

# Micro-CT를 이용한 백서 이소골 발생에 대한 연구

한림대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실,<sup>1</sup> 아주대학교 의과대학 이비인후과학교실<sup>2</sup>  
이준호<sup>1</sup> · 정연훈<sup>2</sup> · 박기현<sup>2</sup>

## Study on the Development of the Mouse Ossicles Using Micro-CT

Jun Ho Lee, MD<sup>1</sup>, Yun-Hoon Choung, DDS, MD<sup>2</sup> and Keehyun Park, MD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon; and

<sup>2</sup>Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objectives** : Detailed information on how ossicles change in the developing temporal bone would be helpful in understanding biomechanical knowledge of ossicles. In this study, three dimensional structural images of mouse were investigated through Micro-CT to understand developmental anatomy of its ossicles. **Materials and Method** : Thirty five temporal bones of BALB/c mice, aged from gestational day 11 to postnatal day 21, and adults were investigated. Three-dimensional high-resolution reconstructions of the ossicles of the left sided temporal bones were obtained using a Micro-CT system. The right sided temporal bones were used for the histological study. **Results** : Internal biomechanical characters (volume fraction, structure model index, degree of anisotropy, etc) of murine ossicles and temporal bones were attained to the adult level at postnatal day 21. **Conclusion** : This study will be useful in understanding the more accurate microstructure of murine temporal bone, and will provide the anatomical basis for the future animal studies. (Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2009;52:327-34)

**KEY WORDS** : Ear ossicles · Development · Three-dimensional imaging.

## 서 론

백서의 내이와 중이의 발생에 대한 연구는 부분적으로 발표되어 왔으며, 이전의 이러한 연구들은 현미경하 조직학적 관점에 기인한 보고들이 대부분이며, 측두골에 대한 2차원적인 조직 병리 슬라이드와 외형적 형태로만 진행되어 3차원적인 구조에 대한 기계적 물성을 나타내는 생역학적인 평가에 어려움이 있다.<sup>1-3)</sup> 이러한 연구에 있어서 3차원적 영상을 얻는 것이 중요하여 기존의 여러 시도들이 있었지만,<sup>4,5)</sup> 골 자체의 내부구조와 물리학적 특성과 같은 생역학적 분석에는 한계를 보였다.

Rowley<sup>6)</sup>가 처음으로 Micro-CT를 이용한 이소골의 세부구조의 분석을 시도한 이래로 Micro-CT를 이용한 3차원적 형태에 대한 연구가 이비인후과 분야에서 활발히 접목되고 있는 상황이며,<sup>7,8)</sup> Guldberg 등<sup>9)</sup>은 rat의 골격발생

(skeletogenesis)을 Micro-CT를 이용하여 전체 몸체에 대해 연구한 바 있다.

발생과정 중에서 측두골이 형성되기 시작하는 시기인 임신 11일째부터 성체까지의 조직학적 특성을 보면 임신 11일경에 관찰되는 이소낭(otocyst)은 연조직(precartilage mesenchymal condensations)상태로 나타나게 되며, 이소골은 연골조직으로 성장하다가 태어나기 1일 전인 임신 17일에 측골의 일부에서 골아세포(osteoblast)가 관찰되면서 골화가 시작되어 측골, 침골, 등골 순으로 진행되어 생후 11일에서 17일에 걸쳐 골화가 완성된다.

저자들은 Micro-CT를 이용하여 백서의 이소골 발생에 있어 골 성장과정에 강조점을 두고 골화가 급격히 진행되는 시기인 생후 11일부터 생후 21일까지의 기간 동안의 이소골의 강도 및 생역학을 순차적으로 측정하고 도식화하여 기존의 조직학적 연구와 비교 분석을 시행하였다. 이러한 연구는 기존의 연구에서 보이는 형태학적 연구에 이소골 자체의 기능적인 측면을 접목시킬 수 있어 추후에 활발하게 진행될 이비인후과 영역의 생역학적 연구기반에 기초 자료로 활용하고자 본 연구를 시행하였다.

논문접수일 : 2008년 10월 10일 / 심사완료일 : 2009년 1월 29일  
교신저자 : 박기현, 443-721 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5  
아주대학교 의과대학 이비인후과학교실  
전화 : (031) 219-5266 · 전송 : (031) 219-5264  
E-mail : parkkh@ajou.ac.kr

## 재료 및 방법

### 재 료

본 연구에서는 임신 11일부터 생후 21일까지의 BALB/c 백서를 대상으로 시행하였으며, 성적 발육이 충분한 암컷과 수컷을 함께 두어 교미를 유도한 후 암컷의 질에서 전(plug)이 형성되는 날을 임신 1일째로 계산하는 질전법(vaginal plug technique)을 이용하여 임신 기간을 결정하였다. 기존 연구에서 보여주듯이 백서 측두골의 성장은 조직학적으로는 생후 21일째 성장이 완성되기에 본 연구에서도 표본을 생후 21일째까지 채취하였다.<sup>3,4)</sup>

### 표본제작 및 염색

질전법 방법으로 각각의 임신 날짜를 결정한 뒤 이로부터 11일째부터 백서 태아를 모체로부터 추출하여 절두한 뒤 전두골과 두정골을 잘라 내어 뇌를 제거한 뒤 정중앙을 분리하였다. 이렇게 분리되어진 측두골 전체 표본들을 10% PBS 용액에 섭씨 4도에서 약 7일간 고정하였다. 이와 같이 얻어진 태생기의 시편 8개와 생후 얻어진 시편 21개, 그리고 성체에서 얻어진 시편까지 30개의 조직 중 우측편인 조직들은 조직학적 표본을 제작하였다. 특히 생후에 채취한 조직들 중 골조직이 생성된 표본들은 탈석회화 용액(DE-CAL RAPID, National diagnostics, Atlanta, USA)으로 16시간 동안 탈석회화시켰다. 이후 hematoxylin과 eosin (H & E) 염색을 하여 현미경적 검사를 하였다. 시편 자체의 용적이 미세하기에 채취시 손상을 예방하기 위해 측두골 앞쪽의 골을 제거하고 후두골 일부를 제거하여 Micro-CT로 분석하기 편리하게 시편을 제작하였다. 좌측 측두골은 Micro-CT를 이용하여 검사를 시행하였다.

### Micro CT 촬영 조건

Micro-CT(Skyscan-1072, Skyscan, Belgium)를 이용하여 측두골의 장축에 직각이 되는 2차원 횡단면 영상(이러한 영상은 임상적으로 환자에게 이용되는 측두골 단층촬영 영상 중 coronal view에 해당됨)을 촬영하였다. 이렇게 촬영한 횡단면 영상은 1024×1024의 픽셀로 이루어져 있으며 각각의 픽셀은 실제적으로 백서 측두골에서 13.3×13.3 μm의 면적을 나타내는 크기가 된다. 이러한 2차원 영상을 토대로 각각 측두골의 3차원 구조를 재구성하였는데 이때 이용되는 복셀 크기는 13.3×13.3×13.3 μm이다.

이때 각각의 시편에 대한 비교시 오차가 생기지 않게 하기 위해 촬영시 조건을 일정하게 유지하였는데, 평활, 후정렬, 정중여과, 기하학적 보정을 실행하였고 제도축척, 이중재건은 실행하지 않았으며 신호역치 값은 94, 광선 하더링 보정값은 3, 화상 최소단면 값은 0.014000, 화상 최대단면 값은 0.095000, 색채범위 값은 0, 휘도 값은 127, 명암대비 값은 383으로 정하여 시행하였다.

각각의 측두골 시편으로부터 최저 327장(발생초기)에서 최다 890장(성체)의 횡단면 영상을 약 2시간에 걸쳐 획득하였다.

### 분석 방법

H & E 염색을 한 조직슬라이드와 비교하여 Micro-CT에서 얻어진 정보를 분석하였다. 본 연구에서는 Micro-CT에서 얻어진 측두골의 2차원 영상을 2차원 및 3차원의 구조지수가 자동 계산되는 CT-Analyser™(SkyScan, Belgium)와 Ant™(SkyScan, Belgium)라는 분석 프로그램을 이용하였다.

중이강의 크기변화에 따른 이소골의 골화되는 양상을 순

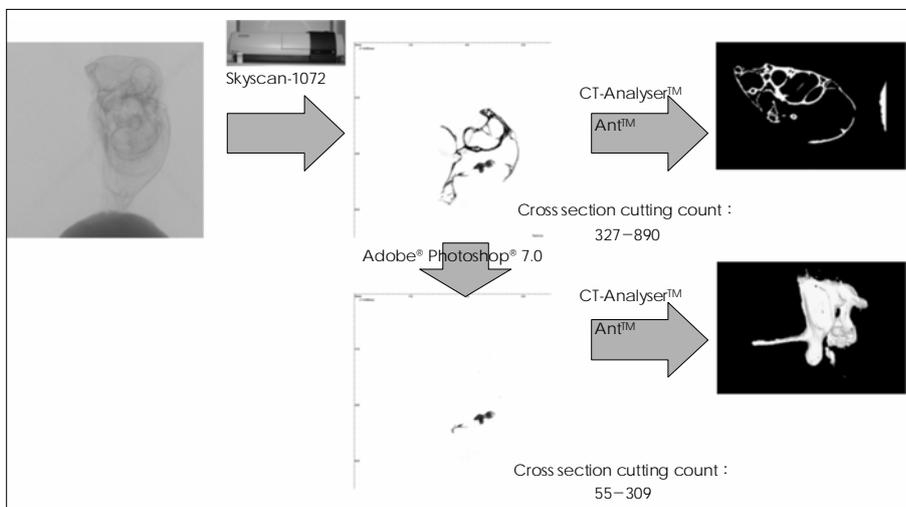


Fig. 1. 3D images of temporal bone and ossicles are reconstructed by CT-Analyser™ and Ant™. Images of ossicles were obtained by erasing unnecessary portions of images on two-dimensional tomograms using Adobe® Photoshop® 7.0.

차적으로 분석하여 성체의 크기로 형성되는 시기와 3차원적인 발생과정을 도식화하였다.

측두골내에 존재하는 이소골의 형상을 구하고 분석하기 위해 각각의 단층사진(tomogram)에서 이소골을 포함한 중이강내의 조직소견을 제외한 나머지 측두골 영상을 Adobe® Photoshop® 7.0 프로그램을 이용하여 제거한 뒤 이소골만을 CT analyser™와 Ant program™을 이용하여 분석하였다(Fig. 1).

성체에서 시행한 이소골 각각 부위에 대한 측정의 척도는 이소골 세부 부위의 서로 만나는 부위 중 가장 급격한 각도를 이루는 곳을 기준으로 하였고, 길이는 장축에서 가장 긴 부위를 측정하였다.<sup>2)</sup>

발생 및 성장 과정에 따른 이소골 내부의 골밀도를 측정하기 위하여 이소골 중 추골의 두부와 침골의 체부에 대한 골 용적의 비율을 계산하여 체적비율(volume fraction, %)로 대변되는 강도를 생후 낳자 순으로 비교하여 변화양상을 구하였다. 특히 발생과정 중 성체 이소골의 강도를 가지게 되는 시기 등을 확인하였다. 체적비율은 기존 연구에서 증명된 척도로 단위면적내에 실질적인 골의 양을 측정하는 것으로 골의 강도를 나타낸다.<sup>9-12)</sup>

추가적으로 각각 이소골의 체적(volume, mm<sup>3</sup>), 표면적(surface, mm<sup>2</sup>), 단위체적당 표면적비(surface/volume ratio, L/mm), 구조형태지수(structure model index, SMI)를 구하여 비교하였다. 구조형태지수는 0~3의 숫자를 이용하여 3차원 구조물이 판형과 막대형 중 어느 구조를 갖는지를 나타내는 척도로 쓰이는데, 값이 클수록 막대형 구조를 나타낸다.

성장에 가면서 일정한 형태의 구조로 변화가 일어나는지

를 알아보기 위해 이소골 전체와 이소골 내부 구조에 대한 이방성의 정도(degree of anisotropy, DOA)와 구조형태지수를 구하였다. 이러한 자료는 이소골의 골 형성 과정에서 성체화 되어가는 데 있어 기능적, 물리적 성향을 분석할 수 있는 장점이 있다(Fig. 2).

내부 구조의 특성을 분석하기 위해서는 Micro-CT상에서도 일정 크기 이상이 되어 2차원 단층사진이 여러 장 이상 필요로 하지만, 백서 등골인 경우 크기가 작아 이 조건을 충족하지 못해 이번연구에서 제외하였다.

## 결 과

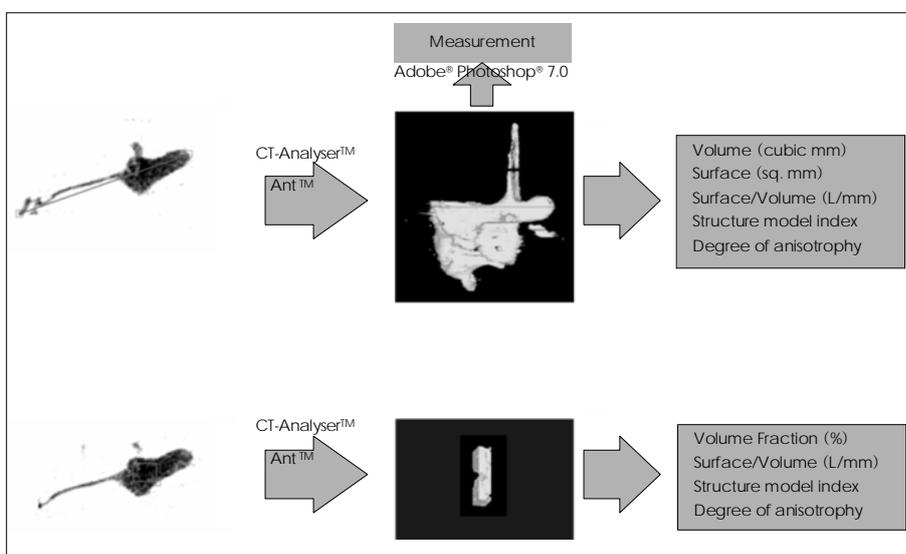
### H & E 염색에 의한 이소골 발생과정 분석

임신 8일째 이판(otic placode)이 형성된 뒤 10일째 완전한 이소골모양으로 모양을 갖춘 뒤 태어날 때까지 이소골은 미세한 부분만 골화가 형성되고 대부분은 연골형태로 남아 있었다.

생후 9일째까지 연골형태로 유지되던 이소골은 생후 11일째부터 추골, 침골, 등골 순으로 골화가 활발히 진행되는 것을 알 수 있으며, 21일째에는 성체와 거의 같은 모양을 유지하고 있었다. 생후 21일째와 비교하여 성체 이소골은 내부에 혈관, 신경, 결체조직들로 구성된 하버스관(Haversian canal)의 비중이 커져 있음이 관찰되었다(Fig. 3).

### 백서 측두골의 전체적인 영상

태생기부터 생후 7일째까지의 시편은 Micro-CT를 사용하여 관찰한 결과 아직 경골화가 되지 않은 상태이기에 주변 연조직과의 경계가 불분명하고 스캔하였을 때 일정부



**Fig. 2.** Microstructural analysis of ossicles by CT-Analyser™ and Ant™. The volume fraction (Surface/Volume) means bony strength. Structure model index makes it possible to quantify the characteristic form of a three-dimensional structure as rod-like or plate-like. Degree of anisotropy means directional pattern of three-dimensional structure.

백서 이소골 발생

본의 위축이 생겨 분석이 불가능하였으며, 생후 9일째 시편은 7일째와는 다르게 경골화가 어느 정도 진행되어 측두골의 형상을 유지하고 있는 것을 알 수 있으나 이소골과 같은 세부구조는 파악할 수 없었다. 본 연구에서 Micro-CT를 이용한 분석은 이소골의 세부구조의 파악이 가능한 생후 11일째부터 성체까지의 시편을 이용하였다.

Micro-CT를 이용하여 각각 측두골의 2차원 단층사진 영상을 구한 뒤, 측두골의 3차원적 구조를 재구성하여 영상으로 구할 수 있는데, 측두의 미세한 구조뿐 아니라 원하는 부위의 내부 구조까지도 지정하여 분석할 수 있었다.

생후 9일 시편에서 측두골이 비특이적으로 일정부위에서만 Micro-CT에서 골로 인식되어 있는 것을 알 수 있으며, 성장하면서 측두골의 형태를 점점 갖추다가 17일경에 성

체의 모습으로 인식되어지는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

중이강의 계측

생후 11일부터 성체까지 중이강 구조 중 장축의 길이, 그리고 이러한 축에 수직이 되는 면에서 장축과 여기에 직각축 중 가장 긴 것을 측정하여 중이강내의 부피가 성체로 갈수록 증가되는 것을 알 수 있었다. 특기할 점은 이소골 증추골의 골화되는 부위가 증가되는 속도보다 중이강내의 성장속도가 더욱 빨라 중이강 장축에 대한 추골의 골화되는 부위의 비율은 성체로 갈수록 감소가 되었다(Table 1). 이와 같은 결과는 생역학적 의미를 나타내진 않지만 이소골의 발생 및 성장이 완성된 이후에도 지속적으로 중이강이 확장됨을 알 수 있다.

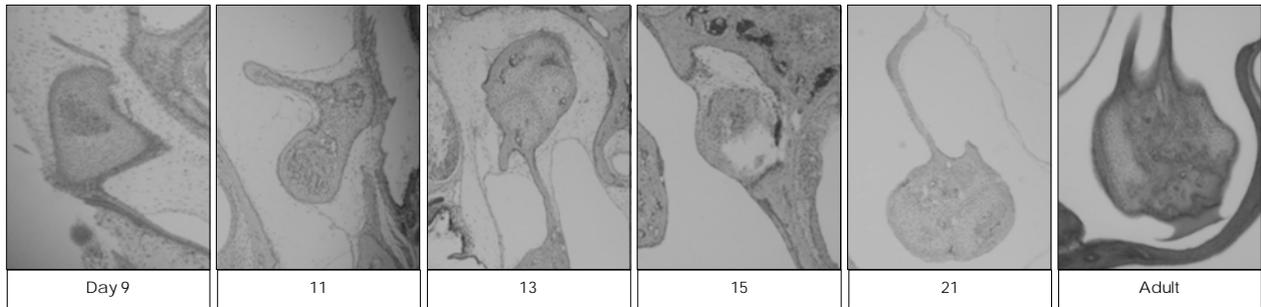


Fig. 3. Ossicular development according to age (malleus). Ossification appeared from postnatal day 11, and Harvesian canal of adult ossicle was abundant compared with day 21 (H & E stain × 40).

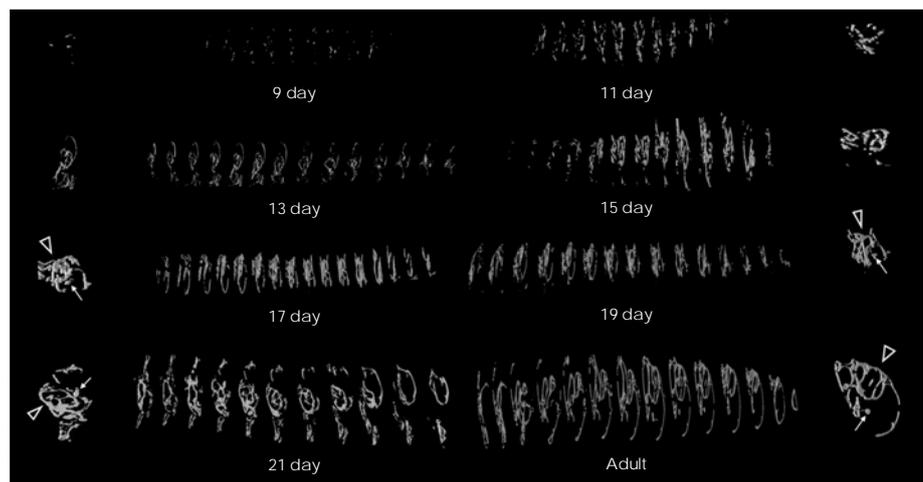


Fig. 4. The picture of temporal bones shows the internal bony structure. Ossicles (white arrow) and inner ear structure (white arrowhead) were detected since postnatal 17 day.

Table 1. Growing pattern of the middle ear cavity size. The growth velocity of middle ear cavity (bullae) was faster than that of ossicles (postnatal day)

|  | 11 days | 13 days | 15 days | 17 days | 19 days | 21 days | Adult |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| Long axis length (mm)                                  | 2.525   | 2.643   | 3.299   | 3.854   | 3.987   | 5.894   | 7.528 |
| Short axis length (mm)                                 | 1.648   | 1.741   | 1.980   | 2.060   | 2.180   | 3.296   | 3.579 |
| Width (mm)   | 1.600   | 1.654   | 1.701   | 1.765   | 1.941   | 3.073   | 3.227 |
| Malleus ossification total length/long axis length (%) | 25.2    | 24.1    | 23.1    | 20.5    | 20.4    | 19.1    | 14.9  |

성장과정 중 이소골들의 면적, 체적, 이방성의 정도와 구조형태지수

측두골 전체의 영상을 구할 때와 마찬가지로 이소골의 골화되는 정도를 파악하기 위해 2차원 단층사진을 이용하여 3차원 재구성을 시행하였다(Fig. 5).

11일경부터 연골로 형성되어 있는 추골과 침골의 일부 부위에서 골화된 부분이 나타나는 것을 알 수 있으며 19일 경에는 골화된 모양이 성체와 흡사해진다. 성체 추골의 모양은 사람 추골과는 다른 양상을 보이는 데 두부의 대부분이 매우 얇은 막성골(두께 : 0.027 mm)로 형성되어 있다

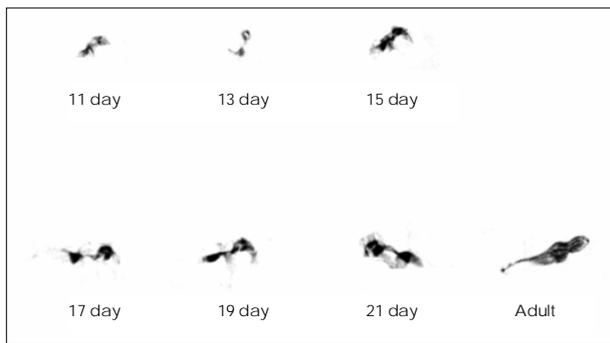


Fig. 5. Two dimensional tomogram of ossicles.

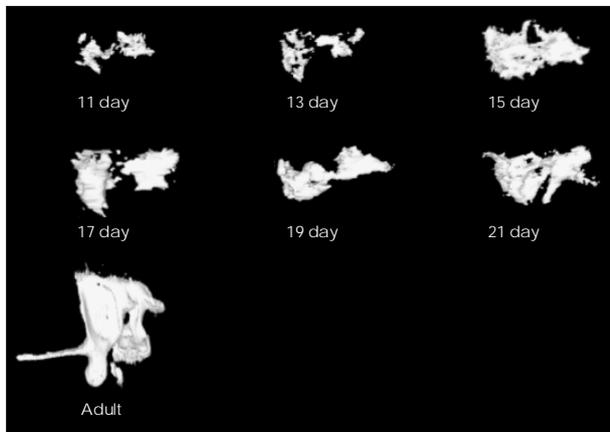


Fig. 6. Ossification pattern of ossicles during development.

(Fig. 6).

여기에서 얻어진 영상에 대한 단위체적당 표면적비(surface/volume) 값을 구할 때에 11, 13일경이 15, 17, 19일 보다 단위체적당 표면적비 값이 높게 나타난 이유는 골의 성숙이 미흡하고 연골로 되어 있는 발생기의 이소골과 주변조직과의 컴퓨터상의 대비(contrast)가 낮아 단위체적에 대한 면적이 크기 때문으로 사료된다.

11일부터 21일까지 성장하는 과정에서는 이소골들의 체적과 면적이 증가하는 양상을 보이고 있으며, 성체로 완성 되면 골내에 골소주 형성(trabecular formation)의 비중이 커지기 때문에 전체적인 부피는 줄어들고 측정되는 면적은 증가하는 양상을 보이고 있다(Table 2).

추골, 침골, 등골 전체는 성장해 가면서 구조형태지수는 17일경까지는 계속 일정하게 유지되다가 19일경부터 증가되는 것을 보이며 21일경에 성체 수준에 도달하였다. 이방성의 정도는 성장과정에 따른 특별한 양상을 보이지 않는다. 이방성의 값이 클수록 시편자체가 일정방향을 가지게 되는 것을 나타내는데 본 연구의 시편은 추골과 침골을 같이 분석하였기 때문에 성장과정 중 일정방향으로 배열되지 않는 것으로 사료된다. 구조형태지수는 값이 올라갈수록 검사를 받는 시편이 막대형 구조로 되어 있음을 나타내는 것으로 날수가 증가할수록 막대형 구조로 변화되고 있음을 시사한다. 이소골이 발생 이후 성장해 가면서 성체와 같은 막대형 구조로 변형되는 것을 알 수 있다.

발생과정에 따른 추골과 침골 내부의 특성 변화

추골과 침골 모두 생후 21일경에 성체의 체적비율에 근접하는 양상을 보였으며 특히 기능적인 측면을 볼 때 생후 15일경에 이소골의 체적비율, 즉 골의 강도가 급격히 증가 되는 것을 알 수 있다. 생후 21일이 성체보다 더 높게 체적비율이 측정되는데 이는 성체화가 되어가면서 이소골 내부에 하버스관의 발달이 진행되기 때문으로 사료된다.

검사하는 시편의 전체용적에서 골의 표면적을 구하는 값

Table 2. Parameters of ossicles according to the age structure model index of ossicles

| Age    | Parameter | Volume (mm <sup>3</sup> ) | Surface (mm <sup>2</sup> ) | S/V    | DOA   | SMI   |
|--------|-----------|---------------------------|----------------------------|--------|-------|-------|
| Day 11 |           | 0.034                     | 2.164                      | 63.223 | 0.909 | 2.115 |
| Day 13 |           | 0.041                     | 2.548                      | 61.503 | 0.979 | 2.048 |
| Day 15 |           | 0.088                     | 2.791                      | 31.849 | 0.976 | 2.064 |
| Day 17 |           | 0.151                     | 3.847                      | 25.420 | 0.989 | 2.258 |
| Day 19 |           | 0.168                     | 5.518                      | 32.877 | 0.923 | 2.474 |
| Day 21 |           | 0.214                     | 5.743                      | 26.786 | 0.954 | 2.806 |
| Adult  |           | 0.186                     | 7.462                      | 40.200 | 0.946 | 2.872 |

Density window value : minimum 3-maximum 255. S/V : surface/volume, DOA : degree of anisotropy, SMI : structure model index

**Table 3.** Parameters of internal characteristics in malleus according to age

| Parameter | Volume fraction | CSC | S/V (L/mm) | SMI   | DOA   |
|-----------|-----------------|-----|------------|-------|-------|
| Day 11    | 8.187%          | 11  | 38.462     | 0.890 | 0.473 |
| Day 13    | 16.311%         | 36  | 28.760     | 2.113 | 0.724 |
| Day 15    | 39.466%         | 37  | 59.380     | 2.199 | 0.985 |
| Day 17    | 62.302%         | 24  | 44.511     | 1.656 | 0.907 |
| Day 19    | 92.847%         | 27  | 39.158     | 1.470 | 0.938 |
| Day 21    | 94.227%         | 25  | 45.836     | 1.800 | 0.922 |
| Adult     | 89.475%         | 37  | 84.619     | 1.115 | 0.491 |

Density window value : minimum 3-maximum 255. CSC : cross section count, S/V : surface/volume, SMI : structure model index, DOA : degree of anisotropy

**Table 4.** Parameters of internal characteristics in the incus according to age. The growing pattern was similar to malleus

| Parameter | Volume fraction | CSC | S/V (L/mm) | SMI   | DOA   |
|-----------|-----------------|-----|------------|-------|-------|
| Day 11    | 8.305%          | 13  | 36.581     | 0.952 | 0.463 |
| Day 13    | 29.928%         | 17  | 24.597     | 2.308 | 0.816 |
| Day 15    | 31.666%         | 18  | 62.675     | 2.299 | 0.912 |
| Day 17    | 52.230%         | 25  | 67.657     | 1.969 | 0.995 |
| Day 19    | 91.086%         | 12  | 34.253     | 2.003 | 0.999 |
| Day 21    | 94.305%         | 14  | 33.624     | 1.571 | 0.978 |
| Adult     | 90.349%         | 44  | 58.919     | 0.874 | 0.449 |

Density window value : minimum 3-maximum 255. CSC : cross section count, S/V : surface/volume, SMI : structure model index, DOA : degree of anisotropy

인 surface/volume 값은 13일경까지 높게 유지되며 15일 이후 급격히 감소하였다가 21일경에 증가하는 추세로 돌아서서 성체로 진행되면서 증가하게 된다. 이는 13일경까지는 경골화가 되지 않는 연골조직이 많이 유지되다가 15일경 경골화가 된 뒤 21일경부터 이소골 내부에 이소골에 필요한 혈관, 미세한 신경, 그리고 결체조직을 함유하고 있을 것으로 생각되는 빈 공간인 하버스관의 형성이 활발하게 진행되기 때문으로 사료된다.

이전까지는 구조형태지수도 성장해 가면서 계속적으로 증가되다가 생후 21일경부터 급격하게 줄어드는 것을 알 수 있는데 이는 이소골 내부가 조밀한 골로 유지되다가 21일경부터 삼유주(trabecula) 양상으로 변화되면서 판형 구조로 변화되는 것으로 볼 수 있다(Table 3 and 4).

## 고 찰

측두골의 내부구조에 대한 연구와 발생과정에 대한 연구는 현재 이비인후과적인 영역에서는 초기 단계이며, 특히 3차원적인 구조에 대한 연구는 시행되지 않은 실정이다. 이전의 연구를 살펴보면 광학현미경 하에서 사람 측두골의 발생에 따른 크기변화를 측정한 연구들이 있으며, 이때 사용되어진 측정기구는 현미경하에서 격자문양이 있는 측정기구를 이용하여 분석되었다.<sup>13-15)</sup> 이와 같은 방식은 0.01 mm

의 단위까지 측정이 가능하나 시편을 파라핀으로 고정할 때 발생하는 일정부분의 변형이나 측정시 검사자에 따른 오차가 생길 수 있지만 무엇보다 시편을 고정시킨 파라핀을 절단할 때 기준을 일정하게 잡을 수 없기에 3차원적으로 형성되어 있는 구조를 2차원적으로 분석한다는 것은 한계가 있으며, 이소골 같은 경우는 3차원적으로 각각의 이소골이 서로 연관되어 있어 조직 슬라이드상으로는 정확한 모양 및 서로의 연관관계 등을 파악하는 것은 불가능한 일이다. 또한 2차원 영상인 조직 슬라이드나 CT, MRI에서 3차원 영상을 재구성해주는 알고리즘이 개발되어 원하는 작업을 할 수 있게 되었지만 세밀도가 떨어지고 지루한 작업을 장시간 수행하는 것이 어려운 점으로 지적되고 있다.<sup>16,17)</sup>

측두골의 3차원 구조에 대한 연구들을 보면 Park 등<sup>4)</sup>은 조직학적 절편을 이용하여 컴퓨터 그래픽을 이용하여 wire-frame 3D reconstruction을 하여 백서의 발생과정에 따른 중이강 및 이관의 체적을 구하였으며, 또한 Micro-CT를 이용하여 사람 이소골의 3차원적 구조에 대해 연구하였다.<sup>8)</sup> Morsli 등<sup>18)</sup>은 발생 10.25일부터 17일까지의 백서의 내이강 내에 염색액을 채워 넣어 내이강의 발생과정을 도식화하였다. 특히 박 등<sup>4)</sup>의 연구에 의하면 tubotympanic recess의 용적은 임신 15일째와 생후 11일째부터 생후 15일째까지 급격한 변화를 보이고 21일째 성체 크기에 도달하는 것을 알 수 있어 본 연구에서도 이 기간 동안(임신 11일부터

생후 21일)의 시편을 가지고 이소골의 발생과정을 분석하였다.

최근 개발된 Micro-CT는 용적이 적은 시편도 고해상도로 분석할 수 있는 비파괴 검사장비로써, mm 단위의 시편을  $\mu\text{m}$  단위로 2차원 횡단면을 촬영하고, 3차원 재구성을 통해 이소골의 3차원 입체구조를 영상화할 수 있어 손쉽게 구조적인 분석을 가능하다. 이러한 미세단층촬영기(micro-tomography)로부터 직접 시편의 2차원 및 3차원 구조의 분석이 단시간내에 시행될 수 있다. 임상에서 사용되는 단층촬영기의 최고해상도는 1~2.5 mm에 불과하나 본 연구에 사용된 미세단층촬영기는 fan-beam microfocus X-ray tube를 이용하기 때문에 최고 해상도가 5~8  $\mu\text{m}$ 까지 가능하다.

본 연구에서는 Micro-CT를 이용하여  $\mu\text{m}$  단위로 시편을 분석한 뒤 디지털화된 자료를 컴퓨터에서 계측을 하였으며, 이 자료는 저장되어 추후 다른 방향의 연구에도 계속적인 활용이 가능한 장점을 지니게 되었다. 이러한 새로운 방식의 도입은 전자재료공학, 의용공학, 지질학, 건축재료학, 보석감정 등 주로 비파괴적 검사를 필요로 하는 분야에서, 의학 분야에서는 정형외과와 구강외과에서 활발히 진행되고 있다.<sup>10,11)</sup> 또한 시편에 조작을 가하지 않는 비파괴 촬영장비이기 때문에 Micro-CT를 이용한 분석 후, 시편은 절단하여 병리조직 슬라이드를 만들어 서로 비교할 수 있는 장점이 있다.

Park 등<sup>4)</sup>의 연구에서 보면 측두골의 성장과정 중 생후 11일째 중이강내 간엽조직이 사라지기 때문에 중이강 용적이 급격히 성장하게 되고 이는 15일 때까지 진행하게 되면서 생후 21일 때에는 중이강의 용적이 성체사이즈(0.007 mL)에 도달하게 되는 것을 알 수 있다. 이와 같은 결과를 토대로 본 연구에서도 측두골내 구조가 성체화되는 시기를 생후 21일로 정한 뒤 연구를 시행하였다.

시편이 한 개밖에 되지 않아 백서 이소골의 평균값을 대변할 수는 없지만, 이소골 각각의 부위에 대한 정확한 계측이 가능하였다. 특히, Huangfu 등<sup>3)</sup>의 현미경을 이용한 이전의 백서 중이강내의 연구에서 보여진 이소골의 레버비는 분만하는 시기부터 성체에 이르기까지 커다란 변화없이 일정하게 M1/I1은 0.97 : 1, M2/I2는 2.01 : 1의 비율을 유지한다고 하였다. 백서의 이소골은 사람과는 틀린 구조이기 때문에 임피던스 변압에 중요한 추골과 침골의 비율은 추골과 침골에서 형성되어지는 2개의 축을 중심으로 2개의 비율로 구성되는데, 본 연구에서 성체의 레버비는 M1/I1은 1.145, M2/I2는 1.341로 M2/I2에서는 기존의 현미경하 측정방법의 결과와는 차이가 있는 것으로 보인다.<sup>3,8)</sup>

사람에서 측두골 및 고막의 발생은 이미 임신 4주에 발생

이 시작되는 것을 현미경상에서 구별할 수 있으며 임신 31주가 되어서야 측두골의 각각의 구획이 서로 융합을 하기 시작한다. 측두골의 고막틀 부분(tympanic part)은 출생시에도 계속 진행되어 3세가 되어서야 성인의 모양을 갖추게 되며, 이소골은 임신 15주경부터는 연골화된 조직에 골화가 시작되어 25~26주에는 추골병의 끝부분 일부를 제외한 모든 이소골에 골화가 완성되며, 출생시에는 외형이 성인과 거의 같아지게 된다.<sup>15)</sup> 본 실험에 이용된 백서와 유사종인 비단털쥐의 경우에는 임신 11일에 연조직(precartilage mesenchymal condensations)상태로 나타나게 되며 태어나기 1일 전인 15일에 추골의 일부에서 골아세포(osteoblast)가 관찰되면서 골화가 시작되어 추골, 침골, 등골 순으로 진행되어 생후 11일에서 17일에 걸쳐 골화가 완성된다. 이러한 과정과 더불어 중이강내의 간엽조직은 흡수가 진행되어 생후 15일경에 거의 사라지게 된다. 백서를 이용한 본 연구에서는 골화가 진행되는 양상은 H & E 염색을 통한 현미경 검사상 9일경까지는 이소골 중 일부 부위에서만 골화된 조직이 관찰되다가 11일경부터 추골, 침골, 등골 순으로 각각 이소골의 전반적인 부분에서 골화가 완성되어가는 모습을 확인할 수 있었다.

Sarrat 등<sup>2)</sup>이 사람 이소골에서 Martin's trichrome 염색을 시행하여 fuchsinophil lamella bundles의 방향을 도식화하였는데 이는 외부의 음압이 이소골로 전달될 때 이소골내에서 압력이 전달되는 양상을 보여준다.

이 염색법에 의하면 추골과 단각을 제외한 침골, 그리고 족관을 제외한 등골의 장축에 평행하게 외부의 압력이 전달되는 것을 알 수 있는데 본 연구에서도 이와 같은 방향으로 방향성이 발생해 가면서 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

이방성(anisotropy)이란 방향에 따라 물성이 다른 현상이다. 그러므로 방향성이란 외부에서 받는 힘에 주로 버티는 방향으로 늘어서는 것이라 할 수 있다. 이방성의 정도(degree of anisotropy)는 이방성의 강도를 나타내는 지수로서 이 수치가 크면 한 방향에 대한 물성이 크다고 말할 수 있다. Hildebrand 등<sup>12)</sup>의 보고에 의하면 구조형태지수(structure model index, SMI)는 0~3의 숫자를 이용하여 3차원 구조물이 판형과 막대형 중 어느 구조를 갖는지를 나타내는 척도로 쓰이는데, 값이 클수록 막대형 구조를 나타낸다. 본 연구에서는 이소골들의 이방성의 정도와 구조형태 지수의 차이를 분석해보면 막대형 구조이면서 한 방향으로 늘어선 것을 확인할 수 있었다.

유양돌기는 사람인 경우 태생기 3~7개월에 중이강을 채우고 있던 간엽조직이 점점 흡수된 후 생후 태아가 호흡할 때 공기가 이관을 통하여 고실로 들어감에 따라 합기화가

시작되며 4~5세에 성인과 같은 함기봉소가 이루어지며 15세에 완전히 발육한다. 백서에서는 21일째 중이 및 내이같은 경우 성체화가 된 것으로 보지만 측두골의 함기봉소가 21일째 관찰되지 않는 것으로 보아 이후에 함기화가 되는 것으로 보인다. 또한 사람의 유양돌기와 같은 구조를 가지고 있지 않으며 내이의 와우 주변에서 시작되어 중이강의 한쪽 면에 국한되어 함기봉소가 존재함을 확인할 수 있었다.

## 결 론

Micro-CT를 이용한 연구는 측두골과 같은 미세구조를 3차원적으로 재구성하여 영상으로 구할 수 있으며, 외부표면의 미세한 구조뿐 아니라 원하는 부위의 내부 구조까지도 지정하여 분석할 수 있다. 이러한 장점과 현미경 하에서 관찰되는 조직학적 소견보다 더욱 세밀한 분석이 가능하며, 구조적인 부분 이외에 기능적인, 특히 생역학적인 분석이 가능하다는 것은 큰 장점이라 할 수 있다.

본 연구의 결과를 종합해보면 백서 이소골의 발달에 있어 생역학적으로 성체화되는 시기는 생후 21일째로, 기존의 연구에서 보여지는 형태학적으로 성체화되는 시기와 동일한 것을 알 수 있다. 본 연구에서 구해진 Micro-CT를 이용한 백서 측두골의 생역학적 구조분석은 기존의 사람 측두골에 대한 Micro-CT를 이용한 연구와 더불어 중이강내의 이소골 및 주변 측두골의 골 형성의 양상과 골 성장 과정의 이해에 큰 도움이 될 것이며, 아울러 추후에 인간 태아의 측두골의 발생과정에 대한 연구에 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

아울러 이와 같이 컴퓨터를 이용한 3차원 영상을 얻는 것은 앞으로 발생 해부에 관한 더욱 가치있는 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

중심 단어 : 이소골 · 발생 · 미세단층촬영.

## REFERENCES

- 1) Schuknecht HF. *Pathology of the ear*. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger;1993. p.31-3.
- 2) Sarrat R, Torres A, Guzman A, Lostalé F, Whyte J. *Functional structure of human auditory ossicles*. *Acta Anat (Basel)* 1992;144 (3): 189-95.
- 3) Huangfu M, Saunders JC. *Auditory development in the mouse: Structural maturation of the middle ear*. *J Morphol* 1983;176 (3):249-59.
- 4) Park K, Lim DJ. *Luminal development of the eustachian tube and middle ear: Murine model*. *Yonsei Med J* 1992;33 (2):159-67.
- 5) Han DH, Won JH, Lee S, Kim HJ. *Three-dimensional computer-aided reconstruction of the temporal bone in Mongolian Gerbil*. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2005;48 (11):1323-8.
- 6) Hadlock TA, Ferraro NF, Rahbar R. *Acute mastoiditis with temporomandibular joint effusion*. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;125 (1): 111-2.
- 7) Jacob A, Chole RA. *Survey anatomy of the paranasal sinuses in the normal mouse*. *Laryngoscope* 2006;116 (4):558-63.
- 8) Park K, Moon SK, Lee JH, Won YY, Baek MH. *Study on the three dimensional structure of the human ossicle using Micro CT*. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2003;46 (4):276-81.
- 9) Guldberg RE, Lin AS, Coleman R, Robertson G, Duvall C. *Microcomputed tomography imaging of skeletal development and growth*. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004;72 (3):250-9.
- 10) Ding M, Odgaard A, Hvid I. *Accuracy of cancellous bone volume fraction measured by micro-CT scanning*. *J Biomech* 1999;32 (3):323-6.
- 11) Giesen EB, van Eijden TM. *The three-dimensional cancellous bone architecture of the human mandibular condyle*. *J Dent Res* 2000;79 (4):957-63.
- 12) Hildebrand T, Ruesgesser P. *Quantification of bone microarchitecture with the structure model index*. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 1997;1 (1):15-23.
- 13) Swarts JD, Rood SR, Doyle WJ. *Fetal development of the auditory tube and paratubal musculature*. *Cleft Palate J* 1986;23 (4):289-311.
- 14) Luntz M, Sadé J. *Growth of the eustachian tube lumen with age*. *Am J Otolaryngol* 1988;9 (5):195-8.
- 15) Ars B. *Organogenesis of the middle ear structures*. *J Laryngol Otol* 1989;103 (1):16-21.
- 16) Harada T, Ishii S, Tayama N. *Three-dimensional reconstruction of the temporal bone from histologic sections*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;114(10):1139-42.
- 17) Mori K, Naito Y, Hirono Y, Honjo I. *Three-dimensional computer graphics of the eustachian tube*. *Am J Otolaryngol* 1987;8 (4):211-3.
- 18) Morsli H, Choo D, Ryan A, Johnson R, Wu DK. *Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs*. *J Neurosci* 1998;18 (9):3327-35.