



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월02일
(11) 등록번호 10-1700887
(24) 등록일자 2017년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G06T 7/00 (2017.01) C12M 1/34 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G06T 7/0012 (2013.01)
C12M 1/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0104766
(22) 출원일자 2015년07월24일
심사청구일자 2015년07월24일
(56) 선행기술조사문헌
An automatic mobile cell counting system for
the analysis of biological image*
JP2015091220 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한밭대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동)
주식회사 아이큐바이오
광주광역시 북구 첨단과기로 123 ,120호(오룡동,기전공학동)
(72) 발명자
경민영
대전광역시 서구 청사서로 70 202동 801호 (월평동,무궁화아파트)
이현빈
대전광역시 서구 둔산로 155 109동 703호 (둔산동,크로바아파트)
신상모
대전광역시 유성구 노은동로 111, 1003동 206호 (노은동, 열매마을 10단지 아파트)
(74) 대리인
이은철

전체 청구항 수 : 총 6 항

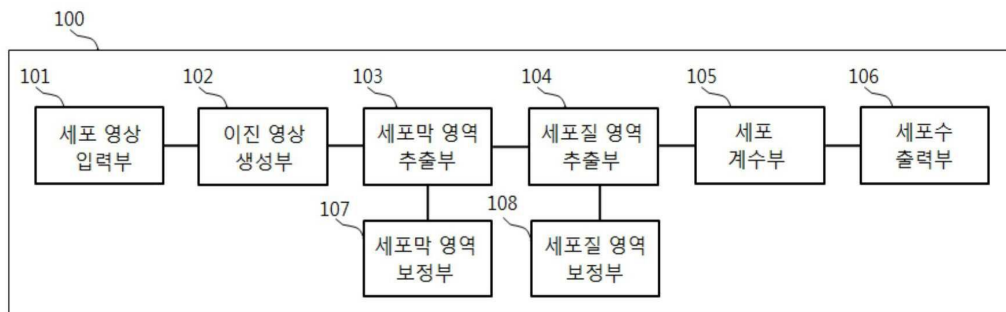
심사관 : 신재철

(54) 발명의 명칭 영상 처리를 이용한 세포 계수 장치 및 방법, 이를 실행시키기 위한 프로그램을 기록한 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체

(57) 요약

본 발명은 영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 장치 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 세포를 촬영한 영상에서 픽셀값의 변화량의 크기를 이용하여 세포 영역과 배경 영역을 분리하는 단계와, 상기 세포 영역에서 세포막 추출 임계값을 설정하여 세포막을 추출하는 단계와, 상기 추출된 세포막을 이용하여 상기 세포 영역에서 세포 개수를 카운팅하는 단계를 포함한다. 본 발명에 따르면, 세포 영상에서 세포막 영역을 추출하여 각각의 세포를 분리·검출하고 또한, 계수하고자 하는 세포 영상의 과거 시점의 세포 영상을 이용하여 세포의 개수를 역추적 함으로써, 단순한 형태의 단일 세포는 물론 형태가 복잡한 세포 또는 뭉쳐 있는 세포 집단 내의 세포 및 세포 간 경계가 희미한 세포 집단 내의 세포까지도 신속하고 정확하게 계수할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201402570001

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 (사)한국산학연합회

연구사업명 산학협력기술개발사업

연구과제명 영상 처리를 이용한 자동 세포 카운팅 소프트웨어 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한밭대학교 산학협력단

연구기간 2014.08.01 ~ 2015.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 방법에 있어서,
 세포를 촬영한 영상에서 픽셀값의 변화량의 크기를 이용하여 세포 영역과 배경 영역을 분리하는 단계와,
 상기 세포 영역에서 세포막 추출 임계값을 설정하고, 세포막 추출 임계값을 낮추어가며 세포막을 추출하는 단계와,
 상기 추출된 세포막을 이용하여 상기 세포 영역에서 세포 개수를 카운팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 계수 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
 상기 세포막을 추출하는 단계는 세포막 추출 임계값을 세포막 영역을 제외한 다른영역 픽셀값의 평균값과 동일해 질 때까지 낮추어가며 세포막을 추출하는 것을 특징으로 하는 세포 계수 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
 상기 추출된 세포막 영역 중 세포막 최소 면적에 해당하는 픽셀 개수 미만의 영역을 제거하는 것을 특징으로 하는 세포 계수 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
 상기 카운팅 단계는
 상기 추출된 세포막을 이용하여 세포질의 평균 면적을 구하는 단계와,
 상기 세포질의 평균 면적보다 큰 면적을 갖는 세포질을 미분리 세포 영역으로 도출하는 단계와,
 상기 미분리 세포 영역은 동일 위치의 과거의 세포 영상을 이용하여 세포 개수를 카운팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 계수 방법.

청구항 5

영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 방법을 컴퓨터에서 실행시키기 위한 프로그램을 기록한 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체에 있어서, 상기 세포 계수 방법은
 세포를 촬영한 영상에서 픽셀값의 변화량의 크기를 이용하여 세포 영역과 배경 영역을 분리하는 단계와,
 상기 세포 영역에서 세포막 추출 임계값을 설정하고, 세포막 추출 임계값을 낮추어가며 세포막을 추출하는 단계와,
 상기 추출된 세포막을 이용하여 상기 세포 영역에서 세포 개수를 카운팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하

는 기록매체.

청구항 6

영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 장치에 있어서,
세포 영상을 입력받는 세포 영상 입력부와,
상기 입력된 세포 영상에서 세포 영역과 배경 영역의 이진 영역을 생성하는 이진 영상 생성부와,
상기 생성된 이진 영상에서 세포막 영역을 추출하는 세포막 영역 추출부와,
상기 세포막 영역이 추출된 영상에서 세포질 영역을 추출하는 세포질 영역 추출부와,
상기 세포질 영역이 추출된 영상에서 분리된 세포질 각각을 계수하여 세포수를 산출하는 세포 계수부와,
상기 세포 계수부에서 산출된 세포수를 출력하는 세포수 출력부를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 계수 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 영상 처리를 이용한 세포 계수 장치 및 방법, 이를 실행시키기 위한 프로그램을 기록한 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 형태가 복잡한 세포 및 경계가 불분명하게 뭉쳐 있는 세포 집단 내 세포를 정확하게 계수할 수 있는 영상 처리를 이용한 세포 계수 장치 및 방법, 이를 실행시키기 위한 프로그램을 기록한 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포를 다루는 실험에 있어서 세포의 계수는 가장 기초적인 실험으로 세포의 계수는 생명과학 뿐만 아니라 다양한 질병을 진단하는 의학 분야에서도 널리 행해지고 있다. 특히, 암 세포의 성장 및 분열의 분석은 약물의 효능 및 치료법의 효용성을 입증하기 위하여 매우 중요한데 이러한 암 세포의 성장을 측정하는 방법으로써 세포의 계수는 가장 많이 사용되는 세포 분석법이다.

[0003] 과거 그리고 현재까지도 소규모의 실험실에서는 세포의 계수를 위하여 유리로 된 슬라이드 구조물인 헤모사이트미터(hemocytometer)에 세포 샘플을 얹고 광학현미경으로 관찰하며 직접 눈으로 계수하는 방식을 이용하였다. 그러나 이와 같은 방식은 많은 시간과 노력을 필요로 하고, 측정하는 연구자들에 따라 세포 분리를 다르게 할 수 있기 때문에 매우 주관적인 결과를 나타낸다는 문제점이 있다.

[0004] 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근에는 컴퓨터 기반의 세포 계수 기법이 개발되고 있다. 그 예로, 크게 세포 분리 기반의 경계선 검출(Edge Detection), 형태적 분석(Morphological Analysis), 동적 윤곽선(Active Contours)을 이용하는 방법과 세포 이동 분석 기반의 세포 추적(Cell Tracking) 방식으로 나눌 수 있다.

[0005] 경계선 검출(Edge Detection)은 Sobel, Canny Edge Detection과 같은 기존의 경계선 검출기를 사용하여, 세포의 경계선을 검출하는 방식이다. 하지만 이러한 방법은 세포의 모양이 복잡하거나, 세포가 뭉쳐있을 경우에 경계선 검출이 정확하게 이루어지기 어렵기 때문에 세포 계수 결과의 신뢰도가 떨어지는 문제점이 있다.

[0006] 형태적 분석(Morphological Analysis)은 효모 세포와 같이 일정한 모양의 세포의 형태적 특징을 미리 추출하여 세포를 검출하는 방식으로, 세포의 모양이 일정하지 않을 경우에는 적용이 불가능하며, 같은 종류의 세포라도 이미지의 밝기, 잡음과 같은 주변 환경 변화에 따라 검출률이 매우 달라지는 단점이 있다.

[0007] 동적 윤곽선(Active Contours)은 원 이미지와 입력 이미지의 픽셀값의 변화량과 이미지 각각의 윤곽선을 중첩시켜 세포의 경계선을 찾는 방식이다. 하지만, 각각의 세포마다 윤곽선 초기화가 필요하기 때문에 반자동적이며 해당 방식은 세포의 외곽선만을 검출하기 때문에 세포가 세포 집단을 구성할 경우 이를 분리하여 검출하는 것이 불가능하다.

[0008] 또한, 세포 이동 분석 기반의 세포 추적(Cell Tracking)은 여러 프레임 간의 세포의 움직임을 추적하여 세포 이미지 내의 배경 혹은 잡음으로부터 잠재적 세포 객체를 식별해냄으로써 세포의 개수를 세는 방법으로 각각의 세

포를 추적하려면 매우 많은 시간이 필요하고, 세포 추적 기반의 세포 계수 방법은 대부분 단일 세포에만 적용이 가능하며, 세포가 뭉쳐 세포 집단을 구성할 경우에는 해당 기법을 적용할 수 없는 한계점을 가지고 있다.

[0009] 이와 같이 기존에 제안된 컴퓨터 기반의 세포 계수 방법의 대부분은 형태가 복잡한 세포이거나 세포가 뭉쳐 세포 집단을 구성할 경우 이를 정확하게 분리하여 검출하고 계수하기 어려운 실정이다.

[0010] 관련 종래 기술로는, 대한민국 공개특허 제10-2009-0034245호(초분광 이미지 시스템을 이용하는 정량적 세포 분석방법), 일본 공개특허공보 제2014-82957호(세포 계수 장치 및 세포 계수 프로그램) 등이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서 본 발명은 단순한 형태의 단일 세포는 물론 형태가 복잡한 세포를 신속하고 정확하게 계수할 수 있는 영상 처리를 이용한 세포 계수 장치 및 방법, 이를 실행시키기 위한 프로그램을 기록한 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체를 제공하는 것을 일 목적으로 한다.

[0012] 또한 본 발명은 세포 집단을 형성하여 세포 간 경계가 희미한 세포 집단 내의 세포를 신속하고 정확하게 계수할 수 있는 영상 처리를 이용한 세포 계수 장치 및 방법, 이를 실행시키기 위한 프로그램을 기록한 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 방법에 있어서, 세포를 촬영한 영상에서 픽셀값의 변화량의 크기를 이용하여 세포 영역과 배경 영역을 분리하는 단계와, 상기 세포 영역에서 세포막 추출 임계값을 설정하여 세포막을 추출하는 단계와, 상기 추출된 세포막을 이용하여 상기 세포 영역에서 세포 개수를 카운팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 바람직하게는, 상기 세포막을 추출하는 단계는 상기 세포 영역에서 상기 세포막 추출 임계값을 내리면서 세포막을 추출할 수 있다.

[0015] 바람직하게는, 상기 추출된 세포막 영역 중 세포막 최소 면적에 해당하는 픽셀 개수 미만의 영역을 제거할 수 있다.

[0016] 바람직하게는, 상기 카운팅 단계는 상기 추출된 세포막을 이용하여 세포질의 평균 면적을 구하는 단계와, 상기 세포질의 평균 면적보다 큰 면적을 갖는 세포질을 미분리 세포 영역으로 도출하는 단계와, 상기 미분리 세포 영역은 동일 위치의 과거의 세포 영상을 이용하여 세포 개수를 카운팅하는 단계를 포함할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 방법을 컴퓨터에서 실행시키기 위한 프로그램을 기록한 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체에 있어서, 상기 세포 계수 방법은 세포를 촬영한 영상에서 픽셀값의 변화량의 크기를 이용하여 세포 영역과 배경 영역을 분리하는 단계와, 상기 세포 영역에서 세포막 추출 임계값을 설정하여 세포막을 추출하는 단계와, 상기 추출된 세포막을 이용하여 상기 세포 영역에서 세포 개수를 카운팅하는 단계를 포함하는 것을 다른 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 장치에 있어서, 세포 영상을 입력받는 세포 영상 입력부와, 상기 입력된 세포 영상에서 세포 영역과 배경 영역의 이진 영역을 생성하는 이진 영상 생성부와, 상기 생성된 이진 영상에서 세포막 영역을 추출하는 세포막 영역 추출부와, 상기 세포막 영역이 추출된 영상에서 세포질 영역을 추출하는 세포질 영역 추출부와, 상기 세포질 영역이 추출된 영상에서 분리된 세포질 각각을 계수하여 세포수를 산출하는 세포 계수부와, 상기 세포 계수부에서 산출된 세포수를 출력하는 세포수 출력부를 포함하는 것을 또 다른 특징으로 한다.

발명의 효과

[0019] 상기와 같은 본 발명에 따르면, 세포 영상에서 세포막 영역을 추출하여 각각의 세포를 분리·검출함으로써, 단순한 형태의 단일 세포는 물론 형태가 복잡한 세포를 신속하고 정확하게 계수할 수 있다.

[0020] 또한 본 발명에 따르면, 계수하고자 하는 세포 영상의 과거 시점의 세포 영상을 이용하여 세포의 개수를 역추적함으로써, 세포 집단을 형성하여 세포 간 경계가 희미한 세포 집단 내의 세포까지도 간단하고 정확하게 계수할

수 있다.

[0021] 또한 본 발명에서 제공하는 영상 처리를 이용한 세포 계수 방법은, 신속하고 정확한 세포수의 측정 결과가 요구되는 암 진단 분야에서 매우 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 영상 처리를 이용한 세포 계수 장치의 구성도이다.

도 2는 영상 처리를 이용한 세포 계수 방법을 도시한 블록도이다.

도 3은 헬라 세포(HeLa cell)의 (a)형광 현미경 이미지와 (b)광학 현미경 이미지이다.

도 4에서 (a)는 헬라 세포의 광학 현미경 이미지이고, (b) 내지 (e)는 영상 처리를 이용한 세포 계수 방법의 단계별 수행 결과를 나타내는 이미지이다.

도 5에서 (a)는 헬라 세포를 확대한 이미지이고, (b)는 헬라 세포의 그래디언트 매그니튜드 이미지(gradient magnitude image)이며, (c)는 세포 영역과 배경 영역의 픽셀값의 변화량을 나타내는 히스토그램이다.

도 6은 세포막 영역의 보정 단계를 나타내는 이미지이다.

도 7에서 (a)는 단일의 헬라 세포, (b)는 세포 간 경계가 뚜렷한 헬라 세포 집단, (c)는 세포 간 경계가 희미한 헬라 세포 집단을 나타내는 이미지이다.

도 8은 세포 간 경계가 희미한 세포 집단의 세포 계수를 위한 역추적(Back Tracking) 알고리즘의 수행 결과를 나타내는 이미지이다.

도 9는 본 발명에 따른 영상 처리를 이용한 세포 계수 방법을 컴퓨터에서 실행시키기 위한 프로그램의 흐름도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 실시예들을 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0024] 본 발명의 실시예에 따른 영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 장치는 세포 영상을 입력받는 세포 영상 입력부와, 상기 입력된 세포 영상에서 세포 영역과 배경 영역의 이진 영역을 생성하는 이진 영상 생성부와, 상기 생성된 이진 영상에서 세포막 영역을 추출하는 세포막 영역 추출부와, 상기 세포막 영역이 추출된 영상에서 세포질 영역을 추출하는 세포질 영역 추출부와, 상기 세포질 영역이 추출된 영상에서 분리된 세포질 각각을 계수하여 세포수를 산출하는 세포 계수부와, 상기 세포 계수부에서 산출된 세포수를 출력하는 세포수 출력부를 포함할 수 있다.

[0025] 이하에서는 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0026] 도 1은 영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 장치의 구성도이다. 도 1을 참조하면, 영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 장치(100)는 세포 영상 입력부(101), 이진 영상 생성부(102), 세포막 영역 추출부(103), 세포질 영역 추출부(104), 세포 계수부(105) 및 세포수 출력부(106)로 구성될 수 있고, 세포막 영역 보정부(107)와 세포질 영역 보정부(108)를 더 포함할 수 있다.

[0027] 현미경으로 촬영된 세포 영상은 세포 영상을 입력받는 세포 영상 입력부(101)에 입력되고, 이진 영상 생성부(102)는 상기 입력된 세포 영상에서 세포 영역과 배경 영역 간의 픽셀(pixel)값의 변화량 차이를 이용하여 세포 영역과 배경 영역으로 이루어진 흑백의 이진 영역을 생성한다. 세포막 영역 추출부(103)는 세포막 영역 추출의 임계값(threshold)을 설정하고, 상기 생성된 이진 영상에서 설정된 임계값보다 높은 픽셀값을 갖는 영역을 세포막 영역으로 추출한다. 세포질 영역 추출부(104)는 상기 세포막 영역이 추출된 영상에서 각각 분리된 세포 내의 세포막 영역을 제거하여 세포질 영역을 추출한다. 세포 계수부(105)는 상기 세포질 영역이 추출된 영상에서 분리된 세포질 각각을 분리된 단일 세포로 간주하고 이를 계수하여 세포수를 산출한다. 세포수 출력부(106)는 상기 세포 계수부에서 산출된 세포수를 출력한다.

[0028] 본 발명에 따른 영상 처리를 이용한 세포 계수 장치(100)에 있어서, 세포막 영역 추출부(103)는 세포막 영역 보

정부(107)를 더 포함할 수 있다. 세포막 영역 보정부(107)는 세포막 영역 추출의 임계값으로 설정된 픽셀값의 조정을 통하여 세포막을 반복적으로 추출함으로써 상기 세포막 영역을 보정하여 보다 정확한 세포막 골격 이미지를 획득할 수 있다.

[0029] 또한, 세포질 영역 추출부(104)는 세포질 영역 보정부(108)를 더 포함할 수 있다. 세포질 영역 보정부(108)는 세포 간 경계가 희미한 세포 집단을 위한 수단으로써, 입력된 세포 영상의 과거 시점의 영상을 이용하여 상기 추출된 세포질 영역에서 세포 간 분리가 정확히 이루어지지 않은 세포질 영역을 보정하여 묻쳐 있는 세포 집단 내의 계수되지 않은 세포까지 계수함으로써, 세포 집단 내의 세포 개수를 정확히 보정할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 방법에 있어서, 세포를 촬영한 영상에서 픽셀값의 변화량의 크기를 이용하여 세포 영역과 배경 영역을 분리하는 단계와, 상기 세포 영역에서 세포막 추출 임계값을 설정하여 세포막을 추출하는 단계와, 상기 추출된 세포막을 이용하여 상기 세포 영역에서 세포 개수를 카운팅하는 단계를 포함할 수 있다.

[0031] 상기 세포막을 추출하는 단계는 상기 세포 영역에서 상기 세포막 추출 임계값을 내리면서 세포막을 추출할 수 있다.

[0032] 상기 추출된 세포막 영역 중 세포막 최소 면적에 해당하는 픽셀 개수 미만의 영역을 제거할 수 있다.

[0033] 상기 카운팅 단계는 상기 추출된 세포막을 이용하여 세포질의 평균 면적을 구하는 단계와, 상기 세포질의 평균 면적보다 큰 면적을 갖는 세포질을 미분리 세포 영역으로 도출하는 단계와, 상기 미분리 세포 영역은 동일 위치의 과거의 세포 영상을 이용하여 세포 개수를 카운팅하는 단계를 포함할 수 있다.

[0034] 보다 구체적으로 살펴보면, 도 2는 본 발명에 따른 영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 방법을 도시한 블록도이다. 도 2를 참조하면, 영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 방법은 세포 영상을 획득하는 단계(S10), 상기 세포 영상에서 세포 영역과 배경 영역을 분리하여 이진 영상을 생성하는 단계(S20), 상기 이진 영상에서 세포막 영역을 추출하는 단계(S30), 상기 세포막 영역이 추출된 영상에서 세포질 영역을 추출하는 단계(S40) 및 상기 세포질 영역이 추출된 영상에서 세포를 계수하는 단계(S50)를 포함할 수 있다.

[0035] 세포 영상을 획득하는 단계(S10)는 세포에 염색을 하지 않고 광학 현미경으로 촬영하여 상기 세포 영상을 획득할 수 있다. 세포 영상(이미지, image)을 이용한 세포의 계수에 사용되는 세포 이미지의 종류는 도 3에 도시된 바와 같이 세포의 염색 여부 또는 사용하는 현미경에 따라 크게 (a)형광 현미경 이미지(fluorescence microscopy image)와 (b)광학 현미경 이미지(optical microscopy image)로 나눌 수 있다.

[0036] 형광 현미경 이미지는 일반적으로 형광 염료 혹은 DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole)를 사용하여 인위적으로 염색을 시킨 세포를 형광 현미경으로 촬영한 이미지로써 세포의 상태에 따라 발광하는 색이 달라지기 때문에 세포를 검출하기에 비교적 수월하고 단순하다는 장점을 갖는 반면, 세포의 검출시마다 염색 과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있다.

[0037] 반면에, 광학 현미경 이미지는 세포에 인위적인 영향을 주지 않기 때문에 세포의 오염 발생빈도가 비교적 적다는 장점이 있지만, 세포 이미지 내에서 세포 간의 경계가 비교적 뚜렷하지 않기 때문에 정확한 세포 검출에 어려움이 있다는 문제점이 있으나, 본 발명에서는 세포 영상 전체에 세포막 추출 알고리즘을 적용하고, 또한 세포 간 경계가 희미한 세포 집단의 경우 과거 시점의 세포 영상을 기반으로 하는 역추적(Back Tracking) 알고리즘을 적용·보완함으로써 상기과 같은 문제점을 해결하였다. 이에 따라, 본 발명에 의하면 광학 현미경 이미지가 가지는 세포 검출의 어려움을 극복하여 세포 각각을 검출해 낼 수 있고, 이로 인하여 세포 영상 내의 세포를 정확하게 계수할 수 있다.

[0038] 세포 영상에서 세포 영역과 배경 영역을 분리하여 이진 영상을 생성하는 단계(S20)는 상기 세포 영역과 상기 배경 영역 간의 픽셀값의 변화량 차이를 이용하여 분리할 수 있다. 픽셀값의 변화량 계산에는 일반적으로 사용되는 Sobel 연산자를 이용할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

[0039] 이진 영상에서 세포막 영역을 추출하는 단계(S30)는 상기 세포막 영역을 제외한 다른 영역의 픽셀값의 최대값을 세포막 영역 추출의 임계값(threshold)으로 설정할 수 있고, 상기 임계값보다 높은 픽셀값을 갖는 영역을 세포막 영역으로 추출할 수 있다. 세포 영상을 살펴보면, 각각의 세포에 있어서 세포막 영역은 다른 영역에 비하여 비교적 밝은 것을 확인할 수 있고, 밝은 영역은 높은 픽셀값을 갖는다. 이와 같이 영역에 따른 픽셀의 밝기값의 차이를 이용하여 세포막 영역을 추출하기 위해서 세포막 영역을 제외한 다른 영역의 픽셀값의 최대값을 세포막 영역 추출의 임계값으로 설정하고, 상기 임계값보다 높은 픽셀값을 갖는 영역을 도출하여 세포막 골격 이미지를

추출할 수 있다. 세포막 영역을 제외한 다른 영역의 픽셀값의 최대값으로는 배경 영역의 픽셀값의 최대값을 이용할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

- [0040] 세포막 영역을 추출하는 단계(S30)는 세포막 추출 임계값보다 높은 픽셀만을 대상으로 하여 세포막 골격 이미지를 추출하기 때문에 세포막 영역의 추출이 완전하지 않은 바, 이를 보완하기 위하여 추출된 세포막 영역을 보정하는 단계(S31)를 더 포함할 수 있다. 세포막 영역을 보정하는 단계(S31)는 상기 세포막 영역 추출 임계값이 상기 세포막 영역을 제외한 다른 영역의 픽셀값의 평균값과 동일해질 때까지 상기 임계값을 순차적으로 내려가며 세포막 영역을 반복적으로 추출하여 보정할 수 있다.
- [0041] 세포막 영역을 보정하는 단계(S31)는 또한, 추출된 세포막 영역 중 세포막 최소 면적에 해당하는 픽셀 개수 미만의 영역을 제거하여 보정할 수 있다. 이것은 세포막 영역을 추출하는 단계(S30)에서 부분적으로 추출된 픽셀 영역은 세포막 영역이 아닐 가능성이 높으므로 해당 영역을 제거할 필요가 있기 때문이다.
- [0042] 세포막 영역을 추출하는 단계(S30)와 세포막 영역을 보정하는 단계(S31)를 포함하는 영상 처리를 이용한 세포 계수의 중간 과정을 "세포막 추출 알고리즘"이라 칭한다.
- [0043] 세포질 영역을 추출하는 단계(S40)는 상기 세포 영역에서 상기 세포막 영역을 제거하여 세포질 영역을 추출할 수 있다.
- [0044] 세포를 계수하는 단계(S50)는 세포질 영역이 추출된 영상에서 각각의 세포질을 분리된 단일 세포로 간주하고, 상기 각각의 세포질을 계수함으로써 세포 영상 내의 세포의 수를 측정할 수 있다.
- [0045] 단일 세포 및 세포 간 경계가 뚜렷한 세포 집단의 경우에는 세포 영상을 획득하는 단계(S10), 세포 영상에서 세포 영역과 배경 영역을 분리하여 이진 영상을 생성하는 단계(S20), 세포막 영역을 추출하는 단계(S30)와 세포막 영역을 보정하는 단계(S31), 세포질 영역을 추출하는 단계(S40), 세포를 계수하는 단계(S50)에 의하여 세포 수의 측정이 가능하다. 하지만, 세포 간 경계가 희미한 세포 집단의 경우에는 단일의 세포 이미지만을 이용해서는 정확한 분리가 어렵기 때문에 시간 경과 이미지(Time lapse image) 기반의 역추적(Back Tracking) 알고리즘을 적용하여 보다 정확하게 세포를 계수할 수 있다.
- [0046] 즉, 세포질 영역을 추출하는 단계(S40)는, 상기 분리된 세포질 영역의 면적의 평균값을 구하는 단계(S41), 상기 평균값을 초과하는 면적값을 갖는 세포질 영역 즉, 미분리된 영역을 현재 관심영역(region of interest, ROI)으로 설정하는 단계(S42), 상기 세포의 과거 시점의 영상에서 상기 현재 ROI와 동일한 위치를 과거 ROI로 설정하는 단계(S43) 및 상기 과거 ROI 내의 세포를 계수하여 상기 현재 ROI 내의 세포 개수를 보정하는 단계(S44)를 더 포함할 수 있고, 이와 같이 세포 간 경계가 희미한 세포 집단 내의 세포 수를 정확하게 보정하기 위하여 적용되는 알고리즘을 "역추적 알고리즘"이라 칭한다.
- [0047] 일반적으로 한 플레이트내의 세포는 동시에 배양되며, 이를 주기적으로 관찰하기 때문에, 같은 플레이트 내의 세포들은 그 크기가 비슷하다. 따라서 분리되지 않은 세포에서 추출된 세포질 영역은 다른 영역의 세포질에 비해 면적이 크기 때문에, 추출된 세포질 영역 중 면적이 평균 이상인 영역을 찾아 이 부분을 미분리된 세포를 포함하는 영역 즉, 현재 관심영역(ROI)으로 설정한다. 역추적 알고리즘에서는 과거 이미지를 참고하기 위하여 분리되지 않은 세포가 포함된 현재 ROI의 위치를 기준으로 과거 이미지 내의 동일한 위치를 과거 ROI로 설정한다. 다음으로, 과거 ROI 내의 세포 개수를 참고하여 미분리된 세포 영역이 포함된 현재 ROI 내의 세포 개수를 보정할 수 있다.
- [0048] 마지막으로 세포를 계수하는 단계(S50)에서는 분리된 단일 세포, 세포 간 경계가 뚜렷한 세포 집단 내의 세포 및 역추적 알고리즘을 이용하여 세포수가 보정된 세포 간 경계가 희미한 세포 집단 즉, 현재 ROI 내의 세포를 계수하고, 세포 개수를 합산하여 최종적으로 세포 영상 내의 세포수를 산출할 수 있다.
- [0049] 이와 더불어, 본 발명은 또한 영상 처리를 이용하여 세포를 계수하는 방법을 컴퓨터에서 실행시키기 위한 프로그램 기록한 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체에 있어서, 상기 세포 계수 방법은 세포를 촬영한 영상에서 픽셀 값의 변화량의 크기를 이용하여 세포 영역과 배경 영역을 분리하는 단계와, 상기 세포 영역에서 세포막 추출 임계값을 설정하여 세포막을 추출하는 단계와, 상기 추출된 세포막을 이용하여 상기 세포 영역에서 세포 개수를 카운팅하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0050] 이하에서는 암 세포주인 헬라 세포(HeLa Cell)를 이용한 세포 계수 방법을 하나의 적용예로써 설명하기로 한다.
- [0051] 먼저, 도 4의 (a)에서 보는 바와 같이, 광학 현미경에 의해 촬영된 그레이 스케일의 헬라 세포 영상을 획득하였다. 헬라 세포 영상에서 특정 영역의 세포 모습을 확대하여 관찰한 결과, 도 5의 (a)에서 보는 바와 같이, 각

세포는 비교적 밝은 세포막으로 둘러싸여 있고, 각 세포의 내부(즉, 세포질)는 배경에 비해 픽셀값의 변화량이 매우 높은 것을 확인할 수 있다. 도 5의 (b)는 이러한 픽셀값의 변화량의 차이를 보다 명확하게 확인하기 위하여 그래디언트 매그니튜드(Gradient magnitude)로 표현한 영상이다.

[0052] 본 적용예에서는 픽셀값의 변화량을 구하기 위하여 Sobel 연산자를 이용하였고, 그 결과를 히스토그램으로 표현한 결과, 도 5의 (c)에서 보는 바와 같이 배경 영역은 픽셀값의 변화량이 매우 낮은 반면에, 세포 영역은 위치에 따라 픽셀값이 다양하다는 특징이 있다. 이러한 특징을 이용하여 세포 영역과 배경 영역의 이진 영역으로 이루어진 이진 영상을 생성할 수 있다. 세포 영역과 배경 영역의 픽셀값의 변화량의 차이를 이용하여 생성된 헬라 세포의 흑백의 이진 영상은 도 4의 (b)에서 보는 바와 같다.

[0053] 다음으로, 도 5의 (a)에서 보는 바와 같이 헬라 세포의 세포막은 다른 영역보다 밝기 때문에, 높은 픽셀값을 가지고 있다. 따라서 세포막을 추출하기 위하여 배경 영역의 픽셀값의 최대값을 세포막 추출의 임계값으로 설정하였고, 상기 임계값보다 높은 픽셀값을 갖는 영역을 헬라 세포의 세포막 영역으로 추출하였다. 그 결과, 도 4의 (c)에서 보는 바와 같이 헬라 세포의 세포막 골격 이미지를 생성할 수 있다.

[0054] 하지만, 도 4의 (c)에서 보여지는 헬라 세포의 세포막 골격 이미지는 세포막 추출의 임계값보다 높은 픽셀값을 갖는 영역만을 대상으로 추출하였기 때문에, 세포막 영역의 추출이 완전하지 않다. 따라서, 이를 보완하기 위하여 상기 세포막 추출의 임계값으로 설정된 픽셀값이 헬라 세포의 배경 영역 픽셀값의 평균값과 동일해질 때까지 임계값을 순차적으로 내려가며 도 6에서 보는 바와 같이 헬라 세포의 세포막 영역을 반복적으로 추출하여 보정하였다. 또한, 도 4의 (c)에서 보는 바와 같이 세포막 영역의 추출 단계에서 부분적으로 추출된 픽셀 영역은 세포막 영역이 아닐 가능성이 높기 때문에 이러한 부분을 제거하기 위하여 해상도가 750×550 일 때 픽셀 30이하의 영역을 제거하는 보정을 수행하였다. 이와 같은 세포막 영역의 보정의 결과로 도 4의 (d)와 같이 보정된 세포막 골격 이미지가 생성되었다.

[0055] 상기 과정을 통하여 헬라 세포의 세포막 영역을 추출한 후, 세포 영역에서 상기 추출된 세포막 영역을 제거하여 도 4의 (e)에서 보는 바와 같이 세포질 영역을 추출하였고, 각각의 세포질은 분리된 단일의 헬라 세포로 볼 수 있기 때문에 추출된 세포질 영역의 각각의 세포질을 계수하면 헬라 세포 영상 내의 세포의 수를 측정할 수 있다. 즉, 도 7의 (a)와 (b)의 영상처럼 분리된 단일 세포이거나 세포 간 경계가 뚜렷한 세포 집단의 경우 지금까지 상술한 과정에 의해 세포의 계수가 가능하다.

[0056] 하지만, 도 7의 (c)와 같이 세포 간 경계가 희미한 세포 집단의 경우 상기의 과정만으로는 세포막 영역의 추출이 불완전하여 세포 분리가 정확하게 수행되지 어렵기 때문에 이와 같은 세포 집단을 계수하기 위하여 추가적으로 시간 경과 이미지(Time lapse image) 기반의 역추적(Back Tracking) 알고리즘이 필요하다.

[0057] 구체적으로, 같은 플레이트 내의 헬라 세포는 그 면적과 형태가 비슷하다. 따라서 추출된 세포질 영역 내의 각각의 세포질은 그 면적 및 형태가 유사하나, 세포막의 분리가 제대로 이루어지지 않은 경우의 세포질은 그 면적이 크게 측정된다. 이러한 점을 이용하여 세포막 추출의 오류로 인하여 세포 분리가 정확하게 수행되지 않은 영역을 검출할 수 있다. 즉, 상기 과정에서 추출된 헬라 세포의 분리된 세포질 영역의 면적의 평균값을 구하였고, 평균값을 초과하는 면적값을 갖는 영역을 찾아 이를 미분리 세포 후보로 지정하여 이를 현재 관심영역(region of interest, ROI)으로 설정하였다. 다음으로 본 적용예에서 사용된 헬라 세포의 과거 시점의 영상에서 현재 ROI와 동일한 위치를 과거 ROI로 설정하였고, 과거 ROI 내의 헬라 세포를 계수하여 분리되지 않은 헬라 세포 즉, 현재 ROI 내의 세포 개수를 보정하였다.

[0058] 구체적으로, 도 8에서 보는 바와 같이 도 8(a)는 세포 간의 경계가 희미한 세포 집단으로써 도 8(b)에서 보이는 것과 같이 세포 간 분리가 정확하게 수행되지 않았다. 그러나, 도 8(a)의 과거 시점의 영상인 도 8(c)를 살펴보면 세포 간 경계가 비교적 뚜렷하고, 이는 도 8(d)와 같이 세포의 정확한 분리가 가능하다. 따라서 헬라 세포의 과거 영상(도 8(c))의 과거 ROI 부분에 본 적용예의 세포막 추출 알고리즘을 적용하였고, 이를 통하여 세포질을 추출함으로써 해당 부분의 세포질 영역이 명확하게 분리·보정되었다(도 8(d)). 이 부분 즉, 과거 ROI 내의 헬라 세포를 계수하였고, 계수된 세포의 수로 도 8(b)의 세포 개수를 보정하였다.

[0059] 상기 상술한 과정을 통하여 영상 처리된 헬라 세포의 영상에서 최종적으로 세포의 개수를 세는 작업을 수행하였고, 분리된 단일의 세포 개수, 세포 간 경계가 뚜렷한 세포 개수 및 역추적 알고리즘을 이용하여 세포수가 보정된 세포 간 경계가 희미한 세포 집단 즉, 현재 ROI 내의 세포 개수를 모두 합산하여 헬라 세포 영상 내의 세포의 개수를 측정하였다.

[0060] 이상에서 대표적인 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명하였으나, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의

지식을 가진 자는 상술한 실시예에 대하여 본 발명의 범주에서 벗어나지 않는 한도 내에서 다양한 변형이 가능함을 이해할 것이다. 그러므로 본 발명의 권리 범위는 설명한 실시예에 국한되어 정해져서는 안 되며, 후술하는 특허청구범위뿐만 아니라 특허청구범위와 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태에 의하여 정해져야 한다.

부호의 설명

[0061]

100 : 영상 처리를 이용한 세포 계수 장치

101 : 세포 영상 입력부

102 : 이진 영상 생성부

103 : 세포막 영역 추출부

104 : 세포질 영역 추출부

105 : 세포 계수부

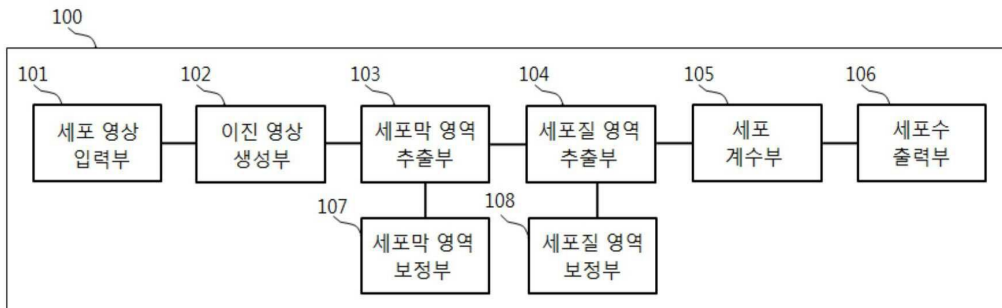
106 : 세포수 출력부

107 : 세포막 영역 보정부

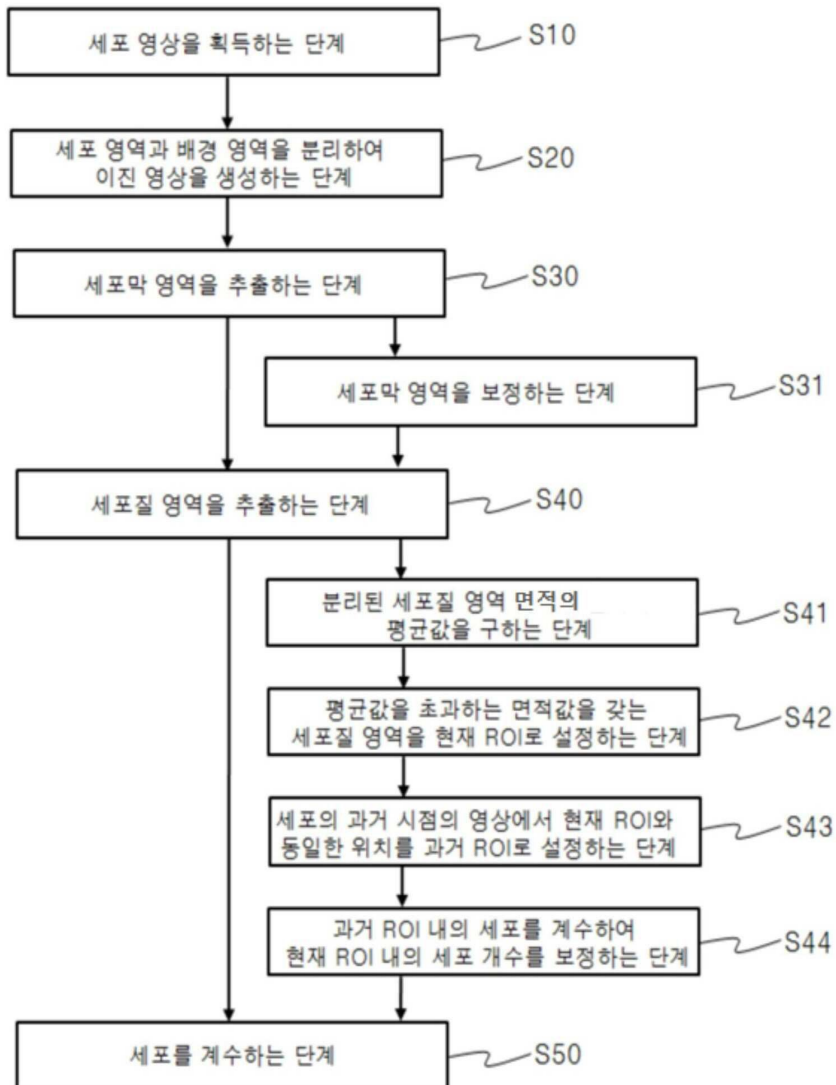
108 : 세포질 영역 보정부

도면

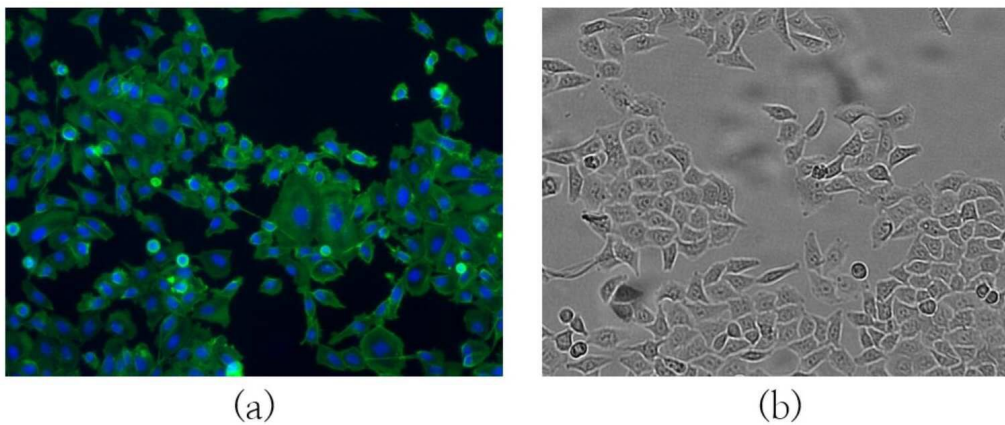
도면1



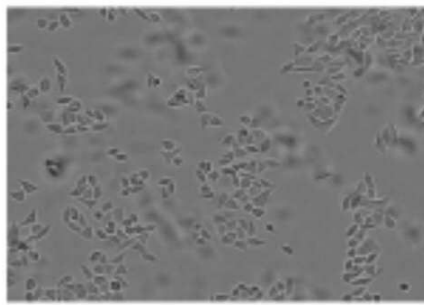
도면2



도면3



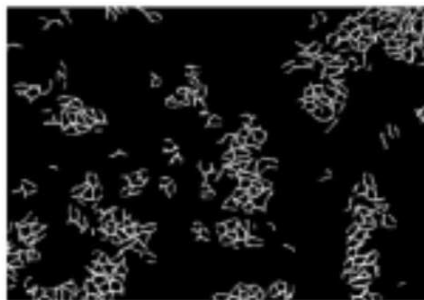
도면4



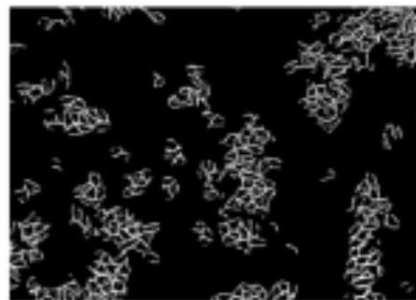
(a) HeLa Cell Image



(b) Cell & Background Segmentation



(c) Cell Membrane Extraction

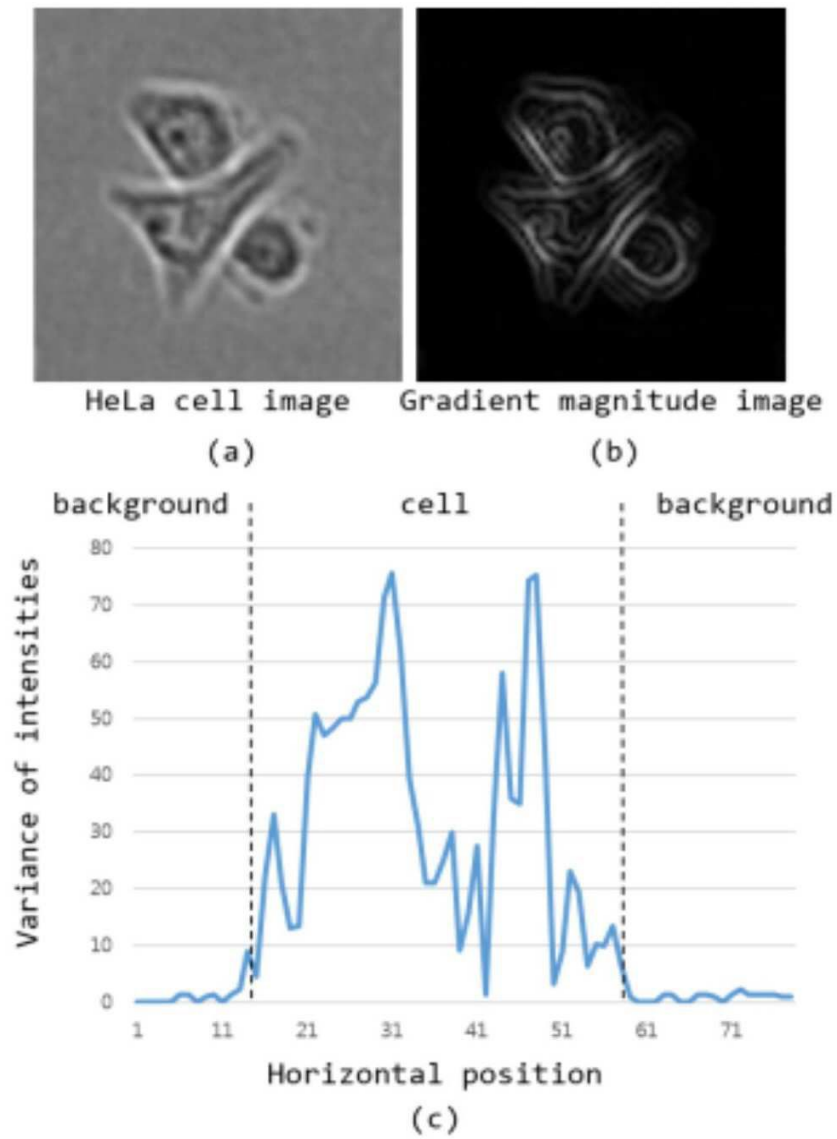


(d) Cell Membrane Compensation

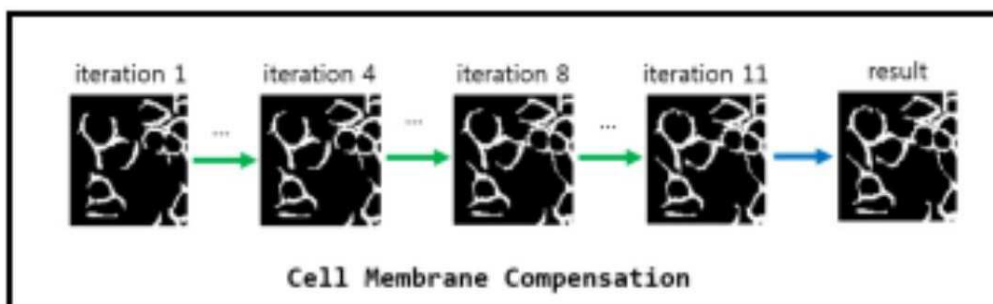


(e) Cytoplasm Extraction

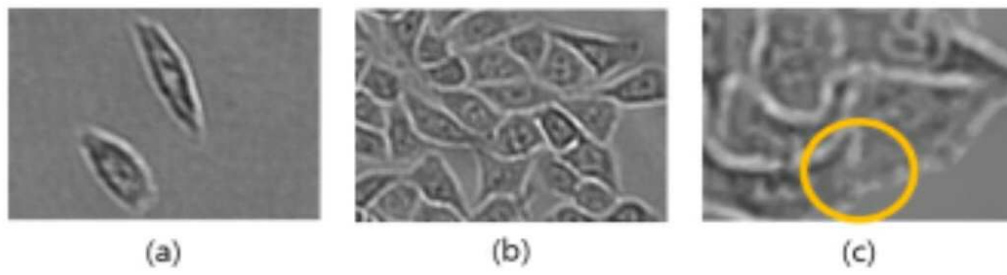
도면5



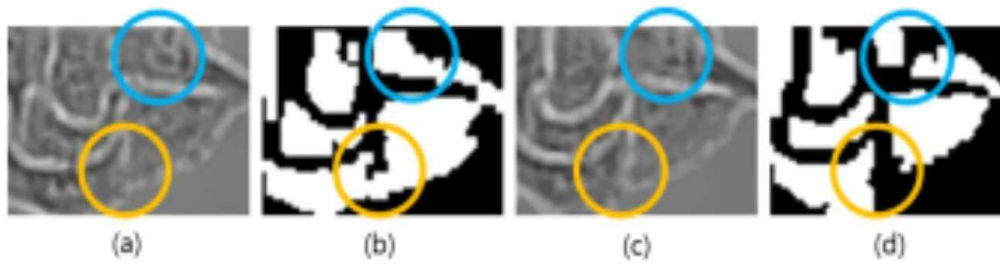
도면6



도면7



도면8



도면9

