

# 전산화 영상 분석을 이용한 심근 섬유화 측정에서의 영상 보정과 gray level threshold 결정

서울대학교 의과대학 병리학교실 및 서울대학교 의학연구원 심장연구소

이남영 · 박영식 · 정진행 · 서정욱

## Image Standardization and Determination of Gray Level Threshold in the Assessment of the Myocardial Fibrosis by the Computerized Image Analysis

Nam-Young Lee, Young-Sik Park, Jin-Haeng Chung, and Jeong-Wook Seo

Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine; Heart Research Institute, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

The computerized image analysis is a useful tool for the quantitative assessment of histopathologic findings. In contrast to the usual microscopic examination by pathologists, the computerization should be accompanied with the standardization process of the image. We developed an algorithm to standardize images and to determine the optimal gray level threshold, using a myocardial fibrosis model. Sirius red staining was more convenient for the image analysis than Masson's trichrome staining because of a better contrast with the surrounding structures. To get an optimal measurement, light intensity was standardized at each of the fibrosis, myocardium and background. In this study, the most promising method to determine the degree of fibrosis was that of revising the background without tissue to a gray level of 200, obtaining a green component of the color image, revising the myocardial fiber to 163, and defining a partial ratio as fibrosis index when the gray level threshold was 120. These threshold levels and parameters were determined after drawing the binarization index curves according to the change of the gray level threshold and by the morphological examination of the actual binarization figures overlaid to the original color image. Through these processes we could get a consistent result on the myocardial fibrosis and we expect a similar principle applies when we analyze color images in the histopathologic quantitation by computerized image analysis. (Korean J Pathol 1998; 32: 494~503)

**Key Words:** Computerized image analysis, Quality assurance, Myocardial fibrosis

### 서 론

병리 조직을 이용한 진단과 연구는 주로 육안 및 현미경적 형태에 대한 정성적 분석을 통하여 이루어진다. 그러나 심근 조직이나 간 생검에서의 섬유화 정도, 화학요법 후 종양의 괴사정도 등에서는 정성적 분석과 더

불어 정량적 검사가 필수적이다.<sup>1,2</sup> 현미경 판독에 의한 정량적 검사는 주관적인 해석으로 측정 오차가 크다. 이러한 주관적인 해석 단계는 고정, 절편, 염색 등의 표본 제작 과정에 의한 차이를 감안할 수 있고 조직학적 구조가 다양한 현미경 영상을 포괄적으로 판단할 수 있는 장점이 있다. 전산화 영상 분석은 준비된 영상에 대하여 정해진 프로그램에 의해 단시간만에 결과 처리를 할 수 있지만<sup>3~8</sup> 그 영상의 염색 상태가 다른 경우 결과가 일정치 않은 단점이 있다. 따라서 조직의 여러 가지 차이점을 구별할 수 있는 병리 의사의 현미경 판독 능력을 유지하면서 전산화를 수행하기 위해서는 현미경 절편의 두께, 염색 정도 및 영상의 획득과 처리 방법을 표

접 수: 1998년 3월 12일, 게재승인: 1998년 5월 9일

주 소: 서울 종로구 연건동 28, 우편번호 110-799

서울대학교 의과대학 병리학교실, 서정욱

ISSN : 0379-1149

\*본 연구는 서울대학교 의학연구원 연구비(1998)로 충당되었음.

준화해야하고, 분석 과정에서도 영상간의 차이를 보정하는 과정이 필요하며 결과를 해석할 때 이 결과가 신빙성을 가지는지 검토하는 과정 또한 필요하다.<sup>9</sup>

본 연구는 병리 영상 분석에서의 불균일성을 극복하기 위하여 검사의 표준화와 정도 관리의 방법을 제시하고자 한다. 심근 섬유화 모델을 이용하여 시료 제작, 영상 획득 과정 등의 검사 조건을 균일화하는 방법을 검토하였고, 염색의 차이를 정량화하는 알고리즘을 개발하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구 재료

정상 심장과 섬유화가 있는 심장의 횡단면으로부터 얻은 현미경 절편을 이용하였다. 섬유화가 있는 심장은 이소성 동종이식방법으로 만성 심근 섬유화를 유발한 생쥐로부터 얻었다. 심장 조직은 포르말린 고정 후 통상적인 조직포매과정으로 파라핀 블록을 만들었고 4  $\mu$ m 두께로 박절하였다. 각각의 절편은 Sirius red (슬라이드 A, B)와 Masson's trichrome (슬라이드 C, D) 방법으로 염색하였다.

### 2. 컴퓨터 영상 분석 기기

컴퓨터 영상 분석 기기는 200 MHz 펜티엄프로 개인용 컴퓨터를 이용하여 BMI plus 영상 분석 프로그램을 이용하였다.

분석과정의 영상에 대하여 다음의 명칭을 사용하였다.

A0, B0, C0, D0 (배경 영상): 슬라이드 A-D의 조직이 없는 부분에서의 현미경 영상이 CCD 카메라를 통해 컴퓨터 화면에 나타난 영상.

A1-A5, B1-B5, C1-C5, D1-D5 (기초 영상): 슬라이드 A-D에서 현미경 400배의 시야에서 각 5개씩 획득한 컴퓨터 영상.

A1c-A5c, B1c-B5c, C1c-C5c, D1c-D5c (배경 보정 영상): 기초 영상에서 각각 배경 영상을 빼고 일정한 값(200)을 더하여 보정한 (c: corrected) 영상. (예:  $A1 - A0 + 200 = A1c$ )

A1g-A5g, B1g-B5g (녹색 분획 영상): 배경 보정 영상을 색채 분해 방법으로 분리하여 얻은 녹색 (g: green) 분획을 흑백으로 표시한 영상.

A1gm-A5gm, B1gm-B5gm (표준화 녹색 분획 영상): 녹색 분획 영상에서 섬유화가 없는 부분 즉 심근세포 (m: muscle)의 gray level 치를 보정한 흑백영상.

A1s-A5s, B1s-B5s (채도 분획 영상): 배경 보정 영상에 대하여 색채 분해 방법으로 분리하여 얻은 채도 (s: saturation) 분획을 흑백으로 표시한 영상.

A1sm-A5sm, B1sm-B5sm (표준화 채도 분획 영상): 채도 분획 영상에서 섬유화가 없는 부분 즉 심근세포(m: muscle)의 gray level 치를 보정한 흑백영상.

C1br150-C5br150, D1br150-D5br150 (청색-적색 분획

영상): 배경 보정 영상의 각 화소에 대한 청색 (b: blue) 분획 값에서 적색 (r: red) 분획 값을 뺀 후 150을 더한 영상. (예:  $C1b - C1r + 150 = C1br150$ )

C1br150m-C5br150m, D1br150m-D5br150m (표준화 청색-적색 분획 영상): 청색-적색분획 영상에서 섬유화가 없는 부분 즉 심근세포 (m: muscle)의 gray level 치를 보정한 흑백영상.

### 3. 영상 획득 및 배경 보정

현미경 (Olympus BH2) 400배의 시야에서 슬라이드 A-D에서 각각 5개씩의 기초 영상 (A1-A5, B1-B5, C1-C5, D1-D5)을 CCD 카메라를 통해 컴퓨터 화면에 나타내어 tif 파일로 저장하였다. 또한 동일한 유리 슬라이드의 조직이 없는 부분에서 같은 배율로 배경영상 (A0, B0, C0, D0)을 만들었다. 현미경 광원의 밝기, 조리개, 렌즈 등을 일정하게 유지하였고 CCD 카메라 (Toshiba IK-40)와 영상획득 (BMI plus 영상분석 프로그램의 video camera 기능) 과정에서도 일정한 환경을 지정하였다.

기초 영상에서 각각의 배경 영상을 빼고 200 (적절한 밝기)을 더하여 동일한 배경으로 보정한 영상을 만들었다. 이 과정은 영상분석 프로그램의 arithmetic SUB1 기능을 이용하였다.

### 4. Sirius red 표본의 녹색 분획을 이용한 영상 처리

배경 보정 영상 (A1c-A5c, B1c-B5c)을 색채 분해 방법 (RGB split)을 이용하여 녹색 분획 영상을 얻었다. 이 영상의 histogram에서 gray level threshold (GLT)에서 이치화 (binarization)한 영역의 백분율 (이치화율)을 구하였다. 이 때 GLT는 0~255 gray level 구간에서 5 gray level 간격으로 하였고 각 GLT에 대한 백분율을 그 GLT값에서의 이치화율로 하여 GLT에 대한 이치화율의 그래프를 그렸다.

녹색 분획 영상에서 섬유화가 없는 부분, 즉 심근 세포 구역을 각 5개씩 선택하여 총 50개 구역의 평균 gray level을 산술 평균하여 섬유화가 없는 부분의 표준 gray level을 정하였다. 각 녹색 분획 영상에서 섬유화가 없는 부분의 평균 gray level에 표준 gray level과 이 값의 차이를 더하여 표준화 녹색분획 영상 (A1gm-A5gm, B1gm-B5gm)을 만들었다.

표준화 녹색분획 영상에서 GLT에 대한 이치화율을 측정하여 그래프를 그렸다.

### 5. Sirius red 표본의 채도 분획을 이용한 영상 처리

배경 보정 영상 (A1c-A5c, B1c-B5c)에 대하여 색채 분해 방법으로 분리하여 얻은 채도 분획을 흑백으로 표시한 채도 분획영상 (A1s-A5s, B1s-B5s)을 얻었다.

각 채도 분획 영상에서 심근세포구역의 평균 gray level을 산술 평균하여 섬유화가 없는 부분의 표준 gray level을 정하였다. 녹색 분획 영상에서와 같은 방법으로 각 채도 분획 영상의 섬유화가 없는 부분의 평균 gray

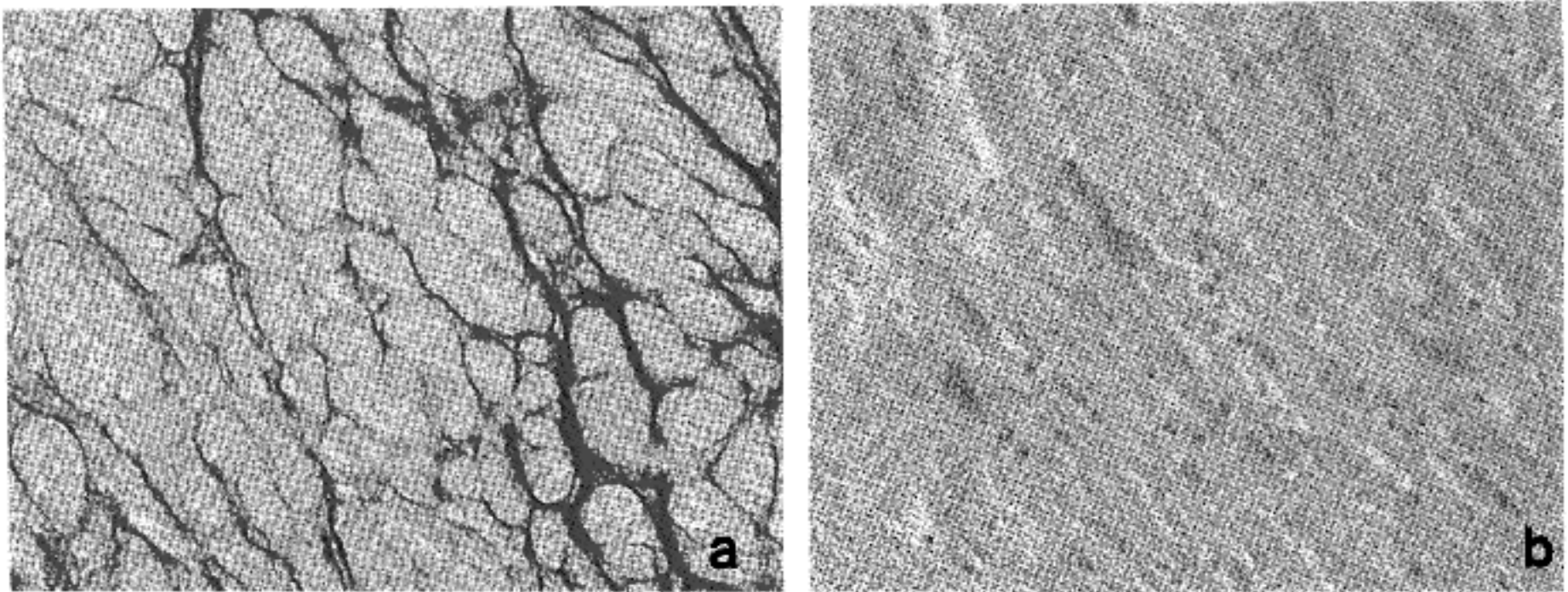


Fig. 1. a. Microphotograph of myocardium stained with Sirius red (image B1c). Collagen fibers are stained red and myocytes, light yellow. Background was compensated with image of a glass slide. Bar represents 50  $\mu$ m. b. Microphotograph of myocardium stained with modified Masson's trichrome (image D1br150). Collagen fibers are stained blue and myocytes, yellow and nuclei, red. Background was compensated with image of a glass slide. Bar represents 50  $\mu$ m.

level에 표준 gray level과 이 값의 차이를 더하여 표준화 채도 분획 영상 (A1sm-A5sm, B1sm-B5sm)을 만들었다.

표준화 채도 분획 영상을 GLT에 대한 이치화율을 측정하여 그래프를 그렸다.

6. Masson's trichrome 표본의 청색 분획과 적색 분획의 차이를 이용한 영상 처리

배경 보정 영상 (C1c-C5c, D1c-D5c)의 각 화소에 대한 청색 분획 값에서 적색 분획 값을 뺀 후 150을 더한 영상을 얻었다 (청색-적색 분획 영상, C1br150-C5br150, D1br150-D5br150).

청색-적색 분획 영상에서 섬유화가 없는 부분, 즉 심근 세포 구역을 5개씩 선택하여 총 50개 구역의 평균 gray level을 산출 평균하여 섬유화가 없는 부분의 표준 gray level을 정하였다. 각 청색-적색 분획 영상에서 섬유화가 없는 부분의 평균 gray level에 표준 gray level과 이 값의 차이를 더하여 표준화 청색-적색 분획 영상 (C1br150m-C5br150m, D1br150m-D5br150m)을 만들었다.

결 과

1. 영상 획득 및 배경 보정

슬라이드 A-D에 대하여 각 5개씩의 기초 영상과 조적이 없는 부분의 배경 영상을 얻고 일정한 배경으로 보정하였다. 이들 영상은 기초 영상에 비하여 균일한 화질임을 확인할 수 있었다.

2. Sirius red 표본의 녹색 분획을 이용한 영상 처리

배경 보정 영상 (A1c-A15, B1c-B5c, Fig. 1)을 색채 분해 방법으로 분리하여 얻은 녹색 분획 영상 (A1g-A5g,

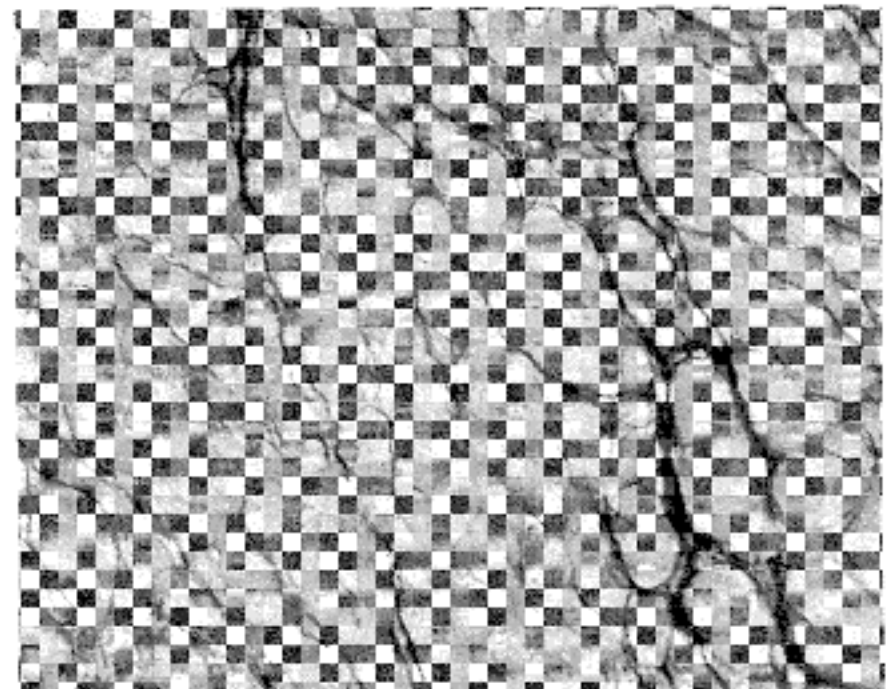


Fig. 2. Green fraction of image B1c (image B1g). Red color from the original image has low green value and appears dark in this figure. Yellow and white has high green value and appears light in this figure.

B1g-B5g, Fig. 2)을 얻었다. 녹색 분획 영상의 GLT에 따른 이치화율 변화는 A군과 B군이 서로 다르게 나타났다 (Fig. 3). 섬유화가 미약한 정상 심장인 A 군은 GLT 값 150~190 사이에서 S자형 곡선을 그렸고, 섬유화가 현저한 B군은 GLT 값 5~180 사이에서 S자형 곡선을 나타냈다. 낮은 GLT에서는 이치화율이 0%로 나타나고, 섬유화 영역에서는 GLT값 변화에 따라 이치화율이 증가하였다. 심근 세포 영역의 GLT값에서는 이치화 지수가 급속히 증가하며 그 후에는 100%가 되었다. 두 표본에서 심근 세포 영역은 거의 비슷한 기울기를 나타냈

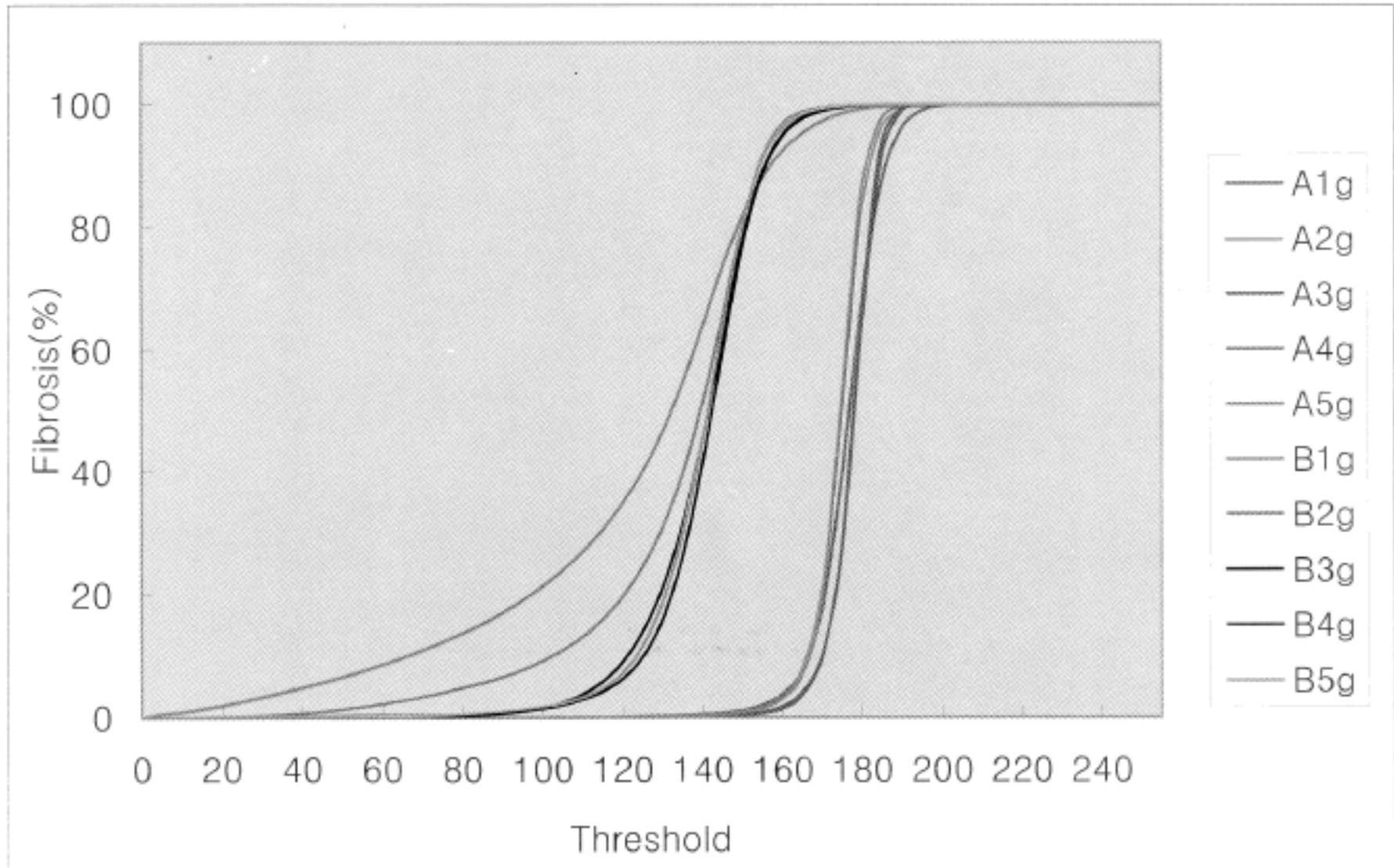


Fig. 3. Changes of the binarization index (percentage of area with gray value less than the threshold) are plotted according to the change of the threshold of gray level from green fraction images (A1g-A5g, B1g-B5g).

지만 GLT값은 30 gray level 정도의 차이를 보였다.

녹색 분획 영상에서 섬유화가 없는 부분, 즉 심근 세포 구역을 5개씩 선택한, 총 50개 구역의 평균 gray level은 163이었고 이를 섬유화가 없는 부분의 표준 gray level로 정하였다. 각 녹색 분획 영상에서 섬유화가 없는 부분의 평균 gray level을 표준 gray level과 일치시킨 표준화 녹색분획 영상에서 GLT 값에 따른 이치화율의 변화를 표시하였다 (Fig. 4). 확연히 구분되던 A, B군의 곡선이 중간 값으로 모였다.

### 3. Sirius red 표본의 채도 분획을 이용한 영상 처리

배경 보정 영상 (A1c-A5c, B1c-B5c)에서 색채 분해 방법으로 분리하여 얻은 채도 분획을 흑백으로 표시한 채도 분획영상 (A1s-A5s, B1s-B5s, Fig. 5)을 얻었다. 채도 분획영상에서 섬유화가 없는 부분의 평균 gray level은 95이었고 이를 섬유화가 없는 부분의 표준 gray level로 정하였다. 녹색분획 영상에서와 같은 방법으로 얻은 표준화 채도분획 영상에 대하여 GLT 값에 따른 이치화율의 변화를 표시하였다 (Fig. 6).

### 4. Sirius red 표본의 녹색 및 채도 분획영상을 이용한 섬유화 지수 측정

표준화 녹색분획 영상으로부터 얻은 이치화율 그래프 (Fig. 4)로부터 완만한 증가를 보이는 섬유화 부분의

GLT는 100~140으로 판단하였고, GLT 값을 110, 120, 130으로 했을 때 이치화도를 그렸다 (Fig. 7~9). 이들 이치화도를 판독하여 적절한 GLT값을 110~130으로 결정할 수 있었으며 GLT 120에서의 영상 B1gm (Fig. 8)의 이치화율이 섬유화율에 근접하였고 22%로 판독하였다. GLT 값의 변화에 따른 10개 영상에서의 이치화율은 Table 1과 같았으며 이들 중 GLT 120에서의 이치화율을 섬유화율로 결정하였다. 표준화 채도분획 영상에서 Fig. 8과 같이 이치화율 22%를 나타내는 GLT는 132이었으며 그 때의 이치화 영상은 Fig. 10과 같았다. 채도 분획으로 이치화한 Fig. 10은 녹색분획을 이용한 경우 (Fig. 8)에 비하여 세포질에 음영이 나타났으며 이는 위 양성 부분으로 판독할 수 있었고 그만큼의 위음성이 있음을 예상할 수 있었다.

### 5. Masson's trichrome 표본에서의 영상 처리

배경 보정 영상 (C1c-C5c, D1c-D5c)의 각 화소에 대한 청색 분획 값에서 적색분획 값을 뺀 후 150을 더한 청색-적색 분획영상 (C1br150-C5br150, D1br150-D5br150)에서 섬유화가 없는 부분의 평균 gray level은 99이었다. 섬유화가 없는 부분의 gray level을 99로 보정한 표준화 청색-적색 분획영상 (C1br150m-C5br150m, D1br150m-D5br150m)을 얻었다. 청색 분획이 적색 분획보다 클수록 청색이 분명하였으며 섬유화가 강하였다. 표준화 청

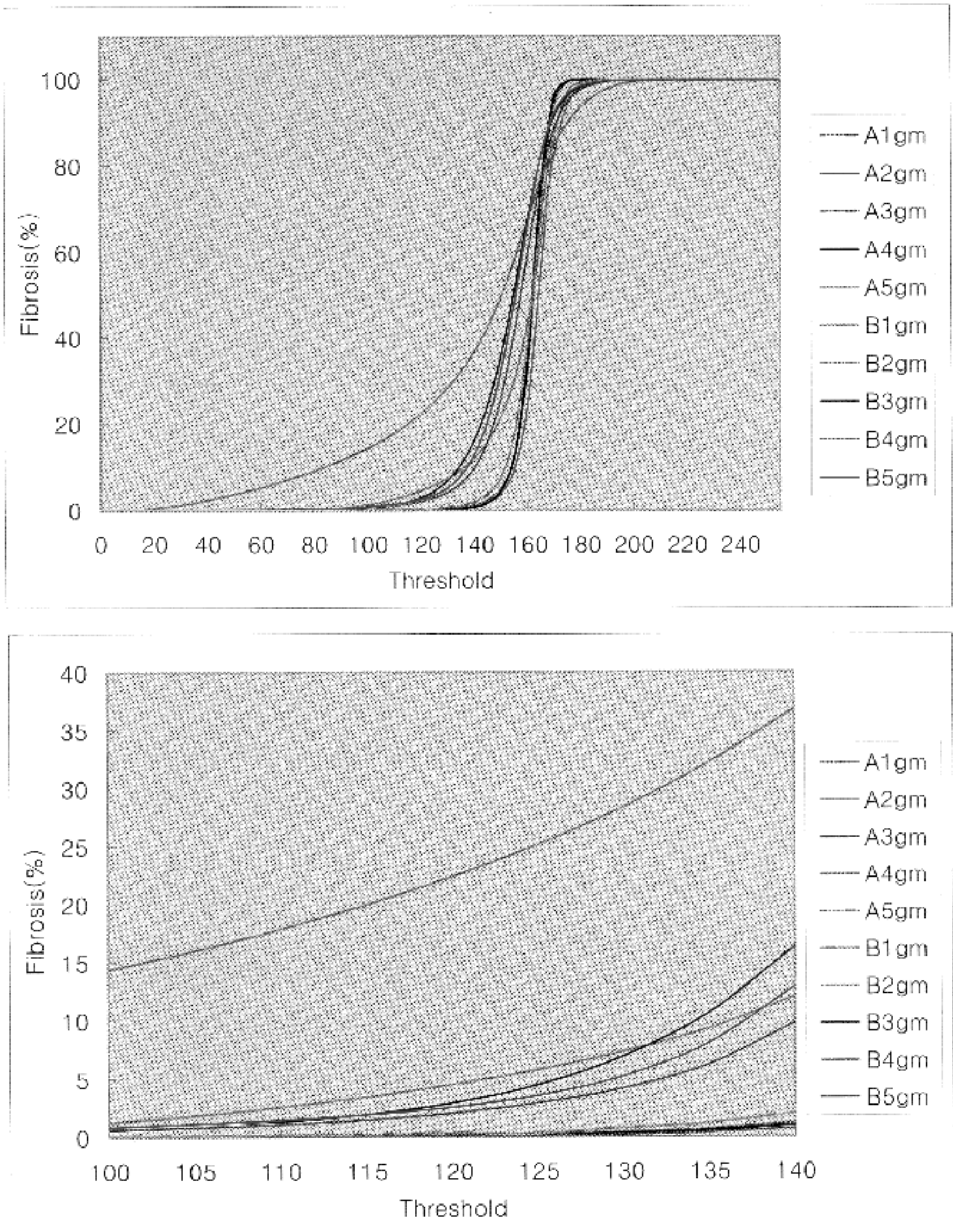


Fig. 4. a. Changes of the binarization index are plotted according to the change of the threshold of gray level from green fraction images after correction based on gray values at the myocytes (A1gm-A5gm, B1gm-B5gm). b. Magnification of the figure 4A between gray levels 100~140, where binarization indices slope in 40 degrees or less.

색-색 분획영상에 대하여 GLT 값에 따른 이치화율의 변화는 Fig. 11과 같았다.

섬유화 정도를 나타내는 것으로 판독한 이치화율에서 GLT는 129였으며 그 때의 영상은 Fig. 12와 같았다.

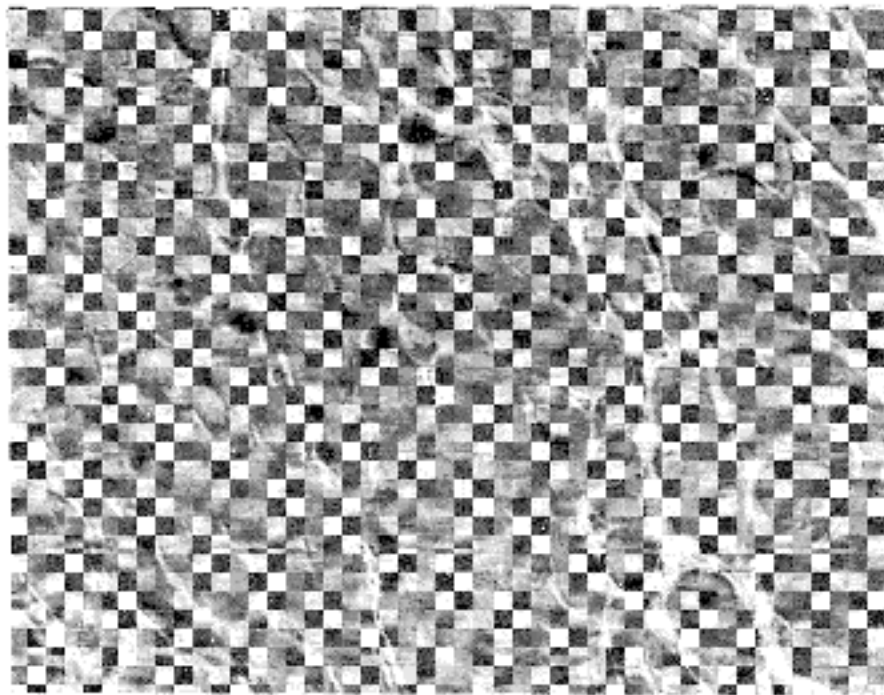


Fig. 5. Saturation fraction of image B1c (image B1s). Red color from the original image has high saturation value and appears light in this figure. Yellow and white has low saturation value and appears dark in this figure.

## 고 찰

진산화 영상 분석은 일정한 기준에 의해 단시간에 많은 양의 분석을 수행할 수 있다는 장점이 있다. 색 특성의 차이를 이용한 분석은 색상, 채도, 명도, 및 적색, 녹색, 청색의 여섯 가지 색 성분 및 이들의 조합을 이용할 수 있다. 이들 색 성분은 일반적으로 각각 0~255의 수치로 표시되며 각 화소의 색성분치를 단색 (흑백)영상으로 나타낸다. 영상 분석은 단색 영상에 대한 역치를 설정하고 역치를 기준으로 이치화하여 분석하게 된다. 이치화로 선택된 영역의 면적을 표시하는 것은 세포수 자동 측정<sup>10,11</sup>과 함께 영상 분석의 대표적인 방법이다. 간경변증이나<sup>1</sup> 심근 섬유화<sup>2-5,12,13</sup> 등에서 섬유화 정도 분석을 예로 들 수 있고 그 밖에도 여러 가지 면역조직 화학적 염색의 양성 면적 측정에 응용할 수 있으며<sup>6</sup> 조직에서의 호르몬 수용체의 발현성도를 측정하는데에도 사용할 수 있다.

병리조직학적 검사는 염색 정도뿐만 아니라 세포와 조직의 형태, 분포 등 다양한 정보를 종합적으로 판단하는 과정이어서 이 모든 과정을 진산화하기는 어렵다. 그러나 특성 염색으로 표시된 영역을 구별하고 구별된 영역의 절대면적 또는 그 비율을 계산하는 것은 비교적 용이하게 할 수 있고 편리하게 이용되고 있다. 따라서 그러한 과정을 수행하는데 적합한 염색 방법을 찾는 것

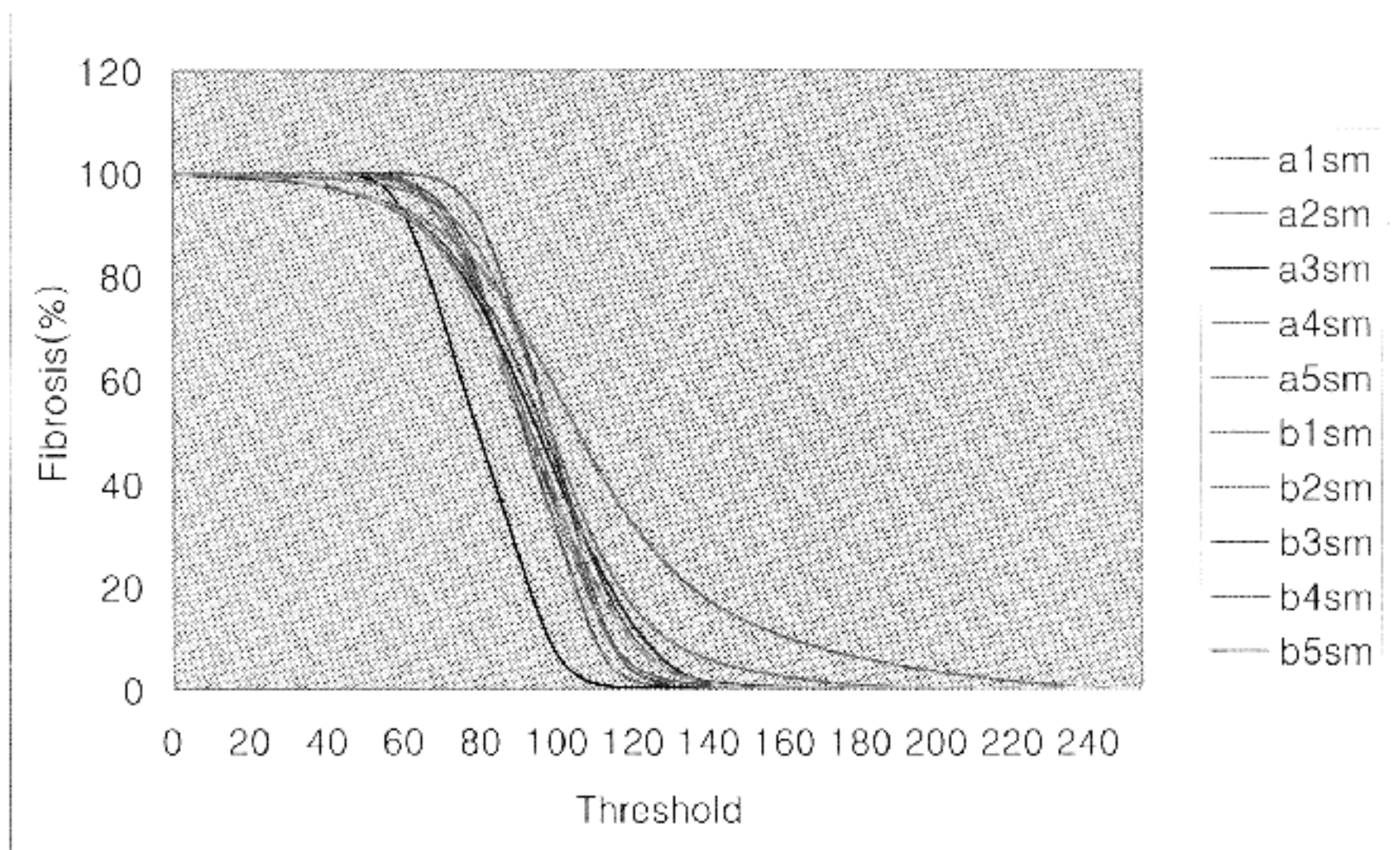


Fig. 6. Changes of the binarization index are plotted according to the change of the threshold of gray level from saturation fraction images after correction based on gray values of the myocytes (A1sm-A5sm, B1sm-B5sm).

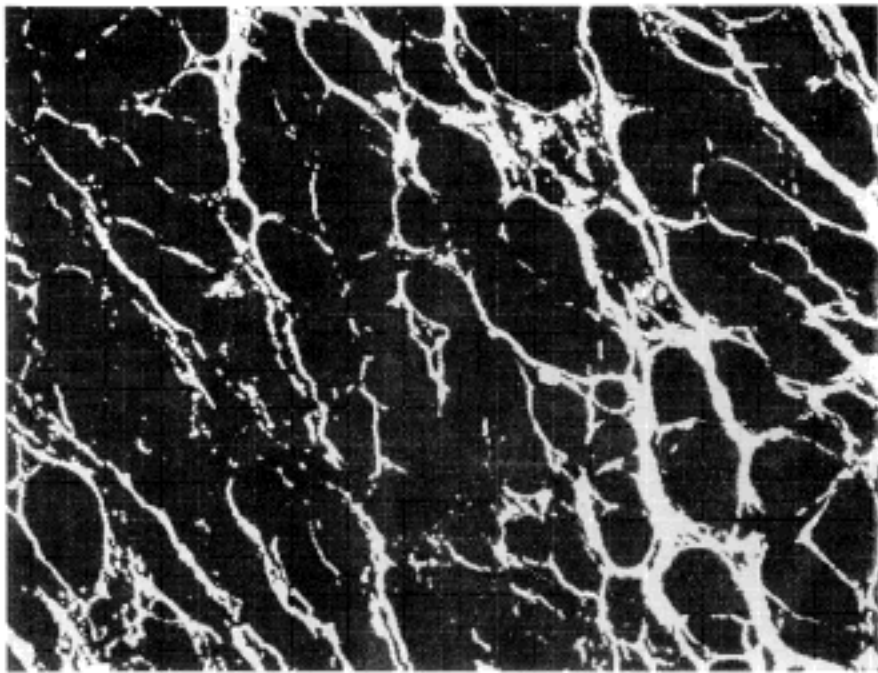


Fig. 7. Binarization image at GLT of 110 from the corrected green image (B1gm).

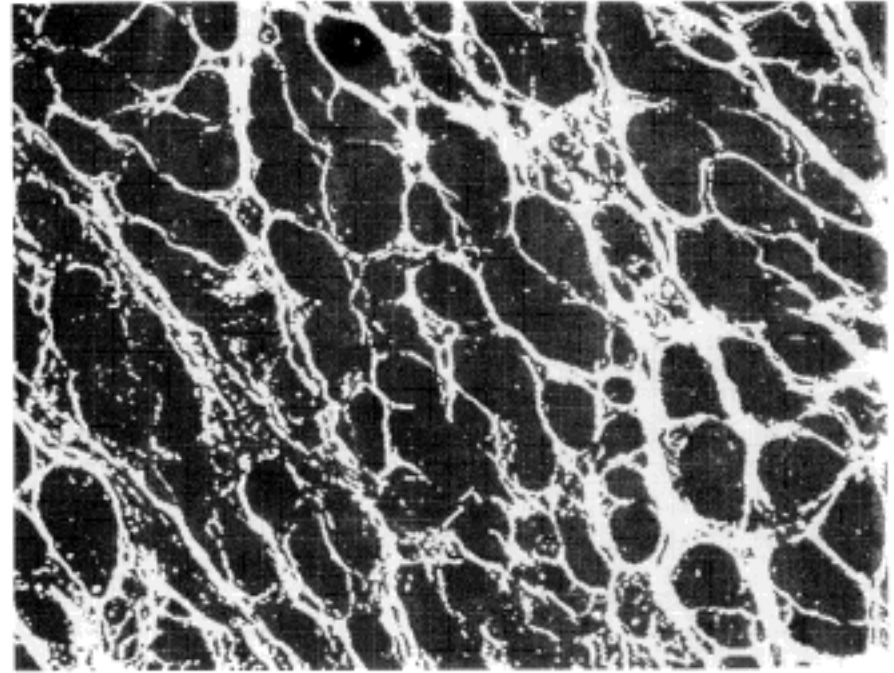


Fig. 9. Binarization image at GLT of 130 from the corrected green image (B1gm).

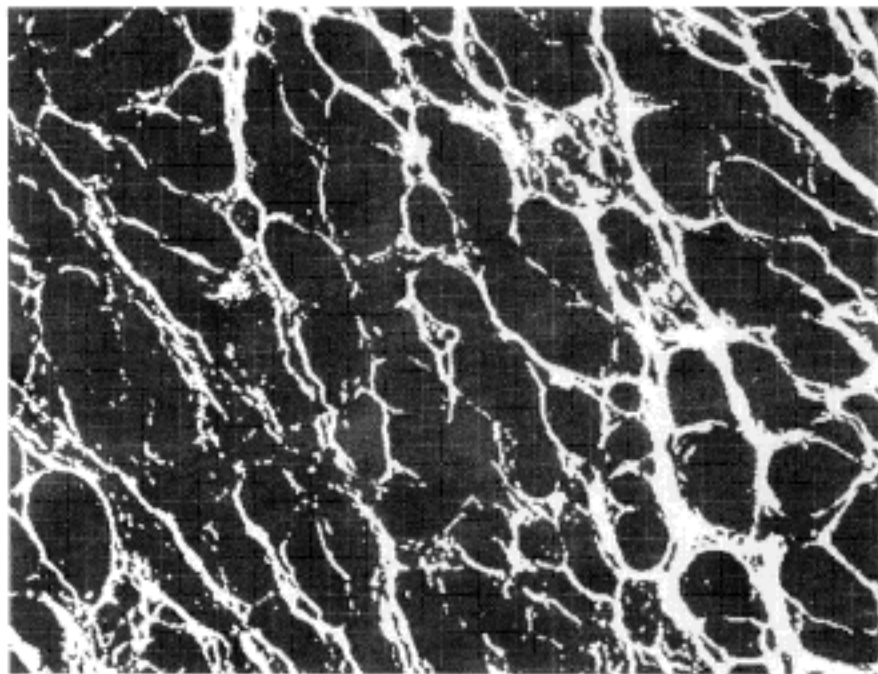


Fig. 8. Binarization image at GLT of 120 from the corrected green image (B1gm). Binarization index is 22%.

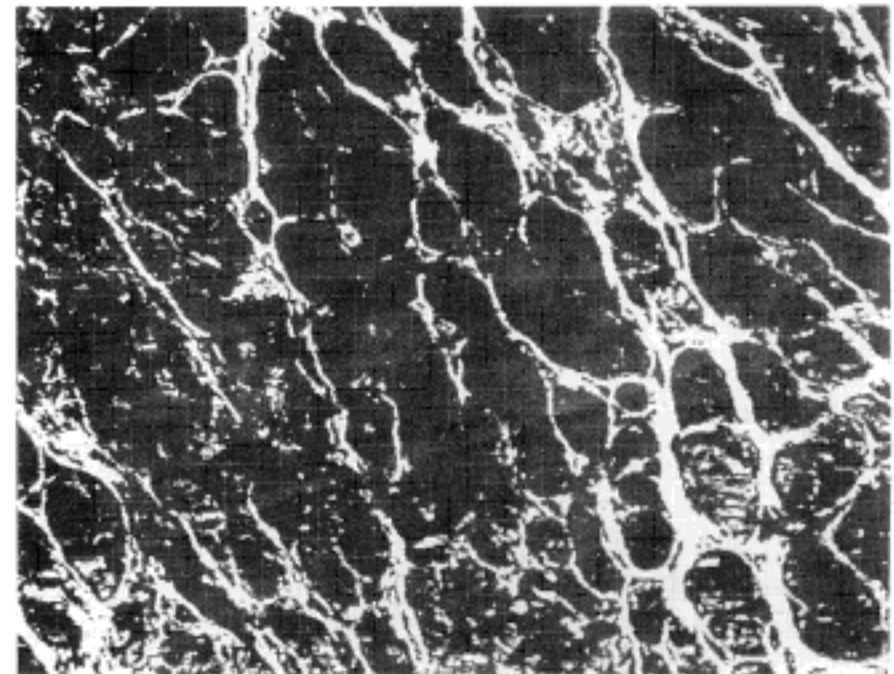


Fig. 10. Binarization image at GLT of 132 from the corrected saturation image (B1sm) where binarization index is 22%. Compared to figure 8, there is false positive staining at the cytoplasm of myocytes.

Table 1. The binarization index according to the gray level threshold of 100~140 (rows) from 10 green fraction images after correction based on gray values at the myocytes. (A1gm-A5gm, B1gm-B5gm: columns)

| Threshold | A1   | A2   | A3   | A4   | A5   | B1    | B2    | B3    | B4   | B5    |
|-----------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|------|-------|
| 100       | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.06 | 14.32 | 1.22  | 0.51  | 0.61 | 0.78  |
| 105       | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.09 | 15.93 | 1.81  | 0.79  | 0.80 | 1.06  |
| 110       | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.14 | 17.83 | 2.54  | 1.23  | 1.07 | 1.40  |
| 115       | 0.06 | 0.04 | 0.04 | 0.03 | 0.21 | 19.94 | 3.41  | 1.88  | 1.46 | 1.85  |
| 120       | 0.11 | 0.06 | 0.09 | 0.06 | 0.31 | 22.35 | 4.47  | 2.86  | 2.04 | 2.48  |
| 125       | 0.19 | 0.11 | 0.16 | 0.11 | 0.25 | 25.12 | 5.74  | 4.41  | 2.90 | 3.48  |
| 130       | 0.34 | 0.20 | 0.28 | 0.19 | 0.71 | 28.34 | 7.30  | 6.87  | 4.16 | 5.14  |
| 135       | 0.63 | 0.40 | 0.51 | 0.36 | 1.13 | 32.19 | 9.29  | 10.62 | 6.22 | 7.99  |
| 140       | 1.16 | 0.81 | 0.99 | 0.71 | 1.99 | 36.80 | 12.03 | 16.30 | 9.78 | 12.84 |

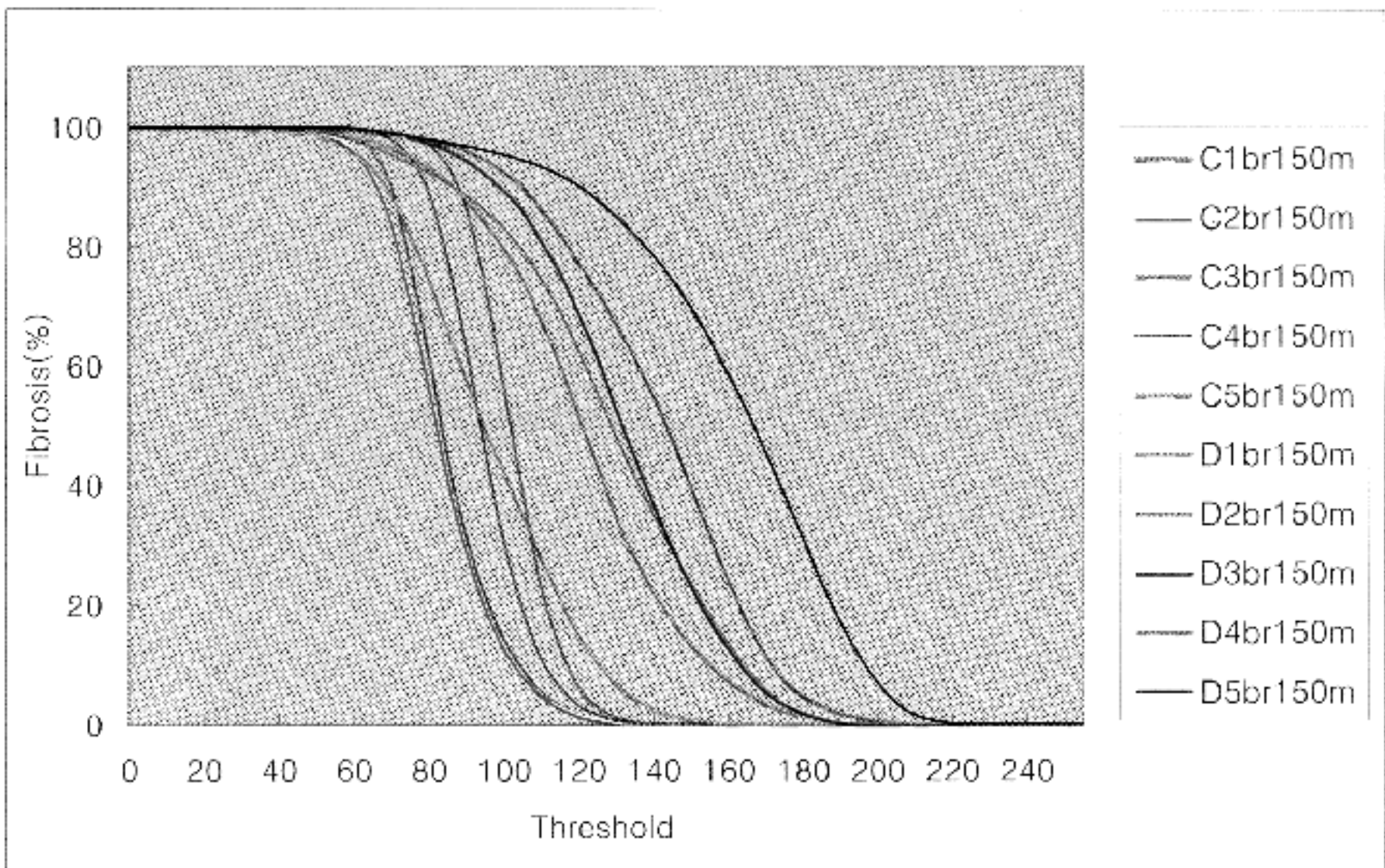


Fig. 11. Changes of the binarization index (percentage of area with gray value over the threshold) are plotted according to the change of the threshold of gray level from the composite image from modified Masson's trichrome staining. Blue fraction value of each pixel was subtracted by red fraction value and added with 150 (C1br150m-C5br150m, D1br150m-D5br150m).

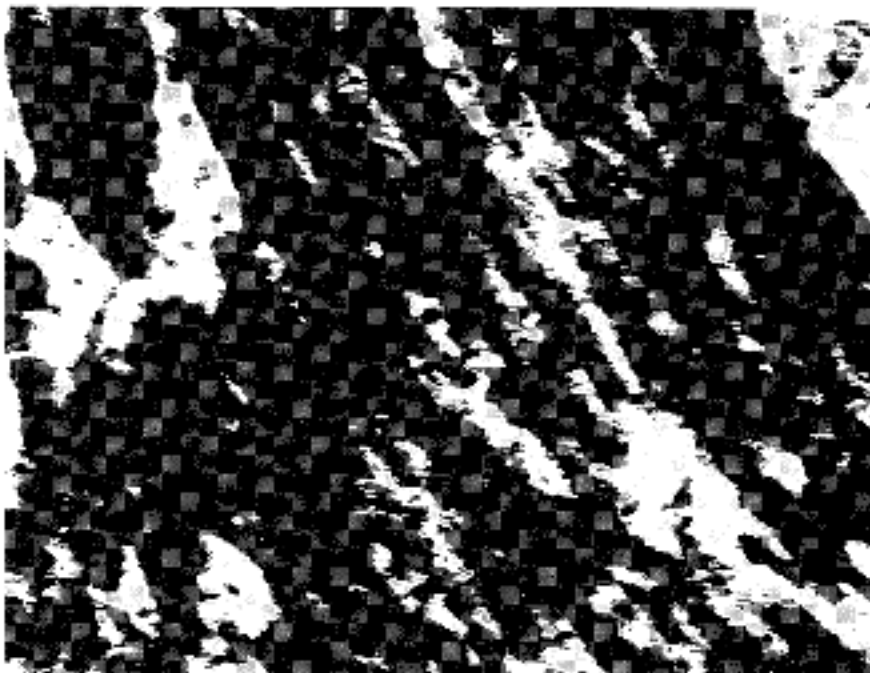


Fig. 12. Binarization image at GLT of 129 from myocyte composite image D1br150m where binarization index is 22%. Compared to figures 1B and 7-10, interstitial fibrosis is poorly delineated.

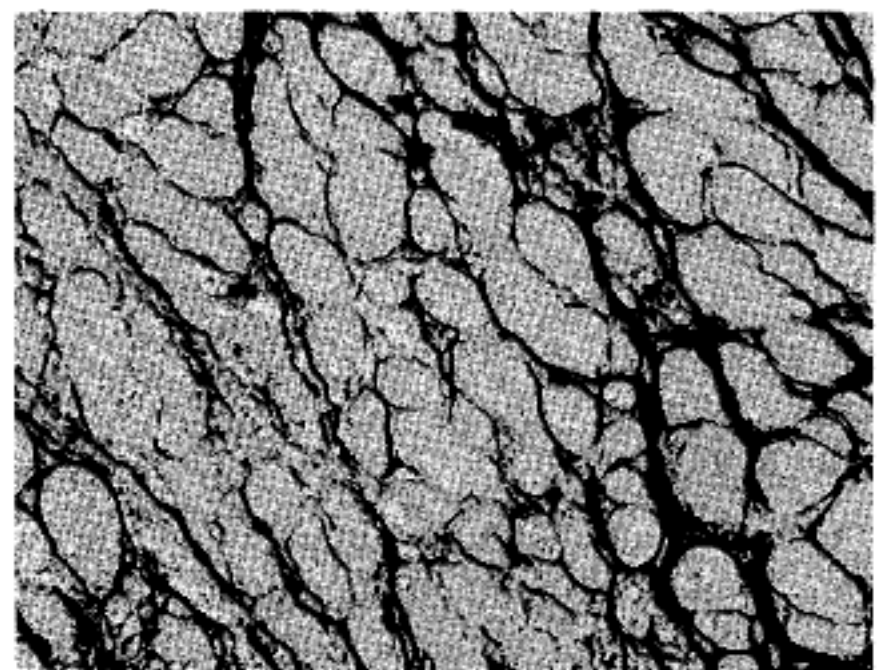


Fig. 13. Inversion of binarization image at GLT of 120 (Fig. 8) from the corrected green image (B1gm) is overlaid to the original image B1c.



은 영상 분석에서 매우 중요하다. 섬유화에 대한 염색은 통상적으로 Masson's trichrome 염색이 많이 쓰이고 있다.<sup>3</sup> 섬유화를 나타내는 청색을 근육 세포의 붉은 색과 구별하는 것은 현미경 판독에서는 용이하나 전산화 영상 분석에서는 몇 가지 문제점이 있다. 우선, 단색 분획으로는 청색과 적색이 구별되지 않았다. 그러나 청색 분획과 적색 분획의 차이를 계산함으로써 섬유화가 구별되는 함수를 찾을 수 있었다. 구별 함수에 가중치를 주거나 다른 함수를 찾는 것도 시도할 수 있을 것이다. 또 다른 문제는 중간 단계의 색 (보라색) 영역이 많이 나타나고 염색 과정의 변화에 영향을 많이 받는다는 점이다. 이 점은 검사자의 판단으로 해결할 수 밖에 없었다. Sirius red 염색은 Masson's trichrome 염색보다 색의 대조는 약하지만 섬유화 부분의 전산화 영상분석에는 용이하여 많이 사용된다.<sup>4</sup> 즉, 붉은 색의 보색인 녹색분획 영상을 이용하여 붉은 섬유화 조직과 심근 세포의 연노랑 색을 쉽게 구별할 수 있었다. 또한 붉은 색이 채도가 높다는 장점을 이용하여 채도 분획을 쓸 수도 있었다. 조직에 검은 부분이 섞여 있다면 녹색분획을 쓰는데 장애가 된다. 채도 분획은 붉은 색에 대해서만 한정적으로 쓸 수 있다.

여러 영상에 대한 분석을 재현성 있게 하기 위해서는 영상의 보정이 필요하다. 현미경 표본 제작과정에서 나타나는 절편의 두께, 염색액의 농도와 온도 등에 의해 나타나는 염색 농도 등에 따라 표준화가 필요하다. 같은 표본에서도 컴퓨터로 영상을 취득하는 과정에서 차이를 보인다. 현미경을 통하여 CCD 카메라로 영상을 얻을 때 영상의 농도가 달라질 수 있다. 이들에 대한 오차를 종합적으로 해결하는 것이 영상 보정의 목적이다. 영상의 부분에 따라 빛의 양이 다른 것은 조직이 없는 상태에서 나타나는 빛의 양을 빼줌으로써 해결할 수 있다. 이 경우 조직이 없는 배경 값을 지정해야 하고 이는 200정도가 적당하였다. 이 기능은 각 화소에서의 각 분획 gray scale 값에서 배경치를 빼고 200을 더하는 수식으로 가능하였다. 조직이 있는 부분에서는 측정하고자 하는 부분과 배경의 색 분획의 gray scale 값을 표준화하는 것이 필요하다. 측정하고자 하는 부분을 보정하는 것보다는 배경 조직을 표준화하는 것이 유용하였으며 본 연구에서는 섬유화가 없는 부분의 심근 세포가 표준화의 대상이었다. 이 과정으로 현미경 표본의 두께, 염색 농도, 빛의 밝기 등을 종합적으로 보정할 수 있었다.

영상 보정의 원리는 GLT 값에 따른 이치화율의 변화를 도식화한 Fig. 3, 4를 통하여 이해할 수 있다. 낮은 GLT에서는 이치화율 (GLT보다 낮은 gray level 값을 가진 부분의 비율)이 0%였다. GLT가 약간 높아지면서 완만한 상승을 보이는 구간이 나타난다. 이 부분에서의 이치화 영상 (Fig. 7~9)을 보면 이 변화가 섬유화 부분에 대한 민감도에 따라 나타남을 알 수 있다. GLT가 더 높아짐에 따라 이치화율은 급격히 증가하는데 (Fig. 8) 이는 섬유화 영역만이 아니라 심근 세포 부분이 같이

선택되기 때문이다. Fig. 3에서는 A군과 B군의 곡선이 30 gray level 정도의 차이를 나타내고 있음을 알 수 있다. 이 차이에 대한 정확한 계산은 심근 세포 구역을 지정하여 이들 구역의 평균 gray level 값으로 표준화하였다. 이렇게 표준화한 결과를 보면 두 개의 군이 평균 gray level 값으로 평행 이동했음을 알 수 있다 (Fig. 4). 본 연구에서는 평균 gray level 값을 모든 영상에 대한 평균값으로 하였지만 측정하고자 하는 영상이 많을 때는 표본 몇 개만 측정해서 표준화 값을 정해도 무방하다고 생각된다. Fig. 3에서와 같이 심근 세포 부분의 곡선의 기울기가 일정하면 평행이동으로 표준화가 가능하나 Fig. 11에서와 같이 기울기가 일정치 않으면 표준화가 어렵고 따라서 결과의 신뢰도가 떨어진다.

영상 보정을 마친 상태에서 GLT 값에 따른 이치화율의 변화를 도식화한 Fig. 4에서 낮은 GLT에서의 완만한 증가 부분에서 이치화율을 읽으면 섬유화율로 쓸 수 있다. 이 영역에서 어떤 GLT 값이 가장 정확한지는 이치화 영상을 비교하여 결정할 수 있다 (Fig. 7~9). 그러나 엄밀한 의미에서 가장 정확한 GLT 값은 알 수가 없다. 이 영역에서 일정한 수치를 취하면 될 것이다 (Table 1). 이치화 영상을 만들어 보고 영상을 비교해서 달라진 부분의 특성을 보면서 적당한 GLT 값을 결정할 수 있다 (Fig. 8, 10, 12). 또한 이치화 영상을 기초 영상에 덧붙여 봄으로써 확인할 수 있다 (Fig. 13).

본 연구에서 섬유화 정도를 결정하는 방법으로 가장 좋은 방법은 Sirius red 염색 표본에 대하여 조직이 없는 배경을 200으로 보정하고, 녹색 분획 영상을 얻어, 심근 세포를 이 부분의 평균인 163으로 보정한 후 120 이하의 값을 갖는 부분의 비율을 섬유화율로 정하는 것이라 판단하였다. Sirius red 염색의 채도 영상이나 Masson's trichrome 염색 후 청색 분획에서 적색 분획치를 뺀 값이 5 이상인 부분을 택하는 것도 차선택이 될 수 있었다. 자동 영상 분석의 정도 관리를 위해서 배경 영상을 이용한 표준화가 매우 중요하며, 표준화는 본 연구에서와 같은 면적 측정에서 뿐만 아니라 세포수 측정 등에서도 활용될 수가 있을 것이다.<sup>14</sup> 또한 GLT 변화에 따른 이치화율 변동 곡선을 그려보고 이치화 영상을 판독하는 방법으로 적절한 GLT를 결정할 수 있을 것이다.

## 결론

형태학에서의 전산화 영상 분석 방법 (computerized image analysis)은 형태를 객관적으로 그리고 분석적으로 평가하는 작업이다. 통상의 현미경 판독에서는 표본 제작의 불균일성과 측정 오차를 주관적인 해석으로 보완하게 된다. 전산화 영상 분석 방법은 이러한 보완 과정이 없으므로 표본의 두께, 염색 정도 및 영상의 획득과 처리 방법을 표준화해야 정확한 검사가 가능하다. 본 연구에서는 병리 영상 분석에서의 불균일성을 극복하기 위하여 시료 제작, 영상 획득 과정 등의 검사 조건

을 균일화하는 방법을 찾고자 심근 섬유화 모델을 이용하여 주어진 영상에서의 색의 차이를 정량화하는 알고리즘과 검사의 표준화 방법을 개발하였다.

섬유화 부분이 뚜렷하게 나타나는 Sirius red 염색이 Masson's Trichrome 염색보다 전산화 영상 분석에 적합함을 알 수 있었다. 영상의 부분에 따라 빛의 양이 다른 것은 조직이 없는 상태에서 나타나는 빛의 양을 빼줌으로써 해결 할 수 있었다. 본 연구에서 섬유화 정도는 Sirius red 염색 표본에서 조직이 없는 배경 영상을 빼고 200을 더하여 보정하고, 녹색 분획 영상을 얻어, 심근 세포 영역의 gray level의 평균인 163으로 보정한 후 120 이하의 값을 갖는 부분의 비율로 판단하였다. 이러한 방법과 역치의 선택은 GLT 변화에 따른 이치화 지수 (binarization index)의 변동 곡선을 그려보고 이치화도를 실제 만들어 보며 이치화 영상을 원래의 칼라 영상에 덧붙여 봄으로써 검증할 수 있었다. 이러한 방식으로 분석하였을 때 결과가 균일하게 나옴을 확인하였으며 여러 가지 방법으로 염색한 현미경 영상을 정량적으로 분석하고자할 때 사용할 수 있는 영상처리 원칙이라고 판단하였다.

### 감사의 말씀

본 연구에 사용된 심근 섬유화 모델을 제공한 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실 이정렬 교수, 병리학교실 김을경, 정향민, 석철준씨에게 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Kage M, Shimamatu K, Nakashima E, Kojiro M, Inoue O, Yano M. Long-term evolution of fibrosis from chronic hepatitis to cirrhosis in patients with hepatitis C: morphometric analysis of repeated biopsies. *Hepatology* 1997; 25: 1028-31.
2. Maehashi N, Yokota Y, Takarada A, et al. The role of myocarditis and myocardial fibrosis in dilated cardiomyopathy. Analysis of 28 necropsy cases. *Jpn Heart J* 1991; 32: 1-15.
3. Agacitos E, Kavantzias N, Nanas J, et al. The myocardial fibrosis in patients with dilated cardiomyopathy. *Gen Diagn Pathol* 1995/96; 141: 305-11.
4. Fournes P, Heudes D, Simon D, Guillemain R, Amrem C, Bruneval P. Influence of acute or chronic rejection on myocardial collagen density in serial endomyocardial biopsy specimens from cardiac allografts. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 796-803.
5. Beltrami CA, Dealla Mea V, Finato N, Rocco M. Computer-assisted morphometric analysis of the heart. *Anal Quant Cytol Histol* 1996; 18: 129-36.
6. Aziz DC. Quantitation of estrogen and progesterone receptors by immunocytochemical and image analyses. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 105-11.
7. Czerniak B, Herz F, Wersto RP, et al. Quantitation of oncogene products by computer-assisted image analysis and flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 463-6.
8. Humm JL, Macklis RM, Yang Y, Bump K, Chin LM. Image analysis for the study of radionuclide distribution in tissue sections. *J Nucl Med* 1994; 35: 1217-22.
9. 서정욱. 병리 영상분석 검사. 조보연 편. 디지털 영상기법 1997. 서울: 서울대학교병원 임상의학연구소, 1997; 28-38.
10. Weaver JR, Au JLS. Comparative scoring by visual and image analysis of cells in human solid tumors labeled for proliferation markers. *Cytometry* 1997; 27: 189-99.
11. 김어진. 생쥐의 심장발생과정에서 세포 증식과 세포고사의 역할[의학석사 학위논문]. 서울: 서울대학교, 1997.
12. Schwarz F, Mall G, Zebe H, et al. Quantitative morphologic findings of the myocardium in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1983; 51: 501-6.
13. Schwarz F, Mall G, Zebe H, et al. Determinants of survival in patients with congestive cardiomyopathy: quantitative morphologic findings and left ventricular hemodynamics. *Circulation* 1984; 70: 923-8.
14. 박영식, 이남영, 박소연, 서정욱. 전산화 영상 분석 방법을 이용한 세포증식능 측정. (준비중) 1998.