

면역조직화학염색에 의한 유방암 세포핵의 정량적 분석과 세포수에 의한 분석

○
허민권*, 최홍국*, 서정욱**
*인제대학교 전산학과
**서울대학교 병리학교실

Quantitative and cell count analysis of Breast cancer cell nuclei by Immunohisto- chemical stained tissue section

Min-Kwon Heo*, Heung-Kook Choi*, Jeong-Wook Seo**

*Department of Computer Science, Inje University

**Department of Pathology, Seoul National University

요 약

전자현미경 영상인 유방암 조직세포의 암 분포 정도를 알기 위해, 조직세포중 암이 퍼진 부분과 그렇지 않은 부분에 대해 정량적 분석과 세포수에 의한 분석을 비교하여 보았다. 유방암 조직세포의 면역조직화학염색에서 암이 있는 세포핵은 갈색으로 나타났고, 그렇지 않은 세포는 푸른색으로 나타났다. 이것은 환자를 진단하고 예지하는데 있어서 중요한 요인으로 작용하지만 지금까지는 의사의 주관적인 생각이 다분히 포함된 판단에 의존할 수 밖에 없었다. 의료영상이미지의 시각적 표현을 위해 RGB칼라를 HLS칼라로 변환하여 사용하였으며, 이것은 시각적으로 좀 더 쉽게 갈색세포핵과 푸른색 세포핵을 구분하게 해 주었다. 두 세포핵을 분리하기 위해 히스토그램의 임계치와 Box classification의 두 알고리즘을 사용하여 추출하였다. 그리고 추출한 세포핵들에 대해 각각 정량적인 분석과 세포수에 의한 분석을 하였다. 이러한 실험은 시각적 병리정밀검사에 좋은 보조도구로 사용될 수 있을 것이다.

1. 서론

칼라이미지에 대한 영상분할은 영상을 분석하는데 매우 중요한 역할을 한다. 최근의 칼라이미지 분석은 응용영역이 계속적으로 증가하고 있다 [10,11]. RGB 3바이트로 표현되는 칼라이미지는 그레이 레벨 이미지나 이진이미지보다 더 많은 정보를 가지고

있다. 현미경으로 관찰하여 부분적으로 염색된 세포의 칼라이미지 분석은 조직학과 세포학에서 매우 중요하게 사용되고 있다 [2,10]. 서로 다른 칼라 개체들은 사람과 컴퓨터에 의한 이미지 분석에서 그들의 고유특성을 효과적인 신호로 제공한다[11,12]. 칼라

이미지의 분할(Segmentation)을 위해 Ranefall P.[10]은 고유치와 고유벡터를 계산하여 Principal Component Hue를 제안하였으며, Choi et al.[2,3]은 텍스처와 칼라 정보를 합성하여 사용했다. RGB칼라는 인간이 시각적으로 식별하기가 HLS칼라보다 어렵기 때문에 HLS칼라로 변환 후 다시 시각화를 위해 HLS칼라를 유사한 RGB칼라로 나타내었다.

정확한 영상의 분할은 많은 의료영상 이미지의 정확한 분석을 위해 꼭 필요한 조건이다. 이 의료영상 이미지를 분석하기 위해 광범하게 사용되고 있는 히스토그램의 임계치와 Box classification[6,8] 알고리즘을 사용하여 분할 하였다. 분할한 이미지는 많은 잡음과 구멍을 가지고 있었으며 동일한 조건으로 이러한 잡음이나 구멍을 제거한 후 양성개체인 갈색 세포핵과 음성개체인 푸른색 세포핵에 대해 먼저 정량적 분석을 하였으며, 이어 갈색세포핵과 푸른색세포핵에 대한 세포수를 분석하였다. 본 논문에서는 이들 두 방법에 대해 각각 실험을 한 다음 그 결과를 비교하여 보았다.

2. 재료와 칼라 모델

2.1 재료와 이미지 획득

면역조직화학적으로(IHC) 염색한 세포핵 조직 절편은 1998년 서울대학병원에서 유방암 환자로부터 채취한 조직이다. 조직절편은 Diaminobenzidine (D-AB)으로 발색하고 Hematoxyline으로 대조 염색하였다. 이 면역화학 조직염색은 서로 다른 형태의 항체들을 조직에서 서로 묶어 시각적으로 노출되게 하는 염색이다. 디지털화된 이미지는 두께가 4 μ m가 되며, RGB각각 1byte씩 3개의 그레이 레벨밴드를 가지고 있는 640 \times 480칼라이미지로써 CCD칼라 비디오 카메라가 연결되어 있는 Olympus 광학 현미경을 통해 얻었다. 이렇게 얻은 이미지는 40 \times 확대하였고 화소 크기는 약 0.4 μ m이다 (그림.1). 현미경으로부터 이미지를 읽어 들이는 것은 BMI Plus를 사용하였으며 모든 이미지의 처리와 분석은 Pentium PC 기반의 Visual C++에 의해 구현하였다.



그림 1. 유방암 환자의 종양검체에서 시행한 면역조직화학염색 세포의 RGB칼라 이미지

2.2 HLS 칼라모델

대부분의 경우 컴퓨터의 모니터에 나타내기 위한 목적을 가진 RGB칼라 공간은 HLS칼라 공간보다 인간이 인지하기에 덜 시각적이다. RGB 칼라 공간은 사용하기 간단하고 표현하기가 빠르다는 이점을 가지고 있지만 칼라를 직관적으로 변화시키지 못하다. HLS칼라 공간의 사용 예로 Ranefall et al.[9]은 얼굴 특징을 찾기 위해 HLS칼라 공간의 정보를 사용하여 표현했다. 칼라 이미지의 RGB세 영역은 이것을 HLS칼라 공간(그림. 2)으로 변환했을 때 구하고자 하는 갈색 세포핵과 푸른색 세포핵의 구분을 더 직관적으로 표현하여 주었다.

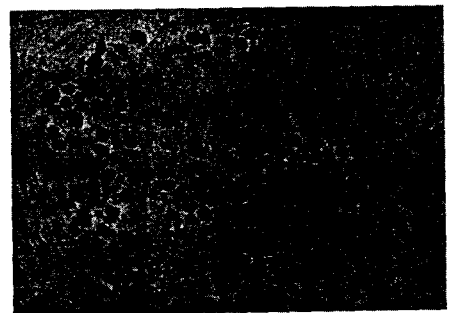


그림 2. 유방암 환자의 종양검체에서 시행한 면역조직화학염색 세포의 HLS칼라 이미지

이 HLS칼라공간은 색상(Hue), 명도(Lightness), 채도(Saturation)로 RGB가 대신 표현되었다. 이 표현

에서 색상(Hue)은 기본 칼라이고 채도(Saturation)는 색의 탁한 정도를 나타내는 것이며, 명도(Lightness)는 칼라에 독립적인 요소로써 검은색과 흰색을 제공한다. 따라서 RGB칼라 공간은 HLS칼라공간으로 즉, R(0~255), G(0~255), B(0~255)가 H(0°~360°), L(0~1), S(0~1)로 각각 대응되어 변환된다.

3. Training 이미지

3.1 이미지의 분할(Segmentation)

전형적인 면역화학조직염색 세포 이미지의 히스토그램은 배경화면과 추출하고자 하는 갈색과 푸른색 화소의 개체 분포에 큰 영향을 보여준다. 그 분포는 약한 계곡점이나 변곡점으로써 분리할 수 있다. 실험에서는 히스토그램에 대해 미분함수와 smoothing 알고리즘을 사용하여 히스토그램에서 구하고자 하는 두 개의 임계치 값들을 얻었다. 또한 다른 방법으로 구하고자 하는 영역(바탕영역, 갈색세포영역, 푸른색 세포영역)에서 세 개의 화소를 HLS칼라 모델에서 선택하는 Box classification 방법을 사용하여 영역에 대한 범위를 구하였다. 히스토그램의 임계치만으로 국소적인 영역들을 정확히 분리할 수가 없었으므로 이 두 방법을 조합하여 원하는 것을 추출하였다. 그림 3에서 그 결과를 보여준다.

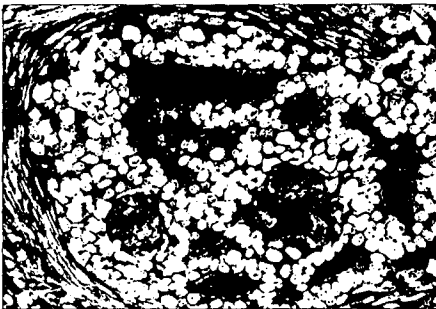


그림 3. (가) 히스토그램 임계치와 Box classification을 조합하여 배경영역과 개체의 분할이미지

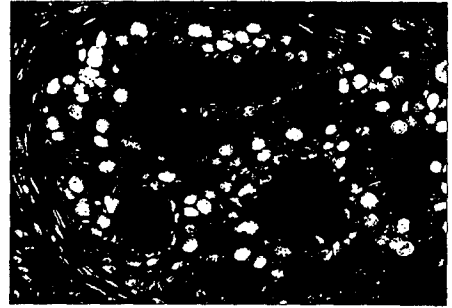


그림 3. (나) 갈색 세포 분할 이미지

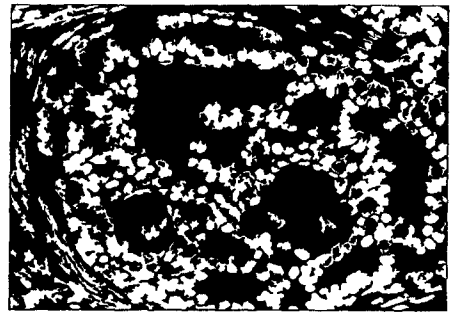


그림 3. (다) 푸른색 세포 분할 이미지

붉은색 밴드는 각 양성개체(갈색세포핵)와 음성개체(푸른색세포핵)를 분리하는데 영향을 미치지 않았으며 녹색 밴드에서 갈색세포핵을 분리하기 위해 0~133, 푸른색 세포핵을 분리하기 위해 134~181, 배경을 분리하기 위해 182~255로 범위를 정하였고, 푸른색 밴드에서는 갈색 세포핵을 분리하기 위해 0~99, 푸른색 세포핵을 분리하기 위해 170~255, 배경영역을 분리하기 위해 100~169로 범위를 정하였다.

3.2 정량적 분석

그림 3에서 보는 것과 같이 추출한 개체는 많은 잡음과 구멍이 발생하였다. 조금 더 정확한 개체의 정량을 측정하기 위해 그림3의 이미지에서 먼저 개체에 번호를 붙인 다음 개체의 화소수가 60보다 작은 개체들은 제거하였다. 그 결과로 그림 3. (가)에서는 총 114,043화소를 얻었고, 갈색 세포핵 부분만

추출(그림 3. (나))에서는 총 23,591화소를 얻었다.

3.3 세포수에 의한 분석

3.2에서는 세포에 대한 양적인 분석을 하였으며, 이번에는 세포의 수로 분석하였다. 먼저 갈색 세포 핵영역(그림 3. (나))에서 개체수를 세기 위해 다음과 같은 단계로 잡음을 제거하였다.

- ① 구멍 메우기
 - ② 60이하의 개체를 제거
 - ③ 디스턴스 알고리즘을 사용하여 깊이가 6이하인 개체를 제거
 - ④ 9×9 마스크를 사용하여 중심점 구하기
- 그 결과로 그림 4. (가)를 얻었다.

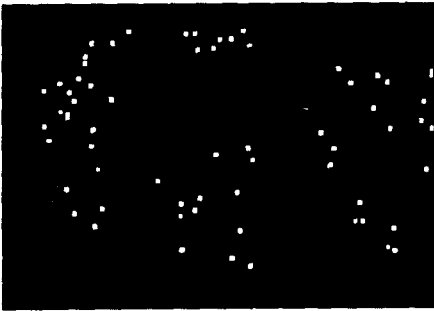


그림 4. (가) 갈색 세포 영역의 중심점

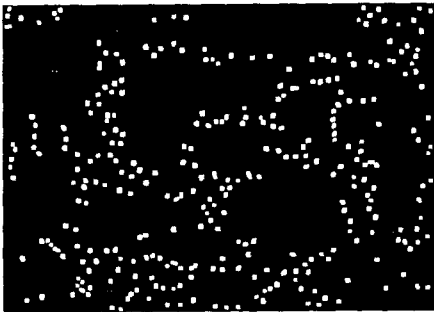


그림 4(나) 푸른색 세포 영역의 중심점

푸른색 세포 영역(그림 3. (다))에 대해서는 다음과 같은 방법으로 결과(그림 4. (나))를 구하였다.

- ① 그림 3. (다)에서 개체가 60화소 이하인 개체를 제거

- ② 디스턴스 알고리즘을 사용하여 깊이가 6이하인 개체를 제거
- ③ 1번 줄이기(erosion)
- ④ 다시 개체수가 60이하인 개체를 제거
- ⑤ 1번 늘이기(dilation)
- ⑥ 9×9마스크를 사용하여 중심점 구하기

각각 개체의 수는 64, 308로 나타났다.

4. Test 이미지

임의적으로 두 테스트 이미지를 선택하여 3에서 실험한 것과 똑같은 방법으로 이미지를 읽어 들었다.

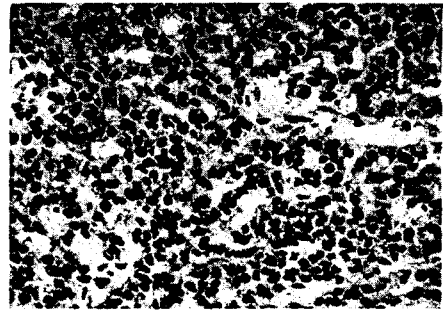


그림 5. (가)

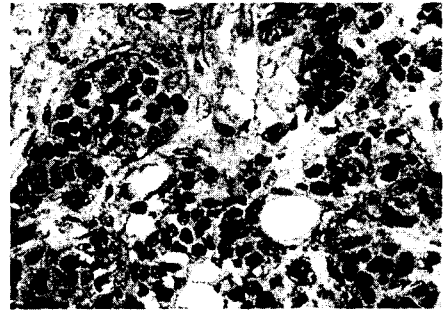


그림 5. (나)

그림 5. (가), 그림 5. (나)에서 두 이미지를 보여 준다. 이들 이미지는 training 이미지보다 하나는 비교적 작은 세포들로 구성되어 있고, 또 하나는 비교적 큰 세포들로 구성되어 있었다.

위의 두 이미지에 대해서도 3.1에서 구한 영역의

범위를 적용하여 개체들을 추출하였다. 그 결과 정량적인 방법에서는 그림 5. (가)에 대해 양성(갈색)세포핵은 74,358화소를 그리고 그림 5. (나)에 대해 양성은 11,900화소를 얻었다. 그리고 세포수에 의한 분석 방법에서는 그림 5. (가)는 양성(갈색)세포핵의 수 289개, 음성(푸른색)세포핵의 수 218개를 얻었고, 그림 5. (나)에 대해서는 각각 171개, 63개의 세포수를 얻었다.

5. 결과

먼저 정량적 분석에 의한 방법의 결과는 각각 이미지의 순서에 따라 21.2%, 52.2%, 55.6%의 결과를 얻었고, 세포수에 의한 결과는 각각 17%, 57%, 73%의 결과를 얻었다. 첫 번째와 두 번째 이미지의 결과는 각각 $\pm 5\%$ 정도의 차이를 보이고 있고 세 번째 이미지는 조금 큰 차이를 보이고 있다. 이 차이는 두 방법의 잡음제거방법이 서로 다르기 때문에 많은 차이가 발생하였다. 그리고 이들 결과는 병리학자에 의한 시각적 정밀검사에 좋은 자료가 될 것이다.

6. 향후과제

칼라이미지를 분석하는 응용프로그램들은 많이 등장하고 있고, 이러한 응용프로그램들은 일반적인 칼라이미지의 분석에 다 적용할 수 있도록 많은 기능들을 갖추고 있다. 이러한 다양한 기능은 특정이미지에 대해서 결과를 구하고자 할 때 틀에 대한 많은 지식을 요구한다. 본 논문에서는 일반적인 모든 칼라 이미지에 적용하는 것이 아니라 특정한 결과를 요구하는 이미지에 대해 사용자가 틀에 대한 많은 지식없이 단지 몇가지 동작만으로 결과를 제공받을 수 있는 자동 틀을 구현하고자 한다. 위의 결과에서도 보듯이 영역분할시 많은 잡음이 발생하였고, 이들 잡음으로 인한 많은 잡음제거 절차를 거쳐야 하기 때문에 정확도도 문제가 되지만 많은 잡음처리 과정을 거치므로 처리속도도 개선해야 할 점이다. 차후 이러한 부분의 개선을 위해 영역분할방법의 개선 및 잡음제거 방법을 개선하기 위해 계속 연구 할 것이다.

참고문헌

[1] Berry D.T. Colour recognition using spectral

signatures. Pattern Recognition Letters, Vol. 6, pp.69-75, 1987.

- [2] Choi H-K., Bengtsson E. A direct way of combining texture and color for image segmenation. The 10th Scandinavian Conference on Image Analysis, Lappeenrants in Finland, pp.931-938, 1997.
- [3] Choi H-K, Jarkrans T., Bengtsson E., Vasko J., Wester K., Malmstrom P-U, Busch C. Image analysis based grading of bladder carcinoma. Comparison of object, texture and graph based methods and their reproducibility, Analytical Cellular Pathology, Vol 15, pp.1-18, 1997.
- [4] Faugeras O.D. Digital color image processing within the framework of a human visual model. IEEE Trans. Acoustic Speech and Signal Processing, Vol 27, pp.380-393, 1979.
- [5] Foley J.D., van Dam A., Feiner K., Hughes J.F. Computer graphics principles and practices. Addison-Wesley, pp.617-619, 1996.
- [6] Granlund G.H. and Knutsson H. Signal processing for computer vision. Kluwer Academic Publishers, pp.367-380, 1995.
- [7] Gonzalez R.C., Woods R.E. Digital image processing. Addison Wesley, pp.221-237, 1993.
- [8] Milvang O. An adaptive algorithm for color image quantization. Proc. 5th SCIA, Vol 1, pp. 43-47, 1987.
- [9] Ranefall P., Nordin B., Bengtsson E. Finding facial features using HLS color space. Proc. 8th ICIAP, pp.191-196, 1996.
- [10] Ranefall P. Towards automatic quantification of immunohistochemistry using colour image analysis. Ph. D. Thesis, Uppsala University, Sweden, ISBN 91-554-4152-1, pp. 12-14, 1998.
- [11] Schettini R. Multicolored objected recognition and location. Pattern Recognition Letters. Vol. 15. pp.1089-1097, 1994.
- [12] Tominaga S. Expansion of color images using three perceptual attributes. Pattern Recognition Letters, Vol. 6, pp.77-85, 1978.