



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2016년 2월

석사학위 논문

총혈구계산 지표를 이용한
광학현미경 고배율 시야당 적혈구 수
산정

조선대학교 대학원

의학과

김우성

2016년

2월

석사학위논문

총혈구계산 지표를 이용한 광학현미경 고배율 시야당 적혈구 수 산정

김

우

성

총혈구계산 지표를 이용한
광학현미경 고배율 시야당 적혈구 수
산정

Estimation of RBC number per one high power field on a
light microscopy using CBC parameters

2016년 2월 25일

조선대학교 대학원

의학과

김 우 성

총혈구계산 지표를 이용한
광학현미경 고배율 시야당 적혈구 수
산정

지도교수 문 대 수

공동지도교수 박 건

이 논문을 의학석사학위 신청 논문으로 제출함

2015년 10월

조선대학교 대학원

의학과

김 우 성

김우성의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 장속진 (인)

위 원 조선대학교 교수 문대수 (인)

위 원 조선대학교 교수 강성호 (인)

2015년 11월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT.....	1
I . 서론.....	3
II . 재료 및 방법.....	4
1. 대상.....	4
2. 측정방법.....	4
III . 결과.....	5
1. CBC 및 manual red cell count 결과.....	5
2. CBC 지표들과 각 슬라이드에서 수기로 구한 적혈구 수 의 평균값(mRBC) 비교.....	5
3. mRBC와 aRBC의 선형회귀분석.....	6
4. aRBC를 이용한 현미경 한 시야 당 관찰되는 RBC 개수 의 추정(estimated red cell count, eRBC).....	6
5. mRBC와 eRBC를 이용한 표적세포 백분율 계산 및 비 교.....	6
IV . 고찰.....	7
【참고문헌】	10

표 목 차

Table 1.12

도 목 차

Figure 1.....	13
Figure 2.....	14
Figure 3.....	15
Figure 4.....	16
Figure 5.....	17
Figure 6.....	18

ABSTRACT

Estimation of RBC number per one high power field on a light microscopy using CBC parameters

Woo-Seong Kim

Advisor : Prof. Dae-Soo Moon M.D.,

Prof. Geon Park M.D.

Department of Laboratory Medicine,

Graduate School of Chosun University

Estimation of RBC number per one high power field on a light microscopy using CBC parameters

Background : It is important to calculate percentage of poikilocytes for RBC morphology grading. But it is very labor-intensive and time-consuming step to count 1,000 RBCs. Therefore, we investigated the relationship between RBC number per one high power field (HPF) and complete blood count (CBC) parameters.

Method : We selected 110 peripheral blood smear (PBS) slides showed target cell with CBC data. We captured 10 different high power field (HPF) per one PBS slide in the ideal zone by digital camera (DMC-LX5, Panasonic, Japan) through an ocular lens. All RBCs and target cells in the captured pictures were equal to one observed HPF were manually counted. We statistically analyzed the relationship between manual RBC count (mRBC) and CBC parameters.

Result : The Spearman correlation coefficient of mRBC and automated RBC counts (aRBC) was 0.957 ($P < 0.001$). Simple linear regression was used to compare mRBC (y) and aRBC (x). The formula for regression line was : $y = 58.093x + 51.885$ ($r = 0.947$, $P < 0.001$). We calculated the estimated RBCs

(eRBCs, the assumed RBCs count in one HPF) by using above formula. The equation was $eRBC = 58.093 \times aRBC + 51.885$. Two different target cell percentages were calculated by mRBCs (mRBC method) and eRBCs (eRBC method). The two different methods gave the following equation by mRBC method (y1) to eRBC method (x1): $y1 = 1.128x1 - 0.116$ ($r = 0.995$, $P < 0.001$)

Conclusions : The RBCs in the ideal zone observed by a light microscopy can be estimated roughly by the equation using aRBC.

I. 서론

자동혈구분석기(automated blood cell analyzer)의 발달로 과거 말초혈액도말 표본(peripheral blood smear, PBS)이 했던 진단적 역할의 많은 부분을 자동혈구 분석기가 대체하고 있다[1]. 하지만 PBS는 빈혈, 혈소판 감소증의 원인을 감별하고 백혈병과 림프종의 진단에 중요한 역할을 하고 있으며 특정 감염질환의 진단과 원인을 알 수 없는 황달(unexplained jaundice)등을 감별하는데 도움을 준다[1]. 특히, 자동혈구분석기에서는 적혈구수(red blood cell count), 혈색소(hemoglobin, Hb), 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구혈색소(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), RDW (red cell distribution width) 등과 같은 여러가지 적혈구 지표들(red cell parameters) 들을 제공하고 있지만 다양한 질환의 감별에 중요한 이상적혈구(poikilocyte)에 대한 정보를 제공하기에는 한계가 있어 말초도말표본을 현미경으로 관찰하는 것이 이 때 중요한 역할을 하게 된다. 이상적혈구는 보고를 할 때 이상혈구의 백분율(%) 혹은 1+, 2+, 3+, 4+와 같은 등급 시스템(grading system)을 사용하여 보고하는데 이것은 이상적혈구의 정량적 측정이 임상질환의 감별진단에 중요한 역할을 하기 때문이다[2, 3]. 예를 들면, 타원적혈구(elliptocyte)가 말초혈액에서 전체 적혈구 중 50% 이상 관찰되는 경우 유전타원적혈구증(hereditary elliptocytosis, 진단검사의학 5판 용어)를 의심해 볼 수 있고 눈물방울방울적혈구(tear drop cell, 진단검사의학 5판 용어)이 10% 이상 관찰되는 경우 일차골수섬유증(primary myelofibrosis)를 의심해 볼 수 있다. 그러나 정확한 이상적혈구의 백분율을 구하기 위해서는 1000개 이상의 적혈구를 수기법으로 감별계산 하는 과정이 필요하다[4]. 하지만 이 방법은 시간과 인력이 많이 소모된다[5]. 그러나 만약 1000개 이상의 적혈구를 감별계산 하지 않는다면 그 결과는 판독자의 주관에 따르거나 부정확할 수 있다.

저자들은 이상적혈구의 백분율을 정확하고 손쉽게 구할 수 있도록 하기 위해 자동혈구분석기에서 제공하는 지표(parameter)들과 한 개의 고배율 시야에서 관

찰되는 적혈구 개수 사이의 상관관계를 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상

2008년 7월부터 2009년 7월 사이에 조선대학교병원 진단검사의학과에 일반혈액 검사 및 말초혈액도말검사가 동시에 의뢰된 검체 중 표적세포(target cell)가 관찰된 검체를 선별하였다. 그 중 Hb이 4.1~ 17.0 g/dL 범위에 있는 110 검체를 선별하였다. 110개 검체에는 적혈구들이 고루 퍼져있지 않고 많이 겹쳐있어 ideal zone이 불분명한 검체는 포함시키지 않았다.

2. 측정방법

1) 전혈구계산(CBC) 측정

자동혈구측정기(ADVIA 2120, Siemens, Tarrytown, NY, USA)를 사용하여 K2EDTA 진공채혈관에 채혈된 검체로 Hb, 적혈구용적율(Hct), 적혈구 수(automated red cell count, aRBC), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC) 등을 측정하였다.

2) 말초혈액도말슬라이드의 제작, 현미경으로 관찰되는 적혈구 수 측정 및 표적세포 수 측정

같은 검체로 도말슬라이드를 제작하였고 제작 시 자동화장비(ADIVA Autoslide, Siemens, Tarrytown, NY, USA)를 사용하였다. 현미경은 광학현미경(BX41, Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 슬라이드 당 1000배에서 서로 다른 최적도 말부위(ideal zone) 10시야를 관찰하였다. 관찰한 시야를 디지털 카메라(DMC-LX5, Panasonic, Osaka, Japan)로 촬영하였다. 육안으로 보이는 시야와 디지털 카메라로 촬영한 시야가 일치하도록 디지털 카메라를 대안렌즈에 대고 촬영하였다(Fig. 1.). 촬영한 사진에서 보이는 적혈구를 수기법으로 세어서 그 총 수(manual red cell count)를 구하였고 같은 시야에서 보이는 표적세포를 수

기법으로 세어서 그 수를 구하였다.

3) 최적도말부위(ideal zone)

최적도말부위는 대부분 적혈구가 겹쳐있지 않는 부위부터 적혈구 중앙의 얇게 염색되는 부위(central pallor)가 거의 없어지는 부위 사이 공간으로 정의하였다[6].

4) 통계분석

CBC 지표들(Hb, Hct, aRBC, MCV, MCH, MCHC)과 수기법으로 측정한 적혈구 수(manual red cell count)를 비교하기 위해 Spearman 상관 분석을 시행하였고 P 값이 0.05 미만인 경우를 의미있는 것으로 판정하였다. 선형회귀분석을 통해 회귀방정식을 산출하였다. 통계분석은 SPSS (version 21.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하였다.

III 결과

1. CBC 및 manual red cell count 결과

110 검체의 CBC 지표 범위 및 평균과 표준편차는 Table 10에 표시하였다(Table 1). 각 슬라이드의 manual red cell count의 평균값(mRBC)은 121~374개 였으며, 변이계수(coefficient of variation)는 2.8~11.2% 였다.

2. CBC 지표들과 각 슬라이드에서 수기로 구한 적혈구 수의 평균값(mRBC) 비교

110 검체의 mRBC와 각각의 CBC 지표들을 사이의 상관관계를 분석하기 위해 Spearman 상관분석을 시행하였다. mRBC와 Spearman 상관계수는 Hb이 0.948 ($P < 0.001$), Hct 0.941 ($P < 0.001$), aRBC 0.957 ($P < 0.001$), MCV -0.260 ($P = 0.006$), MCH -0.111 ($P = 0.246$), MCHC 0.392 ($P = 0.000$), RDW -0.699 ($P <$

0.001)였다. CBC 지표들 중 aRBC의 상관계수가 0.957 ($P < 0.001$)로 mRBC와 상관관계가 가장 좋은 것 나타났다.

3. mRBC와 aRBC의 선형회귀분석(simple linear regression)

Spearman 상관분석 결과 mRBC와 상관관계가 가장 좋은 것으로 나타난 aRBC에 대해서 mRBC와의 선형(linear) 관련성을 알아보기 위하여 선형회귀분석을 시행하였다. 분석결과 aRBC(x)와 mRBC(y)의 관계는 $y = 58.093x + 51.885$ ($r = 0.947$, $P < 0.001$) (관계식 1) 으로 나타낼 수 있었다(Fig. 2).

4. aRBC를 이용한 현미경 한 시야 당 관찰되는 RBC 개수의 추정(estimated red cell count, eRBC)

aRBC(x)와 mRBC(y)의 관계식인 $y = 58.093x + 51.885$ 를 이용하여 eRBC를 추정하였다. 그 추정 방정식은 다음과 같았다.

$$eRBC = 58.093 \times aRBC + 51.885 \quad (\text{관계식 2})$$

위 방정식에 110개 검체의 aRBC값을 각각 대입하여 eRBC를 구하였다. eRBC 값은 124~375 사이에 있었고 평균값과 표준편차는 각각 250.9와 60.9 였다. eRBC와 mRBC 값을 가지고 선형회귀분석 시행한 결과 두 값 사이에 상관성이 관찰되었다(Fig. 3). Bland and Altman plot을 이용하여 mRBC와 eRBC 사이의 차이(difference)를 관찰하였다(Fig. 4)[7]. mRBC와 eRBC 차이(difference)의 평균(mean)은 0.001이었으며 절대값의 평균은 8.174, 표준편차(standard deviation, SD)는 10.258 였다. mRBC와 eRBC 차이는 전체 데이터의 97.3%가 $\text{mean} \pm 2SD$ 범위 안에 있었고 $\text{mean} \pm SD$ 범위 안에는 70.9%가 포함되었다.

5. mRBC와 eRBC를 이용한 표적세포 백분율 계산 및 비교

mRBC와 eRBC를 이용하여 구한 poikilocyte의 백분율이 얼마나 차이를 보이는지 알아보기 위해 poikilocyte 중 표적세포를 이용하여 각각 백분율을 구해 그 수치를 비교하였다. 전체 슬라이드에서 1시야 당 관찰되는 표적세포의 평균은 4.4 개였고 각 슬라이드에서 1시야 당 관찰되는 표적세포 개수의 평균은 0.1 에서 25.1개 였으며, 변이계수는 0.209~3.162% 였다. 각 슬라이드에서 mRBC, eRBC를

이용한 표적세포 백분율의 계산은 각각 다음 식을 이용하였다.

mRBC로 구한 표적세포 백분율(target cell %_{mRBC}) = (표적세포 평균 개수 ÷ mRBC) × 100.....mRBC 방법 (mRBC method)(관계식 3)

eRBC로 구한 표적세포 백분율(target cell %_{eRBC}) = (표적세포 평균 개수 ÷ eRBC) × 100.....eRBC 방법 (eRBC method)(관계식 4)

mRBC를 이용하여 구한 표적세포의 백분율은 0.03 ~ 14.00% 범위에 있었고 eRBC를 이용하여 구한 표적세포의 백분율은 0.03 ~ 11.68% 범위에 있었다. mRBC 방법(y_1)과 eRBC 방법(x_1)을 이용하여 구한 표적세포 백분율을 가지고 선형회귀분석을 시행하였다. 분석 결과 $y_1 = 1.128x_1 - 0.116$ ($r = 0.995$, $P < 0.001$)의 관계를 보여 상관관계가 좋은 것으로 나타났다(Fig. 5). mRBC와 eRBC로 구한 표적세포 백분율의 차이의 평균은 0.139% 이고 표준편차는 0.431 였다(Fig. 6). 각각 방법으로 구한 표적세포 백분율의 차이가 $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ 를 벗어나는 경우는 7검체였다.

IV 고 찰

과거 자동화장비를 이용하여 변형적혈구를 감별하려고 하는 노력이 있었다. 하지만 자동화장비만으로는 정확한 변형적혈구 감별이 어렵고 말초혈액도말검사를 통한 보완이 필요하다[3]. 예를 들면, 유세포분석법을 이용하는 ADVIA 120 (Siemens, Tarrytown, NY, USA)는 혈구의 부피(volume)와 굴절지수(refractive index)를 활용하여 혈구 감별 계산을 수행하는데, 이것을 통해 분열적혈구(schistocyte)의 감별 계산이 가능하다[8]. 하지만 혈구의 모양 인자(shape factor)를 고려하고 있지 않기 때문에 분열적혈구의 감별 계산 결과의 정확성이 떨어진다고[3, 8]. 한편, Diffmaster Octavia (CellaVision AB, Lund, Sweden)과 CellaVision DM96 (CellaVision AB, Lund, Sweden)은 형태학적 분석 프로그램을

사용하여 혈구를 감별하지만 적혈구의 형태학적 이상을 감별할 수 있는 프로그램은 되어 있지 않아 변형적혈구의 감별에 어려움이 있다[3, 9].

최근 Choi 등은 영상 분석 소프트웨어(image based differential counting)를 이용해 말초혈액도말슬라이드에서 관찰되는 변형적혈구의 비율을 측정하였다[3]. 수기법과 비교하였을 때 우수한 상관성을 보였으나 톱니적혈구(echinocyte), 타원적혈구(elliptocyte), 분열적혈구, 세 종류의 변형적혈구만 측정할 수 있도록 영상 분석 소프트웨어가 설계되어 나머지 변형적혈구에 대해서는 분석이 불가능 하였다[3].

본 연구에서는 자동혈구분석기에서 측정된 aRBC를 가지고 현미경 고배율 1시야에서 관찰되는 평균 RBC 개수를 추정한 다음 말초혈액도말검사에서 보이는 변형적혈구 개수를 통해 변형적혈구의 백분율을 측정하였고 수기법과 비교하였을 때 비교적 좋은 상관성을 보였다. 이 방법은 영상 분석 소프트웨어를 필요로 하지 않으며 검사실에 구비되어 있는 자동혈구분석기를 활용할 수 있다는 장점이 있다.

검사자가 말초혈액도말슬라이드를 관찰하여 변형적혈구 수를 직접 구해야한다는 단점이 있지만 현재까지 사용할 수 있는 다른 방법들도 말초혈액도말검사를 통한 보완이 필요하다[3].

mRBC 방법과 eRBC 방법을 통해 구한 표적세포 백분율의 차이는 mRBC와 eRBC의 수가 적을수록 크게 나타났으며 표적세포의 비율이 높을수록 크게 나타났다. 표적세포 백분율의 차이가 $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ 이상인 7검체 중 1검체는 자가면역용혈질환 환자 검체로 밝혀져 aRBC의 측정에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다[10]. 그러나 나머지 검체에서는 mRBC에 영향을 미칠 수 있는 말초혈액도말에서 현저한 적혈구 응집(agglutination)이나 자동혈구분석기 측정에 오류를 일으킬 수 있는 높은 백혈구 수(high white blood cell count), 거대혈소판(giant platelet), 자가면역용혈질환, 한랭글로불린(cryoglobulin) 등은 관찰되지 않았다[10]. 두 방법 간 표적세포 백분율의 차이가 나는 원인은 말초혈액도말 슬라이드에서 최적도말부위의 두껍게 도말된 부위(최적도말부위의 안쪽)와 얇게 도말된 부위(최적도말부위바깥쪽)는 시야 당 관찰되는 적혈구 개수가 달라질 수 있으므로 관찰하는 부위에 따라 mRBC 값에 오차를 줄 수 있을 것으로 생각되고 최적도말부위 내

에서도 부분적으로 혈액이 도말 되는 정도가 약간씩 차이를 보여 오차를 만들 수 있을 것으로 생각된다.

관계식 1, 2, 3을 이용하여 변형적혈구의 백분율을 구할 수 있는데 그 관계식은 다음과 같았다.

$$\text{변형적혈구 백분율(\%)} = \frac{\text{현미경 고배율 시야 당 평균 변형적혈구 수}}{58.093 \times aRBC + 51.885} \times 100$$

이 식을 이용하면 비교적 간편하게 대략적인 변형적혈구 백분율을 구할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구의 한계점으로는 최적도말부위의 두껍게 도말 된 부위와 얇게 도말 된 부위에서의 mRBC에 대한 평가가 없었으며 수기법으로 도말슬라이드를 제작하는 경우에 대한 평가가 없다는 점이 있다.

수기법으로 변형적혈구의 백분율을 구하는 것에 비해 약간의 오차는 발생할 수 있으나 거의 모든 검사실에 보급되어 있는 자동혈구분석기만으로 결과값을 얻을 수 있고 대략적인 변형적혈구의 백분율을 구할 수 있다는 점에서 의의가 있을 것으로 생각된다.

【참고문헌】

1. Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med* 2005;353:498-507.
2. Gulati GL, ed. *Blood cell morphology grading guide*. 1st ed. Chicago: American Society of Clinical Pathology Press, 2009:1-33.
3. Choi JM and Lee WS. Development of a poikilocyte measuring method using image analysis software. *Lab Med Online* 2013;3:6-14.
4. Zini G, d'Onofrio G, Briggs C, Erber W, Jou JM, Lee SH, et al. ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *Int J Lab Hematol* 2012;34:107-16.
5. 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.
6. Kim HS, Ko HH, Lee D, Hoon. The Measurement of Red Cell Size in Peripheral Blood Smear -Comparison of Mean Corpuscular Area and Mean Corpuscular volume -. *Ann Lab Med* 2001;21:13-7.
7. Bland JM and Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-10.
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. 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.
10. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and

reticulocytes. Int J Lab Hematol 2007;29:21-41.

【각주】

Table 1. Ranges of each CBC parameters of 110 specimens

CBC parameters	Range (Mean \pm SD)
Hb (g/dL)	4.1~17.0 (10.8 \pm 3.2)
Hct (%)	12.4~49.1 (31.4 \pm 9.0)
aRBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	1.24~5.56 (3.43 \pm 1.04)
MCV (fL)	75.4~118.7 (92.6 \pm 8.0)
MCH (pg)	22.6~39.9 (31.6 \pm 2.7)
MCHC (g/dL)	29.6~36.7 (34.2 \pm 1.4)
RDW (%)	12.0~24.9 (15.2 \pm 2.6)

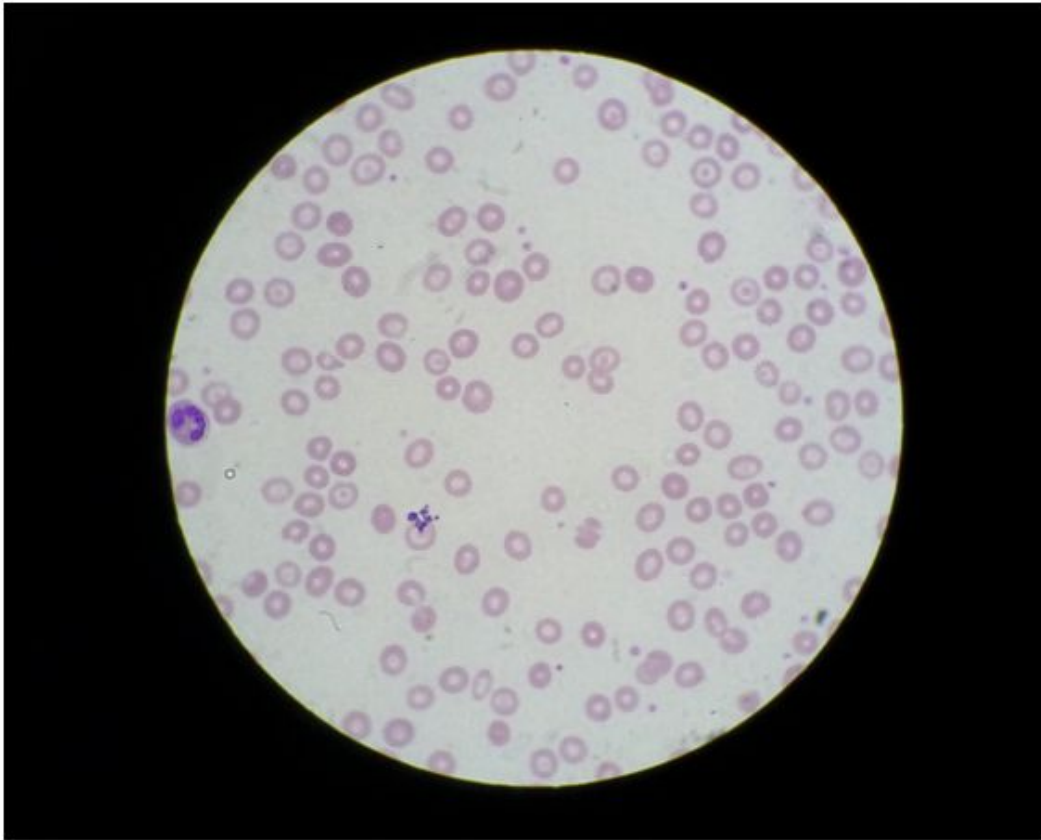


Fig. 1. The picture was captured from peripheral blood smear slide in the ideal zone by digital camera through an ocular lens. ($\times 1000$ magnification)

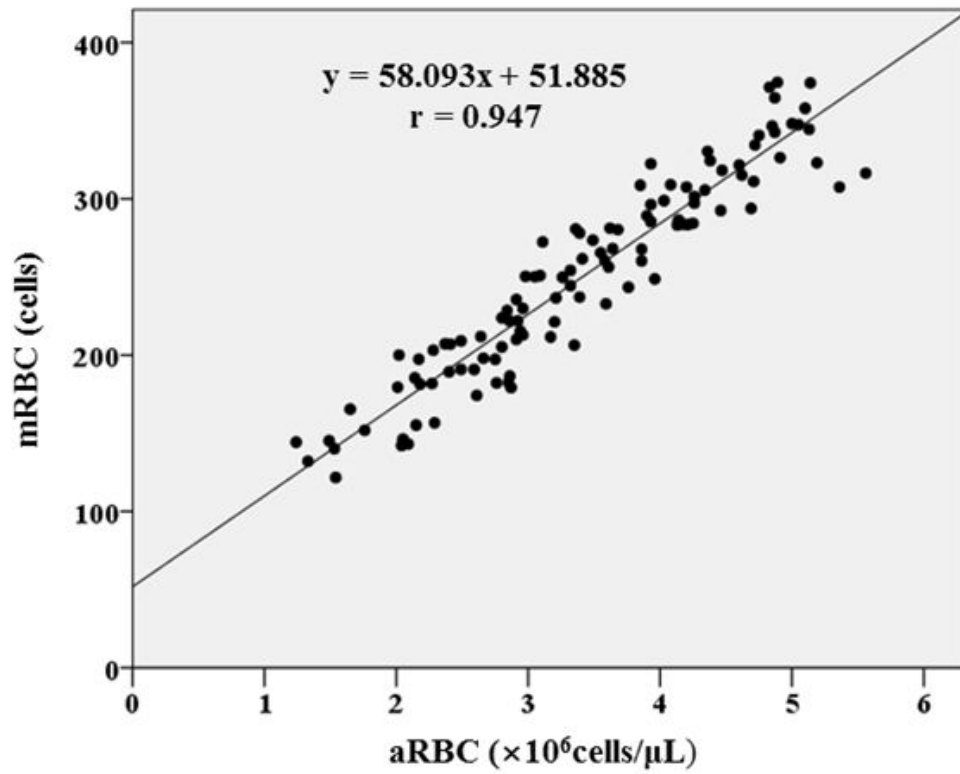


Fig. 2. Correlation of automated red cell count (aRBC) and mean of manual red cell counts (mRBC)

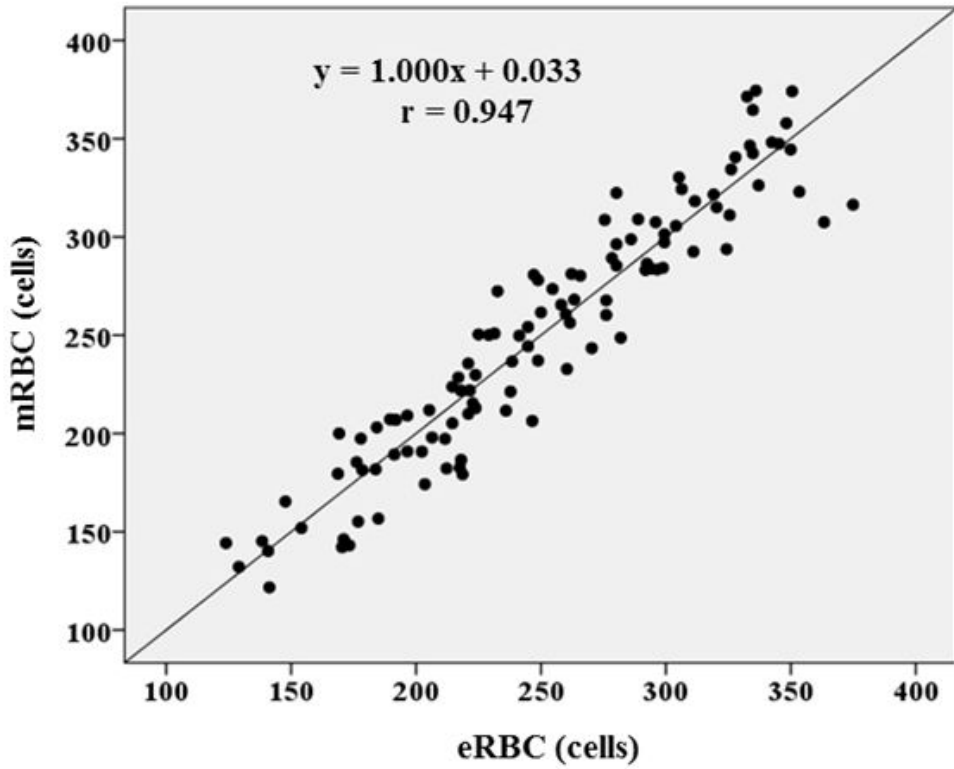


Fig. 3. Correlation of estimated red cell count (eRBC) and mean of manual red cell count (mRBC)

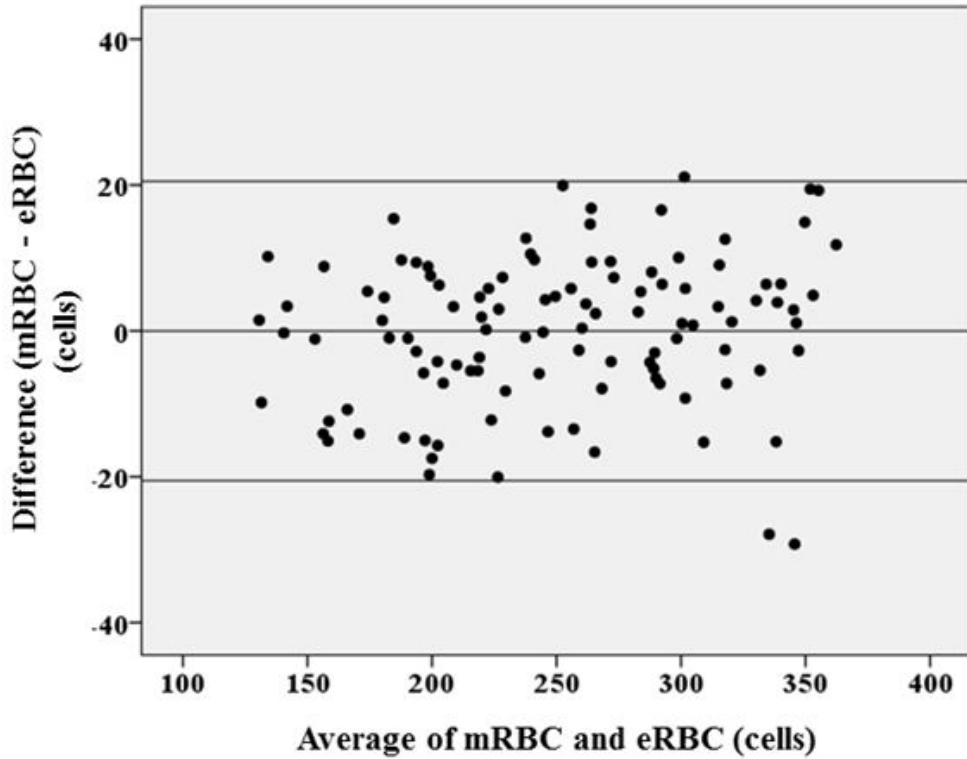


Fig. 4. Difference against mean plot for mRBC and eRBC according to Bland and Altman design. The middle horizontal lines is drawn at the mean difference and the outer horizontal lines are drawn at the mean difference plus and minus 2 times the standard deviation ($\text{mean} \pm 2\text{SD}$) of the differences.

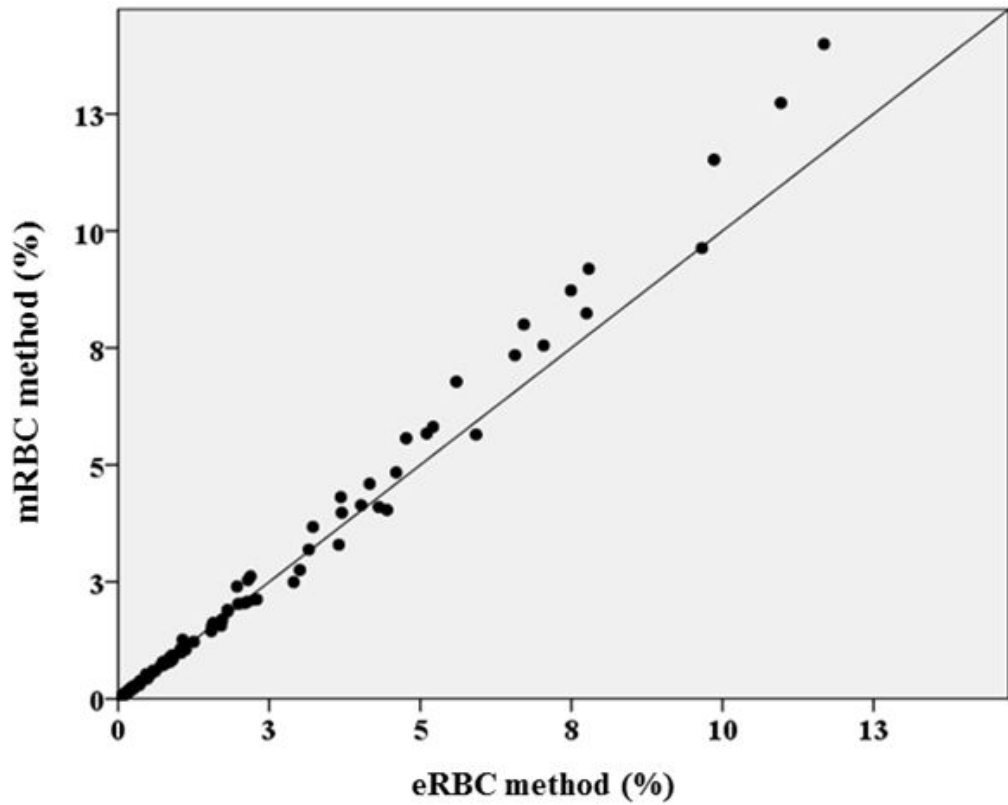


Fig. 5. The regression analysis for percentage of target cells obtained from eRBC method versus percentage of target obtained from mRBC method with the line of equality

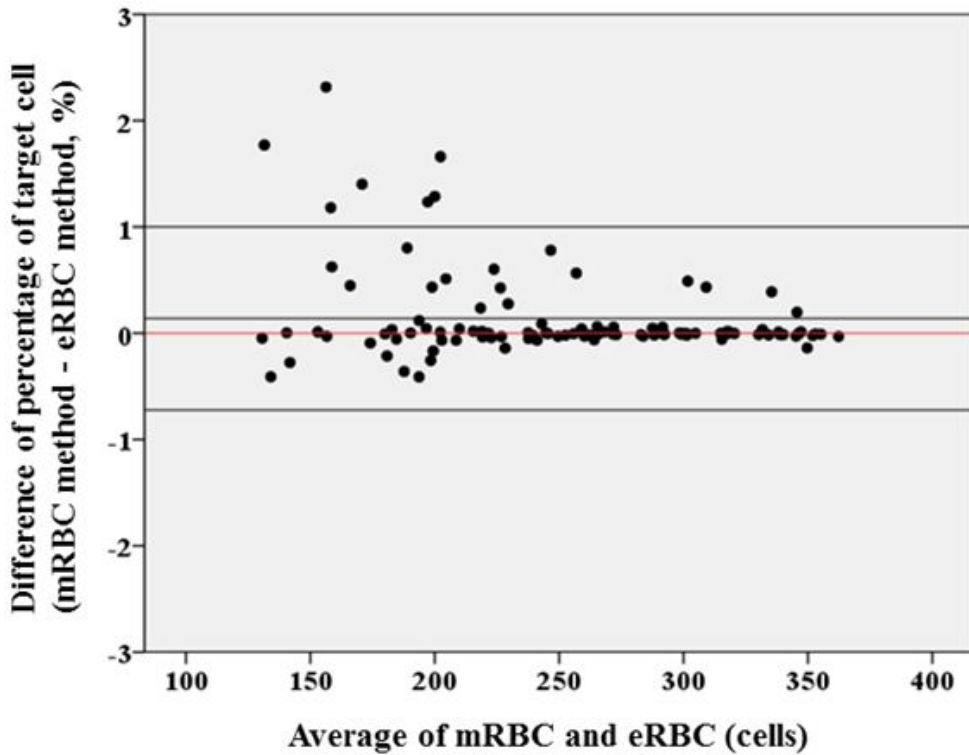


Fig 6. The plot of difference of percentage of target cell between mRBC and eRBC methods against average of mRBC and eRBC. The middle black horizontal line is the mean of the difference. The outer black horizontal lines are drawn at the mean difference plus and minus 2 times the standard deviation ($\text{mean} \pm 2\text{SD}$) of the differences. The red horizontal line is drawn at zero line.