

비접촉형 경면현미경을 이용한 각막내피세포 분석의 재현성

김 기 산 · 박 영 규

= 요 약 =

비접촉형 경면현미경과 분석프로그램의 별달로 각막내피세포의 형태학적 검사가 간편화 되었으나, 그 정확성에는 부족한 점이 있다. 이에 저자들은 비접촉형 경면현미경 검사의 정확성을 알아보기 위해 Konan noncon Robo-ca sp 8000 비접촉형 경면현미경을 이용하여 각막내피세포를 촬영한 후 내피세포밀도, 세포면적의 변이계수 및 육각형세포의 비율을 분석하여, 이들 결과의 검사자간의 오차와 재현성을 알아보고자 하였다. 두명의 검사자가 정상 각막을 가진 20 안에 대하여 한눈에 각 3회씩 경면현미경 검사를 한 후, 두 명의 검사자간의 오차가 어떠한가를 알아보고자 하였고(1군), 또한 한명의 검사자가 두 안에 대하여 각 10회씩 반복하여 경면현미경 검사를 한 후, 검사의 재현성을 알아보고자 하였다(2군). 1군의 결과를 보면, 내피세포밀도의 평균변이계수는 4.83%, 3.81%로 두 검사자간에 통계학적으로 의의있는 차이는 없었으나 ($p=0.16$), 세포면적의 변이계수(다면성)의 평균변이계수와 육각형세포 비율(다형성)의 평균변이계수는 각각 12.46%, 17.90%와 12.30%, 8.40%로써 두 검사자간에 통계학적으로 의의있는 차이를 보였다($p=0.04$ 및 $p=0.01$). 2군에서는 내피세포밀도의 변이계수는 두 안에서 각각 3.67%와 3.69%로서 변이계수가 낮게 나타나 검사의 재현성이 뛰어났으나, 세포면적의 변이계수의 변이계수는 두 안에서 각각 11.41%, 15.00%, 육각형세포의 비율의 변이계수는 각각 7.79%, 10.24%로 모두 높게 나타나 검사의 재현성이 떨어졌다. 이상의 결과로 Konon noncon Robo-ca sp 8000 비접촉형 자동초점 경면현미경을 이용하여 각막내피세포 분석시 내피세포밀도 검사에서는 검사자간에 오차가 적고 재현성이 좋은 반면에, 세포면적의 변이계수와 육각형 세포비율 검사에서는 검사자간에 오차도 크고 재현성도 떨어짐을 알 수 있었다(한안지 39:1978~1983, 1998).

= Abstract =

Assessment of the Reproducibility of Corneal Endothelial Cell Analysis with Non-Contact Specular Microscope

Ki-San Kim, M.D., Ph.D., Young Kue Park, M.D.

<접수일 : 1998년 3월 16일, 심사통과일 : 1998년 6월 8일>

계명대학교 의과대학 안과학교실

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea

The noncontact autofocus specular microscope with incorporated semiautomated image analyzing program provide a rapid morphometric endothelial analysis. We evaluated the reproducibility of endothelial cell analysis with Konan noncon Robo-ca sp 8000 noncontact specular microscope. Specular microscopic examinations were performed three times each in twenty eyes by two examiners, and ten times each in two eyes by one examiner. The difference of mean coefficient of variation of cell density evaluated by two examiners were not statistically significant(4.83% and 3.81%, p=0.16). But, mean coefficient of variation of CV(coefficient variation of cell size, polymegathism) and hexagonality(pleomorphism) were statistically significantly different between two examiners(12.46%, 17.90%, p=0.04 and 12.30%, 8.40%, p=0.01, respectively). Repeatability evaluated by one examiner in two eyes showed small coefficient of variation of cell density(3.67% & 3.69%) and large coefficient of variation of CV(11.41% & 15.00%) and hexagonality(7.79% & 10.24%).

In conclusion, our study has shown that Konan noncon Robo-ca sp 8000 noncontact specular microscope allows accurate estimation of endothelial cell density. But reproducibility of coefficient of variation of cell size and hexagonality analysis were lower than that of cell density analysis(J Korean Ophthalmol Soc 39:1978~1983, 1998).

Key Words : Corneal endothelial cell, Noncontact specular microscopy, Repeatability

경면현미경을 이용한 각막내피세포의 형태학적 검사는 임상에서 널리 행해지고 있다. 전총각막이식술을 시행하는 경우에서 술전에 공여 각막의 내피세포 검사가 가능하고¹⁾, 술후에 내피세포의 형태학적 변화를 관찰할 수 있으며²⁾, 초음과 수정체 유화술을 이용한 백내장 수술시 발생하는 각막내피세포의 손상정도와 수술중에 사용하는 점탄성 물질의 내피세포 보호효과 판정에도 이용될 수 있다³⁻⁵⁾. 또한 내피 이영양증 등과 같은 각막내피질 환의 진단에 도움이 되며, 연령에 따른 내피세포의 변화 및 콘택트렌즈 착용에 의한 내피세포의 변화관찰 등에도 이용된다⁶⁻⁸⁾.

Vogt⁹⁾는 1920년에 세극등 현미경의 경면반사를 이용하여 생체에서 처음으로 각막내피세포를 관찰했으나 안구운동 및 확대의 제약으로 임상적으로 사용하지는 못하였다. 경면현미경은 1968년에 Maurice¹⁰⁾에 의해 처음으로 고안된 후, 1975년에 Laing¹¹⁾, 1976년에는 Bourne과 Kaufman¹²⁾에 의해서 여러가지 경면현미경이 개발되어 각막내피세포의 임상적 관찰 및 연구에 널리

쓰이게 되었는데, 이들은 모두 경면현미경의 대물렌즈를 각막에 압평시켜서 내피세포를 촬영하는 접촉형 경면현미경이었다.

비접촉형 경면현미경은 1978년에 Holm¹³⁾에 의해 임상에 처음으로 소개된 후 많은 발전을 이루어 왔다. 이들 비접촉형 경면현미경의 장점으로는 각막상피의 손상이 우려되거나 상피손상이 있는 환자에서도 검사가 가능하며, 내피세포의 형태학적 분석을 빠른 시간에 할 수 있고, 같은 장소를 추적 관찰하는 것이 가능하다는 점 등이다. 실제로 Konan noncon Robo-ca sp 8000 비접촉형 경면현미경은 자동초점장치를 이용해서 쉽게 경면 영상을 얻을 수 있으며, 각막내피의 동일한 부위에 초점을 맷을 수 있기 때문에 같은 장소를 추적관찰 하는 것이 가능하다. 또한 반자동화된 영상분석 프로그램을 이용하여 비디오 화면에 기록된 내피세포에서 바로 형태학적 분석이 가능하기 때문에 빠르게 결과를 얻을 수 있다. 그렇지만, 비접촉형 경면현미경을 이용한 각막내피세포 검사시에 접촉형 경면현미경을 이용한 검사에 비

해 검사 결과의 정확성이 떨어진다고 알려져 있다. 나등¹⁴⁾은 비접촉형이 임상적 사용에는 편리하나 해상력이 접촉형에 비해 떨어진다고 하였다.

이에 저자들은 비접촉형 경면현미경을 이용한 각막내피세포 검사의 정확성을 알아보기 위하여 Konan noncon Robo-ca sp 8000 비접촉형 자동초점 경면현미경을 이용하여 각막내피세포의 밀도, 세포면적의 변이계수 및 육각형세포의 비율을 검사하였다. 두 명의 검사자가 동일한 피검사자의 각막내피세포를 검사한 후에 검사자에 따른 오차의 정도가 어떠한지, 또한 같은 검사자가 동일한 피검사자의 각막내피세포를 10회 반복 검사하여 검사의 재현성이 어떠한지를 각 변수별로 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

세극등 현미경 검사상에서 이상 소견이 없고, 안외상이나 심한 안질환의 병력이 없으며, 안과적 수술을 받은 적이 없는 건강한 각막을 가진 20안을 대상으로 하였다. 대상자의 나이 분포는 22세에서 26세까지로 평균 23.8세였다. 각막내피세포의 촬영은 Konan noncon Robo-ca sp 8000 비접촉형 경면현미경을 이용하여 각막 중심부의 내피세포를 촬영하였다. 두 명의 검사자가 20안에 대하여 한눈에 각 3회씩 검사를 실시한 후에 각막내피세포의 밀도, 세포면적의 변이계수 및 육각형세포의 비율 각각에 대하여 검사자에 따른 검사 결과의 오차를 알아 보고자 하였고(1군), 또한 한 명의 검사자가 두 안에 대하여 각 10회씩 반복하여 검사를 실시한 후 역시 각막내피세포의 밀도, 세포면적의 변이계수 및 육각형세포의 비율에 대하여 검사의 재현성을 알아 보고자 하였다(2군).

Konan noncon Robo-ca sp 8000 비접촉형 경면현미경은 자동초점장치를 이용하여 각막내피세포에 초점을 맺은 후에 촬영을 하면 비디오 화면에 각막내피세포의 경면영상이 보이게 된다. 경면현미경에는 영상을 저장할 수 있는 기능은 없고, 반자동화된 영상분석프로그램을 이용해서 비디오 화면에 나타난 영상에서 바로 분석을 한 후, 분석결과가 나타난 영상을 프린터할 수 있다. 비

디오 화면에 나타난 각막내피세포 영상에서 인접하여 분포하고 있는 충분하게 많은 수의 세포의 중심부를 마우스를 이용해서 표시선택하면 자동으로 평균 각막내피세포면적, 내피세포의 밀도, 내피세포의 다면성을 나타내는 세포면적의 변이계수 및 내피세포의 다형성을 나타내는 육각형세포의 비율이 분석된다. 이렇게 구한 각각의 변수들의 변이계수의 변화를 봄으로써 결과의 재현성 및 검사자간의 오차를 판단하였다. 통계 분석은 paired-T test를 이용하여 p 값이 0.05 이하인 경우를 유의하다고 보았다.

결 과

두 명의 검사자가 동일한 20안에 대하여 한눈에 각 3회씩 검사한 후, 두 검사자에 따른 검사 결과의 오차를 알아본 결과(1군), 각막내피세포밀도의 평균은 두 검사자에서 각각 2671.03개/ mm^2 과 2752.86개/ mm^2 , 내피세포면적의 변이계수의 평균은 37.40과 37.02, 육각형세포 비율의 평균은 58.97%와 61.80%이고, 이들 변수들의 평균변이계수를 보면 내피세포밀도의 평균변이계수는 각각 4.83%, 3.81%로 두 검사자간에 통계학적으로 의의있는 차이는 없었지만($p=0.16$), 내피세포면적의 변이계수(다면성)의 평균변이계수는 12.46%, 17.90%, 육각형세포 비율(다형성)의 평균변이계수는 12.30%, 8.40%로써 두 검사자간에 통계학적으로 의의있는 차이를 보여($p=0.04$, $p=0.01$), 비접촉형 경면현미경을 이용한 각막내피세포 검사시에 내피세포밀도 검사에서는 검사자에 따른 오차가 적었으나, 세포면적의 변이계수와 육각형세포 비율의 검사에서는 두 검사자간에 통계학적으로 의의있는 차이를 보였다(Table 1).

한명의 검사자가 2안에 대하여 각 10회씩 반복 검사하여 검사의 재현성을 알아본 결과(2군)는 Table 2에서 보는 바와 같다. 각막내피세포밀도는 우안은 최저 2702개/ mm^2 , 최고 3067개/ mm^2 로써 평균 2862.40개/ mm^2 이고, 좌안은 최저 2564개/ mm^2 , 최고 2932개/ mm^2 로써 평균 2814.43개/ mm^2 이다. 내피세포면적의 변이계수는 우안은 최저 24

— 김기산 외 : 비접촉형 경면 현미경 검사 —

Table 1. Results of corneal endothelial cell analysis in group 1

Examiners	Statisticus	CD*	CV†	6A*
I	Mean	2671.03	37.40	58.97
	Standard deviation	228.67	2.87	5.83
	Mean coefficient of variation	4.83±2.57%	12.46±7.13%	12.30±5.35%
II	Mean	2752.86	37.02	61.80
	Standard deviation	234.25	4.69	5.94
	Mean coefficient of variation	3.81±1.72%	17.90±8.15%	8.40±4.30%
Paired T-test		p=0.16	p=0.04	p=0.01

CD* : Cell density

CV† : Coefficient of variation in cell size

6A* : Percent of hexagonal cells

Table 2. Results of corneal endothelial cell analysis in group 2

Number	I			II		
	CD*	CV†	6A*	CD*	CV†	6A*
1	2906	29	68	2932	26	70
2	2840	36	59	2932	28	70
3	2881	31	64	2824	33	67
4	2890	37	61	2801	24	79
5	2808	33	62	2832	24	80
6	2724	31	67	2564	36	59
7	2865	33	53	2785	26	77
8	3067	33	61	2785	33	62
9	2702	33	63	2808	28	78
10	2941	24	70	2881	25	69
Mean	2862.40	32.01	62.84	2814.43	28.34	71.10
Standard deviation	105.09	3.65	4.89	103.89	4.24	7.28
Coefficient variation	3.67%	11.41%	7.79%	3.69%	15.00%	10.24%

CD* : Cell density

CV† : Coefficient of variation in cell size

6A* : Percent of hexagonal cells

에서 최고 37로써 평균 32.01, 좌안은 최저 24에서 최고 36로써 평균 28.34이며, 육각형세포의 비율은 우안은 최저 59, 최고 70로써 평균 62.84%, 좌안은 최저 59, 최고 80로써 평균 71.10%이다. 각 변수의 변이계수를 보면, 내피세포밀도의 변이계수는 두 안에서 각각 3.67%와 3.69%로 두 안 모두에서 변이계수가 낮게 나타나 내피세포밀도검사에서는 재현성이 좋았으나, 내피세포면적의 변이계수(다면성)의 변이계수는

11.41%와 15.00%로 두 안 모두에서 변이계수가 높게 나타나 내피세포밀도 분석시 보다 재현성이 떨어졌으며, 육각형세포비율(다면성)의 변이계수도 7.79%와 10.24%로 역시 내피세포밀도 분석시보다 재현성이 떨어졌다.

고 찰

경면현미경의 발달로 인하여 생체내의 각막내피

세포를 간편하게 검사할 수 있게 되었다. 초기에 개발되어 임상에 사용한 경면현미경은 대물렌즈를 각막에 압평시킨 후 내피세포를 촬영하는 접촉형 경면현미경으로써, 해상력이 뛰어나고 고배율로 확대된상을 얻을 수 있었다. 그러나 경면현미경을 피검자의 각막에 직접 접촉시킨 상태에서 조작을 하기 때문에, 각막상피에 손상이 우려되거나 손상이 있는 환자에게는 적합하지 않았다. 이에 반해, 비접촉형 경면현미경은 각막상피에 손상이 있는 환자에서도 검사가 가능한 장점이 있다. 또한, 경면현미경의 대물렌즈를 각막에 접촉시킴으로써 피검자들이 느끼는 거부감을 없앨 수 있고, 최근에 안과 수술을 시행받은 눈이나 각막에 감염성 질환을 비롯한 여러가지 질환이 있는 눈에서도 검사가 가능하다. Price와 Cheng¹⁵⁾은 접촉형 경면현미경과 비접촉형 경면현미경으로 각막내피세포를 검사한 후, 환자들이 느끼는 불편감을 비교하였다. 10명을 대상으로 검사하여 비접촉형 경면현미경으로 검사시에는 10명 모두에서 불편감을 느끼지 않은 반면에, 접촉형 경면현미경으로 검사시에는 5명에서 자신들의 각막에 대물렌즈가 접촉하는 것에 대한 거부감과 경면현미경에서 나오는 강렬한 빛으로 인한 눈부심 및 검사중의 과다한 눈물 흘림 등으로 불편감을 느꼈다고 발표하였다. 그 밖에, 접촉형 경면현미경은 각막내피세포의 동일한 부위를 반복해서 촬영하는 것이 힘든 반면에, 비접촉형 경면현미경으로 검사시에는 동일한 부위라고 확인할 수 있는 표식이 되는 특징적인 부위가 있다면 같은 장소를 반복해서 추적 관찰하는 것이 가능하며, 접촉형 경면현미경은 각막윤부에서 2 내지 3mm 범위의 각막 주변부를 관찰하는 것이 불가능하고 각막중심부의 50~60% 범위내의 각막내피세포만을 관찰할 수 있는 반면에, 비접촉형 경면현미경은 각막의 주변부를 비롯하여 각막의 거의 모든 부분을 쉽게 관찰할 수 있다¹⁶⁾.

Landes 등¹⁷⁾은 세가지의 반자동형 경면현미경 (Zeiss 비접촉형 경면현미경, Keeler Konan sp 3300 접촉형 경면현미경, Konan noncon Robo-ca sp 8000 비접촉형 경면현미경)으로 건강한 각막을 가진 12안의 각막내피세포를 한눈에 각 3번씩 촬영하여 각막내피세포면적을 분석한 후 검사

의 재현성을 비교하였다. 각막내피세포면적의 평균변이계수가 Zeiss 비접촉형 경면현미경으로는 3.9%, Keeler Konan sp 3300 접촉형 경면현미경으로는 4.0%, Konan noncon Robo-ca sp 8000 비접촉형 경면현미경으로는 2.2%로 Konan noncon Robo-ca sp 8000 비접촉형 경면현미경에서 재현성이 가장 뛰어났다고 발표하였다. 또한 Tagawa 등¹⁸⁾은 sp 1000 Topcon 비접촉형 자동초점 경면현미경으로 10안의 건강한 각막의 내피세포를 한눈에 각 5번씩 촬영후 분석하여 검사의 재현성을 알아 보았다. 10안에서의 내피세포면적의 변이계수의 평균과 내피세포밀도의 변이계수의 평균이 각각 5% 이하로 검사의 재현성이 뛰어났다고 발표하였다. 본 연구에서도 내피세포밀도 분석 시 약 3-4%의 변이계수를 보여 이를 연구와 큰 차이가 없었으며 검사자간의 유의한 오차도 없었다. 그러나, 다면성의 지표가 되는 내피세포면적의 변이계수와 다형성의 지표인 육각형세포 비율의 분석시에는 재현성이 떨어졌으며 검사자간의 오차도 통계학적으로 의의있게 나타났다.

경면현미경을 이용한 각막내피세포 검사시, 한번 검사에 몇개 이상의 내피세포를 분석할 것인지 를 결정하는 것이 중요하다. Hirst 등¹⁶⁾에 의하면 규칙적인 모자이크 형태를 보이는 정상 각막내피세포에서는 50개 이상의 세포를 분석하면, 내피세포밀도 분석시 신뢰성이 높은 결과를 얻을 수 있으나, 나이가 많은 사람의 각막내피세포나 안내수술중 내피세포가 외상을 받았던 경우에는 세포의 크기가 변화가 심하고 세포밀도가 낮아서 부적절했다고 하였다. 또한 내피세포밀도가 매우 낮은 각막에서는 비접촉형 경면현미경으로 촬영시 비디오 화면에 얻을 수 있는 내피세포수가 50개 이상을 넘지 못하는 경우도 있다. 대부분의 비접촉형 경면현미경은 접촉형 경면현미경보다 좁은 시야를 가지므로 촬영시 비디오 화면에 얻을 수 있는 세포수가 제한적이지만, Konan noncon Robo-ca sp 8000 비접촉형 경면현미경은 다른 비접촉형 경면현미경보다 넓은 시야를 가지므로 충분한 수의 세포를 얻을 수 있다. 일반적으로는 최소 75개에서 100개 사이의 세포를 분석할 것을 권유한다¹⁹⁾. 본 연구에서는 최저 61개에서 최고

110개까지 평균 81.3개의 내피세포를 분석하였는데, 분석시 내피세포의 중심에 마우스를 이용해서 표시를 한 세포수와 실제로 분석된 세포수와는 항상 차이가 있었다. 그래서, 분석시 마우스를 이용해서 비디오 화면에 나타난 세포의 중심에 표시를 할때 인접하여 분포되어 있는 세포를 하나도 빠뜨림없이 모두 표시하고, 내피세포의 중심에 정확히 표시해야 많은 수의 세포가 분석에 이용될 수 있을 것이다. 따라서 보다 정확한 결과를 얻기 위해서는 숙련된 한명의 검사자가 계속 추적검사 하는 것이 좋겠고, 가능한 많은 수의 세포를 분석하는 것이 필요하며 또한 몇번의 반복 검사의 평균치를 취하는 것이 보다 정확한 결과를 얻을 수 있다고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Bourne WM : *Examination and photography of donor corneal endothelium*. Arch Ophthalmol 96:1799-1800, 1976.
- 2) Laing RA, Sandstrom MM, Berrospi AR, Leibowitz HM : *Morphological changes in corneal endothelial cells after penetrating keratoplasty*. Am J Ophthalmol 82:459-464, 1976.
- 3) Sugar J, Mitchelson J, Kraff M : *The effect of phacoemulsification on corneal endothelial cell density*. Arch Ophthalmol 96:446-448, 1978.
- 4) Graue EL, Polack FM, Balazs EA : *The protective effect of Na-hyaluronate to corneal endothelium*. Exp Eye Res 31:119-127, 1980.
- 5) 백종민, 김기산, 오준섭 : 수정체 전낭하 백내장 낭외 적출술 후 후방인공수정체 삽입기술에서의 각막내피세포의 형태학적 분석. 한안지 33:476-483, 1992.
- 6) Laule A, Cable MK, Hoffman CE, Hanna C : *Endothelial cell population changes of human cornea during life*. Arch Ophthalmol 96:2031-2035, 1978.
- 7) MacRae SM, Matsuda M, Phillips DS : *The long-term effects of polymethylmethacrylate contact lens wear on the corneal endothelium*. Ophthalmology 101:365-370, 1994.
- 8) 김기산, 박성렬, 오준섭 : 정상 한국인의 각막내피세포의 형태학적 분석. 한안지 33:320-325, 1992.
- 9) Vogt A : *Die Sichtbarkeit des lebenden Hornhautendothels; Ein Beitrag zur Methodik der Spalulampenmikroskopie*. Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol 101:123-144, 1920.
- 10) Maurice DM : *Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye*. Experientia 24:1094-1095, 1968.
- 11) Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM : *In vivo photomicrography of the corneal endothelium*. Arch Ophthalmol 93:143-145, 1975.
- 12) Bourne WM, Kaufman HE : *Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo*. Am J Ophthalmol 81:319-323, 1976.
- 13) Holm O : *High magnification photography of the anterior segment of the human eye*. Trans Sweed Ophthal Soc Acta Ophthal(kbh) 56:457-476, 1978.
- 14) 나화균, 이상욱 : 백내장수술후의 각막내피세포밀도의 변화. 한안지 22:503-511, 1981.
- 15) Price NC, Cheng H : *Contact and noncontact specular microscopy*. Br J Ophthalmol 65:568-574, 1981.
- 16) Hirst LW, Ferris FL III, Stark WJ, Fleishman JA : *Clinical specular microscopy*. Invest Ophthalmol Vis Sci 19:2-4, 1980.
- 17) Landesz M, Siertsema JV, Van Rij G : *Comparative study of three semiautomated specular microscope*. J Cataract Refract Surg 21:409-416, 1995.
- 18) Tagawa H, Kado M, Okada A : *Property and clinical availability of the noncontact autofocus specular microscope*. Invest Ophthalmol Vis Sci 35(Suppl):1598, 1994.
- 19) Waring GO III, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR : *The Corneal endothelium; normal and pathologic structure and function*. Ophthalmology 89:531-590, 1982.