

# 정규 상호상관도 및 이진화 기법을 이용한 뇌종양 세포의 형광 현미경 영상 스티칭

서지현<sup>\*</sup>, 강미선<sup>\*\*</sup>, 김현정<sup>\*\*\*</sup>, 김명희<sup>\*\*\*\*</sup>

## Image Stitching Using Normalized Cross-Correlation and the Thresholding Method in a Fluorescence Microscopy Image of Brain Tumor Cells

Ji Hyun Seo<sup>\*</sup>, Mi-Sun Kang<sup>\*\*</sup>, Hyun-jung Kim<sup>\*\*\*</sup>, Myoung-Hee Kim<sup>\*\*\*\*</sup>

### ABSTRACT

This paper, which covers a fluorescence microscopy image of brain tumor cells, looks at drug reactions by treating different types and concentrations of drugs on a plate of 24x16 wells. Due to the limitation of the field of view, a well was taken into 9 field images, and each has an overlapping area with its neighboring fields. To analyze more precisely, image stitching is needed. The basic method is finding a similar area using normalized cross-correlation (NCC). The problem is that some overlapping areas may not have any duplicated cells that help to find the matching point. In addition, the cell objects have similar sizes and shapes, which makes distinguishing them difficult. To avoid calculating similarity between blank areas and roughly distinguishing different cells, thresholding is added. The thresholding method classifies background and cell objects based on fixed thresholds and finds the location of the first seen cell. After getting its location, NCC is used to find the best correlation point. The results are compared with a simple boundary stitched image. Our proposed method stitches images that are connected in a grid form without collision, selecting the best correlation point among areas that contain overlapping cells and ones without it.

**Key words:** Normalized Cross-Correlation, Thresholding, Image Stitching, Well

### 1. 서 론

약물 및 농도 별 반응을 살펴보기 위해 환자에게서 추출·배양된 뇌종양 세포들은 384개의 웰(well)로 구성된 플레이트(plate)에서 각기 다른 종류 및 농도

로 처리되어 형광 현미경 영상으로 획득되었다. 그러나 1개의 웰은 관측시야(FOV: Field of View)의 한계로 인해 9개의 필드(field)들로 나뉘어 촬영되었고, 각 필드는 인접하는 필드와 중복되는 영역을 지니고 있다. 보다 정확한 웰 단위의 분석을 위해 필드 영상

※ Corresponding Author : Myoung-Hee Kim, Address: (03760) 52, Ewhayodae-gil, Seodaemun-gu, Seoul, Republic of Korea, TEL : +82-2-3277-4420, FAX : +82-2-3277-4409, E-mail : mhkim@ewha.ac.kr

Receipt date : Jan. 24, 2017, Revision date : May 15, 2017  
Approval date : May 29, 2017

<sup>\*</sup> Dept. of Computer science & Engineering, Ewha Womans University (E-mail : jihyuns1109@gmail.com)

<sup>\*\*</sup> Dept. of Computer science & Engineering, Ewha Womans University (E-mail : Mesun@ewhain.net)

<sup>\*\*\*</sup> Seoul School of Integrated Sciences & Technologies (aSSIST) (E-mail : charitas@empas.com)

<sup>\*\*\*\*</sup> Dept. of Computer science & Engineering, Ewha Womans University

※ This research was supported by the Bio & Medical Technology Development Program of the NRF funded by the Korean government, MSIP (NRF-2015M3A9A7029725). We thank Institute for Refractory Cancer Research, Samsung Medical Center for providing microscopic images of glioblastoma cells.

들을 하나의 완전한 웰 영상으로 합치는 작업, 즉 영상 스티칭(image stitching)을 필요로 한다.

관련 연구들을 살펴보았을 때 영상 스티칭은 일반적으로 특징 기반(feature-based)과 밝기 값 기반(intensity-based)으로 분류 할 수 있다. 특징 기반 방법은 점, 선 및 등고선과 같은 특징들 간의 일치를 찾는 반면 밝기 값 기반은 영상에서 변화하는 강도의 크기를 비교하여 일치하는 부분을 찾는다[1]. 특징 기반은 영상의 특징점을 추출하여 유사도를 구하는 방식으로 영상의 각도, 회전, 크기 등에 좌우 받지 않으며 사용자가 직접 입력해야 하는 매개 변수가 없다. C. Sun et al.은 헤리스 코너(Harris corner) 방법을 통해 특징점 추출 후 특징 기반 상관관계를 사용하여 매칭점을 찾는 방법을 제안하고 있다. 광학 현미경 영상과 형광 영상 두 타입에 모두 적용한 이 방법은 최소 이미지의 5%가 중첩된다는 가정아래 코너를 찾는다[2]. Bin Ma et al.은 헤리스 코너와 달리 영상의 크기 변화에도 영향을 받지 않는 SIFT(Scale Invariant Feature Transform)와 특징 기반 상호상관도를 사용하여 매칭점을 찾는 스티칭 어플리케이션 AutoStitch를 전자 현미경 영상에도 적용하고 있다[3]. SIFT와 헤리스 코너 방법 모두 높은 정확성을 자랑하지만, 본 논문에서 사용하고자 하는 형광 영상은 크기, 회전과 같은 변화는 없는 관계로 헤리스 코너와 SIFT만큼 복잡한 계산을 필요로 하지 않는다. 그리하여 효율성 높이고자 좀 더 적은 계산량을 지닌 밝기 값 기반 방법을 사용하게 되었다.

두 영상의 유사도를 알아내기 위해 밝기 변화를 비교하는 기본적인 방법으로는 평균 절대차(Mean Absolute Difference: MAD) 또는 평균 제곱오차(Mean Square Error: MSE)가 있다[4]. 그러나 이 두 개의 방법은 영상의 전체 밝기가 균일하지 못한 경우에 적용하기 어렵기 때문에 이 방법을 사용하기 위해서는 사전에 비교 영역의 밝기 값을 정규화 시켜 밝기에 상관 없이 패턴을 비교할 수 있게 만들어야 한다. 이를 위해 본 논문에서는 정규화와 영상간 밝기차를 비교하는 과정을 동시에 처리할 수 있는 방법인 정규 상호상관도(Normalized Cross Correlation: NCC)를 사용한다. 정규 상호상관도는 영상간 가장 유사한 영역을 찾아내기 위해 사용하는 대표적인 방법 중 하나로, 3차원 다중 치과 CT[5], 전신의 디지털 X-ray영상[6] 또는 혈관을 촬영한 광학 현미경[7] 등

다양한 의료영상들을 스티칭하는 데 적용되기도 하였다. 그러나 본 논문에서 사용하는 세포 영상은 스티칭을 하고자 하는 영역 내 객체가 세포핵으로 대부분 유사한 형태와 크기를 지니고 있으며, 중첩되는 영역의 범위가 적은 관계로 중첩 영역 내 중복되는 세포의 포함 여부 및 정도가 일정치 않아 중복 가능한 모든 범위에 정규 상호상관도를 적용하여 비교하기에는 어려운 점이 있었다. 이를 해결하려면 계산 과정에서 비교 영역 내 객체가 없이 배경만 있어 상관도가 높게 나온 것인지, 중복되는 객체가 없는 상황에서 다른 세포핵을 동일한 객체로 인식하여 높은 수치를 얻은 것인지 구분할 수 있어야 한다. 본 논문에서는 이를 구분하기 위해 기본적인 이진화(thresholding) 방법을 적용하여 세포핵의 존재 유무 및 위치를 확인한 후 정규 상호상관도를 이용하여 가장 높은 유사도를 보이는 영역을 찾아내어 뇌종양 세포의 형광 현미경 영상을 자동으로 스티칭하는 방법을 제안한다.

## 2. 뇌종양 세포 형광 현미경 영상 스티칭

본 논문에서 제안하는 세포핵 영상의 스티칭 작업 순서는 Fig. 1와 같다. 이웃하는 영상들간 세포핵이 존재하는 중첩 영역을 찾고, 각 영역의 상관도 값을 계산 후 비교하여 웰 내 필드영상들의 위치를 결정하고 있다. 이웃하는 필드 영상 간 최적의 유사도를 지닌 영역을 찾는 과정은 Fig. 2에 ②와 ③에서 구체적으로 보여주고 있으며, 이는 2.2와 2.3에서 자세히 설명한다.

### 2.1 대상 영상

실험에 사용한 영상은 삼성서울병원에서 제공받은 것으로 Operetta High-Content Imaging System을 통해 환자유래 뇌종양 세포에 약물을 처리하고 형광 염색을 한 세포핵을 10배율로 촬영한 것이다. 1개의 웰은 9개의 필드로 나누어 촬영되었으며 Fig. 2에 나온 것과 같은 순서의 배열로 구성되어 있다. 이웃하는 필드 간에 서로 중복되는 영역을 갖고 있으며, 기계적 한계로 인해 중복 영역의 크기가 조금씩 차이를 지니는데, 수동적으로 플레이트 웰들의 영상을 전체적으로 살펴보았을 때 최대 중첩 범위는 좌우 35픽셀, 상하 20픽셀 이내로 필드 영상의 2~2.5% 정

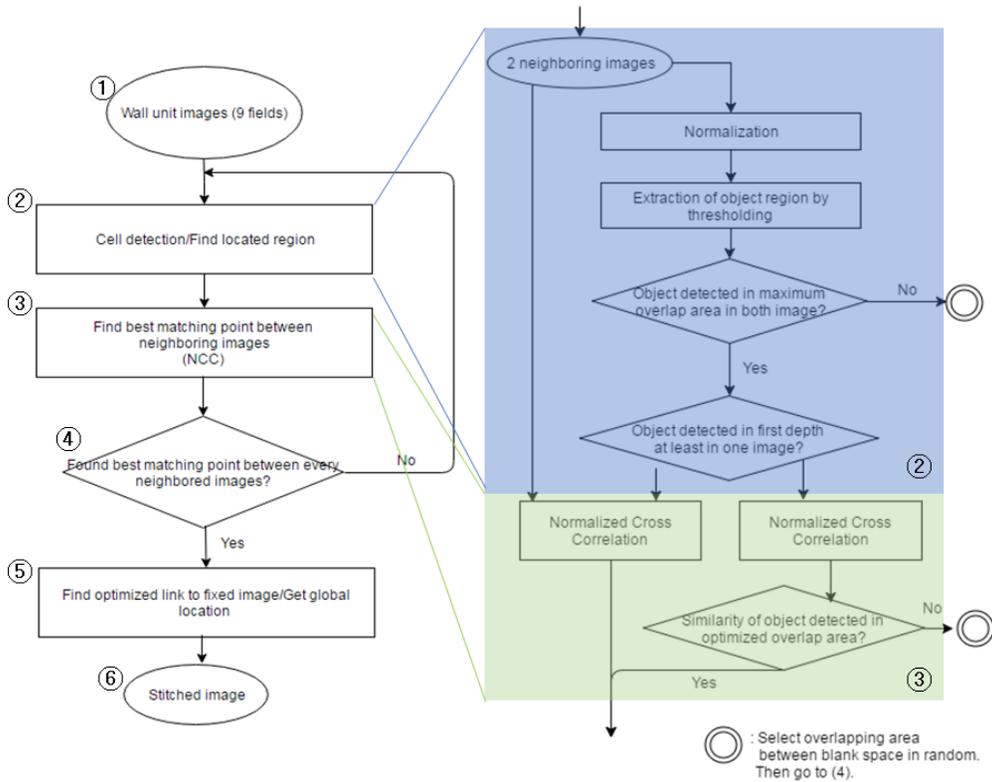


Fig. 1. Flowchart of stitching algorithm.

도에 해당한다. 각 필드영상들은 빛 흡수율, 광경로 등의 차이로 인해 영상의 밝기가 균일하지 못하다.

2.2 이진화 처리를 통한 중첩 영역 내 세포 유무와 위치 확인

Fig. 1의 ②단계에 속하는 이진화 처리는 중첩 가능한 최대 범위 안에 세포의 존재여부 및 존재 시

위치를 파악하기 위해 이루어진다. 이진 영상은 객체의 유무와 위치만 파악하고자 하는 목적으로 그 이후 정규 상호상관도를 계산할 때는 기존 원영상을 사용한다. 일차적으로 광경로 및 빛 흡수율 등의 차이로 인해 나타나는 필드 영상 간의 균일하지 않은 밝기 차이를 좁히기 위해 영상 대비 정규화가 진행되며, 그 다음 전역 고정된 두 개의 임계값으로 각각 이진화 처리를 하여 세포핵이 최대 중첩 영역 범위 내에 존재하는지 확인한다. 발견되는 세포핵이 있다면 중첩 영역 비교 시 가장 첫 번째로 중첩될 세포핵의 위치정보를 계산하여 ③단계에 넘겨주게 된다. 이진화 처리시 서로 다른 임계값 2개를 사용하는 이유는 Fig. 3과 같이 세포핵의 형광 밝기가 약한 경우 밝기 값의 변화도(gradient)에서 에지(edge) 검출을 하는 대표적인 이진화 기법에서는 감지하지 못하기 때문에 약한 밝기의 세포핵도 탐지 가능한 낮은 임계값으로도 이진화를 적용한다. 이 단계에서 발견되는 세포들은 Fig. 4와 같이 위치에 따라 3가지 타입으로 분류할 수 있다. 중복되는 세포가 없는 경우와 중복되는

Field 2	Field 3	Field 4
Field 6	Field 1	Field 5
Field 7	Field 8	Field 9

Fig. 2. Order of field images composing well.

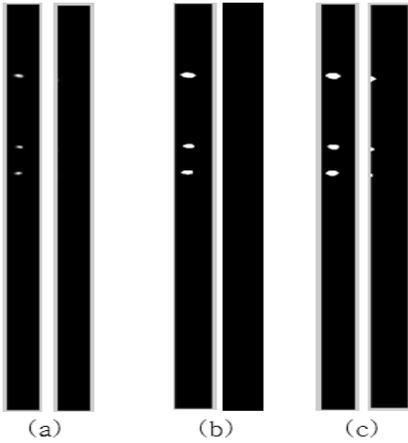


Fig. 3. (a) Normalized image (b) Binary image in threshold value 0.05 (c) Binary image in threshold value 0.025.

세포가 존재하는 경우, 마지막으로 중복되는 세포가 존재하는지 확인 할 수 없는 경우이다. 첫 번째 경우는 (A)와 같이 둘 중 하나라도 범위 내에 세포가 발견되지 않는다면 두 필드영상 간 중첩된 세포가 없는 것으로 간주하여 빈 배경 사이에 임의로 중첩되는 영역을 설정하는 것으로 끝나게 된다. 두 번째는 (B)처럼 두 영상 모두 범위 내에 세포가 있고 적어도 하나의 세포가 중복되는 영역이 첫 번째 픽셀 열에서부터 위치하고 있는 경우이다. 이 경우 중첩되는 세포가 존재한다고 판단하여 정규 상호상관도를 계산하는 단계로 넘어가게 된다. 마지막으로 두 필드 모두 범위 내에 세포가 존재하지만, 둘 다 첫 번째 픽셀 열에서부터 거리를 두고 있어 동일 세포인지 아닌지 확인할 수 없는 경우이다. (C)에서 세포들의 크기와 모양은 유사하지만 위치를 보면 서로 다른 세포인 관계로 가장 높은 유사도를 보인 부분을 찾아도 그것은 옳은 중첩 영역이 아니기 때문에 중첩 영역을 찾는 방법은 두 번째와 같지만 추가적으로 임계값으로 검출된 이진화 처리 영상의 겹치는 비율을 계산하여 설정한 제한 값을 기준으로 서로 다른 세포인지 판단을 내린다. 이렇게 다른 세포인 경우 첫 번째와 같이 빈 배경 사이에 임의의 중첩 영역을 설정하는 것으로

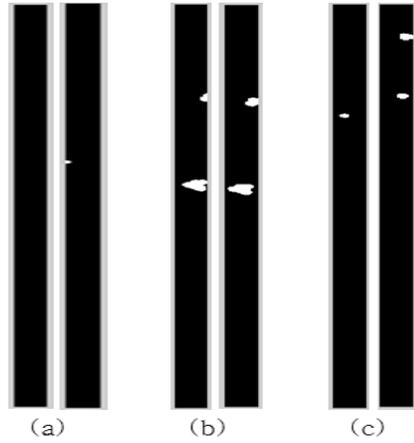


Fig. 4. Image thresholding in maximum overlap area (a)Type 1 (b)Type 2 (c)Type 3

마무리하게 된다.

### 2.3 정규 상호상관도 기반 중첩 영역의 유사성 비교

Fig. 2의 ③단계는 가장 높은 유사도를 보이는 부분을 찾기 위해 중첩 가능한 범위 내에 세포가 일부 겹쳐지기 시작한 부분부터 최대 범위까지 가능한 모든 영역에서 정규 상호상관도를 계산한다. 겹쳐지는 깊이에서만 정규화 한 후 강도 차이를 계산하는 것으로 밝기차이에 상관없이 패턴의 비교가 가능하다. 정규 상호상관도를 구하는 식은 다음과 같이 정의된다.

필드간 유사한 영역을 찾기 위해 현재 비교하는 영역의 픽셀 크기가  $M \times N$ 이라고 할 때  $im1(x,y)$ 는 두 영상 중 하나의  $(x,y)$  위치에서 픽셀의 밝기 값이며,  $\overline{im1}$ 는  $im1$ 의 평균 밝기 값,  $im2(x,y)$ 는 다른 영상의 픽셀 위치 별 밝기 값을 담고 있는 함수이다. 정규 상호상관도는 0에서 1사이의 값을 갖게 되는데 1에 가까울수록 비교하는 영역의 유사도가 높다는 의미를 뜻한다.

### 2.4 필드 별 상호상관도 비교를 통한 웰영상 내 위치 재정의

이웃하는 두 필드 간의 가장 높은 유사도를 보인

$$Normalized\ Cross\ Correlation = \frac{\sum_{x=0y=0}^M \sum_{y=0}^N (im1(x,y) - \overline{im1})(im2(x,y) - \overline{im2})}{\sqrt{(\sum_{x=0y=0}^M \sum_{y=0}^N (im1(x,y) - \overline{im1})^2) (\sum_{x=0y=0}^M \sum_{y=0}^N (im2(x,y) - \overline{im2})^2)}} \quad (1)$$

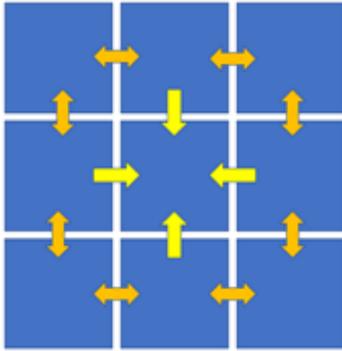


Fig. 5. Possible connection between field images due to its correlation value.

영역을 모두 찾으면 웰 내의 필드영상들이 어느 이웃 필드를 기반으로 위치를 구할 것인지 결정하는 단계로 넘어가게 된다. 전 단계들을 통해 모든 이웃하는 영상 간 가장 높은 유사도를 보인 중첩 영역을 찾았지만 중첩대상이 아예 없는 경우 임의의 위치에 정의를 한 경우도 있고, 웰을 구성하는 필드 간 구해낸 중첩 영역이 조금씩 차이를 지니고 있어 전체적으로 정확하게 맞물리지 않을 수 있다. 따라서 웰 내 필드

영상의 위치를 구할 때 이웃하는 필드 간 중첩 영역에서 구한 상관도 값을 비교하여 더 높은 상관도를 지닌 경로를 찾아 이를 이용하여 중앙 필드를 중심으로 웰 영상 내 필드영상들의 위치를 정하게 한다. Fig. 5와 같이 각 필드는 화살표 방향으로 이웃하는 필드 간의 중첩 영역에서 가장 높은 유사도를 보인 영역에서 얻은 상호상관도 값을 비교하여 중앙 필드까지 최소 상호상관도가 가장 높게 나온 경로를 선택하게 된다.

### 3. 실험 결과

본 논문에서 제안된 방식은 Intel Xeon X5482 3.20Ghz CPU, 4GB 메모리 컴퓨터 환경에서 실험되었으며 프로그램은 MATLAB R2013A가 사용되었다. 1개의 웰(필드영상 9장)을 처리하는데 걸리는 시간은 평균적으로 34.38초가 소요된다.

Fig. 6와 Fig. 7은 제안한 알고리즘을 적용한 스티칭 결과를 보여주고 있으며 원본의 밝기 강도가 낮은 관계로 차이를 뚜렷하게 구분할 수 있도록 영상 대비도를 높인 영상이다. Fig. 6의 각 (A), (B), (C)의 1과

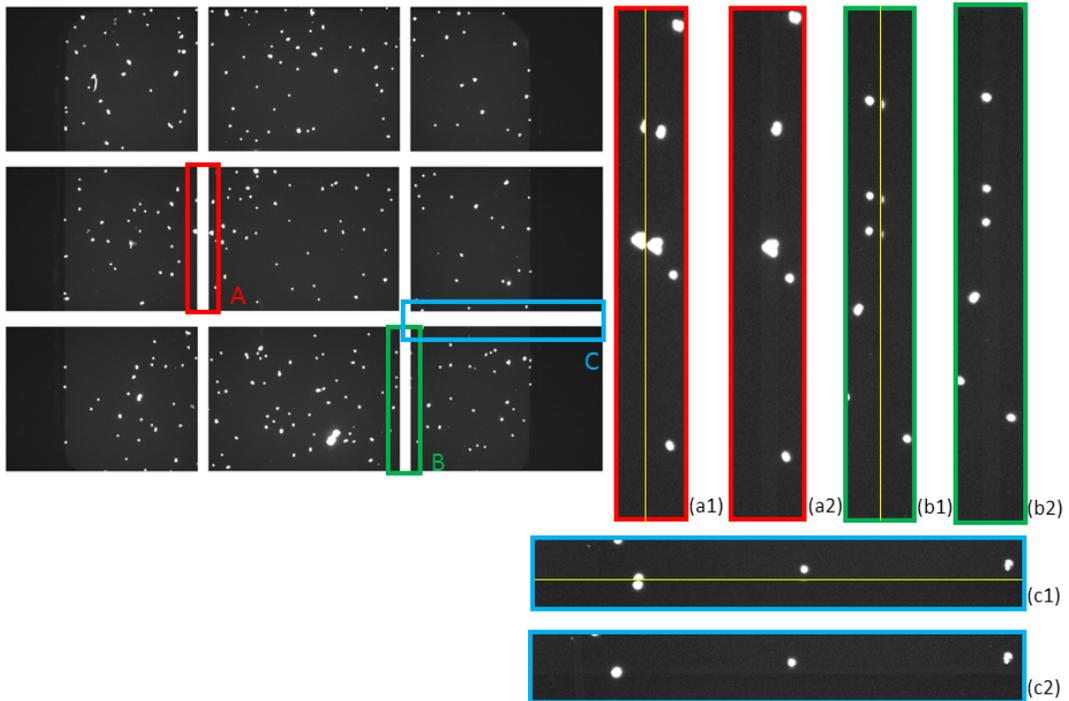


Fig. 6. Magnified overlapping area of Fig 5 image. (a1) Without proposed algorithm (a2) Proposed algorithm (b1) Without proposed algorithm (b2) Proposed algorithm (c1) Without proposed algorithm (c2) Proposed algorithm.

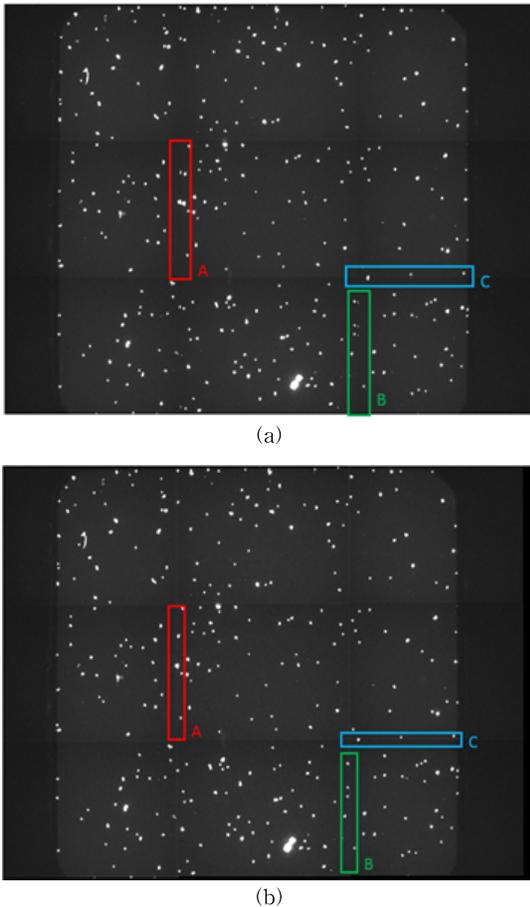


Fig. 7. (a) Stitched image without proposed method (b) Stitched image using proposed method.

2를 비교함으로써 기존에 중복되어 보여지던 세포들이 제대로 처리되어 하나의 세포로 나타남을 확인할 수 있다. Fig. 6의 (B) 경우 한 쪽 영상에 세포의 밝기가 약해 대비도를 높이지 않는 경우 육안으로 잘 보이지 않으나 이진화 처리 단계에서 인지하여 하나로 결합시키는데 성공하였다. Fig. 7에서는 Fig. 6에서 나온 영상을 전체적으로 보여주고 있다. 경계면만을 스티칭한 영상과 달리 제안한 알고리즘을 적용하여 스티칭한 웰 영상에서는 동일한 세포만 중첩 처리하고 서로 다른 세포는 그대로 유지된 것을 볼 수 있다. 그러나 많은 영상에 적용해 보았을 때 세포 핵 탐지는 설정한 임계 값을 기준으로 배경과 세포를 구분하고 있기 때문에 간혹 측정된 배경과 세포의 평균 밝기 값을 벗어나는 영상의 경우 제대로 세포 유무를 감지를 못하는 문제가 발견되기도 하였다.

#### 4. 결 론

본 논문에서는 기본적인 이진화를 사용하여 세포 유무 감지를 통해 이웃하는 필드영상 내 세포가 존재하여 서로 겹치는 경우에만 정규 상호상관도를 계산한 후 정합 하는 자동 스티칭 방법을 제시하였다. 협소한 중첩 범위, 대상의 유사한 형태, 그리고 중첩 범위 내에 중첩 되는 대상의 존재가 불확실한 상태의 영상들을 웰 단위로 스티칭하는 목적에 맞춰 제작된 이 프로그램은 초반에 이진화 과정에서 임계 값을 사용자가 직접 설정하여 주어야 하는 부분이 있어 영상에 대한 사전적인 이해를 필요로 하고 스티칭 작업시간이 다소 걸린다는 단점이 있으나 결과에서는 중첩되는 세포와 서로 다른 세포를 구분 지어 찾는 등 스티칭을 필요로 한 근본적인 요구를 만족시키고 있다. 향후 현재 진행된 연구결과의 정확도를 향상시키고 작업시간을 개선하며, 영상에 대하여 사전적인 이해 없이 스티칭 할 수 있는 방안에 대하여 연구할 필요가 있다.

#### REFERENCE

[ 1 ] A.A. Goshtasby, *2-D and 3-D Image Registration for Medical, Remote Sensing, and Industrial Applications*, Wiley Press, Hoboken, New Jersey, 2005.

[ 2 ] C. Sun, R. Beare, V. Hilsenstein, and P. Jackway, "Mosaicing of Microscope Images with Global Geometric and Radiometric Corrections," *Journal of Microscopy*, Vol. 224, pp. 158-165, 2006.

[ 3 ] B. Ma, T. Zimmermann, M. Rohde, S. Winkelbach, F. He, W. Lindenmaier, et al., "Use of Autostitch for Automatic Stitching of Microscope Images," *Micron*, Vol. 38, Issue 5, pp. 492-499, 2007.

[ 4 ] D.J. Kang and J.E. Ha, *Digital Image Processing Using Visual C ++*, SciTech Media, Gyeonggi-do, Korea, 2003.

[ 5 ] S. Park, S. Park, J. Lee, J. Shin, and Y. Shin, "High-Quality Stitching Method of 3D Multiple Dental CT Images," *Journal of Korea Multimedia Society*, Vol. 17, No. 10, pp. 1205-

1212, 2014.

- [6] H. Cho, H. Kye, and J. Lee, "Rapid Stitching Method of Digital X-ray Images Using Template-based Registration," *Journal of Korea Multimedia Society*, Vol. 18, No. 6, pp. 701-709, 2015.
- [7] V. Rankov, R.J. Locke, R.J. Edens, P.R. Barber, and B. Vojnovic, "An Algorithm for Image Stitching and Blending," *Proceedings of SPIE*, Vol. 5701, pp. 190-199, 2005.
- [8] P.M. Jain and V.K. Shandliya, "A Review Paper on Various Approaches for Image Mosaicing," *International Journal of Computational Engineering Research*, Vol. 3, Issue 4, pp. 106-109, 2013.
- [9] H. Kim, J.U. Lee, and H. Hong, "Automatic Stitching of Pathological Prostate Images Using Geometric Correction and Rigid Registration," *Journal of KISS : Software and Applications*, Vol. 39, No. 12, pp. 955-964, 2012.



서 지 현

2016년 2월 이화여자대학교 컴퓨터전자공학부 학사  
 2016년 3월~현재 이화여자대학교 컴퓨터공학 석사과정



강 미 선

2007년 2월 이화여자대학교 컴퓨터학 학사  
 2010년 3월~현재 이화여자대학교 컴퓨터공학 통합과정



김 현 정

2000년 2월 이화여자대학교 통계학과 이학사  
 2002년 8월 이화여자대학교 경영학 석사  
 2007년 2월 이화여자대학교 경영학 박사

2007년 5월~2008년 9월 산업은행 리스크관리본부  
 2008년 9월~2013년 9월 딜로이트컨설팅/안진회계법인  
 2013년 10월~2016년 9월 이화여자대학교 경영학과 연구교수  
 2016년 10월~2017년 2월 이화여자대학교 컴퓨터공학과 연구교수  
 2017년 3월~현재 서울과학종합대학원 (aSSIST) 교수



김 명 희

1979년 8월 서울대학교 전자계산학과 석사  
 1986년 2월 독일 괴팅겐대학교 전자계산학과 박사  
 2000년~2017년 이화여자대학교 컴퓨터그래픽스/가상현실 연구실 센터장

1987년~현재 이화여자대학교 컴퓨터공학과 교수