

화상분석기를 이용한 정도별 이형성증에 대한 연구

광주보건대학 임상병리과

주 경 응

The Study of Dysplastic Grades to Digital Image Analyzer

Kyung-Woong Joo

Department of Clinical Pathology, Kwangju Health College, Gwangju 506-701, Korea

The purpose of this study was to develop discriminant analysis models for predicting cervical normal/dysplasia case diagnoses using cytometric features derived from the digital image analysis of cell monolayers. The database consisted of 19 cases diagnosed either as normal (n=5), moderate dysplasia (n=7), severe dysplasia (n=7) on monolayer preparations. We studied the nuclear and cytoplasmic characteristics of cells in the normal, moderate dysplasia and severe dysplasia on cervical samples. The morphometric parameters selected for the analysis were nuclear/cytoplasmic ratio and the nuclear variations measured by image analysis on normal and precancerous lesions of cervical smears; several shape factors; area; perimeter; maximal, minimal and equivalent circle diameters.

The results showed that the dysplasia samples exhibited changes in both cellular and nuclear form and size but lacked substantial differences in the tumor grades. The coefficient of nuclear variation is as follows to normal cell $21.8\pm 3.2\%$, moderate dysplasia $33.5\pm 6.1\%$, severe dysplasia 27.7 ± 5.8 of cervical smears.

Key words : Dysplastic cell, Image analysis, Coefficient of variation

I. 서 론

암세포는 정상 세포가 각종 원인에 의하여 유전자의 형질 전환이 발생하여 그 결과 세포의 형태학, 생물화학, 면역학적 특성이 변한 변성세포가 무제한 증식함으로써 생기는 악성종양이다. 이러한 악성종양은 급속히 이웃 조직으로 침습해 가며, 혈액이나 림프액을 통한 전이로 치명적인 결과를 가져온다(Artacho 등, 1993).

암세포는 어느 정도의 분화가 상실된 역형성을 보이며

형태학적 기능적 이상을 동반한 비정형성을 나타낸다. 현미경하에서 암세포는 그 세포와 핵이 모양과 크기에 있어 다형성을 보이며, 주로 주위 세포보다 몇 배 크거나 아니면 아주 작아서 원시적인 세포로 발견된다. 양성종양을 구성하는 세포들은 잘 분화된 거의 정상세포와 유사한 세포들로 구성되어 있지만, 정상 세포가 암세포로 되는 과정 중에 생긴 암유전자의 형질 변화의 축적이 세포의 형태학적 변화를 일으키고, 이를 토대로 조직학적인 진단을 할 수 있다. 침윤암의 전단계인 이형성증 세포는 다형성, 농염성, 다핵성 등을 특징으로 하지만, 침습과 전이를 하지 않는 상태로, 그 심도에 따라 형태학적인 변화도 차이가 있다(Artacho 등, 1993; Athanassiadou 등,

교신저자 : 주경응, (우)506-701 광주광역시 광산구 신창동 683-3
광주보건대학 임상병리과
TEL : 062-958-7624, 017-202-7577
E-mail : jookw@kjhc-c.ac.kr

2001). 그러나 전암단계로 알려진 이형성증은 정상과 암의 중간단계로 암과 비슷한 형태학적 변화를 보이며 경계가 아주 불분명하므로 이형성증 심도의 진단은 판독하는 사람에 따라 차이를 보일 수 있어 객관성과 재현성의 문제가 발생하기 쉽고 진단을 내리는 것이 어렵다. 이형성증 진단에 있어서 정량적인 기초에 입각한 형태의 해석으로 화상분석기가 많이 응용되고 있다(Wheeler 등, 1987; Keenan 등, 2000).

본 연구에서는 병리조직학적으로 정상(5례), 중등도 이형성증(7례), 고도 이형성증(7례)으로 진단된 19례를 대상으로 화상분석기를 이용하여 단계별 이형증에서의 형태학적 지표를 구하여 정상 세포에서 암세포로 이행하는 과정 중에 나타난 형태학적인 변화를 분석해 보고자 한다.

II. 재료 및 방법

본 실험에서는 질확대경 조준하 생검, 원추 생검으로 얻은 표본에서 병리조직학적으로 진단된 정상 5례, 중등도 이형성증 및 고도 이형성증 각각 7례를 대상으로 자궁경부 세포진검사를 시행하였다.

1. 실험 재료

세포진검사는 경관搔모 혹은 면봉법을 사용하여 세포를 얇게 도말한 후 즉시 95% 에틸알코올에 30분 고정한 후, 일반적인 형태 관찰을 위한 Papanicolaou(이하 Pap) 염색하여 판독하였으며, 진단은 Pap 분류법을 사용하였다.

2. 연구 방법

정상 및 중등도 이형성증과 고도 이형 증으로 나타난 표본에서 다음과 같은 항목으로 분석하였다.

1) 형태 계측

염색된 표본을 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하여 200×로 사진촬영(Nikon 3CCD camera, Japan)한 후 화상분석기 시스템(IMT-Size 5, Leica, USA)을 이용하여 각 증례에서 형태지수를 산출하였다.

III. 결 과

1. 세포학적 관찰

각 증례에 있어서 핵과 세포질의 분리 특징을 보였으며, 이형성증의 심도가 높을수록 세포질에 대한 핵의 비, 염색질의 불규칙상이 증가되었지만, 세포질은 빈약해짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

2. 세포의 변형

정상 및 중등도 이형성세포, 고도 이형성증 세포의 다양성과 변형성을 측정된 결과는 다음과 같다(Table 1)

1) 핵 면적

핵의 평균 면적은 정상 $32.4 \pm 7.0 \mu\text{m}^2$, 중등도 이형성증 $42.3 \pm 8.0 \mu\text{m}^2$, 고도 이형성증 $46.4 \pm 7.8 \mu\text{m}^2$ 순서로 증가했다.

2) 세포 크기의 다양성

세포 크기를 다양성을 나타내는 핵면적의 변이계수는 정상 $21.8 \pm 3.2\%$, 중등도 이형성증 $33.5 \pm 6.1\%$, 고도 이형성증 $27.7 \pm 5.8\%$ 로 이형성증에서 다양성이 가장 크게 나타났다.

Table 1. Mean morphometric values of nuclear areas, nuclear perimeter, coefficient of variation, and form factors in normal and dysplastic cervical epithelial cells.

	Areas perimeter1)	CV2)	FF I 3)	FF II4)	FF III5)
Normal	32.4±7.0	21.8±3.2	0.85±0.13	0.81±0.13	4.05±0.33
Moderate dysplasia	42.3±8.0	33.5±6.1	0.79±0.16	0.55±0.03	4.91±0.55
Severe dysplasia	46.4±7.8	27.7±5.8	0.72±0.15	0.68±0.24	4.41±0.54

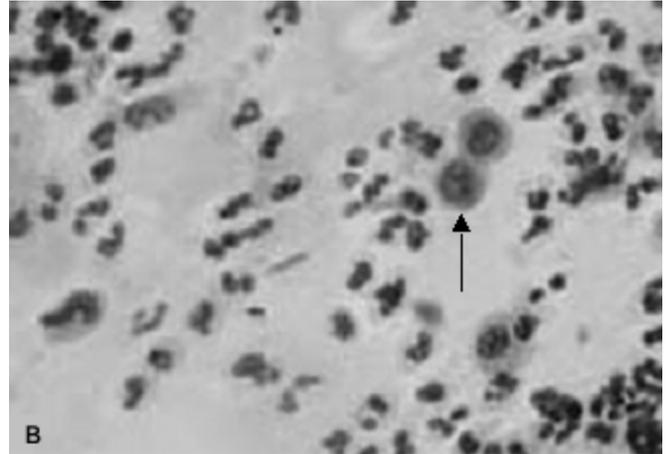
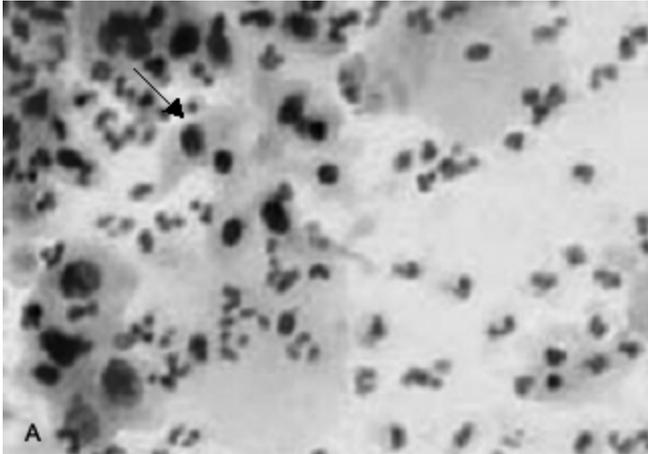


Fig. 1. The cytoplasmic and nuclear characteristics of cells in the moderate dysplasia(A) and severe dysplasia(B). The dysplasia samples showed changes in both cellular and nuclear form and size but lacked substantial differences in the tumor grades(arrow). Pap stain. $\times 200$

3) 형태지수

(1) 형태지수(form factor; 이하 FF) I 에서 정상이 0.85 ± 0.13 으로 나타났으며, 중등도 이형성증 0.79 ± 0.16 , 고도 이형성증 0.72 ± 0.15 로 나타났다.

(2) FF II 은 정상 0.81 ± 0.13 , 중등도 이형성증 0.55 ± 0.03 , 고도 이형성증 0.68 ± 0.24 를 보였다.

(3) FF III 에서 중등도 이형성증이 4.91 ± 0.55 로 정상세포 4.05 ± 0.33 와 고도 이형성증 4.41 ± 0.54 보다 높게 나타났다.

- 1) $\text{mean} \pm \text{standard deviation} (\mu\text{m}^2)$
- 2) CV : coefficient of variation(%)
- 3) FF(form factor) I : $\text{area} / (\text{maximal diameter} / \text{minimal diameter})$
- 4) FF II : $4 \times \text{area} / (\text{perimeter})^2$
- 5) FF III : $\text{perimeter} / \sqrt{\text{area}}$

IV. 고 찰

자궁경부암은 우리나라 여성 암 발생의 1위를 차지하고 있다. 사망순위는 위암 다음으로 차지하고 있는 실정이며, 연간 인구 10만 명당 24명 정도의 새로운 환자가 발생하여 약 5000명의 새로운 자궁경부암 환자가 매년 발생하고 있다(송 등, 2001). 최근 몇 년간 자궁경부암의 발생을 줄이기 위한 노력이 계속되고 있으며 침윤암의 치료법을 향상시키는 것도 중요한 일이나 무엇보다 더 중요한 것은 암 전 단계에서 효과적인 방법으로 조기진

단을 하여 침윤암의 발전을 미리 차단하고 예방하여 이 질환으로 인하여 불필요하게 사망하는 경우를 최대한으로 줄이는 것이 매우 중요하다고 하였다(Abdul 등, 1982; 송 등, 2001).

1943년 Papanicolaou의 세포학적 검사와 질경검사 및 생검으로 자궁경부의 암종은 여러 단계의 상피 변화를 거쳐서 발생함이 입증되었다. 또한 자궁경부 세포진 검사는 Pap에 의해 분류 및 검사법이 제시된 이래 침윤성 자궁경부암의 발생률과 이로 인한 사망률을 감소시키는 데 크게 기여하였다(Athanassiadou 등, 2001). 상피의 단계적 변화는 여러 정도의 이형성증, 상피내 암종, 그리고 침윤성 암종으로 구성된다. 자궁경부의 발암과정에서 가장 초기의 가장 경한 비정형성 변화를 이형성증이라고 한다. 이형성증은 정도에 따라 경도, 중등도, 및 고도로 나눈다. 경도 이형증은 중등도 이형성증으로, 고도 이형성증은 상피내 암종으로 오랜 기간에 걸쳐 서서히 진행된다. 한 단계의 변화로부터 다음 단계의 변화로 진행되는 데 소요되는 기간은 개체에 따라 상이하지만, 대체로 수년이 소요되는 것으로 알려지고 있다(Maeda 등, 1997; Athanassiadou 등, 2001).

세포진 검사는 그 방법의 간편성과 경제적인 장점으로 인해 자궁경부암의 선별검사 및 조기진단의 목적으로 현재까지 전 세계적으로 가장 널리 사용하고 있지만, 낮은 민감도와 판독결과의 부적절한 표현 등이 문제시되고 있다(Charvet 등, 2004). 조직학적 소견으로는 종양은 양성 과 악성으로 구분 지을 수 있지만 전암단계로 알려진 이형성증은 정상과 암의 중간단계로 암과 비슷한 형태학적

변화를 보이며 경계가 아주 불분명하므로 진단을 내리는 것이 어렵다. 특히, 고도 이형성증은 상피내 암종과 별로 형태학적 차이를 인정할 수 없다고 알려져 있다(Wheeler 등, 1987; Maeda 등, 1997; Keenan 등, 2000). 그러나 병리조직분야에서 기타 다른 검사에 비하여 자동화되어가는 것이 더디게 진행되고 있는 것이 현실이다. 특히 병리조직학적 진단은 여전히 경험을 축적한 사람이 경험과 직관을 기초로 진단을 내리고 있어 사람에 따라 다른 진단이 내려지는 예가 적지 않다.

조직학적으로 양성종양을 구성하는 세포들은 자주 나타나는 염색체 변이 등을 제외하고는 잘 분화된 거의 정상세포와 유사한 세포들로 구성되어 있는 반면, 암세포는 다소 분화는 있을 수 있지만 어느 정도의 분화가 상실된 역형성을 보이며 형태학적 기능적 이상을 동반한 비정형성을 나타낸다. 현미경하에서 암세포는 그 세포와 핵의 모양과 크기에 있어 다형성을 보이며, 주로 주위 세포보다 몇 배 크거나 아니면 아주 작아서 원시적인 세포로 발견된다. 또한 특징적으로 핵은 DNA량이 증가하여 이수체를 보이므로 Pap 염색에서 아주 진하게 염색되는 농염색성이 나타나며, 핵 자체도 커져서 핵과 세포질의 비율이 증가된다(Bacus, 1995; Keenan 등, 2000; Howell 등, 2004). 핵의 모양은 대체로 변화가 심하고 염색질이 핵막을 따라 굵게 분포하며 핵속에 커다란 핵소체가 있어 합성 능력을 반영한다. 그리고 분화가 안 된 악성종양일수록 많은 수의 유사분열을 보이며 특징적으로 3극성, 4극성 또는 다극성의 비정형성 유사 분열의 양상을 띤다 (Orille 등, 1993; Dey와 Powari, 2002). 본 실험에서도 이형성증 각 증례에서 핵과 세포질의 분리 특징을 보였으며, 그 심도가 높을수록 세포질에 대한 핵의 비, 염색질의 불규칙상이 증가되었지만, 세포질은 빈약해짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

최근 정량적인 기초에 입각한 형태의 해석을 위하여 화상분석에 대한 관심이 높아지고 있다. 또한 컴퓨터에 의한 화상분석 처리로 화상을 수치적으로 표현하여 객관성과 재현성이 향상될 것으로 기대되고 있다. 본 실험에서는 이형성증 세포의 현미경적 특징과 형태학적 특징을 객관적으로 알아보기 위하여 정상과 이형성증의 핵, 그리고 단계별 이형성증 간에 형태학적 차이를 수치화하고 핵의 다양성과 변형성을 측정하여 비교해 보았다. 각 증례에서 핵과 세포질의 분리 특징을 보였으며, 이형성증의 심도가 높을수록 세포질에 대한 핵의 비, 염색질의 불규칙상이 증가되었지만, 세포질은 빈약해짐을 관찰할 수 있

었다. 핵의 평균 면적은 정상 $32.4 \pm 7.0 \mu\text{m}^2$, 중등도 이형성증 $42.3 \pm 8.0 \mu\text{m}^2$, 고도 이형성증 $46.4 \pm 7.8 \mu\text{m}^2$ 순서로 증가했다. 세포 크기의 다양성을 나타내는 핵면적의 변이계수는 정상 $21.8 \pm 3.2\%$, 중등도 이형성증 $33.5 \pm 6.1\%$, 고도 이형성증 $27.7 \pm 5.8\%$ 로 이형성증에서 다양성이 가장 크게 나타났다. 이와 같이 화상분석과 다변량 해석을 병용함으로써 이형성증 정도에 따라 수치적으로 상호 명료하게 분리되어 객관적이고 재현성이 좋은 진단이 가능하다는 것을 알 수 있었다. FF I에서는 정상이 0.85 ± 0.13 으로 1에 매우 가깝게 나타나 원형 또는 타원형을 보이는 반면, 중등도 이형성증 0.79 ± 0.16 , 고도 이형성증 0.72 ± 0.15 로 이형성증 세포가 정상 세포보다는 불규칙한 형태임을 알 수 있었다. FF II은 정상이 0.81 ± 0.13 , 중등도 이형성증 0.55 ± 0.03 , 고도 이형성증 0.68 ± 0.24 로 중등도 이형성증이 정상과 고도 이형성증에 비해 작은 수치를 보이므로 정상과 고도 이형성증보다 타원형의 형태를 갖고 불규칙한 모양을 보였다.

또한, 중등도 이형성증 세포의 길이만으로 보면 대부분이 짧은 세포들이 더 많은 것으로 나타나 타원형을 나타냄을 알 수 있었다. FF III에서도 중등도 이형성증이 4.91 ± 0.55 으로 정상세포 4.05 ± 0.33 와 고도 이형성증 4.41 ± 0.54 보다 높게 나타나 이 지수의 최소치보다 크므로 정상과 고도 이형성증보다 원형 윤곽에서 벗어나 있음을 알 수 있었다(Fig. 1, Table 1).

본 연구를 통하여 이형성증 진단 그리고 단계별 진단이나, 정상에서 이형성증, 이형성증에서 침윤암으로 어떻게 이행되는지를 알아보는 데 기초자료로 이용함으로써 진단방법을 향상시키는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Abdul KF, Fu Y, Reagan W, Wentz W. Morphometric study of intraepithelial neoplasia of the cervix. *Obstetrics and Gynecology* 60:210, 1982.
2. Artacho PE, Roldan VR, Salas MJ, Vaamonde LR. Histomorphometry of normal and abnormal cervical samples. *Anal Quant Cytol Histol* 15(4):290-297, 1993.
3. Athanassiadou P, Kavantzias N, Gonidi M, Athanassiades P, Liossi A, Nakopoulou L, Petrakakou

- E, Davaris P. Correlations between nuclear/ cytoplasmic area ratio and classification of cervical smears. *J Exp Clin Cancer Res* 20(4):481-486, 2001.
4. Bacus JW. Cervical cell recognition and morphometric grading by image analysis. *J Cell Biochem Suppl* 23:33-42, 1995.
 5. Charvet I, Meda P, Genet M, Pelte MF, Vlastos AT. Optical diagnosis of cervical dysplasia. *Bull Cancer* 91(1):45-53, 2004.
 6. Dey P, Powari M. Mean nuclear volume in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 24(2):70-72, 2002.
 7. Howell LP, Zhou H, Wu W, Davis R. Significance of subclassifying high-grade squamous intraepithelial lesions into moderate dysplasia/CIN II versus severe dysplasia/CIN III/CIS in the Bethesda System terminology. *Diagn Cytopathol* 30(5):362-366, 2004.
 8. Keenan SJ, Diamond J, McCluggage WG, Bharucha H, Thompson D, Bartels PH, Hamilton PW. An automated machine vision system for the histological grading of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), *Pathol* 192(3):351-362, 2000.
 9. Maeda MY, Di Loreto C, Shirata NK, Shih LW, Cavaliere MJ, Longatto Filho A, Alves VA. Image analysis of nuclear/cytoplasmic ratio in cervical smears to discriminate three grades of cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Cytol* 41(3):744-748, 1997.
 10. Orille V, Sampedro A, Ferrer-Barriendos J, Corral N, Martinez A. Quantitative pathology of the cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Gynaecol Oncol* 14(6):491-500, 1993.
 11. Wheeler N, Suffin SC, Hall TL, Rosenthal DL. Prediction of cervical neoplasia diagnosis groups. Discriminant analysis on digitized cell images. *Anal Quant Cytol Histol* 9(2):169-181, 1987.
 12. 송민경, 권용일, 박태철, 천민정, 신진웅, 이진우, 이준모, 남궁성은. 자궁경부 상피내 병변 및 자궁경부암 186 예에서 자궁경부 세포진검사의 위음성률에 관한 연구, 대한산부회지 제44권 제4호, 2001.