

생체발광영상에서 포톤 검출 정량화를 위한 보정기법의 개발

탁운오¹ · 김현식¹ · 박형주¹ · 최홍국² · 최은서³ · 한수욱⁴ · 이병일¹

¹화순전남대병원 핵의학과, ²인제대학교 전산학과, ³조선대학교 물리학과, ⁴한국광기술원

Development of Correction Technologies for Quantification of Photon Measurement in Bio-Luminescence Image

Yoon-Oh Tak¹, Hyeon-Sik Kim¹, Hyeong-Ju Park¹, Heung-Kook Choi², Eun Seo Choi³, Swook Hann⁴ and Byeong-il Lee¹

¹Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Hwasun Hospital, Korea

²Department of Computer Science, Inje University, Korea

³Department of Physics, Chosun University, Korea

⁴Korea Photonics Technology Institute, Korea

(Received November 2, 2010. Accepted March 11, 2011)

Abstract: Bioluminescence imaging (BLI) is the most sensitive animal imaging technique for molecular imaging research. Generally, highly sensitive CCD is used to detect an optical probe introduced in a living mouse. However, in many cases, the light signal emitted from a probe is too small to detect because it is scattered and attenuated by the tissue prior to being detected. The problem is that scattering and attenuation not only inhibit accurate measurement but also make image quality down. Thus we introduced a new method to reduce noise by using property of CCD and method to improve image quality of bioluminescence image by using two steps Gaussian blurring.

Key words: bioluminescence image, CCD noise correction, Gaussian blur, photon quantification

1. 서 론

생체발광영상기법(BLI, bioluminescence imaging)은 광학영상기법 중의 하나로 발광효소(luciferase)가 생체 내에서 특이 기질인 D-루시페린(D-luciferin)을 만나 화학반응을 일으키며 방출하는 빛을 영상화하는 기법이다[1-2]. BLI는 비침습적이며 가격이 저렴하고 다른 분자영상장비에 비해 영상을 획득하기가 더 쉽기 때문에 전 세계적으로 꾸준히 사용이 늘고 있으며 분자영상연구에 있어 필수적인 영상기법으로 자리매김 하였다. 그러나 생체 내에 투여된 광학 표지

자(optical probe)가 방출하는 빛이 주로 가시광선 영역의 빛이기 때문에 생체 내에서의 감쇄 및 산란이 심해 영상의 신호 대 잡음비(SNR, Signal to noise ration)가 낮은 것이 단점이다.

생체발광영상은 CCD카메라를 사용하여 영상을 획득하므로 BLI의 단점인 낮은 SNR을 극복하기 위해서는 먼저 영상 획득 시 발생하는 잡음 요소들에 대한 분석이 필요하다. 생체발광영상에 포함된 잡음은 그 원인에 따라 크게 광학적 잡음(optical noise), 전기적 잡음(electronic noise), 열적 잡음(thermal noise)으로 나눌 수 있다[3-4]. 광학적 잡음은 CCD카메라가 광자를 받아들이는 과정에서 발생하는 것으로 광자 산탄 잡음(photon shot noise)이라고도 하며 전체 잡음의 우연오차(temporal error)를 증가시키는 요인이 된다. 전기적 잡음은 광자가 광다이오드를 거쳐 전자로 변환되는 과정에서 발생하며 전자 산탄 잡음(electronic shot noise), 읽기 잡음(readout noise)이 대표적이다. 이 두 잡

Corresponding Author : 이병일
전남 화순군 화순읍 일심리 화순전남대병원(519-809)
TEL: +82-61-379-8482 / FAX: +82-61-379-8455
E-mail: dewpapa@hanmail.net

이 논문은 한국연구재단의 중견연구지원사업(No. 20100027672)과 광주과학기술원 소재 의료시스템공학연구소(iMSE)의 지원을 받아 수행된 연구임.

음은 우연오차와 계통오차(systematic error)를 모두 증가시킨다. CCD 자체에서 발생하는 열전자(thermal electron)에 의해서도 잡음이 발생하는데 이를 암전류 잡음(dark current noise)이라고 하며 전기적 잡음과 마찬가지로 우연오차와 계통오차(systematic error)를 모두 증가시킨다. 여기서 계통오차는 전체 잡음의 평균 크기와 관계가 있고 우연오차는 분산 또는 표준편차와 관계가 있다. 영상의 SNR을 높이고 화질을 개선하기 위해서는 전체 잡음의 계통오차와 우연오차에 대한 보정이 모두 필요하다.

계통오차의 보정을 위해서는 주로 외부의 빛이 없는 상태에서 카메라의 노출을 0초로 하여 촬영한 잡음 영상을 사용한다. 이 영상을 원본영상(raw image)에서 빼어주는 간단한 영상처리를 통해 계통오차의 대부분을 보정할 수 있다. 그러나 계통오차의 크기가 매 촬영마다 동일하지 않으므로 Schöberl은 보다 정밀한 보정을 위해 계통오차의 크기를 노출 시간에 따른 함수로 모델링 하는 방법을 제안하였다[5]. 그는 선형 모델(Linear Model), 분할 선형 모델(Segmented Linear Model) 그리고 이차 모델(Quadratic Model)을 사용하여 영상이 포함하고 있는 계통오차의 크기를 추정하였다. 하지만 Schöberl의 방법은 보정 결과 영상의 우연오차를 증가시키는 단점이 있다. Mansouri는 잡음 영상을 반복적으로 촬영하여 그 평균 영상을 계통오차의 보정에 사용함으로써 우연오차의 증가 없이 계통오차를 보정하였다[6]. 하지만 이 방법은 연속적으로 변화하는 계통오차의 특성을 반영하지 못하는 것이 단점이다. 따라서 이 연구에서는 각 보정 방법의 단점을 보완하여 Mansouri와 같이 평균 잡음 영상을 사용하되 계통오차의 크기를 매번 영상을 촬영할 때마다 직접 측정하여 우연오차 증가 없이 계통오차를 보정하는 방법을 제안하고자 한다.

계통오차를 보정하더라도 육안으로 볼 때의 영상의 질은 향상되지 않으므로 우연오차에 대한 보정을 통해 영상의 질을 향상시킬 필요가 있다. 영상에 포함된 우연오차는 주로 통계적 방법이나 정규화 알고리즘을 사용하여 보정하며 현재까지 다양한 알고리즘들이 소개되었다[7-9]. 그 중 가장 간단한 보정 방법은 영상을 여러 번 촬영한 다음 전체 영상의 평균 영상을 구하는 것이다. 하지만 생체발광영상은 살아있는 동물을 촬영하는 것이기 때문에 반복해서 촬영하거나 장시간 노출을 주어 촬영하기 어려운 경우가 많다. 정규화 알고리즘을 사용하면 이러한 반복 촬영 없이 영상의 우연오차를 보정할 수 있지만 계산 시간이 많이 걸려 실시간 촬영을 방해하거나 허상(artifact)으로 인해 광량 측정의 신뢰도를 떨어뜨릴 수도 있다. 따라서 이 연구에서는 두 번의 가우시안 블러링을 통해 처리 속도가 빠르면서 보정 후 측정값의 손실이 적은 우연오차 보정 방법을 제안하고자 한다.

II. 연구 방법

1. 연구 재료

생체발광영상의 획득을 위해 ALIS(Animal lighting imaging system)를 사용하였다[10-11]. ALIS는 질소냉각 방식의 CCD를 사용하여 개발한 영상장비로 암실내의 생체발광현상을 촬영하는 장비이다(그림 1). 보정용 광원으로는 XLS-4를 사용하였다[12]. XLS-4는 4개의 LED 광원으로 이루어져 있으며 생체발광실험에 사용하고 있는 파장대역과 유사한 635 nm의 빛을 방출하는 장비이다. 방출하는 광자의 양은 초당 약 $10^3 \sim 10^{10}$ flux(photons/sr/cm²)로 광량이 일정하기 때문에 생체발광영상장비의 정량 측정 성능을 평가하기에 적합한 광원이다(그림 2).

2. 잡음 모델링

ALIS 잡음 요소를 모델링 하기 위해 Irie가 제안한 CCD 잡음 모델을 사용하였다[13-14]. Irie의 모델은 CCD에서 발생하는 잡음을 발생 단계와 종류에 따라 분류하고 신호의 흐름



그림 1. 생체발광영상 획득에 사용한 ALIS 장비
Fig. 1. Animal lighting imaging system(ALIS) for acquisition of bioluminescence images

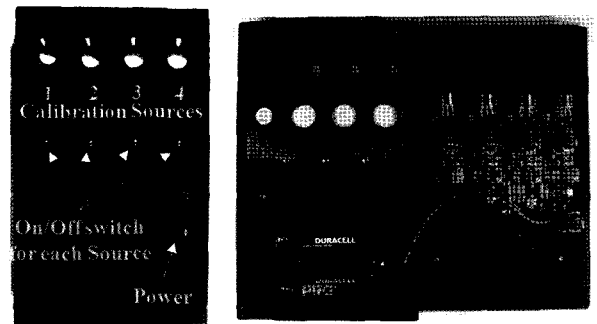


그림 2. 보정용 광원으로 사용한 XLS-4
Fig. 2. Calibrated light source (XLS-4)

에 따라 도식화한 것이다. ALIS의 잡음 모델은 Irie의 모델에서 컬러 CCD에서만 나타나는 디모자이킹 잡음(demosaicing noise), 디지털 필터 잡음(digital filter noise)을 제거하고, 미세 광량을 측정하는 장비에서는 측정이 어렵고 그 영향이 미미한 광반응 비균일성(photo-response non-uniformity)도 제거하였다. 그리고 읽기 잡음 영상에 포함되어 나타나는 고정 패턴잡음(fixed-pattern noise)을 생략하고 CCD 외부에서 발생하지만 광량 측정의 정확성에 영향을 미치는 비네팅(Vignetting) 왜곡을 포함시켰다. 수정된 ALIS의 잡음 모델을 수식으로 표현하면 아래와 같다.

$$R = S \times V + N_p + N_e + N_d + N_r + N_q \quad (1)$$

여기서 R은 원본영상이고 S는 잡음이나 왜곡이 포함되지 않은 유효신호 영상으로 최종적으로 얻고자 하는 영상이다. V, N_p, N_e, N_d, N_r 그리고 N_q는 각각 비네팅 왜곡, 광학적 잡음, 전기적 잡음, 암전류 잡음, 읽기 잡음 그리고 양자화 잡음이다.

잡음 모델을 통해 원본영상의 각 잡음 요소를 정의하였으므로 이를 역변환 하면 유효신호 영상인 S를 추정할 수 있다. 식 (1)을 S에 관해 다시 정리하면 아래와 같다.

$$S = (R - (N_p + N_e + N_d + N_r + N_q)) \times V^{-1} \quad (2)$$

여기서 N_d는 냉각형 CCD를 사용하면 무시할 수 있는 수준으로 떨어지므로 생략이 가능하다. 또 N_p, N_e 그리고 N_q는 산탄 잡음으로써 우연오차와 관계되므로 이를 N_t로 대체하고 반대로 N_r은 계통오차와 관계되므로 이를 N_s로 대체하면 식을 아래와 같이 보다 간단히 나타낼 수 있다.

$$S = (R - N_s - N_t) \times V^{-1} \quad (3)$$

이 논문에서는 식 (3)을 바탕으로 계통오차와 우연오차를 차례로 보정하고 비네팅 보정을 추가적으로 수행하여 유효신호 영상 S를 구하였다.

3. 계통오차 보정

생체발광영상을 촬영하면 광원에서 발생한 신호와 배경 잡음 등으로 인해 유효신호 S가 가진 계통오차의 실제 크기를 추정하기 어렵다. 따라서 이 논문에서는 생체발광영상을 분석하여 계통오차의 크기를 추정하는 대신 매번 영상 획득 때마다 노출 시간을 0초로 주고 촬영한 영상을 사용하여 계통오차를 보정하였다. 이 영상을 N_{total}이라고 한다면 N_{total}영상은 노출 시간이 0초이므로 유효신호 S가 0이 되고 광학적 왜곡 또한 발생하지 않으므로

$$N_{total} = \widehat{N}_s + \widehat{N}_t \quad \text{where} \quad \widehat{N}_s = N_s + \epsilon_s, \quad \widehat{N}_t = N_t + \epsilon_t \quad (4)$$

이 된다. 이 때 ε_s와 ε_t는 참 값과 추정된 값 사이의 오차이

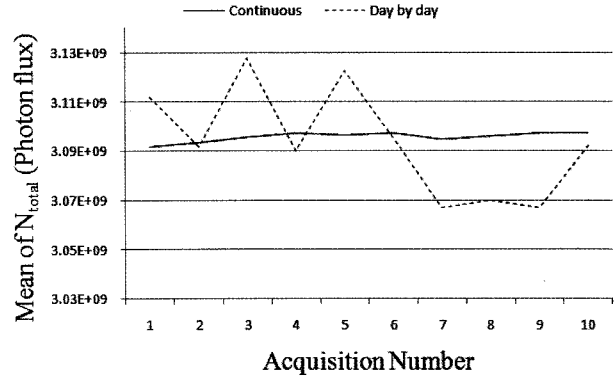


그림 3. 전체잡음(N_{total})의 크기 변화 (실선 : 연속 촬영, 점선 : 하루 간격 촬영)

Fig. 3. Differences of total noise(N_{total}). (Solid line: Continuous acquisition, Dashed line: Day-by-day acquisition)

고 ε_t의 크기가 작을수록 보다 정확한 보정을 할 수 있다. 그림 3에서와 같이 N_{total}의 크기는 시간에 따라 완만한 변화를 보이므로, 생체발광영상을 촬영한 직후에 노출을 0초로 주고 다시 한 번 영상을 촬영하여 생체발광영상이 가진 계통잡음과 유사한 크기의 계통잡음을 가지는 N_{total}영상을 촬영하였다. N_{total}을 사용하여 계통오차를 보정한 추정 영상 \hat{S} 은 아래와 같이 구하였다.

$$\hat{S} = R - N_{total} \quad (5)$$

$$= R - \{(N_s + \epsilon_s) + (N_t + \epsilon_t)\} \quad (6)$$

$$= S + N_s - (N_s + \epsilon_s) + N_t - (N_t + \epsilon_t) \quad (7)$$

$$= S - \epsilon_s + \epsilon_t \quad (8)$$

\hat{S} 은 N_{total}영상을 사용하였으므로 계통오차가 대부분 보정되고 실제로는 ε_s만 남게 된다. 하지만 ε_s = $\widehat{N}_s - N_s$ 이고 \widehat{N}_s , N_s는 확률변수이므로

$$\text{Var}(\epsilon_s) = \text{Var}(N_s) + \text{Var}(\widehat{N}_s) + 2\text{Corr}(N_s, \widehat{N}_s) \quad (9)$$

이 되어 보정 결과 영상의 우연오차가 약 2배 가까이 증가하는 문제가 있다. 이러한 우연오차의 증가를 막기 위해 이 논문에서는 사전에 N_{total}을 1000회 반복하여 촬영하고 그 평균 영상 N_{avg}를 구하여 식 (8)의 ε_s를 크게 감소시켰다. 하지만 N_{avg} 영상은 매번 영상 획득 때마다 동일하게 사용되어 연속적으로 변화하는 계통오차를 효과적으로 보정할 수 없으므로 이 논문에서는 N_{avg}의 계통오차를 매번 영상 획득 때마다 N_{total}이 가진 계통오차의 크기에 맞도록 보정하였다. 계통오차와 우연오차를 동시에 효과적으로 보정하기 위한 영상 N'_{avg}는 아래의 식 (10)을 사용하여 제작하였다.

$$N'_{avg} = \left(\frac{1}{NM} \sum_x \sum_y^M N_{total}(x,y) - \frac{1}{NM} \sum_x \sum_y^M N_{avg}(x,y) \right) + N_{avg} \quad (10)$$

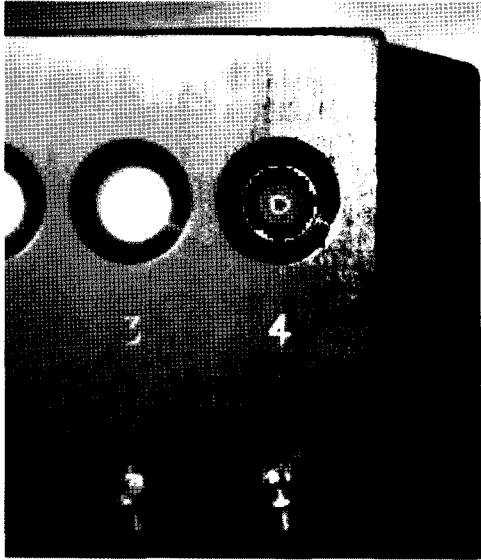


그림 4. XLS-4와 ROI를 이용한 광량의 측정
Fig. 4. Measurement of the photon intensity using XLS-4 and ROI

제한한 계통오차 보정 방법의 성능을 검증하기 위하여 N_{avg} 영상만 사용하는 Mansouri의 보정 방법과 비교하였다. 먼저 XLS-4의 4번 광원을 작동시킨 후 작동 직후의 광량 불안정이 해소되도록 약 10분간 대기한 다음 광원을 ALIS장비의 FOV(field of view) 중심에 위치시키고 노출 1, 2, ..., 10초로 3회 반복 촬영하였다. 그리고 광원이 위치한 곳에 지름이 9.2 mm인 원형 관심영역(ROI, Region of interest)를 그린 다음 ROI내 평균 광량을 측정하여 보정 방법에 따라 서로 비교하였다(그림 4).

4. 우연오차 보정

생체발광영상에서 우연오차는 영상의 화질을 떨어뜨리는 잡음 요소이다. 현재까지 광량이 풍부한 조건에서 촬영한 일반 영상의 화질 개선을 위해서 평균 영상을 이용한 통계적 방법 또는 총분산 최소화(total variation minimization)와 같은 정규화 방법 등이 소개되었지만 생체발광영상에 이를 적용할 경우 블러링(blurring) 과정에서 원본영상의 측정값이 손실되거나 허상(artifact)이 발생하는 문제가 있다. 생체발광영상에서는 영상의 화질만큼이나 광량 측정의 정확성도 중요한 요소이므로 이 연구에서는 영상의 화질을 개선하면서도 원본영상의 측정값에 대한 손실을 줄일 수 있는 2단계 가우시안 잡음 제거 방법(2-Step GD, 2-Step Gaussian Denoising)을 제안하였다. 제안한 방법은 아래의 두 단계로 구성된다.

$$\text{First step} : I_1 = I_0 \otimes G(\sigma) \quad (11)$$

$$\text{Second step} : I_2 = I_1 + D \otimes G(\sigma) \text{ where } D = (I_0 - I_1) \quad (12)$$

여기서 I_0 는 원본영상 R과 같고 G는 가우시안 커널(Gaussian kernel)이고 σ 는 G의 표준편차이다. \otimes 은 회전 연산자(convolution)이다. 알고리즘의 첫 번째 단계에서는 블러링을 통해 영상의 화질이 개선되도록 하였다. 이 때 블러링으로 인한 경계선 정보의 손실을 줄이기 위해 σ 의 크기를 2.0으로 제한하였다. 그림 5는 2-Step GD 방법의 각 단계별 신호의 변화를 1차원 신호를 사용하여 나타낸 것이다. 첫 번째 단계가 완료되면 그림의 가는 실선과 같이 우연오차는 보정이 되지만 원본 신호의 값이 일부 손실된다. 그림의 굵은 실선은 두 번째 단계까지 완료하였을 때의 신호 값을 나타낸 것으로 원본 신호의 크기가 유지됨과 동시에 우연오차가 잘 보정된 것을 볼 수 있다. 이를 위해 두 번째 단계에서는 I_0 의 잡음요소라 할 수 있는 D에 블러링을 다시 한 번 적용하여 I_1 에 더해줌으로써 첫 번째 단계에서 손실된 측정값 정보가 복원되도록 하였다.

2-Step GD 방법의 보정 성능을 검증하기 위해 노출 시간에 따라 밝기가 일정하게 증가하는 가상의 원형 광원 영상을 제작하였다. 광원의 크기는 지름 9.2 mm로 하였고 위치는 영상의 중심에 오도록 하였다. 모든 영상에 $\sigma = 1.25$ 인 가우시안 잡음을 동일하게 삽입하여 우연오차를 대신하였고 계통오차는 완전하게 보정되었다고 가정하였다. 각 영상의 노출 시간은 1, 2, ..., 10초로 하였으며 총분산 최소화 방법과 제안한 2-Step GD방법으로 각 영상을 보정하고 최대 신호 대 잡음비(PSNR, Peak signal to noise ratio)를 서로 비교하였다. 총분산 최소화 방법의 반복 회수는 15회로 하였으며 PSNR은 식 (13)을 사용하여 계산하였다.

$$\text{PSNR(dB)} = 10 \log \left(\frac{\max(0)^2}{\frac{1}{NM} \sum_x \sum_y M [S(x, y) - O(x, y)]^2} \right) \quad (13)$$

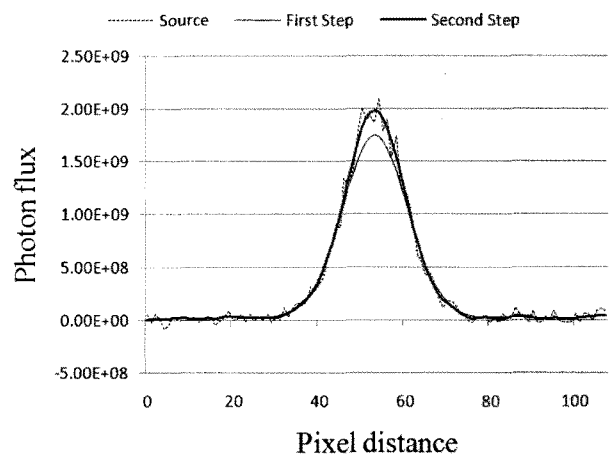


그림 5. 2-Step GD를 이용한 보정 방법의 단계별 신호 변화 (점선 : 원본 신호, 가는 실선 : 1 단계 적용, 굵은 실선 : 2단계 적용)
Fig. 5. Signal change between each step of the 2-Step GD method. (Dashed line: Original signal, Thin solid line: After first step, Thick solid line: After second step)

여기서 S는 광원이 위치한 곳에 그린 너비 9.2 mm의 정사각형 ROI로 신호 영역을 의미하며 max는 ROI 영역 내 픽셀의 최대값이다. O는 잡음이 없는 원본 신호에 그린 S와 동일한 크기와 위치를 가지는 ROI이다.

5. 비네팅 보정

동일한 밝기의 광원을 촬영하더라도 광원이 영상의 중심에 있을 때와 주변에 있을 때는 측정값에 약간의 차이를 보이는데 이러한 현상은 비네팅이 주된 원인이다[15-17]. 비네팅은 렌즈에 의한 광학적 왜곡으로 인해 발생하는 것으로 FOV내에서 광원이 어느 곳에 위치하든 관계없이 광량을 일관성 있게 측정하기 위해서는 비네팅에 대한 보정이 필요하다. 비네팅은 Reiss가 제안한 코사인 4승 법칙을 이용해 보정이 가능하지만 렌즈의 특성에 따른 편차가 심한 편이다[16]. 따라서 이 연구에서는 코사인 4승 법칙에 실험적으로 결정되는 가중치 ω 를 추가하여 비네팅을 보정하였다. 이를 수식으로 나타내면 아래와 같다.

$$\frac{E_{\theta}}{E_0} = \cos^4(\omega\theta) \quad (14)$$

여기서 θ 는 광축과 입사광이 이루는 각도를 나타내고, E_0 는 광축을 통과하는 빛의 밝기 즉, θ 가 0일 때의 빛의 밝기를 말한다. E_{θ} 는 빛이 광축에서 θ 만큼 비스듬하게 들어올 때의 밝기이다.

6. 광량 측정의 신뢰도 분석

생체발광영상의 분석에서는 광량의 정확한 측정이 가장 중요한 요소이므로 제안한 보정 방법의 성능 검증을 위해 광량 측정의 신뢰도를 분석하였다. 광량의 측정은 측정의 주체가 되는 측정자에 따라 영향을 받을 수 있고 측정자가 같더라도 측정 시간이나 측정 조건 등 여러 외부 요인에 의해서도 영향을 받을 수 있다. 그러므로 측정의 신뢰도 분석은 이 두 가지로 모두 고려해 1명의 측정자가 서로 다른 시간에 측정하였을 때의 측정자간 신뢰도(interobserver reliability)로 나누어 분석하였다. 측정자내 신뢰도는 1명의 실험자가 1시간 간격으로 30번의 측정을 3회 반복하였고 측정자간 신뢰도는 3명의 실험자가 1시간 간격으로 각각 30번의 측정을 하였다. 측정을 위한 광원은 XLS-4를 사용하였으며 일정한 광량의 유지를 위해 광원을 작동시킨 뒤 10분간 대기하며 작동 직후의 광량 변화를 안정시킨 후 촬영하였다. 촬영 시 노출 시간은 최소 1초에서 최대 15초까지 무작위로 하였으며 광원의 위치 역시 FOV내에서 무작위로 하였다. 획득한 각 영상을 Mansouri의 보정 방법과 제안한

방법을 사용하여 각각 보정하고 광원이 위치한 곳에 지름 9.2 mm의 원형 ROI를 그려 ROI내 평균 광량을 측정하였다. 측정의 동질성을 파악하기 위해 유의수준 0.05에서 일원배치 분산분석(One-way ANOVA, One-way Analysis of variance)을 두 가지 보정 방법에 대해 각각 시행하고 그 결과를 비교하였다.

7. 소동물 생체발광영상 실험

실제 소동물을 사용하여 생체발광영상을 획득하고, 획득한 영상에 제안한 보정방법을 적용하는 실험을 수행하였다. 먼저 건강한 Balb/c 5주령 마우스에게 CT26 마우스 대장암 세포를 좌측 어깨 부위에 접종하여 종양 직경이 8-10 mm가 되었을 때 *SalmonellaAppGpp-lux*를 1×10^7 cfu/100 μ l만큼 꼬리정맥으로 주입하였다. *SalmonellaAppGpp-lux*는 lux 유전자를 chromosome에 넣어 계속적으로 박테리아가 발광할 수 있으며 특히 종양 부위에서 더 잘 발현되는 특징이 있다. 주로 2~3일째에 종양 부위에서 상대적으로 많은 빛이 발생(tumor targeting)하므로 주입 후 5일간 매일 발광영상을 촬영하였다. 소동물 생체발광영상은 광량이 미약하므로 노출 시간을 30초로 주었으며 촬영한 영상을 Mansouri의 방법과 제안한 방법을 사용하여 보정하고 보정 기법간 차이를 비교하였다.

III. 연구 결과

1. 계통오차 보정 결과

계통오차의 보정을 위해 ALIS 장비에서 N'_{avg} 영상을 제작한 결과 N_{total} 영상의 픽셀 표준편차의 크기인 3.4×10^7 flux에 비해 N'_{avg} 영상의 픽셀 표준편차는 7.6×10^6 flux로 약 4.5배 작았다. 또한 N'_{avg} 을 식 (11)의 I_0 로 두고 식 (12)의 D를 계산하면 고정패턴잡음(fixed pattern noise)이 제거된 N'_{avg} 의 우연오차(근사치)를 구할 수 있는데 이 값은 1.7×10^6 flux로 같은 방법으로 구한 N_{total} 영상의 우연오차인 3.3×10^8 flux 보다 약 12배 작았다.

제안한 계통오차 보정방법의 성능 검증을 위해 Mansouri의 방법을 사용하여 보정하였을 때와 제안한 방법을 사용하여 보정하였을 때를 비교한 결과, Mansouri의 방법을 사용하였을 때는 노출 시간 별 측정값의 변이계수(%CV)가 노출 시간 8초에서부터 1 이하로 감소하였으나 제안한 방법을 사용하였을 때는 노출 시간 1초에서부터 변이계수가 1 이하로 감소하였으며 노출 시간 1초에서 10초까지 큰 변이 없이 일정한 측정값을 보였다(그림 6).

2. 우연오차의 보정 결과

제안한 2-Step GD 방법으로 우연오차를 보정한 결과 노

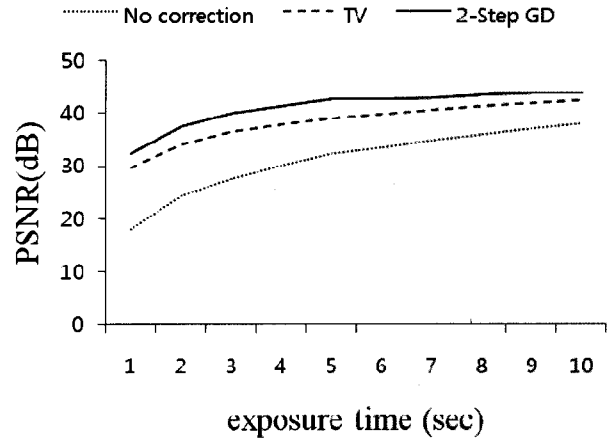
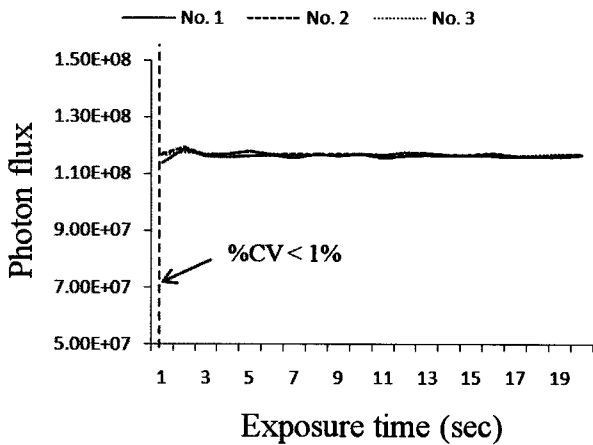
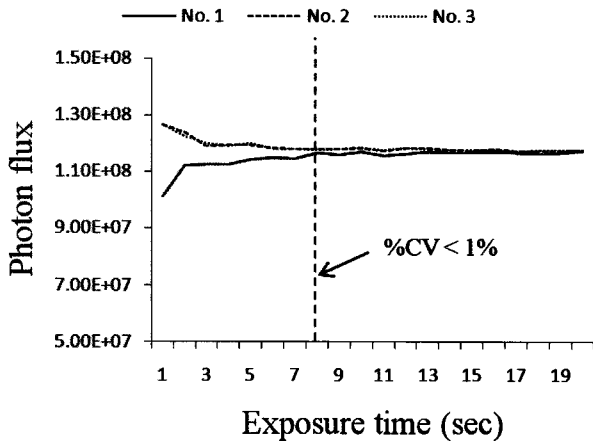


그림 7. 우연오차 보정 성능 실험 결과

Fig. 7. Comparison of two kind of temporal error correction methods

90

그림 6. 계통오차 보정 결과 (a) Mansouri의 방법 (b) 제안한 방법
Fig. 6. Comparison of two kind of systematic error correction methods. (a) Mansouri's method (b) Proposed method

출 시간에 따라 정도의 차이가 있지만 충분산 최소화 방법을 사용하였을 때보다 1.2~2.5 dB정도 PSNR이 향상되었다(그림 7).

3. 신뢰도 분석 결과

측정자내, 측정자간 신뢰도 평가 실험의 결과를 상자 도표(box plot)를 사용하여 나타내었다(그림 8-9). 측정자내 신뢰도 평가를 위해 일원배치 분산분석을 실시한 결과, Mansouri의 방법을 사용하여 보정하였을 때는 측정값 간에 통계적으로 유의한 차이를 보였으나($p = .015$) 제안한 방법을 사용하였을 때는 유의한 차이가 없었다($p = .870$). 또 측정자간 신뢰도 평가에서도 측정자내 신뢰도 평가와 유사하게 Mansouri의 방법을 사용하여 보정하였을 때는 통계적으로 유의한 차이를 보였지만($p = .002$) 제안한 방법을 사용하였을 때는 유의한 차이가 없었다($p = .968$).

4. 소동물 생체발광영상 실험 결과

마우스의 꼬리 정맥으로 주입된 *SalmonellaAppGpp-lux*

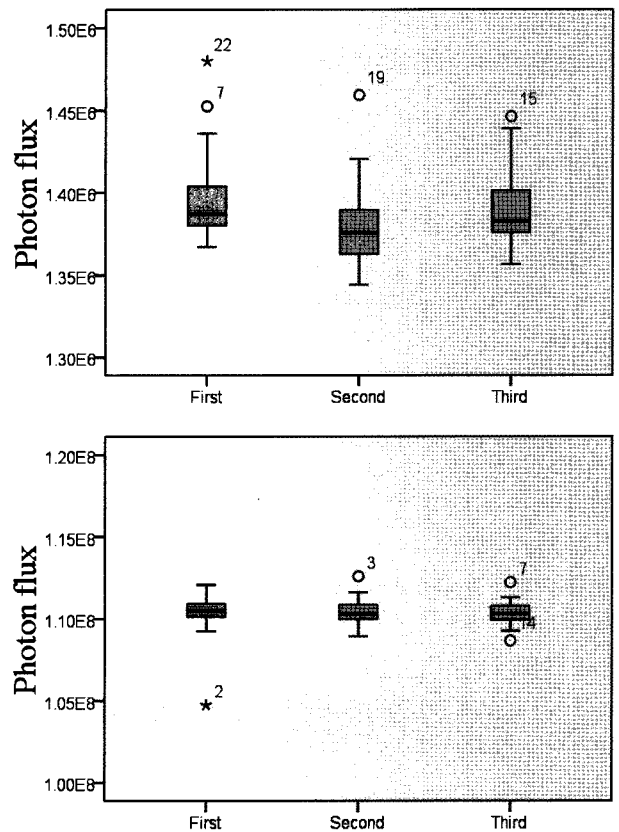


그림 8. 측정자내 신뢰도 분석 결과 (a) 보정 전 ANOVA $p = .015$ (b) 보정 후 ANOVA $p = .870$

Fig. 8. Intra-rater reliability of the photon intensity measurement. (a) Before correction, ANOVA $p = .015$ (b) After correction, ANOVA $p = .870$

가 처음 며칠간 간(liver), 비장(spleen)에서 발현을 보이다 이후 종양 부위에서 강한 발현을 보였다. 그림 10의 (a)와 (b)는 마우스의 종양 부위를 확대한 영상이다. SNR을 높이기 위해 노출 시간을 30초로 길게 주었지만 여전히 약 13 dB

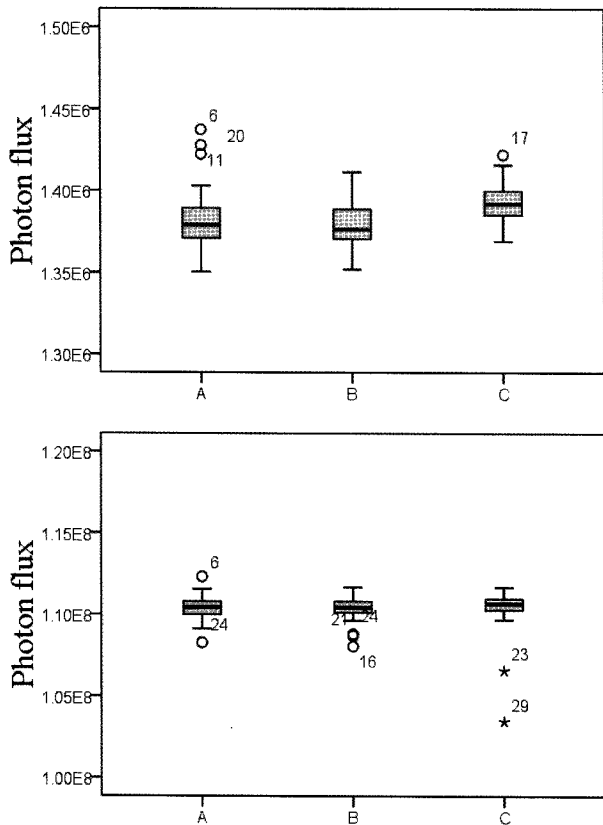


그림 9. 측정자간 신뢰도 분석 결과 (a) 보정 전 ANOVA $p = .002$ (b) 보정 후 ANOVA $p = .968$
 Fig. 9. Inter-rater reliability of the photon intensity measurement. (a) Before correction, ANOVA $p = .002$ (b) After correction, ANOVA $p = .968$

로 SNR이 낮았다. 때문에 (a)와 같이 계통오차만 보정하였을 때는 잡음으로 인해 화질이 좋지 못했다. 반면 제안한 방법으로 우연오차까지 보정하였을 때는 (b)와 같이 화질이 개선되었으며 이 때의 SNR은 35 dB로 (a)와 비교하여 약 23 dB 향상되었다. (c)는 (a)와 (b)의 종양 부위에서 선윤곽(line profile)을 비교한 것으로 제안한 방법으로 우연오차를 보정한 후에도 신호의 크기가 잘 유지 됨을 확인할 수 있었다.

IV. 결 론

생체발광영상의 정량화는 분자영상연구에 있어 핵심적인 영상기법이다. 이 연구에서는 계통오차와 우연오차를 동시에 보정함으로써 생체발광영상의 정량화에 대한 신뢰성을 높이고 영상의 질을 향상시키기 위한 보정기법을 개발하였다.

개발한 계통오차 보정방법을 생체발광영상에 적용한 결과 우연오차의 증가 없이 계통오차를 보정할 수 있었으며 계통오차의 크기를 매번 영상을 획득할 때마다 직접 측정하는 방식을 사용하였기 때문에 계통오차의 크기를 추정하는 방식

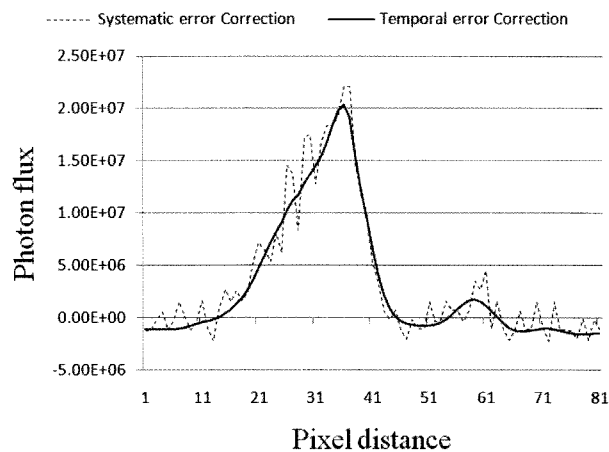
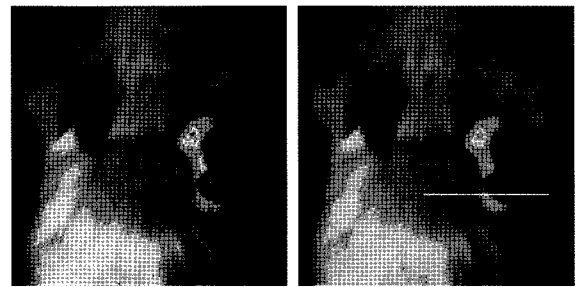


그림 10. 마우스 종양 모델의 생체발광영상 (a) 계통오차 보정 (b) 우연오차 보정 (c) 계통오차와 우연오차 보정 후 선윤곽 비교
 Fig. 10. Correction of the bioluminescence image of mouse tumor model. (a) After Systematic error correction (b) After temporal error correction (c) Comparison of the line profile between the systematic error correction and the temporal error correction

에 비해 정확한 보정을 할 수 있었다. 이를 통해 영상 획득 시 최소 노출 시간인 1초만 주어도 장시간 노출을 주어 촬영하였을 때와 같이 높은 신뢰도로 광량을 측정할 수 있었다.

계통오차 보정과 함께 우연오차를 보정함으로써 측정의 정확성뿐만 아니라 영상의 질도 개선하였다. 우연오차의 보정을 위해 제안한 2-Step GD 방법은 가우시안 블러링을 사용하여 화질을 개선하되 블러링을 통한 화질 개선의 단점이라 할 수 있는 원본 측정값에 대한 손실을 보정하기 위한 방법이다. 2-Step GD 방법과 충분산 최소화 방법을 사용하여 잡음을 보정한 결과 2-Step GD 방법의 계산 시간이 더 짧았으며 PSNR이 더 향상되었다. CCD의 해상도와 감도를 높이거나 하드웨어 비닝(Hardware binning) 등 물리적인 방법을 통해서도 이와 유사한 효과를 볼 수 있지만 제안한 방법을 사용함으로써 하드웨어의 지원 없이 효과적으로 우연오차를 보정하고 화질을 개선할 수 있었다. 또한 제안한 방법을 사용하여 생체발광영상을 보정한 결과 측정하고자 하는 광원의 FOV내 위치나 카메라의 노출 시간에 관계없이 신뢰성 있는 측정값을 얻을 수 있었으며 광량을 측정하는 측정자를 달리하거나 측정 시각을 달리 하였을 때에도 신뢰성

있는 측정을 할 수 있었다.

제안한 방법을 실제 소동물 생체발광영상에 적용 가능한 지 알아보기 위한 소동물 실험은 광원의 밝기가 수시로 변화하는 생물학적 특성을 고려해 광량 측정의 정확성보다는 화질 개선에 초점을 두어 실험을 수행하였으며 이를 위해 실험 대상은 누드마우스 대신 체모에 의한 빛의 산란이 심한 Balb/c 마우스를 사용하였다. 제안한 방법으로 소동물 영상을 보정한 결과 측정값의 손실을 최소화하면서 높은 화질 개선 효과를 보였다. 제안한 방법의 화질 개선 효과는 SNR이 낮을수록 높게 나타나는데 소동물 영상의 경우 광량이 미약하여 그 효과가 더욱 잘 나타났다.

제안한 보정 방법은 XLS-4광원이나 실제 소동물의 생체발광영상을 효과적으로 보정하였으나 모든 생체발광영상에 대해 동일한 형태의 가우시안 블러링을 적용하는 것은 단점으로 작용할 수 있다. 생체발광영상은 촬영 대상과 조건에 따라 SNR이 달라지는데 이를 고려하지 않은 2-Step GD방법은 높은 SNR을 가지는 영상의 대조도를 감소시킬 가능성이 있다. 따라서 향후 연구에서는 영상의 SNR에 따른 적응적인 2-Step GD방법의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- [1] June-Key Chung, "General Perspectives for Molecular Nuclear Imaging," *Korean J. Nucl. Med.*, vol. 38, no. 2, pp. 111-114, 2004.
- [2] Jung-Joon Min, "In Vivo Molecular Photonic Imaging," *Korea Society for Molecular and Cellular Biology*, vol. 7, no. 3, pp. 21-35, 2005.
- [3] Y. Matsushita, S. Lin, "Radiometric calibration from noise distributions," in *CVPR*, Minneapolis, USA, Jun. 2007, pp.6.
- [4] L. Vandamme, "Noise as a diagnostic tool for quality and reliability of electronic devices," *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 41, no. 11, pp. 2176-2187, 1994.
- [5] M. Schoberl, C. Senel and S. Foßel, "Non-linear dark current fixed pattern noise compensation for variable frame rate moving picture cameras," in *EUSIPCO*, Glasgow, Scotland, Aug. 2009, pp. 268-272.
- [6] A. Mansouri, F. Marzani and P. Gouton, "Development of a protocol for CCD calibration: application to a multispectral imaging system," *International Journal of Robotics and Automation*, vol. 20, no. 2, pp. 94-100, 2004.
- [7] J. Bardsley, A. Luttmann, "Total variation-penalized Poisson likelihood estimation for ill-posed problems," *Advances in Computational Mathematics*, vol. 31, no. 1, pp. 35-59, 2009.
- [8] Y. Huang, M. Ng and Y. Wen, "A new total variation method for multiplicative noise removal," *SIAM Journal on Imaging Sciences*, vol. 2, no. 1, pp. 20-40, 2009.
- [9] J. Oliveira, J. Bioucas-Dias and M. Figueiredo, "Adaptive total variation image deblurring: A majorization-minimization approach," *Signal Processing*, vol. 89, no. 9, pp. 1683-1693, 2009.
- [10] Byeong-il Lee, Hyeon Sik Kim and Hye Jin Jeong, "Development of Optical Molecular Imaging System for the Acquisition of Bioluminescence Signals from small Animals," *Nucl Med Mol Imaging*, vol. 43, no. 4, pp. 344-351, 2009.
- [11] Hyeon Sik Kim, Eun Seo Choi and YoonOh Tak, "Development of Quantification Method for Bioluminescence Imaging," *Nucl Med Mol Imaging*, vol. 43, no. 5, pp. 451-458, 2009.
- [12] M. Nelson, B. Rice and B. R. Bates, "Light calibration device for use in low level light imaging systems," *United States Patent*, 2002.
- [13] K. Irie, A. E. McKinnon and K. Unsworth, "A model for measurement of noise in CCD digital-video cameras," *Measurement Science and Technology*, vol. 19, pp. 045207, 2008.
- [14] K. Irie, A. E. McKinnon and K. Unsworth, "A technique for evaluation of CCD video-camera noise," *IEEE Transactions on Circuits and Systems for Video Technology*, vol. 18, no. 2, pp. 280, 2008.
- [15] D. Goldman, J. Chen, "Vignette and exposure calibration and compensation," in *ICCV*, Beijing, China, Oct. 2005, pp. 899-906.
- [16] M. Aggarwal, H. Hua and N. Ahuja, "On cosine-fourth and vignetting effects in real lenses," in *ICCV*, 2001. pp. 472-479.
- [17] M. Reiss, "The Cos⁴ Law of Illumination," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 35, no. 4, pp. 283-288, 1945.