

논문 2009-46SP-3-1

미토콘드리아 절편의 여러 투사각에서 투과 전자 현미경으로 획득한 영상의 정합과 밝기 보정

(Registration and Intensity Compensation of Tilted Images of the Mitochondria Section Obtained from the Transmission Electron Microscopy)

김 동 식*

(Dong Sik Kim)

요 약

투과전자현미경(transmission electron microscopy)에서 특정 투사각에서 획득한 2차원으로의 투사 영상의 열을 사용하여 세포와 같은 물질의 3차원 구조를 복원한다. 이때 전처리 과정으로 2차원 투사 영상의 정확한 영상 정렬과 밝기 보정이 필요하다. 본 논문에서는 기준점(fiducial marker)을 사용한 정렬 방법을 이용하여 영상열을 정렬하고, 수십 장의 영상들의 상이한 밝기 특성을 일정하게 보정하는 방법을 제시하였다. 영상의 투과율 모델에 근거하여, 영상의 주변부의 밝기 정보를 사용하여 각 영상의 조명을 일정한 값으로 조정하고 투사각에 따라 대상의 밝기가 일정하게 변동하도록 밝기 보정을 수행하는 알고리즘을 제시하였으며, 실제 투과전자현미경으로부터 얻은 영상열을 사용하여 밝기 보정 알고리즘의 성능을 검증하였다.

Abstract

Using the projected 2-dimensional tilted images obtained from the transmission electron microscopy, we can reconstruct the 3-dimensional structures of objects, such as cells. As a preprocessing procedure, the tilted images should be registered and compensated in terms of the spatial position and the intensity difference, respectively. In this paper, we employ the fiducial marker-based approach to perform a registration, and introduce a simple intensity compensation scheme. Based on the transmissivity image formation model, we propose an algorithm that can compensate the components of the illumination and transmissivity of each image according to the tilted angle. Numerical analysis using real images obtained from the transmission electron microscopy are shown in this paper to show the performance of the proposed algorithm.

Keywords : 미토콘드리아, 밝기보정, 영상정렬, 투과전자현미경, 투사각 영상열

I. 서 론

세포나 바이러스와 같은 생체 물질의 기작을 밝히기 위해서는 이러한 생체 물질의 3차원 구조의 복원은 필수적이다^[1]. 3차원 구조의 복원을 위하여 여러 가지 방

법이 연구되어왔는데, 그 중에서 투과전자현미경(transmission electron microscopy, TEM)으로 표본을 여러 투사각으로 기울이면서 2차원으로 투사된 영상으로 구성된 투사각 영상열(tilted image sequence)을 사용하여 3차원 구조를 복원하는 방법이 있다^[2]. 이때 표본은, 3차원으로 복원하려고 하는 세포 등의 연속 절편(serial section) 중 하나의 절편이 되며^[2], 사용하는 전자현미경의 전압에 따라서 영상을 얻을 수 있는 절편의 두께가 결정이 되는데, 일반적으로 50nm에서 2 μ m의 두께를 가지는 절편의 3차원 복원을 위하여 투사각 영상열이 사용된다.

* 정회원, 한국외국어대학교 전자정보공학부
(Department of Electronics and Information Engineering, Hankuk University of Foreign Studies)

※ 본 논문은 2009년도 한국외국어대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

접수일자: 2008년5월26일, 수정완료일: 2009년4월3일

TEM을 사용하여 일정한 각도 주기로 기울여가며 2차원 투사 영상을 획득하는데, 이때 일반 필름을 사용하여 찍고 현상 후 디지털 스캔을 하거나, CCD 사진기를 사용하여 직접 디지털 영상을 얻는다. 근래에는 CCD 사진 기술의 발달로 일반 필름을 사용한 사진기를 대체해 나가고 있지만 고화질의 영상을 얻기 위해선 여전히 필름 영상을 사용한다. 이렇게 획득한 2차원 투사 영상들을 사용하여 3차원 복원을 하기 위해서는 우선 전처리 작업으로서 영상들을 어떠한 기준 좌표에 대하여 정확히 정렬(registration)시킨다. 이때 부정확하게 정렬되면 3차원으로 복원된 영상이 흐려지는 등의 문제가 발생한다. 또한 TEM의 불균일한 전자빔과 투사각을 기울이는 동안 들어지는 좌표, 사진 찍는 과정이나 스캔하는 동안에 임의로 조정된 노출, 필름의 불균일한 현상 과정 등으로 인하여 획득한 영상들은 서로 다른 밝기 특성을 가지게 된다. 따라서 이러한 상이한 밝기 특성을 역시 전처리 과정으로서 동일하게 보정해 줄 필요가 있다.

TEM으로부터 영상이 형성되는 과정은 전자파의 크기(amplitude)와 위상(phase)에 의해 발생한 영상 대비(contrast)로 나눌 수 있다^[3]. 크기 대비(amplitude contrast)는 전자파 크기의 손실로 만들어지는 영상으로 일반적으로 큰 원자량을 가지는 구조의 영상 취득에 유리하다. 따라서 이러한 크기 대비로 일반 생체 표본의 영상을 얻기 위해선 큰 원자량을 가지는 물질로 표본을 염색하는 음성염색(negative staining) 방법을 사용한다^[1,p.13]. 반면에 위상 대비를 이용하면 원자량이 작은 물체의 고화질 영상 취득에 유리하며^[3,ch.10], 생체 물질을 급속 냉동시켜서 극저온 TEM(cryo-TEM)으로 표본의 영상 획득이 가능하며, 바이러스 등의 3차원 복원을 할 수 있다.

본 논문에서는 미토콘드리아의 3차원 구조 복원을 위한 전처리 과정으로, 미토콘드리아 표본의 절편을 염색하여 TEM으로 얻은 투사각 영상열을 정렬하고, 정렬된 영상들의 상이한 밝기 특성을 일정하게 보정하였다. 영상의 정렬을 위하여, 투사각 영상열의 정렬에 흔히 사용하는 기준점(fiducial marker) 방법^[2,ch.5, 7]을 사용하였으며, 수십 장이 되는 영상들의 밝기 특성을 일정하게 보정하는 것에 대하여 고찰하여 문제점을 제시하고 이를 보완하기 위하여 영상 형성의 투과율 모델에 기초한 밝기 보정 방법을 제안하였다. 또한 실제 TEM으로부터 얻은 투사각 영상열을 사용하여 실험을 수행

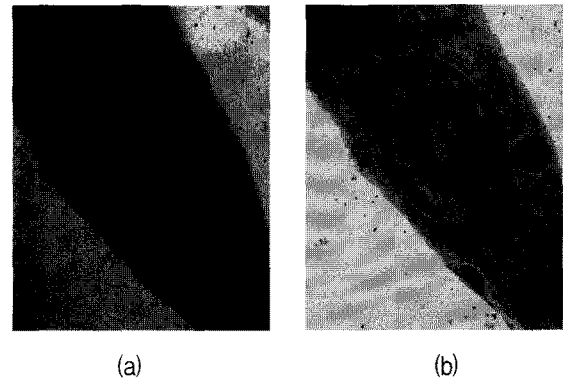


그림 1. TEM으로 찍은 미토콘드리아의 투사각 영상 (2485 × 2000 크기 영상, 고려대학교 생명공학원 세포공학 및 생체3차구조연구실, 250nm section으로 3% uranyl acetate와 lead citrate 염색, TEM: Hitachi 1250M, 1000kV) (a) 28도 기울어진 투사 영상 (b) 30도 기울어진 투사 영상

Fig. 1. Mitochondria tilted images obtained by TEM (2485 × 2000, Laboratory of Cell Engineering and 3D Structure, Korea University, 250nm thickness section sample with the 3% uranyl acetate and lead citrate staining, TEM: Hitachi 1250M, 1000kV). (a) Projected image with 28 degrees. (b) Projected image with 30 degrees.

하였다. 그림 1은 미토콘드리아 절편의 투사 영상으로 두께가 250nm인데, TEM에서 2도의 투사각 주기를 가지며 기울여 찍은 2차원 투사 영상의 예이다. 그림 1(a)와 (b)에서 보는 바와 같이 바로 인접한 투사각을 가지는 영상이지만 미토콘드리아의 위치도 다르고, 밝기 특성도 다름을 알 수 있다.

본 논문의 구성은 다음과 같다. 제 II장에서는 본 연구에서 사용된 기준점을 사용한 영상열의 정렬 방법에 대하여 정리하였다. 제 III장에서는, 먼저 두장의 영상을 사용한 상대적 밝기 보정에 대하여 논하고, 이러한 방법을 수십 장의 영상의 밝기 보정으로 적용하는데 발생하는 문제점을 제시하고, 영상 형성에서 투과율 모델에 기초하여 간단히 영상열의 밝기를 보정할 수 있는 알고리즘을 제시하였다. 제 IV장에서는 실제 투사각 영상열에 대한 실험 결과를 제시하였으며, 마지막 장에서 결론을 정리하였다.

II. 기준점을 사용한 영상열의 정렬

영상의 정렬은 한 영상을 기준으로 하여 공통된 장면을 가지고 있는 다른 입력 영상의 위치를 일치시키는 것으로, 이를 위하여 입력 영상을 공간 영역에서 적절

히 변환하는 함수를 찾는 작업이 필요하다. 영상 정렬은 크게 특징점과 상관도 기반을 둔 알고리즘으로 나눌 수 있다^[11]. TEM을 통해서 얻어진 투사각 영상열의 정렬을 위해서는 이러한 두 가지 방법을 모두 사용할 수 있다^[2]. 3차원 구조 복원을 위하여 보통 전체 투사각이 -60도에서 60도에 이르므로 정렬해야하는 영상열에서 영상의 개수는 투사각의 간격이 2도인 경우 61개이고, 1도인 경우엔 121개가 된다. 따라서 이렇게 많은 영상을 모두 정렬하기 위해선 특징점 기반의 기법 중에서도 단순하면서도 성능이 강인한 기준점(fiducial marker) 방법을 주로 사용한다^[2, ch.5].

기준점은 표본 절편의 양쪽 면에 교상체(colloid)인 금 입자를 뿌려서 임의의 기준점을 2차원 투사 영상에 만든다^[2, p.62]. 그림 1에서 보면 검은 점들이 이렇게 금 입자로 만들어진 기준점들이다. 표본의 영상보다 대비가 강하므로 정확한 기준점을 만들 수 있으며 여러 장의 영상을 정확하고 강인하게 정렬시킬 수 있다. 본 실험에서는 이러한 기준점 기반의 정렬 방법을 사용하여 투사각 영상열을 정렬하였다. 이때 Penczek 등^[7]에 의해 사용된 알고리즘을 사용하였는데 간단히 정리하면 다음과 같다.

정렬할 투사각 영상열에 영상이 m 개 있다고 하자. 또한 한 영상에 사용하는 기준점이 n 개 있다고 할 때, j 번째 기준점의 3차원 좌표를 (x^j, y^j, z^j) 로 나타내고 이들이 i 번째 2차원 영상으로 투사되어 관찰된 좌표를 $(x_o^{i,j}, y_o^{i,j})$ 라고 표기하자. 그러면 3차원 공간에서 2차원 좌표평면으로 투사된 기준점 모델은 다음과 같다.

$$\begin{aligned} & \begin{pmatrix} \cos\alpha_i & \sin\alpha_i \\ -\sin\alpha_i & \cos\alpha_i \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_o^{i,j} \\ y_o^{i,j} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} d_x^i \\ d_y^i \end{pmatrix} \\ &= \begin{pmatrix} \cos\theta_i & 0 & -\sin\theta_i \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x^j \\ y^j \\ z^j \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \epsilon_x^{i,j} \\ \epsilon_y^{i,j} \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (1)$$

$(i = 1, \dots, m, j = 1, \dots, n)$

식 (1)에서 θ_i 는 i 번째 영상의 투사 각도이고 α_i 와 벡터 (d_x^i, d_y^i) 는 각각 2차원 투사 영상의 회전된 각도와 평행 이동된 값을 나타낸다. 그리고 $\epsilon_x^{i,j}$ 와 $\epsilon_y^{i,j}$ 는 서로 독립인 불규칙 변수이다. 기준점들은 행렬 $\begin{pmatrix} \cos\theta_i & 0 & -\sin\theta_i \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$ 에 의하여 3차원 좌표인 (x^j, y^j, z^j) 가 2차원 좌표로 투사된다. 이러한 2차원 좌표는 i 번째

영상에서 관찰된 2차원 좌표 $(x_o^{i,j}, y_o^{i,j})$ 를 α_i 만큼 회전하고 (d_x^i, d_y^i) 만큼 평행 이동한 것과 같다. 식 (1)의 좌측 항의 투사된 2차원 좌표를 $(x_p^{i,j}, y_p^{i,j})$ 로 표기하고 다음과 같이 정의하자.

$$\begin{pmatrix} x_p^{i,j} \\ y_p^{i,j} \end{pmatrix} := \begin{pmatrix} \cos\alpha_i & \sin\alpha_i \\ -\sin\alpha_i & \cos\alpha_i \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_o^{i,j} \\ y_o^{i,j} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} d_x^i \\ d_y^i \end{pmatrix}$$

그러면 식 (1)로부터 다음과 같은 관계식을 얻을 수 있다.

$$\begin{aligned} x_p^{i,j} &= x^j \cos\theta_i - z^j \sin\theta_i + \epsilon_x^{i,j} \\ y_p^{i,j} &= y^j + \epsilon_y^{i,j} \end{aligned} \quad (i = 1, \dots, m, j = 1, \dots, n) \quad (2)$$

만일 α_i 와 (d_x^i, d_y^i) 를 알고 있다고 가정하면 투사된 2차원 영상으로부터 $(x_p^{i,j}, y_p^{i,j})$ 를 구할 수 있으며, 식 (2)는 다항식 회귀 모델 형태를 가지므로 회귀 분석에 의하여 각 기준점의 3차원 좌표 추정인 $(\hat{x}^j, \hat{y}^j, \hat{z}^j)$ 를 구할 수 있다. 이렇게 추정된 3차원 좌표에 투사 행렬 $\begin{pmatrix} \cos\theta_i & 0 & -\sin\theta_i \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$ 를 적용한 것을 $(\hat{x}_p^j, \hat{y}_p^j)$ 로 표기하고 다음과 같이 정의하자.

$$\begin{pmatrix} \hat{x}_p^j \\ \hat{y}_p^j \end{pmatrix} := \begin{pmatrix} \cos\theta_i & 0 & -\sin\theta_i \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{x}^j \\ \hat{y}^j \\ \hat{z}^j \end{pmatrix}$$

그러면 새로운 평행 이동 추정치 $(\hat{d}_x^i, \hat{d}_y^i)$ 와 회전각도 $\hat{\alpha}_i$ 는 다음 식으로부터 각각 구한다.

$$\begin{aligned} \hat{d}_x^i &= \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (\hat{x}_p^j - \hat{x}_p^{i,j}), \quad \hat{d}_y^i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (\hat{y}_p^j - \hat{y}_p^{i,j}) \\ \tan \hat{\alpha}_i &= \frac{\sum_{j=1}^n (\hat{x}_p^i \hat{y}_p^{i,j} - \hat{y}_p^i \hat{x}_p^{i,j})}{\sum_{j=1}^n (\hat{x}_p^i \hat{x}_p^{i,j} - \hat{y}_p^i \hat{y}_p^{i,j})} \end{aligned}$$

이렇게 구해진 평행 이동과 회전 추정 성분을 사용하여 각 투사 영상의 기준점의 위치인 $(x_p^{i,j}, y_p^{i,j})$ 를 갱신하고 다시 반복적으로 기준점의 3차원 좌표 추정인 $(\hat{x}^j, \hat{y}^j, \hat{z}^j)$ 를 구하여 최종적으로 평행 이동 추정치 $(\hat{d}_x^i, \hat{d}_y^i)$ 와 회전각도 $\hat{\alpha}_i$ 가 어떠한 값으로 수렴하면 영

상열은 정렬된다. 알고리즘에서 정렬한 결과의 정확도는 다음과 같은 여러 제곱의 합을 구하여 얼마나 줄어들었는지를 관찰하므로 확인할 수 있다.

$$\frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (\hat{x}_p^j - \hat{x}_p^{i,j})^2 - (\hat{d}_x^i)^2 + \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (\hat{y}_p^j - \hat{y}_p^{i,j})^2 - (\hat{d}_y^i)^2$$

기준점을 가상으로 합성하여 이러한 기준점 기반 정렬 알고리즘의 성능을 정량적으로 분석한 결과는 참고문헌^[13]에 정리되어있다. 기준점의 개수를 증가시키면 예상한 바와 같이 정렬의 정밀도는 올라간다.

III. 정렬한 영상열의 밝기 보정

화소 단위로 처리하는 밝기 변환 함수(intensity transformation function)를 사용하여 영상의 밝기 상태를 변화시킬 수 있다^[4p.77]. 즉 영상 밝기의 대비를 올리거나 낮출 수 있다. 예를 들어, 평균값을 의미하는 상수 항과 이득을 나타내는 1차 계수 항으로 이루어진 1차 함수 형태의 밝기 변환 함수를 고려할 수 있는데, 이는 영상의 노출 보정 등을 위하여 흔히 사용한다^[6].

1. 상대적 밝기 보정

만일 한 쌍의 영상에서 같은 위치의 화소가 같은 화면을 담고 있다면 한 영상을 기준으로 하여 다른 영상의 밝기를 상대적으로 보정할 수 있다^[7]. 이때 밝기 보정을 위한 함수는 두 영상 화소의 분포로부터 회귀분석(regression analysis)을 통하여 구하는데, 다항식 회귀 모델^[10p.181]에 기초하여 t 차의 다항식 형태로 밝기 보정 함수를 얻을 수 있다^[5, 12]. 이렇게 밝기를 변환하는 함수는 단조 증가의 성질을 가져야 하므로^[7], 다항식에 단조 증가의 제약을 주는 회귀분석을 수행할 필요가 있다^[6].

이러한 두 영상을 사용한 상대적인 밝기 보정 기법을 사용하여 투사각 영상열의 영상들의 밝기 특성을 일정하게 되도록 보정할 수 있다. 즉 영상열에서 이웃한, 투사각의 차이가 적은 영상 간에 형성된 물체는 서로 거의 일치한다는 가정 하에 상대적 밝기 보정을 시도할 수 있다. 예를 들면, 투사각이 0도인 영상의 밝기를 적절히 보완한 후에 이 보완된 영상을 기준으로 하여 우선 바로 인접한 영상의 밝기를 보정하고, 그 다음으로

인접한 영상 쌍에 대하여 계속해서 상대적인 영상의 밝기 보정을 수행할 수 있다. 그러나 실험 결과에서 보면 중앙의 기준 영상으로부터 멀어짐에 따라 밝기 보정된 영상의 밝기 대비가 현저히 떨어짐을 관찰할 수 있다. 이는 이웃한 영상이 같은 물체를 담고 있다고 가정해서 구한 밝기 보정용 회귀 함수가 정확히 두 영상 간의 밝기 관계를 나타내는 함수와 어느 정도 오차가 있기 때문이다. 또한 회귀 함수를 구하는 과정에서 유한한 개수의 데이터를 사용하므로 과적합(overfitting) 등의 문제가 발생하기 때문이다. 따라서 오히려 다항식 회귀 모델에서 다항식의 차수를 가장 낮은 경우인 $t=1$ 로 했을 때 가장 좋은 밝기 보정 특성을 보인다. 그러므로 수 십장이 넘는 영상들을 일정하게 밝기 보정을 수행하기 위해선 상대적 보정 방법보다는 다른 특별한 알고리즘의 개발이 필요하다.

2. 투과율 모델에 기초한 밝기 보정

본장에서는 여러 장의 영상들을 투과율 모델에 근거하여 간단하게 밝기 보정할 수 있는 알고리즘을 제시하였다. 기본적으로 밝기 보정용 함수는 두개의 계수만을 사용하는 1차 함수의 형태를 가진다($t=1$).

TEM에서 일정한 투사각 θ_i 에서 얻은 i 번째 2차원 영상을 $f_k^i (\geq 0)$ ($k=1, \dots, K$)로 표기하자. 여기서 K 는 하나의 영상을 구성하는 화소의 개수이다. 조명(illumination)과 투과율(transmissivity)을 각각 I_k^i 와 T_k^i 로 표기하면($I_k^i, T_k^i \in R$), 영상 형성을 위한 투과율 모델은 다음과 같은 곱의 형태가 된다^[4p.51].

$$f_k^i = I_k^i \cdot T_k^i \quad (k=1, \dots, K, i=1, \dots, m)$$

이때 조명과 투과율은 각각 $0 \leq I_k^i < \infty$ 와 $0 \leq T_k^i \leq 1$ 의 범위를 가진다고 하자. 이러한 영상을 1차 함수로 밝기 변환한다고 하면, 변환된 i 번째 영상을 g_k^i 라고 표기할 때 다음과 같다.

$$g_k^i := a_i f_k^i + b_i \quad (k=1, \dots, K) \quad (3)$$

식 (3)에서 a_i 는 영상의 대비를 조절할 수 있는 이득 항이고 b_i 는 영상의 평균을 조절할 수 있는 상수항이다.

미토콘드리아 영상 f_k^i 에서 물체와 배경을 분할(segmentation)할 수 있다고 하고 분할된 화소의 인덱

스 집합을 Ω_O 와 Ω_B 라고 표기하자. (분할하는 방법은 다음 절에 소개하였다.) 그리고 밝기 보정의 기준이 되는 조명과 투과율을 적절한 I 와 T 로 정하자. 이제 간단한 가정 하에 밝기 변환을 위한 계수 a_i 와 b_i 를 구해보자. 배경에서는 조명만 존재한다는 가정 하에 변환한 영상 g_k^i 는 다음을 만족해야 한다.

$$\frac{1}{m_B^i} \sum_{k \in \Omega_B} g_k^i = I \quad (i = 1, \dots, m) \quad (4)$$

또한 투과율은 물체 영역에서 다음 식을 만족해야 한다.

$$\frac{1}{m_O^i} \sum_{k \in \Omega_O} g_k^i = IT \cos \theta_i \quad (i = 1, \dots, m) \quad (5)$$

여기서 m_O^i 와 m_B^i ($\leq m$)는 각 인덱스 집합 Ω_O 와 Ω_B 의 원소의 개수를 나타내며, $\cos \theta_i$ 는 투사각이 증가함에 따라 절편의 두께가 증가하여 투과율이 감소하는 현상을 고려해 주기 위한 것이다^[2p.194]. 따라서 식 (4)와 (5)는 각각 배경과 물체 부분의 평균 영상 값이 된다. 또한 이 식들과 식 (3)으로부터, 주어진 i 번째 영상에 대하여, 다음과 같은 연립 방정식을 얻을 수 있다.

$$a_i \overline{f_O^i} + b_i = IT \cos \theta_i \quad (6)$$

$$a_i \overline{f_B^i} + b_i = I \quad (7)$$

식 (6)과 (7)에서 $\overline{f_O^i}$ 는 i 번째 TEM 영상에서 물체 부분의 화소 값에 대한 평균이고 $\overline{f_B^i}$ 는 배경 부분의 화소 값에 대한 평균으로 다음과 같이 각각 정의된다.

$$\overline{f_O^i} := \frac{1}{m_O^i} \sum_{k \in \Omega_O} f_k^i, \quad \overline{f_B^i} := \frac{1}{m_B^i} \sum_{k \in \Omega_B} f_k^i$$

따라서 m 개의 식 (6)과 (7)로부터 m 개의 a_i 와 b_i 를 구할 수 있으며, 식 (3)을 사용하여 입력 영상 f_k^i 의 밝기 보정을 수행하여 보정된 영상 g_k^i 를 얻을 수 있다.

3. 미토콘드리아와 배경의 분할

본 장에서는 TEM 영상에서 물체인 미토콘드리아 부분과 배경을 분할하여 인덱스 집합인 Ω_O 와 Ω_B 를 구하

는 방법에 대하여 묘사하였다. 우선, 영상의 히스토그램을 기반으로 한 분할을 수행하기 위하여 두 부류의 무게 중심과 임계값을 반복적으로 구하는 방법을 사용하였다^[9]. 이렇게 구한 임계값으로 영상을 임시로 물체와 배경으로 분할하고, 형태론적(morphological) 필터^[4p.523]를 사용하여 최종적으로 물체와 배경을 분리하여 각 영상에 대하여 인덱스 집합 Ω_O 와 Ω_B 를 구하였다. 형태론적 필터링을 사용하는데 있어서, 물체 부분의 검출을 위하여 닫힘(closing) 연산을 먼저 적용하여 고립된 부분을 제거하고, 닫힘 연산 시에 사용된 구조요소(structuring element)의 크기보다 큰 구조요소를 사용하여 열림(opening) 연산을 적용하여 실제 물체보다 약간 작은 물체의 인덱스 집합을 Ω_O 로 결정하였다. 이는 물체와 배경의 경계에 해당하는 화소들이 물체 부분의 화소 값 평균을 구하는데 오류를 줄 수 있으므로 이들을 평균을 구하는데 고려하지 않기 위함이다. 이때 구조요소는 원형의 것을 사용하였다. 배경에 해당하는 집합 Ω_B 도 같은 방법으로 구하였다. 이때 고려해야 할 사항은 영상 정렬을 위하여 사용한 기준점들을 적절히 제거해 주어야 한다.

IV. 실험 결과

먼저 기준점을 이용한 투사각 영상의 정렬을 위하여 교상체의 금 용액에 의해 기준점이 만들어진 미토콘드리아 절편을 -58도에서 60도까지 2도씩 기울여서 TEM으로 얻은 영상 60장을 실험에 사용하였다. 이때 각 영상마다 동일한 17개의 기준점을 선정하여 정렬에 사용하였다. 그림 2는 60장의 영상열을 제 II장에서 언급한 기준점 방법으로 정렬한 결과인데, 정확하게 정렬이 되었음을 알 수 있다. 이때 정렬된 결과의 정확성을 확인하기 위하여 다음과 같이 인접한 두 영상을 겹쳐서 표시해 보았다. 그림 1의 영상을, 정렬 알고리즘에서 구한 평행이동 및 회전각으로 보정한 후 서로 겹쳐서 그림 3에 도시하였다. 그림 3은 그림 1(a)와 (b)의 영상을 각각 -4.94도와 -4.71도씩 회전시키고 (139.46, 28.80)과 (10.11, 97.94)만큼 수평 이동시켜 정렬하였다. 그림 3의 중첩한 결과에서 기준점을 관찰해 보면 거의 일치하는 것을 확인할 수 있다. 합성 영상을 사용하여 정량적으로 정렬의 성능 검증을 위한 연구 내용은 참고문헌 [13]을 참조하기 바란다.

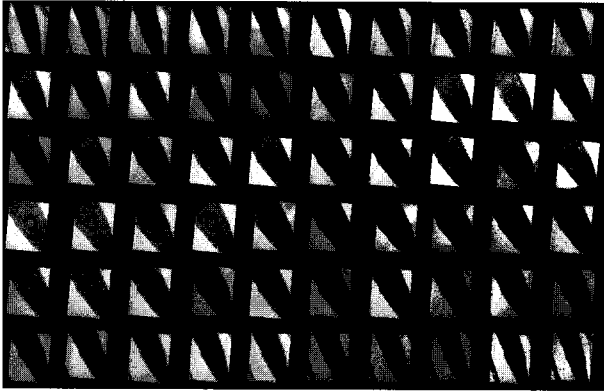


그림 2. 기준점 방법^[8]에 의해 정렬한 60장의 TEM 투사각 영상

Fig. 2. Registered 60 TEM tilted images based on the fiducial marker method^[8].

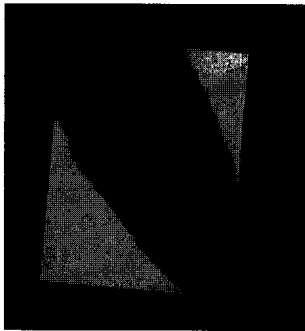


그림 3. 정렬한 그림 1의 영상을 중첩시킨 결과

Fig. 3. Overlaid registered images of Fig. 1.

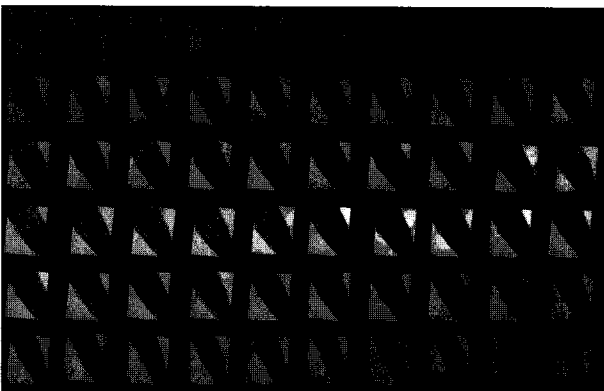


그림 4. 상대적 밝기 보정 알고리즘으로 보정한 결과 (35번째 영상이 기준 영상이다, $t = 1$)

Fig. 4. Intensity compensated images by employing the relative intensity compensation approach (the 35th image is the reference one, $t = 1$).

그림 2의 정렬한 결과를 보면 서론에서 언급한 바와 같이 각 영상의 밝기 특성이 일정하지 않음을 알 수 있다. 이러한 상이한 밝기 특성을 보정하기 위하여 제 III.1절에서 언급한 상대적 밝기 보정 방법으로 우선 보정을 시도하였다. 35번째 영상을 기준으로 하여 앞뒤로

나가면서 순차적으로 전체 영상을 밝기 보정한 결과를 그림 4에 도시하였다. 그림 4의 결과를 보면 인접한 영상 간의 상관도가 줄어든 상태에서 밝기 보정 함수를 구하기 때문에 추정된 회귀 함수에 오차가 존재하고 이 오차가 밝기 보정이 진행되면서 누적이 되어 영상의 대비가 급격히 감소해가는 현상을 볼 수 있다. 이러한 현상은 회귀 분석이라는 관점에서 더 심도 있게 연구되고 이를 극복할 수 있는 알고리즘의 제시가 요구된다.

이제 제안한 투과율 모델에 근거한 밝기 보정 알고리즘을 이용하여 보정을 수행한 결과를 제시하였다. 먼저 물체와 배경을 분할하여 각각의 평균을 구하는 과정을 그림 5와 6에 정리하였다. 단일 임계값을 사용하여 잠정적으로 분할을 하고 형태론적 필터링을 적용하여 성공적으로 물체를 분할할 수 있었다. 그림 7에는 이렇게 분리된 물체와 배경의 평균인 $\overline{f_O^i}$ 와 $\overline{f_B^i}$ 를 각 영상에 대하여 구하고 도시하였다. 그림 7에서 알 수 있듯이 영상에 따라서 물체와 배경의 평균이 일정하지 않고 변화가 심함을 알 수 있다. 변화의 정도를 정량적으로 나타내기 위하여 다음과 같은 분산을 정의하여 관찰하였다. 물체와 배경에 대한 분산 σ_O^2 와 σ_B^2 의 정의는 다음과 같다.

$$\sigma_O^2 := \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m \left(\frac{\overline{f_O^i}}{\cos\theta_i} - \mu_O \right)^2$$

$$\sigma_B^2 := \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m \left(\overline{f_B^i} - \mu_B \right)^2$$

여기서 평균인 μ_O 와 μ_B 의 정의는 다음과 같다.

$$\mu_O := \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \frac{\overline{f_O^i}}{\cos\theta_i}, \quad \mu_B := \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \overline{f_B^i}$$

밝기 보정을 하기 전의 영상인 그림 2(또는 그림 7)의 경우 물체와 배경의 분산이 각각 $\sigma_O^2 = 24.9\text{dB}$ 와 $\sigma_B^2 = 27.4\text{dB}$ 로 비교적 높음을 알 수 있다. 이때 평균은 각각 $\mu_O = 98.0$ 과 $\mu_B = 206.8$ 이다. 그림 8은 그림 7의 평균을 사용하여 제안한 알고리즘에서 계산한 이득 a_i 와 상수 b_i 를 나타내고 있다. 영상에 따라서 다양한 값이 유도됨을 알 수 있다.

제안한 알고리즘으로 밝기 보정을 수행한 결과를 그림 9와 10에 제시하였다. 여기서 목표 조명과 투과율을

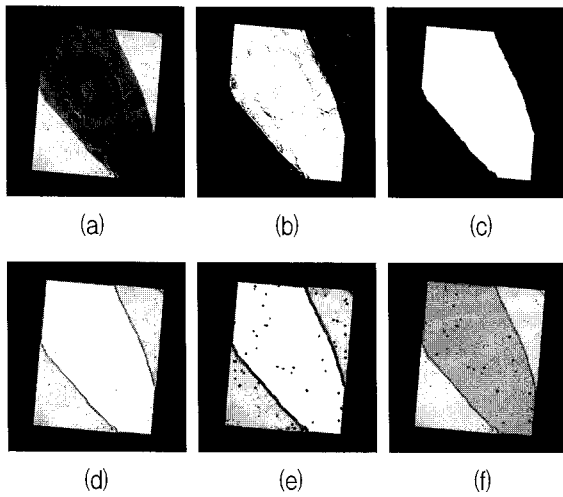


그림 5. 미토콘드리아 영상에서 물체의 분할 (a) 원영상 (b) 단일 임계값(173.8)으로 분리한 물체 (c) 형태론적 연산인 닫힘(15) 후 열림(25) 적용 결과 (d) 기준점의 검출(< 0.1) (e) 기준점의 침식(15) (f) 원영상에 기준점 부근을 제외한 검출된 물체의 표시($\overline{f_O^i}=116.1$)

Fig. 5. Segmentation of Mitochondria. (a) Original image. (b) Segmented object using a single threshold (173.8). (c) Result of morphological closing (15) and then opening (25) operations. (d) Detection of the fiducial markers (< 0.1). (e) Erosion (15) of the fiducial markers. (f) Display of the object excluding the fiducial markers on the original image ($\overline{f_O^i}=116.1$).

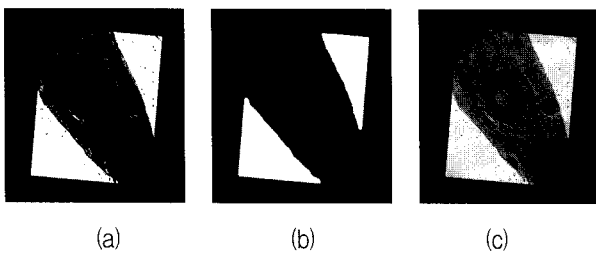


그림 6. 미토콘드리아 영상에서 배경의 분할 (a) 단일 임계값(173.8)으로 분할한 배경 (b) 형태론적 연산인 닫힘(15) 후 열림(25) 적용 결과 (c) 원영상에 기준점 부근을 제외한 배경의 표시($\overline{f_B^i}=237.2$)

Fig. 6. Segmentation of the background. (a) Segmented background using a single threshold (173.8). (b) Morphological closing (15) and then opening (25) result. (c) Display of the background excluding the fiducial markers on the original image ($\overline{f_B^i}=237.2$).

각각 $I=250$ 과 $T=0.44$ 로 설정하여 밝기 보정을 수행하였다. 그림 10은 그림 1의 영상을 정렬하고 밝기

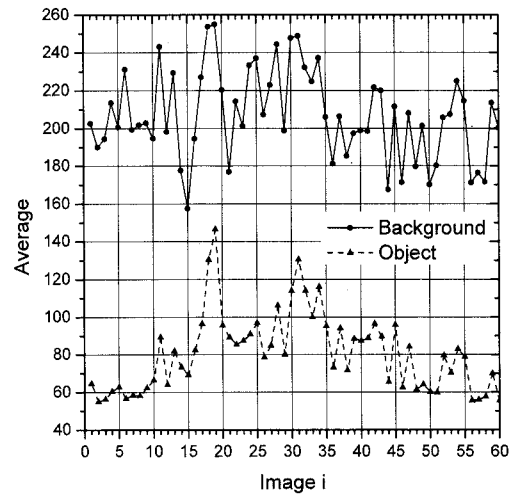


그림 7. 그림 2의 영상에 대한 물체와 배경의 평균, $\overline{f_O^i}$ 와 $\overline{f_B^i}$ ($\sigma_O^2=24.9dB$, $\sigma_B^2=27.4dB$)
 Fig. 7. Averages of the object and background, $\overline{f_O^i}$ and $\overline{f_B^i}$, respectively, for the images of Fig. 2 ($\sigma_O^2=24.9dB$, $\sigma_B^2=27.4dB$).

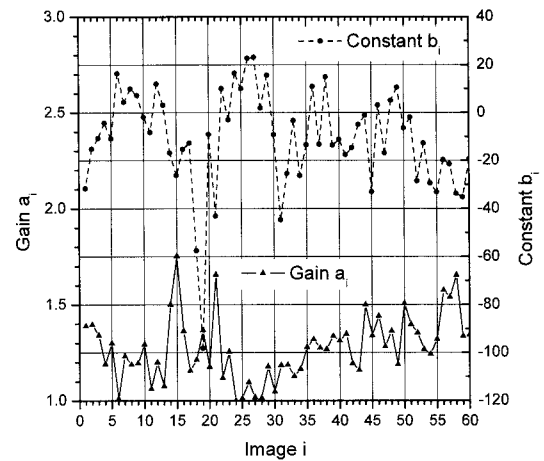


그림 8. 제안한 알고리즘에서 구한 이득 a_i 와 상수 b_i ($I=250$, $T=0.44$)
 Fig. 8. Calculated gain a_i and constant b_i from the proposed algorithm ($I=250$, $T=0.44$).

를 보정한 최종 결과이다. 그림 4와는 다르게 전체적으로 일정하게 밝기 보정을 수행하였음을 알 수 있다. 또한 투사각을 고려하여 밝기를 보정하였으므로 투사각이 커질수록 미토콘드리아 부분의 물체가 어두워짐을 알 수 있다. 그림 11에는 목표로 설정한 물체의 평균 $IT\cos\theta_i$ 와 배경의 평균 I 에 대하여 제안한 알고리즘으로 보정한 영상들의 물체와 배경의 평균을 제 III.3절의 방법으로 다시 구하여 비교하였다. 그림 7에서와 같이

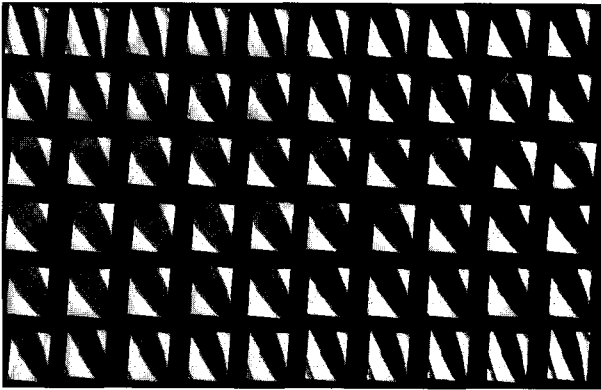


그림 9. 투과율 모델에 근거한 밝기 보정 결과
Fig. 9. Intensity compensation based on the transmissivity model.

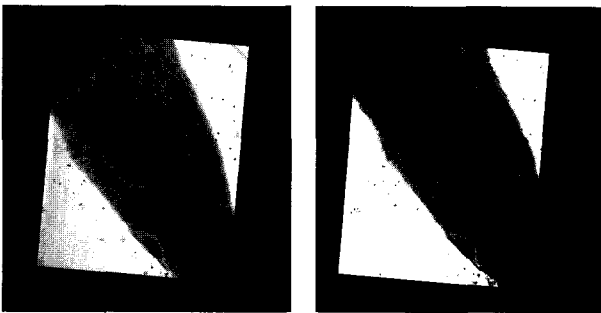


그림 10. 그림 1의 영상을 정렬하고 투과율 모델에 근거하여 밝기 보정을 수행한 결과
Fig. 10. Registered and compensated image of Fig. 1 based on the transmissivity model.

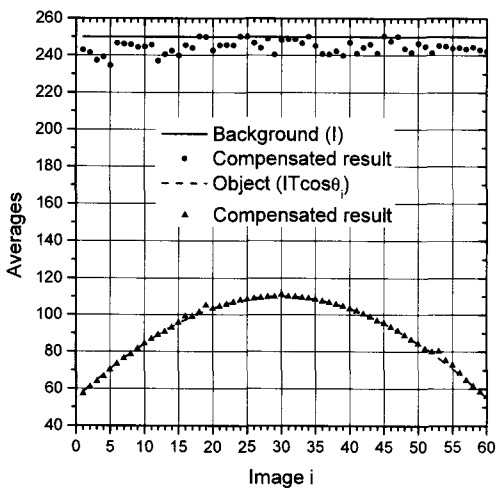


그림 11. 밝기 보정된 영상 g_k^i 의 물체와 배경의 평균
($I=250$, $T=0.44$, $\sigma_O^2=-2.46\text{dB}$, $\sigma_B^2=10.8\text{dB}$)
Fig. 11. The averages of the object and background of the intensity compensated images g_k^i ($I=250$, $T=0.44$, $\sigma_O^2=-2.46\text{dB}$, $\sigma_B^2=10.8\text{dB}$).

매우 불규칙한 밝기 특성을 보이던 영상열이 밝기 보정된 영상들에서는 물체와 배경에서의 평균이 목표 값과 매우 근접함을 알 수 있으며 분산 값도 물체의 경우에는 24.9dB에서 -2.46dB로, 배경의 경우 27.4dB에서 10.8dB로 줄어들었음을 알 수 있다. 따라서 제안한 알고리즘이 비교적 간단한 방법으로 투사각 영상열의 밝기를 잘 보정해 줌을 알 수 있다.

V. 결 론

본 논문에서는 표본에 교상체의 금 입자로 만들어진 기준점(fiducial marker)을 사용하여 정렬한 투과전자현미경(transmission electron microscopy, TEM)으로부터 얻은 투사각 영상열의 밝기 보정을 수행하였다. 이는 궁극적으로 생체의 정확한 3차원 복원을 위한 것이다. 두장의 영상 쌍 간에 상대적인 밝기 보정 함수를 구해서 전체 영상을 보정하는 경우 영상의 대비가 떨어지는 등의 문제가 발생하였으나, 제안한 투과율 모델에 근거한 단순한 밝기 보정 방법으로 이러한 단점이 개선된 밝기 보정을 수행할 수 있었다.

참 고 문 헌

- [1] J. Frank, *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*. NY: Academic Press, 1996.
- [2] J. Frank, *Electron Tomography; Method for Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell*. 2nd. ed. NY: Springer, 2006.
- [3] B. Fultz and J. M. Howe, *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*. Berlin: Springer, 2001.
- [4] R. C. Gonzalez and R. E. Woods, *Digital Image Processing*. 2nd. ed. NY: Prentice Hall, 2002.
- [5] D. S. Kim, S. Y. Lee, and K. Lee, "Empirical conditional mean: nonparametric estimator for comparometric exposure compensation," in *Proc IEEE ICASSP*, Toulouse, France, May 2006, pp. II-957 - II-960.
- [6] D. S. Kim and K. Lee, "Block-coordinate Gauss-Newton optimization and constrained monotone regression for image registration in the presence of outlier objects," *IEEE Trans. Image Processing*, vol. 17, no. 5, pp. 798-810, May 2008.
- [7] S. Mann, "Comparometric equations with

- practical applications in quantigraphic image processing," *IEEE Trans. Image processing*, vol. 9, no. 8, pp. 1389-1406, 2000.
- [8] P. Penczek, M. Marko, K. Buttle, and J. Frank, "Double-tilt electron tomography," *Ultramicroscopy*, vol. 60, pp. 393-410, 1995.
- [9] T. Ridler and S. Calvard, "Picture thresholding using an iterative selection method," *IEEE Trans. Systems Man Cybernet.*, vol. 8, no. 8, pp. 630-632, 1978.
- [10] A. Sen and M. Srivastava, *Regression Analysis, Theory, Methods, and Applications*. NY: Springer-Verlag, 1990.
- [11] B. Zitova and J. Flusser, "Image registration methods: a survey," *Image and Vision Computing*, vol. 21, pp. 977-1000, 2003.
- [12] 김동식, 이기룡, "영상의 노출 보정을 고려한 공간 정합 알고리즘 연구," *대한전자공학회 논문집*, 제 44권, SP 편, 제 2호, pp. 93-101, 2007년 3월.
- [13] 이준호, 이지호, 김동식, "정렬된 특정 투사 각도에서 획득한 TEM 영상열의 밝기 보정," *신호처리합동학술대회 논문집*, 제 20권 1호, 대구, 2007년 10월.

저 자 소 개

김 동 식(정회원)
 대한전자공학회 논문지
 제 42권 SP편 제 6호 참조