

## 적출한 인체 안구에서 얻은 망막색소상피세포의 환경별 및 시간별 체외 생존률

서경률 · 김순현 · 권오웅

= 요약 =

망막색소상피세포는 망막의 외층에 한층으로 구성되어 중요한 생리적 기능을 수행한다. 최근 연령관련황반변성과 이로부터 발생한 망막 중심와하 맥락막 신생혈관의 치료 방법으로서 정상 망막색소상피세포의 이식이 대두되고 있다. 망막색소상피세포 이식이 성공적 결과를 얻기 위해서는 이식 당시 세포의 생존률이 높아야 한다. 이러한 생존률은 생체로부터 얻어진 후의 기간과 세포의 보존 환경에 따라 영향을 받을 수 있다.

본 연구는 망막색소상피세포에서 상기 두가지 인자가 세포 생존률에 미치는 영향을 알아보고 이식이 시행되어야 할 시간의 한계와 그 기간 중에 가장 적합한 보존 환경을 알아 보고자 했다.

1997년 11월부터 1998년 2월까지 신촌세브란스병원 안과에서 각막 이식을 위해 기증된 안구 6안에서 각막 이식 직후 얻어진 망막색소상피세포를 냉동, 냉장, 실온 보관하면서 세포를 얻어질 당시와 24시간 후, 48시간 후 각각의 세포 생존률을 구하여 비교하였다.

생존률은 냉장 보관에서 가장 높았고, 세포판을 얻은 후 24시간까지는 95% 정도의 생존률을 보인 후, 48시간부터 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다. 그러므로, 생체 이식을 위해 얻어진 망막색소상피는 냉장 보관되어야 하며, 24시간 내에 이식함이 바람직할 것이다(한안지 40:481~488, 1999).

= Abstract =

### In Vitro Viability of Retinal Pigment Epithelial Cells from Human Donor Eyeballs According to the Environmental Conditions and Periods

Kyoung Yul Seo, Sun Hyun Kim, Oh Woong Kwon

<접수일 : 1998년 6월 15일, 심사통과일 : 1998년 11월 18일>

연세대학교 의과대학 안과학교실, 시기능개발 연구소

Address reprint requests to Kyoung Yul Seo, M.D.

The Institute of Vision Research, Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine  
#134 Shinchon-dong, Sodaemun-gu, Seoul, 120-752, Korea

Tel : 82-2-361-8538, Fax : 82-2-312-0541

Retinal pigment epithelial cells(RPE) form a monolayer on the outer portion of sensory retina and have important physiologic functions that include solute transport, phagocytosis and digestion of membranes shed from photoreceptor outer segments, and drug detoxication. Recently, transplantation of normal RPE has been proposed as a potential therapeutic modality in the surgical management of subretinal neovascularization in age related macular degeneration(ARMD). The viability of RPE at the time of transplantation is important for a good result after transplantation. This viability can be influenced by the period and environmental conditions of storage after harvest.

In this study, the influence of these two factors on the viability was evaluated under controlling other remaining factors in vitro. And limitation of maximal time and optimal environmental condition of storage were investigated.

From November 1997 to February 1998, RPE cell sheets from six donor eyeballs for corneal transplantation in the department of ophthalmology of Severance Hospital were harvested and stored in  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , or room temperature condition. The viability of RPE cells at 0, 24 and 48 hours after harvest was assessed and compared statistically.

The viability was highest at  $4^{\circ}\text{C}$  condition. During storage, the viability was about 95% at 24 hours and decreased abruptly to below 90% at 48 hours. Therefore, RPE cells for transplantation are to be stored at  $4^{\circ}\text{C}$  condition and transplantation should be performed within 24 hours after harvest(J Korean Ophthalmol Soc 40:481~488, 1999)

**Key Words** : Age-related macular degeneration, Retinal pigment epithelium, Retinal transplantation, Environments of cell storage, In vitro viability, Human

망막색소상피세포는 망막의 외층에 한층으로 구성되어 중요한 생리적 기능을 수행한다. 이에겐 물질 이동, 탐식, 광감각 세포로부터 탈락된 막의 분해, 약물 독성 제거 등이 있다. 이러한 망막색소상피세포에 기능적 장애가 생기면 광감각 세포의 세포외 환경의 변화가 초래되어 시력의 감소를 일으키는 연령관련황반변성(Age related macular degeneration)와 같은 각종 질환의 병인을 제공케 된다.

최근 연령관련황반변성과 이로부터 발생한 망막 중심와하 맥락막 신생혈관의 치료 방법으로서 정상 망막색소상피세포의 이식이 대두되고 있다. 망막 수술시 망막중심와하 맥락막 신생혈관과 함께 그 부위의 망막색소상피세포를 제거하게 되면 망막색소상피세포의 결손이 있는 한 중심와 시력의

회복이 지연되는 것으로 보아 망막색소상피세포의 중요성을 알 수 있었고 이에 따라 망막하 수술 시 태아 망막색소상피세포 이식이 시도되었던 단기 결과가 보고된 바 있다<sup>1)</sup>.

현재까지 망막색소상피세포의 이식은 주로 dissociated cell suspension이나<sup>1)</sup> 태아 망막색소상피세포 patch로 얻은 배양 망막색소상피세포를 이용한 것이었다<sup>2)</sup>. 하지만 cell suspension 주입의 경우 망막하 섬유화, 세포 다층화 등의 문제가 있었고, 태아 세포의 경우 얻기가 어렵고 그 결과가 성공적이지 못한 문제가 있었다. 이에 따라 세포를 dissociation 기법으로 얻어 sheet 형태로 이식하는 방법도 시도되었다<sup>3)</sup>.

망막색소상피세포 이식이 성공적 결과를 얻기 위해서는 이식 당시 세포의 생존률이 높아야 한

다. 이 생존률은 생체로부터 얻어진 후 기간에 따라, 세포의 보존 환경에 따라 영향을 받을 수 있다. 본 실험은 망막색소상피세포에서 상기 두가지 인자가 세포 생존률에 미치는 영향을 알아보아 이식이 시행되어야 할 시간의 한계와 그 기간 중에 가장 적합한 보존 환경을 알아 보고자 했다.

## 재료 및 방법

1997년 11월부터 1998년 2월까지 신촌세브란스병원 안과에서 각막 이식을 위해 기증되었던 안구 6안에서 각막 이식을 실시한 직후, 안구로부터 얻어진 망막색소상피세포를 젤라틴판 위에 올려 냉동, 냉장, 실온 보관하면서 세포를 얻을 당시와 24시간 후, 48시간 후 각각의 세포 생존률을 구하여 비교하였다. 기증자 중 남자는 3안, 여자는 3안이었으며 연령은 평균 74.5세(64세-83세)였다. 우안이 3예, 좌안이 3예였다.

### 1. 망막색소상피세포판 형성

기증된 안구는 각막 이식 직후 각막이 제거되어진 상태에서 세포판 형성 전까지 식염수로 적셔진 거즈로 싼 후, moist chamber내에 보관하였다. 이렇게 보존하였던 안구는 먼저 안구에 붙은 외안근과 지방 조직을 깨끗이 제거한 후 각막 윤부에 해당하는, 각막이 제거된 부위로부터 스프링 가위로 공막의 네 방향에 90도 간격으로 경선 절개를 실시했다. 이 절개는 공막 아래로 상맥락막 공간에 시행하며 이때 맥락막을 다치지 않도록 주의하여 시신경이 안구로 들어가는 부분까지 충분히 절개 후 공막을 안구로부터 분리하여 제거했다. 맥락막을 포함한 나머지 안구를 25U/ml의 Dispase (Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.)에 넣은 후 약 30분간 둔 뒤 꺼냈다. Dispase에서 꺼낸 안구는 CO<sub>2</sub>-free medium(pH=7.4) (CFM, Gibco)에 씻은 후, 거상연을 따라 망막하 공간으로 360도 횡선 절개를 시행했다. 횡선 절개된 부위로부터 다시 네 방향의 경선 절개를 하여 맥락막을 망막으로부터 완전히 분리하여 펼쳤다. 이 맥락막 위에 붙은 망막색소상피세포층을 CFM에 10-15분간 두어 망막색소상피가 브루크막으로부터 완전히 분리

된 다음, Glass Micropipet으로 흡인한 뒤 25mm×75mm×1mm 슬라이드 유리판 위에 마련된 50% 젤라틴판 위에 망막색소상피세포의 침부가 위로 향하도록 펼쳐두었다. 이 젤라틴판은 Minimal essential medium(MEM, Gibco)에 50% 농도로 porcine skin gelatin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)을 용해시킨 후 여기에 300mM의 sucrose(Sigma Chemical Co.)를 더한 것이다. 이 젤라틴판을 70% ethanol로 소독된 cryostat(Microm, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로, 100 $\mu$ m의 두께로 잘랐고 이를 유리 슬라이드에 올린 후, 100mm 디쉬에 넣고, DMEM을 부어 4 $^{\circ}$ C에 보관하였던 것이다. 망막색소상피의 침부는 색소 침착도가 많고 기저부는 거칠고 덜 색소침착되어 보이는 것으로 구별할 수 있다. 유리판을 100mm×15mm 폴리스틸렌 디쉬(Falcon #1029, Becton-Dickson, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.)에 넣은 상태에서 5% 이산화탄소 95% 공기의 37 $^{\circ}$ C 배양기(CO<sub>2</sub> incubator, Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio, U.S.A.)에 5분간 두어 젤라틴을 녹여 세포판을 고정시킨 후, 4 $^{\circ}$ C의 냉장실에 다시 5분간 두어 젤라틴을 굳혀 CFM 8ml를 가한 후 실험 조건에 따라 각각 영상 20 $^{\circ}$ C, 영상 4 $^{\circ}$ C 환경에 둘 디쉬는 그 상태대로, 영하 70 $^{\circ}$ C는 90% fetal bovine serum(Gibco)와 10% dimethyl sulfoxide(Sigma Chemical Co.)으로 교환한 후에 옮겨, 25 $^{\circ}$ C/min로 온도를 떨어뜨려 deep-freezer(REVCO scientific Inc., Asheville, NC, U.S.A.)에 보관했다.

### 2. 세포 생존률 측정

인체 안구를 재료로 얻어진 망막색소상피세포판을 냉동, 냉장, 실온 보관하면서 세포를 얻어질 당시와 24시간 후, 48시간 후, 72시간 후 각각의 세포 생존률을 구하기 위해 냉장보관과 실온보관의 경우 망막색소상피세포판을 MEM이 든 디쉬로 옮긴 후 37 $^{\circ}$ C에 5분간 두어 젤라틴을 녹였고, 냉동보관의 경우 90% fetal bovine serum에 10% dimethyl sulfoxide을 해동후 제거하고 다시 MEM으로 교체하고 37 $^{\circ}$ C에 5분간 둔 후 생존률을 측정하였다. 생존

를 Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.)을 사용하였다. 이 kit는 Calcein AM와 Ethidium Homodimer으로 구성되어 있으며 Calcein AM은 생존 세포내의 Esterase에 의해 분해되어 세포막외로 투과되지 않는 녹색형광을 띠는 물질로 바뀌며, Ethidium Homodimer는 죽은 세포에서 세포내로 확산되어 DNA에 부착하여 적색 형광을 띠게 된다. Kit내의 4mM의 Calcein AM은 Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS, Gibco)에 희석하여 1uM로, 2mM의 Ethidium Homodimer는 4uM로 농도를 맞춘 뒤, D-PBS로 미리 세척하여둔 망막색소상피세포판에 100uL 정도를 가하여 디쉬로 덮어 30분을 실온에 두었다. 30분 경과후 D-PBS로 다시 세척하고 coverslip으로 덮었다. 이 유리판을 confocal laser scanning microscopy (CLSM, Leica TCSMT, Leica laser technik GMBH, Heidelberg, Germany)하에 관찰하였고, 필요에 따라 형광필터하에 사진촬영하였다. 무작위적으로 추출했던 세 부위에서의 생존률을 200배 배율하의 생존세포수와 죽은 세포수를 세어 그 환경과 시간의 평균으로 삼았다.

### 3. 통계학적 분석

생존률은 젤라틴판 위에 올리기 전과 직후, 첫 24시간과 48시간 후 세포의 평균 생존률은 평균 ±표준오차의 형태로 표시하였고, 시간별, 보존환경별 생존률의 차이의 분석은 Wilcoxon signed rank test를 사용하였다.

## 결 과

6개의 안구 중 남자는 3안, 여자는 3안이었으며 연령은 평균 74.5세 (64세-83세)였다. 우안이 3예, 좌안이 3예였다. 평균 사망후 안구적출까지의 시간은 2.2시간이었고, 사망후 망막색소상피세포 형성까지의 시간은 23.5시간이었다. 모든 안구는 각막 이식을 위해 각막이 제거된 후안부였다.

### 1. 세포 생존률

젤라틴판 위에 올리기 전 세포의 평균 생존률은

98.4%였고, 젤라틴판 위에 올린 후 세포의 평균 생존률은 이와 비슷한 97.3%였다. 안구를 보존하는 동안 젤라틴판 위에 올린 세포의 평균 생존률은 점차 떨어져서 냉장보관의 경우, 처음에는 97.3%였던 생존률이 첫 24시간 후에는 94.8%, 48시간 후에는 89.4%로 감소하였다. 반면, 냉동보관과 실온 보관은 이보다 더 급격히 생존률이 감소하여, 냉동보관은 첫 24시간 후에는 40.4%, 48시간 후에는 35.1%였고, 비교군으로 사용하였던 실온보관은 첫 24시간 후에는 9.8%, 48시간 후에는 3.2%였다(Table 1, Fig. 1).

### 2. 생존률의 통계적 차이

냉장보관의 경우, 젤라틴판 위에 올리기 전후의 평균 생존률과 첫 24시간 후 세포의 평균 생존률의 차이는 통계학적으로 유의한 차이가 없었으며 ( $p>0.05$ ), 보관후 48시간 생존률과는 유의한 차이가 있었다( $p<0.01$ ). 하지만, 냉동과 실온 보관은 모두 24시간과 48시간에서 유의한 통계적 차이가 있었다( $p<0.01$ ).

보존방법에 따라 서로 비교해 보면, 냉장, 냉동, 실온 모두 각 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었고( $p<0.01$ ), 냉장보관이 냉동보관보다, 냉동보관이 실온보관보다 높은 생존률을 가짐을 알 수 있었다.

## 고 찰

연령관련황반변성은 시력상실과 높은 유병률로 인해 고령 환자에게 있어 실명을 일으키는 주요 원인이다<sup>4</sup>. 특히 진행된 연령관련황반변성에서 동반되는 망막하신생혈관막, 특히 황반하신생혈관막은 시력 상실을 초래하는 질환 중 하나로<sup>5</sup> 연령관련성황반변성뿐 아니라 그외 안히스토플라즈마증, 근시 등에 의해서도 발생할 수도 있다.

비록 이런 망막하신생혈관막을 수술로 성공적으로 제거한다고 해도 수술중 불가피한 망막색소상피의 손실로 인해, 이후 시신경세포의 기능장애와 맥락막 혈관 위축 등이 유발된다<sup>6</sup>. 망막색소상피세포를 이 손상부에 이식하였던 경우, 이와 같은 기능장애와 위축이 방지될 수 있음이 알려졌다<sup>7</sup>

**Table 1.** Viability of retinal pigment epithelial cells according to the environmental conditions and periods(%)

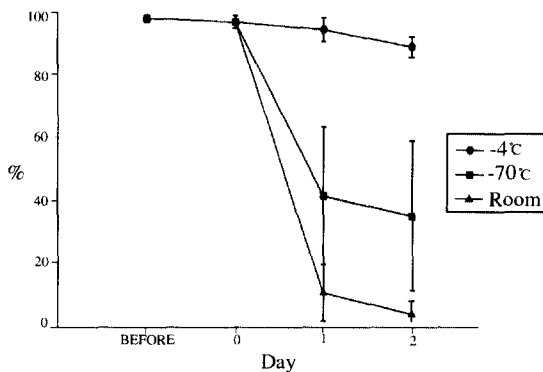
Donor eyeballs	sex	age	before	0 hour*	24 hour*			48 hour*		
					4℃	-70℃	RT	4℃	-70℃	RT
1	Male	76	99.8	99.7	98.2	70.5	16.4	91.4	34.2	6.6
			99.8	96.7	97.5	40.3	13.2	94.3	57.5	0
			97.9	99.1	98.9	68.0	18.5	91.2	70.9	7.2
2	Male	76	98.9	96.4	97.1	46.0	8.1	89.8	43.1	9.5
			97.9	99.5	93.2	32.5	34.2	90.5	33.4	3.2
			98.8	99.3	98.5	56.4	16.8	95.4	54.3	9.7
3	Female	83	97.7	94.7	94.9	21.4	0	86.6	3.3	0
			99.5	98.5	96.4	3.5	0	85.4	0	0
			95.3	92.4	90.6	12.3	0	89.9	20.3	0
4	Female	83	95.0	95.8	90.4	25.6	0	86.2	14.5	0
			97.4	97.0	94.5	15.0	0	82.2	0	0
			98.1	93.7	86.3	36.2	0	87.5	10.4	0
5	Male	64	99.9	98.5	98.5	58.0	11.8	92.3	64.5	0
			98.8	99.4	97.5	35.3	9.5	89.5	25.9	0
			99.5	98.5	99.2	78.6	12.9	93.2	64.5	0
6	Female	65	98.8	98.2	93.0	43.7	12.9	88.1	60.5	8.5
			97.9	96.5	97.3	42.3	15.6	92.1	20.5	10.7
			98.9	97.8	89.3	43.5	10.2	88.0	55.5	2.2
			Mean	76.00	98.32	97.31	95.11	41.65	10.06	89.69
SD	8.36	1.39	2.11	3.85	22.16	9.13	3.40	24.2	4.18	

before : before the placement of RPE on gelatin sheets

\* : Duration after the placement of RPE on gelatin sheets

RT : Room temperature

SD : standard deviation



**Fig. 1.** Viability of retinal pigment epithelial cells according to the environmental conditions and periods

<sup>12)</sup> 망막색소상피의 결손이나 변성이 유발되는 질병에 있어 망막색소상피 이식이 그 치료법으로서 대두되고 있다.

망막색소상피의 이식을 위한 망막색소상피세포를 준비하는 방법으로, 세포를 dissociated cell suspension으로 준비하여 초자체 절제후 망막에 절개하여 주입하는 경우와<sup>1)</sup> 태아의 인체 망막색소상피를 배양하여 작은 patch 형태로 세포 단층을 자른 후, micropipette으로 옮겨 망막하에 이식하는 방법이 있었다<sup>2)</sup>. 이들 방법은 각기 장단점을 가지지만, cell suspension은 세포가 여러 층으로 깔리거나 망막하에 들어간 후, 섬유화 반응을 일으켜 망막하 섬유조직을 형성하는 문제가, patch 이식은 태아의 인체 망막색소상피를 얻는 기회가 매우 드물고 윤리적 문제가 관여되어 있으

올려 이후 보관하였는데, 젤라틴판은 그 제작과정  
이 모두 세포배양 hood(Class II A/B3 biological  
safty cabinet, Forma Scientific Inc.)내  
에서 처리하였으나, 망막색소상피세포판은 보존  
후 생체에 이식할 것을 궁극적으로 목표로 하므로  
무균적 술식과 재료가 보장되어야 한다. 이를 위  
해 추후 이식을 위한 실험전에, 젤라틴판과 망막  
색소상피세포판 모두 호기성, 혐기성세균과 진균  
배양에서 음성 반응을 보임을 입증해야 하겠다.

본 실험에서 망막색소상피의 생존률을 알아보기  
위해 사용한 방법은 Calcein AM과 Ethidium  
Homodimer를 동시에 염색하는 Live/Dead  
probe을 사용하였으며, Calcein AM은 생존 세  
포내의 esterase에 의해 변화되어 세포막외로 투  
과되지 않는 녹색형광을(515nm) 띠는 물질로 바뀌  
며, Ethidium Homodimer는 죽은 세포에서 세  
포내로 확산되어 핵산에 부착하여 적색 형광을  
(635nm) 띠게 된다. 이 방법은 안구조직 중 각막  
내피세포의 생존률을 평가하는데 유용함이 입증  
되었으며<sup>17)</sup> 망막색소상피의 생존률에도 사용될 수  
있다<sup>18)</sup>. 이 염색법으로 Calcein AM에 의한 생존  
세포 염색과 Ethidium homodimer에 의한 죽은  
세포 염색을 잘 구분하기 위해서는 적당한 각 염  
색액의 농도를 먼저 알아야 한다. 이 농도는 각  
세포에 따라 모두 그 값이 다른데, 가장 좋은 것  
은 충분한 형광을 보이는 최저 농도를 알아내어  
그 농도로 염색하는 것이다. 망막색소상피 염색에  
적당한 농도를 구하기 위해, 먼저 배양한 돼지 망  
막색소상피를 이용해 70% methanol로 모두 죽  
인 상태에서 충분한 형광을 보이는 Ethidium  
Homodimer의 농도를 구한 뒤(1-4 $\mu$ M), 죽은 돼  
지 망막색소상피가 가성 양성 형광을 보이지 않는  
Calcein AM의 농도를 구했다(0.5-1 $\mu$ M). 앞에서  
구한 Calcein AM의 농도중 생존 망막색소상피에  
충분한 형광을 보이는 농도(1 $\mu$ M)를 다시 구했다.  
즉 Ethidium homodimer의 농도 1-4 $\mu$ M,  
Calcein AM의 농도 1 $\mu$ M을 생존 세포와 죽은 세  
포가 섞인 배양 세포에 가하였고 이 농도들이 적  
당한 농도임을 알았다(Fig. 3). 인체 망막색소상  
피에도 이 농도를 가해 결과를 얻었다(Calcein  
AM 1 $\mu$ M, Ethidium Homodimer 1 $\mu$ M).

**Fig. 2.** Retinal pigment epithelial sheet prepared by  
disperse on gelatin block( $\times 40$  A,  $\times 100$  B)

며, patch 형태의 이식이 그 성공률이 다소 떨어  
진다는 어려움이 있었다<sup>13)</sup>. 최근 이 같은 문제를  
극복하기 위해 망막색소상피를 얻을 때부터 상피  
판의 형태로 분리하는 방법이 성공하였으며<sup>14) 16)</sup>  
태아의 인체 망막색소상피가 각막 이식을 위해 기  
증된 성인의 인체 망막색소상피에서도 성공적으  
로 분리될 수 있었다.

이 방법은 공막을 제거한 안구에서, 먼저 dis-  
pase를 이용하여 브루크막과 망막색소상피를 분리  
시킨 후, 망막과 맥락막을 수술적으로 제거함으로  
써 망막색소상피간의 세포간 접합은 유지한채로  
판의 형태로 얻게 된다<sup>3)</sup>. 망막색소상피판은 육각  
형의 망막색소상피 모양이 잘 유지되어 있으며,  
세포 한층으로 이루어져 있어 현미경하에서 망막  
색소상피층의 체내 형태와 동일한 모습을 보인다  
(Fig. 2). 이 세포판은 50%(w/v) 젤라틴판 위에

**Fig. 3.** Fluorescent staining of human(A) and porcine(B) retinal pigment epithelial sheets with 1 $\mu$ M Calcein AM and 4 $\mu$ M Ethidium Homodimer ( $\times$ 200)

또 앞으로 망막색소상피가 인체에 이식되어지려면, 인체로부터 얻어진 세포판을 즉시 망막색소상피병변을 가진 안구에 이식할 수도 있겠으나 대부분의 경우 환자의 여건, 수술준비 등을 위해 일정 시간 동안 보관한 후 가능해질 것이다. 따라서 망막색소상피의 보관이 성공적 이식을 위한 필수 조건이라고 하겠다. 지금까지 보존방법은 각막이식을 위한 보존법과 같이 세포대사를 최소화하는 냉동 보관이 주로 사용되어 왔다<sup>19)</sup>. 하지만 각막 보존에 있어서도 장기 보존을 위한 방법으로 냉동 보관 방법이 연구되고 있으며<sup>20)</sup> 망막색소상피의 보관에 있어서도 가능한 방법으로 고려되고 있다<sup>21)</sup>. 냉장보관의 생존률은 대체로 48시간까지는 90% 이상이며, 이 이후는 급격히 감소하는 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 냉동 보관후 생존률은 지금까지 측정된 적은 없으나 약 3개월까지 세포의 성질이 변하지 않고 보존됨은 알려져 있었다<sup>22)</sup>. 본 실험에서는 냉장 보관의 경우, 기존의 연구들과 유사하여 실온 보존에 비해 매우 높은 생존률을 관찰할 수 있었으나, 냉동 보관의 경우, 비교군인 상온보다는 높으나 생존률이 낮았다. 하지만 세포의 냉동시에 본 실험에서 사용된 냉동 속도인 25 $^{\circ}$ C/min보다 느린 2 $^{\circ}$ C/min로 냉동할 경우 세포의 파괴가 적어 더 높은 생존률을 기대할 수도 있으므로, 이를 검증하기 위해서는 더 나은 냉동보관

환경에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다. 보관 시간은 냉장 조건만을 고려할 때 본 실험의 결과는 이전의 연구와 유사한 생존률을 보이며<sup>3)</sup>, 이는 이식수술이 인체에서 망막색소상피판을 형성한 후 24시간 이전에 시행되어야함을 보여주고 있다.

## REFERENCES

- 1) Algvare PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y : *Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization*. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 232:707-716, 1994
- 2) Sheng Y, Gouras P, Cao H, Berglin L, Kjeldbye H, Lopez R, Rosskothan H : *Patch transplants of human fetal retinal pigment epithelium in rabbit and monkey retina*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:381-390, 1995
- 3) Tezel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ : *Harvest and storage of adult human retinal pigment sheets*. *Curr Eye Res* 16:802-809, 1997
- 4) Feeney-Burns L, Burns RP, Gao CL : *Age-related macular changes in humans over 90 years old*. *Am J Ophthalmol* 109:265-278, 1990
- 5) Green WR, Wilson DJ : *Choroidal neovascu-*

- larization. *Ophthalmology* 93:1169-1176, 1986
- 6) Desai VN, Del Priore LV, Kaplan HJ : *Choriocapillaris atrophy after submacular surgery in presumed ocular histoplasmosis. Arch Ophthalmol* 113:408-409, 1995
  - 7) Seaton AD, Turner JE : *RPE transplants stabilize retinal vasculature and prevent neovascularization in the RCS rat. Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 83-91, 1992
  - 8) Sheedlo HJ, Li L, Turner JE : *Effect of RPE age and culture conditions on support of photoreceptor cell survival in transplanted RCS dystrophic rats. Exp Eye Res* 57:753-761, 1993
  - 9) Yamamoto S, Du J, Gouras P, Kjeldbye H : *Retinal pigment epithelial transplants and retinal function in RCS rats. Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:3068-3075, 1993
  - 10) Seaton AD, Sheedlo HJ, Turner JE : *A primary role for RPE transplants in the inhibition and regression of neovascularization in the RCS rat. Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 162-169, 1994
  - 11) Gouras P, Algvere P : *Retinal cell transplantation in the macula: new techniques. Vision Res* 36:4121-4125, 1996
  - 12) Little CW, Castillo BV Jr, DiLoreto DA, Cox C, Wyatt J, del Cerro C, del Cerro M : *Transplantation of human fetal retinal pigment epithelium rescues photoreceptor cells from degeneration in the Royal College of Surgeons rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:204-211, 1996
  - 13) Berglin L, Gouras P, Sheng Y, Lin PK, Cao H, Kjeldbye H : *Tolerance of fetal human retinal pigment epithelium xenograft in monkey retina. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235:103-110, 1997
  - 14) Castillo BV Jr, Little CW, del Cerro C, del Cerro M : *An improved method of isolating fetal human retinal pigment epithelium. Curr Eye Res* 14:677-683, 1995
  - 15) Chang CW, Roque RS, Defoe DM, Caldwell RB : *An improved method of isolating and culture of pigment epithelial cells from rat retina. Curr Eye Res* 10:1081-1086, 1991
  - 16) Pfeffer B : *Improved methodology for cell culture of human and monkey retinal pigment epithelium. Prog Retina Res* 10:251-291, 1991
  - 17) Imbert D, Cullander C : *Assessment of cornea viability by confocal laser scanning microscopy and MTT assay. Cornea* 16:666-674, 1997
  - 18) Haugland RP, Larison KD : *Fluorescent dyes for assessing vital cell functions. In Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 5th ed. OR, Eugene, Molecular Probes, 1994, pp 172-180*
  - 19) Doughty MJ : *Physiological state of the rabbit cornea following 4 degree C moist chamber storage. Exp Eye Res* 49:807-827, 1989
  - 20) Wusteman MC, Boylan S, Pegg DE : *Cryopreservation of rabbit corneas in dimethyl sulfoxide. Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1934-1943, 1997
  - 21) Durlu YK, Tamai M : *Transplantation of retinal pigment epithelium using viable cryopreserved cells. Cell Transplant* 6:149-162, 1997
  - 22) Tamai M : *Retinal pigment epithelial cell transplantation: perspective. Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 100:982-1006, 1996