大韓不妊學會雜誌: 第24卷 第2號 1997
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 24, No. 2, 1997, 8

정자의 형태학적 특성 분석에 관한 연구

서울대학교 의과대학 비뇨기과학교실, 의공학교실*

백재승 · 전성수 · 김수웅 · 이원진* · 박광석*

A Study on the Morphological Analysis of Sperm

Jae-Seung Paick, Seong Soo Jeon, Soo Woong Kim, Won Jin Yi* and Kwang Suk Park*

Department of Urology, Department of Biomedical Engineering, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

= Abstract =

In male reproducible health, fertility and IVF (in-vitro fertilization), semen analysis has been most important. Semen analysis can be divided into concentration, motional and morphological analysis of sperm. The existing method which was developed earlier to analyze semen concentrated on the sperm motility analysis. To provide more useful and precise solutions for clinical problems such as infertility, semen analysis must include sperm morphological analysis. But the traditional tools for semen analysis are subjective, imprecise, inaccurate, difficult to standardize, and difficult to reproduce. Therefore, with the help of development of microcomputers and image processing techniques, we developed a new sperm morphology analyzer to overcome these problems.

In this study the agreement on percent normal morphology was studied between different observers and a computerized sperm morphology analyzer on a slide-by-slide basis using strict criteria.

Slides from 30 different patients from the SNUH andrology laboratory were selected randomly. Microscopic fields and sperm cells were chosen randomly and percent normal morphology was recorded. The ability of sperm morphology analyzer to repeat the same reading for normal and abnormal cells was studied.

The results showed that there was no significant bias between two experienced observers. The limits of agreement were 4.1% ~ -3.8%. The Pearson correlation coefficient between readers was 0.79. Between the manual and sperm morphology analyzer, the same findings were reported. In this experiments the slides were stained by two different methods, PAP and Diff-Quik staining methods. The limits of agreement were 7.2% ~ -5.7% and 6.0% ~ -6.3%, respectively. The Pearson correlation coefficients ware 0.76 and 0.91, respectively. The limits of agreement was tighter below 20% normal forms. In the experiments of repeatability, 52 cells stained by PAP and Diff-Quik staining methods were analyzed three times in succession. Estimating pairwise agreement, the kappa statistic for the pairs were 0.76, 0.81, 0.86, and 0.75, 0.88, 0.88 respectively.

본 연구는 한국과학재단의 특정기초연구 과제중 정자의 형태학적 특성 분석에 관한 연구(과제 번호 95-0403-23-01-3)에 대한 지원하에 이루어 졌음.

In this study it was shown that there was good agreement between manual and computerized assessment of normal and abnormal cells. The repeatability and agreement per slide of computerized sperm morphology analyzer was excellent. The computer's ability to classify normal morphology per slide is promising. Based on results obtained, this system can be of clinical value both in andrology laboratories and IVF units.

Key Word: Sperm morphology, Strict criteria, Sperm morphological analysis, Computerized method

서 론

남성 불임의 진단과 치료에 있어서 정액 검사는 가장 기본적이고 필수적인 검사이다. 정액 분석은 환자로부터 채취한 정액을 대상으로 현미경 시야에서 정자의 특성을 분석하는 방법으로 운동학적 특성을 분석하는 방법과 형태학적 특성을 분석하는 방법으로 나누어 생각할 수 있다. 정자의 운동학적 특성 분석은 정자의 농도, 속도, 운동 유형등 정자의 전체적인 활동 정도를 거시적으로 분석하는 방법이며, 정자의 형태학적 분석은 정자의 머리의 형태학적 특성을 기준으로 정자를 개체 단위로 분류하는 미시적인 분석 방법이라고 할 수 있다. 기존의 정액 분석은 정자의 활동성이 가임 또는 불임에 주요한 관건이라는 믿음 하에 주로 정자의 운동 특성 분석에 집중되어 왔다. 그러나 불임 등 임상에서 발생하는 제반의 문제에 대해 좀 더 유용하고 정확한 해결을 위해서는 정자의 운동학적 특성 분석과 함께 객관적인 정자의 형태학적 특성 분석의 필요성이 제시되고 있다 (Sherins *et al.*, 1977; Wickings *et al.*, 1983).

정자의 형태학적 분석 방법 가운데 최근 가장 많이 사용되고 있는 것은 strict criteria를 이용한 방법이다. Strict criteria를 이용한 방법은 정상 정자의 머리 모양을 규정하는 값을 정하고 이 값의 범위를 이용하여 정상 정자를 비정상 정자군으로부터 구별해 내는 방법이다. Strict criteria는 지금까지 여러 가지가 제안되었으며 주로 Kruger 등 (Kruger *et al.*,1986)이 제안한 방법과 세계보건기구 (WHO, 1992)의 방법이 많이 쓰이고 있다. 그러나 이러한 형태 분석의 strict criteria가 임상에서 사용되는 데 있어서, 주로 수작업 중심이어서 주관적이고 부정확하며, 비효율적이고 재현 불가능하다는 단점을 안고 있었다. 그러나 최근의 컴퓨터 기술과 영상 처리 기술의 발전은 정자 형태에 대한 정량적이고 자동화된 분석을 가능하게 하고 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 발전된 제반 기술을 활용하여 임상에서 유용하게 사용될 수 있는 정자의 형태학적 분석 시스템을 개발하고 이의 정확도와 신뢰도를 검증하고자 하였다.

연구 방법 및 재료

1. 정자의 형태학적 특성 분석 시스템의 개발

① 정자의 형태학적 특성 분석 시스템의 구성

정자의 형태학적 특성 분석 시스템은 정자 형태를 관찰하기 위한 현미경과 여기에 장착된 CCD카메라 그리고 PC와 PC에 장착되는 영상처리 보드로 구성된다. 현미경의 광학적 영상은 CCD카메라에 의해 아날로그 영상신호로 전환된다. 이 영상신호는 PC에서 분석할 수 있도록 영상처리 보드를 통해 디지탈 신호로 변환된다. 획득되는 디지탈 영상의 크기는 가로 512 화소, 세로 480 화소의 크기로 이루어지며, 한 화소는 256 가지 (8 비트)의 그레이 레벨 (gray level)을 가진다. 각각의 구성요소는 다음과 같다.

현미경: 현미경은 보통의 광학현미경 (BHTU-F: Olympus Inc, Japan)을 사용했다. 현미경의 배율은 정자를 육안으로 관측시 충분히 구별 분석할 수 있을 정도의 배율을 가져야 한다. 또한 한 개의 정자가 영상에서 차지하는 가로, 세로의 화소 크기와 한 개의 화소가 나타낼 수 있는 공간적 정보량도 고려하여 배율을 결정했다. 보통의 광학 현미경을 이용할 경우 1000배 정도의 배율이면 분석에 충분한 정도의 해상도를 보였다.

CCD 카메라: CCD카메라는 현미경의 광학적 신호를 아날로그 영상신호로 전환시킨다. 이 때 전환되는 영상의 크기는 가로 512 화소, 세로 480 화소이다. 흑백과 칼라 CCD 카메라 두 종류 모두 사용 가능하나 실제로 영상이 디지탈화 될 때 흑백 영상으로 전환되므로 흑백 CCD 카메라 (WH-501: Watec Inc, Japan)를 사용했다.

영상 처리 (수집)보드: 전환된 아날로그 영상 신호는 PC에서 분석 가능하도록 PC에 장착된 영상처리 보드 (PCVISIONplus; Imaging Technology Inc, USA)에 의해 디지탈 영상신호로 바뀐다. 디지탈화된 영상의 한 화소는 8 비트로 표시되므로 256 가지의 밝기로 표시된다. 분석시 전체 크기 (512×480)에 해당하는 영상에는 보통 2 내지 4 개의 정자가 나타나며 한 프레임의 영상이 수집되면 일괄적으로 분석된다. 또한 영상 수집 보드는 수집되는 영상을 간단하게 제어할 수 있는 기능도 제공한다. 즉 영상 전체의 명도와 조도를 사용자가 간단한 유저 인터페이스를 통하여 쉽게 조절할 수 있다.

Flow Chart of Image Processing

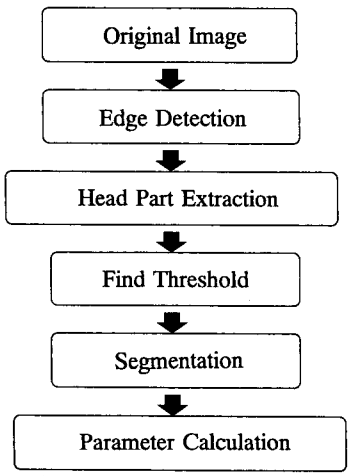

Fig. 1. Flow chart of image processing.

PC: 수집된 영상은 분석을 위해 PC의 메모리로 옮겨진다. 이때 필요한 모든 정보를 모두 옮길 수 있도록 PC의 자료 전송속도가 충분히 빨라야 한다. 현재의 상용화되고 있는 PC (IBM compatible 486-DX2(66))는 이것을 가능하게 한다. 일단 메모리로 정보가 전송되면 모든 정보처리는 개발된 프로그램에 의해 이루어진다.

② 정자의 형태학적 특성지표

영상처리를 거친 영상은 각각의 정자 머리 영상에 대해 위치 정보와 더불어 영역 구분 정보를 넘겨주게 된다. 이 같은 정보를 이용하여 정자 형태 분석을 위한 파라미터들을 계산한다. 정자 형태 분석 파라미터들은 몇 개의 그룹으로 나누어서 그 특성을 분석할 수 있으며, 그 중에 기본적으로 이용될 수 있는 측정 파라미터들은 길이 (L-length), 너비 (W-width), 둘레 (P-perimeter), 면적 (A-area), 아크로좀 비율 (AP-acrosomal proportion)이 있고, 이 기본적인 파라미터들을 이용해서 유도할 수 있는 파라미터로는 타원성 (E-elliptical), 컴팩트니스 (C-Compactness), 오벌 (O-Oval)이 있다. 컴팩트니스는 원에 대해 1이라는 값을 갖게 되고 형태가 원에 가까울 수록 1에 가까워진다. 오벌은 컴팩트니스의 역수로서 형태가 계란형에 가까운 정도를 나타낸다.

Edge Detection

Original Image

Edge Detected Image

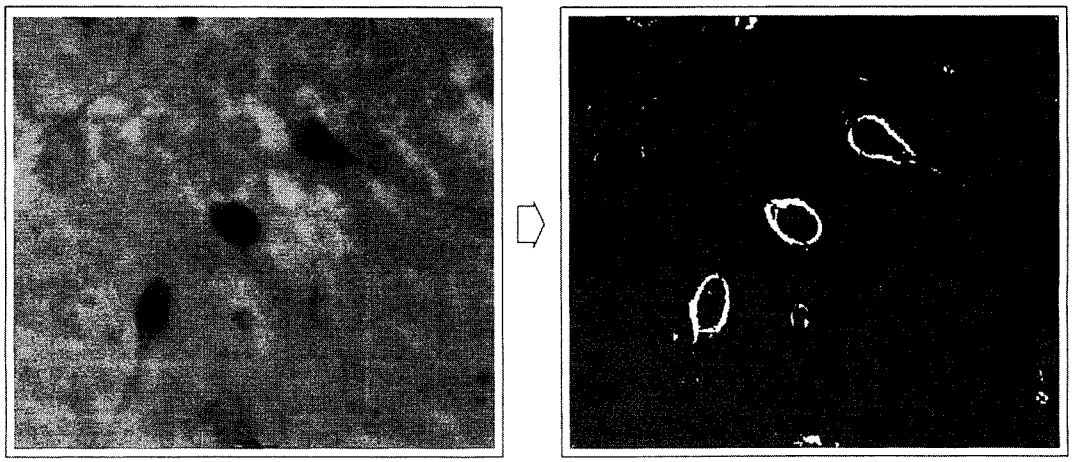

Fig. 2. Processed images during the edge detection of sperm head. Lt.: Original image, Rt.: Edge detected image.

③ 정자의 형태학적 특성 분석 알고리듬 (최적 역치 방법을 이용한 정자의 형태학적 특성 분석)

전체 영상에서 정자를 포함하는 부분만을 추출해 내기 위한 기본적인 영상처리 과정 및 파라미터 추출을 위한 분석 과정이 그림 1에 나타나 있다. 먼저 전체 영상에서 정자의 위치를 찾기 위해 경계 추출 연산자 (edge operator)를 적용시킨다. 경계 추출 연산자를 적용시킨 다음 일정한 크기 이상의 값을 나타내는 화소를 선택하여 경계를 추출한다 (그림 2). 추출된 경계는 정자와 다른 이물질을 구분하기 위해 필터링을 거친다. 필터링은 영상에서 잡음에 해당하는 작은 점들을 제거하며 서로 관계 있는 점들을 연결시켜 준다.

정자를 포함하는 부분을 찾기 위한 방법으로서 경계 추출된 영상을 가로와 세로 방향에 대해 정사영을 이용하는 방법이 있다. 여기서는 화소의 gradient가 높은 부분을 연결하여 이것을 포함하는 가로 세로에 대해 각각 최대 최소의 좌표를 찾아 직사각형의 격자로 구분해내는 방법을 이용했다 (그림 3). 직사각형의 격자를 이용할 경우 정자의 머리부분이 타원형에 가깝기 때문에 머리 부분과 배경 부분의 영역 넓이가 거의 같아져서 역치값을 찾을 때 오차를 줄이는 역할도 한다. 역치값 설정시 두 부분의 상대적 확률이 매우 중요하기 때문이다.

직사각형의 격자 안에서 배경으로부터 정자의 경계를 정확히 구분하기 위해서 최적 역치값을 찾아야 하는데 이를 위해 두 가지 알고리듬을 이용하였다. 하나는 영상의 히스토그램 분포로부터 역치값을 얻는 방법이고, 다른 하나는 영상의 히스토그램을 이용하지 않고 공간적인 정보로부터 역치값을 구하는 방법이다.

히스토그램을 이용한 방법 (그림 4): 히스토그램을 이용 (Otsu, 1979)하여 여러 가지의 분산, 즉 영역내 분산과 영역간 분산을 구할 수 있다. 이 방법을 이용하여 배경과 물체 영역간의 분산이 최대화되는 그레이 레벨을 찾는다. 실제 계산시 0차 모멘트와 1차 모멘트만을 사용하기 때문에 쉽고 빠르게 역치값을 찾을 수 있다. 또 영역간 분산의 최대값은 히스토그램의 bimodal한 특성 지표 또는 영상의 두 영역간 분리도를 나타내는 지표로서 사용될 수 있다. 실제로 이 역치값은 두 영역의 평균값의 중간값에 해당함이 밝혀졌다 (Reddi *et al.*, 1984). 이는 영상의 공간적인 정보를 이용하지 않고 영상의 히스토그램만으로 구해지므로 매우 유용하다.

전체 영상 가운데서 추출된 부분에 대해 히스토그램 방법을 적용시킨 결과가 그림 4와 5에 나타나 있다. 격자 내부의 타원체가 영역 분할된 정자를 나타낸다. 히스토그램에서 알 수 있는 것처럼 추출된 부분은 대개 bimodal한 특성을 보인다. 히스토그램 방법에 의한 역치값은 영역간 분

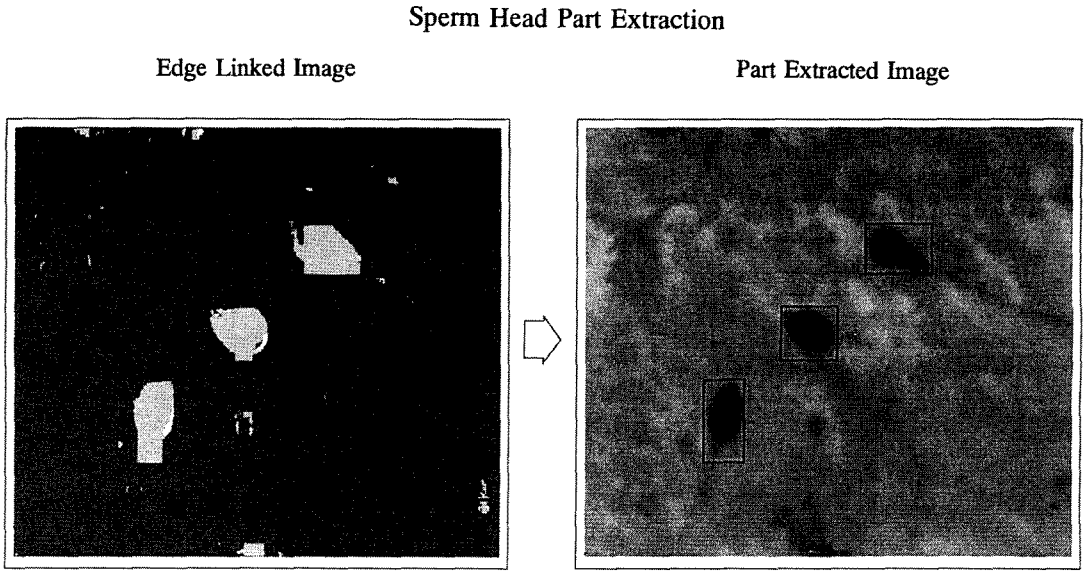

Fig. 3. Processed images during the part extraction of sperm head. Lt.: Edge linked image, Rt.: Part extracted image.

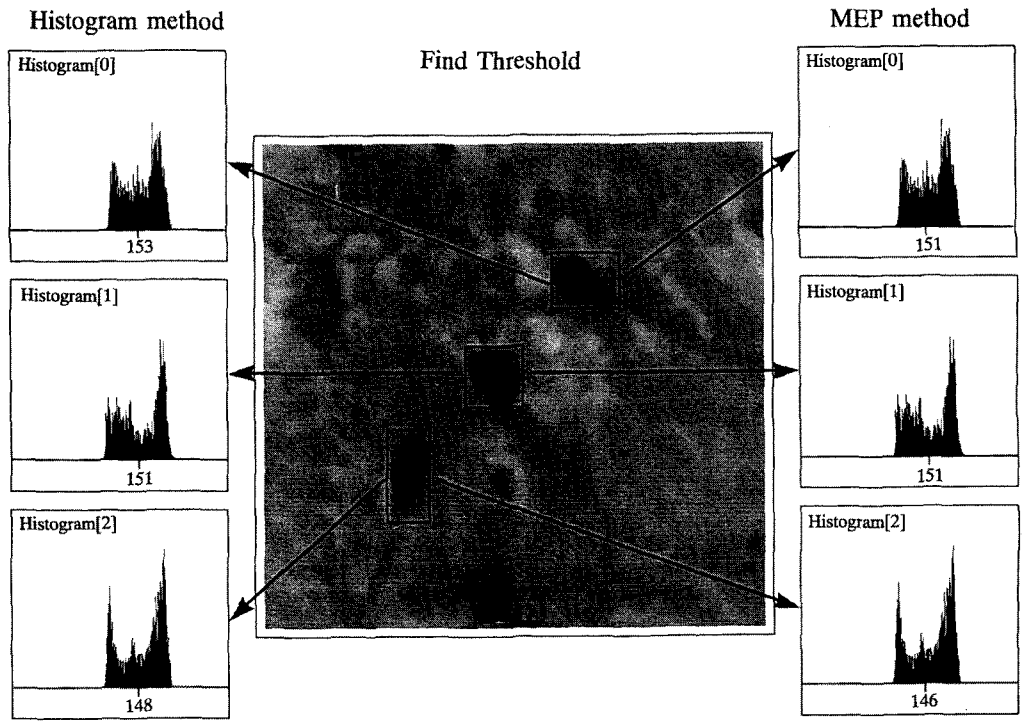

Fig. 4. Processed images during the fine thresholding. Lt.: Histogram method, Rt.: MEP (minimum error problem) method.

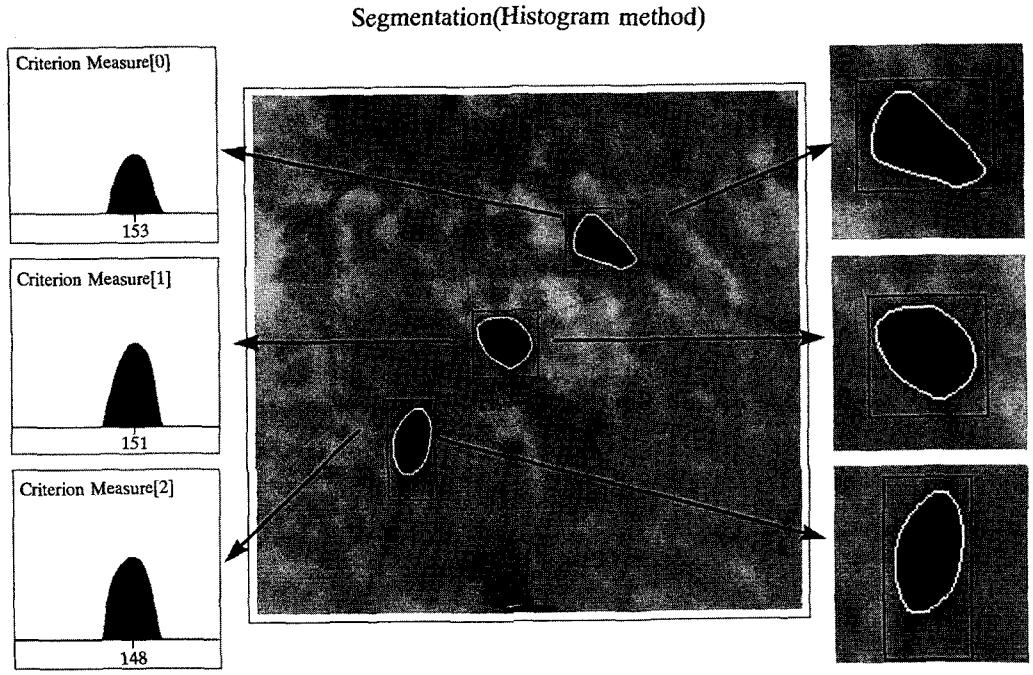

Fig. 5. Processed images during the segmentation.

산 척도를 최대로 하는 값으로 척도 그래프를 보면 특정한 값에서 최대를 나타냄을 알 수 있는데 이 값이 역치값이 된다. 대부분의 추출된 영상에 대해 히스토그램 분포에 관계없이, 또 사각형 격자의 크기에 관계없이 정확한 경계를 나타내는 역치값을 구할 수 있었다. 경계를 나타내는 화소들은 영역 분할된 뒤 좀 더 정확한 파라미터 측정을 위해 smoothing된 결과이다.

Bayes 결정법칙 방법 (그림 4): Bayes 결정법칙(Bayes decision rule)에 근거한 방법은 두 영역의 확률 밀도 함수를 Gaussian이라 가정하고 두 개의 영역으로 분할했을 때 오류가 최소화되는 값(MEP: Minimum Error Problem)(Mardia & Hainsworth, 1988)을 역치값으로 이용하는데, 반복해서 적용시켰을 경우 빠른 속도로 수렴하게 된다. 이 방법을 적용시키기 위한 전 영상처리 과정은 히스토그램 방법과 같다.

④ 형태 분석을 위한 파라미터 추출

영역 분할된 정자의 영상으로부터 strict criteria를 이용하여 형태분석에 필요한 각종 파라미터를 측정했다. 그림 6은 여러 가지 형태의 정자에 대해 영역 분할된 결과와 분석에 필요한 파라미터 값들을 보여주고 있다. 면적은 정자 머리를 나타내는 전체 화소수로 측정하였으며 길이와 너비는 두 화소간의 거리로 측정하였다. 비율은 길이에 대한 너비의 비이다. 아크로좀 비율은 정자의 머리 앞 밝은 부분의 전체 머리 화소수에 대한 비율로 나타냈다.

⑤ 분석 프로그램

분석 프로그램의 구동 환경은 Windows를 사용하였다. Windows는 키보드를 사용하지 않고 마우스만을 사용하여 시스템을 구동할 수 있어 사용자가 프로그램을 쉽게 이용할 수 있다. 또한 편집환경은 MDI (Multiple Document Interface)를 이용함으로써 한 개의 응용 프로그램 내에서 분석 윈도우, 데이터 그래프 윈도우, 데이터 윈도우 등을 동시에 열어 놓은 상태에서 분석 및 편집 작업을 가능하게 하였다.

2. 정액검체 표본

서울대학교병원 남성의학 클리닉으로부터 30개의 서로 다른 환자의 정액표본을 무작위로 선택하였다. 정자의 형태학적 특성분석을 위한 정액표본은 다음과 같이 준비하였다. 모든 슬라이드는 사용 전에 70% 에틸 알코올로 철저히 씻고, 가능한 얇은 smear를 위해 5μL 이하의 정액을 사용하였다. 또한 인위적으로 두부가 떨어져 나가는 것을 방지하기 위해 정액 방울을 슬라이

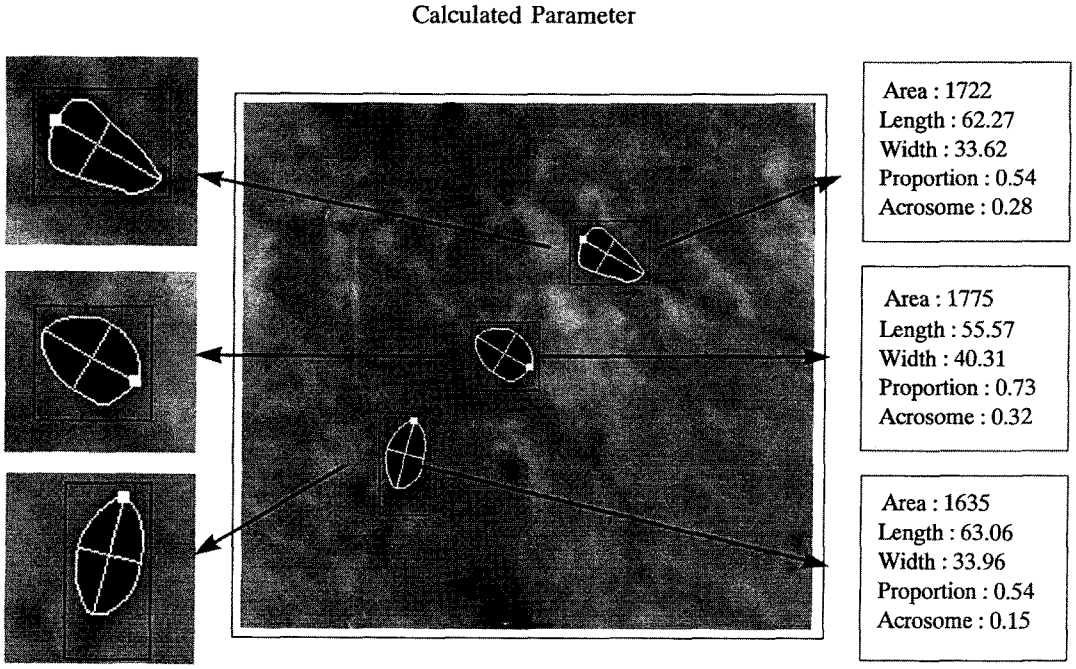

Fig. 6. Processed images during the calculation of parameters.

드를 향해 밀기보다는 끌어 당겼다. 정액표본은 warm tray에서 37℃로 말리고 (air dried), Papanicolaou 염색법 (WHO, 1992)과 Diff-Quik 염색법 (Kruger *et al.*, 1987)으로 염색하였다.

3. 수작업을 통한 정자의 형태학적 분석

정액표본을 현미경을 통하여 1000배의 배율로 확대하고 CCD 카메라를 통해 다시 4배 (총 4000배)로 확대한 화상을 모니터에 옮긴 후 숙련된 검사자에 의해 strict criteria를 이용하여 수작업 분석을 수행하였다. 본 연구에서는 Papanicolaou 염색법과 Diff-Quik 염색법으로 제작된 정액검체 슬라이드를 무작위로 선택한 후 정상형태 정자의 백분율을 두 명의 숙련된 검사자가 평가하였다.

4. 컴퓨터를 이용한 정자의 형태학적 특성의 분석

슬라이드를 현미경 대물대에 넣음으로써 컴퓨터는 영상을 포착한 후 이를 처리하고 사용자가 다음 영상을 선택한다. 처리과정은 interactive mode나 batch mode 중 선택할 수 있다. Interactive mode에서는 영상이 포착되면 즉시 처리된다. 사용자는 화면에서 모든 정자의 처리과정을 볼 수 있다. 정자의 테두리는 현미경 영상 위에 색선으로 중첩되고 분류된 결과는 색표로 나타남과 동시에 영상 위에 중첩된다. 영상 위의 모든 물체는 다음 평가를 위해 하나의 유효한 정자 세포로 받아들여지거나 거부된다. 거부되는 경우는 물체의 초점이 맞지 않거나 물체가 이물질로 간주될 때이다. 정자들은 형태학적 특성 분석과정을 거쳐 정상과 비정상의 2 범주로 분류된다. 세포가 정상으로 분류되기 위해서는 크기, 모양, 아크로좀 비율의 세 변수가 모두 정상으로 판단되어야만 한다.

Batch node에서는 포착된 영상은 사용자가 작업하는 시간을 최소화하기 위해 먼저 disk에 저장되고 나중에 처리된다. 어떠한 단계에서도 정액표본 마다 정상 세포의 백분율 등 결과 통계치를 사용자가 볼 수 있어 육안적 소견과 수시로 비교할 수 있다.

5. 특성지표의 통계적 유의 수준 분석

수작업의 정자형태 분석과 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석의 결과를 비교하기 위하여 Bland and Altman plot (Bland & Altman, 1986)과 Pearson correlation coefficient를 사용하였다 (% 정상형태 정자 / 100 마리 정자). κ 통계치 (Maxwell & Pillner, 1968)는 측정치가 2번의 반복된 검사에 의한 검사치일때 일치성의 척도로 대개 사용된다. κ 값이 0.4 미만일 때는 낮은 일치성을 의미하고, 0.4에서 0.75 사이의 값일 경우는 좋은 일치성을, 0.75 초과시에는 매우 좋은 일치성을 의미한다. 본 연구에서 개발된 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석법을 이용하여 동일한 정액표본의 반복된 3회 검사치의 검증에 이 방법을 적용하였다. 여러 번 시행한 정자형태 이진 검사치의 분석을 위해 Lau (Lau, 1993)는 일치성의 척도를 개발하였다. 일치성은 다른 측정치로부터 한 특정치를 예측하는 예측도 (predictive probability)에 의해 측정된다. 호환성 (exchangeability)은 검사치들 사이에서 측정된다. Canonical moments 라는 변수는 κ 값이 2, 3,..., m 라고 하면 k-1번째 검사치의 일치도 가 주어졌을 때 κ번째 검사치의 예측도를 측정하는데 사용된다.

정자형태 분석에 사용되는 이진 분류는 정상 (n or o) 또는 비정상 (a or 1)이다. 본 연구에서는 검사자간 그리고 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석의 비교를 위해 Bland and Altman plot을 이용하였으며, 재현성은 κ 통계지수와 예측도 (predictive probability)를 이용하여 평가하였다.

결 과

1. 검사자 대 검사자

이 실험에서는 동일 정액표본을 2명의 숙련된 수작업 검사자가 같이 평가하고, 각각의 슬라이드에서 정상형태 정자의 백분율을 기록하였다. Papanicolau 염색법으로 염색된 15개의 서로 다른 환자의 정액표본은 서울대학교병원 남성의학클리닉 환자군으로부터 무작위로 선택한 후 슬라이드마다 100개의 세포를 평가하였다.

2명의 숙련된 수작업 검사자간의 상관계수는 높았고, 서로 통계학적인 유의한 차이는 없었다 (그림 7, Pearson correlation coefficient=0.7861, P value=0.7959). 또한 Bland and Altman plot에서 두 검사자간에는 유의한 차이는 없었고, limits of agreement는 +4.1%에서 -3.8%였다 (그림 8).

2. 검사자 대 컴퓨터

이 실험에서는 숙련된 수작업 검사자의 결과

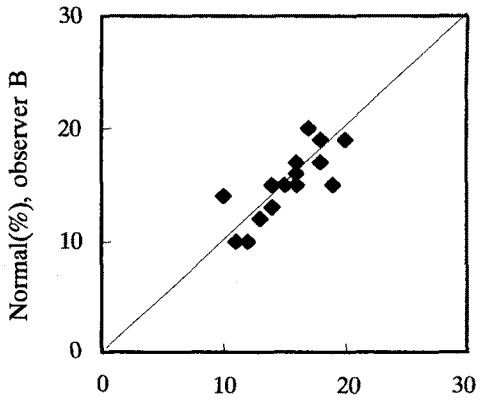

Fig. 7. Percent normal morphology evaluated manually by two observers, with line of equality (Papanicolaou staining, Pearson correlation coefficiency=0.794, n=15).

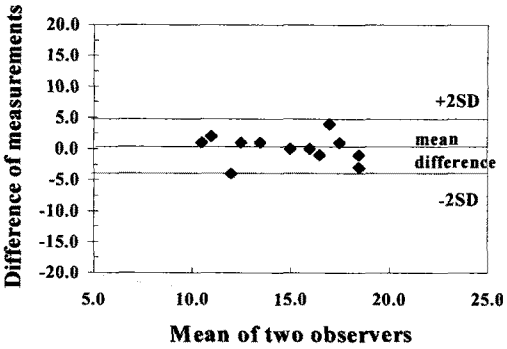

Fig. 8. Bland and Altman limits of agreement among 15 cases evaluated manually by two observers for normal sperm morphology (Papanicolaou staining, limits of agreement: +4.1 ~ -3.8).

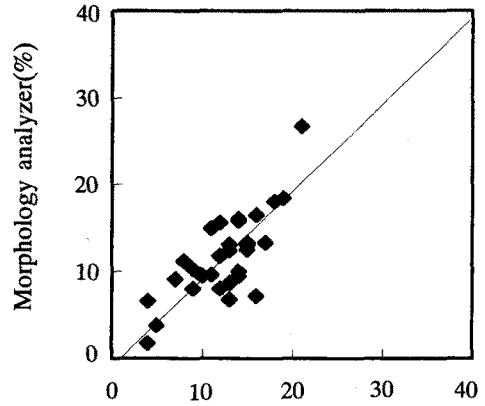

Fig. 9. Percent normal morphology measured with manual and computerized morphology analyzer, with line of equality (Papanicolaou staining, Pearson correlation coefficiency=0.762, n=30).

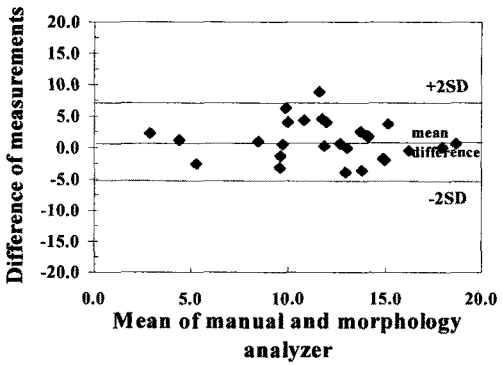

Fig. 10. Bland and Altman limits of agreement among 30 cases evaluated manually and by computerized morphology analyzer for normal sperm morphology (Papanicolaou staining, limits of agreement: +7.2 ~ -5.7).

를 개발된 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석법과 비교하였다. 슬라이드마다 정상 형태 정자의 백분율을 기록하였다. 검사자에 의한 결과와 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석법에 의해 보고된 정상형태 정자의 백분율을 30명 환자의 슬라이드에서 비교하였다. 슬라이드마다 최소한 100개의 세포를 평가하였다. 정자의 염색방법으로는 Papanicolaou 염색법과 Diff-Quik 염색법을 사용하였다.

먼저 Papanicolaou 염색검체에서 숙련된 수작업 검사자와 개발된 정자형태 분석법 사이에서 상관계수는 높았고, 서로 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (그림 9, Pearson correlation coefficient=0.7620, P value=0.2099). 또한 Bland and Altman plot에서 두 검사간에는 유의한 차이는 없었고, limits of agreement는 +7.2%에서 -5.7%였다 (그림 10). 정상 형태의 정자가 0%에서 20%인 검체로 제한할 경우 limits of agreement는 +6.8%에서 -5.3%로 좁아져 더욱 높은 일치도를 보이고 있다.

Diff-Quik 염색검체에서도 숙련된 수작업 검사자와 개발된 정자형태 분석법 사이에서 상관계수는 높았고, 서로 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (그림 11, Pearson correlation coefficient= 0.9115, P value=0.8055). 또한 Bland and Altman plot에서 두 검사간에는 유의한 차이가 없었고, limits of agreement는 +6.0%에서 -6.3%였다 (그

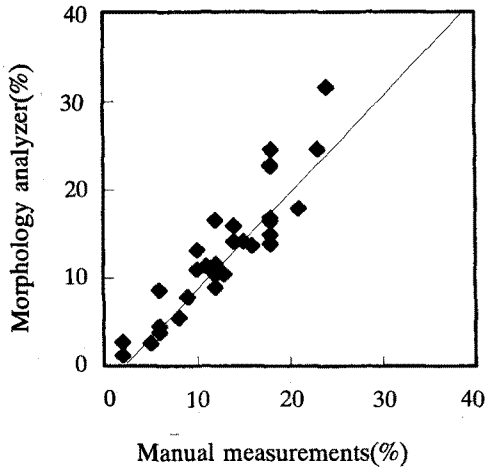

Fig. 11. Percent normal morphology measured with manual and computerized morphology analyzer, with line of equality (Diff-Quik staining, Pearson correlation coefficiency=0.911, n=30).

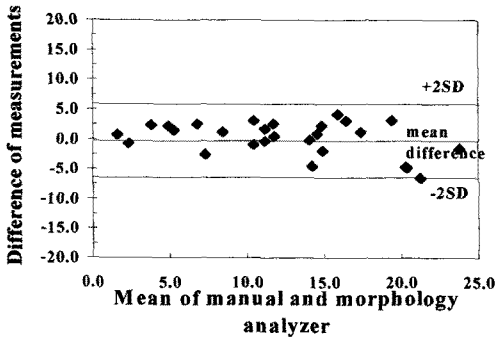

Fig. 12. Bland and Altman limits of agreement among 30 cases evaluated manually and by computerized morphology analyzer for normal sperm morphology (Diff-Quik staining, limits of agreement: +7.2 ~ -5.7).

림 12). 정상 형태의 정자가 0%에서 20%인 검체로 제한할 경우 limits of agreement는 +5.0%에서 -3.6%로 좁아져 더욱 높은 일치도를 보이고 있다.

3. 컴퓨터를 이용한 정자의 형태학적 분석의 재현성

개발된 정자형태 분석법이 정상과 비정상 세포에 대해 같은 판독을 재현할 수 있는가에 대한 실험이었다. 정자의 염색법으로는 Papanicolaou 염색법과 Diff-Quik 염색법을 사용하였고 각각의 염색법에 대해 10개의 서로 다른 환자의 슬라이드로부터 52개의 세포를 무작위로 선택한 후

Table 1. Triplicate sperm cell morphology readings by computerized morphology analyzer (Papanicolaou staining)

Outcome of three readings			Frequency
First	Second	Third	
a	a	a	34
a	a	n	1
a	n	a	1
a	n	n	1
n	a	a	2
n	a	n	1
n	n	a	0
n	n	n	12
Total			52

a: abnormal morphology
n: normal morphology

Table 2. Triplicate sperm cell morphology readings by computerized morphology analyzer (Diff-Quik staining)

Outcome of three readings			Frequency
First	Second	Third	
a	a	a	40
a	a	n	0
a	n	a	1
a	n	n	2
n	a	a	0
n	a	n	1
n	n	a	0
n	n	n	8
Total			52

a: abnormal morphology
n: normal morphology

3번 반복하였다.

먼저 Papanicolaou 염색검체에서의 결과는 표 1과 같다. 쌍을 이룬 검사치들의 일치성의 척도로서 κ 값은 각 각 0.76, 0.81, 0.86으로 모두 일치성이 매우 좋은 범주인 >0.75에 속하였다. 쌍을 이룬 검사치들의 일치도에 대한 예측도 (predictive probability)는 다음과 같았다.

$P(X2 = 1 : X1 = 1) = 0.95$

$P(X2 = 0 : X1 = 0) = 0.80$

여기서 Xi는 i번째 검사값을 의미한다. 즉 한 세포에 대하여 첫 번째 검사치가 비정상일 때 (X1 = 1), 다음번 검사치가 비정상 (X2 = 1)일 예측도는 95%였다.

처음 두 번의 검사결과에 따른 세 번째 검사치의 일치도에 대한 예측도는 다음과 같았다.

P(X3 = 1 : X2 + X1 = 2) = 0.97

P(X3 = 1 : X2 + X1 = 1) = 0.60

P(X3 = 1 : X2 + X1 = 0) = 0.00

즉 한 세포에 대하여 처음 두 번의 검사결과가 다를 경우 (X2 + X1 = 1), 세 번째 검사치가 비정상 (X3 = 1)일 예측도는 60%였다.

Diff-Quik 염색검체에서의 결과는 표 2와 같다. 쌍을 이룬 검사치들의 일치성의 척도로서 κ 값은 각 각 0.75, 0.88, 0.88로 모두 일치성이 매우 좋은 범주인 >0.75에 속하였다. 쌍을 이룬 검사치들의 일치도에 대한 예측도 (predictive probability)는 다음과 같았다.

P(X2 = 1 : X1 = 1) = 0.93

P(X2 = 0 : X1 = 0) = 0.89

여기서 Xi는 i번째 검사값을 의미한다. 즉 한 세포에 대하여 첫 번째 검사치가 비정상일 때 (X1 = 1), 다음번 검사치가 비정상 (X2 = 1)일 예측도는 93%였다.

처음 두 번의 검사결과에 따른 세 번째 검사치의 일치도에 대한 예측도는 다음과 같다.

P(X3 = 1 : X2 + X1 = 2) = 1.00

P(X3 = 1 : X2 + X1 = 1) = 0.25

P(X3 = 1 : X2 + X1 = 0) = 0.00

즉 한 세포에 대하여 처음 두 번의 검사결과가 다를 경우 (X2 + X1 = 1), 세 번째 검사치가 비정상 (X3 = 1)일 예측도는 25%였다.

고 안

사람 정자 형태 평가에서의 객관성과 표준화의 결여, 수작업 방법 관리의 어려움, 검사실과 검사자의 자체적 또는 서로 간의 높은 변이도 등은 자동화된 형태 분석법의 개발에 많은 동기를 부여하고 있다. 디지탈화된 서판 (tablet)과 마이크로컴퓨터를 이용한 초기 기기 (Schmassmann *et al.*, 1979)이래, 현재는 몇 종류의 자동화된 기기가 외국에서 개발되어 상품화되어 있다 (Morphologizer; Cryo Resources, New York, NY, CellForm-Human; Mortion Analysis Corp., Santa Rosa, CA). 정자 형태 평가에서의 자동화된 객관적 접근방식은 향후 보완, 발전되어야 할 사안들이 많은 형편이다. 연구자들은 그 간의 연구를 통해 지금은 일반인에게까지 이미 널리 보급된 개인용 컴퓨터와 광학현미경을 이용한 정자의 운동 특성 분석 연구를 통해 컴퓨터 정액분석 방법을 개발한 바 있다 (이원진 등, 1995). 따라서 정자의 형태학적 특성 분석에 관한 본 연구는 운동학적 특성 분석과 함께 종합적인 정액분석 방법 개발의 연장선에서 연구되었다고 할 수 있다.

사람 정자 형태에 대한 수작업 방법의 문제점들은 오래 전부터 논의되어 왔다. 가장 중요한 문제점 중 하나는 형태학적 유형 분류의 정의였다. 1960년대부터 정자 형태에 대한 정의를 표준화하려는 시도 (van Duijn, 1964, 1966)가 있었으나, 최근까지도 기존 정의에 의한 정상 정자가 실제로 정상인지를 확증하기 위한 객관적인 기준이 없었다. 비록 몇몇 연구에서 비정상 형태의 정자는 정상 형태의 정자와 비교할 때 유영 운동의 양상이 다르고, 자궁경부 점막을 통과하는데 있어서도 덜 효과적이라는 보고가 있었으나 (Katz *et al.*, 1982; Morales *et al.*, 1988), 수정능력과 결부된 객관적인 기준의 결여가 문제점으로 제기되었다. 이러한 상황에서 정상 형태 정자의 백분율이 수정률이나 체외수정률 등과 연관성이 있다는 보고들은 정자의 형태학적 특성에 대한 연구에 있어서 매우 고무적이었다. 체외수정 (IVF)에서 가임력의 지표로서의 strict criteria의 유용성은 이미 입증되었다 (Kruger *et al.*, 1986, 1988, 1993). 즉 strict criteria를 이용할 경우 IVF programs에서 정상 정자 형태가 14% 미만인 경우에는 14% 이상인 경우에 비해 수정률이 의미있게 떨어짐이 발견되었고, 정상 정자 형태가 5% 미만인 경우에는 수정률이 현저히 떨어져 7.5%로 보고되었다 (P pattern, poor prognostic pattern). 정상 형태가 14%를 초과한 경우에는 정상 형태가 15%에서 30%사이이거나 30%를 초과한 경우의 환자들과 비슷한 수정률을 갖는다고 하였다. 또한 정상 정자 형태가 14%를 초과하면 14% 이하인 경우보다 GIFT (gamate intrafallopian transfer) program에서 임신율이 의미 있게 높다는 보고도 있었다 (Van der Merwe *et al.*, 1992). IVF에서 가임력의 지표로서의 strict criteria의 유용성이 잘 입증되어 있다는 사실은 현재와 같이 IVF가 보편화되어 있는 상황에서 strict criteria를 정자 형태 분석의 임상적 표준으로 받아들일 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구자들을 포함한 여러 연구자들이 정자 형태를 평가하는데 있어서 Kruger 등이 제안한 strict criteria를 이용하였을 때 검사자간, 또 한 검사자안 (intraobserver)에서 매우 높은 상관관계를 관찰하였다 (이해원 등, 1993;

Menkveld *et al.*, 1990). 따라서 연구자들은 strict criteria를 표준으로 정자형태 분석방법을 개발하였다.

또한 컴퓨터를 이용한 방법의 검증은 정자의 Papanicolaou 염색법을 표준으로 하였다. 염색법에 따라 기준치가 다르고 청상 또는 비정상의 최후 해석에 영향을 준다는 것은 잘 알려져 있다. 가령 Diff-Quik 염색은 Papanicolaou 염색과 다른 측정 기준치가 있다 (Kruger *et al.*, 1988). 본 연구에서는 정자형태 분석에 가장 널리 사용되고 있고 측정 기준치가 확립되어 있는 Papanicolaou 염색법을 사용하였다. 이와 함께 염색 방법이 쉽고 염색에 소요되는 시간이 빠르며 strict criteria에 대한 기준이 이미 설정된 Diff-Quik 염색도 병행하였다. 이와 같은 측면을 기본으로 하여 개발된 정자형태 분석 방법의 초기 버전의 정확도와 재현성을 검증하였다.

서울대학교병원 남성의학클리닉에서 strict criteria를 이용하여 정상 정자의 백분율을 측정하였을 때 두 검사자간의 Spearman 상관 계수 (correlation coefficients)는 0.856으로 높았으며, 한 검사자의 2회 반복 검사의 Spearman 상관 계수도 0.894로 높았다. 또한 세 검체에서 각 검체 당 8회의 반복 검사를 실시한 결과 채택 가능한 한도의 변이 계수 (7.45-15.15)를 보였다고 보고한 바 있다 (이해원 등, 1993).

본 실험의 결과들을 살펴보면 2명의 숙련된 수작업 검사자간의 상관계수는 높았고, Bland and Altman plot에서도 두 검사자간에 유의한 차이가 없었다. 이는 Papanicolaou 염색법으로 염색된 정자 검체에 대하여 정자형태 방법으로 strict criteria를 이용하였을 때 수작업 검사자간에 서로 비교할만하고 신뢰할만한 결과를 나타냄을 보여주고 있다. 또한 앞으로 새로이 개발된 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석과 비교할 수작업 검사자로서 충분히 숙련되어 있음을 보여준다.

Papanicolaou 염색법과 Diff-Quik 염색법으로 염색된 검체에 대하여 숙련된 수작업 검사자와 개발된 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석 사이에서 높은 상관계수를 보였고, Bland and Altman plot에서도 두 검사간에 유의한 차이가 없었다. 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석방법은 육안 검사시 정상 또는 비정상 세포에 대하여 정자 세포가 아닌 것으로 인식하거나, 불순물을 정자세포로 인식하여 정상 또는 비정상으로 인식할 수 있다. 이는 이번 실험에서 검사자의 육안적 검사에서 100개의 정자 세포를 인지하여 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석방법에 인식시켰을 때 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석방법에서는 정자 세포의 수를 90개에서 110개 정도로 인지하여 그 결과를 보고하는 것으로도 확인할 수 있었다. 그러나 위 실험결과에서 보듯이 분석결과에는 큰 영향을 미치지 않았다. 물론 새로운 버전의 분석방법에서는 이 점을 좀 더 보완하여야 할 것이다. 정상 정자형태가 20% 이상인 경우에 수작업 검사와 개발된 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석 방법과 비교할 때 발생할 수 있는 오류 중 하나로는 현미경 한 시야당 너무 많은 정자 세포들이 검사결과에 오차를 유발시킬 수 있다는 점이다. 컴퓨터를 이용한 기기에서는 이러한 경우에 정자의 중첩 등으로 정자를 정자로 인식하지 못하거나 잘못된 판독을 할 수 있기 때문에 5μL 이하의 작은 방울로 smear함으로써 고배율 시야당 5개에서 10개 정자가 나오게 하였다. 이렇게 함으로써 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석뿐 아니라 수작업 검사에서도 일어날 수 있는 정자들의 중첩이나 너무 많은 정자로 인해 생길 수 있는 오차를 줄이도록 하였다.

Papanicolaou 염색법과 Diff-Quik 염색법으로 염색된 검체에 대하여 숙련된 수작업 검사자와 개발된 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석 사이에서 limits of agreement는 염색법에 따라 각각 +7.2%에서 -5.7%와 +6.0%에서 -6.3%였는데 정상 형태의 정자가 0%에서 20%인 검체로 제한할 경우 limits of agreement는 염색법에 따라 각각 +6.8%에서 -5.3%와 +5.0%에서 -3.6%로 좁아져 더욱 높은 일치도를 보이고 있다. 이미 언급되었던 것처럼 strict criteria를 이용하였을 때 IVF 나 GIFT program에서 정상형태의 정자를 14%를 기준으로 수정률의 차이를 보고하고 있기 때문에 정상형태의 정자가 20% 이하인 경우에 더욱 높은 일치도를 보인 결과는 임상적용에 있어서 더욱 중요하고 의미 있는 결과였다.

검사결과에 대한 재현성은 검사실의 질적 관리에 있어 초석이라고 할 수 있다. 정상 또는 비정상 정자에 대하여 반복해서 같은 판독을 할 수 있는 능력은 검사실 결과에 대한 신뢰성과 그 결과의 적절함을 나타내준다. 새로이 개발된 컴퓨터를 이용한 정자형태 분석방법의 재현성 평가에서도 같은 정자세포에 대한 3번의 측정치가

매우 높은 일치성을 보여 정자형태의 분석에 있어 유용한 진단 기기로 평가할 수 있겠다.

정자의 염색방법에 있어서도 이 실험에 사용하였던 Papanicolaou 염색법과 Diff-Quik 염색법은 모두 정자형태 분석에 좋은 염색방법임을 확인할 수 있었다. 물론 염색방법들간의 우월성 및 타 염색법에 대한 분석이 필요하리라 사료되어 이에 대한 연구도 계획 중에 있다.

개발된 정자형태 분석방법을 이용하여 비정상 정자를 세분하고 분류할 수 있을 것이다. 크기에 따른 분류로는 정상형, 소형 및 대형으로, 모양에 따른 분류로는 정상형, 약간 비정형 (slightly amorphous), 가는형 (thin), 뾰족형 (tapered), 길쭉형 (elongated), 둥근형 (round), 중간 부위가 두터운형 (midpiece), 또는 심한 비정형 (severely amorphous) 등으로 세분화하고 분류하는 자동화된 시스템도 개발 중에 있다.

결 론

결론적으로 새로이 개발된 정자형태 분석방법은 숙련된 검사자와의 비교에서 높은 상관관계를 보였으며, 통계학적으로도 유의한 차이가 없었고, 반복된 검사에서 높은 재현성을 보여, 정자의 형태분석에서 기존의 검사자에 의한 육안적 검사방법을 대치할 수 있게 되었다. 또한 이의 활용으로 경제적, 시간적 이득과 함께 더욱 객관적인 검사결과를 얻을 수 있게 되었다.

참 고 문 헌

Bland JM, Altman DG: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986, 2, 307-310.

Katz DF, Diel L, Overstreet JW: Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. *Biol Reprod* 1982, 26, 566-570.

Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K: Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986, 46, 1118-1123.

Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA: A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl* 1987, 18, 275-277.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S: Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988, 49, 112-117.

Kruger TF, DuToit TC, Franken DR, Acosta AA, Oehninger SC, Menkveld R, Lombard CJ: A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. *Fertil Steril* 1993, 59, 202-209.

Lau T: Higher-order kappa-type statistics for a dichotomous attribute in multiple ratings. *Biometrics* 1993, 49, 535-542.

이원진, 전성수, 박광석, 백재승: 개인용 컴퓨터(PC)를 이용한 국산 정액분석기의 개발. 대한불임회지 1995, 22, 63-73.

이해원, 백재승, 이성원, 김청미: 가임력이 인정된 한국 남성 정자의 "Stricter Criteria"에 의한 형태 분석. 대한비뇨기과학회 추계학술대회 1993, P-35.

Mardia KV, Hainsworth TJ: A spatial thresholding method for image segmentation. *IEEE Trans Pat Anal Mach Intl* 1988, 10, 919-927.

Maxwell AE, Pillner AEG: Deriving coefficients of reliability and agreement for ratings. *Br J Math Stat Psychol* 1968, 21, 105-116.

Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJvW, Kruger TF, van Zyl JA: The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990, 5, 586-592.

Morales P, Katz DF, Overstreet JW, Samuels SJ, Chang RJ: The relationship between the motility and morphology of spermatozoa in semen. *J Androl* 1988, 9, 241-247.

Otsu N: A threshold selection method from gray level histograms. *IEEE Trans Syst Man Cyber* 1979, 9, 62-66.

Reddi SS, Rudin SF, Keshavan HR: An optimal multiple threshold scheme for image segmentation. *IEEE Trans Syst Man Cyber* 1984, 14, 661-665.

Schmassmann A, Mikuz G, Bartsch G, Rohr H:

Quantification of human sperm morphology and motility by means of semi-automatic image analysis system. *Microsc Acta* 1979, 82, 163-178.

Sherins RJ, Brightwell D, Sternthal PM: Longitudinal analysis of semen of fertile and infertile men. In: Troen P, Nankin HR, eds. *The Testis in Fertile and Infertile Men.* New York: Raven Press, 1977, 473-488.

Van der Merwe JP, Kruger TF, Swart Y, Lombard CJ: The role of oocyte maturity in the treatment of infertility because of teratozoospermia and normozoospermia with gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril* 1992, 58, 581-586.

Van Duijn C: Cytologic details and size-frequency distributions in human spermatozoa. *Int J Fertil* 1964, 9, 533-545.

Van Duijn C: Cytological structure of human spermatozoa revealed by optical microscopy. In: Westin B, Wiqvist N, eds. *Proceedings of the 5th World Congress on Fertility and Sterility.* Amsterdam: Excerpta Medica Foundation, 1966, 545-555.

Wickings EJ, Freischem CW, Langer K, Nieschlag E: Heterologous ovum penetration test and seminal parameters in fertile and infertile men. *J Androl* 1983, 4, 261-271.

World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.