

쥐에서 마이봄샘의 빛간섭단층촬영 소견과 조직학적 소견의 비교

Comparison of Optical Coherence Tomography Findings and Histological Findings of Meibomian Gland in Rats

이승훈¹ · 엄영섭² · 송종석² · 나경선¹ · 김은철¹ · 김현승¹ · 김만수¹ · 황호식¹

Seung Hoon Lee, MD¹, Youngsub Eom, MD, PhD², Jong Suk Song, MD, PhD², Kyung Sun Na, MD, PhD¹, Eun Chul Kim, MD, PhD¹, Hyun Seung Kim, MD, PhD¹, Man Soo Kim, MD, PhD¹, Ho Sik Hwang, MD, PhD¹

가톨릭대학교 의과대학 안과학교실¹, 고려대학교 의과대학 안과학교실²

Department of Ophthalmology, College of Medicine, The Catholic University of Korea¹, Seoul, Korea
Department of Ophthalmology, Korea University College of Medicine², Seoul, Korea

Purpose: To compare optical coherence tomography (OCT) and histological findings of Meibomian glands in rats. Based on these results, the histological findings of the structures seen using OCT were clarified.

Methods: En bloc excision was performed on the upper and lower eyelids in two rats. The axis of the Meibomian gland was vertically scanned with three-dimensional (3D) OCT and reconstructed into 3D images. The samples were fixed in 10% formalin again and stained with hematoxylin and eosin. The findings of the OCT and histological examinations were then compared to determine the histological characteristics of the structures observed in the OCT.

Results: The surface of the acinus was well-delineated in the Meibomian glands of rats using OCT. However, no deep acini were observed in the central ducts.

Conclusions: The structure of Meibomian glands imaged by OCT in rats was limited to the surface of the acinus. The structure of the reconstructed Meibomian gland *ex vivo* was similar to that of the human Meibomian gland. The possibility of developing an *in vivo* meibography system was therefore confirmed in animals.

J Korean Ophthalmol Soc 2020;61(8):849-854

Keywords: Histology, Meibography, Meibomian gland, Optical coherence tomography, Rat

■ Received: 2019. 10. 4. ■ Revised: 2020. 1. 31.
■ Accepted: 2020. 7. 24.

■ Address reprint requests to **Ho Sik Hwang, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Yeouido St. Mary's Hospital,
#10 63-ro, Yeongdeungpo-gu, Seoul 07345, Korea
Tel: 82-2-3779-1245, Fax: 82-2-761-6869
E-mail: huanghs@daum.net

* This Study is Supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number: HI17C0659), Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF), funded by the Ministry of Education, Republic of Korea (No. 2017R1A1A2A10000681), and the Sodam Scholarship Foundation of Busan Sungmo Eye Hospital.

안구건조증이란 눈물생성이 부족하거나(눈물부족형 안구건조증) 눈물막이 과도하게 증발하여(증발과다형 안구건조증) 안구 표면의 건조함을 일으키는 질환으로 자극감, 이물감, 통증 및 흐리게 보이는 증상을 유발할 수 있다.¹

마이봄샘기능부전(meibomian gland dysfunction, MGD)은 증발과다형 안구건조증의 가장 중요한 원인 중 하나이다.^{2,3} 마이봄샘이란 눈꺼풀에 존재하는 피지샘의 일종으로 안구표면에 지질을 분비하여 눈물막의 지질층을 형성한다.⁴ 이 지질층은 눈물의 증발을 억제하는데 마이봄샘기능부전의 경우 마이봄샘이 막히거나 소실되어 기름(meibum)의 분비가 줄어들어 지질층이 얇아지면서 증발과다형 안구건조증이 나타난다.

과거에는 마이봄샘기능부전을 진단하기 위한 투과조명 생체현미경검사법이 연구되었으며,⁵⁻⁹ 최근 Arita et al^{10,11}에서 비접촉 방식의 적외선을 이용한 마이봄샘촬영술(non-contact meibography)이 소개되어 임상에서 많이 사용되고 있다. Hwang et al¹²은 전안부 빛간섭단층촬영(optical coherence tomography, OCT)을 이용한 비접촉 마이봄샘촬영술(Hosik meibography)을 소개한 바 있는데, 이는 적외선 카메라가 내장된 기기로서 1,310 nm 파장의 적외선을 이용하여 마이봄샘을 단층으로 촬영하고 고해상도 이미지를 구하였다. 접촉 방식에서 발생할 수 있는 피검자의 불편함을 해소하였으며, 전안부 빛간섭단층촬영 이외에 어떤 추가적인 장비의 도움 없이도 시행할 수 있다는 장점을 보여주었다.

또한 Hwang et al¹³은 최근 푸리에영역 빛간섭단층촬영(fourier domain optical coherence tomography)에 기반한 생체 내 3차원 마이봄샘촬영술(*in vivo* 3D Meibography)로 사람의 눈꺼풀의 3차원 이미지를 구현하여 고무적인 결과를 보여준 사례가 있다. 여기서 사용한 FD-OCT는 고속파장 스위핑 레이저(high-speed wavelength swept laser)를 사용하였는데, 52 kHz의 속도로 통상적인 전안부 빛간섭단층촬영(anterior segment optical coherence tomography)보다 약 26배 빠른 속도로 안초음파(A-scan)을 촬영하였고 이를 통해 검사자의 손가락이나 피검자의 눈꺼풀이 떨리면서 발생하는 운동 허상(motion artifact)을 보정하였다. 또한 1,310 nm 파장의 광원을 이용한 강한 조직 투과력으로 결막보다 깊은 구조물을 선명하게 구현하였다.

현재까지 2차원 및 3차원으로 구현한 빛간섭단층촬영 이미지로 마이봄샘의 구조를 확인한 연구들이 있었지만 위 이미지에서 나타난 구조물들이 정확히 무엇인지 알아본 연구는 없었다. 본 연구는 상기 FD-OCT로 구한 이미지를 직접 조직검사와 비교하여 결국 빛간섭단층촬영에서 나타난 마이봄샘의 구조물들이 무엇을 가리키는지 파악해보고자 하였다.

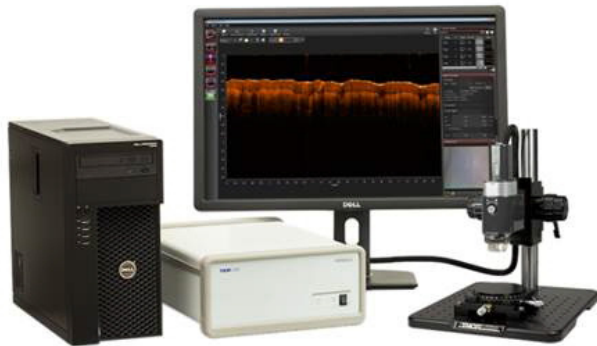


Figure 1. 3D OCT Meibography system (GAN210C1, Thorlabs, NJ, USA) for a laboratory rat.

대상과 방법

본 연구는 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement의 권고사항을 준수하였으며, 2마리의 쥐를 희생시킨 후 양안 위눈꺼풀 및 아래눈꺼풀에 일괄절제술(en bloc excision)을 시행하여 검체를 구하였다. 우안의 위아래눈꺼풀을 눈꺼풀결막(palpebral conjunctiva)이 위를 향하도록 위치시킨 후 해부현미경(dissecting microscope)으로 촬영하였고 위 검체를 대상으로 3차원 빛간섭단층촬영(GAN210C1, Thorlabs, Newton, NJ, USA)을 사용하여 마이봄샘의 축에 대해 평행하게 스캔하였다. 사용한 3차원 빛간섭단층촬영기의 중심파장은 930 nm였고 축방향해상력(axial resolution)은 공기에서 6 μ m, 물에서 4.5 μ m였으며 측방향해상력(lateral resolution)은 8 μ m였으며, 스캔속도(A-scan/Line rate)는 5.5-36 kHz였다(Fig. 1).

이 3차원 FD-OCT를 사용하여 위아래 눈꺼풀결막을 스캔한 후 마이봄샘의 단층영상을 만들었으며 스캔의 범위는 0.78 mm (상측에서 하측 방향, B-scan [512 A-scans]) \times 2.2 mm (좌측에서 우측 방향, C-scan [512 B-scans])였고, 따라서 해상도는 가로 4.33 μ m, 세로 1.52 μ m였다(Fig. 2). 이를 FD-OCT의 내장프로그램을 이용하여 3차원으로 재구성하였으며 추가적으로 '데이터 시각화, 분석 및 모델링 소프트웨어'인 3차원 편집프로그램 'AMIRA' (AMIRA software, Mercury Computer Systems, Chelmsford, MA, USA)를 사용하여 3차원 이미지로 재현해보았다. 이후 검체를 10% 포르말린 고정 및 H&E 염색을 시행하였고, 빛간섭단층촬영으로 구현한 이미지와 조직학 소견을 비교해보았다.

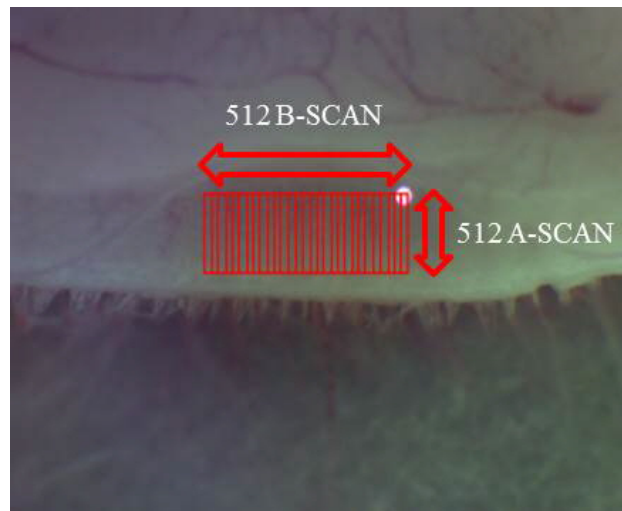


Figure 2. Upper eyelid of a rat. Red-hatched area was set as a shooting target. The width was made up of 512 B-scans, the height was made up of 512 A-scans.

결 과

해부현미경(dissecting microscope)으로 촬영한 사진에서 결막 밑으로 마이봄샘이 하얀 포도송이 모양처럼 비쳐 보이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 위눈꺼풀에서 마이봄샘은 12-14개였으며 마이봄샘의 폭은 0.8-1.6 mm, 길이는 2.0-2.6 mm였다. 아래눈꺼풀에서 마이봄샘은 12-13개였으며 마이봄샘의 폭은 0.7-1.2 mm, 길이는 0.8-2.1 mm였다. 마이봄샘의 수는 유사했으나 아래눈꺼풀에서 폭이나 길이가 다소 작았다.

쥐 위눈꺼풀의 빛간섭단층촬영의 단면사진에서는 저신호강도로 나타나는 눈꺼풀결막(palpebral conjunctiva)이 관찰되었고, 고신호강도로 나타나는 세엽(anici)으로 보이는 구조물이 관찰되었으며 중심관(central duct)은 명확히 확인되지 않았다. 눈꺼풀결막과 세엽의 경계를 따라 고신호강

도를 나타내는 눈꺼풀판으로 보이는 구조물도 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 단면으로 찍은 사진을 3차원으로 재구성했을 때, 수평단면(horizontal section)과 기존의 시상단면(sagittal section)에서도 마찬가지로 바깥에서부터 눈꺼풀결막, 눈꺼풀판, 세엽의 구조물이 관찰되었으며 중심관은 관찰되지 않았다(Fig. 4B).

빛간섭단층촬영에서 얻은 안초음파 이미지를 3차원 빛간섭단층촬영의 내장프로그램(Fig. 5B) 및 'AMIRA' (Fig. 5C)를 통해 3차원 재구성한 정면영상(en face image)으로 만들어 보았으며, 해부현미경에서 희미하게 포도 모양으로 관찰되었던 세엽의 구조(Fig. 5A)와 유사한 형태로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

같은 부위에 대해 시행한 두 검사를 비교해보았을 때 우선 조직 소견에서는 가장 표면에서부터 눈꺼풀결막과 눈꺼풀판이 보이고, 눈꺼풀판 안에 중심관과 세엽으로 이루어

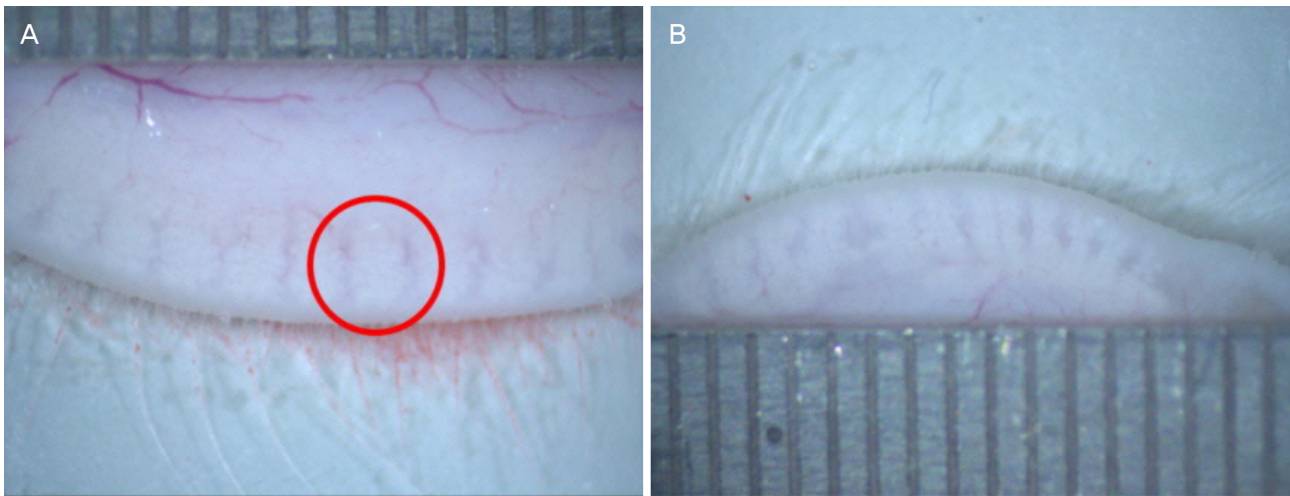


Figure 3. Dissection microscopic image of the rat. (A) Upper lid and (B) lower lid. A hazy image of meibomian gland is shown (red circle).

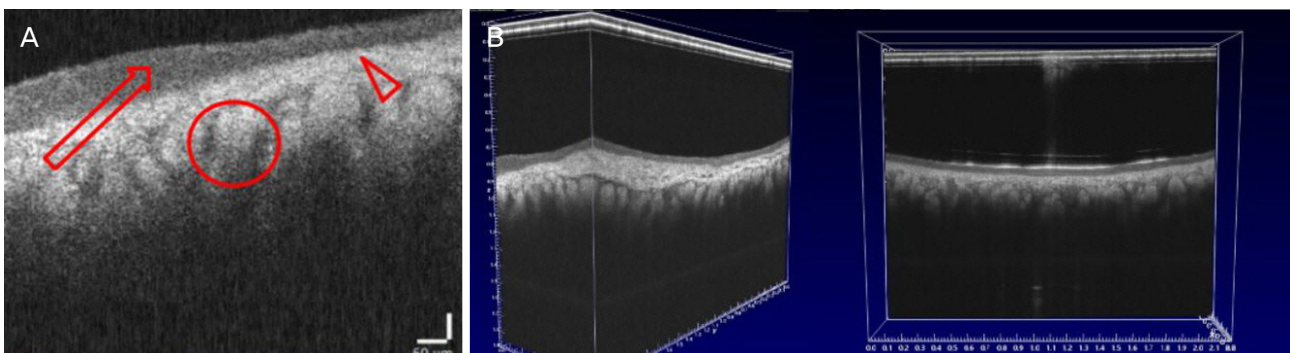


Figure 4. Anterior segment optical coherence tomography images of meibomian glands. (A) B-scan image of meibomian gland. B-scan image showed palpebral conjunctiva (arrow), tarsus (arrowhead), and meibomian gland (circle). (B) Three dimensional (3D) reconstructed image of meibomian gland.

진 마이봄샘이 관찰되며 그 뒤로 눈물레근, 눈꺼풀 피부의 진피층과 상피층이 관찰되었다. 그러나 빛간섭단층촬영에서는 눈꺼풀결막, 눈꺼풀판의 일부만 확인되고 조직검사와 달리 마이봄샘의 중심관은 관찰되지 않고 중심관보다 표면에 있는 마이봄샘의 세엽들만 관찰되었다(Fig. 6). 조직 소견과는 달리 빛간섭단층촬영에서는 해상도의 한계로 마이

봄샘 세엽의 세포(meibocyte)는 관찰되지 않았다. 사각형 영역으로 빛간섭단층촬영에서 관찰이 가능한 구조물의 범위(Fig. 6A)와 조직검사에서 보이는 범위(Fig. 6B)를 표시해보았을 때, 세엽의 일부를 포함한 마이봄샘의 표면 영역만 관찰되었다. 이러한 소견들은 위아래눈꺼풀이 유사하였으며 개체 간 특이한 차이는 보이지 않았다.

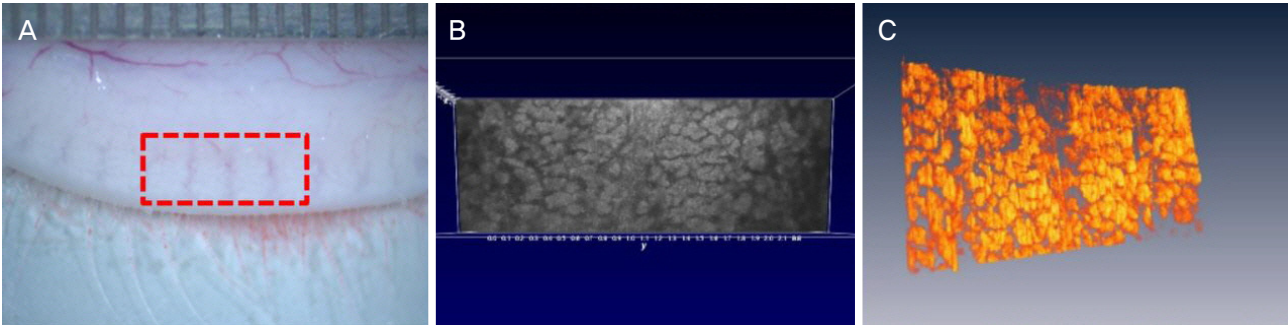


Figure 5. Dissecting microscopic image and reconstructed optical coherence tomography images of the meibomian glands in the upper eyelid. (A) Dissecting microscopic image of the upper lid (dotted rectangle). (B) Three dimensional (3D) reconstructed en face image using (B) optical coherence tomography built-in program and (C) 'AMIRA' (AMIRA software; Mercury Computer Systems, Chelmsford, MA, USA).

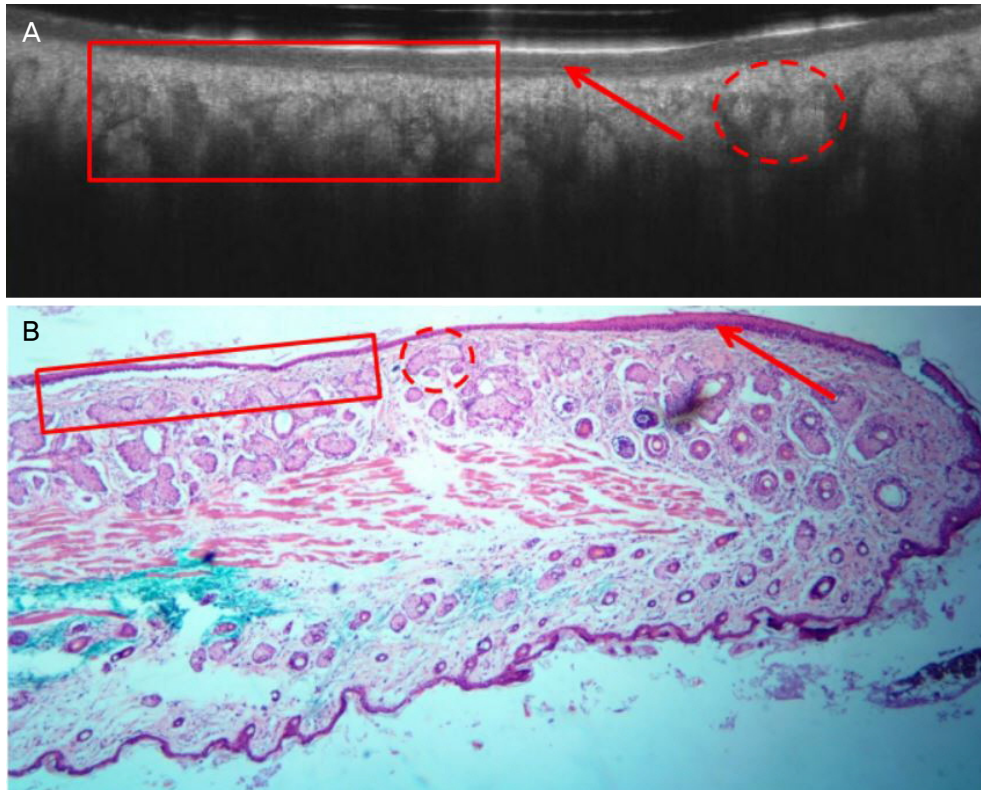


Figure 6. (A) The optical coherence tomography image of Meibomian gland. (B) The microscopic image showing palpebral conjunctiva (arrow), acini (dotted circle) were shown (haematoxylin and eosin, $\times 40$). The rectangular area of (A) corresponds to the rectangular area of (B).

고찰

본 연구에서는 체외 상태에서 쥐의 눈꺼풀을 빛간섭단층촬영으로 촬영하여 눈꺼풀결막, 눈꺼풀판, 표면 쪽의 세엽을 관찰하였으나, 중심관 및 중심관보다 깊은 세엽은 관찰되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 쥐의 마이봄샘을 빛간섭단층촬영을 이용하여 3차원으로 재구성하였을 때 이는 기존 마이봄샘의 구조와 유사하였고, 관찰되는 범위에서 구조물의 단면 및 경계를 명확하게 구분할 수 있었다.

사람의 정상적인 마이봄샘은 소엽(acini), 도관(duct), 개구부(orifice)로 구성되며,⁹ 마이봄샘 구조는 위눈꺼풀과 아래눈꺼풀 사이에 차이점이 존재한다. 위눈꺼풀의 마이봄샘은 평균 31개, 5.5 mm의 길이로 존재하며, 아래눈꺼풀의 마이봄샘은 평균 26개, 2 mm의 길이로 존재한다.¹⁴ 위눈꺼풀은 아래눈꺼풀에 비해 샘의 수가 많고 길이도 길며 전체 용적도 약 2배가량 크다.

예전부터 안과 검사 기기로 마이봄샘을 관찰해보고, 이를 통해 마이봄샘촬영술(meibography)을 개발하거나 임상에 적용하려는 연구들이 많이 진행되었다. 마이봄샘촬영술은 1977년 Tapie¹⁵에 의해 처음 기술되었으나 당시에는 활용이 매우 제한적이었는데, 광원을 안검에 직접 접촉시키고 촬영 시간이 길어 피검자의 불편감이 컸으며 검사에 높은 숙련도가 요구되었다. 이후 2008년에 Arita et al¹⁰이 비접촉 마이봄샘촬영술(non-contact meibomography)을 소개하면서 임상적 활용도가 높아졌다. 비접촉 마이봄샘촬영술은 세극등에 적외선 카메라를 장착하고 적외선 투과필터(transmitting filter)를 이용하였다. 광원을 직접 안검에 접촉시키지 않고 적외선을 안검에 투영하는 비접촉 방식을 사용하여 피검자의 불편함을 줄이고 검사 시간도 단축시키게 되었다.

이어 Hwang et al¹²은 전안부 빛간섭단층촬영을 이용한 비접촉 마이봄샘촬영술(Hosik meibography)을 소개하였는데, 이를 통해 적외선 파장 방식으로 고해상도의 마이봄샘 이미지를 구하였으며 이는 처음으로 빛간섭단층촬영으로 마이봄샘을 단층촬영하였다는 의의가 있다. 이후 Hwang et al¹³에서는 한 단계 나아가 3차원 FD-OCT를 통해 마이봄샘을 3차원으로 구현해보았다.

Liang et al¹⁶에서도 빛간섭단층촬영을 이용한 마이봄샘 촬영술을 시행하여 저분비성 마이봄샘기능장애(obstructive MGD) 환자가 정상인에 비해 마이봄샘의 길이 및 폭이 감소하고 이러한 소견이 환자의 증상이나 임상적인 징후와 연관성이 있음을 보고하였으며, Palamar et al¹⁷은 안구딸기코(ocular rosacea) 환자에서 안구건조증이 유발되거나 마이봄샘이 소실됨을 확인하였다. 또한 Yoo et al¹⁸에서도 상

기 마이봄샘촬영술로 마이봄샘의 소실이 확인된 환자를 3차원 빛간섭단층촬영 이미지와 비교하여 그 일치성을 확인한 바 있다.

마이봄샘의 이미지 구현을 시도한 연구들은 지속적으로 있었으나, 본 연구는 이를 조직검사와 비교하여 빛간섭단층촬영에서 보이는 구조물이 중심관보다 표면에 존재하는 세엽에 국한된 영역임을 처음으로 확인하였으며, 비접촉 방식의 마이봄샘촬영술로 마이봄샘의 일부 영역만 관찰 가능하다는 한계점을 발견하였다는 데에 그 의의를 둘 수 있겠다. 빛간섭단층촬영의 장점으로는 조직검사와는 달리 조직의 변형 없이 원하는 간격으로 단층을 촬영할 수 있으며 동물의 희생, 조직의 고정, 절단, 염색 등의 과정이 필요 없다는 장점이 있다.

푸리에영역 방식의 3차원 빛간섭단층촬영에 기반한 마이봄샘촬영술은 이미 사람을 대상으로 마이봄샘의 구조를 평가한 사례는 있으나,^{13,19} 마이봄샘의 진단과 치료를 보다 자세히 연구하기 위해서는 mouse, rat 등의 동물을 모델로 한 마이봄샘촬영술이 필요할 것으로 사료된다. 본 연구는 죽은 동물을 대상으로 시행되었으며, 이를 기반으로 향후 살아있는 동물을 대상으로 사람에게 시행하기 어려운 안약이나 약물의 효과를 확인하는 효과적인 마이봄샘촬영술 시스템의 개발을 기대해 볼 수 있겠다.

REFERENCES

- 1) Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II definition and classification report. *Ocul Surf* 2017;15:276-83.
- 2) Lemp MA, Crews LA, Bron AJ, et al. Distribution of aqueous-deficient and evaporative dry eye in a clinic-based patient cohort: a retrospective study. *Cornea* 2012;31:472-8.
- 3) Viso E, Gude F, Rodríguez-Ares MT. The association of meibomian gland dysfunction and other common ocular diseases with dry eye: a population-based study in Spain. *Cornea* 2011;30:1-6.
- 4) Tomlinson A, Bron AJ, Korb DR, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the diagnosis subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:2006-49.
- 5) Mathers WD, Daley T, Verdick R. Video imaging of the meibomian gland. *Arch Ophthalmol* 1994;112:448-9.
- 6) Nichols JJ, Berntsen DA, Mitchell GL, Nichols KK. An assessment of grading scales for meibography images. *Cornea* 2005;24:382-8.
- 7) Pult H, Nichols JJ. A review of meibography. *Optom Vis Sci* 2012;89:E760-9.
- 8) Robin JB, Jester JV, Nobe J, et al. In vivo transillumination biomicroscopy and photography of meibomian gland dysfunction. A clinical study. *Ophthalmology* 1985;92:1423-6.
- 9) Yokoi N, Komuro A, Yamada H, et al. A newly developed video-meibography system featuring a newly designed probe. *Jpn J Ophthalmol* 2007;51:53-6.
- 10) Arita R, Itoh K, Inoue K, Amano S. Noncontact infrared meibography to document age-related changes of the meibomian glands in

a normal population. *Ophthalmology* 2008;115:911-5.

11) Arita R, Itoh K, Inoue K, et al. Contact lens wear is associated with decrease of meibomian glands. *Ophthalmology* 2009;116:379-84.

12) Hwang HS, Park CW, Joo CK. Novel noncontact meibography with anterior segment optical coherence tomography: Hosik meibography. *Cornea* 2013;32:40-3.

13) Hwang HS, Shin JG, Lee BH, et al. In vivo 3D Meibography of the human eyelid using real time imaging fourier-domain OCT. *PLoS One* 2013;8:e67143.

14) Kim JH, Ro JW, Yi K, et al. Changes of the meibomian gland according to age in the normal Korean population. *J Korean Ophthalmol Soc* 2015;56:13-8.

15) Tapie R. Biomicroscopic study of the glands of meibomius. *Ann Ocul* 1977;210:637-48.

16) Liang Q, Pan Z, Zhou M, et al. Evaluation of optical coherence tomography meibography in patients with obstructive meibomian gland dysfunction. *Cornea* 2015;34:1193-9.

17) Palamar M, Degirmenci C, Ertam I, Yagci A. Evaluation of dry eye and meibomian gland dysfunction with meibography in patients with rosacea. *Cornea* 2015;34:497-9.

18) Yoo YS, Na KS, Byun YS, et al. Examination of gland dropout detected on infrared meibography by using optical coherence tomography meibography. *Ocul Surf* 2017;15:130-8.e1.

19) Gumus K, Pflugfelder SC. Anterior segment optical coherence tomography (AS-OCT) in the management of dry eye. *Int Ophthalmol Clin* 2017;57:13-22.

= 국문초록 =

쥐에서 마이봄샘의 빛간섭단층촬영 소견과 조직학적 소견의 비교

목적: 쥐에서 마이봄샘(meibomian gland)의 빛간섭단층촬영(optical coherence tomography, OCT) 소견과 조직학적 소견을 비교하여 빛간섭단층촬영에서 보이는 구조물의 조직학적 소견을 확인하고자 한다.

대상과 방법: 쥐 2마리를 대상으로 위눈꺼풀 및 아래눈꺼풀에 대해 일괄절제술(en bloc excision)을 시행한 후 3차원 빛간섭단층촬영(three dimensional OCT, 3D OCT)으로 마이봄샘의 축에 대해 수직으로 스캔하여 3차원 이미지로 재구성하였다. 위 검체를 다시 10% 포르말린에 고정한 다음 H&E 염색을 시행하였다. 빛간섭단층촬영과 조직검사의 소견을 비교하여 빛간섭단층촬영에서 보이는 구조물이 조직학적으로 무엇인지 확인하였다.

결과: 빛간섭단층촬영으로 관찰한 쥐의 마이봄샘에서 세엽(acini)의 표면 쪽은 잘 관찰되었으나, 중심관(central duct) 및 중심관보다 깊은 세엽은 관찰되지 않았다.

결론: 쥐에서 빛간섭단층촬영으로 확인 가능한 마이봄샘의 구조물은 세엽의 표면으로 제한되었으나 체외(ex vivo) 상태에서 재구성한 마이봄샘의 구조는 사람의 마이봄샘과 유사하게 관찰되었으며, 동물에서 생체내(in vivo) 상태의 마이봄샘촬영술(meibography) 시스템의 개발 가능성을 확인하였다.

<대한안과학회지 2020;61(8):849-854>

이승훈 / Seung Hoon Lee
가톨릭대학교 의과대학 안과학교실
Department of Ophthalmology,
College of Medicine, The Catholic
University of Korea

