

Image Analysis Software를 이용한 변형적혈구 측정법 개발

Development of a Poikilocyte Measuring Method Using Image Analysis Software

최종문 · 이웅수

Jong-Moon Choi, M.D., Woong-Soo Lee, M.D.

한양대학교병원 진단검사의학과

Department of Laboratory Medicine, Hanyang University Hospital, Seoul, Korea

Background: To achieve consistency in poikilocytes grading in peripheral blood cell examinations, we made an image-based differential count (IDC) software to measure the degree of abnormalities in individual red blood cells (RBCs) and relative fractions of poikilocytes.

Methods: Thirty peripheral blood samples were analyzed. Smear slides were examined on a microscope with charge-coupled device (CCD) camera. To verify this program, we compared the IDC results with the results of manual differential counting (MDC). Relative fractions of schistocytes, echinocytes, and elliptocytes were measured by IDC and MDC. The error rate of IDC was measured by confirming the final processed images of IDC. Correlations of IDC and MDC results were compared using linear regression analysis and the time required for each test was measured. For presentation of the mathematical decision criteria of poikilocytes, IDC algorithms for recognizing schistocytes, echinocytes, and elliptocytes were made using simple geometrical or mathematical formulas.

Results: The error rate of IDC was 2.8%. For analysis of 1,000 RBCs, MDC took 7.3 minutes and IDC took 2.7 minutes. Linear regression coefficients were 0.776 ($P < 0.001$) for schistocytes, 0.895 ($P < 0.001$) for echinocytes, and 1.001 ($P < 0.001$) for elliptocytes.

Conclusions: It was possible to define poikilocytes with geometrical or mathematical formulas using image analysis programs. The IDC program would be helpful for consistent grading of poikilocytes.

Key Words: RBC, Image analysis program, Peripheral blood smear, Poikilocytes, Schistocytes, Echinocytes, Elliptocytes

서 론

말초혈액도말검사는 말초혈액 내에 존재하는 혈구의 숫자 및 형태학적 특성 등을 파악하여 각종 임상질환의 감별진단에 필요한 기초적인 정보를 얻기 위해 사용된다. 특히 적혈구 세포의 형태학적 특성을 관찰함으로써 빈혈, 유전타원적혈구증, 파종혈관내응고(disseminated intravascular coagulation) 등의 감별진단에 필요한 정보를 얻을 수 있다[1].

Corresponding author: Woong-Soo Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Hanyang University Hospital,
222 Wangsimri-ro, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea
Tel: +82-2-2290-8976, Fax: +82-2-2298-1735, E-mail: wslee@hanyang.ac.kr

Received: July 3, 2012

Revision received: September 13, 2012

Accepted: September 27, 2012

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2013, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

혈구의 형태학적 분석은 세포의 크기, 염색 양상 및 형태학적 특성을 관찰하여 기술하며 일반적으로 이상이 있는 혈구는 세포 각각의 형태학적 이상의 정도나 이상혈구의 비율, 혹은 두 가지를 모두 고려하여 slight, moderate, marked나 1+, 2+, 3+, 4+와 같은 등급 시스템(grading system)을 사용하여 보고한다[2, 3]. 일관성 있고 적절한 등급을 보고하기 위해서는 숙련된 검사자가 형태학적 특성에 대한 주관적 소견과 객관적인 정보를 종합하여 분석할 필요가 있다. Gulati는 변형적혈구를 포함한 이상혈구의 일관성 있는 등급 판정을 위하여 이상 혈구의 등급과 그에 상응하는 이상혈구의 비율을 수치로 제시하였으며 세포 각각의 이상 정도를 등급에 반영하는 것이 가능하도록 현미경으로 촬영한 사진을 등급별로 나누어 제시하였다[3].

변형적혈구의 비율을 보다 정확히 측정하기 위해서는 수기법으로 변형적혈구를 감별계산(manual differential counting)하는 과정이 필요하다. 수기법은 형태학적 등급 판정을 위한 객관적인 정보를 제공할 수 있으나 전문화된 인력이 필요하고 많은 검사실 인력이 소모되며[4] 관찰한 세포수가 적은 경우 검사 결과를 신뢰할 수 없으므로[5] 감별계산을 변형적혈구의 등급 판정을 위해 시행

하는 것은 비현실적이다. 혈구 각각의 형태학적 이상 정도를 관찰하여 등급을 정하는 방법은 검사자가 일관된 기준을 유지하기 위해 많은 노력이 필요하다. 형태학적 특성을 글로 표현하거나 한정된 사진 정보만으로 형태학적 이상 정도를 규정하고 검사자 간 판정 기준을 일치시키는 것은 현실적으로 어려운 점이 많다. 변형적혈구 등급 판정과 관련된 문제의 근본적인 해결 방법으로 구체적 수치에 입각한 변형적혈구 판정의 기준이 필요하나 아직까지 변형적혈구 판정을 위한 보편적인 기준이 없는 실정이다. 임상에서 흔히 관찰되는 톱니적혈구(echinocyte), 타원적혈구(elliptocyte), 분열적혈구(schistocyte)의 경우 적혈구의 변형 정도가 검체별로 편차가 크고 동일한 슬라이드 내에서도 적혈구마다 변형 정도가 다양해 판독자의 기준에 영향을 많이 받는다. 특히 분열적혈구의 경우 혈전혈소판감소자색반병(thrombotic thrombocytopenic purpura), 용혈요독증후군(hemolytic uremic syndrome) 등 빠른 진단이 요구되는 질환과 관련이 있어 검사의 중요도가 높다.

본 검사실에서는 영상 분석 기술이 변형적혈구의 등급 측정과 관련된 문제에 도움이 될 수 있는지 확인하기 위해 광학현미경에 장착된 color charge coupled device (CCD) 카메라와 자체 제작한 영상 분석 소프트웨어(image based differential counting)를 이용해 말초혈액도말슬라이드 상에서 관찰되는 변형적혈구 비율을 측정하였으며 검사 결과를 바탕으로 영상측정법의 정확도를 평가하였다.

대상 및 방법

1. 대상

본원 진단검사의학과에 의뢰된 말초혈액도말검사 중 변형적혈구가 관찰된 환자를 대상으로 본 연구를 시행하였다. 2012년 2월부터 5월까지 의뢰된 말초혈액도말 검사 중 분열적혈구, 톱니적혈구, 타원적혈구 중 한 종류 이상의 변형적혈구가 관찰된 환자 30명을 무작위로 추출하였으며 다른 종류의 변형적혈구가 다수 존재하거나 말라리아가 동반된 환자의 경우 본 실험에서 제외하였다.

2. 말초혈액도말슬라이드의 제작 및 변형적혈구 측정

환자의 혈액을 EDTA가 들어 있는 채혈관(Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)에 채혈한 후 1시간 이내에 슬라이드에 얇게 도말하였다. 도말한 슬라이드를 건조시킨 후 자동슬라이드염색기(Hemastainer, Geometric Data, Wayne, USA)를 이용하여 Wright 염색을 시행하였다.

염색된 슬라이드를 건조시킨 후 광학현미경(Zeiss Axio Scope A1, Carl Zeiss Inc, Thornwood, USA)을 이용하여 관찰하였다. 슬라이드의 가장자리로부터 최대한 떨어져 있으면서 적혈구가 가급

적 겹쳐지지 않는 부분을 200배 시야에서 찾은 후 400배 시야에서 CCD 카메라(DeltaPix Infinity X-32, DeltaPix Aps, Maalov, Denmark)를 이용해 영상을 촬영하였다. 촬영한 영상은 Bitmap image 파일 형태로 컴퓨터 하드디스크에 저장하였으며 촬영 해상도는 3,200×2,400화소로 선택하였다.

수기법을 통한 변형적혈구 측정을 영상측정법과 동일한 지점에서 시행하기 위하여 슬라이드를 이동시키지 않은 상태에서 유침배울(1,000배, oil immersion)로 배울을 변경하였다. 유침배울 내에 관찰 가능한 적혈구를 모두 수기로 측정한 후 다른 측정 지점으로 이동하여 관찰하였으며 총 1,000개 이상의 적혈구를 측정할 때까지 촬영 및 수기 측정을 반복 시행하였다.

수기법은 변형적혈구 중 분열적혈구, 톱니적혈구, 타원적혈구에 대해서 시행하였고 표적적혈구(target cell), 입모양적혈구(stomatocyte), 눈물방울적혈구(tear drop cell), 유극적혈구(acanthocyte) 등 기타 다른 종류의 변형적혈구가 관찰된 경우 이를 정상적혈구에 포함시켰다.

3. 영상 전처리 알고리즘

1) 색보정(color adjustment)

CCD 카메라에 노출된 빛의 강도 및 조리개의 열림 정도에 따라 발생할 수 있는 색조 및 밝기 차이에 의한 결과 차이를 감소시키기 위하여 색보정을 시행하였다. 사진 전체를 구성하는 화소(pixel)를 적-녹-청 채널(red-green-blue channel)로 분리한 후 채널 별로 신호강도(signal intensity)를 합하고 이를 전체 화소 수(7,680,000)로 나누는 방법으로 적색, 녹색, 청색의 평균신호강도를 계산하였다. 원본 사진 화소의 적-녹-청 채널 신호강도에 목표신호강도를 곱하고 평균 신호강도로 나누어 보정된 적-녹-청 채널 신호강도를 구하였다. 목표신호강도의 값은 적색의 경우 198, 녹색의 경우 182, 청색의 경우 228로 설정하였다. 원본 사진 화소의 적-녹-청 채널 신호강도를 보정한 적-녹-청 채널 신호강도 값으로 변환하는 방법으로 색보정을 시행하였다.

2) 배경 분리

보정된 화소의 적-녹-청 신호강도가 삼색 모두 목표신호강도(적색: 198, 녹색: 182, 청색: 228) 이상인 경우 배경 이미지의 화소로 분류하였고, 목표신호강도가 하나 이상 미달인 경우 혈구 이미지의 화소로 분류하였다.

3) 혈구 간 분리

배경으로부터 분리된 혈구들의 이미지 중 서로 붙어 있는 혈구의 이미지를 검출하기 위하여 분수령 알고리즘(watershed algorithm) [6]을 이용하여 적혈구의 외각선을 인식하게 하였다. 적혈구

간 중첩이 있는 것으로 판단되거나 영상의 가장자리에 위치한 적혈구는 변형적혈구 비율 측정 대상에서 제외하였다.

4. 변형적혈구의 형태 인식 알고리즘

구체적인 변형적혈구의 형태학적 이상 정도를 판단하는 기준을 제시하기 위해 적혈구의 영상 데이터를 수치화한 후 수학 및 기하학적 공식에 기반하여 판정하도록 프로그램을 제작하였다. 적혈구의 형태학적 소견을 아래의 수학적 방법에 따라 분석하였으며 분석 결과 측정된 톱니적혈구, 타원적혈구, 분열적혈구의 수를 전체 적혈구의 수로 나누어 전체 적혈구에 대한 변형적혈구의 비율을 계산하였다(Fig. 1).

1) 혈구의 분류 및 기본 형태 측정 방법

혈구의 면적과 길이의 단위는 화소로 하였다. 혈구의 면적은 혈구를 구성하는 화소의 수로 정의하였으며 면적이 1,500화소 이상 8,000화소 미만이면 적혈구로 정의하였다.

적혈구를 구성하는 화소의 위치를 2차원 좌표로 변형하여 가로 좌표와 세로 좌표를 구하였다. 동일한 적혈구를 구성하는 화소들의 가로 좌표 평균값을 중심점의 가로 좌표로, 세로 좌표들의 평균

값을 중심점의 세로 좌표로 정의하였다.

특정 두 점 간의 사이의 길이는 가로 좌표 간의 차를 제곱한 값과 세로 좌표 간의 차를 제곱한 값을 서로 더하고 이 값의 제곱근을 구하여 계산하였다. 적혈구의 반지름 길이는 중심점으로부터 둘레까지의 거리로 정의하였다.

적혈구를 중심점으로부터 10° 간격으로 분할하여 총 36개의 반지름 길이를 구하였다. 두 반지름 간의 각도가 180°인 두 개의 반지름의 길이를 더하는 방법으로 18개의 지름의 길이를 계산하였다. 지름의 길이가 가장 긴 것을 긴 지름, 짧은 것을 짧은 지름으로 정하였다.

2) 톱니적혈구의 수학적 판단 기준

적혈구의 중심점으로부터 반지름의 변화 양상을 측정하여 톱니적혈구의 반지름 변화 패턴과 일치하는지 여부를 확인하였다. 10° 간격으로 측정한 적혈구의 반지름의 길이가 시계 방향으로 감소 후 증가 혹은 증가 후 감소하는 패턴을 보이면서 반지름 길이가 1.2화소 이상 변하는 경우 해당 적혈구 반지름과 적혈구의 둘레가 만나는 점을 pike라고 정하였고 한 개의 적혈구 내에 pike의 수가 5개 이상인 경우 해당 적혈구를 톱니적혈구로 정하였다(Fig. 2).

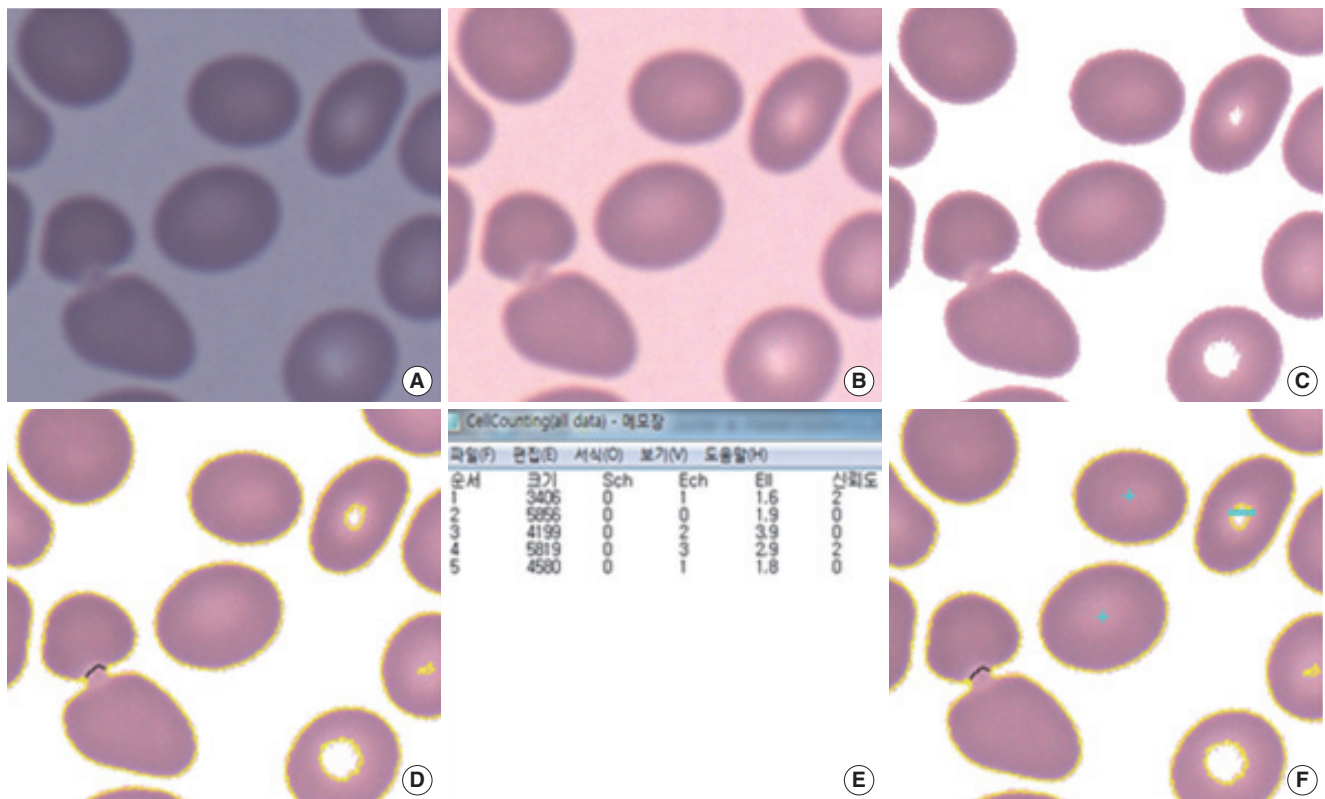


Fig. 1. The main algorithm of red cell morphology analysis (Wright stain, x400). (A) Original image of peripheral blood smear. (B) Color adjusted image. (C) Background separated image. (D) Cell boundary recognition and cell separation. (E) Morphology data collection. (F) Poikilocytes recognition.

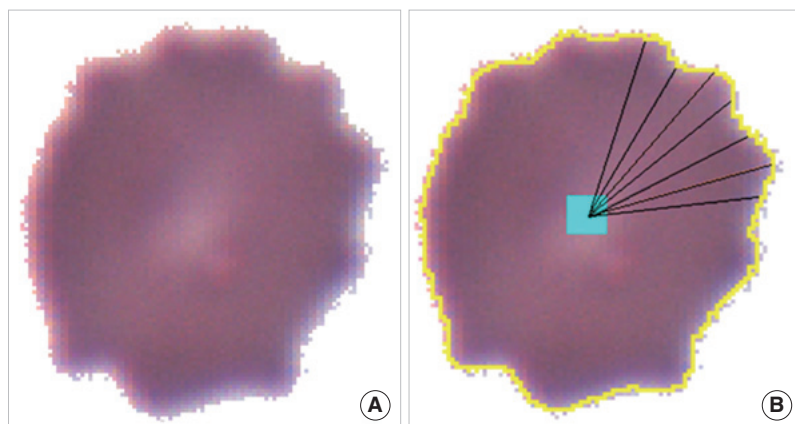


Fig. 2. The echinocyte recognizing algorithm (Wright stain, $\times 400$). (A) Background separated image. (B) Echinocyte recognition. Acute angles of AOB, BOC, COD, DOE, EOF, FOG are 10° . $c1 = \overline{BO} - \overline{CO}$. $c2 = \overline{CO} - \overline{DO}$. If $c1 \times c2$ is smaller than 0 and absolute value of $c2$ is 1.2 or more than the point C is a pike. If total number of pikes is 5 or more, then the RBC is recognized as an echinocyte.

3) 타원적혈구의 수학적 판단 기준

타원적혈구를 평가하기 위해 측정된 긴 지름과 짧은 지름의 길이 비율을 측정하였다. 긴 지름을 짧은 지름으로 나눈 값이 3.5를 초과한 경우 타원적혈구로 정하였다.

4) 분열적혈구의 수학적 판단 기준

분열적혈구를 평가하기 위하여 적혈구의 잘린 단면 및 돌출부를 검출하기 위한 기하학적 알고리즘을 고안하였다. 반지름이 12 화소인 작은 원(bead)을 그 중심점이 화면 전체의 모든 좌표를 지나가도록 사진의 가장 좌상측 화소($x=0, y=0$)로부터 한 화소씩 좌에서 우로 이동시켰으며 우측 끝에 도달하면 한 화소 아래 가장 좌측지점에서 다시 우로 이동시켰다. 작은 원의 중심이 사진의 가장 우하측 화소($x=3,200, y=2,400$)에 도달할 때까지 위의 과정을 반복하였다.

한 화소를 이동할 때마다 해당 위치의 작은 원을 구성하는 화소 중 배경이미지에 속하는 화소가 포함되어 있는지 검사하였다. 검사한 화소 중 한 개 이상 배경 이미지의 화소가 포함되어 있는 경우 처리 과정 없이 다음 지점으로 이동하였으나 그렇지 않은 경우 해당 지점의 작은 원을 구성하는 화소 전체를 비접촉면적으로 지정하였다.

적혈구 돌출부는 적혈구에서 비접촉면적을 제외한 부분으로 하였으며 적혈구 돌출부의 화소 수를 분열적혈구 계수(schistocyte value)로 정의하였다. 분열적혈구 계수가 70 이상인 경우 분열적혈구로 판단하였다(Fig. 3).

5) 변형적혈구 판정 논리의 서열

세 종류의 변형적혈구(분열적혈구, 톱니적혈구, 타원적혈구)의 특성이 서로 혼재되어 있는 경우 다음 논리 기준에 따라 변형적혈구의 종류를 결정하였다. 적혈구가 분열적혈구 감별 알고리즘을 만족할 경우 다른 알고리즘의 결과와는 상관없이 분열적혈구로 판

정하였으며, 분열적혈구 감별 알고리즘의 판단 기준에 미달하면서 톱니적혈구 및 타원적혈구 감별 알고리즘에서 동시에 만족할 경우 타원적혈구로 판정하였다.

6) 영상측정법의 정확성 평가

변형적혈구에 대한 영상측정법의 정확성을 평가하기 위하여 다음 두 가지 방법을 사용하였다. 첫 번째로 프로그램이 인식한 적혈구를 종류별로 기호(+, 정상적혈구; X, 분열적혈구; ■, 톱니적혈구; -, 타원적혈구)를 말초혈액도말 사진의 적혈구 위에 표시하도록 프로그래밍하였고 판독자는 영상 분석 소프트웨어가 모니터에 출력한 적혈구의 이미지와 기호가 서로 일치하는지 조사하였으며 불일치한 경우 다음 정의에 따라 오류 사례를 계수하였다. 백혈구 혹은 혈소판을 적혈구로 판정한 경우는 혈구 종류의 판정 오류로 정의하였고 정상적혈구를 변형적혈구로 판정하거나 변형적혈구를 정상적혈구로 판정한 경우, 변형적혈구의 종류를 잘못 판정한 경우를 변형적혈구 판정 오류로 정의하였다. 혈구 종류의 판정 오류와 변형적혈구의 판정 오류를 합한 값을 전체 적혈구 수로 나눈 값을 오류율(error rate)로 정의하였다. 변형적혈구의 판정 오류 사례는 정상적으로 인식되었을 때의 변형적혈구 종류와 영상 분석 소프트웨어가 인식한 변형적혈구의 종류에 따라 총 12가지로 세분하였다. 분열적혈구, 톱니적혈구, 타원적혈구 이외의 변형적혈구를 정상적혈구로 인식하거나 적혈구로 계수하지 않은 경우 영상 분석 소프트웨어가 정상 작동한 것으로 간주하였고 이들을 분열적혈구나 톱니적혈구, 혹은 타원적혈구로 인식한 경우는 정상적혈구를 잘못 인식한 사례로 분류하였다.

두 번째로 영상 인식 프로그램 결과와 수기법 결과 간의 차이를 확인하기 위하여 수기법과 영상측정법 결과를 비교하고 검사 간 상관성 분석을 위해 선형회귀분석을 시행하였다. 수기법 및 영상측정법의 변형적혈구 등급은 Gulati's grading system이 제시하는 변형적혈구 비율에 따랐다[3].

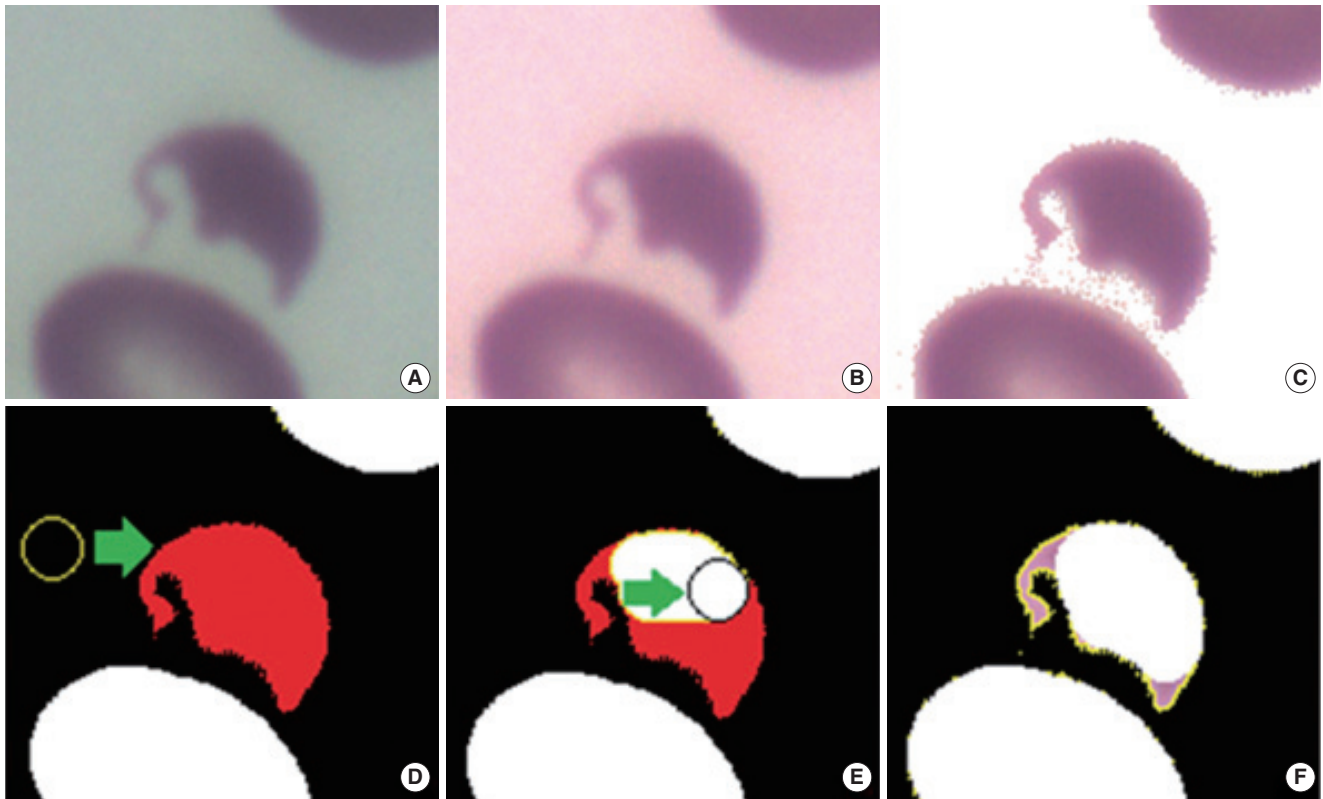


Fig. 3. The schistocyte recognizing algorithm (Wright stain, $\times 400$). (A) Original image. (B) Color adjusted image. (C) Background separated image. (D) A bead (yellow circle) is moving from left to right. (E) Pixels of a RBC (red color) were erased by the bead. (F) The remaining area of this RBC (purple color) is the schistocyte value. If schistocyte value is larger than 70, then the RBC is recognized as a schistocyte.

7) 검사시간의 비교

영상측정법에 소모된 시간은 초점 조절 및 촬영 - 영상 분석 - 변형적혈구 비율 산출까지 걸린 시간으로 정하였으며 수기법에 소모된 시간은 초점 조절 - 수기 측정 - 변형적혈구 비율의 산출 시간으로 하였다. 측정 위치 선정, 오일 세척 등에 소모된 시간은 두 측정법 모두 포함시키지 않았다.

8) 프로그램 제작 도구 및 통계 분석

영상 분석 소프트웨어는 Microsoft Visual Studio 10.0 (Microsoft, Redmond, WA, USA)을 이용하여 제작하였다. 선형회귀분석은 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 시행하였으며 $P < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

본 실험에서 조사한 말초혈액도말슬라이드의 변형적혈구의 빈도 분포는 수기법 결과 기준으로 분열적혈구는 +/-에서 4+까지, 톱니적혈구의 경우 +/-에서 3+까지, 타원적혈구의 경우 +/-에서 2+까지였다. 수기법 및 영상측정법을 통해 각각 평균 5.4시야를 관찰하

였으며 수기법을 통해 측정한 전체 적혈구 수는 평균 1,092개, 영상측정법은 평균 2,278개였으며, 적혈구 1,000개를 측정하는데 걸리는 시간으로 환산하였을 때 수기법은 평균 7분 19초, 영상측정법은 평균 2분 41초의 시간이 소모되었다. 영상 분석 프로그램 자체의 동작 시간은 사진 한 장당 평균 10초였다.

전체 촬영한 영상을 재확인한 결과 30명의 환자에서 시행한 영상측정법 검사 결과의 전체에서 10건의 혈구의 종류 판정 오류와 1,884건의 변형적혈구 판정 오류를 발견하였으며 이 두 경우를 합했을 때 영상측정법에서 인식한 전체 적혈구 수에 대한 오류율은 약 2.8% (1,894/68,341)였다. 혈구종류의 판정 오류 사례 중 9건은 거대혈소판(giant platelet)을 적혈구로 판정한 경우였고 1건은 소림프구(small lymphocytes)를 적혈구로 판정한 경우였다. 전체 1,884건의 변형적혈구의 판정 오류 중 가장 흔한 인식 오류는 정상적혈구를 톱니적혈구로 인식한 경우였으며(729건), 그 다음으로 정상적혈구를 타원적혈구로 인식한 경우(339건), 톱니적혈구를 정상적혈구로 인식한 경우(253건), 정상적혈구를 분열적혈구로 인식한 경우(248건) 순이었다. 정상적혈구를 분열적혈구로 잘못 인식한 판정 오류 중 5건은 눈물방울적혈구를 분열적혈구로 인식한 경우였고 27건은 표적적혈구와 입모양적혈구를 분열적혈구로 인식

Table 1. Recognition errors in image-based differential counting

Error type	Original cell	Recognized cell	Number	(%)
Cell type recognition	Platelet	Normal RBC	9	(90.0)
error (N = 10)	Small lymphocyte	Normal RBC	1	(10.0)
Poikilocyte type	Echinocyte	Schistocyte	81	(4.3)
recognition error	Elliptocyte	Schistocyte	45	(2.4)
(N = 1,884)	Normal RBC/other*	Schistocyte	248*	(13.2)
	Schistocyte	Echinocyte	34	(1.8)
	Elliptocyte	Echinocyte	12	(0.6)
	Normal RBC	Echinocyte	729	(38.7)
	Schistocyte	Elliptocyte	8	(0.4)
	Echinocyte	Elliptocyte	46	(2.4)
	Normal RBC	Elliptocyte	339	(18.0)
	Schistocyte	Normal RBC	77	(4.1)
	Echinocyte	Normal RBC	253	(13.4)
	Elliptocyte	Normal RBC	12	(0.6)

*This category included 32 cases of error which were originated from other types of poikilocytes (19 cases, recognized target cells as schistocytes; 8 cases, recognized stomatocytes as schistocytes; 5 cases, recognized tear drop cells as schistocytes).

한 경우였다(Table 1).

수기법을 영상측정법과 비교한 결과 30명 중 17명에서 세 종류의 변형적혈구 등급이 모두 일치하였다. 다른 13명의 환자는 1단계 이하의 등급 차이가 있었다(Table 2). 선형회귀분석을 시행한 결과 두 검사 간에 유의한 상관성이 세 가지 검사항목 모두에서 관찰되었다($P < 0.001$) (Fig. 4).

고찰

과거 ASC-1000, LARC, Hematrak, Diff3/Diff4, ADC-500 등 혈구의 형태학적 패턴 분석 장비가 혈액 내 혈구의 종류별 숫자 및 비율을 파악하기 위해 임상 검사에 도입된 바 있으나 정확성 등의 문제로 인해 널리 이용되지는 않았다[2]. 유세포분석법을 이용한 전혈구계산치(complete blood count, CBC)는 검사의 재현성이 우수하고 효율적이나 혈구의 형태학적 이상 소견에 대해서는 제한적인

Table 2. Results of manual differential counting and image-based differential counting on same ideal zones of peripheral blood smear slides

Slide number	Schistocytes				Echinocytes				Elliptocytes			
	MDC (% , grade)		IDC (% , grade)		MDC (% , grade)		IDC (% , grade)		MDC (% , grade)		IDC (% , grade)	
1	1.3	1+	0.6	+/-	0.0	+/-	0.0	+/-	9.8	1+	10.7	1+
2	2.4	1+	1.9	1+	0.0	+/-	0.2	+/-	6.7	1+	7.5	1+
3	0.4	+/-	0.6	+/-	2.4	+/-	4.6	+/-	1.9	+/-	1.7	+/-
4	1.6	1+	1.3	1+	0.0	+/-	0.6	+/-	2.9	+/-	2.8	+/-
5	0.8	+/-	0.5	+/-	1.3	+/-	1.0	+/-	3.8	+/-	2.4	+/-
6	2.1	1+	2.8	1+	2.2	+/-	1.8	+/-	5.0	+/-	6.8	1+
7	1.5	1+	1.2	1+	1.2	+/-	1.1	+/-	1.5	+/-	1.3	+/-
8	2.5	1+	3.0	2+	2.2	+/-	1.7	+/-	3.7	+/-	4.5	+/-
9	1.0	1+	1.4	1+	1.5	+/-	1.8	+/-	9.5	1+	7.9	1+
10	1.9	1+	2.0	1+	1.5	+/-	4.3	+/-	3.0	+/-	4.8	+/-
11	1.3	1+	1.9	1+	1.1	+/-	2.2	+/-	4.8	+/-	8.2	1+
12	0.6	+/-	1.1	1+	0.0	+/-	1.8	+/-	7.0	1+	7.7	1+
13	0.0	+/-	0.0	+/-	0.0	+/-	0.6	+/-	1.7	+/-	1.7	+/-
14	0.2	+/-	0.4	+/-	0.1	+/-	0.8	+/-	4.3	+/-	4.0	+/-
15	0.9	+/-	1.3	1+	50.2	3+	45.9	2+	6.2	1+	7.8	1+
16	1.7	1+	1.9	1+	18.2	1+	18.0	1+	1.1	+/-	3.3	+/-
17	1.0	1+	1.1	1+	8.2	+/-	7.0	+/-	7.2	1+	5.3	+/-
18	1.7	1+	1.8	1+	10.2	1+	11.0	1+	5.5	+/-	6.5	1+
19	0.8	+/-	0.8	+/-	3.3	+/-	3.7	+/-	2.9	+/-	2.8	+/-
20	1.5	1+	1.3	1+	0.9	+/-	0.4	+/-	5.7	+/-	6.5	1+
21	0.1	+/-	0.1	+/-	0.0	+/-	0.3	+/-	6.0	1+	5.9	+/-
22	2.4	1+	1.6	1+	2.4	+/-	2.0	+/-	4.0	+/-	3.6	+/-
23	1.8	1+	2.5	1+	33.7	2+	30.5	2+	2.7	+/-	2.0	+/-
24	1.6	1+	3.0	2+	48.1	2+	41.6	2+	4.7	+/-	4.2	+/-
25	4.8	2+	4.7	2+	2.1	+/-	3.8	+/-	6.3	1+	7.3	1+
26	0.9	+/-	1.3	1+	71.5	3+	65.4	3+	1.4	+/-	1.1	+/-
27	14.5	4+	11.3	3+	5.9	+/-	3.2	+/-	1.3	+/-	1.2	+/-
28	1.1	1+	1.0	1+	0.3	+/-	0.2	+/-	7.6	1+	7.3	1+
29	0.3	+/-	0.2	+/-	2.7	+/-	2.7	+/-	3.3	+/-	3.1	+/-
30	1.5	1+	1.5	1+	0.0	+/-	0.6	+/-	33.1	2+	33.9	2+

Schistocyte grading system: +/- ≤ 1%, 1% < 1+ ≤ 3%, 3% < 2+ ≤ 6%, 6% < 3+ ≤ 12%, 4+ > 12%. Echinocyte grading system: +/- ≤ 10%, 10% < 1+ ≤ 25%, 25% < 2+ ≤ 50%, 50% < 3+ ≤ 75%, 4+ > 75%. Elliptocyte grading system: +/- ≤ 6%, 6% < 1+ ≤ 20%, 20% < 2+ ≤ 50%, 50% < 3+ ≤ 75%, 4+ > 75%.

Abbreviations: MDC, manual differential counting; IDC, image-based differential counting.

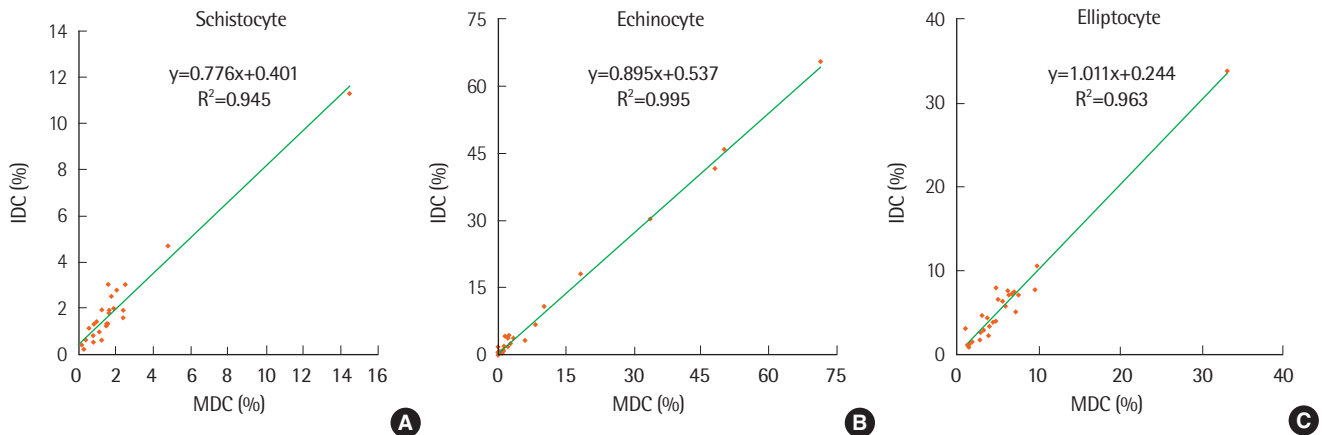


Fig. 4. Correlations of manual differential counting (MDC) and image-based differential counting (IDC) for schistocytes, echinocytes, and elliptocytes (all P -values were <0.001).

정보만 제공할 수 있다[7]. 유세포분석법을 활용한 전혈구계산치 검사 장비 중 하나인 ADVIA 120 (Bayer Health Care, Torreytown, NY)의 경우 분열적혈구의 양을 측정하는 것이 가능하나 말초혈액 도말검사를 통해 보완해야 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있다[8]. 최근 등장한 형태학적 패턴 분석을 이용한 말초혈액세포 감별계산 시스템인 CellaVision DM96 (CellaVision AB, Lund, Sweden)은 백혈구 감별 계산의 정확성이 말초혈액도말검사를 대체 가능할 정도로 높다고 알려져 있으나 변형적혈구 분석의 경우 자동 분석 시스템은 갖추어지지 않아 판독자가 직접 육안으로 시행해야 하는 문제점이 있다[7].

본 연구에서는 자체 제작한 변형적혈구 영상 분석 프로그램을 이용하여 변형적혈구의 비율을 측정하였고 비교적 정확한 결과를 구할 수 있었다. 일부 변형적혈구를 잘못 판정한 사례도 있었으나 그 중 상당수는 원본 이미지의 촬영 상태와 연관이 있었다. 변형적혈구 종류의 판정 오류 사례 중 정상적혈구를 분열적혈구로 분류한 사례(248건)와 톱니적혈구로 분류한 사례(729건)의 경우 원본 이미지의 낮은 명도로 인해 발생한 경우가 대부분이었다. 명도가 낮은 이미지는 배경 이미지 분리 과정에서 배경 이미지를 세포의 일부로 인식하거나 세포의 일부를 배경으로 인식되는 빈도가 높았다. 영상 촬영 시 초점이 어긋나는 것도 오류율 증가의 원인이었다. 톱니적혈구를 정상적혈구로 인식한 사례(253건)는 잘못된 초점조절로 인해 톱니적혈구의 돌기 부분의 경계선이 흐려지면서 발생했다. 정상적혈구를 타원적혈구로 분류한 사례(339건)의 경우 영상측정법을 중첩된 적혈구가 많은 지점에서 시행한 경우 발생 빈도가 높았다. 분수령 알고리즘이 서로 붙어 있는 적혈구 중 일부를 제대로 분리해내지 못해 타원적혈구로 잘못 해석되었다(Fig. 5). 중첩된 적혈구가 적은 지점을 선택하고 정확하게 초점을 맞춘 상태에서 조리개를 열고 촬영함으로써 영상측정법의 오류를 보다

줄일 수 있을 것이라 생각된다.

영상측정법은 적혈구의 크기, 길이, 구조물 간의 각도 등을 측정하여 적혈구의 형태학적 특성을 수치화된 형태로 기록하고 이를 바탕으로 변형적혈구를 측정한다. 변형적혈구를 비롯한 말초혈액 도말의 판독은 판독자의 형태학적 인식을 기반으로 하므로 혈구의 구체적인 형태학적 정의가 존재하지 않는 한 판독자 간 결과 차이는 발생할 수밖에 없으며 이는 말초혈액도말검사뿐 아니라 현미경을 이용한 다른 임상검사에서도 공통적으로 발생하는 문제이기도 하다[9]. 형태학적 특성이 복잡하거나 다른 조건과 유사한 경우, 혹은 형태학적 특성이 미약한 경우일수록 다른 조건과 명확히 구분되는 형태학적 정의를 내리기 어려워진다. 영상 분석 기술은 기존에 추상적인 언어나 사진, 그림 등으로 표현되었던 형태학적 특성을 수치화하여 명확한 형태학적 정의를 재정립하는 데 도움을 줄 수 있을 것이다.

하지만 영상측정법을 말초혈액도말검사 대체 용도로 사용하는 것은 어려울 것으로 생각한다. 실제 임상검사실에서는 다양한 종류의 변형적혈구를 관찰할 수 있으나 본 연구에 사용된 영상 분석 소프트웨어 세 종류의 변형적혈구만 측정할 수 있도록 설계하였고 환자 선택 단계에서도 측정 대상에서 제외된 변형적혈구의 비율이 높은 환자를 포함하지 않았다.

프로그램 자체 알고리즘 오류 역시 임상 적용을 위해 해결해야 할 과제 중 하나이다. 영상측정법을 톱니적혈구의 비율이 높은 환자를 대상으로 시행할 경우 일부 돌기의 돌출이 심한 톱니적혈구를 분열적혈구로 인식하였다. 색 보정 및 배경 분리 등 전처리 과정의 알고리즘에서도 여러 문제점이 발견되었다. 초기 프로그램 제작 기획 단계에서 유극적혈구를 감별하는 것이 가능하도록 시도하였으나 배경분리 과정에서 유극적혈구의 돌기가 제거되어 인식이 불가능했다.

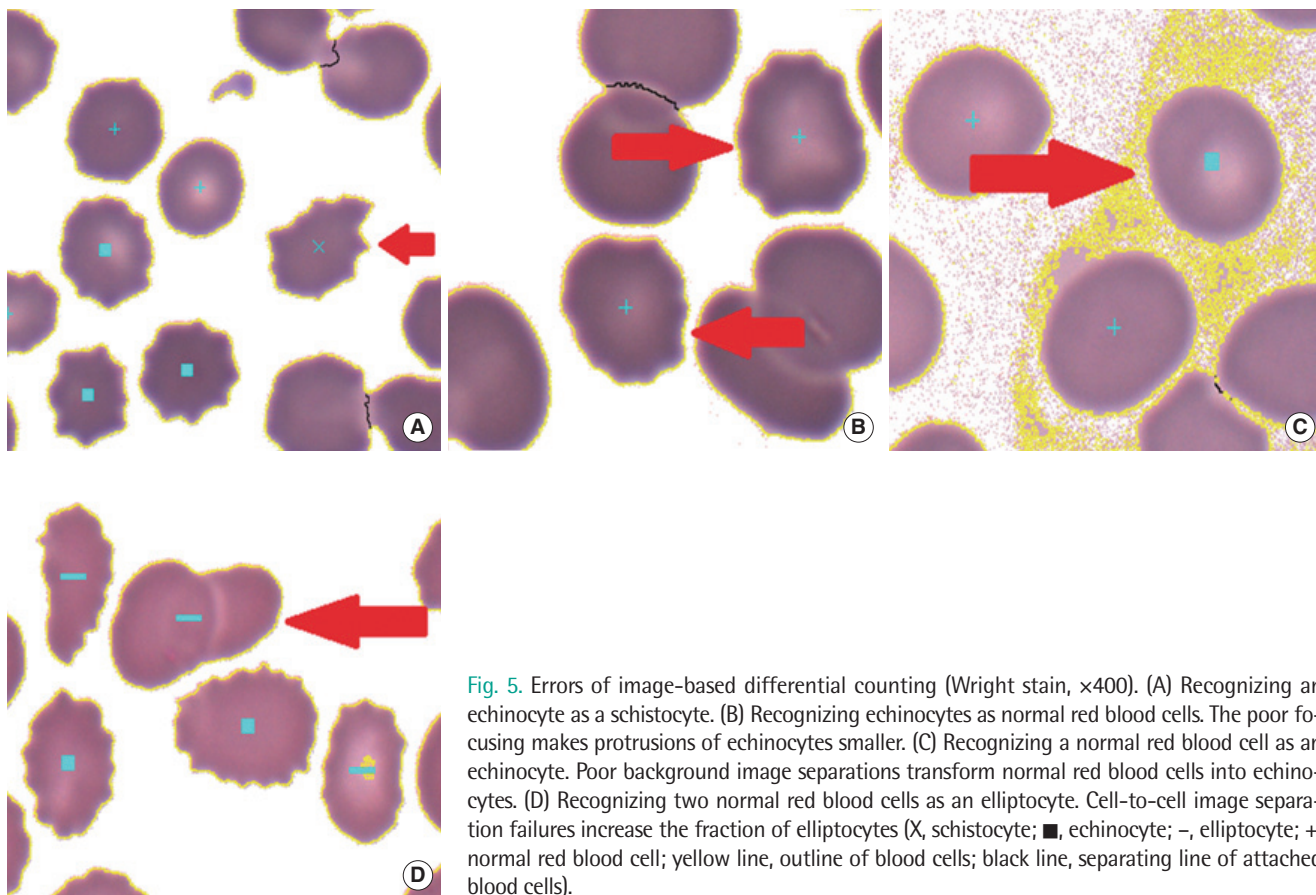


Fig. 5. Errors of image-based differential counting (Wright stain, ×400). (A) Recognizing an echinocyte as a schistocyte. (B) Recognizing echinocytes as normal red blood cells. The poor focusing makes protrusions of echinocytes smaller. (C) Recognizing a normal red blood cell as an echinocyte. Poor background image separations transform normal red blood cells into echinocytes. (D) Recognizing two normal red blood cells as an elliptocyte. Cell-to-cell image separation failures increase the fraction of elliptocytes (X, schistocyte; ■, echinocyte; -, elliptocyte; +, normal red blood cell; yellow line, outline of blood cells; black line, separating line of attached blood cells).

혈구의 분리 인식을 위해 채택한 분수령 알고리즘 역시 개선이 필요했다. 분수령 알고리즘은 기본적으로 급격한 색상 및 명도에 변화를 기준으로 물체를 구분하므로 두 개 이상의 적혈구가 서로 붙어 있어도 세포질의 색상과 명도가 비교적 일정한 경우 하나의 적혈구로 잘못 인식하며 반대로 급격한 색상 및 명도의 변화가 있는 경우 하나의 혈구를 두 개 이상의 혈구로 인식할 수 있다. 서로 부착된 세포를 하나의 세포로 잘못 인식할 경우 이는 변형적혈구 인식 오류의 원인이 되며 하나의 세포를 여러 개의 세포로 분리하여 잘못 인식하는 경우 서로 부착된 세포는 인식 대상에서 제외한다는 기본 알고리즘으로 인해 측정 가능한 세포의 수가 줄어드는 문제가 발생한다.

혈구 종류 판정 오류는 총 10건으로 비교적 그 발생 빈도가 낮았으나 이는 본 연구에서 적용한 크기 기반 세포 종류의 판별 알고리즘의 성능이 높아서라기보다는 분수령 알고리즘의 오작동과 관련이 있는 것으로 사료된다. 소립구나 거대혈소판 등 적혈구와 크기가 비슷한 세포의 경우 핵이나 세포질의 불균질한 색으로 인해 과분리 현상이 발생하여 측정 대상에서 대부분 제외되었다. 분수령 알고리즘의 개선 시 혈구 종류 판정 오류도 동시에 해결해야 할 것으로 생각된다.

본 연구의 한계점으로는 말초혈액도말슬라이드 선정 시 변형적혈구의 종류와 그 비율이 다양하지 않았다는 점을 들 수 있다. 추가 연구 시 다양한 종류의 변형적혈구를 인식할 수 있도록 기능을 추가해야 할 것으로 생각되며 보다 많은 환자를 대상으로 영상측정법을 평가를 해야 할 것으로 사료된다.

현재 영상측정법은 실제 임상에 적용하기에 부족한 점이 많으나 간단한 수학적 알고리즘을 사용하여 수기법과 유사한 수준으로 변형적혈구가 인식 가능함을 실증했다는 것에서 그 의미를 찾을 수 있을 것이다. 차후 프로그램 개선을 통해 보다 다양한 종류의 변형적혈구를 측정하도록 발전시켜 임상 적용하는 것이 가능해질 것이라 생각한다.

요 약

배경: 일관성 있는 말초혈액검사의 변형적혈구의 등급 측정을 위해 이미지 기반 감별 측정(image based differential count) 프로그램을 제작하여 적혈구의 하나하나의 이상 정도를 측정하고 변형적혈구의 상대적 분율(relative fraction)을 계산하였다.

방법: 30명의 말초혈액의 형태학적 소견을 분석하였다. 말초혈액도

말을 charge-coupled device 카메라가 부착된 현미경을 이용하여 확대 촬영 및 관찰하였다. 영상 분석 소프트웨어를 평가하기 위하여 수기감별측정법(manual differential count)의 결과와 비교하였다. 분열적혈구(schistocyte), 톱니적혈구(echinocyte), 타원적혈구(elliptocyte)의 상대적 분율을 영상측정법과 수기법을 이용해 계산하였다. 오류율은 영상 분석 소프트웨어의 최종 이미지 결과를 확인하여 측정하였다. 선형회귀분석을 통해 영상측정법과 수기법의 상관성을 평가하고 검사 소요시간을 측정하였다. 비정상적혈구의 형태학적 특성을 정의할 수 있는 수학적 판정 기준을 제시하기 위하여 영상측정법의 알고리즘은 간단한 수학적, 기하학적 공식에 기반하여 제작하였다.

결과: 영상측정법의 오류율은 2.8%였다. 적혈구 1,000개를 측정하는데 소요된 시간을 환산했을 때 수기법은 7.3분, 영상측정법은 2.7분이 걸렸다. 선형회귀분석에서 직선회귀계수는 분열적혈구의 경우 0.776 ($P < 0.001$), 톱니적혈구의 경우 0.895 ($P < 0.001$), 타원적혈구의 경우 1.001 ($P < 0.001$)이었다.

결론: 영상 분석 프로그램을 이용해 이상적혈구의 형태학적 조건을 기하학적, 수학적 공식을 이용해 정의할 수 있음을 확인하였다. 영상측정법은 변형적혈구의 등급 측정의 일관성을 유지하는 데 도움을 줄 수 있을 것이라 생각한다.

참고문헌

1. Bull BS. Morphology of the erythron. In: Lichtman MA, et al., eds. Williams hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2006:377-82.
2. Hyun BH, Gulati GL, Ashton JK. Differential leukocyte count: manual or automated, what should it be? Yonsei Med J 1991;32:283-91.
3. Gulati GL, ed. Blood cell morphology grading guide. 1st ed. Chicago: American Society of Clinical Pathology Press, 2009:1-33.
4. Briggs C, Longair I, Slavik M, Thwaite K, Mills R, Thavaraja V, et al. Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the CellaVision DM96 automated image analysis system. Int J Lab Hematol 2009;31:48-60.
5. Rümke CL. The imprecision of the ratio of two percentages observed in differential white blood cell counts: a warning. Blood Cells 1985;11:137-40.
6. Beucher S. Watersheds of functions and picture segmentation. Proc IEEE Int Conf Acoust Speech Signal Process 1982;7:1928-31.
7. Ceelie H, Dinkelaar RB, Van Gelder W. Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of Diffmaster Octavia and Cellavision DM96. J Clin Pathol 2007;60:72-9.
8. Lesesve JF, Salignac S, Alla F, Defente M, Benbih M, Bordigoni P, et al. Comparative evaluation of schistocyte counting by an automated method and by microscopic determination. Am J Clin Pathol 2004;121:739-45.
9. Sir JU and Kim TY. A new digital image processing technique for mixed pattern analysis of anti-neutrophil cytoplasmic antibody test. J Korean Rheum Assoc 2004;11:333-41.