위상차 현미경 영상 내 푸리에 묘사자를 이용한 암세포 형태별 분류

강미선 · 이정엄 · 김혜련 · 김명희

이화여자대학교 컴퓨터공학과

Classification of Tumor cells in Phase-contrast Microscopy Image using Fourier Descriptor

Mi-Sun Kang, Jeong-Eom Lee, Hye-Ryun Kim and Myoung-Hee Kim

Dept. of Computer Science and Engineering, Ewha Womans University

(Received July 11, 2012. Accepted November 17, 2012)

Abstract: Tumor cell morphology is closely related to its migratory behaviors. An active tumor cell has a highly irregular shape, whereas a spherical cell is inactive. Thus, quantitative analysis of cell features is crucial to determine tumor malignancy or to test the efficacy of anticancer treatment. We use 3D time-lapse phase-contrast microscopy to analyze single cell morphology because it enables to observe long-term activity of living cells without photobleaching and phototoxicity, which is common in other fluorescence-labeled microscopy. Despite this advantage, there are image-level drawbacks to phase-contrast microscopy, such as local light effect and contrast interference ring. Therefore, we first corrected for non-uniform illumination artifacts and then we use intensity distribution information to detect cell boundary. In phase contrast microscopy image, cell is normally appeared as dark region surrounded by bright halo ring. Due to halo artifact is minimal around the cell body and has non-symmetric diffusion pattern, we calculate cross sectional plane which intersects center of each cell and orthogonal to first principal axis. Then, we extract dark cell region by analyzing intensity profile curve considering local bright peak as halo area. Finally, we calculated the Fourier descriptor that morphological characteristics of cell to classify tumor cells into active and inactive groups. We validated classification accuracy by comparing our findings with manually obtained results.

Key words: cell segmentation, phase-contrast microscopy image, halo artifact

169

I. 서론

일반적으로 암세포는 혈관을 통해 다른 신체 부위로 쉽게 전이되기 때문에 치료가 매우 어렵다[1]. 그래서, 암세포의

전이를 억제할 수 있는 치료 방법에 관한 연구는 매우 중요하다. 최근 현미경 영상을 기반으로 한 암세포의 전이 운동 모니터링 기술이 암 전이 억제 치료의 효과를 검증하는 방법으로 고려되고 있으며, 관련 연구들이 활발하게 진행되고 있다[2-4].

현미경 영상을 통해 암세포의 행동 패턴을 분석하기 위해서는 영상 내에서 세포 영역을 분할, 추출하는 기술이 필요하며, 분할된 세포가 활성인지 비활성인지를 구별하는 기술 또한 필요하다. 본 논문에서는 3차원 상에서 오랜 시간 살아있는 세포 관찰이 가능한 간헐 촬영 위상차 현미경(phase-contrast microscope) 영상을 사용하여 세포를 분석한다.

위상차 현미경은 물질을 통과한 빛이 물질의 굴절률의 차이에 의해 갖게 되는 위상차를 명암차로 변화시켜 관찰하는 현미경이다[5]. 위상차 현미경은 시료를 염색할 필요가 없기

Corresponding Author : Myoung-Hee Kim
Dept. of Computer Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul, Korea 120750
TEL: +82-2-3277-2307 / FAX: +82-2-3277-4409
E-mail: mhkim@ewha.ac.kr

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구이며(No. 20120001009) 지식경제부와 한국산업기술진흥원의 전략기술인력양성사업으로 수행된 연구결과입니다. 본 연구에서 사용된 3차원 위상차 현미경 U87세포주 영상 데이터는 미국 텍사스주 휴스턴 Methodist병원 연구기관의 Dr. Stephen Wong으로부터 제공 받아서 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

때문에 긴 시간 살아있는 세포의 관찰이 가능하여 세포의 행동 패턴 분석에 적합하다[6].

세포 분석에 관한 대부분의 이전 연구는 형광 현미경(fluorescent microscopy) 영상을 사용하였다[6,7]. 형광 현미경 영상은 형광으로 염색한 부위의 밝기값과 주변 배경의 밝기값 차이가 크게 나타나기 때문에 간단한 방법으로 세포 영역과 배경 영역을 분할할 수 있다. 하지만 형광 염색 과정에서 광독성(phototoxicity)과 광퇴색(photobleaching) 문제가 나타날 수 있어 살아있는 세포의 움직임을 관찰하기에는 무리가 있다. 또한 다중 광자(multi-photon)를 이용한 공초점(confocal) 현미경 영상도 3차원상의 세포 영역을 추출하고 영역의 변화를 추적하기 위해 사용되었다. 이 방법은 레이저를 이용하여 형광 염색된 시료의 단면 및 3차원 영상을 얻을 수 있지만, 형광 염색 과정을 거치기 때문에 살아있는 세포를 장시간 동안 관찰하는데 한계가 있다.

암세포의 형태는 물리적인 특성뿐만 아니라 행동 특성도 포함하기 때문에 본 논문에서는 교모세포종 세포주인 U87 세포의 형태를 관찰한다. 본 연구에서 사용한 U87세포는 활성상태일 경우 비정형적인 형태를, 비활성상태일 경우 둥근 형태를 띤다[12]. 이런 세포의 형태를 분석하기 위하여 본 논문에서는 위상차 현미경의 3차원 영상 내 나타나는 후광 효과를 이용하여 볼륨 영상에서 효과적으로 개별 세포를 추출하는 방법을 제안하고, 푸리에 묘사자를 특징점으로 SVM(Support Vector Machine) 분류기를 이용하여 학습을 통해 U87 세포가 활성인지 비활성인지를 자동적으로 구분하는 방법을 기술한다.

본 논문의 구성은 다음과 같다. 2장에서는 본 논문에서 제안하는 U87 세포의 활성/비활성 분류 방법을 자세히 설명한다. 먼저 3차원 위상차 현미경 영상에서 주로 나타나는 불균일 조명 문제를 보정하는 영상 전처리 방법을 서술한다. 전처리된 3차원 영상에서 개별 세포별로 초점이 잘 맞는 단면을 획득하고 후광 현상(halo effect) 패턴을 분석하여 각 세포의 영역을 분할하는 방법을 제안한다. 분할된 세포의 단면을 푸리에 묘사자로 나타내고, 이것을 SVM 분류기를 이용해 분류한다. 3장에서는 제안한 방법을 이용하여 실험한 결과를 보여주고, 4장에서는 결론 및 향후 연구 방향을 기술한다.

II. 방 법

그림 1은 본 논문에서 제안하는 방법의 순서도이다. 위상차 현미경은 시료의 매질 자체 속성, 빛 흡수율, 광경로 등의 차이로 인하여 영상의 밝기가 균일하지 못하기 때문에 이를 보정해주는 전처리를 수행한다. 그 다음 최소 문턱치

(minimum threshold) 알고리즘을 이용하여 세포의 초기 위치를 탐지하고 그 중심을 지나는 주축의 단면을 획득한 후 후광 현상(halo artifact)을 고려한 문턱치 알고리즘으로 세포를 배경으로부터 분할한다. 분할된 각 개별 세포의 단면 영상을 푸리에 묘사자로 나타내고, 이것을 SVM 분류기의 입력 특징 벡터로 사용한다.

그림 1. 순서도
Fig. 1. Flowchart of the proposed system

1. 불균일 조명 보정

위상차 현미경은 물질을 통과한 빛이 물질의 굴절률 차이에 의해 발생하는 위상차(phase shift)의 정도를 영상 밝기의 정도로 바꾸어 관찰하는 현미경이다. 시료를 염색하지 않고도 고해상도의 영상을 얻는 것이 가능하여 살아 있는 세포를 관찰할 수 있지만 영상 밝기의 불균일성 때문에 세포 영상의 정보를 정량적으로 분석하고자 할 때에는 좋은 성능을 기대하기 어려워진다. 이것을 보정하는 작업은 세포 영상의 정확한 분석을 위해 필수적인 과정으로, 본 논문에서는 히스토그램 기반의 불균일 조명 보정 방법[13]을 이용한다.

히스토그램 기반의 불균일 조명 보정 방법은 과잉 개선(over-enhancing)을 방지하기 위해 비용함수(cost function)를 정의하고 이를 최소화하는 Modification Framework-Histogram Smoothing (MF-HS) 방법[14]을 기반으로 지역적 변환함수 보간 기법[15]을 적용하여 블록화 현상(blocking artifact)을 최소화하면서 지역적 특성을 반영하도록 제안된 방법이다[13]. 이 방법은 실시간으로 적용이

가능하기 때문에 본 논문에서와 같이 데이터의 양이 방대한 3차원 영상을 처리하는 데 적합하다.

그림 2는 히스토그램 기반의 불균일 조명 보정 방법을 적용하기 전과 적용한 후의 영상이다. 원영상에 나타나는 불균일 조명 문제가 해결되고, 명암 대비가 향상되어 영상이 개선됨을 확인할 수 있다.

2. 세포 분할을 위한 볼륨 영상 데이터에서의 세포 위치 탐지

볼륨 영상에서 각각의 세포를 분할하기 위해 최소 문턱치 알고리즘을 적용하여 세포 영역을 배경으로부터 분리한다. 최소 문턱치 알고리즘은 영상의 히스토그램이 쌍봉 분포(bimodal)를 갖는다고 가정하는데, 본 논문에서 사용된 영상은 어둡게 나타나는 세포 영역과 후광현상으로 인하여 밝게 나타나는 세포 주변 영역이 존재하여 최소 문턱치 알고리즘이 적용되기에 적합하다.

본 논문에서는 볼륨 영상의 각 층(2D 영상)에서 문턱치 값을 정한 후 이들의 평균값을 새로운 문턱치 값으로 설정하여 볼륨 영상 전체에 일괄적으로 적용한다. 그림 3은 그 결과 영상을 보여준다.

그림 2. 불균일 조명 보정 필터 적용 결과. (a) 원영상, (b) 불균일 조명 보정 결과

Fig. 2. Contrast-enhancement result sample. (a) Original image, (b) Image after MF-HS-based HE (histogram equalization)

그림 3. 불균일 조명 보정 영상에 최소 문턱치 알고리즘 적용 결과
Fig. 3. Binary images after minimum threshold algorithm

3. 주성분분석 이용 단면 획득

II.2의 결과를 각 세포 영역으로 간주하고, 일정 크기의 볼륨 데이터를 추출한다. 그림 4에서 보는 바와 같이 후광 현상은 3차원 영상에서 Z축 면에 대해 비대칭적 확산 패턴을 갖는다. 본 논문에서는 각 세포의 형태를 관찰하기 위해 현미경의 초점이 잘 맞는 세포의 단면을 얻고자 한다. 이를 위해 주성분 분석(principal component analysis)[17]을 사용하여 세포의 중심을 지나는 첫 번째 주축(the first principal component)을 구한 후 이 주축에 직교하는 단면을 이용한다[7].

그림 4. 3차원상 축에 따른 세포 출현 상관관계. (a) 수평면, (b) 수직면
Fig. 4. 3D cell appearance correlation. (a) Horizontal slice, (b) Vertical slice

그림 5. 초기 개별 세포 영역 샘플. (a) 초기 개별 세포 영역 3차원 가시화, (b) 세포영역의 무게중심을 지나는 주축에 수직인 단면 표시, (c) 샘플 영상의 단면 이미지
Fig. 5. Initial region sample (a) Initial region of one cell, (b) The cross-section is orthogonal to the first principle axis, which passes through the center of mass. (c) Cross-sectional image of sample

주성분 분석은 데이터 분석에 널리 이용되는 방법 중 하나로, 분산을 최대로 하는 방향을 좌표축으로 하는 새로운 좌

표계로 데이터를 선형 변환한다. 즉, p 차원의 벡터들로 구성된 데이터 집합 $\mathbf{x}$ 가 주어졌을 때, 유한한 $p \times p$ 공분산행렬 $\mathbf{V}[\mathbf{x}] = \Sigma$ 를 이용하여 식 (1)에서와 같이 주성분을 구한다[18].

$$\begin{aligned} a_1 &= \arg \max_{a \in \{1, \dots, p\}} \mathbf{V}[\mathbf{a}'\mathbf{x}] \\ a_k &= \arg \max_{\substack{a \in \{1, \dots, p\} \\ a \perp a_1, \dots, a_{k-1}}} \mathbf{V}[\mathbf{a}'\mathbf{x}] \end{aligned} \quad (1)$$

첫 번째 주축(the first principal component)은 데이터를 한 개의 축으로 사상시켰을 때 그 분산이 가장 커지는 축으로 본 논문에서는 세포의 기울어짐을 추정하는 데 사용하며, 이 축에 수직인 단면으로부터 세포를 분할하여 세포의 형태 정보를 획득한다[19,20]. 그림 5은 초기 개별 세포 영역 영상 데이터에서 얻은 첫 번째 주축에 수직인 단면을 보여준다.

그림 6. 추출한 단면 영상에서 밝기값 분포와 밝기값 기울기의 상관관계. (a) 추출한 단면 영상 샘플, (b) 단면 영상에서 밝기값 분포에 따른 문턱치 임계값 범위 (위), 단면 영상에서 밝기값 기울기 분포 (아래)
Fig. 6. Relationship between the intensity profile of a cell image and Intensity gradient. Cell image sample (b) Threshold range in the intensity profile at cross-section (top), Intensity gradient at cross-section (bottom)

4. 단면 영상에서의 세포 영역 분할

II.3로부터 획득한 단면 영상에서 세포 영역만을 분할해 내기 위해 후광 현상(halo artifact)을 고려한 문턱치 알고리즘을 적용한다. 후광 현상은 어두운 세포 영역 주위로 밝은 영역이 나타나는 현상이다. 그림 6에 나타낸 바와 같이, 본 논문에서는 이 현상의 패턴을 분석하기 위하여 세포의 중심을 지나는 직선에서의 밝기값 분포와 밝기값 기울기 분포를 함께 관찰한다. 밝기값이 급격히 변하는 지점 즉, 기울

기가 가장 크게 나타나는 2개의 정점(peak)을 영상 중심으로 부터 양방향으로 한 개씩 찾는다. 이 정점 값들은 세포와 배경의 경계에 나타나는 후광현상을 관찰할 수 있는 지점으로 이들의 평균값을 문턱치 알고리즘의 임계값으로 결정하여 세포와 배경 영역을 분할한다[3,4].

5. 개별 세포의 형태 정보 추출

푸리에 묘사자(fourier descriptor)는 패턴 인식이나 이미지 분석 등에 널리 쓰이는 방법으로써 영상 내 분류 대상이 되는 세포의 방향성과 크기 및 위치에 무관하게 고유한 형태 특성을 나타낸다[21]. 본 논문에서는 이 푸리에 묘사자를 각 세포의 형태 정보를 나타내는 특징 벡터로 사용한다.

푸리에 묘사자를 추출하기 위해서는 그림 7과 같이 앞서 획득한 단면 영상 내 세포의 윤곽선(contour)을 4 이웃 연결성을 유지하여 1 픽셀 너비로 획득한다. 그리고 획득된 영역에 대한 중심점을 구하고 중심점으로부터 영역의 경계 각 픽셀까지의 거리함수를 구한다. 그 후 푸리에 변환(fourier transform)을 이용하여 공간 도메인에서 표현된 대상 세포의 윤곽선 거리함수를 주파수 도메인으로 변환한다. 변환된 주파수 공간에서의 표현은 세포 영역의 중심점으로부터의 거리를 사용하기 때문에 이동에 대해 무관한 성격을 띄게 되고 방향 정보를 나타내는 위상(phase) 성분은 제외하고 크기(amplitude) 성분만 취하여 분할된 세포 영역의 방향성에 무관한 형태 정보 추출이 가능하다. 또한 크기 성분에서 DC성분을 제거하여 분류 대상의 상대적 크기에 영향을 받지 않는 형태학적으로 분류가 가능한 형상 표현을 얻는다[22]. 이렇게 만들어진 푸리에 묘사자는 저주파 성분은 영역의 전체 형태를 결정하고, 고주파 성분은 상세한 형태를 나타내기 때문에 동심원 함수(concentric function)를 이용하여 고주파 성분과 저주파 성분을 구분하여 최종 세포 형상 표현을 생성한다. 이렇게 계산된 푸리에 묘사자를 세포 형태 분류를 위한 특징 벡터로 사용한다.

그림 7. 푸리에 묘사자 획득을 위한 세포 영역 경계 검출 (a) 원영상, (b) 이진 영상, (c) 경계 영상

Fig. 7. Boundary image extraction process. Cross-sectional image of sample, (b) binary image, (c) boundary image

6. 형태에 따른 개별 세포 분류

각 개별 세포의 단면 영상으로부터 추출한 푸리에 묘사자

를 특징 벡터로 이용하여 세포 형태를 구형(비활성)과 비정형(활성) 세포로 분류하고자 한다. 이를 위해 본 논문에서는 적은 샘플 개수에서도 과잉적합(over-fitting) 문제에 강인하고, 정확한 이진 분류 성능을 제공하는 SVM (Support Vector Machine)을 사용한다[23].

SVM을 학습시키기 위한 학습 데이터 집합은 활성/비활성 세포 각 15개로 구성되었다. 표 1은 학습 데이터로 사용한 단면영상 샘플이다. 본 논문에서는 공개 SVM 도구인 LibSVM [24]을 이용하였다.

표 1. 학습 데이터로 사용한 단면 영상 샘플
Table 1. Training cross-sectional image samples

Sample#	Sample1	Sample2	Sample3	Sample4
Shape				
Spherical cells				
Irregular-shaped cells				

III. 실험 및 결과

본 논문에서는 Matrigel을 이용하여 3차원 상에서 배양한 다형성교아종(glioblastoma multiforme)의 특성을 갖는 U87 세포주를 대상으로 실험을 실시하였다. 세포 이미지는 간헐촬영(time lapse) 3차원 위상차 현미경을 이용하여 획득하였고(0, 11, 25 시간에 각각 촬영), 현미경 배율은 10×이며 획득된 영상의 크기는 각 시간 별로 1280×1024×110이다. 하지만 본 논문에서는 256×256×110으로 나누어 처리하였다. 영상 처리 과정에서 개발된 툴은 세포 영상 전처리 과정에서는 MATLAB 언어를 기반으로 필터를 구현하였고 세포 추출 과정에서는 윈도우 기반 C++언어를 사용하였다.

본 장에서는 2장에서 설명한 방법들을 U87 세포의 3차원 위상차 현미경 영상에 적용한 결과를 기술하고자 한다. 표 2는 초기 개별 세포 영역에서 주축을 추출한 후 주축에 수직인 무게중심을 지나는 단면과 동일한 무게중심을 지나는 수평면, 그리고 수직면에서 후광효과를 분석한 후 얻어진 임계값을 적용하여 분할한 결과를 비교하였다. 이 결과를 통해 주성분분석을 이용하여 획득한 단면에서의 분할 결과가 수평면과 수직면에서 분할한 결과보다 후광현상 관찰이 용이하며 세포의 경계가 또렷하게 나타나서 향상된 세포 추출 결과를 확인 할 수 있었다.

볼륨 영상에서 추출한 각각의 세포 영상을 푸리에 묘사자와 학습된 SVM을 이용하여 분류한 결과는 그림 8에 나타

표 2. 문턱치 알고리즘 이용 분할 결과 비교. MF-HS 기반 히스토그램 평활화 영상 (위), 문턱치 알고리즘 적용 결과 (아래)

Table 2. Comparison of threshold segmentation results. Gray-level images after MF-HS-based HE (top) and binary images after thresholding (bottom)

	Cross-sectional slice	Horizontal slice	Vertical slice
Sample 1
Sample 2
Sample 3

내었다. 그림 8을 통해 3차원 위상차 현미경 영상으로부터 추출한 개별 세포의 위치와 함께 각각의 세포가 활성 세포인지 비활성 세포인지를 파악할 수 있다.

본 실험에서는 분류된 결과의 정확도를 확인하기 위해 수동으로 분류한 결과와 비교하였으며, 그 결과 75.97%의 정확도를 보였다. 이것은 참고문헌 3과 4에서 제안한 방법을 적용하였을 때보다 약 15% 정도 향상된 결과이다. 참고문헌 3과 4에서는 분할된 세포 영역의 원형률과 크기만을 형태 정보로 추출하여 분류기의 입력 특징 벡터로 사용하였다. 이 방법은 약 60%의 분류 정확도를 보였다. 본 논문에서 제안한 방법이 더 좋은 성능을 보임을 확인할 수 있었다. 표 3에 이 결과들을 정리하였다. 또한 본 논문에서 제안한 분류 방법의 민감도와 특이도 판단 경계를 변화시키며 계산한 후 도식화하여 그림 9와 같은 수신자 판단특성곡선(ROC 곡선)을 나타내었다. 이러한 수신자 판단특성곡선 분석을 통해

(a) 0hour

(b) 11hours

(c) 25hours

그림 8. SVM 이용 분류 결과. ○:구형세포; *:비정형 세포, (a) 0hour (○: 24, *: 52), (b) 11hours (○: 15, *: 45), 25hours (○: 16, *: 73)
Fig. 8. SVM-based classification result. Blue circles represent spherical cells; red stars represent irregular-shaped cells. (a) 0hour (○: 24, *: 52), (b) 11hours (○: 15, *: 45), 25hours (○: 16, *: 73)

0.7711의 AUC (Area Under the ROC Curve)를 산출하였다. 절단점을 3으로 하였을 때 민감도 69.8%, 특이도 74.4%였다.

표 3. Feature의 종류에 따른 분류 정확도

Table 3. Classification accuracy through feature selection

Time	Feature	Cell size and roundness	Fourier descriptor
0hour		59.45%	73.68%
11hours		62.27%	73.33%
25hours		58.85%	80.90%

그림 9. U87 암세포 형태별 분류 모델에 대한 ROC 곡선

Fig. 9. The Receiver Operating Characteristic (ROC) curve. ROC curve analysis on classifying active tumor cells in phase-contrast microscopy image

IV. 결 론

간헐 촬영 위상차 현미경은 세포 관찰을 위해 염색이나 고정 등의 작업이 필요치 않기 때문에 살아있는 세포의 변화를 오랜 시간 관찰할 수 있는 장점을 가지고 있지만 영상 전반적으로 나타나는 불균일 조명 문제와 세포 영역을 중심으로 Z축 면에서 비대칭적 확산 패턴을 가지는 후광 현상으로 인하여 초점이 맞지 않아 세포 분할 및 분류에 어려움이 있다. 본 논문에서는 이러한 문제를 극복할 수 있는 일련의 방법들을 제안하였다. 3차원 위상차 현미경 영상에 히스토그램 평활화 기반 방법을 적용하여 현미경 영상에 불균일 조명에 의해 전반적으로 나타나는 밝기 차이를 보정하였다. 보정된 영상에 최소 문턱치 알고리즘을 적용하여 초기 세포 영역을 탐지하였다. 그리고 주성분 분석을 이용하여 초기 개별 세포에서 초점이 잘 맞고 후광현상 분석이 용이한 단면을 각각 획득하여 세포의 형태를 효과적으로 관찰할 수 있도록 하였다. 또한 각 단면에서 분할된 세포 영역의 푸리에 묘사자를 형태정보로 추출하여 형태에 따른 활성 (비정

형) / 비활성 (구형) 세포를 학습을 통해 자동으로 분류하는 방법을 제시하였다.

향후 연구 과제로는 본 논문에서 제시한 분류 결과를 생물학 전문가가 검증하는 과정을 거칠 것이다. 이를 통하여 본 논문에서 제안한 방법을 적용한 분류 결과가 생물학적 기준에 따른 분류 결과와 비교하여 어느 정도의 오차를 갖는지 평가할 것이다. 또한 본 논문에서는 위상차 영상의 크기가 커서 $256 \times 256 \times 110$ 으로 나누어서 실험을 실시하였으나, 향후에는 GPU (Graphics Processing Unit)를 이용하여 $1280 \times 1024 \times 110$ 크기의 원영상을 그대로 이용하면서 처리 속도를 개선할 수 있는 방법에 대해 연구를 수행할 것이다.

References

- [1] S. Wadler, H. Zhang, M. Cammer, and X.P. Hu, "Quantification of Ribonucleotide Reductase Expression in Wild-Type and Hydroxyurea-Resistant Cell Lines Employing in Situ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction and a Computerized Image Analysis System," *Anal. Biochem.*, vol. 267, No. 1, pp. 24-29, 1999.
- [2] Y. Hamamoto, S. Uchimura and S. Tomita, "On the behavior of artificial neural network classifiers in high-dimensional spaces," *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 18, no. 5, pp. 571-575, 1996.
- [3] M.S. Kang, S. M. Song, H.A. Lee and M.H. Kim, "Cell morphology classification in phase contrast microscopy image reducing halo artifact," in *Proc. SPIE Photonics West*, San Francisco, USA, Jan. 2012.
- [4] M.S. Kang, S. M. Song, H.A. Lee and M.H. Kim, "Quantitative tracking of tumor cells in phase contrast microscopy exploiting halo artifact pattern," in *Proc. SPIE Medical Imaging*, San Diego, USA, Feb. 2012.
- [5] F. Zernike, *Physica*, 9, 1942, p.686
- [6] K. Li, M. Chen, T. Kanade, E. D. Miller, L. E. Weiss, and P. G. Campbell, "Cell population tracking and lineage construction with spatiotemporal context," *Med. Image Anal.*, vol. 12, no. 5, pp. 546-566, 2008.
- [7] I. Adanja, O. Debeir, V. Megalizzi, R. Kiss, N. Warzee, and C. Decaestecker, "Automated tracking of unmarked cells migrating in three-dimensional matrices applied to anti-cancer drug screening," *Expl. Cell Res.*, vol. 316, pp. 181-193, 2010.
- [8] J. Pan, T. Kanade, and M. Chen, "Learning to detect different types of cells under phase contrast microscopy," in *Proc. Microscopic Image Analysis with Applications in Biology (MIAAB)*, Bethesda, USA, Sep. 2009.
- [9] M. Magg, "Tracking cells in phase contrast light microscopic images", *Diploma Theses*, 2010.
- [10] J. Orikawa, and T. Tanaka, "Cell segmentation from phase-contrast images using hybrid watershed and region growing algorithm for genomic drug discovery," *SICE Annual Conference*, 2010.
- [11] S. Hadjidemetriou, B. Gabrielli, T. Pike, F. Stevens, K. Mele, and P. Vallotton, "Detection and tracking of cell divisions in

- phase contrast video microscopy,” in *Proc. Microscopic Image Analysis with Applications in Biology (MIAAB)*, New York, USA, Sep. 2008.
- [12] C. Decaestecker, O. Debeir, P. Van Ham, and R. Kiss, “Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration,” *Med Res Rev*, vol. 27, no. 2, pp. 149-176, 2007.
- [13] H. Lee, J.S. Kim, J.T. Kim, and M.H. Kim, “Histogram based Correction of Non-uniform Illumination on Phase-Contrast Microscopy,” in *Proc. Workshop on Image Processing and Image Understanding (IPIU)*, Jeju, Korea, Feb. 2010, pp. 347-348.
- [14] T. Arici, S. Dikbas, and Y. Altunbasak, “A histogram modification framework and its application for image contrast enhancement,” *IEEE Trans. Image Process*, vol. 18, no. 9, pp. 1921-1935, 2009.
- [15] Z. Chen, B. R. Abidi, D. L. Page, M. A. Abidi, “Gray-Level Grouping (GLG): An Automatic Method for Optimized Image Contrast Enhancement-Part I : The Basic Method,” *IEEE Tran. on Image Processing*, vol. 15, no. 8, pp. 2290-2302, 2006.
- [16] L.I. Smith, “A tutorial on Principal Components Analysis,” 2002.
- [17] J. Shlens, “A tutorial on principal component analysis,” 2005.
- [18] S. Kolenikov and G. Angeles. “The Use of Discrete Data in PCA: Theory, Simulations, and Applications to Socioeconomic Indices,” Technical Report, Carolina Population Center, University of North Carolina at Chapel Hill, 2004.
- [19] H.J. Choi and H.K. Choi, “Grading of renal cell carcinoma by 3D morphological analysis of cell nuclei,” *Comp. in Bio. and Med.*, vol. 37, no. 9, pp. 1334-1341, 2007.
- [20] Y. Watanabe, “A method for volume estimation by using vector areas and centroids of serial cross sections,” *IEEE Trans. on Bio-Medical Engineering*, vol. 29, no. 3, pp. 202-205, 1982.
- [21] N.M Tahir, A. Hussain, M.M. Mustafa, S.A. Samad and H.Husin, “Fourier Descriptor for Pedestrian Shape Recognition using Support Vector Machine,” in *Proc. 7th IEEE International Symposium on Signal Processing and Information*, 2007.
- [22] M. Kazhdan, “An approximate and efficient method for optimal rotation alignment of 3D models,” *IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 29, no. 7, pp. 1221-1229, 2007.
- [23] V.N. Vapnik, *The Nature of Statistical Learning Theory*, Springer, 1995.
- [24] C.-C. Chang and C.-J. Lin, LIBSVM: a library for support vector machines, Software available at <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm>, 2001.