

적외선과 웹캠을 이용한 일측 미로절제를 시행한 마우스의 원형 자유공간에서의 행동 지표 계측

가천의과대학 의학전문대학원 길병원 이비인후과학교실

김미주, 황현중, 정승원, 한규철

Measuring the Behavioral Parameters of Mouse Following Unilateral Labyrinthectomy in Round Free Field Using an Infrared Lamp and a Simple Webcam Camera

Mi-Joo Kim, MD, Hyun Jung Hwang, MD, Seung Won Chung, MD, Gyu Cheol Han, MD, PhD

Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Gachon University of Medicine and Science, Graduate School of Medicine, Incheon, Korea

- Received Nov 15, 2010
- Revised (1st) Jan 10, 2011
- (2nd) Jan 14, 2011
- (3rd) Jan 23, 2011
- Accepted Feb 1, 2011

- Corresponding Author:
Gyu Cheol Han, MD, PhD
Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Gachon University of Medicine & Science, Graduate School of Medicine, 1198 Guwol-dong, Namdong-gu, Incheon 405-760, Korea
Tel: +82-32-460-3324
Fax: +82-32-467-9044
E-mail: hangckr@gmail.com

- Copyright © 2011 by
The Korean Balance Society.
All rights reserved.

Background and Objectives: In this research, movements of mouse after labyrinthectomy were analyzed to determine the degree of vestibular dysfunction and compensation. **Materials and Methods:** By using an infrared lamp, mouse movements were recorded for 100 seconds in a dark room. The experimental area was manufactured as a circular space with a diameter of 60 cm. The movements of five mice labyrinthectomized on right side were observed and recorded at 3 hours, 9 hours and 120 hours after the operation, and also the ten mice of control group. **Results:** The differences between the total moving distances and the rotating angle from the origin that set the center of round field between groups were analyzed with pictures of 1 frame per second. It is concluded that all 4 groups show significant differences between its mean rotation angle and total moving distances statistically. At 9 hours after right labyrinthectomy, mice tended to turn clockwise; but at 120 hours, there was no significant difference between clockwise and counter-clockwise rotation. **Conclusion:** Measuring the movement of mouse in round free field can be the proper method to determine the degree of vestibular dysfunction and vestibular compensation. This test was time-saving and cost-effective method.

Research in Vestibular Science 2011;10(1):12-18

Key Words: Mouse; Vestibular function; Behavior test; Labyrinthectomy

서 론

전정기관은 공간에서 머리의 움직임을 감지하여 척추동물의 시축(visual axis)과 머리와 몸의 자세를 유지하는 중요한 역할을 한다.^{1,2} 전정기관의 기능 이상을 측정하는 몇 가

지의 동물 모델이 기존에 보고되고 있으며 이러한 방법들은 다양한 전정반사를 이용하여 전정기관의 손상 정도와 보상의 정도를 파악하는데 유용하다고 알려져 있다.³⁻⁶ 특히 전정안반사(vestibulo-ocular reflex)를 이용한 전정기관의 기능 이상 측정 방법은 자기코일이나 비디오 안진기를 이용한다. 이

방법들은 전정기관의 이상 시 나타나는 자발 안진을 측정하거나 회전 자극을 주었을 때 발생하는 유발 안진을 측정한다.^{3,7,8} 그러나 마우스는 동공을 관찰하기 어려워서 안구의 회선운동(torsional nystagmus)을 측정하기 어렵고 따라서 측반고리관에 대한 검사로 국한되기도 한다. 전정척수반사(vestibulo-spinal reflex)를 이용하는 검사는 정적 상태(static status)에서 머리 기울임 정도를 측정하는 방법이 있다.³ 그 외에도 동물의 행동 중에 제자리 돌기(circling)나 뒷다리로 서기(rearing) 그리고 두부 경추, 경추-흉부, 흉부-요추간 각도를 측정하여 전정기관의 결손을 보여주는 지표로 활용 된다.²

기존의 안진이나 머리 기울임을 측정하는 방법은 정적인 상태에서 한쪽 전정기관의 손상을 충분한 전정보상이 일어나기 전까지 일정기간 유용한 검사법이 될 수 있다. 그러나 실제로 전정신경염과 같이 편측의 전정 기능이 손상이 있는 경우 정적인 상태에서의 이상 소견이 완전히 소실되는 경우에도 걷기 또는 달리기 같은 동적인 상황에서도 이상소견을 여전히 보이는 등 완전한 회복이라고 보기는 어렵다.^{4,6} 즉, 정적인 상태에서 자세 같은 전정척수반사는 일반적으로 빠르게 보상이 이루어지지만 동적인 상황에서는 지속적으로 이상 소견을 보일 수 있으므로 실제로 동물이 움직이는 상황에서의 전정척수반사 측정이 필요하다. 하지만 기존의 연구들은 제한적으로만 동적상태를 평가하였거나 감정, 인지, 학습, 신체 요인을 두루 평가하지 못하고 단편적인 신체적 특성이나 근전도와 같은 전기적 특성에 의존하여 검사결과가 매우 주관적인 단점이 있었다. 따라서 본 저자는 객관적이면서 비침습적이고 반복 실험할 수 있으면서 검사시간이 짧고 표준화가 가능하며 행동의 신체적 특성과 함께 감정, 인지, 학습 등 다양한 요소를 복합적으로 고려한 공간감각의 변화를 측정하는 방법을 고안하게 되었다. 이 실험방법은 웹캠을 이용한 방법으로 흑백의 차이를 분석하는 프로그램을 이용한다. 이러한 시스템은 동물의 행동을 시간에 따라 평가 할 수 있으며 또한 실험실에 쉽게 적용이 가능하며 시간과 비용을 줄일 수 있다.⁹ 저자는 본 실험을 통해 일측의 전정 기관이 손상된 마우스의 동적상태에서의 전정기능을 평가할 수 있는 지표의 유용성을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용한 동물은 12-20주 사이의 평균 몸무게는

20-25 g C57BL/6 수컷 마우스(Samtako & Biokorea, Osan, Korea) 15마리(실험군: 5마리, 대조군: 10마리)를 사용하였다. 사육조건은 주간 14시간, 야간 10시간 주기로 하였으며, 실내온도는 25°C, 습도는 30%, 조명도는 60 lux, 주변 소음은 50 dB 이하로 유지하였다.

2. 미로절제술

실험군으로 사용된 5마리는 미로절제술을 시행하였다. 이 소포르란(Aerane, O₂ 5 L/min: 2.0, Ilsung Pharm. Co., Seoul, Korea)을 사용하여 흡입 마취를 시행하고, 우측 이개 후방에 1% 리도카인으로 국소 마취를 시행 후 이개로부터 0.5 cm 후방에 1 cm 길이의 수직 절개를 시행하였다. 연조직과 근육을 박리하여 측반고리관과 후반고리관을 확인하고 측반고리관에 치과용 드릴을 이용하여 천공술을 시행하였다. 외림프액의 누출을 확인하고 천공부위를 전방으로 확장하여 전정부의 측벽을 개방하였다. 외림프액의 누출이 더 이상 없을 때까지 지속적으로 흡인을 시행하였다. 술 후 천공부위의 유지와 미로 재활성화를 막기 위해 avitene (ALCON, Inc., Humacao, Puerto Rico)을 천공부위를 통해 전정내부에 채워 넣었으며 절개부위를 6-0 나일론을 이용하여 봉합하였다. 수술 직후 머리 기울임(head-tilting), 제자리 돌기, 넓은 보폭(wide gait) 그리고 꼬리를 들었을 때 좌측으로 몸통을 회전하는 소견(tail-hanging test)을 보고 미로 절제술의 성공 여부를 확인하였다.^{2,10} 대조군은 실험군과 동일한 방법으로 절개를 시행한 다음 반고리관을 확인한 후 다시 절개선을 봉합하였다.

3. 실험 장비 및 환경

영상 획득을 위해 USB용 상보형금속산화반도체(complementary metal semiconductor, CMOS) 웹캠(Pleomax PWC-2200, Samsung, Suwon, Korea)을 원통 바닥의 수직 위로 90 cm에 설치하고 적외선램프 64 LED (0.25W×64=16w, KD media, Seoul, Korea)를 높이 2.4 m에 장착하였으며, 자료의 저장을 위한 컴퓨터(IBM compatible Core 2 Quad CPU Q6600 @ 2.40GHz, 2 GB RAM Windows XP [SP3]) 장비를 사용하였다. 또한 마분지를 이용하여 지름 60 cm, 높이 15 cm의 벽을 만들고 잔물과 냄새를 제거하기 위해서 매 검사마다 전지를 바닥에 다시 설치하였고, 탈취-소독제를 뿌린 후 원형의 자유 공간을 만들어 실험을 하였다. 영상장비는 흑백모드를

사용하고, 60 Hz의 깜박거림, 감마값은 0.18, 대비 값은 1.08, 밝기는 16, 자동 화이트밸런스, 1초에 1프레임 비율, 녹화제한시간은 3,600초로 설정하였으며, 영상 파일은 800×600 해상도의 *.avi 파일 형식으로 저장하였다. 모든 실험은 5 lux 이하의 암실에서 적외선램프를 켜고 시행하였으며, 실내온도 25℃, 습도 30%, 소음치 50 dB 이하로 유지하였다.

4. 운동의 측정

실험군 5마리는 우측 미로절제술을 시행하였으며 대조군으로는 10마리가 사용되었다. 실험군의 마우스는 미로절제술을 시행한 후에 3시간, 9시간 120시간이 지난 후에 대조군과 같은 조건의 실험환경에서 운동을 측정하였다(Figure 1). 실험에서 얻은 이미지를 Matlab® v6.5 (MathWorks Inc., Natick, MA, USA)과 자체 개발한 이미지 처리 프로그램을 이용하여 매초마다의 마우스의 위치 좌표 값을 얻을 수 있다

(Figure 2). 이미지의 좌표를 얻는 방법은 영상에서 최소의 red-green-blue (RGB) 값을 보이는 지점을 마우스가 있는 곳으로 정하였다. 측정 지표로 마우스가 100초간 움직인 이

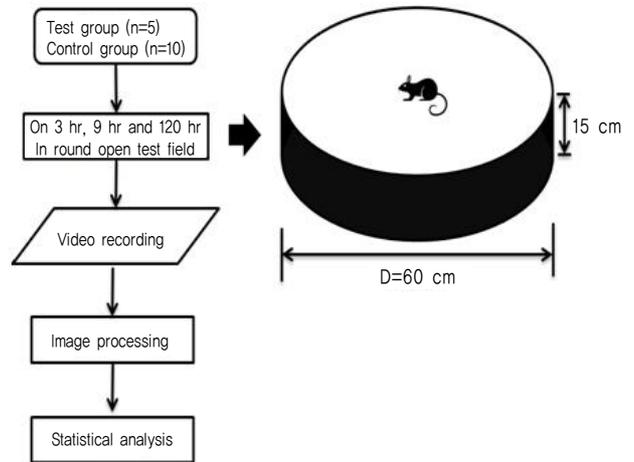


Figure 1. Experimental diagram.

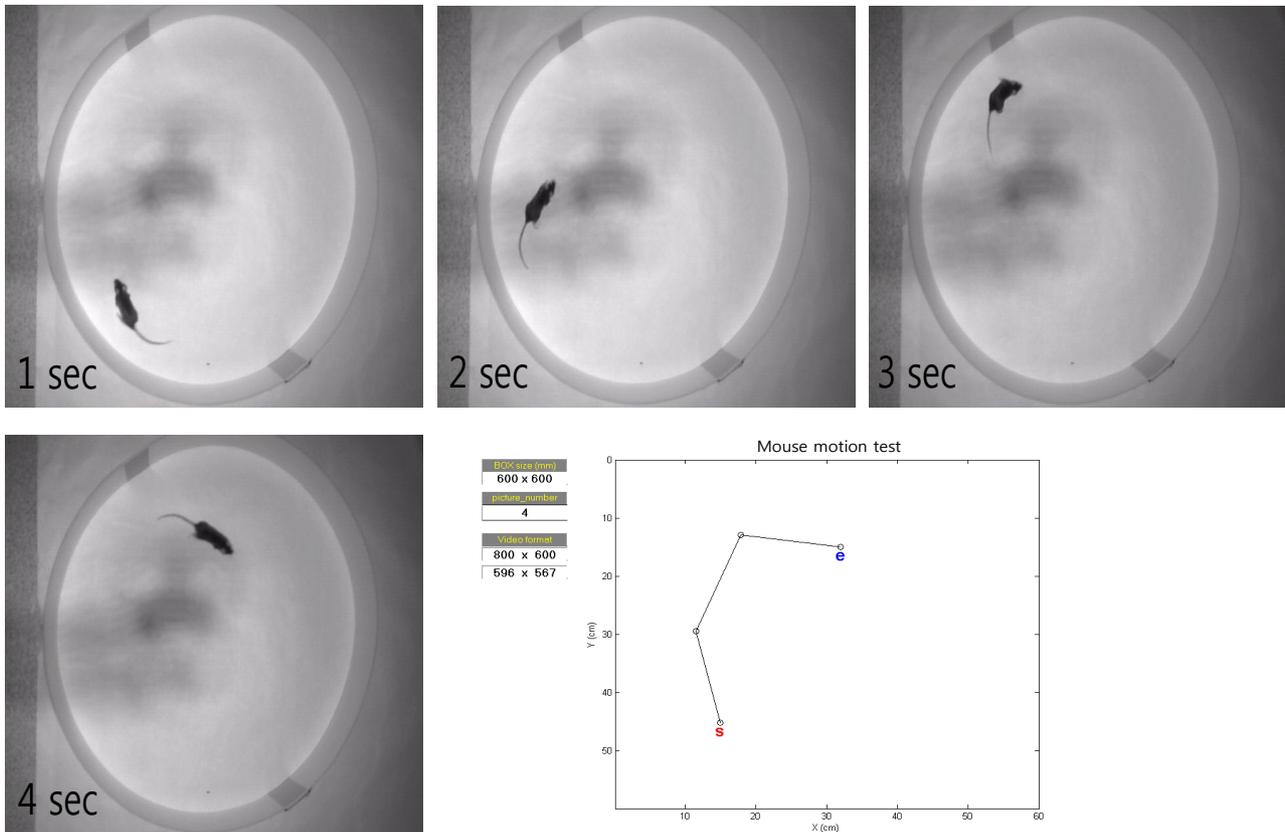


Figure 2. The captured images of mouse, 3 hours postoperative, represented from upper left to right, and lower left, which shows the movement of mouse at each second. Then the mouse was converted as the dot of the plane, and graph using MATLAB at lower right to show the coordinates of mouse during 4 seconds. Coordinate S means the starting position and E means the ending position.

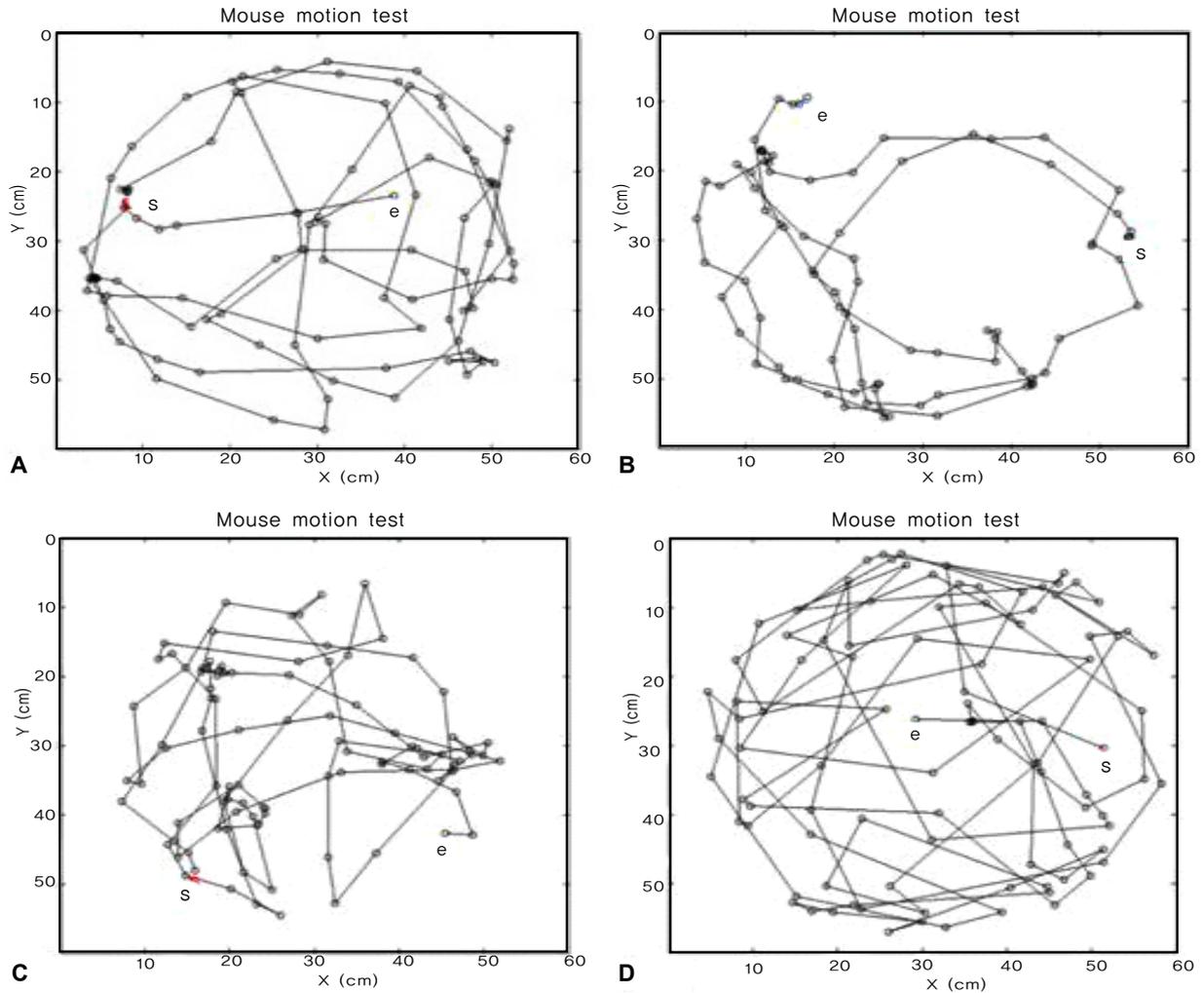


Figure 3. Dot representation of a mouse, and his moving path. (A) The control group, (B) 3 hours postoperative group, (C) 9 hours postoperative group, (D) 120 hours postoperative group.

동 거리를 측정하였으며 중앙(30, 30)을 기준으로 회전한 각도를 측정하였다. 그림에서 시계방향의 회전 각도를 음의 값으로 하였고, 반시계방향으로(좌측)의 회전은 양값으로 처리하였다. 대조군과 수술 3시간, 9시간, 120시간 후의 움직임 이미지를 이미지 처리한 결과이다(Figure 3).

5. 통계분석

대조군, 수술 3시간, 9시간, 120시간의 그룹간의 움직임을 반복 측정하였으므로 Friedman 검정을 사용하여 시간 경과에 따른 각도 선택에 차이가 있는지에 대하여 알아보았다. 이동거리는 2,000단위를 기준으로 빈도를 구하였으며, 회전각도는 60°를 기준으로 빈도를 구하였다. 통계 분석은 상업용 프로그램 패키지인 SPSS ver. 15.0 (SPSS Inc., Chicago,

IL, USA)를 사용하였으며 95% 신뢰수준으로 하였다.

결 과

1. 이동 거리와 회전각

대조군(시간 0시간)과 실험군의 측정 시간대(3시간, 9시간, 120시간)에 따른 이동거리와 회전각의 평균값의 변화(mean plot)에서 마우스는 미로절제술 후 3시간에 이동거리가 감소하고 그 후 다시 증가하였다. 회전각은 미로절제술 후 작아지고 9시간에는 시계 방향(우측)으로의 회전이 우세하여 음값으로 최소가 되며 이후 120시간이 지나 전정 보상이 이루어지면 시계 방향과 시계 반대 방향 회전의 우위가 없어져 0에 가까운 값을 나타내었다(Figure 4). 대조군과 미로절

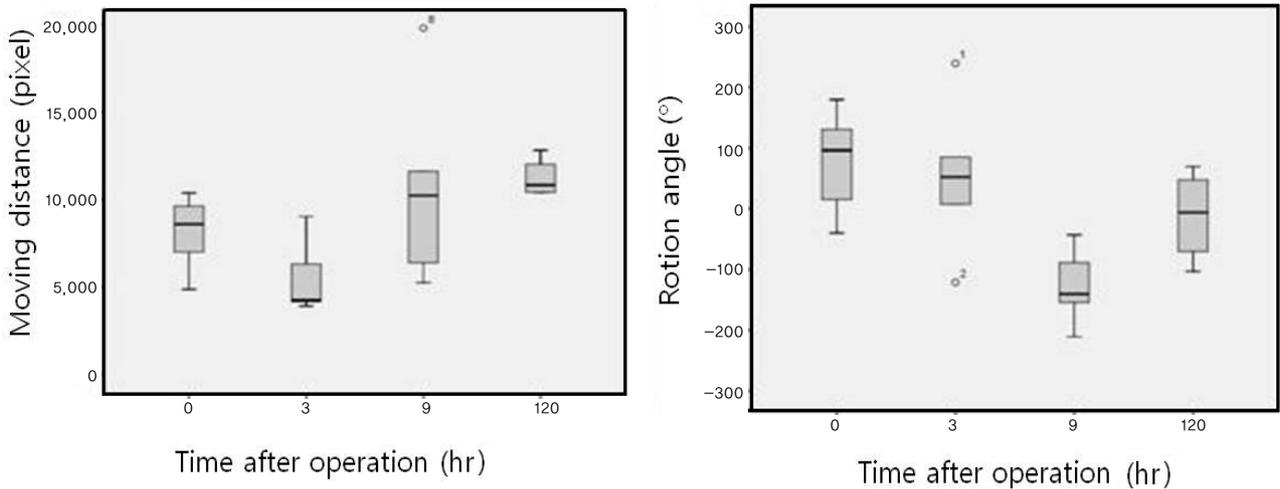


Figure 4. Stem and leaf plot contains mean values of mouse moving distances and rotation angles. Left plot represents the control group (0 hour) and right plot represents the study group (3 hours, 9 hours, 120 hours).

제술을 시행한 후 3시간, 9시간, 120시간을 그룹으로 나누었을 때 100초간 이동한 총 거리($p=0.019$)와 중심을 기준으로 회전한 상대 각도($p=0.044$)는 4개의 군 사이에는 통계적으로 유의한 차이($p<0.05$)가 있었다. 각 그룹 간의 회전각의 차이는 대조군과 측정 시간대에서 유의한 차이를 보였다 ($p<0.05$). 또한 이동거리의 차이는 대조군과 측정군에서 유의한 차이를 보였다($p<0.05$).

고 찰

저자들은 일측 전정 기관에 손상을 가진 마우스의 운동 양상을 관찰함으로써 전정 척수 반사의 관점에서 전정 보상의 정도를 관찰하려 하였다. 기존의 설치류를 이용한 논문에서 정상 동물인 경우 일반적으로 원통의 공간에 갇힌 경우 한쪽으로 편향됨이 없이 좌우측으로 동일하게 벽을 따라 회전하는 운동을 한다고 보고되고 있다.^{11,12} 설치류의 일종인 gerbil의 경우 원형 공간에 집어넣은 경우 약 10-15분 동안은 간혹 움직임을 멈추지만 지속적으로 이런 좌우 회전 운동을 반복한다. 정상 gerbil의 일측 전정 기관을 파괴시킨 경우 손상된 방향으로 더 많이 회전하는 성향이 강해지며 장시간 측정하여 총 회전수를 측정할 경우 특정방향으로의 회전이 유의하게 많아진다고 보고되고 있다.¹² 기존 논문에서는 1시간 동안의 gerbil의 누적된 각 방향의 회전수를 가지고 전정 손상 정도를 파악하였으나,¹² 본 연구에서는 측정 시간을 100초간의 짧은 시간으로 설정한 대신 회전하는 각도를 지표로 전정 손상 정도를 측정하였고 실험군에서 시간

경과에 따라 회전각도 평균치의 유의한 차이를 확인하였다.

실험은 대조군 10마리, 실험군 5마리로 시행하였다. 결과에서 대조군의 경우 이론적으로는 양측으로 회전하는 각도의 차이가 없어야 하나 전체 10마리 대조군의 경우 회전 각도에서 좌측 회전이 우월한 측 양의 값을 보이고 있다. 즉 전정기능이 정상인 마우스더라도 한 방향의 회전 이동이 더 두드러진 개체 있을 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 실제로 실험에서도 오류를 줄이려면 정상 상태에서도 일측으로의 회전 방향 우위를 가지는 개체를 배제하고 실험군으로 선정하여 전정 절제술을 시행해야 결과의 오류를 줄일 수 있을 것이라 판단을 암시한다. 이 실험에서는 3시간, 9시간, 120시간으로 검사의 시행시기 간의 간격이 넓어 시간 경과에 따른 지속적인 변화를 보기에는 제한점이 있었다. 따라서 향후에는 정상 상태에서 방향 우위를 보이지 않는 개체들을 실험에 사용하고 좀 더 세분된 시간 간격으로 검사를 시행하는 연구가 필요하겠다. 아울러 실험 전 트레이닝을 실험 프로토콜에 추가하고, 실험데이터 샘플링에서 측정시간을 늘리고, 수술 후 움직임을 증가시킬 수 있는 추가적 고안이 필요하며 현재 초당 1장의 측정속도를 증가시킴으로써 보다 나은 결과를 유출할 수 있을 것으로 생각한다.

동물이나 사람이 평형을 잡기 위해서는 시각 자극(visual input), 체성 감각(somatosensory input) 및 전정 기관의 세 가지 자극을 모두 이용하게 된다.¹³ 이 중에서 순수하게 전정 척수 반사의 관점에서 전정 기능 장애를 평가하기 위해서는 시각 자극을 가능한 배제하는 방법이 필요하고 따라서 이 실험에서는 시각 자극이 적은 암실에서 일정 높이의 벽

을 세워 검사를 진행하여 시각에 의한 영향을 최대한 배제 하였으며 암실에서 마우스를 추적하기 위해 적외선램프를 이용하여 순수하게 전정 반사만을 측정하려 하였다. 그리고 적외선을 이용하는 경우 마우스의 흑색과 가장 잘 구분하기 위해 원통의 바닥은 흰색으로 처리하였다. 영상 처리는 RGB 값을 이용하여 영상에서 가장 낮은 값을 가지는 부위를 마우스의 위치로 설정하였다. 기존의 연구들에서는 동물의 움직임을 추적하기 위해서 영화 촬영 기법(cineradiography), 신체에 장착된 감지 센서 등을 이용한 방법들이 사용되었고 이런 방법들은 장비와 비용이 많이 필요한 단점이 있다.^{2,14} 이 실험에 사용한 웹캠 및 적외선 램프 등은 적은 비용으로도 가능하므로 경제적인 장점을 가지고 있다. 그러나 적외선으로 추적된 마우스의 좌표는 코끝, 몸통 혹은 골반 등의 신체의 특정 부위를 의미하는 것이 아니라 신체 중에서 가장 어두운 부위, 즉 RGB 값이 가장 낮은 부위를 좌표로 지정하였기 때문에 이는 결과에 영향을 주는 한 원인이라고 생각된다.

향후 이 검사 결과를 더욱 객관화하기 위해서는 몇 가지 고려해야 할 점이 있다. 먼저 100초의 측정 시간 동안 활발히 움직이는 시간에 측정될 수도 있고 반대로 움직임이 적은 시간에 녹화가 되어 결과에 영향을 줄 수 있다. 향후 한 번의 측정 시간을 30분, 60분 같이 더 연장하여 누적된 결과를 얻을 경우 이동 거리 및 회전각도 모두 더 유의한 차이를 보일 수 있다고 생각한다. 그리고 회전 각도뿐 아니라 총 회전수도 측정 변수로 활용할 수 있으리라 생각된다. 또, 측정 설정 시 1초당 1 프레임 기준으로 검사를 시행하였지만 초당 더 많은 30 혹은 60 프레임을 적용하여 더 정교한 추적 영상을 얻을 경우 더 객관적인 자료가 될 수 있으리라 생각한다. 마지막으로 각 초 사이마다 움직인 거리가 회전 각에도 영향을 줄 수 있기 때문에 순수하게 회전 방향성만을 반영하는데 어려움을 줄 수 있다. 따라서 실험 공간의 지름을 줄여서 직선 운동을 가능한 배제하고 순수하게 벽을 따라 회전하는 운동을 유도하면 회전 각도가 보다 유용한 지표로 사용될 수 있을 것이다.² 그리고 신체 부위 중 어느 특정 부위만을 추적하기 위해서는 표지자를 별도로 머리나 몸통 부위에 설치하여 추적하는 방법들을 추가해야 할 것이다.

결 론

웹캠을 이용하여 마우스의 움직임을 측정하는 방법은 비용과 시간 측면에서 효율적이며 방법이다. 이 실험에서는

이동 거리와 회전 각도를 지표로 측정을 하였고 전정기관의 손상 후 회복에 따른 유의한 차이를 확인할 수 있었다. 특히 회전 각도는 통계적으로 상당한 차이를 보여 향후 전정기관의 손상 혹은 보상정도를 반영할 수 있는 정량적 지표로 활용 될 수 있다. 더 나아가, 이 논문의 방법은 같은 설치류 계통의 다른 실험동물에서도 사용할 수 있는 실험법이 되리라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 313-2008-2-E00385).

중심 단어: 마우스, 전정기능, 행동검사, 전정미로절제술

REFERENCES

1. **Cullen KE, Roy JE.** Signal processing in the vestibular system during active versus passive head movements. *J Neurophysiol* 2004;91:1919-33.
2. **Vidal PP, Degallaix L, Josset P, Gasc JP, Cullen KE.** Postural and locomotor control in normal and vestibularly deficient mice. *J Physiol* 2004;559:625-38.
3. **Kim MS, Kim JH, Jin YZ, Kry D, Park BR.** Temporal changes of cFos-like protein expression in medial vestibular nuclei following arsanilate-induced unilateral labyrinthectomy in rats. *Neurosci Lett* 2002;319:9-12.
4. **Curthoys IS.** Vestibular compensation and substitution. *Curr Opin Neurol* 2000;13:27-30.
5. **Darlington CL, Dutia MB, Smith PF.** The contribution of the intrinsic excitability of vestibular nucleus neurons to recovery from vestibular damage. *Eur J Neurosci* 2002;15:1719-27.
6. **Black FO, Shupert CL, Peterka RJ, Nashner LM.** Effects of unilateral loss of vestibular function on the vestibulo-ocular reflex and postural control. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989;98:884-9.
7. **Kitahara T, Nakagawa A, Fukushima M, Horii A, Takeda N, Kubo T.** Changes in fos expression in the rat brainstem after bilateral labyrinthectomy. *Acta Otolaryngol* 2002;122:620-6.
8. **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.
9. **Tort AB, Neto WP, Amaral OB, Kazlauskas V, Souza DO, Lara DR.** A simple webcam-based approach for the measurement of rodent locomotion and other behavioural parameters. *J Neurosci Methods* 2006;157:91-7.
10. **Hunt MA, Miller SW, Nielson HC, Horn KM.** Intratympanic injection of sodium arsanilate (atoxyl) solution results in postural changes consistent with changes described for laby-

- rinctomized rats. Behav Neurosci 1987;101:427-8.
11. **Torello MW, Czekajewski J, Potter EA, Kober KJ, Fung YK.** An automated method for measurement of circling behavior in the mouse. Pharmacol Biochem Behav 1983;19:13-7.
 12. **Kaufman GD, Shinder ME, Perachio AA.** Correlation of Fos expression and circling asymmetry during gerbil vestibular compensation. Brain Res 1999;817:246-55.
 13. **Rama-Lopez J, Perez N, Martinez Vila E.** Dynamic posture assessment in patients with peripheral vestibulopathy. Acta Otolaryngol 2004;124:700-5.
 14. **Van de Weerd HA, Bulthuis RJ, Bergman AF, Schlingmann F, Tolboom J, Van Loo PL, et al.** Validation of a new system for the automatic registration of behaviour in mice and rats. Behav Processes 2001;53:11-20.