토끼에서의 빛간섭단층촬영기를 이용한 망막 및 맥락막두께 분석

The Normative Retinal and Choroidal Thicknesses of the Rabbit as Revealed by Spectral Domain Optical Coherence Tomography

김우진 · 최미현 · 김성우

Woojin Kim, MD, Mihyun Choi, MD, PhD, Seong-Woo Kim, MD, PhD

고려대학교 의과대학 안과학교실

Department of Ophthalmology, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: We used spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) to assess the retinal and choroidal thicknesses of the rabbit, a commonly used animal model of ophthalmic disease. We report normative datasets.

Methods: Semi-automated measurements were made on 15 normal right eyes of New Zealand white rabbits. Total retinal, inner retinal layer, outer retinal layer, choroidal, ganglion cell layer, ganglion cell complex, inner nuclear layer, and outer nuclear layer thicknesses were measured at fixed distances (0, 1, 2, 3, 4, and 5 mm) below the optic nerve head.

Results: Total retinal layer (Pearson's correlation coefficient [CC] = -0.778, $p < 0.05$), inner retinal layer (CC = -0.710, $p < 0.05$), outer retinal layer (CC = -0.495, $p < 0.05$), ganglion cell complex (CC = -0.292, $p < 0.05$), ganglion cell layer (CC = -0.284, $p < 0.05$), and outer nuclear layer thicknesses (CC = -0.760, $p < 0.05$) decreased with the distance from the optic nerve head. Inner nuclear layer thickness correlated negatively with the distance from the optic nerve head, but the correlation coefficient was low (CC = -0.263, $p < 0.05$). Choroidal thickness increased with the distance from the optic nerve head (CC = 0.511, $p < 0.05$).

Conclusions: Rabbit retinal thicknesses were measured and analyzed by the distance from the optic nerve head. The datasets will serve as standards when using rabbits.

J Korean Ophthalmol Soc 2021;62(3):354-361

Keywords: Histology, Optical coherence tomography, Rabbit, Retina, Retinal thickness

망막두께의 측정 및 그에 대한 분석은 다양한 안과 질환의 진단 및 치료에 의미 있게 사용되고 있다.^{1,2} 이를 위한 빛간섭단층촬영(optical coherence tomography, OCT)은 비

침습적으로 망막 각 층을 고해상도로 시각화하여 망막 미세구조를 확인하고 그 두께를 정량적으로 평가할 수 있는 검사로 1991년 처음 소개된 이후 여러 망막 질환의 분석에 사용되고 있다.^{2,3} 기존에는 초당 400회의 스캔으로 축 해상도(axial resolution) 8-10 μm 인 시간영역 빛간섭단층촬영(time domain OCT, TD-OCT)이 널리 이용되었으나, 최근에는 기존 OCT에 비해 스캔 속도가 50-100배 이상 빠르고 해상도도 더 높은 스펙트럼영역 빛간섭단층촬영(spectral domain OCT, SD-OCT)을 주로 사용하고 있다.¹ SD-OCT는 초당 25,000-100,000회의 스캔으로 축 해상도 5-10 μm 인 영상을 얻을 수 있어서 시세포 안쪽과 바깥쪽의 접합부(inner segment/outer segment junction)도 보여줄 뿐만 아니라 망막 층별 두께를 보다 정확히 살펴볼 수 있게 해주었

■ Received: 2020. 1. 22. ■ Revised: 2020. 5. 25.

■ Accepted: 2021. 2. 24.

■ Address reprint requests to **Seong-Woo Kim, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Korea University Guro Hospital,
#148 Gurodong-ro, Guro-gu, Seoul 08308, Korea
Tel: 82-2-2626-1260, Fax: 82-2-857-8580
E-mail: vitreokim@gmail.com

* This study was supported in part by Alumni of department of ophthalmology, Korea University College of Medicine.

* Conflicts of Interest: The authors have no conflicts to disclose.

© 2021 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

다.^{4,6} 이에 빛간섭단층촬영을 통한 망막의 해부학적 평가는 망막질환의 연구 및 진단에 필수 요소가 되었다.²

동물에서 망막의 조직학적 평가는 오랫동안 망막의 미세 구조를 연구하는 주된 방법이었는데,⁷ 동물 모델에서 망막의 SD-OCT는 그 조직학적 결과와 매우 밀접한 연관성을

가질 뿐 아니라 빠른 시간에 비침습적으로 망막 층별 구조를 볼 수 있게 해줘서⁸⁻¹⁰ 우리는 조직학적 평가를 위해 동물을 희생시키기 전에 망막의 미세 변화를 추정할 수 있게 되었다. 동물모델 중 토끼(rabbit)는 기르고 다루는 것이 쉽고, 해부학적 구조가 잘 알려져 있으며, 여러 망막 치료를

Figure 1. Experimental setup for measurement of rabbit retinal thickness. (A) The rabbit placed to take a Heidelberg Spectralis® OCT (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany). (B) Optical coherence tomography (OCT) projection providing an overview of a rabbit fundus, including the optic nerve head (ONH) and presumed visual streak area (green area between dotted lines). Retinal layers were segmented along 33 raster b-scans. The measurements were repeated at 6 different positions at 0, 1, 2, 3, 4, and 5 mm ventral to the ONH edge. (C) Widefield fundus photography of the rabbit retina of the right eye. The presumed visual streak (green area between dotted lines) is located under the optic disc overlapping with the avascular field. (D) Spectral domain OCT scan of the rabbit retina. Total retinal layer thickness (TRT) = internal limiting membrane (ILM) to retinal pigment epithelium (RPE); inner retinal layer thickness (IRT) = ILM to anterior border of external limiting membrane (ELM); outer retinal layer thickness = anterior border of ELM to RPE (= TRT-IRT); ganglion cell complex thickness = retinal nerve fiber layer to anterior border of inner nuclear layer. (E) Histologic features of the rabbit retina with hematoxylin-eosin staining.

시행하기 좋은 중간 크기의 동물이기 때문에 망막질환을 연구하는 데 유용하다.¹¹ 특히 토끼는 유리체내 약물동역학과 약물의 독성 연구에서 가장 흔히 이용되는 동물인데 이는 토끼의 유리체내 분포 용적, 청소율, 반감기가 사람의 눈과 유사하기 때문이다.^{12,13}

기존에도 SD-OCT를 이용하여 시신경유두(optic nerve head, ONH) 가장자리로부터의 거리에 따른 토끼 망막두께에 대한 정량화된 분석을 시행한 연구들이 있었으나,^{8,9} 그 분석은 망막 전층의 두께 분석 혹은 망막 시신경섬유층 분석에 국한된 연구로 실험적 평균 자료로 활용하기에는 한계점이 있었다. 본 연구에서는 전체 망막뿐 아니라 내망막층(inner retinal layer), 외망막층(outer retinal layer), 맥락막층, 신경절세포복합체층, 신경절세포층(ganglion cell layer, GCL), 내핵층(inner nuclear layer, INL), 그리고 외핵층(outer nuclear layer, ONL)의 8가지 층의 두께를 모두 측정하였으며, 망막 위치에 따라 각 층의 두께가 어떻게 다른지를 살펴보고자 하였다.

대상과 방법

외견상 질환이 없고, 각막 및 수정체의 혼탁이 없는 20주, 2.5-3.0 kg의 뉴질랜드 흰 토끼(New Zealand white rabbit, Hallym Experimental Animal Research Institute, Hwaseong, Korea) 15마리를 대상으로 하였다. 본 연구는 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement of the 동물실험 윤리에 대한 권고사항을 준수하였다. Spectralis® OCT (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany)에 55°C 렌즈를 장착하고(Fig. 1A), ONH를 12시 방향에 위치시킨 뒤 333 μ m 간격으로 33장의 raster b-scan을 촬영하여 각 b-scan은 44회 반복 측정하여 영상을 얻고(Fig. 1B), 안저 촬영(widefield fundus photography)을 시행하여 안저 구조를 확인하였다(Fig. 1C). Visual streak에 평행한 raster scan을 얻기 위해 비측과 이측의 양측 망막에 있는 혈관과 raster scan axis가 수평을 이룰 수 있도록 OCT를 촬영하였다(Fig. 1B).⁹ 광각안저촬영에는 Optomap 200Tx (Optos PLC, Dunfermline, UK) 초광각 주사레이저 검안경을 이용하였다. 또한 medullary ray에 수직인 단면으로 hematoxylin-eosin staining이 된 조직 사진을 얻었다(Fig. 1E).

토끼의 망막은 사람의 망막처럼 OCT상에서 안쪽의 신경절세포층(ganglion cell layer, GCL)부터 가장 바깥쪽의 망막색소상피(retinal pigment epithelium, RPE)까지 11개의 고반사와 저반사를 보이는 층들로 나뉜다(Fig. 1D).^{14,15} 망막의 층은 내경계막(internal limiting membrane, ILM), 망막신경섬유층(retinal nerve fiber layer, RNFL), GCL, 내망상

층(inner plexiform layer, IPL), INL, 외망상층(outer plexiform layer, OPL), ONL, 외경계막(external limiting membrane, ELM), 광수용체층(photoreceptor layers) 그리고 망막색소상피와 같은 층들로 나누어진다(Fig. 1D, E). 전체 망막두께(total retinal layer thickness, TRT)는 내경계막에서 망막색소상피층까지의 두께를 측정하였고, 내망막층 두께(inner retinal layer thickness, IRT)는 내경계막에서 외경계막 내측 경계까지로 하였다.^{16,17} 외망막층 두께(outer retinal layer thickness, ORT)는 외경계막 내측 경계에서 망막색소상피층까지의 두께로, 본 연구에서는 전체 망막두께와 내망막층 두께를 먼저 구한 후 전체 망막두께에서 내망막층 두께의 차(ORT=TRT-IRT)로 정의하였다. 또한 신경절세포 축삭돌기로 이뤄진 망막신경섬유층(RNFL), 신경절세포체로 이뤄진 GCL, 신경절세포 수지상돌기로 이뤄진 내망상층(IPL)의 세 층을 포함하는 신경절세포복합체(ganglion cell complex, GCC)의 두께를 측정하였다. 신경절세포복합체는 녹내장으로 신경절세포가 손상될수록 얇아져 녹내장의 초기 진단과 그 진행 정도를 평가하는 데 유용하여 임상에서 많이 사용되는 지표이며,^{18,19} 토끼에서 망막신경섬유층, 신경절세포층, 내망상층의 세 층을 구분하여 측정하는 것에 한계가 있어 함께 측정하였다.

ONH에서 아래로 0, 1, 2, 3, 4, 그리고 5 mm 떨어진 위치에서 전체 망막두께, 내망막층과 외망막층의 두께, 맥락막두께(choroidal thickness, CT), 신경절세포복합체 두께, 신경절세포층 두께, 내핵층 두께, 그리고 외핵층 두께를 얻었다. 상기 8가지 층의 두께는 각각 다른 3명의 측정자들에 의해 총 3회 측정되어 통계 분석에 이용되었다. SD-OCT image에서 공막륜(scleral ring)을 시신경 아래쪽 가장자리로 보고 이로부터의 거리를 측정하여 각 망막층과 맥락막층의 두께를 측정하였으며 이를 15마리 토끼들 간에 비교하였다.

자료의 통계적인 분석은 SPSS for Windows software version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하였다. ONH에서 아래로 0, 1, 2, 3, 4, 그리고 5 mm 떨어진 위치의 다섯 군 간의 망막 각 두께들의 비교에는 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 시행하였으며, 각 위치별로 두 군 간의 망막두께 측정치의 비교는 repeated ANOVA test로 하였다. ONH로부터 떨어진 위치와 망막 세부층 두께와의 비모수 상관관계 검정(Pearson correlation test)을 시행하여 망막 세부층 두께 변화의 경향성을 알아보았다. *p*-value가 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

총 15마리의 토끼를 대상으로 연구하였다. 3명의 측정자들 간 reliability analysis 시행시 intra-class correlation coefficient (ICC)는 전체 망막두께 99.5%, 내망막층 두께 99.3%, 외망막층 두께 97.5%, 맥락막두께 99.2%, 신경절세포층 두께 93.8%, 신경절세포복합체 두께 93.6%, 내핵층

두께 81.2%, 그리고 외핵층 두께 99.3%였다. 특히 전체 망막, 내망막층, 외망막층, 맥락막, 신경절세포층, 신경절세포복합체, 그리고 외핵층의 7개 층의 두께 측정치에서 ICC는 90% 이상이였다.

망막 각 층의 두께는 ONH 가장자리와 그로부터 1, 2, 3, 4, 그리고 5 mm 떨어진 위치에서 평균값 $\pm$ 표준편차(μm)로 계산하였다. 총 망막두께는 ONH에서 아래로 1 mm 간격으

Table 1. Layer thickness at a distance from the optic nerve head edge

Layer thickness (μm)	Distance from the ONH edge (mm)						p-value*
	ONH edge	1	2	3	4	5	
Total retinal layer	172.14 $\pm$ 7.28	167.29 $\pm$ 8.60	158.88 $\pm$ 9.48	151.40 $\pm$ 8.98	146.38 $\pm$ 9.69	141.45 $\pm$ 8.96	<0.001
Inner retinal layer	127.19 $\pm$ 5.06	122.69 $\pm$ 7.16	118.79 $\pm$ 6.74	113.19 $\pm$ 7.55	109.69 $\pm$ 7.93	106.62 $\pm$ 8.29	<0.001
Outer retinal layer	44.95 $\pm$ 6.50	44.60 $\pm$ 4.91	40.10 $\pm$ 6.04	38.21 $\pm$ 6.85	36.69 $\pm$ 7.39	34.83 $\pm$ 7.39	<0.001
Choroid	78.44 $\pm$ 27.71	96.22 $\pm$ 20.31	104.33 $\pm$ 16.23	112.02 $\pm$ 18.39	116.24 $\pm$ 16.97	115.40 $\pm$ 15.24	<0.001

The values are presented as mean $\pm$ standard deviation.

ONH = optic nerve head.

*p-value for five-group comparison by one-way analysis of variance test.

Figure 2. (A) Retinal layer thickness at a distance from the optic nerve head. Total retinal layer thickness ($p < 0.05$), inner retinal layer thickness ($p < 0.05$), and outer retinal layer thickness ($p < 0.05$) decrease with distance from the optic nerve head (ONH). (B) Choroidal layer thickness at a distance from the optic nerve head. Choroidal thickness increases with distance from the ONH ($p < 0.05$). (C) Inner retinal layer thickness at a distance from the ONH. Ganglion cell complex (GCC) thickness ($p < 0.05$), ganglion cell layer (GCL) thickness ($p < 0.05$), inner nuclear layer (INL) thickness ($p < 0.05$), and outer nuclear layer (ONL) thickness ($p < 0.05$) decrease with distance from the optic nerve head.

로 측정 시 차례대로 $172.14 \pm 7.28 \mu\text{m}$, $167.29 \pm 8.60 \mu\text{m}$, $158.88 \pm 9.48 \mu\text{m}$, $151.40 \pm 8.98 \mu\text{m}$, $146.38 \pm 9.69 \mu\text{m}$, $141.45 \pm 8.96 \mu\text{m}$ 였다. 총 망막두께는 ONH에서 아래로 멀어짐에 따라 차이가 있었으며(ANOVA test, $p < 0.05$), 감소하는 경향을 보였다(Pearson's $CC = -0.778$, $p < 0.05$, Table 1). 연속된 두 지점 사이의 차이를 비교하였을 때, 총 망막두께는 ONH 가장자리부터 1 mm 사이, ONH로부터 1 mm와 2 mm 사이, 2 mm와 3 mm 사이, 3 mm와 4 mm 사이, 그리고 4 mm와 5 mm 사이에서 모두 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 2A). 내망막층 두께는 ONH에서 아래로 1 mm 간격으로 측정 시 차례대로 $127.19 \pm 5.06 \mu\text{m}$, $122.69 \pm 7.16 \mu\text{m}$, $118.79 \pm 6.74 \mu\text{m}$, $113.19 \pm 7.55 \mu\text{m}$, $109.69 \pm 7.93 \mu\text{m}$, $106.62 \pm 8.29 \mu\text{m}$ 였다. 내망막층 두께는 ONH에서 아래로 멀어질수록 감소하였다(ANOVA test, $p < 0.05$; $CC = -0.710$, $p < 0.05$; Table 1). 연속된 두 지점 간 비교에서 내망막층 두께는 ONH 가장자리부터 1 mm 사이, ONH로부터 1 mm와 2 mm 사이, 2 mm와 3 mm 사이, 3 mm와 4 mm 사이, 그리고 4 mm와 5 mm 사이에서 모두 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 2A). 외망막층 두께는 ONH에서 아래로 1 mm 간격으로 측정 시 차례대로 $44.95 \pm 6.50 \mu\text{m}$, $44.60 \pm 4.91 \mu\text{m}$, $40.10 \pm 6.04 \mu\text{m}$, $38.21 \pm 6.85 \mu\text{m}$, $36.69 \pm 7.39 \mu\text{m}$, $34.83 \pm 7.39 \mu\text{m}$ 였다. 외망막층 두께는 ONH에서 멀어질수록 감소하였다(ANOVA test, $p < 0.05$; $CC = -0.495$, $p < 0.05$; Table 1). 연속된 두 지점 간 비교에서 외망막층 두께는 ONH로부터 1 mm와 2 mm 사이, 2 mm와 3 mm 사이, 3 mm와 4 mm 사이, 그리고 4 mm와 5 mm 사이에서 모두 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 2A). 그러나 ONH 가장자리부터 1 mm 사이의 차이는 명확하지 않았다($p = 0.577$, Fig. 2A). 맥락막두께는 ONH에서 아래로 1 mm 간격으로 측정 시 차례대로 $78.44 \pm 27.71 \mu\text{m}$, $96.22 \pm 20.31 \mu\text{m}$, $104.33 \pm 16.23 \mu\text{m}$, $112.02 \pm 18.39 \mu\text{m}$, $116.24 \pm 16.97 \mu\text{m}$, $115.40 \pm 15.24 \mu\text{m}$ 였다. 맥락막두께는 ONH에서 멀어질수록 증가하였다(ANOVA test, $p < 0.05$; $CC = 0.511$, $p < 0.05$; Table 1). 맥락막두께는 ONH 가장자리부터 1 mm 사이, ONH로부터 1 mm와

2 mm 사이, 2 mm와 3 mm 사이, 그리고 3 mm와 4 mm 사이에서 모두 증가하였으나($p < 0.05$, Fig. 2B). ONH 가장자리부터 4 mm와 5 mm 사이의 차이는 명확하지 않았다($p = 0.407$, Fig. 2B).

신경절세포복합체 두께는 ONH에서 아래로 1 mm 간격으로 측정 시 차례대로 $52.27 \pm 4.64 \mu\text{m}$, $49.22 \pm 7.22 \mu\text{m}$, $48.53 \pm 8.59 \mu\text{m}$, $45.93 \pm 9.27 \mu\text{m}$, $45.38 \pm 8.51 \mu\text{m}$, $44.91 \pm 9.09 \mu\text{m}$ 였다. 신경절세포복합체 두께는 ONH에서 아래로 멀어질수록 계속 감소하였다(ANOVA test, $p < 0.05$; $CC = -0.292$, $p < 0.05$; Table 2). 신경절세포복합체 두께는 ONH 가장자리부터 1 mm 사이와 2 mm와 3 mm 사이에서 감소하였지만($p < 0.05$), ONH 가장자리부터 1 mm와 2 mm 사이($p = 0.377$), 3 mm와 4 mm 사이($p = 0.374$), 그리고 4 mm와 5 mm 사이($p = 0.448$)의 차이는 명확하지 않았다(Fig. 2C). 신경절세포층 두께는 ONH에서 아래로 1 mm 간격으로 측정 시 차례대로 $20.07 \pm 6.69 \mu\text{m}$, $18.31 \pm 5.00 \mu\text{m}$, $17.31 \pm 4.75 \mu\text{m}$, $16.58 \pm 4.56 \mu\text{m}$, $16.13 \pm 5.27 \mu\text{m}$, $15.53 \pm 5.59 \mu\text{m}$ 였고, ONH에서 멀어질수록 감소하였다(ANOVA test, $p < 0.05$; $CC = -0.284$, $p < 0.05$; Table 2). 연속된 두 지점 간 비교에서 신경절세포층 두께 감소는 ONH 가장자리부터 1 mm 사이($p < 0.05$)에서만 유의미하였으며, 1 mm와 2 mm 사이($p = 0.054$), 2 mm와 3 mm 사이($p = 0.159$), 3 mm와 4 mm 사이($p = 0.462$), 그리고 4 mm와 5 mm 사이($p = 0.353$)의 구간에서 그 감소가 유의하지 않았다. 내핵층 두께는 ONH에서 아래로 1 mm 간격으로 측정 시 차례대로 $13.78 \pm 2.44 \mu\text{m}$, $13.84 \pm 2.44 \mu\text{m}$, $13.16 \pm 2.50 \mu\text{m}$, $12.71 \pm 2.67 \mu\text{m}$, $12.51 \pm 3.56 \mu\text{m}$, $11.78 \pm 2.73 \mu\text{m}$ 였다. 내핵층 두께도 ONH에서 멀어질수록 감소하였다(ANOVA test, $p < 0.05$; $CC = -0.263$, $p < 0.05$, Table 2), 연속된 두 지점 간 비교에서는 ONH 가장자리부터 1 mm 사이($p = 0.846$), 1 mm와 2 mm 사이($p = 0.093$), 2 mm와 3 mm 사이($p = 0.209$), 3 mm와 4 mm 사이($p = 0.571$), 그리고 4 mm와 5 mm 사이($p = 0.068$)의 모든 구간에서 그 변화가 유의하지 않았다. 외핵층 두께는 ONH에서 아래로 1 mm 간격으로 측정 시 차례대로

Table 2. Inner retinal layer thickness at a distance from the optic nerve head edge

Layer thickness (μm)	Distance from the ONH edge (mm)						<i>p</i> -value*
	0	1	2	3	4	5	
GCC	52.27 ± 4.64	49.22 ± 7.22	48.53 ± 8.59	45.93 ± 9.27	45.38 ± 8.51	44.91 ± 9.09	<0.001
GCL	20.07 ± 6.69	18.31 ± 5.00	17.31 ± 4.75	16.58 ± 4.56	16.13 ± 5.27	15.53 ± 5.59	0.001
INL	13.78 ± 2.44	13.84 ± 2.44	13.16 ± 2.50	12.71 ± 2.67	12.51 ± 3.56	11.78 ± 2.73	0.002
ONL	39.62 ± 5.06	32.69 ± 5.31	28.79 ± 6.40	24.69 ± 6.65	22.50 ± 6.57	19.90 ± 6.56	<0.001

The values are presented as mean $\pm$ standard deviation.

ONH = optic nerve head; GCC = ganglion cell complex; GCL = ganglion cell layer; INL = inner nuclear layer; ONL = outer nuclear layer.

**p*-value for five-group comparison by one-way analysis of variance test.

39.62 ± 5.06 μm, 32.69 ± 5.31 μm, 28.79 ± 6.40 μm, 24.69 ± 6.65 μm, 22.50 ± 6.57 μm, 19.90 ± 6.56 μm였다. 외핵층 두께는 ONH에서 멀어질수록 감소하였다(ANOVA test, $p < 0.05$; CC=-0.760, $p < 0.05$; Table 2). 연속된 두 지점 간 비교에서 외핵층 두께는 ONH 가장자리부터 1 mm 사이, ONH로부터 1 mm와 2 mm 사이, 2 mm와 3 mm 사이, 3 mm와 4 mm 사이, 그리고 4 mm와 5 mm 사이에서 모두 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 2C).

고 찰

망막질환의 연구에서 ‘생체 외(ex vivo)’ 조직학이 구조적인 형태를 평가하는 표준적인 방법(gold standard)이지만, 영상화 기술의 비약적인 발전으로 망막 구조의 평가에 ‘생체 내(in vivo)’ 빛간섭단층촬영(OCT)이 조직학을 대체할 수 있게 되었다.⁷ 특히 SD-OCT의 등장은 해상도의 비약적인 향상으로 조직학의 해부학적 묘사에 상응하는 수준의 망막층 묘사와 맥락막의 두께 측정을 가능하게 하였다.^{1,7} 이전의 많은 연구들을 통해 사람 망막의 전체 망막두께, 망막 각 층 및 맥락막두께에 대한 표준화된 정량적 수치들이 알려져 유용하게 사용되고 있으나,²⁰ 토끼에서는 이에 대한 연구가 상대적으로 적었다. 동물 실험의 해석에서 망막 구조의 정량적인 분석은 필수적인 요소로⁹ 이에 본 연구에서는 토끼의 전체 망막층, 내망막층, 외망막층, 맥락막층, 신경절세포복합체층, GCL, INL, 그리고 ONL의 8가지 층의 두께를 정량화하고, ONH로부터의 거리에 따른 두께 변화의 경향성도 분석했다. 토끼의 망막에는 인간의 황반(macula) 대신 시각띠(visual streak)가 있는데, 시각띠는 황반처럼 원뿔세포(cone)와 간상세포(rod) 광수용체와 신경절세포의 밀도가 가장 크지만 그 형태는 황반과 차이가 있다.¹¹ 시각띠는 길이 26 mm, 너비 2-2.5 mm 정도로 토끼의 망막을 수평으로 가로지르며, ONH의 중심으로부터 약 2.8-3.0 mm 아래에 위치하고, 신경절 세포가 밀집되어 있다.^{11,21,22} 본 연구에서 토끼 망막 각 세부층 모두 ONH로부터 시각띠를 지나 하방으로 내려갈수록 두께가 감소하였으며, 맥락막층은 증가하였다. 특히 총 망막두께는 ONH 가장자리부터 1 mm 사이($p < 0.05$), ONH로부터 1 mm와 2 mm 사이($p < 0.05$), 2 mm와 3 mm 사이($p < 0.05$), 3 mm와 4 mm 사이($p < 0.05$), 그리고 4 mm와 5 mm 사이($p < 0.05$)에서의 감소가 모두 유의미했다(Fig. 2A). ONH 가장자리로부터 하방으로 내려갈수록 내망막층과 외망막층의 두께도 유의미하게 감소하였다(Fig. 2A). ONH 가장자리에서 멀어질수록 총 망막두께가 감소함은 기존의 정상 토끼의 망막두께에 대한 연구 결과에 부합하였다.⁹ 이는 내망막층과 외망막층

의 두께 감소에 의한 것으로 설명할 수 있으며, 특히 내망막층의 두께 감소는 신경절세포복합체층, 내핵층, 그리고 외핵층의 두께 감소 경향에 의한 것으로 보인다. ONH로부터 멀어질수록 신경절세포복합체층의 두께가 감소하는 경향을 보인 것은 ONH로부터 많이 떨어질수록 망막신경섬유층의 두께가 감소한다는 기존 보고와⁹ 일치한다. 시각띠 부위에서도 유의미한 내망막층의 두께 감소가 있었는데(Fig. 2A), 이는 시신경 하부 2-3 mm에서의 신경절세포복합체층과 외핵층의 두께 감소에 의한 것으로 생각된다(Fig. 2C). Oyster et al²²이 보고한 토끼에서의 신경절세포의 밀도와 분포 보고에 따르면, 신경절세포의 밀도는 시신경 아래가 가장 높고 시각띠 부근까지 감소하며 시각띠보다 아래에서는 더 더 감소하며, 신경절세포 몸체 크기의 변화는 적은 것으로 보고하였다. 또한 토끼에서 원추세포 밀도는 주변부에서 약 7,500/mm²이고 시각띠에서 약 13,000 mm²로, 시각띠 부근에서 가장 높은 것으로 보고된 바 있는데,²³ 토끼의 이러한 해부학적인 특징으로 시각띠 부근의 신경절세포복합체층 두께와 내망막층 두께의 감소가 있었을 것으로 생각되며, 본 연구의 OCT에서의 두께 변화는 그 해부학적인 변화를 반영한 것으로, 이러한 두께 변화는 기존에 보고된 논문에서의 결과와 일치하였다.¹¹ 또한 ONH로부터 하방으로 내려갈수록 맥락막층 두께는 증가하였는데, 사람에서 황반 부위의 맥락막층 두께가 가장 두껍고 비측으로 갈수록 즉, 시신경에 가까울수록 그 두께가 얇아진다는 점을 생각해보면,²⁴ 토끼 망막에서도 그 변화가 비슷함을 알 수 있었다.

토끼는 망막혈관이 ONH로부터 유수신경(myelinated nerve fibres)이 비측(nasal)과 이측(temporal)으로 넓게 수평으로 분산되어 망막의 일부분에만 위치하는 특징을 가지는 merangiotic 동물로써,^{25,26} 망막혈관이 없는 부분인 시각띠는 맥락막모세혈관층(choriocapillaris)에서의 확산을 통해 산소와 영양분의 공급이 이루어진다.²⁶ 이러한 시각띠는 사람에서의 황반부와 기능적으로 유사한 특징을 가지고 있으므로, 토끼의 안구가 영장류에 비해 상대적으로 작지만 망막 실험 모델에 많이 사용되고 있어²⁷ 본 연구 결과를 사람 망막 분석에도 응용하기에 적합할 것으로 생각된다.

SD-OCT에서는 각막곡률이 A-scan의 규모를 줄이거나 늘려 광학적 해상도를 결정한다.⁹ 성인 토끼의 각막 굴절력은 약 42-44디옵터이므로 사람의 각막과 그 값이 매우 가까워 토끼 모델에서 SD-OCT 측정치를 구하면 이를 사람 망막에 적용시 추가적인 변환이 필요하지 않다.⁹ 따라서 본 연구에서 보고된 토끼의 망막 및 맥락막두께에 대한 정량화된 수치와 ONH로부터의 거리에 따른 두께 변화에 대한 분석은 동물 망막 실험을 위한 표준화된 자료가 될 수

있을 뿐만 아니라 인간 망막질환의 진단 및 치료에도 많은 기여를 할 것으로 생각된다. SD-OCT로 측정된 총 망막두께는 시세포 바깥쪽(outer segment), 망막색소상피층의 측정을 모두 포함하므로 TD-OCT에서 측정된 두께보다 대략 70 μm (61.9-74.1 μm) 더 두껍다.²⁸ 따라서 본 연구에서 정량화된 토끼의 망막 및 맥락막두께는 SD-OCT로 측정함으로써 기존의 TD-OCT로 측정된 망막두께와 차이 있음을 알고 적용해야 하겠다.

본 연구는 SD-OCT에서 나타나는 망막 각 층의 두께를 수동으로 측정하여 검사자의 주관적 해석이 연구의 오차에 관여했다는 점에서 제한점이 있었다. 그러나 이 주관적인 편향을 줄이기 위해 3명의 검사자들이 검사치를 구했고 대부분의 측정치에서 90% 이상의 신뢰할 만한 검사자 간 일치도를 보였다. 이는 본 연구에서 수동으로 미세한 층을 측정함에 있어 생길 수 있는 주관적인 판단의 영향력이 작았음을 보여준다. 또한 본 연구는 ONH부로부터의 거리에 따른 망막 층별 두께의 변화를 SD-OCT상에서는 확인할 수 있었지만 조직 사진으로는 확인하지 못하였다는 한계점이 있었다. Medullary ray에 수직인 단면의 Hematoxylin-eosin staining이 된 조직 사진은 얻었으나(Fig. 1E), ONH부로부터의 거리에 따른 조직에서의 망막 층별 두께를 확인 후 SD-OCT상에서의 층별 두께와 비교하지 못하였다는 점에서 한계가 있었다. 따라서 조직과 OCT상에서의 층별 두께를 정확히 비교하지 못했기 때문에 OCT에서의 두께가 실제 망막 조직 두께와 어느 정도의 일치성을 가지는지는 증명하지 못하였다. 특히 이는 조직과 OCT상에서의 망막 층별 두께 변화의 경향성이 일치하지 않을 수 있다는 점에서,¹⁶ 아쉬운 점이라고 할 수 있겠다.

토끼에서 SD-OCT를 이용한 ONH부로부터의 거리에 따른 망막 및 맥락막의 층별 두께 분석을 통해 동물 망막 실험을 위한 기본 자료를 얻을 수 있었다는 점에서 본 연구의 의의가 있다. 특히 비침습적으로 망막의 구조 및 특징을 분석할 수 있는 SD-OCT로 토끼 망막 구조에 대한 정량화된 기본 자료를 얻었기에 앞으로 시행될 동물 및 인간 망막 연구에 본 연구가 기여할 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

- Kim CH, Jin SY, Lee YH, Chang YS. Analysis of macular layer thickness measured using spectral domain optical coherence tomography in Korean subjects. *J Korean Ophthalmol Soc* 2016;57:264-75.
- Gupta P, Sidhartha E, Tham YC, et al. Determinants of macular thickness using spectral domain optical coherence tomography in healthy eyes: the Singapore Chinese Eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:7968-76.
- Kim MH, Jeon CY, Baek SK, et al. The thickness of each retinal layer and visual acuity after vitrectomy in idiopathic epiretinal membrane. *J Korean Ophthalmol Soc* 2017;58:420-9.
- Ko TH, Fujimoto JG, Schuman JS, et al. Comparison of ultrahigh- and standard-resolution optical coherence tomography for imaging macular pathology. *Ophthalmology* 2005;112:1922.e1-15.
- Sayanagi K, Sharma S, Kaiser PK. Comparison of retinal thickness measurements between three-dimensional and radial scans on spectral-domain optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol* 2009;148:431-8.
- Badaró E, Novais E, Prodocimo LM, Sallum JM. Spectral-domain optical coherence tomography for macular edema. *The Scientific World Journal* 2014;2014:191847.
- Ferguson LR, Grover S, Dominguez JM 2nd, et al. Retinal thickness measurement obtained with spectral domain optical coherence tomography assisted optical biopsy accurately correlates with ex vivo histology. *PLoS One* 2014;9:e111203.
- Carpenter CL, Kim AY, Kashani AH. Normative retinal thicknesses in common animal models of eye disease using spectral domain optical coherence tomography. *Adv Exp Med Biol* 2018;1074:157-66.
- Alkin Z, Kashani AH, López-Jaime GR, et al. Quantitative analysis of retinal structures using spectral domain optical coherence tomography in normal rabbits. *Curr Eye Res* 2013;38:299-304.
- Ruggeri M, Wehbe H, Jiao S, et al. In vivo three-dimensional high-resolution imaging of rodent retina with spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1808-14.
- Muraoka Y, Ikeda HO, Nakano N, et al. Real-time imaging of rabbit retina with retinal degeneration by using spectral-domain optical coherence tomography. *PLoS One* 2012;7:e36135.
- Penha FM, Rodrigues EB, Maia M, et al. Retinal and ocular toxicity in ocular application of drugs and chemicals--part I: animal models and toxicity assays. *Ophthalmic Res* 2010;44:82-104.
- Del Amo EM, Urtti A. Rabbit as an animal model for intravitreal pharmacokinetics: clinical predictability and quality of the published data. *Exp Eye Res* 2015;137:111-24.
- Chen S, Popp NA, Chan CC. Animal models of age-related macular degeneration and their translatability into the clinic. *Expert Rev Ophthalmol* 2014;9:285-95.
- Bartuma H, Petrus-Reurer S, Aronsson M, et al. In vivo imaging of subretinal bleb-induced outer retinal degeneration in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:2423-30.
- Lavaud A, Soukup P, Martin L, et al. Spectral domain optical coherence tomography in awake rabbits allows identification of the visual streak, a comparison with histology. *Transl Vis Sci Technol* 2020;9:13.
- Cicinelli MV, Marchese A, Bandello F, Coppola M. Inner retinal layer and outer retinal layer findings after macular hole surgery assessed by means of optical coherence tomography. *J Ophthalmol* 2019;2019:3821479.
- Bhagat PR, Deshpande KV, Natu B. Utility of ganglion cell complex analysis in early diagnosis and monitoring of glaucoma using a different spectral domain optical coherence tomography. *J Curr Glaucoma Pract* 2014;8:101-6.
- Anraku A, Ishida K, Enomoto N, et al. Association between optic nerve head microcirculation and macular ganglion cell complex thickness in eyes with untreated normal tension glaucoma and a

- hemifield defect. J Ophthalmol 2017;2017:3608396.
- 20) Arepalli S, Srivastava SK, Hu M, et al. Assessment of inner and outer retinal layer metrics on the Cirrus HD-OCT Platform in normal eyes. PLoS One 2018;13:e0203324.
- 21) Vaney DI, Hughes A. The rabbit optic nerve: fibre diameter spectrum, fibre count, and comparison with a retinal ganglion cell count. J Comp Neurol 1976;170:241-51.
- 22) Oyster CW, Takahashi ES, Hurst DC. Density, soma size, and regional distribution of rabbit retinal ganglion cells. J Neurosci 1981;1:1331-46.
- 23) Juliusson B, Bergström A, Röhlich P, et al. Complementary cone fields of the rabbit retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:811-8.
- 24) Hirata M, Tsujikawa A, Matsumoto A, et al. Macular choroidal thickness and volume in normal subjects measured by swept-source optical coherence tomography. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:4971-8.
- 25) De Schaepdrijver L, Simoens P, Lauwers H, De Geest JP. Retinal vascular patterns in domestic animals. Res Vet Sci 1989;47:34-42.
- 26) Ninomiya H, Inomata T, Kanemaki N. Microvascular architecture of the rabbit eye: a scanning electron microscopic study of vascular corrosion casts. J Vet Med Sci 2008;70:887-92.
- 27) Ahn SM, Ahn J, Cha S, et al. Development of a post-vitrectomy injection of N-methyl-N-nitrosourea as a localized retinal degeneration rabbit model. Exp Neurobiol 2019;28:62-73.
- 28) Grover S, Murthy RK, Brar VS, Chalam KV. Comparison of retinal thickness in normal eyes using stratus and spectralis optical coherence tomography. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010;51:2644-7.

= 국문초록 =

토끼에서의 빛간섭단층촬영기를 이용한 망막 및 맥락막두께 분석

목적: 토끼에서 스펙트럼영역 빛간섭단층촬영(spectral domain optical coherence tomography, SD-OCT)을 이용하여 시신경유두(optic nerve head, ONH)로부터 거리에 따른 망막 각 층의 두께를 측정하고 이를 통해 망막 동물실험모델에서의 기본 자료를 얻고자 한다.

대상과 방법: 토끼 15마리의 우안에서 SD-OCT 영상을 얻은 후, ONH 테두리에서 시작하여 하방으로 1, 2, 3, 4 그리고 5 mm 위치에서 전체 망막층, 내망막층, 외망막층, 맥락막층, 신경절세포복합체층, 신경절세포층, 내핵층, 그리고 외핵층의 두께를 얻었으며, 측정 위치에 따른 각 층의 두께를 비교하였다.

결과: 총 망막두께(Pearson's correlation coefficient [CC]=-0.778, $p<0.05$), 내망막층 두께(CC=-0.710, $p<0.05$), 외망막층 두께(CC=-0.495, $p<0.05$), 신경절세포복합체 두께(CC=-0.292, $p<0.05$), 신경절세포층 두께(CC=-0.284, $p<0.05$), 그리고 외핵층 두께(CC=-0.760, $p<0.05$)는 ONH에서 아래로 멀어질수록 감소하였다. 내핵층 두께도 ONH에서의 거리와 음의 상관관계를 보였으나 상관계수는 낮았다(CC=-0.263, $p<0.05$). 맥락막두께는 ONH에서 멀어질수록 증가하였다(CC=0.511, $p<0.05$).

결론: SD-OCT를 이용하여 ONH로부터 거리에 따른 토끼 망막두께를 분석하였다. 이 토끼 안저를 이해하는 데 도움이 될 것이며, 토끼 실험의 표준 자료로 사용할 수 있을 것이다.

〈대한안과학회지 2021;62(3):354-361〉

김우진 / Woo Jin Kim

고려대학교 의과대학 안과학교실
Department of Ophthalmology,
Korea University College of Medicine