

마우스의 3차원 전정안반사 측정

¹연세대학교 의과대학 이비인후과학교실, ²가천대학교 의과대학 이비인후과학교실

김미주¹, 한규철²

3-Dimensional Vestibuloocular Reflex Recordings of C57BL/6 Mouse Using 385 nm Ultra-Violet Lighting

Mi Joo Kim, MD¹, Gyu Cheol Han, MD, PhD²

¹Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul; and ²Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Gachon University of Medicine and Science, Graduate School of Medicine, Incheon, Korea

• Corresponding Author:
Gyu Cheol Han, MD, PhD
Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Gachon University of Medicine and Science, Graduate School of Medicine, 21 Namdong-daero 774beon-gil, Namdong-gu, Incheon 405-760, Korea
Tel: +82-32-460-3324
Fax: +82-32-467-9044
E-mail: hangckr@gmail.com

• Copyright © 2012 by
The Korean Balance Society.
All rights reserved.

Background and Objectives: Non-primate Vertebrates are widely used to study vestibular system since their vestibular reflex is very similar to the one in humans. Recording vestibulo-ocular reflex (VOR) in laboratory animals such as mice is technically very sophisticated. Thus, three-dimensional (3D) recording method for VOR has been newly developed in which a 200 μ m-sized marker is attached to the eyeball of a C57BL/6 mouse and a certain ultra-violet (UV) ray is illuminated to it. **Materials and Methods:** A bolt for head fixation was permanently implanted on the skull under inhalation anesthesia. The range of given rotational stimulation was $\pm 100^\circ/\text{sec}$ with the frequency of 0.1 Hz and 0.2 Hz. The analysis was performed with the data gathered from at least three cycles, and the maximum slow-phase velocity of the eyeball was averaged from the data to calculate gain, phase and symmetry. **Results:** In eyeball rotation data recorded with a video-nystagmus-recording machine with UV ray illumination, an error occurred by eyeball rotation were ignorable since its diameter was very small (error rate < 1 pixel). Preoperatively undergiven. 0.1 Hz stimulation, average maximum slow-phase velocity was $14.95 \pm 4.80^\circ/\text{sec}$ in the clockwise rotation and $14.94 \pm 4.01^\circ/\text{sec}$ to the opposite. **Conclusion:** The nystagmus was able to be quantified in C57BL/6 mice by using 3D recording method for VOR with 385 nm UV ray illumination.

Research in Vestibular Science 2012;11 Suppl 2:S22-S28

Key Words: Vestibulo-Ocular Reflex; 3 Dimensional Video-Oculography

서론

전정안반사는 매우 즉각적이고 일정한 패턴을 보여주므로 전정계 연구에 매우 유용한 지표로 사용된다. 따라서 안구운동을 정확하게 측정하는 것은 전정계 연구에서 매우 중요하다.¹ 안구는 3차원적으로 움직이고, 비영장류 실험동물은 안구의 크기가 작고 인간과 달리 홍채, 공막 등의 명

도 대비가 매우 작아서 정확한 측정이 어렵다. 이러한 3차원적인 안구운동을 측정하기 위해 개발된 공막 수색코일 기술(sclera search coil technique)이 사용되어 왔으나²⁻⁴ 코일 이식수술에 따른 각막에 흉터나 염증 등과 안구를 누르는 효과 때문에 안구 움직임을 제한하거나 결과를 왜곡시킬 수 있다.⁵

이러한 수색 코일의 단점을 비디오안진계가 보완할 수

있다. 이는 동공을 추적하거나 각막 반사를 이용하여 수평적, 수직적 안구 위치를 측정한다.^{6,7} 최근에는 안구에 마커를 부착하여 회전축(axis of rotation)에 대한 벡터(vector)값의 변화량을 추적함으로써 안구회전운동까지도 측정이 가능하여 친칠라, 토끼, 기니픽, 랫트, 그리고 마우스와 같은 실험동물에 적용한 예들이 보고 되고 있다.^{1,8,9} 본 논고에서는 마커를 안구에 부착하여 385 nm자외선을 이용하여 텔레센트릭 렌즈(telecentric lens)를 부착한 200 vfps 고속카메라로 촬영하는 방법에 대해 논하고자 한다.

대상 및 방법

1. 비디오 안진측정을 위한 마취 및 실험동물 준비

실험동물에서 정확한 안진을 기록하기 위해서는 생리적 활력증후가 안정화 되고 마취가 되지 않은 상태로 정신이 명료한 상태에서 측정해야 한다. 마취된 상태에서는 안진이 전형 발현이 안되거나, 졸린 상태에서는 안진의 측정이 부정확하므로 대상 실험동물의 생체리듬을 미리 조절하여야 한다. 따라서 수술적 조작이 필요한 경우 흡입마취를 사용하여 실험을 한 후 충분한 회복 시간이 경과 되고서 안진을 측정하거나 부득이 복강내 주사로 마취를 하는 경우는 수술 후 안진을 바로 측정하지 말고 최소 1일 이후에 측정한다.

2. 머리고정용 나사 고정

마취가 되지 않은 상태에서 안진을 측정해야 하므로 두정위에 머리고정을 위한 볼트나 너트를 덴탈세멘트로 미리 고정하는 작업이 반드시 필요하다. 본 실험실에서는 한 개의 볼트를 머리고정용으로 사용한다. 안진측정은 본 나사시술이 안정화되는 1주일 이후에 이루어진다(Figure 1).

3. 마커의 제작과 부착

실험동물에서의 안진측정 방법은 사람처럼 각막윤(limbus corneae)을 추적할 수 없는 경우가 많다. 따라서 각막에 미리 정확히 디자인 된 마커를 부착시켜 추적하게 된다. 본 실험실에서는 직경 200 μ m 검은 점 4개를 200 μ m 간격으로 정사각형으로 배열한 마커와 3개의 흰 점이 박힌 삼각형 마커, 그리고 완전히 흰 삼각형 마커 등을 대상 동물에 따라 선택적으로 사용한다. 마커의 부착은 마우스의 동공을 현미경으로 확인한 상태에서 염산프로파라카인(알카인 0.5% 점안액, S.A.Alcon-Couvreur N.V, Purrs, Belgium)을 점안하고 소량의 순간접착제(Gel-10, Daejin Chemical Co., Siheung, Korea)를 이용하여 안구에 고정시킨다. 안검이 전정안반사 측정을 방해한다고 생각되는 경우에는 상하안검을 각각 상부-하부 피부에 외전봉합하고 실험을 진행한다. 아울러 안진을 측정하는 반대편 안구에는 연고를 도포하여

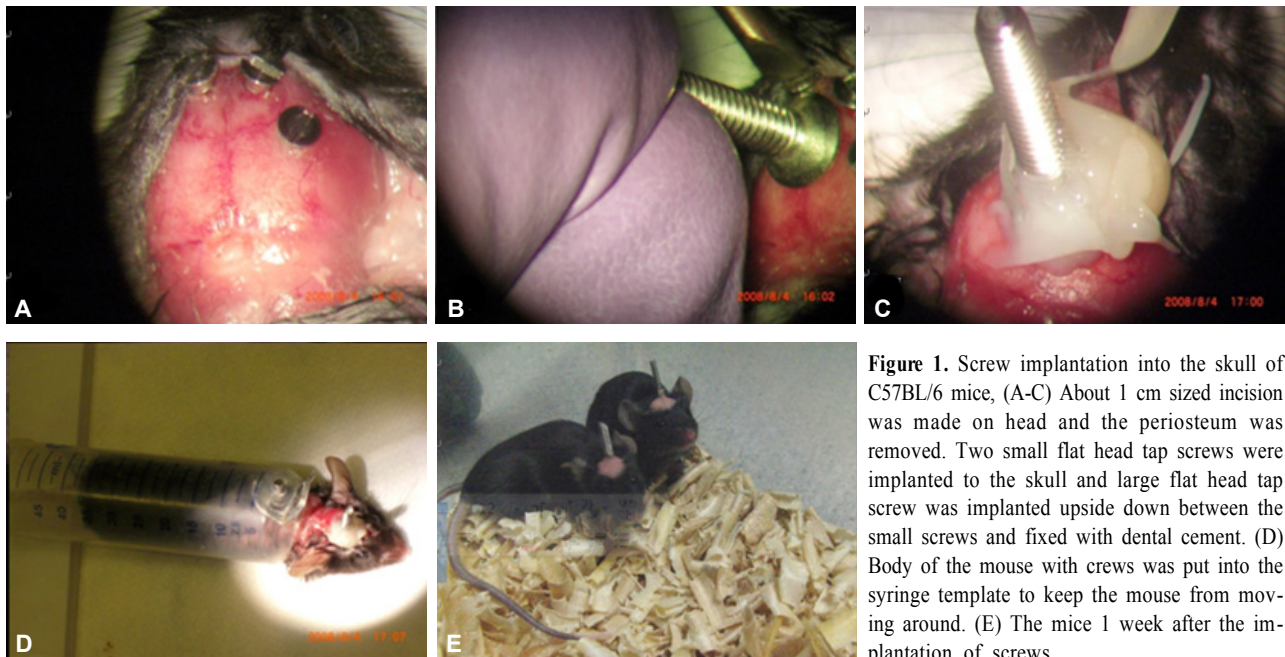


Figure 1. Screw implantation into the skull of C57BL/6 mice, (A-C) About 1 cm sized incision was made on head and the periosteum was removed. Two small flat head tap screws were implanted to the skull and large flat head tap screw was implanted upside down between the small screws and fixed with dental cement. (D) Body of the mouse with crews was put into the syringe template to keep the mouse from moving around. (E) The mice 1 week after the implantation of screws.

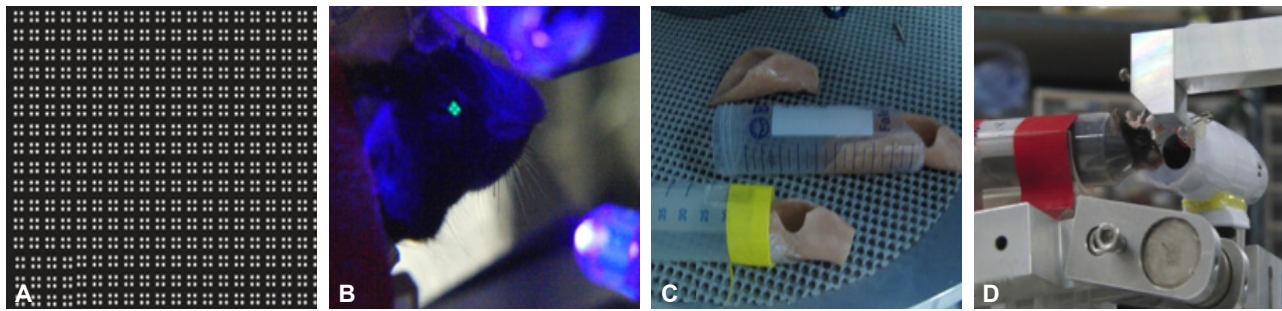


Figure 2. Markers on the eye of mouse. (A) Four round shaped markers which are 200 μm sized and intervals and placed into a square. (B) Markers on its eye which reflect the LED light. (C) Syringe restrainer and head template to fix the body and head of the mouse. (D) The mouse in the restrainer with screws which was fixed into the sinus animal rotator.

시야고정을 최대한 방지해야 한다(Figure 2).

4. 안 운동 측정

안진측정을 위한 회전자극은 30°/sec, 60°/sec, 100°/sec의 최대 각속도에 0.01 Hz부터 0.1 Hz사이의 저주파와 0.1 Hz부터 0.5 Hz 사이의 중간 주파수를 사용하면 회전자극에 대한 안진을 충분히 얻을 수 있다. 안구운동을 측정하기 위해 200 fps (GRAS-03K2M-C, Point Grey Research Inc., Richmond, BC, Canada)로 10 lux 이하 암실 하에서 촬영을 하며 이때 Y2 필터(Hoya 25 mm Y2, Tokina Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 장착한 텔레센트릭 렌즈(TCL1.0x-40-ST, SPO Inc., Daejeon, Korea)와 6개의 접사링(ML-EXR5, Point Grey Research Inc., Canada)을 사용하고 1394 b 케이블(HAR-1394-1721, Point Grey Research Inc., Canada)과 전용 캡처보드(HP NK653AA, Hewlett-Packard development Company, Palo Alto, CA USA)를 사용하여 Fly-capture ver.2 64 bit-용(Point Grey Research, Inc., Canada)으로 전용 IBM 호환 컴퓨터에 640×480 픽셀의 크기로 *.avi 형태의 파일로 저장한다. 동공부분에 부착된 마커의 형광반사를 유발시키기 위해 385 nm (VAOL-3EUV8Y4, VCC optoelectronics, San Marcos, CA, USA) 조명기구를 렌즈의 최전방에서 실험동물 눈 주위로 집중 되도록 고정하고 3 V 건전지를 이용하여 일정 광도를 유지하도록 한다. 카메라 및 분석 프로그램의 보정은 마커가 부착된 직경 3 mm 검은색 구슬을 회전마이크로 스테이지의 중심에 완전 고정시키고 상하 좌우 5°씩 최대 30°까지 이동시켜 얻어진 픽셀의 비율 보정값을 분석용 프로그램에 주기적으로 대입해 주기도 하고 카메라와 안구의 회전축의 얼라인먼트를 맞춘 후 프로그램을 이용하여 자동 보정하도록 할 수도 있다. 보정 과정은, 이론상의 한 점 X, Y, Z를 실제 공간상에서의 좌표라 보면,

변환된 u, v 는 카메라로부터 얻어진 영상의 픽셀 좌표라 간주한다. 그리고 행렬 A 는 camera matrix라 하여 카메라와 관련된 고유 정보를 보정하기 위함이고, 초점 거리에 대한 보정도 이 행렬을 통하여 이루어진다. 그리고 $[R|t]$ 는 회전과 이동을 보정하기 위한 것으로 카메라 고유의 정보라기 보다 외부 카메라 위치에 의한 영향을 반영하는 인자이다. 그러므로 보정을 통하여 위 행렬 정보들을 구한 다음 얻어진 영상들을 통해서 분석을 할 경우, 실제 3차원 정보가 2차원으로 투영된 것에 대한 왜곡을 최소화할 수 있다(Formulas 1, 2).

$$s * m' = A [R|t] * M' \dots\dots\dots \text{Formula 1}$$

$$s \begin{bmatrix} u \\ v \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_x & 0 & c_x \\ 0 & \alpha_y & c_y \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} & t_1 \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} & t_2 \\ r_{31} & r_{32} & r_{33} & t_3 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \\ 1 \end{bmatrix} \dots\dots \text{Formula 2}$$

보정 이후 얻어진 영상으로부터 안구의 위치정보를 추출할 때 사용한 식은 Formula 3이다. 형광 물질을 이용하면 마커만 밝게 보이는데, 밝게 보이는 부분은 크게 4개 영역의 정보로 나뉜다. 즉 각 마커마다 영상에서 하나의 영역으로 보여진다. 이 영역의 중심점이 마커의 중점으로 볼 수 있기에 영상에서 영역의 중심을 아래 식과 같이 픽셀이 위치한 x 좌표와 y 좌표의 평균값을 취하여 마커의 중심 위치를 추정한다.

안구의 회전각도는 마커를 안구 회전축의 중심으로 대칭되는 곳에 붙였기 때문에 임의의 초기 대각선을 기준으로 하여 변화되는 각도를 계산하여 이를 회전운동으로 추정한다(Formulas 4-6).

$$(X_{mc}, Y_{mc}) = \left(\frac{\sum_{i=1}^{N_m} x_{mi}}{N_m}, \frac{\sum_{i=1}^{N_m} y_{mi}}{N_m} \right) \dots\dots\dots \text{Formula 3}$$

$$\theta_1 = \tan^{-1} \left(\frac{y_3 - y_1}{x_3 - x_1} \right) \dots\dots\dots \text{Formula 4}$$

$$\theta_2 = \tan^{-1} \left(\frac{y_4 - y_2}{x_4 - x_2} \right) \dots\dots\dots \text{Formula 5}$$

$$\text{Torsion} = \frac{\theta_1 - \theta_2}{2} \dots\dots\dots \text{Formula 6}$$

최종 안진 분석은 앞서 얻은 안구위치정보와 회전자극기 정보가 수록된 동영상상을 C++로 제작된 프로그램으로 전환하여 원하는 자극구간의 평균 최대 완서상 속도, 지정 구간에 대한 이득, 위상차, 대칭성을 얻을 수 있다.

결 과

1. 보정에 따른 예민도

2.5°씩 상하좌우로 보정용 회전마이크로 스테이지를 이동하여(Figure 3) 영상의 중심점의 이동 픽셀값을 구하였을 때, 수평-수직-회선이동에 대한 1차 함수의 회귀곡선은 R² 값이 각각99.6%, 99.7%, 99.1%였고 직선식은 y=3.706x, y=3.686x-2.32, y=0.9x-0.76으로 일정한 값을 보였으며 이를 바탕으로 얻은 수평-수직-회선운동 에러율은 0.32%, 0.36%, 0.93%로써 유의하게 매우 안정된 값을 보였다(p<0.05). 구체인 안구의 만곡에 따른 내외측 눈구석(medial-lateral canthus)

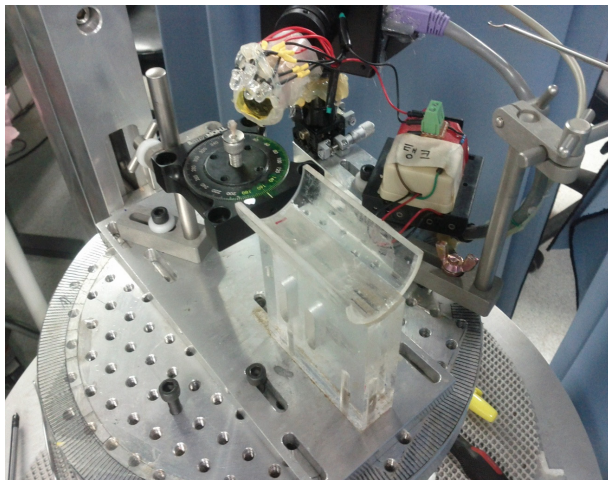


Figure 3. Horizontal calibration process of camera. 3 mm diameter black bead with rotation microstage was used for exact calibration instead of real eyeball of mouse in experimental position.

에서의 에러율을 측정한 바 마우스의 안구의 직경이 충분히 작고 텔레센트릭 렌즈를 사용함으로써 1픽셀 이하로 무시할 수 있는 정도였다(Figure 4).

2. 정상 마우스에서의 전정안반사

0.1 Hz자극에 따른 평균 최대 완서상 속도는 회전반이 좌측에서 우측으로 이동 시 14.95±4.80°/sec, 우측에서 좌측으

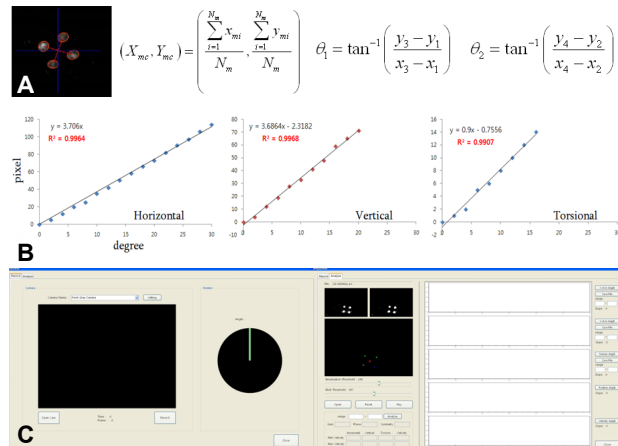


Figure 4. (A) Formulas for analysis of vestibulo-ocular reflex (VOR) of mouse using the markers on the eye. (B) Adjustment of the data in horizontal, vertical and torsional eye movements. (C) Programs to measure and analyze the eye movements.

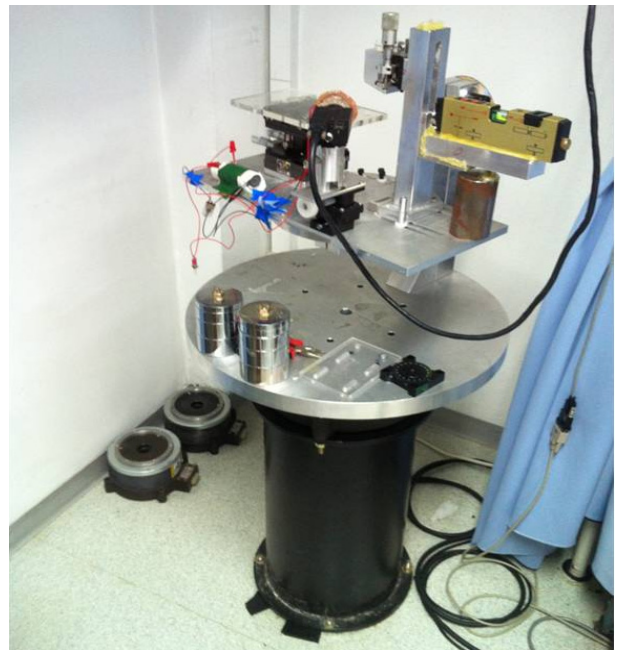


Figure 5. Animal rotator with camera setting.

로 이동 시 $14.94 \pm 4.01^\circ/\text{sec}$ 이었다. 0.1 Hz 회전 자극에 따른 이득은 $0.4-0.8$ (mean $\pm$ standard deviation = 0.64 ± 0.22)의 범위였고 위상차는 위상 선행이 뚜렷했으며 크기는 약 6° 에 해당하였다. 대칭성은 0에 수렴하는 형태로 개체마다 차이를 보였다(Figures 5-8).

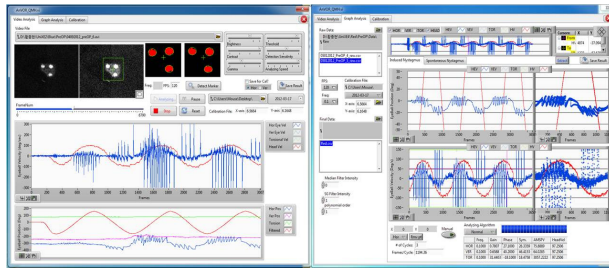


Figure 6. Nystagmus analysis program. The program was designed for 3D analysis of eye movement.

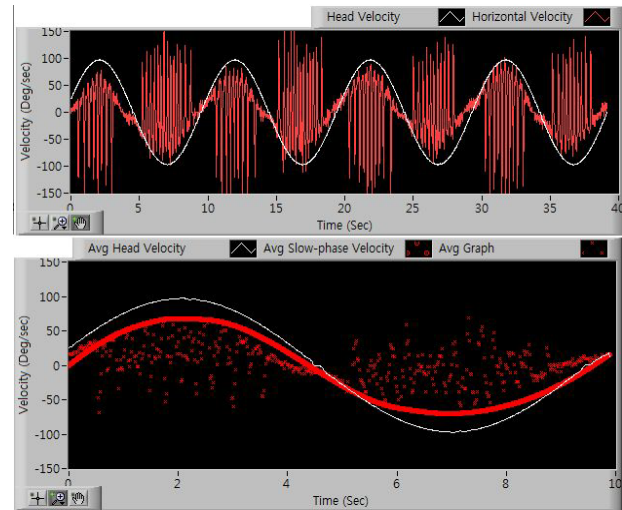


Figure 7. The one result of horizontal nystagmus analysis. The rotation stimulation was $100^\circ/\text{sec}$, 0.1 Hz. The gain, phase and symmetry is 0.82, 6.5° , 0.2435 respectively.

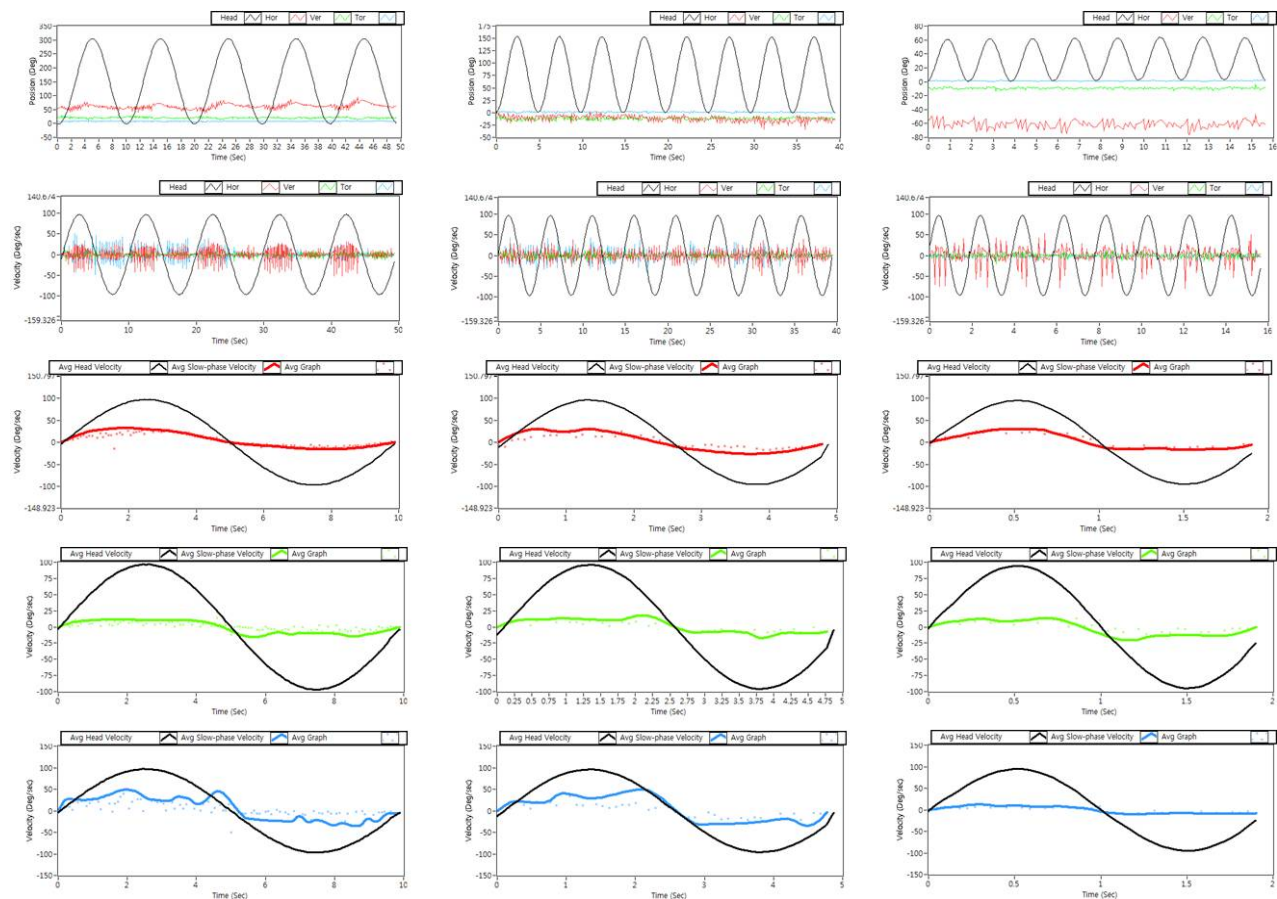


Figure 8. The one result of horizontal-vertical-torsional nystagmus analysis in transgenic mouse. The left, mid and right column means 0.1-0.2-0.5 Hz respectively. The top to bottom figures mean position, slow phase velocity of eye movement, horizontal nystagmus summation result, vertical nystagmus summation result, torsional nystagmus summation result respectively.

고 찰

전정안반사는 반응시간이 16 msec 이내의 빠른 반사궁으로써 전정기능변화를 신속하게 대별한다. 따라서 마우스의 안구운동추적은 전정기관의 생리적 특성과 반응을 측정하기 위해 필수적인 실험 방법임에도 불구하고 인체에 사용되는 방법인 3차원 비디오안진계의 적용이 어려웠다.¹⁰ 그 이유로는 첫째로 마우스 안구의 크기나 공막색깔의 명암대비가 뚜렷하지 않고 영상추적을 위한 특징이 없다는 것이다. 둘째로는 안구운동의 보상이 진행되는 기간에 객관적으로 검사간 신뢰도를 유지하면서 반복측정하기가 어렵다는 것이다.^{11,12} 셋째는 측안 동물(lateral eyed animal)의 경우 각기 독립된 tectofugal visual system으로 선택적 내부 주시 기전(selective internal attention mechanism)에 의해 사물을 인식한다는 점뿐만 아니라 각기 3개 신경원으로 구성된 공액운동이 존재하기는 하지만 눈모음-눈벌림(convergence & divergence)에 관련된 운동이 존재하지 않기 때문에 전안동물이 입체시를 만드는 방법과 달라 수의적 안구운동과 반사궁과 같은 불수의적 안구운동의 메커니즘이 독립적으로 존재하거나 불수의적 운동조차도 다른 수의적 안구운동 조절 신경원들의 영향을 받을 가능성이 있다는 점이다. 본 실험은 마커를 이용하고 머리고정장치를 강화하였으며 반사궁만을 측정한다는 점에서 앞서 지적한 모든 문제점을 모두 극복하고 비디오안진계의 완성도를 높였다.¹³

비디오안진계를 동물에 적용하려면 머리고정이 필수적이다. 이를 위해 다양한 방법들이 소개되었는데,^{12,14} 본 실험에서는 3개의 작은 접시머리 십자나사와 긴 접시머리 십자나사를 이용하였다. 작은 접시머리 십자나사를 고정할 때 두개골에 정교하게 작은 구멍을 내고 돌려서 박는 방식으로 나사의 절반 정도가 삽입되도록 함으로써 대뇌 손상을 최소화하여 이 방법으로 같은 개체에서 약 4주까지 반복 안진측정이 가능하였다. 기존의 소개된 적외선을 이용한 방법들은 수평 혹은 수직안진의 측정만이 가능하였다. 이를 극복하기 위해 소개된 마커와 적외선을 이용한 측정법은 3차원 분석의 가능성을 제시하기에 충분하였다. 마커를 이용한 방법은 마커의 크기가 커짐에 따라 안구운동 범위를 제한할 가능성을 내포한다. 더군다나 측안 동물의 특성상 머리-눈 정렬과 x-y-z방향 안구운동의 이득이 일반적인 중심오목과 동물(foveated animal)과 다르다는 점에서 마커의 크기와 부착방법의 일관성은 충분히 중요한 영향인자일 수 있다.¹⁵ 하지만 마커의 전체 크기가 500 μm 이내로 현미경하

에서 동공에 정확히 부착을 시키면 직경 3.2 mm내외 크기의 안구운동범위에 별 영향을 주지 않는다. 카메라로 영상을 얻을 경우, 실제 영상 정보가 1:1로 카메라 영상으로 얻어지는 것은 아니다. 렌즈에 따라서 실제 크기(길이)와 영상의 크기(픽셀)가 다를 수 있고, 영상의 가운데 부분과 가장자리 부분이 동일한 픽셀 크기임에도 불구하고 왜곡에 의해서 실제 크기를 일정한 축적으로 반영하지 못한다. 이를 최소화 하기 위해 이미 알려진 기준 영상을 이용하여 보정 작업을 통해서 카메라의 왜곡률과 최소화한다. 실험 전 보정을 통한 마커의 부착 각도와 렌즈와의 거리, 카메라의 위치, 머리의 위치 등이 보정하기 때문에 마커에 대한 내적편견은 최소화되었다고 볼 수 있다. 눈깜빡임은 동영상 자체를 얻을 수 없게 하거나 심한 경우 마커를 이탈시킬 수 있다. 이를 해결하기 위해서 상하 안검을 10-0 나이론 봉합사로 외전봉합을 시행하였다. 일시적인 안구감각마비와 눈물량의 조절을 위한 안약은 양측에 동일하게 사용하였다. 조도의 변화는 동영상분석에 직접적인 영향을 미칠 수 있는 요소이다. 385 nm의 파장 조사를 위해 사용한 LED는 개당 15도의 조사각도를 갖고 72 mcd의 밝기이고 4개를 동시에 조사하였으므로 총 조사량은 288 mcd이다.

인체와 달리 본 실험용 비디오안진계는 측안동물을 대상으로 하기 때문에 안진의 특정 방향으로의 비대칭이 주요한 쟁점이 될 수 있고 이를 안정적으로 보정할 수 있는 방법을 강구해야 할 것으로 보인다. 또한 마우스의 안구는 직경이 3.2 mm로 내외측 눈구석에서의 오차율이 1픽셀 이하였지만 랫트나 친칠라와 같이 안구의 직경이 큰 경우 오차율이 의미 있는 값을 가질 수 있으므로 이를 보정할 수 있는 장치를 마련해야 보편적으로 사용할 수 있는 분석 프로그램이 될 것이다.

결 론

본 고에서 소개한 3차원 비디오 안진계는 마우스와 같은 소동물에서 안진을 적절히 정량화할 수 있으며 향후 국내 평형기관 연구에 많은 기여를 할 것으로 생각한다.

Acknowledgement

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2010-0011858).

중심 단어: 전정안반사, 마우스, 삼차원 안진분석, 안구 운동

REFERENCES

1. **Migliaccio AA, Macdougall HG, Minor LB, Della Santina CC.** Inexpensive system for real-time 3-dimensional video-oculography using a fluorescent marker array. *J Neurosci Methods* 2005;143:141-50.
2. **Robinson DA.** A Method of Measuring Eye Movement Using a Scleral Search Coil in a Magnetic Field. *IEEE Trans Biomed Eng* 1963;10:137-45.
3. **Collewijn H, Van der Steen J, Ferman L, Jansen TC.** Human ocular counterroll: assessment of static and dynamic properties from electromagnetic scleral coil recordings. *Exp Brain Res* 1985;59:185-96.
4. **Paige GD, Tomko DL.** Eye movement responses to linear head motion in the squirrel monkey. I. Basic characteristics. *J Neurophysiol* 1991;65:1170-82.
5. **Gilchrist DP, Curthoys IS, Cartwright AD, Burgess AM, Topple AN, Halmagyi M.** High acceleration impulsive rotations reveal severe long-term deficits of the horizontal vestibulo-ocular reflex in the guinea pig. *Exp Brain Res* 1998;123:242-54.
6. **Demer JL, Miller JM, Poukens V, Vinters HV, Glasgow BJ.** Evidence for fibromuscular pulleys of the recti extraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1125-36.
7. **Stahl JS, van Alphen AM, De Zeeuw CI.** A comparison of video and magnetic search coil recordings of mouse eye movements. *J Neurosci Methods* 2000;99:101-10.
8. **Kaufman GD.** Video-oculography in the gerbil. *Brain Res* 2002;958:472-87.
9. **Nakayama K.** Pohotographic determination of the rotational state of the eye using matrices. *Am J Optom Physiol Opt* 1974;51:736-42.
10. **Yamanobe S, Taira S, Morizono T, Yagi T, Kamio T.** Eye movement analysis system using computerized image recognition. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;116:338-41.
11. **Lasker DM, Han GC, Park HJ, Minor LB.** Rotational responses of vestibular-nerve afferents innervating the semicircular canals in the C57BL/6 mouse. *J Assoc Res Otolaryngol* 2008;9:334-48.
12. **Migliaccio AA, Meierhofer R, Della Santina CC.** Characterization of the 3D angular vestibulo-ocular reflex in C57BL6 mice. *Exp Brain Res* 2011;210:489-501.
13. **Voss J, Bischof HJ.** Eye movements of laterally eyed birds are not independent. *J Exp Biol* 2009;212:1568-75.
14. **Friedman RA, Ryan AF.** Transgenic mice. Current applications to the study of the auditory and vestibular systems. *Otolaryngol Clin North Am* 1992;25:1017-26.