

생체 내에서 배양한 각막윤부 상피세포 이식술의 장기 경과 관찰 결과

천현철 · 신동민 · 이동준 · 박우찬

동아대학교 의과대학 안과학교실

목적 : 각막윤부 결핍증을 치료하기 위하여 생체 내에서 배양된 각막윤부 상피세포 이식술을 각막윤부 결핍증 환자에게 시행한 후, 이식된 세포의 성상을 압흔 세포진단 검사(impression cytology)를 시행하여 장기적으로 알아보고자 하였다.

대상과 방법 : 재발성 군날개, 화학 화상, 거짓군날개 등 각막윤부 결핍증으로 진단되어 생체 내 배양한 각막윤부 상피세포 이식술을 시행받은 환자 22명 22안을 대상으로 하여, 일주일동안 생체 내 각막윤부 상피세포를 배양한 양막을 부분 생검하여 배양결핍 부위에 이식한 지 1주, 3개월, 6개월, 1년째에 압흔 세포진단 검사로 세포를 채취하고 Periodic Acid-Schiff 염색 및 각막상피와 결막상피에 대한 면역조직화학 염색을 통해, 배양되어 이식된 상피세포의 성상을 알아보았다.

결과 : 생체 내 배양된 각막윤부 상피세포 이식술 후 1주, 3개월, 6개월, 1년째까지 압흔 세포진단검사 결과, 이식된 각막상피세포가 그 성상을 잘 유지하고 있었다.

결론 : 생체 내에서 배양된 각막윤부 상피세포 이식술은 압흔 세포진단 검사를 통한 추적검사 결과, 1년까지 각막상피세포의 성상을 잘 유지하고 있었고, 임상적으로도 재발이 적으며 미용적으로도 우수한 결과를 보여주는 치료법으로 생각된다.

〈한안지 49(3):415-424, 2008〉

각막윤부에 존재하는 각막상피 줄기세포는 평생 동안 자가분열을 하며 지속적으로 탈락되는 각막상피를 공급하고 재생시키는 중요한 역할을 담당하고 있다.^{1,2} 스티븐스존슨 증후군, 화학손상이나 광범위한 재발성 군날개 등과 같은 각막윤부 결핍증시 결막 상피세포에 의한 각막표면의 결막화(conjunctivalization)가 발생하며 각막신생혈관, 만성염증, 섬유화 증식으로 인해 각막이 불투명하게 되면서 심한 눈부심을 동반하고 설명하게 된다.^{3,4} 단안의 부분 각막윤부 결핍증(partial limbal stem cell deficiency)의 경우 Kenyon

and Tseng⁵은 자가 각막윤부를 일부 떼어내 이식하는 자가 각막윤부이식술을 보고하였으나 각막윤부를 크게 떼 수 없는 단점이 있다. 양안의 전체 각막윤부 결핍증인 경우에는 기증안구에서 각막윤부를 떼어 이식하는 동종각막윤부 이식술이 시행되고 있다. 이 수술은 우리나라 실정상 각막을 기증하는 헌안자가 적고, 이식후 부적합에 의한 거부반응이 발생할 확률이 높으며 이를 억제하기 위한 cyclosporin 같은 고가의 항대사제를 평생 동안 복용해야 하는 어려움이 있다.

최근 양막(amniotic membrane)에 세포를 배양하면 배양된 세포의 특성이 잘 유지된다는 점에 착안하여, 줄기세포를 포함하고 있는 각막윤부조직을 실험실에서 양막에 배양하는 *ex vivo* expansion culture가 개발되었고 이를 각막윤부 결핍증 환자에게 이식하는 수술이 시행되고 있다.⁶⁻⁹ 그러나 이러한 *in vitro* 배양은 배양시 오염, 배양에 필요한 실험기구 및 장비, 인력확보에 따른 문제점과 이식된 각막상피세포에 대한 거부반응 등의 단점이 있다.

이런 단점을 보완하기 위해 Lee and Park¹⁰은 각막에 양막을 이식하여 윤부각막상피세포를 배양하는

〈접수일 : 2007년 3월 30일, 심사통과일 : 2007년 9월 4일〉

통신저자 : 박 우 찬
부산시 서구 동대신동 3가
동아대학교병원 안과
Tel: 051-240-5227, Fax: 051-254-1987
E-mail: wcpark@dau.ac.kr

* 본 논문의 요지는 2006년 대한안과학회 제96회 추계학술대회에서 구연으로 발표되었음.

limbal epithelial cells cultivated *in vivo* on amniotic membrane (LIVAM) technique을 고안하였고 가토를 이용한 실험에서 양막 위로 자란 상피가 각막윤부에서부터 분화한 각막상피임을 면역조직염색 및 전자현미경검사를 통해 증명하였다. 이에 본 저자는 LIVAM technique을 실제 임상적으로 각막윤부결핍증 환자에게 적용하여 생체 내에서 양막 위에 각막상피세포를 배양한 후 윤부결핍 부위에 이식하여 그 임상 결과와 압흔 세포검사법(impression cytology)를 이용하여 배양 후 이식된 세포의 성상을 조사해보고자 하였다.

대상과 방법

양막을 이용하여 생체 내 배양한 각막윤부 상피세포 이식술을 시행한 환자 22명 22안을 대상으로 하였다. 대상 환자는 남자 18명, 여자 4명이었고, 평균연령은 43.6세였다. 원인 질환으로 재발성 군날개 10안, 거짓 군날개 5안, 단순 군날개 1안, 화학적 손상으로 인한 각막 윤부 결핍증이 6안이었다.

각막윤부 상피세포를 *in vivo* 배양하기 위하여 먼저 정상 각막윤부에서 약 2 mm 떨어진 안쪽으로 No. 15 Bard-Parker blade를 이용하여 각막 상피를 제거하여 인위적인 각막상피 결손을 만든 후, 그 위에 각막상피 결손부위보다 약간 작게 양막을 재단하였고, 양막 기저막이 위로 향하게 하여 결막 결손 부위에 올린 후 10-0 nylon으로 연속 봉합하였다. 이때 양막은 25% Alcohol을 사용하여 양막 상피를 제거한 후 사용하였다. 일주일간 보호용 콘택트렌즈를 씌우고 압박안대를 시행했으며, 형광염색약을 이용하여 양막 위로 상피세포가 배양된 것을 확인하였다. 이후 생체 내 각막윤부 상피세포가 배양된 양막 이식술을 위해, 배양된 양막을 주의하여 떼어내었고, 각막윤부 결손 부위에 자라들어온 증식성 섬유혈관화 조직을 광범위하게 제거한 후, 노출된 공막 부위는 일반 양막으로 기저막이 위로 향하게 하여 덮고 10-0 nylon으로 단속 봉합하였다. 그리고 떼어낸 상피세포가 배양된 양막을 윤부 부위에 올린 후 10-0 nylon으로 단속 봉합하였다.

1. 양막에 배양된 상피세포의 특성 검사

가. 조직 검사

인위적으로 만든 각막상피결손 위에 양막을 이식한 후 1주째에 생체형광염색을 통해서 양막 위로 상피가 자라들어온 것을 확인하고, 자가이식을 위해 상피세포가 배양된 양막을 떼어낸 다음, 양막의 일부를 No. 15

Bard-Parker knife를 이용하여 잘라내었다. 얻어진 조직들은 10×10 mm 크기의 cryoblock에 넣고 OCT 컴파운드(Sakura Finetek, USA)에 포매시킨 후 액체질소에 넣어 급속 냉동하였다. 냉동 조직을 micro-tome으로 6 μ m 두께로 잘라 염색에 사용하였다.

나. 조직염색

생체 내에서 양막 위에 배양된 각막윤부 상피세포의 구조를 알아보기 위해 Hematoxylin-Eosin (H&E), Periodic Acid-Schiff (PAS)염색 후 광학 현미경을 이용하여 100배, 200배, 400배로 관찰하였고, 배양된 상피세포의 성상을 알아보기 위해 각막상피세포의 cytokeratin K3에 대한 AE5 antibodies를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였으며, 결막 술잔세포의 유무를 알아보기 위해 결막 술잔세포 뮤신에 대한 MUC5AC antibodies를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다.

(1) Hematoxylin-Eosin 염색

조직의 전처리 방법으로 포매된 조직을 절단하여 슬라이드에 부착시키고 몇 시간 건조한 뒤 4단계의 xylene과 고농도에서 저농도의 순서로 에탄올 처리 후 흐르는 물에 세척한 다음 hematoxylin염색과 PAS염색을 시행하였고 슬라이드를 1% HCl와 1% 암모니아수로 처리한 후 xylene에 담구어 mount한 후 관찰하였다.

(2) Anti-AE5의 면역조직화학 염색법

조직을 증류수로 5~10분간 세척한 후 0.3% 과산화수소수(H_2O_2)가 포함된 용액에 30분 담근 다음, 증류수와 0.12 M 농도의 인산완충용액(phosphate-buffered-saline solution : PBS, pH 7.4)으로 각 5분씩 3회 세척하였다. 비특이적 반응을 줄이기 위해 조직에 1% bovine serum albumin을 5분간 반응시킨 다음, 인산완충용액으로 세척하였다.

일차 항체는 anti-AE5 (Neo-Marker, Labvision, U.S.A)로 사용하였고, 그 후 조직은 0.12 M 인산완충용액으로 세척하였다. 이차 항체(anti-mouse IgG)로 30분 반응시킨 후 다시 인산완충용액으로 세척하였으며 3차 항체(Avidin-Biotin complex)로 30분 반응 후 세척했다. 발색제로 DAB (3,3'-Diaminobenzidine, Sigma, U.S.A)액을 2분간 반응시켰고, 인산완충용액과 증류수로 발색제를 세척한 후 5분간의 Hematoxylin 대조염색 및 세척을 거친 후 관찰하였다.

(3) Anti- MUC5AC의 면역조직화학 염색법

조직을 증류수로 5~10분간 세척한 후 0.3% 과산화소수(H_2O_2)가 포함된 용액에 30분 담근 다음, 증류수와 0.12 M 농도의 인산완충용액(phosphate-buffered-saline solution : PBS, pH 7.4)으로 각 5분씩 3회 세척하였다. 비특이적 반응을 줄이기 위해 조직에 1% bovine serum albumin을 5분간 반응시킨 다음, 인산완충용액으로 세척하였다.

일차 항체는 anti-MUC5AC (Neo-Marker, Lab-vision, U.S.A)로 사용하였고, 그 후 조직은 0.12 M 인산완충용액으로 세척하였다. 이차 항체(anti-mouse IgG)로 30분 반응시킨 후 다시 인산완충용액으로 세척하였으며 3차 항체(Avidin-Biotin complex)로 30분 반응 후 세척했다. 발색제로 DAB (3,3'-Diaminobenzidine, Sigma, U.S.A)액을 2분간 반응시키고, 인산완충용액과 증류수로 발색제를 세척하고 5분간의 Hematoxylin 대조염색 및 세척을 거친 후 관찰하였다.

2. 압흔 세포진단(Impression cytology) 검사

생체 내에서 배양한 각막윤부 상피세포 이식술 시행 후 1주일, 3개월, 6개월, 1년째 압흔 세포진단 검사를 시행하였다. 전체 22안 중 10안에서 이식술 후 1주일에 압흔 세포진단 검사를 시행하였고, 3개월째에는 9안, 6개월째에는 5안, 1년째에는 4안에서 시행하였다. 대상안을 0.5% proparacaine hydrochloride (Alcain, Alcon, USA)으로 점안 마취시킨 후, 배양 양막이 이식된 각막 윤부 부위에 각막과 이식된 양막이 포함되도록 cellulose acetate paper (millipore filter, Ireland, $0.22 \mu m$)한 장을 위치시키고, 이식된 양막과 결막이 포함되도록 다른 한 장의 cellulose acetate paper를 위치시킨 후 Goldmann appplanation tonometer의 tip을 이용하여 약 5초간 누

른 뒤 forcep으로 압흔된 cellulose acetate paper를 떼어내고 24 wells에 넣은 후 95% ethyl-alcohol로 고정하였다. cellulose acetate paper는 가로 방향으로 삼등분하여 각각 압흔된 상피세포의 성상을 알아보기 위해 PAS 염색, AE5 antibodies와 MUC5AC antibodies를 이용한 면역조직화학염색을 시행하였다(Fig. 1).

결 과

생체 내 배양 각막윤부 상피세포 이식술을 시행했던 22명 22안에서 평균 10.4개월의 경과관찰 기간 동안 2안(9.0%)에서 염증 소견을 보였고, 2안(9.0%)에서 공막 위 재발 소견을 보였으며, 1안(4.5%)에서 각막을 침범하는 재발 소견을 보였다. 일주일 동안 생체 내에서 각막윤부 상피세포가 배양된 양막을 자가이식하기 전, 부분 생검하여 H&E 염색, PAS 염색 및 anti-AE5와 anti-MUC5AC를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하고, 이식술 후 1주일, 3개월, 6개월, 1년째에 압흔 세포진단 검사를 시행하고 각각 PAS 염색, anti-AE5, anti-MUC5AC를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하였고 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

1. 상피가 배양된 양막 생검에서 H&E 염색과 PAS 염색

H&E 염색된 조직을 광학현미경으로 100배로 관찰한 결과, 양막 위로 상피세포가 자라 들어 온 것을 확인할 수 있었다. 양막의 기저막 위로 정상 각막상피세포와 유사한 4~6층의 상피층이 관찰되었다. PAS 염색된 조직에서는 뮤신으로 인해 양성으로 염색되는 술잔 세포는 관찰되지 않았다(Fig. 2A, B).

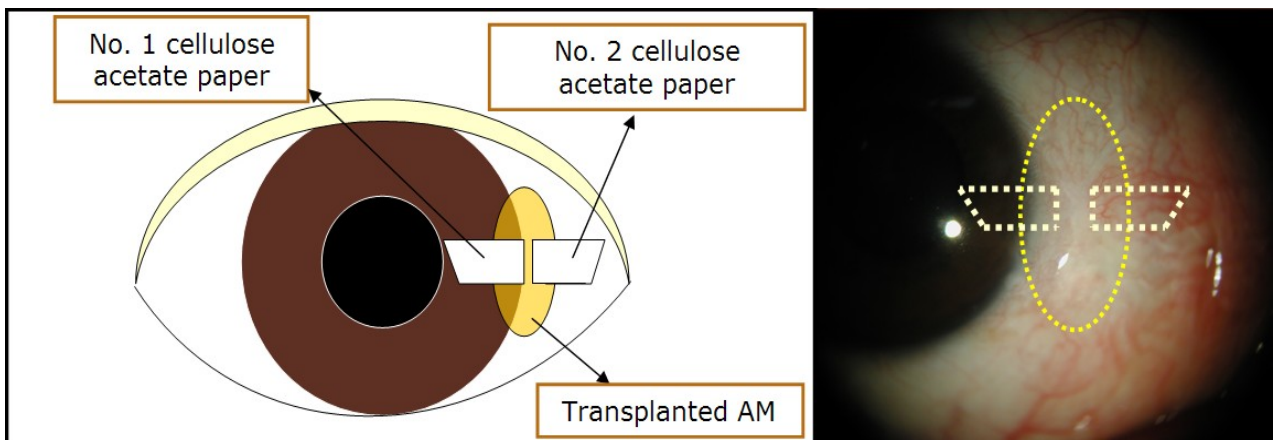


Figure 1. Schematic drawing of the orientation of each cellulose acetate paper applied on the ocular surface.

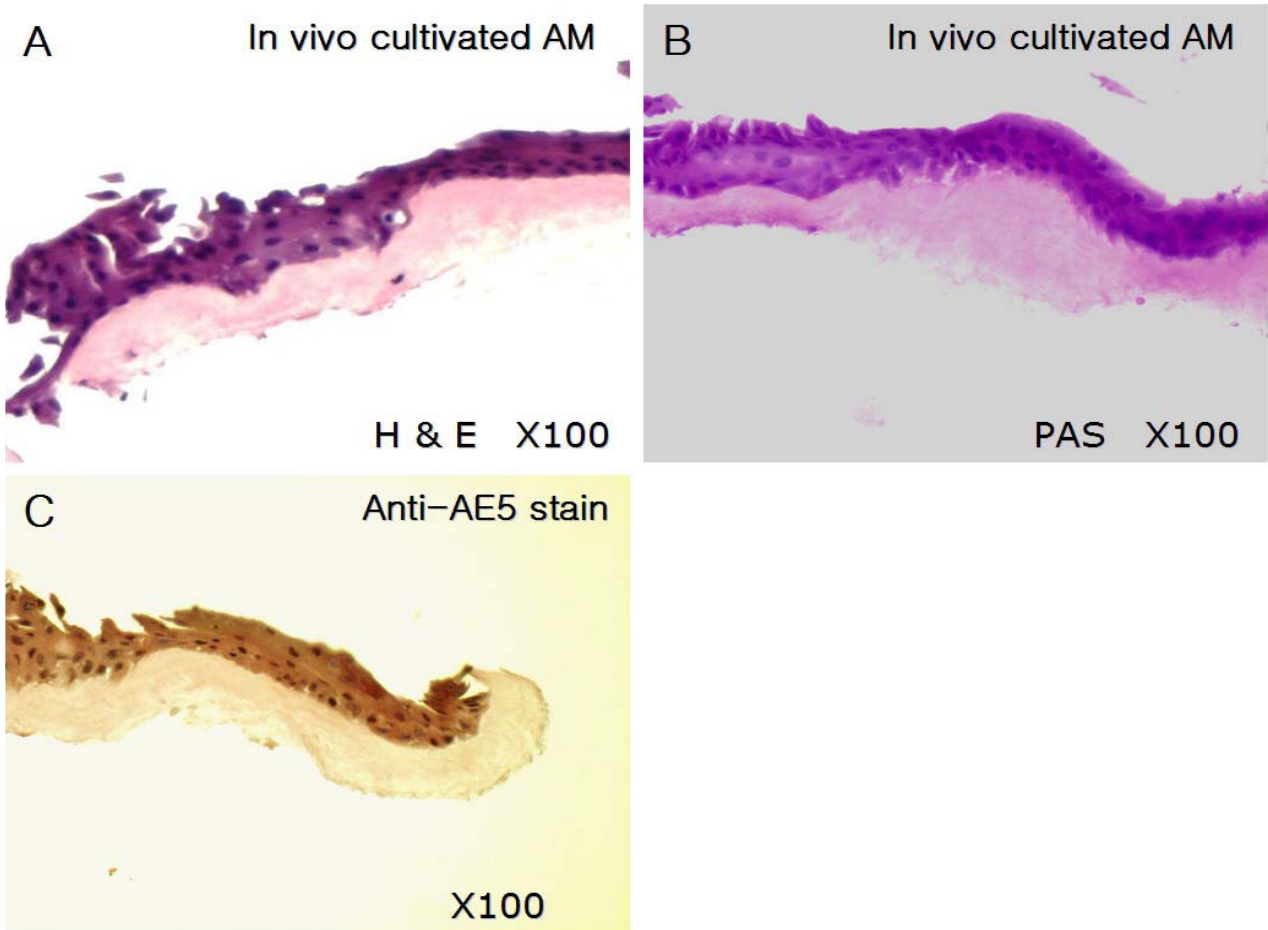


Figure 2. (A) In vivo cultivated corneal epithelial cells on human amniotic membrane for a week. (Hematoxylin-Eosin stain, Original magnification $\times 100$), (B) Periodic Acid-Schiff stain (original magnification $\times 100$), (C) Anti-AE5 immunohistochemical stain (original magnification $\times 100$). Light microscopy demonstrates well stratified and cuboidal corneal epithelial cells firmly attached to basement membrane of human amniotic membrane. There is no goblet cell in the PAS staining. In immunohistochemical staining, cultivated epithelial cells show positive staining for AE5.

2. 상피가 배양된 양막 생검에서 면역화학염색

양막 위로 자란 각막상피세포의 성상을 알아보기 위해 실시한 각막상피세포의 cytokeratin K3에 대한 monoclonal antibodies(Anti-AE5)를 이용한 면역화학염색에서 상피세포층에 양성으로 염색되는 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 2C).

3. 배양 양막 이식술 후 1주일째 압흔 세포진단 검사

각막윤부 상피세포가 생체 내 배양된 양막을 자가 이식한 후 1주일째 각막과 배양 양막이 포함되고 배양 양막과 결막이 포함되도록 cellulose acetate paper를 위치시켜 압흔 세포진단 검사를 시행하였다. 각각의 cellulose acetate paper를 PAS 염색한 결과, 각막

과 배양 양막 위에서 채취된 세포에서는 뮤신을 포함하는 술잔세포가 관찰되지 않았고, 결막 위에서 채취된 세포에서는 뮤신으로 인하여 PAS 양성으로 염색되는 부분이 관찰되었다. AE5에 대한 면역조직화학 염색에서는 각막과 배양 양막 위에서 채취된 세포에서는 양성 반응을 보였으나, 결막 위에서 채취된 세포에서는 염색되지 않았다. 뮤신에 대한 항체를 이용한 MUC5AC 염색에서는 결막 부분에서 채취된 세포에서만 양성 반응을 보였다(Fig. 3).

4. 배양 양막 이식술 후 3개월째 압흔 세포진단 검사

PAS 염색에서 각막과 배양 양막 위에서 채취된 세포는 PAS 음성 상피세포 모양이 보였으나, 결막 위에서 채취된 세포에서는 PAS 양성 세포가 있었다. AE5에

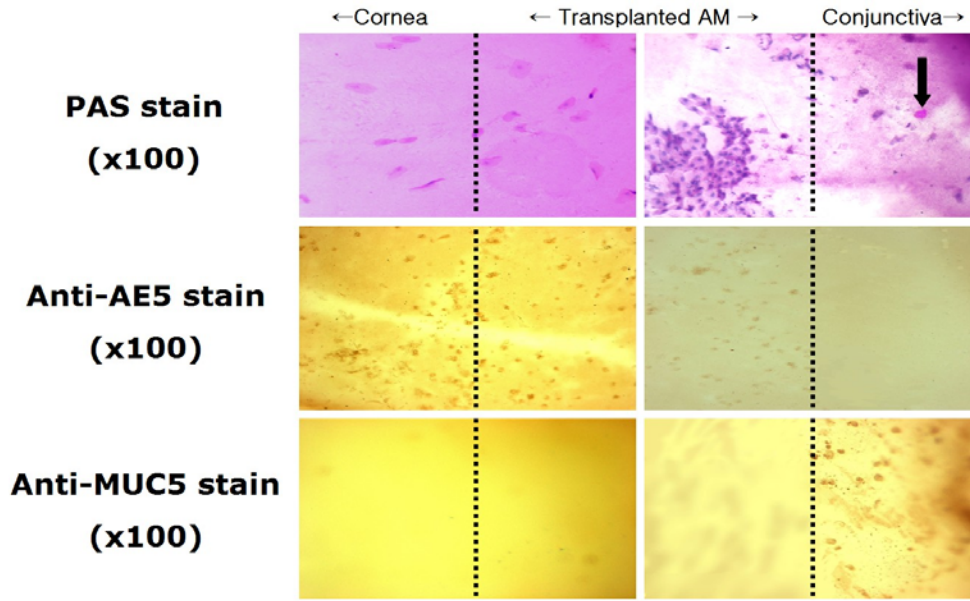


Figure 3. Impression cytology from the cornea, transplanted amniotic membrane and conjunctiva at postoperative a week (original magnification $\times 100$). PAS stain: abundant periodic acid-Schiff negative epithelial cells on corneal and amniotic membrane side, but periodic acid-Schiff positive on the conjunctival side (arrow); Anti-AE5 immunohistochemical stain: positive staining on the corneal and amniotic membrane side; Anti-MUC5AC immunohistochemical stain: positive staining only on the conjunctival side.

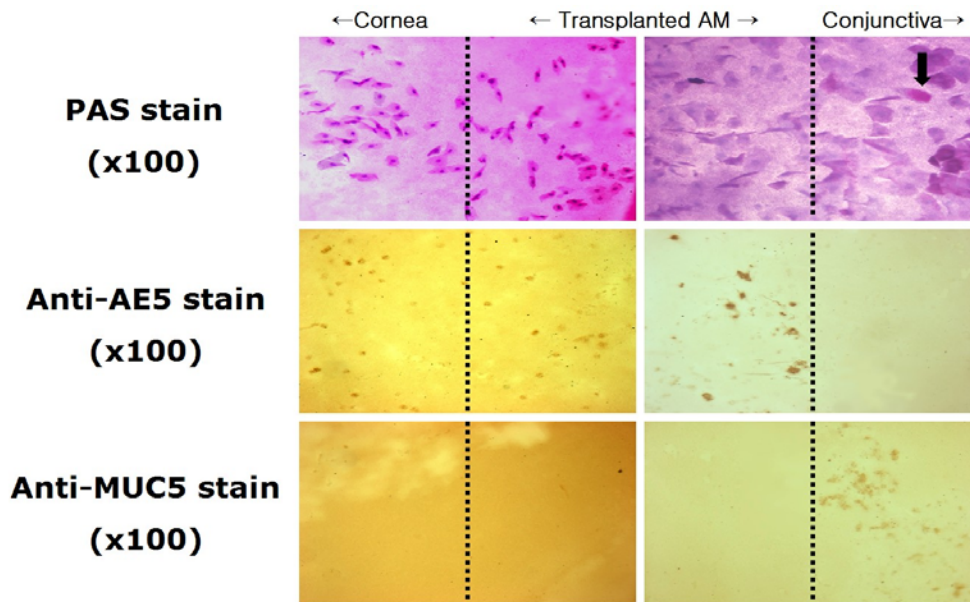


Figure 4. Impression cytology from the cornea, transplanted amniotic membrane and conjunctiva at postoperative 3 months (original magnification $\times 100$). PAS stain: abundant periodic acid-Schiff negative epithelial cells on the corneal and amniotic membrane side, but periodic acid-Schiff positive on the conjunctival side (arrow); Anti-AE5 immunohistochemical stain: positive staining on the corneal and amniotic membrane side; Anti-MUC5AC immunohistochemical stain: positive staining only on the conjunctival side.

대한 면역조직화학 염색에서는 각막과 배양 양막 위에서 채취된 세포에서만 양성으로 나타났으며, MUC5AC에

대한 면역조직화학 염색에서는 결막 위에서 채취된 세포에서만 양성으로 나타났다(Fig. 4).

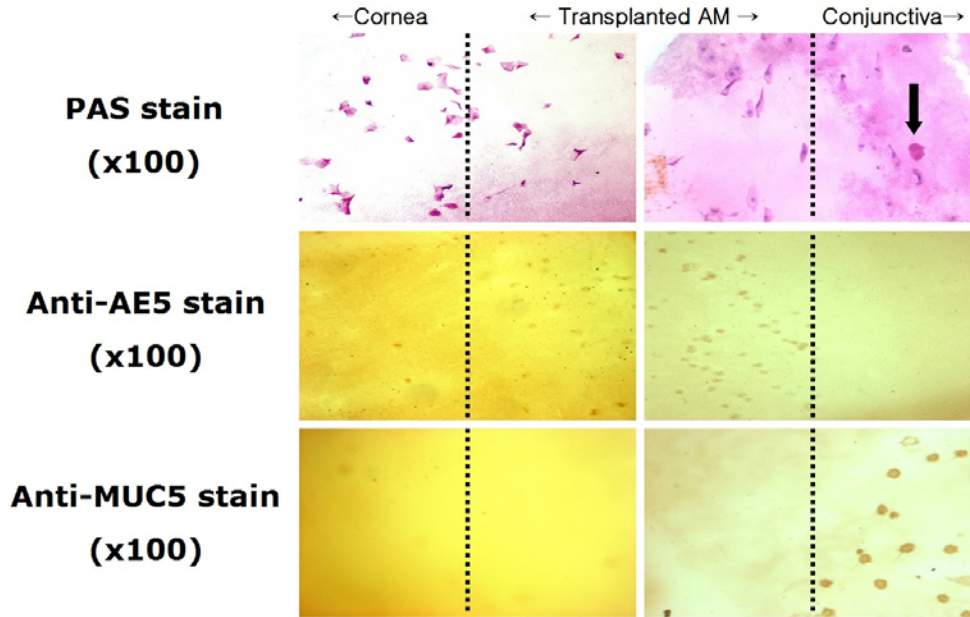


Figure 5. Impression cytology from the the cornea, transplanted amniotic membrane and conjunctiva at postoperative 6 months (original magnification $\times 100$). PAS stain: abundant periodic acid-Schiff negative epithelial cells on the corneal and amniotic membrane side, but periodic acid-Schiff positive on the conjunctival side (arrow); Anti-AE5 immunohistochemical stain: positive staining on the corneal and amniotic membrane side; Anti-MUC5AC immunohistochemical stain: positive staining only on the conjunctival side.

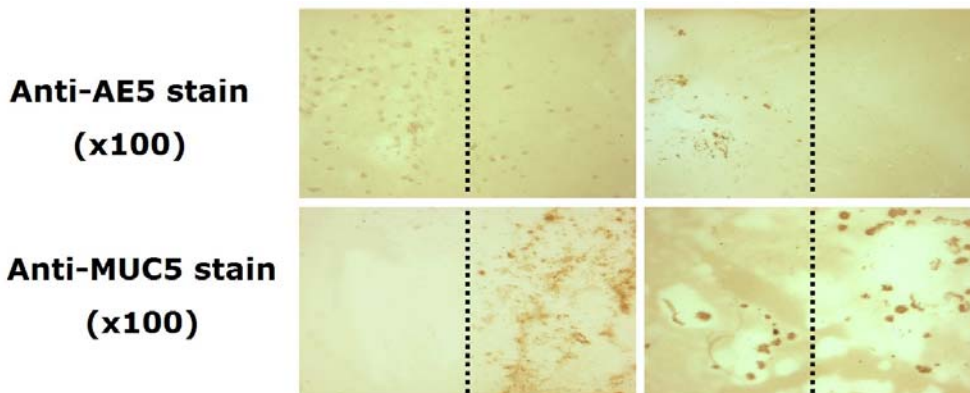


Figure 6. Impression cytology from the cornea, transplanted amniotic membrane and conjunctiva of patient with scleral recurrence at postoperative 6 months (original magnification $\times 100$). Anti-AE5 immunohistochemical stain: positive staining on the corneal and amniotic membrane side; Anti-MUC5AC immunohistochemical stain: positive staining on the transplanted amniotic membrane and conjunctival side.

5. 배양 양막 이식술 후 6개월째 압흔 세포진단 검사

PAS 염색에서 결막 위에서 채취된 세포에서 PAS 양성으로 염색되었고, AE5에 대한 면역조직화학 염색에서는 각막과 배양 양막 위에서 채취한 세포에서만 양성으로 나타났으며, MUC5AC에 대한 면역조직화학 염색에서는 결막 위에서 채취한 세포에서만 양성으로 나타났다(Fig. 5). 그러나, 배양 양막 이식술 6개월째 경과 관찰을 했던 5명의 환자 중 1명에서는 공막 위 채

발 소견을 보였으며, 이 환자에서는 압흔 세포진단 검사 상에서 MUC5AC에 대한 면역조직화학 염색에서 배양 양막 위에서 채취된 세포가 양성으로 염색되어 배양 양막에 일부 결막 상피 세포로 오염되어있음을 관찰하였다(Fig. 6).

6. 배양 양막 이식술 후 1년째 압흔 세포진단 검사

배양 양막 이식술 시행 1년째에도 압흔 세포진단 검

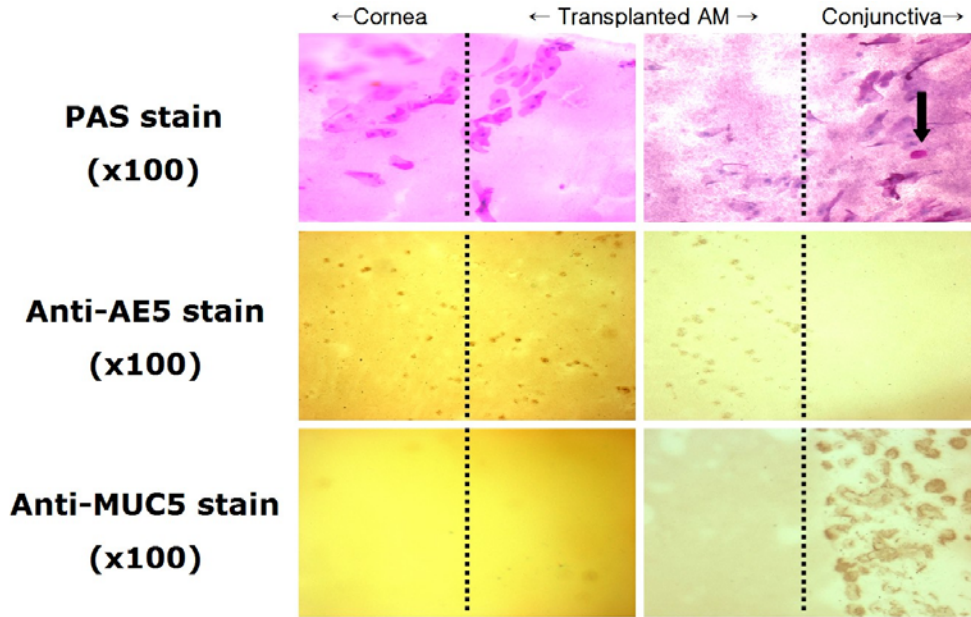


Figure 7. Impression cytology from the cornea, transplanted amniotic membrane and conjunctiva at postoperative 1 year (original magnification $\times 100$). PAS stain: abundant periodic acid-Schiff negative epithelial cells on the corneal and amniotic membrane side, but periodic acid-Schiff positive on the conjunctival side (arrow); Anti-AE5 immunohistochemical stain: positive staining on the corneal and amniotic membrane side; Anti-MUC5AC immunohistochemical stain: positive staining only on the conjunctival side.

사 상에서 각막과 배양 양막 위에서 채취된 세포는 PAS 음성의 서로 유사한 상피세포 모양을 보였고, 결막 부분에서는 PAS 양성으로 염색되었다. AE5에 대한 면역조직화학 염색에서는 각막과 배양 양막 위에서 채취된 세포에서만 양성으로 나타났고, MUC5AC에 대한 면역조직화학 염색에서는 결막 위에서 채취된 세포에서 양성으로 나타났다(Fig. 7).

고 찰

건강한 안구표면은 두 개의 다른 상피세포 즉, 각막 상피세포와 결막상피세포로 이루어진다.¹¹ 각막상피는 각막을 외부환경으로부터 보호하는 첫 번째 방어막이며 외부에 직접 노출되어 있으므로 외상 및 여러 질환들에 의해서 손상을 받기 쉽다. 안구 표면의 손상으로 인한 각막상피의 재생과정은 각막상피 기저층 세포의 재증식과 주변부 각막으로부터 상피결손부위로의 기저세포의 구심성 이동에 의해 이루어진다.¹² 각막손상에 의한 상피의 결손이 발생하면 각막상피의 세포분열이 평상시보다 왕성하게 이루어지는데, 이때 각막윤부 줄기세포가 빠르게 분열하여 주변부 각막에 많은 일시적 증폭세포를 제공하고 이들이 상피의 결손부위로 이동하면서 휴지기의 세포로 분화하여 결손부위를 채우게 된다.¹³⁻¹⁶ 또한 각막윤부 줄기세포는 평생동안 자가분열을 하며

지속적으로 탈락되는 각막상피를 공급하여 재생시키는 역할을 담당한다. 이러한 각막윤부의 각막상피 줄기세포가 부족하거나 기능에 이상이 생기면 각막윤부 결핍증을 초래하게 된다.^{17,18}

양막은 정상적인 상피세포의 특성을 잘 유지시키고 상피세포의 성장을 촉진하며, 항염증 작용, 신생혈관 억제작용 및 반흔형성 억제작용들로 인해 안표면 질환 치료에 광범위하게 사용되어지고 있다.¹⁹⁻²¹ 또한 양막은 기저막으로 작용하므로 상피의 이동을 촉진시키고 기저 상피세포의 유착을 강화시키며 상피의 분화를 촉진시키고 상피의 apoptosis를 억제하여 창상치유 과정에서 상피재생을 촉진한다.²² 또한 IL-1, IL-8, PMN elastase, growth regulated oncogene-alpha, neutrophil activating peptide-78 (ENA)를 하향조정(down regulation)하여 항염증작용을 나타내고 염증세포를 흡착하고 염증세포의 apoptosis를 유발시켜 염증세포가 창상조직에 침투하는 것을 억제하는 것으로 알려져 있다.^{23,24} 이러한 양막에 세포를 배양하면 배양된 세포의 특성이 잘 유지된다는 점에 착안하여, 줄기세포를 포함하고 있는 각막윤부조직을 실험실에서 양막에 배양하는 *ex vivo* expansion culture가 시도되어 이를 각막윤부 결핍증 환자에게 이식하는 수술이 시행되고 있다.⁶⁻⁹ 1997년 Pellegrini et al.^{25,26}은 실험실에서 자가 배양된 각막윤부 세포 이식

술을 2명의 심한 각막 화학화상 환자에서 시행하였고, 1999년 각막윤부이식을 위한 기실로서 양막을 이용한 군과 양막을 이용하지 않은 군과의 비교실험에서 양막군에서 성공적인 상피화가 나타났음을 보고하였다. 그 후 2002년 Tsubota et al은 양막에 *ex vivo* expansion culture된 각막상피 줄기세포를 이식하여 단기간 동안 성공적인 임상 결과를 보고하였고, 2004년 Tseng et al²⁷은 가토안에 대하여 1년까지 장기간 동안 경과관찰에 성공하였음을 보고하였다. 그러나 *in vitro* 배양은 배양시 오염 가능성, 배양에 필요한 실험 기구 및 장비의 구비, 인력확보에 따르는 문제점 등의 단점이 있다. Lee and Park¹⁰은 이런 단점을 보완하기 위해 가토각막에 양막을 이식하여 각막윤부 상피세포를 배양하는 LIVAM technique을 고안하였으며, 이식 4주째까지 이식된 양막에 각막윤부 상피세포가 잘 유지된다는 것을 보고하였다.

본 연구는 *in vivo* corneal limbal epithelial cells culture technique을 각막윤부 결핍증 환자에게 실제 적용하여 생체 내 자가 각막윤부 상피세포 배양 후 이식술을 시행하고, 장기경과관찰을 하면서 압흔 세포진단 검사를 이용하여 배양 후 이식된 각막윤부 상피세포의 성상을 알아보고자 하였다.

인위적 각막상피결손을 만들고, 상피가 제거된 일반 양막을 이식하여 일주일간 각막윤부 상피세포를 배양하고 생검한 결과, H&E 염색에서 정상 각막상피세포와 같이 4~6개 층으로 이루어진 상피세포를 관찰할 수 있었고, PAS 염색에서 음성으로 염색되어 술잔세포가 없는 것을 확인하였으며, 각막상피세포의 cytokeratin K3에 대한 monoclonal antibody인 anti-AE5에 대한 면역조직화학 염색시 양성 반응을 보여, 양막 위에 배양된 상피세포가 각막상피임을 알 수 있었다. 각막윤부 상피세포를 배양했던 정상안에서는 배양된 양막을 제거하고 난 후, 경도의 표층 점상 각막염 소견이 일부 있었으나 곧 치유되었고, 심각한 합병증은 모든 경우에서 없었다.

생체 내 배양한 각막윤부 상피세포 이식술 후 1주일

째, 압흔 세포진단검사서 각막과 이식된 배양 양막 부분에서 채취된 세포는 PAS 염색에서 뮤신을 함유하지 않은 각막상피세포임을 알 수 있었다. 또한 각막상피의 지표가 되는 AE5에 대한 면역조직화학 염색에서 각막과 이식된 배양 양막 부분에서만 양성을 나타내고, 결막 상피의 지표가 되는 MUC5AC에 대한 면역조직화학 염색에서는 결막 부분에서만 양성을 나타내어 이식된 배양 양막의 상피세포가 각막상피세포 성상을 유지하고 있음을 알 수 있었고, 이러한 소견은 생체 내 배양한 각막윤부 상피세포 이식술 후 3개월, 6개월까지 잘 나타났다. 그러나 이식술 후 6개월째 공막 위 재발 소견을 보였던 1명에게서 이식된 배양 양막 부위에 MUC5AC에 대한 면역조직화학 염색에서 양성으로 염색되어 일부 결막 상피세포로 오염되어있는 소견을 관찰하였으나, 육안 소견 상 각막을 침범하는 재발소견은 관찰되지 않았다. 생체 내 배양한 각막윤부 상피세포 이식술 후 1년째에도 이식된 배양 양막 부위의 압흔 세포진단 검사 상 AE5에 대한 면역조직화학 염색에서 양성을 보이고, MUC5AC에 대한 면역조직화학 염색에 대해 음성으로 나와 각막상피세포 성상을 잘 유지하고 있음을 관찰하였다(Table 1).

본 연구에서는 대상 22안에 대해 연속적인 경과관찰을 통해 각 대상안 모두에서 기간별로 압흔 세포진단법을 시행하여야 하지만, 압흔 세포진단 검사의 특성상 검사지로부터 압흔된 세포가 유실되었거나, 경과관찰 기간 중 환자 추적 실패 등의 문제로 전체 환자에서 연속적인 검사를 시행하지 않았다는 제한점을 지닌다. 그러나 각 대상 환자는 모두 동일한 조건에서 생체 내에서 배양한 자가 각막윤부 상피세포 이식술을 시행 받은 후, 본 연구에서 설계했던 각각의 시기별로 압흔 세포진단 검사를 시행했기 때문에 비록 연속적인 검사는 아니지만 이식술 후 일정 기간이 지난 세포의 성상을 반영하고 있었을 것으로 생각된다.

생체 내 배양한 자가 각막윤부 상피세포 이식술(LIVAM transplantation)은 기존의 실험실에서 배양된 각막상피의 비영구성, 배양에 필요한 실험기구 및

Table 1. The results of immunohistochemistry of transplanted epithelial cells cultivated *in vivo* on the amniotic membrane

	The transplanted amniotic membrane cultivated <i>in vivo</i>			
	Postoperative 1 week	Postoperative 3 months	Postoperative 6 months	Postoperative 1 year
	(%)	(%)	(%)	(%)
PAS positive	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)
Anti-AE5 positive	22 (100%)	22 (100%)	5 (100%)	4 (100%)
Anti-MUC5AC positive	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)

(the number of eyes)

장비, 인원보급에 따르는 문제점을 해결하면서 donor에 손상이 없고, 자가 배양이므로 거부반응이 없고, 초기 염증 및 통증이 적으며 언제든지 시술이 가능하고, 빠른 상피 재생이 가능하며 미용적으로도 우수한 장점이 있다. 그리고 본 실험에서 압흔 세포진단 검사를 통한 추적 관찰 결과, 비교적 장기간에도 배양된 각막상피세포가 그 성상을 잘 유지하고 있음을 알 수 있었고, 임상적으로도 재발을 억제하는 것으로 나타나 LIVAM 이식술은 각막윤부 결핍증을 치료하는 하나의 대안이 될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in-vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;103:49-62.
- Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, et al. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989;57:201-9.
- Shapiro MS, Friend J, Thoft RA. Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:135-42.
- Tseng SC. Regulation and clinical implications of corneal epithelium stem cells. *Mol Biol Rep* 1996;23:47-58.
- Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709-23.
- Tsai RJF, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86-93.
- Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, et al. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2506-13.
- Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 2001;119:298-300.
- Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001;108:1569-74.
- Lee DW, Park WC. Transplantation of in vivo cultivated limbal corneal epithelial cells with total limbal stem cell deficiency. *J Korean Ophthalmol Soc* 2005;46:494-503.
- Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea*, 1st ed. Vol. 1. St. Louis: Mosby, 1997:42-4.
- Zieske JD, Bukusoglu G, Gipson IK. Enhancement of vinculin synthesis by migratory stratified squamous epithelium. *J Cell Biology* 1989;109:571-6.
- Chung EH, Heutcheon AE, Joyce NC, Zieske JD. Synchronization of the G1/S transition in response to corneal debridement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1952-8.
- Hall PA, Watt FM. Stem cells: The generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989;106:619-33.
- Thoft RA, Friend J. The X,Y,Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1442-3.
- Sandvig KU, Haaskjold E, Bjerknes R, et al. Cell kinetics of conjunctival and corneal epithelium during regeneration of different-sized corneal epithelial defects. *Acta Ophthalmol* 1994;172:43-8.
- Yanoff M, Fine BS. *Ocular pathology*, 1st ed. Vol. 1. Philadelphia: Harper and Row, 1982:287.
- Pinkerton OD. Immunologic basis for the pathogenesis of pterygium. *Am J Ophthalmol* 1984;98:225-8.
- Chun DH, Jeon SL, Lee JY, Choi TH. The effect of amniotic membrane transplantation on corneal epithelial cell proliferation. *J Korean Ophthalmol Soc* 2002;43:1746-57.
- Park GS, Choi TH, Park WC, Kim JC. The clinical efficacy of amniotic membrane transplantation and limbal conjunctival autograft in patients with recurrent pterygium or pseudopterygium. *J Korean Ophthalmol Soc* 2001;42:1143-9.
- Lee DY, Park WC, Rho SH. The effects of amniotic membrane ointment application on photorefractive keratectomized cornea in rabbits. *J Korean Ophthalmol Soc* 2000;41:2069-77.
- Taylor RJ, Wang MX. Rate of re-epithelialization following amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:S1038.
- Kim JS, Kim JC, Na BK, et al. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000;70:329-37.
- Buultmann S, You L, Spandau U, et al. Amniotic membrane down-regulate chemokine expression in human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:S3044.
- Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349:990-3.
- Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, et al. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000;19:65-71.
- Shimazaki J, Aiba M, Goto E, et al. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorder. *Ophthalmology* 2002;109:1285-90.

=ABSTRACT=

Long-term Outcome of Limbal Epithelial Cells Cultivated *in Vivo* on Amniotic Membrane Transplantation

Hyun Chul Cheon, M.D., Dong Min Shin, M.D., Dong Joon Lee, M.D., Woo Chan Park, M.D.

Department of Ophthalmology, Dong-A University, College of Medicine, Pusan, Korea

Purpose: To investigate the characteristics and the results of long-term follow-up of limbal epithelial cells cultivated *in vivo* on amniotic membranes (LIVAM) in corneal limbal deficiency.

Methods: Twenty-two eyes of twenty-two patients diagnosed with corneal limbal deficiency underwent transplantation of *in vivo* cultivated corneal limbal epithelial cells on the amniotic membrane. Biopsy and immunohistochemical staining (AE5, MUC5AC) of the amniotic membrane cultivated for one week were performed to verify that the cultivated epithelial cells on the amniotic membrane were corneal epithelial cells. Impression cytology was performed to evaluate the characteristics of the transplanted corneal limbal epithelial cells at postoperative 1 week, 3 months, 6 months, and 1 year.

Results: Successful epithelial growth was observed on the amniotic membrane at one week. The epithelial cells were confirmed to be corneal epithelial cells by immunohistochemical staining. Transplanted *in vivo* cultivated corneal epithelial cells were confirmed to have corneal specificity by impression cytology and immunohistochemical staining at postoperative 1 week, 3 months, 6 months, and 1 year.

Conclusions: *In vivo* cultured corneal epithelial cells showed morphological and immunohistochemical findings similar to those of normal corneal epithelial cells. Transplanted *in vivo* cultivated corneal epithelial cells were maintained and showed the characteristics of corneal epithelial cells. Transplantation of *in vivo* cultivated corneal limbal epithelial cells can be performed to reconstruct the corneal limbus in treating corneal limbal deficiency.

J Korean Ophthalmol Soc 49(3):415-424, 2008

Key Words: Impression cytology, Limbal deficiency, Limbal epithelial cells cultivated *in vivo* on amniotic membrane

Address reprint requests to **Woo Chan Park, M.D.**

Department of Ophthalmology, Dong-A University, College of Medicine

#3-1 Dongdaeshin-dong, Seo-gu, Pusan 602-715, Korea

Tel: 82-51-240-5227, Fax: 82-51-254-1987, E-mail: wcpark@dau.ac.kr