를 대입하여 다음 결과를 얻는다.

$$q = s(1/f - 1/u - 1/s) \quad (4)$$

따라서,

$$R = qD/2 = sD/2(1/f - 1/u - 1/s) \quad (5)$$

가 성립한다. 이 때 R은 s ≥ v 또는 s < v의 상태에 따라 양 또는 음의 값을 갖는다. 전자는 영상소자 ID가 초점거리 이전에, 후자는 초점거리 이후에 위치한 것을 의미한다.

카메라가 무손실 시스템(즉, 카메라 시스템에 의한 광에너지 손실이 없는 경우)이라고 하면, 렌즈에 입사되는 광에너지를 1로 가정하였으므로 다음의 관계가 성립한다.

$$\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h_a(x,y) dx dy = 1 \quad (6)$$

이 결과와 퍼짐원의 내부는 균일한 광도를 갖고 외부는 0의 값을 갖는다는 사실을 이용하면,

$$h_a(x,y) = \begin{cases} 1/(\pi R^2) & \text{if } x^2 + y^2 \leq R^2 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (7)$$

가 된다.

2.3 초점 측정(Focus Measure)

카메라 변수를 변화시켜가며 일련의 영상 g_i(x,y)을 얻을 때, 다음과 같은 관계가 성립한다.

$$\begin{aligned} e_i &= (s_i, f, D) \text{ and } s_i < s_{i+1} \text{ or} \\ e_i &= (s, f_i, D) \text{ and } f_i < f_{i+1}, \text{ for } i = 1, 2, 3, \dots \end{aligned} \quad (8)$$

실제의 현미경 시스템에서는 초점거리 f를 변화시키는 것은 불가능하고 렌즈 중심과 ID 사이의 거리 s를 변화시켜서 초점이 가변된 영상을 얻는다. 영상 g_i로부터 계산된 초점 측정치를 M(i)로 나타낸다.

카메라를 선형 불변시스템(Linear Shift-invariant system)이라 가정하면 g_i는 초점이 맞춰진 영상 f(x,y)와 PSF와의 convolution이 된다. F, G_i를 각각 f, g_i의 Fourier transform이라 할 때,

$$G_i(w,v) = H_a(w,v; e_i, u) F(w,v) \quad (9)$$

로 쓸 수 있다. 실제적인 광학 시스템에서 퍼짐원의 가장자리는 빛의 굴절, 색수차, 렌즈의 특성 등에 의해 Gaussian의 형태로 퍼지게 된다. 따라서 앞에서 나타낸 PSF model 대신에 Gaussian PSF model을 쓰기도 한다. 이 model에 따르면 식 (9)는 다음과 같이 쓸 수 있다.

$$G_i(w,v) = \exp[-1/2 \rho^2(w,v) r^2(e_i; u)] F(w,v) \quad (10)$$

여기서 w, v, ρ는 단위 길이당 radian으로 정해지는 공간 주파수이고, r은 퍼짐원의 반경 R에 비례하는 변수로서,

현미경 영상처리시스템을 이용한 세포의 3차원 분석에 관한 연구

$$r = cR \quad c > 0$$

의 관계를 가지며 PSF의 분포에 대한 표준 편차에 해당한다.

퍼짐원에 대하여 원형 대칭인 광학 전달함수(optical transfer function) H_a 는 일종의 sinc 함수의 모양을 갖는데 퍼짐원의 반경 R 이 작아짐에 따라(즉 초점이 맞음에 따라) main lobe의 면적이 커짐을 알 수 있다. 이 함수의 side lobe들의 합을 0으로 가정하면, 영상 에너지(Image Energy)는,

$$M(i) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} |G_i(w,v)|^2 dw dv \quad (11)$$

가 되며 이 값이 바로 초점이 맞추어진 정도를 대변한다.

2.4 컴퓨터 초점 측정

영상의 gray level의 변화는 영상 에너지에 비례하는 함수이다. 따라서 gray level의 분산(variance)을 초점 측정에 이용할 수 있다.

$$\begin{aligned} M_v(i) &= 1/N^2 \sum_x \sum_y [g_i(x,y) - \mu_i]^2 \\ &= 1/N^2 \sum_x \sum_y g_i^2(x,y) - \mu_i^2 \\ \text{where } \mu_i &= 1/N^2 \sum_x \sum_y g_i(x,y) \end{aligned} \quad (12)$$

3. 실험 방법

3.1 현미경 영상처리시스템의 구성

현미경의 외부 카메라 접속부에 512×512의 공간 해상도를 갖는 CCD 카메라를 접속하였고 이로부터 얻어지는 영상 신호를 MIPS(Medical Image Processing System)에서 처리하도록 하였다. CCD 카메라의 영상 신호는 NTSC의 규격을 따르며 MIPS의 영상 입력부로 전달된다. 현미경 영상의 저조도에 의한 CCD 카메라의 양자화 잡음(quantum noise)은 불가항력적인 요소이므로 MIPS에서 실시간으로 평균화하여 화질을 향상시키는 방법이 동원되었다.

3.2 미세 슬릿을 이용한 모의 실험

그림 3은 세포 분석에서 일정 부피 내의 세포의 갯수를 측정할 수 있도록 만들어진 미세 슬릿을 보인 것이다. 이 슬릿을 그림 4처럼 비스듬히 놓으면 위치에 따라 초점이 맞춰진 정도가 다르게 된다. 슬릿의 큰 격자 사이의 거리(ΔL)는 0.25mm이고 슬릿 전체의 길이(L)는 70mm이므로 슬릿 전체의 높이차

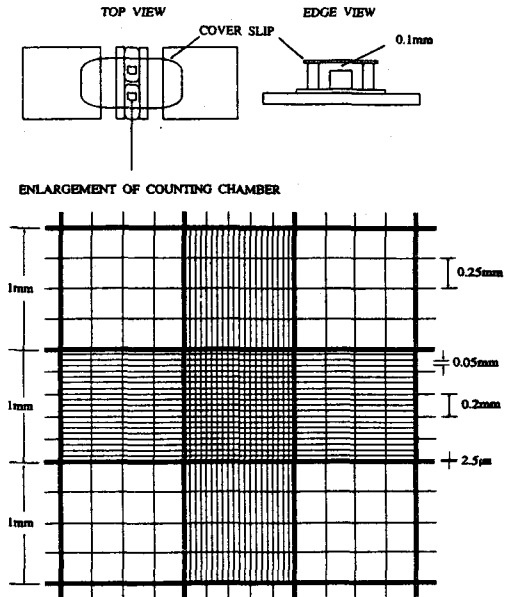


그림 3. 세포 관찰용 미세 슬릿의 모양

(H)를 5.6mm로 하였을 경우 슬릿의 한 격자 사이의 높이차(ΔH)는 20 μ m가 된다. 실험에 사용한 현미경은 Olympus의 IMT-2로 미동나사의 작은 한 눈금은 실제로 2 μ m의 초점 변화를 나타내는 것으로 되어 있다. 고안한 현미경 초점조정시스템(MFCS)의 스텝 모터는 2개의 펄스로서 현미경의 미동나사를 한 눈금 움직인다. 따라서 MFCS에서 스텝 모터에 하나의 펄스를 인가하면 실제로 초점이 맞춰지는 부위는 수직 방향으로 약 1 μ m의 변화를 가져오게 된다.

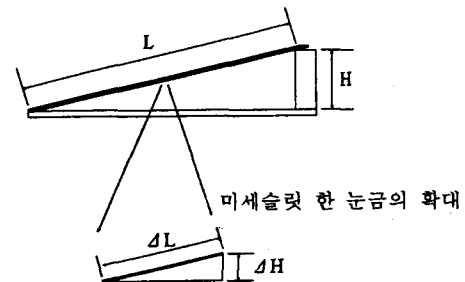
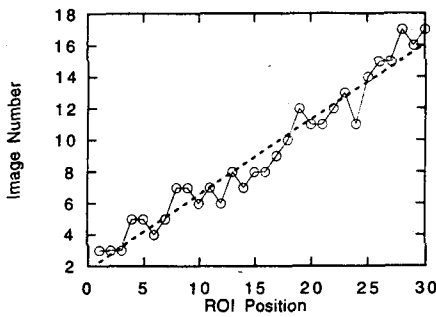


그림 4. 높이 측정을 위해 기울인 미세 슬릿

실험은 이와 같은 구성으로 슬릿이 나타난 화면상의 오른쪽 끝부분에 초점을 맞추고 스텝 모터에 펄스를 하나씩 인가하면서 총 20장의 영상을 얻었다. 사진 7에 이들 영상들을 보였는데 이는 미세슬릿의 0.25mm×0.25mm 격자 하나가 한 화면에 걸쳐 있고, 초점이 맺힌 부위가 왼쪽에서 오른쪽으로 점차 이동하는 것을 볼 수 있다. 초점 측정치는 영상에서 슬릿이

나타난 부위를 중심으로 15×15 (pixel)의 ROI를 정하고 이를 슬릿의 왼쪽 끝에서 오른쪽으로 5 pixel씩 겹쳐 이동하면서 각 위치에서 20장의 영상에 대해 위의 초점 측정치($M_v(i)$)를 구하였다. 그림 5는 이렇게 구한 20장의 영상의 각 위치에서의 초점 측정치 중 최대치를 나타내는 영상의 번호를 나타낸 것이다. 영상의 번호는 실제로 현미경의 초점이 맞춰진 높이를 의미하므로 이것은 그대로 그 위치에서의 슬릿의 높이가 된다. 그림에서 보듯이 각각의 초점 측정치는 슬릿의 높이에 비례하여 최대치를 나타내는 것을 알 수 있다.



$$IN(\text{Image Number}) = 0.4777RP(\text{ROI Position}) + 1.777$$

$$EV(\text{Error Variance}) = 0.911$$

그림 5. 기울인 미세슬릿 영상으로부터 가로방향으로 각 위치의 ROI에서 최대 분산값($M_v(i)$)을 갖는 영상 번호의 분포

4. 결과 및 고찰

4.1 혈관내피세포의 3차원적인 영상의 획득

MIPS와 MFCS(현미경 초점조절장치)를 조합한 시스템은 혈관내피세포의 높이 변화를 유의적으로 찾아낼 수 있었다. 최근에 미국동지에서 Laser confocal microscope를 이용하여 세포의 높이를 재려는 시도가 있지만, 살아 있는 세포의 높이를 측정하기 어렵고, 전처리 과정이 매우 복잡하다. 이에 본 연구에서는 광학현미경의 미동나사에 스텝모터를 설치하여 초점이 가변된 영상을 수집하고, 이로부터 세포의 높이 정보를 얻어내는 방법을 적용하였다.

그림 6은 MIPS와 MFCS를 이용하여 초점을 가변시킨 혈관내피세포의 영상들이다. 이들 12장의 영상에서 하나의 세포를 포함하는 ROI를 정하고, 위의 모의 실험에서와 같은 방법으로 세포의 장축방향으로 초점 측정치의 최대값을 갖는 영상 번호를 구한다.

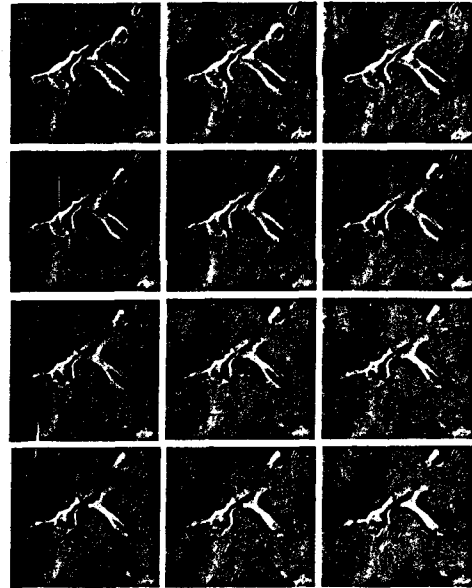


그림 6. 초점을 가변시켜 얻은 세포의 영상들

영상 번호가 하나 증가할 때마다 초점의 위치가 $2\mu\text{m}$ 씩 높아지므로 각 부위의 영상 번호는 그대로 그 부위의 높이가 된다.

그림 7은 정상상태의 혈관내피세포의 3차원 재구성을 보여준다. 위의 영상에서 하나의 세포를 지나서 특정 라인 A-A'를 따라 초점 측정치(focus measure)를 구하는 모습을 보여준다. 아래는 세포의 특정 라인을 따라 ROI를 이동해가며 각 위치에서의 최대 초점 측정치를 갖는 영상 번호를 나타낸 것이다. ROI의 크기는 10×10 pixel이며 특정 라인을 따라 매 5 pixel씩 이동해가며 초점 측정치를 구하였다. 이 그림에서 세로축은 영상 번호와 동시에 각 ROI가 위치하는 높이가 된다.

그림 8은 혈관내피세포에 cytochalasin D를 처리하여 세포의 높이 변화를 유발한 후의 변화된 세포의 높이를 보여준다. Cytochalasin D를 처리하지 않은 세포의 높이는 약 $6\mu\text{m}$ 로 나타나고 있는 반면, cytochalasin D를 처리한 세포의 높이는 약 $12\mu\text{m}$ 의 높이를 나타내고 있는 것을 알 수 있다. 이는 혈관내피세포의 형태적인 변화가 평면적인 모양변화에만 국한하는 것이 아니고, 3차원적인 적응의 형태를 가지고 있음을 알려주는 중요성을 가진다.

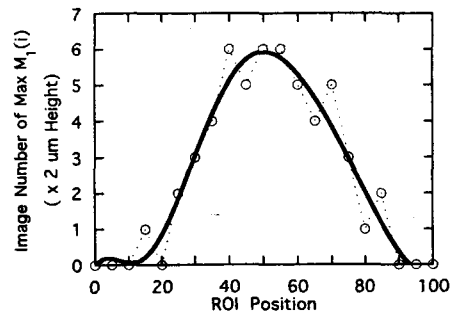
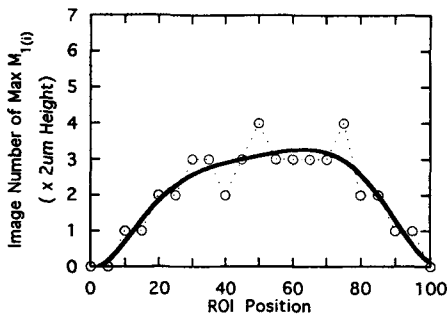
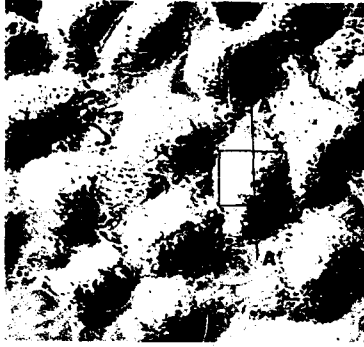


그림 7. 정상적인 혈관 내피세포의 사진과 재구성된 높이 분포

그림 8. Cytochalasin D를 처리한 혈관 내피세포의 사진과 재구성된 높이 분포

4.2 고찰

이상의 결과에서 MIPS와 MFCS는 혈관 내피세포의 시간에 따른 동적 특성의 변화와 기계적인 자극에 의한 형태학적 변화를 관찰하는데 매우 유용하게 이용될 수 있음을 보였다. 기계적 자극에 의한 세포의 형태학적 분석은 현대 생물학 분야에서도 최근에 들어 관심이 고조되고 있으며 이에 관련된 연구도 아직은 초보적인 단계에 불과하다. 그러나 이러한 세포의 형태학적 분석은 세포의 적응 기전을 이해하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 인식되고 있다. 따라서 사용이 불편하고 고가인 laser confocal microscope를 이용하는 것이 용이하지 않은 지금, MIPS와 MFCS를 이용한 이러한 분석 방법은 매우 시기적절하며 그 응용 분야도 비단 혈관 내피세포뿐만 아니라 염색체의 분석, 정자의 운동 분석 등과 같이 매우 다양하다.

초점이 가변된 영상에서 최대 초점 측정치를 이용하여 대상체의 높이를 구하는 방법은 본 논문에서 보여준 바와 같이 매우 간단하게 구현할 수 있다. 그

러나 3차원적인 분포를 갖는 대상체에서 내부 조직의 변화에 따른 높이 측정의 오차는 앞으로 해결해야 할 문제이다. 즉, 각 위치에서의 최대 초점 측정치는 그 위치의 높이를 대변하는 표면의 영상뿐만 아니라 내부 조직의 변화에도 영향을 받으므로 이것이 높이 측정에서 오차를 유발하는 요인이 되고 있다. 이러한 오차 요인에도 불구하고 본 실험에서 매우 유의적인 결과를 얻은 것은 세포의 표면의 영상 에너지에 의해 초점 측정치의 최대값이 주로 좌우되는 것으로 해석할 수 있다.

참고문헌

1. 혈관내피세포의 형태학적 분석을 위한 의학영상처리시스템의 개발, 신동익, 서울대학교 박사학위논문, (1995).
2. "Image Analysis and Mathematical Morphology", J. Serra, Academic Press (1982).
3. "Image Recovery : Theory and Application", Henry Stark, Academic Press (1987).
4. Murali Subbarao, "Focusing Techniques", Optical Engineering, Nov. 1993/Vol. 32 No 11.
5. J. D. Gaskill, "Linear Systems, Fourier Transforms, and Optics", John Wiley & Sons, New York (1978).
6. M. Subbarao, "Determining distance from defocused images of simple objects", Technical Report No. 89.07.20, Computer Vision Laboratory, Dept. of Electrical Engineering, State University of New York, Stony Brook (1989).
7. M. Subbarao and A. Nikzad, "A model for image sensing and digitalization in machine vision", Proc SPIE 1822, 110-120 (1990).
8. J. S. Budd, K. E. Allen, P. R. F. Bell, "Effects of two methods of endothelial cell seeding on cell retention during blood flow", British Journal of Surgery 87, 878-882 (1991).
9. A. R. Koslow, et al., "A flow system for the study of shear forces upon cultured endothelial cells", Journal of Biomechanical Engineering 108, 338-341 (1986).
10. D. I. Shin, et al., Morphological changes of human endothelial cell on the fluid flow, ASAIO, San Francisco, CA., 1994, p. 95.
11. J. K. Chang, J. Kim, J. H. Kim, D. C. Han, B. G. Min, Morphological Changes of human endothelial cell under high Reynolds number flow, N. A. Langrana, M. H. Friedman, E. S. Groods, Eds., Bioengineering Conference (The American Society of Mechanical Engineers, Breckenridge, Colorado, 1993), vol. BED-24, pp. 285-288.