

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

重症多形滲出性紅斑の手術適応、重症度解析に関する研究  
—培養粘膜上皮移植の実施、手術適応の検討—

分担研究者 坪田一男 慶応義塾大学医学部眼科学 教授

**研究要旨** 重症多形滲出性紅斑（以下スティーブンスジョンソン症候群）はウイルスや消炎鎮痛剤が原因と考えられる全身の皮膚粘膜が侵される重篤な疾患である。急性期には高熱にともない皮膚発疹、粘膜症状が生じ、眼症状では角結膜上皮や角膜上皮幹細胞の脱落に伴い、難治性の角膜上皮欠損を生じる。慢性期には涙腺組織の破壊や結膜杯細胞の減少による重症ドライアイをきたす。また、易感染性のため角膜潰瘍の発症や癒痕性角結膜組織による角膜被覆の悪化により、さらに視力低下を引き起こしやすく眼疾患として予後不良である。治療は角膜感染症の併発に留意しながら早期からの消炎により結膜の癒痕形成と瞼球癒着を抑制し、ドライアイの管理を行う。ドライアイに対し涙液保持を目的とした涙点閉鎖は眼表面の改善のみならず、視力の向上に期待できることが指摘されている。一方、癒痕性変化が高度の場合は、角膜上皮幹細胞不全を来すことで、不可逆的に視力が傷害される場合がある。幹細胞を含む培養粘膜上皮移植によって、一部症例で視力の改善が望まれる。今年度は、本術式を改良する目的でより幹細胞を多く残す方法について研究した。

A. 研究目的

重症ドライアイであるスティーブンスジョンソン症候群に対する涙点閉鎖は眼表面への涙液供給が可能となり、生体染色の改善が認められ、それとともに不快感、異物感、熱い感じ、羞明感、痛みなどの自覚症状も改善され、さらに、眼表面の改善にともない視力向上も期待できることは既に報告している。一方、重症ドライアイは眼を開け

ることにより急激に眼表面は乾き瞬間的には見えても、開瞼により視力は低下するため持続して見ることができない。このため通常の視力検査ではある程度の視力が出るものの、日常生活において著しい制限を受ける可能性がある。我々は昨年度、スティーブンスジョンソン症候群の視機能評価に、通常の視力検査ではなくて、実用視力をパラメーターとして用いた方がより正確な評

価ができることを報告した。視覚障害認定基準に実用視力を用いた場合、ステューブンスジョンソン症候群患者では視覚障害認定を取得できる、或はより等級が上の認定が受けられることが明らかとなり、この方法によりステューブンスジョンソン症候群患者に対してさらに救済の道が開かれる可能性が示唆された。本年度は、培養粘膜上皮シート内により多くの幹細胞を残す方法について研究を行った。

## B. 研究方法

フィーダー細胞との接触が上皮細胞のコロニー形成に与える影響を確認するため、以下の実験を行った。100mm dishにマイトマイシンC処理したNIH/3T3細胞（以後フィーダー細胞）を播種し、翌日cell scraperを用いてdishの半分からフィーダー細胞を取り除いた。酵素処理によりヒト輪部より上皮細胞を分離し、1dishあたり2000個播種して2週間培養した。培地にはSHEM (F12/DMEM +10% FBS +EGF, insulin, hydrocortisone, transferrin, isoproterenol hydrochloride)を用いた。ホルマリン固定後ローダミンBによりコロニーを染色し、フィーダー細胞のある箇所とない箇所でそれぞれコロニー形成率(CFE)を求めた。3回の独立した実験を行った。

直接フィーダーと接触させて培養した場合、上皮細胞の増殖に伴いフィーダーは脱落、減少する。フィーダーとして使用され

る繊維芽細胞は上皮細胞からのIL1 $\beta$ に反応して上皮の増殖を刺激するKGFを分泌することから、フィーダーの減少は上皮増殖の減少をもたらすことが考えられる。そこで、contact培養とseparate培養を組み合わせたduplex培養を考案し、上皮増殖の程度を2週目における上皮化の面積により検定した。

次に、培養法の違いが培養上皮シートに与える影響を組織学および免疫組織学的に検討した。カルチャーインサートにフィブリンゲルをコートし、フィーダー細胞を播種した。翌日ヒト輪部上皮細胞を播種し、contact培養、separate培養、およびduplex培養を行った。上皮細胞がコンフルエントに達した後、1週間air lift cultureを行った。培地にはSHEMにアプロチニンを添加したものをを用いた。培養後、HE染色を行って組織学的に検討した。また新鮮凍結凍結切片も作成し、抗cytokeratin3 (K3)、抗cytokeratin12 (K12)と抗cytokeratin15抗体 (K15)と反応させた。またホルマリン固定パラフィン切片を抗p63抗体と反応させた。

最後に各培養上皮シートにおける二次コロニーの形成率を求めた。培養した上皮シートを酵素処理により分散させた後、フィーダーを用意した60mm dishに $10^4$ 個ずつ播種し、2週間培養した。ローダミンBで染色後、コロニー形成率を求めた。3回の独立した実験を行った。

### C. 研究結果

フィーダーが存在する箇所におけるCFEは、フィーダーが存在しない箇所におけるCFEに比べて有意に増加していた (Student's t test,  $p < 0.05$ )。フィーダーの存在する箇所と存在しない箇所の間では輪部上皮のドナー、培地、フィーダーから分泌される液性因子は同一であり、フィーダーとの直接接触の有無のみが異なっていると考えられる。よってこの結果は、フィーダーとの直接の接触がCFEを大きく改善することを示唆した。上皮化の面積はduplex培養群で  $74.3\% \pm 20.4\%$ 、contact培養群で  $36.3\% \pm 30.0\%$ 、separate培養群で  $10.1\% \pm 12.4\%$  (mean  $\pm$  S.D.) であり、duplex培養群とseparate培養群の間で有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。これらの結果は、duplex培養法により上皮の増殖がより促進されることを示唆した。

duplex培養ではcontact培養およびseparate培養に比べ、よりよい組織像が観察されることが多かった。contact培養およびseparate培養に比較して、duplex培養ではK3, K12がsuprabasal cellsに、K15が基底層により強く発現した。特にK12はduplex培養ではK12がより強く発現する一方、K15も基底層により限局して検出された。Duplex培養におけるK12, K15発現パターンは、他2法の培養法に比べ、ヒト輪部のケラチン発現パターンにより類似していた。

最後に、二次コロニー形成率はduplex培養群では  $1.6\% \pm 2.1\%$ 、contact培養群では  $0.18\% \pm 0.19\%$ 、separate培養群では  $0.12\% \pm 0.16\%$  だった。これらの結果は、duplex培養した培養上皮シートはより未分化なコロニー形成細胞をより含むことを示す。

### D. 考察

Duplex培養によりヒト輪部上皮の増殖が促進され、培養上皮細胞シートがより輪部上皮に類似したケラチン発現パターンを示し、また上皮シート中により多くのコロニー形成細胞を含むようになった。我々はこの原因として、1つにはフィーダー細胞との接触によりコロニー形成率が向上したこと、もう1つにはcontact培養では上皮増殖に伴い減少するフィーダー細胞との相互作用を、一部のフィーダー細胞を隔離することにより長期にわたり維持できたことによると考えている。またこの結果は、上皮細胞の適切な維持にはフィーダー細胞表面に存在する因子と、液性因子の双方がともに重要であることを示す。

この培養法はブラックボックスとなりうる羊膜を使用しないため、輪部上皮のin vitroモデル系として有用であると考えられる。例えばフィーダーに適切な遺伝子をノックアウトした3T3を用い、正常な3T3を用いた場合と上皮シートのケラチン発現パターンを比較することで、ニッチに関連する遺伝子候補を検定することができる。

また臨床応用面としては、ヒトフィーダーで作成した上皮シートが 3T3 に及ばないような場合でも、この手法を用いることで質を改善できる可能性が考えられる。

## E. 結論

スティーブンスジョンソン症候群に培養粘膜上皮移植を施行する際には、より多くの幹細胞を移植する必要がある。Duplex 培養により、幹細胞を含む輪部上皮に類似した培養上皮シートを作成できる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表（平成 17 年度）

### 1. 論文発表

#### 英語論文

1. Shimmura S, Miyashita H, Higa K, Yoshida S, Shimazaki J, Tsubota K. Proteomic analysis of soluble factors secreted by limbal fibroblasts. *Mol Vis* 2006;12:478-84.
2. Shimmura S, Miyashita H, Uchino Y, et al. Microkeratome-assisted deep lamellar keratoprosthesis (DLKPro). *Br J Ophthalmol* 2006 ;90:826-829.
3. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J,

Tsubota K. Ocular surface epithelium epithelial cells upregulate HLA-G when expanded in vitro on amniotic membrane substrates. *Cornea* 2006;25:715-721.

4. Uchino Y, Shimmura S, Miyashita H, Taguchi T, Kobayashi H, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. Amniotic membrane immobilized poly (vinyl alcohol) hybrid polymer as an artificial cornea scaffold that supports a stratified and differentiated corneal epithelium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007:in press.
5. Yoshida S, Shimmura S, Kawakita T, Den S, Shimazaki J, Tsubota K. Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4780-4786.
6. Yoshida S, Shimmura S, Matsuzaki Y, Okano H, Tsubota K. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* 2006;24:2714-2722.
7. Higa K, Shimmura S, Kawakita T, Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda

K, Shimazaki J, Tsubota K.  
Proliferation and  
differentiation of  
transplantable epithelial  
sheets engineered with or  
without an amniotic membrane  
carrier. Invest Ophthalmol Vis  
Sci 2007;48:597-604.

#### 日本語論文

なし

#### 2. 学会発表

1. 加藤直子、榛村重人、宮下英之、比嘉一成、吉田悟、川北哲也、坪田一男. 翼状片の発生機序における $\beta$ カテニンの役割、第30回角膜カンファレンス、東京、2006/2/9
2. 宮下英之、榛村重人、森藤史、吉田悟、坪田一男. マウス角膜実質組織幹細胞のフィーダー細胞としての応用、第30回角膜カンファレンス、東京、2006/2/9
3. 吉田悟、榛村重人、島崎潤、松崎有未、岡野栄之、坪田一男. マウス角膜における神経提由来組織幹細胞、第30回角膜カンファレンス、東京、2006/2/9
4. 比嘉一成、榛村重人、板橋裕史、福田恵一、坪田一男、島崎潤. フィブリンコ

ートウェルを用いた培養上皮シートの作成と移植、第30回角膜カンファレンス、東京、2006/2/9

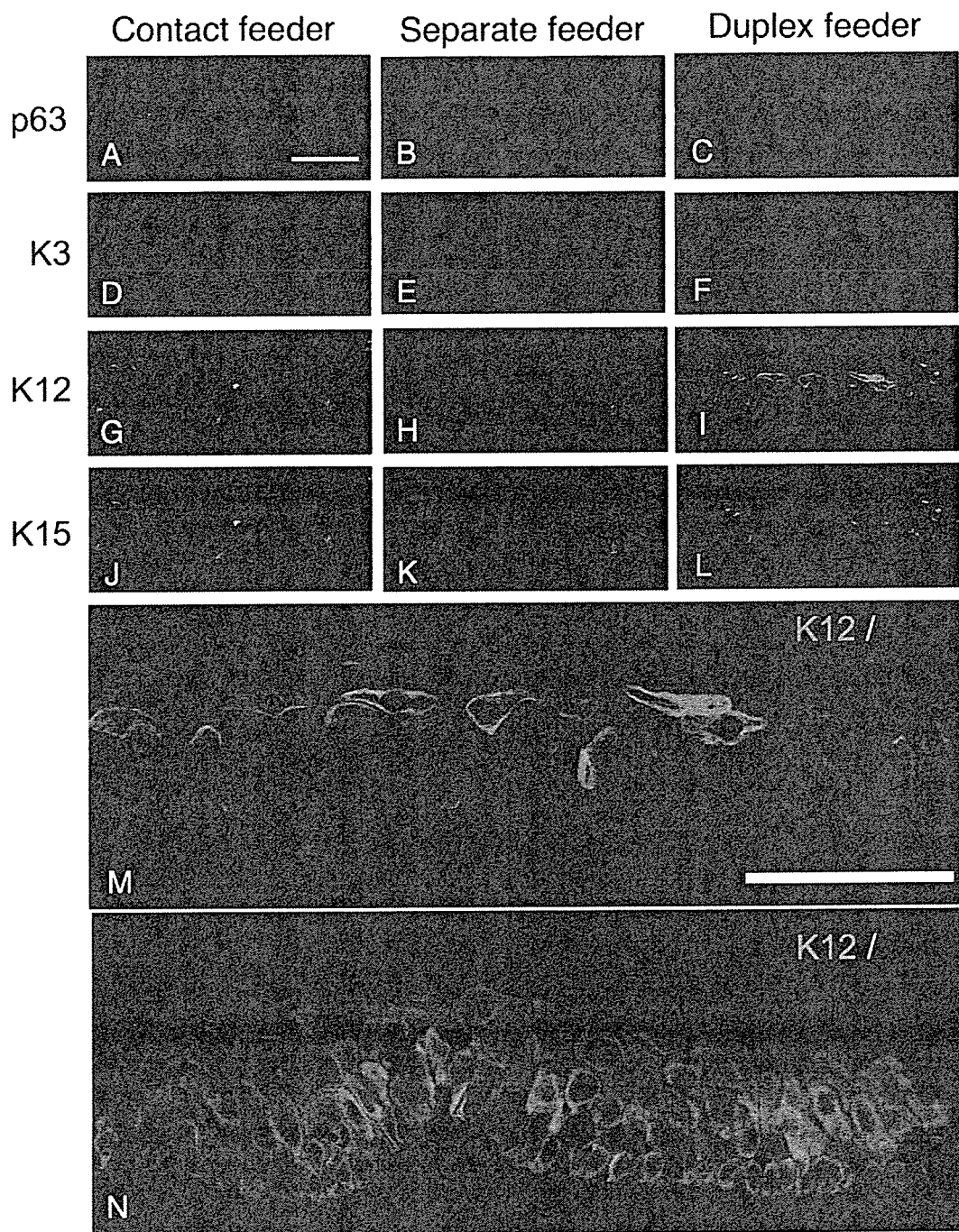
5. 榛村重人、吉田悟、松崎有未、岡野栄之、坪田一男. マウス角膜における神経提由来組織幹細胞、第5回日本再生医療学会、岡山、2006/3/8

6. 榛村重人、比嘉一成、吉田悟、川北哲也、島崎潤、坪田一男. 角膜上皮未分化細胞を用いたマウス培養上皮シート移植実験系の開発、第110回日本眼科学会、大阪、2006/4/14

7. Shigeto Shimmura, Hideyuki Miyashita, Satoru Yoshida, Jun Shimazaki and Kazuo Tsubota. The use of keratocyte progenitors as feeder cells for epithelial sheet cultivation. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, 2006/5/2

8. Machiko Tomita, Shigeto Shimmura, Yoshiyuki Satake, Kazuo Tsubota, Jun Shimazaki. Post-keratoplasty atopic sclerokeratitis. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, 2006/5/3

9. Yoshida S, Shimmura S, Matsuzaki Y, Shimazaki J, Okano H, Tsubota K. Multipotent cornea stromal precursors are of neural crest origin and not the bone marrow. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, 2006/5/2.
10. Shimmura S. Transplantable carrier-free corneal epithelial sheets engineered with a biodegradable fibrin sealant. V Congresso Societa Italiana Cellule Staminali e Superficie Oculare, Rome, Italy 2006/6/2
11. 榛村重人、山本祐介、内野裕一、重安千花、坪田一男. プレカットドナーを用いた角膜内皮移植術 (DSAEK)、第60回日本臨床眼科学会、京都、2006/10/5
12. 山本祐介、榛村重人、重安千花、坪田一男. 深層角膜内皮移植 (DLEK) の再手術例、60回日本臨床眼科学会、京都、2006/10/5
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得：なし
  2. 実用新案登録：なし
  3. その他：なし



Duplex feeder 法でのみ、正常角膜輪部（N）が示すケラチン12／ケラチン15の発現パターンを再現できた。これらのシートから分析したコロニー形成率も duplex 法で有意に高く、より多くの幹細胞が含まれていることが示唆された。

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

分担研究報告書

## 培養粘膜上皮移植の国内移送、実施に関する研究

分担研究者 大橋裕一 愛媛大学医学部眼科学 教授

**研究要旨** 重症多形滲出性紅斑症例に対し、培養角膜上皮シート移植を施行し、その経過につき検討を行った。移送について問題は生じず、術後6ヶ月以上の経過観察期間中、経過は良好である。長期的な予後についてはさらに検討を重ねる必要がある。

### A. 研究目的

重症多形滲出性紅斑は、急速に発症する皮膚、粘膜の水疱、びらんのみならず、眼表面の強い炎症により偽膜形成、瞼球癒着の進行、また、角膜輪部の疲弊により、角膜びらんの遷延が起こり、視力低下をきたす重篤な疾患である。眼表面再建の方法として、過去に角膜移植が試みられてきたが、その経過は良好なものとはいえない。近年培養角膜上皮シート移植による良好な結果が報告されている。我々の施設でも重症多形滲出性紅斑に対する眼表面再建を行い、その治療効果を検討するとともに、各症例の病歴と経過につき検討することを目的とする。

### B. 研究方法

我々の施設で経過観察を行っている重症多形滲出性紅斑患者のうち、瞼球癒着や角膜混濁により視力低下をきたしている患者を

対象とし、患者の病歴や全身状態、眼所見について再度調査を行った。また、京都府立医大より培養角膜上皮シートの提供を受け、眼表面再建術を施行し、術後経過につき検討を行った。

### C. 研究結果

現時点で4症例に対し、培養角膜上皮シート移植を施行した。全例、角膜輪部疲弊のため、角膜上皮欠損の遷延、結膜上皮の角膜内への侵入のため角膜混濁を来し、視力低下をきたしていた。

3眼で、術後早期より培養上皮シートの生着は良好であり、炎症所見も極めて軽度、視力も著明に改善している。一眼のみ、術後瞼球癒着の再発がおこった。現在術後平均経過観察期間は20ヶ月に及ぶが、拒絶反応、難治性感染など、重篤な副作用、合併症は認められていない。



#### D. 考察

重症多形滲出性紅斑の眼表面再建術においては、術後早期に健常な上皮細胞を供給することにより、炎症所見の軽減を得ることが可能である。今回の結果より、培養角膜上皮シート移植は安全に、かつ、高い治療効果を得られることが明らかになりつつある。今後は、症例を増やし、経過観察を続けることにより、長期予後についても引き続き検討していきたい。

#### E. 結論

重症多形滲出性紅斑に対する培養角膜上皮シート移植は非常に有用である。長期的な予後について今後も経過を観察する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表（平成 16 年度）

##### 1. 論文発表

###### 英語論文

1. Wei Zhang, Takashi Suzuki, Atsushi Shiraishi, Ichiroh Shimamura, Yoshitsugu Inoue, Yuichi Ohashi : Dendritic keratitis caused by an acyclovir-resistant herpes simplex virus with frameshift mutation. *Cornea*, 26: 105-106, 2007.
2. Masahiko Yamaguchi, Miki Kutsuna, Toshihiko Uno, Xiaodong Zheng, Toshiniko Kodama, Yuichi Ohashi : Marx line: fluorescein staining line on the inner lid as indicator of meibomian gland function. *Am J*

*Ophthalmol*, 141: 669-675, 2006.

3 Junji Narioka, Yuichi Ohashi : Changes in Lumen Width of Nasolacrimal drainage system after adrenergic and cholinergic stimulation. *Am J Ophthalmol*, 141: 689-698, 2006.

4. Yasuaki Yamamoto, Toshihiko Uno, Katsumi Shisida, Longquan Xue, Atsushi Shiraishi, Xiaodong Zheng, Yuichi Ohashi : Demonstration of aqueous streaming through a laser iridotomy window against the corneal endothelium. *Archives of Ophthalmology*, 124: 387-393, 2006.

5. Shiro Mizoue, Masaru Iwai, Ayumi Ide, Jun Suzuki, Masatsugu Horiuchi, Yuichi Ohashi : Role of Angiotensin II receptor subtypes in conjunctival wound healing. *Current Eye Research*, 31: 129-136, 2006.

###### 日本語論文

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

微量点眼法の開発

分担研究者 小泉範子 同志社大学研究開発推進機構 助教授

**研究要旨** 重症多形滲出性紅斑に対する培養粘膜上皮シート移植術では、移植後の遷延性上皮欠損など粘膜上皮細胞の上皮修復障害による合併症が治療成績を左右する。これまでに、遷延性角膜上皮欠損の治療法として、NGF(nerve growth factor)などの増殖因子の投与が有効であることが報告されているが、薬剤が非常に高価であるために点眼薬として使用することができない。我々は、重症多形滲出性紅斑における遷延性上皮欠損に対する NGF 点眼治療の臨床応用を目的として、噴霧技術を応用した NGF 微量点眼法の開発に着手し、NGF の薬液物性と噴霧特性に関する検討を行った。

**A. 研究目的**

重症多形滲出性紅斑における眼合併症では、角膜上皮幹細胞の障害や角膜上への結膜侵入などを生じ、重篤な視力低下を生じる。我々は、これまでに羊膜を基質とした培養粘膜上皮シート移植（培養角膜上皮シート移植および培養口腔粘膜上皮シート移植）の開発を行い、良好な結果を報告している。しかし角膜上皮幹細胞が重度の障害を受けた、重症多形滲出性紅斑においては、培養粘膜上皮シート移植後の合併症として、上皮シートの細胞の脱落亢進、あるいは増殖能低下にともなう遷延性上皮障害を生じることが知られている。このような難治性の角膜上皮障害に対しては、細胞増殖因子である NGF (nerve growth factor) の点眼治療

が有効であることが報告されている。しかし、NGF は非常に高価であるために、点眼薬として臨床応用されていない。一方、眼科治療に一般的に用いられている液滴式点眼法では、1 滴 30-50  $\mu$ l で薬液が投与されており、眼表面に保持できる涙液量の最大値である 30  $\mu$ l を超え、投与した薬剤の大半は眼瞼縁からあふれ出ていることが知られている。必要以上の薬液を投与する現在の点眼法では、副作用を招くだけでなく、高価な薬剤を無駄に使用することになる。我々は、重症多形滲出性紅斑をはじめとする重症眼疾患に対する NGF 点眼治療を可能にし、培養粘膜上皮シート移植治療後の予後を改善することを目的として、噴霧技術を応用した新規の微量点眼薬投与法の開発

を試みた。本研究は、同志社大学工学部、高野頌教授との共同研究である。

## B. 研究方法

NGF の微量点眼投与を行うために必要な、薬液物性と噴霧特性に関する基礎事項を解析した。測定試料として  $100\ \mu\text{g/ml}$  NGF 溶液を用いて、薬液の密度、粘度、表面張力、pH などの薬液物性を測定し、生理食塩水の物性と比較した。さらにメッシュ式ネブライザーNE-U22（オムロンヘルスケア）を用いて生理食塩水を噴霧し、噴霧孔にパルスレーザーを照射して、薬液の液柱形成をデジタルカメラにより撮影し、撮影された画像を解析した。噴霧孔サイズを  $3.6\ \mu\text{m}$ 、 $4.8\ \mu\text{m}$ 、 $8.1\ \mu\text{m}$  に変化させたときに噴霧される薬液の液柱径、長さ、薬液粒子の空気力学径、速度、さらに一定時間霧化したときの霧化量を測定し、NGF の霧化特性を評価した。

## C. 研究結果

### 1) 薬液物性の実測値

NGF 溶液は、密度  $1003.8\text{kg/m}^3$ 、粘度  $9.04 \times 10^{-4}\text{Pa}\cdot\text{s}$ 、表面張力  $55.3 \times 10^{-2}\text{N/m}$ 、pH 4.83 であり、生理食塩水は、密度  $1003.3\text{kg/m}^3$ 、粘度  $9.57 \times 10^{-4}\text{Pa}\cdot\text{s}$ 、表面張力  $71.9 \times 10^{-2}\text{N/m}$ 、pH 6.05 であった。

### 2) 液柱および噴霧薬液粒子の空気力学径測定結果

噴霧孔サイズ変化における液柱長さ、液柱径および粒子の空気力学径を測定した結果、

液柱長さおよび液柱径は噴霧孔サイズ変化に対して有意に変化し、噴霧孔サイズが大きくなるほど長く、径の大きな液柱が形成された。各噴霧孔から生じた粒子の密度分布を解析した結果、噴霧孔サイズが大きくなると粒子速度も大きくなることがわかった。また霧化量測定結果から、 $3.5\ \mu\text{m}$  および  $4.8\ \mu\text{m}$  の霧化孔を用いた場合に  $1\ \mu\text{l}$  の薬液を霧化するのに必要な時間は  $0.1\text{--}0.20$  秒であり、点眼投与を行う上で実用的な時間であった。以上の結果より、NGF の微量点眼を行ううえでは  $3.6\ \mu\text{m}$  あるいは  $4.8\ \mu\text{m}$  の噴霧孔を用いた噴霧投与が有用であると考えられた。

## D. 考察

重症多形滲出性紅斑における眼合併症の治療に有用な NGF 点眼投与法を可能にするために、噴霧点眼による NGF 微量投与の可能性を検討した。霧化された薬液粒子の粒子径は、薬液の密度、粘度、表面張力などの物性による影響を受けるが、今回使用した NGF 溶液のような低濃度薬液では、物性変化はわずかであり、霧化特性には影響しないと考えられた。今回の NGF 溶液と生理食塩水の物性測定、ならびに生理食塩水を用いた噴霧実験により、メッシュ式ネブライザーを用いることにより NGF 溶液を噴霧することが可能であることが明らかとなった。

## E. 結論

メッシュ式ネブライザーを用いて NGF を霧化することにより、少量の薬液を効率的に眼表面へ投与する治療法の開発が可能であると考えられた。NGF 微量点眼投与が可能になれば、重症多形滲出性紅斑患者の遷延性上皮欠損に対する有用な治療法となる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表（平成 18 年度）

##### 1. 論文発表

##### 英語論文

1. Inatomi T, Nakamura T, **Koizumi N**, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S: Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. Am J Ophthalmol. 141(2): 267-275, 2006 .
2. Tanioka H, Kawasaki S, Yamazaki K, Ang LPK, **Koizumi N**, Nakamura T, Yokoi N, Komuro A, Inatomi T, Kinoshita S: Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 47(9): 3820-27, 2006.
3. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LPK, **Koizumi N**, Yokoi N, Kinoshita S: Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. Ophthalmology, 113(10): 1765-72, 2006.
4. Inatomi T, Nakamura T, Kojyo M, **Koizumi N**, Sotozono C, Kinoshita S: Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. Am J Ophthalmol, 142(5): 757-64, 2006.
5. Ang LPK\*, Nakamura T\*, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S.: Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplantation for severe ocular surface disease. \*co-first authors. Arch Ophthalmol, 124(11): 1543-51, 2006.
6. **Koizumi N**, Rigby H, Fullwood N.J, Kawasaki S, Tanioka H, Koizumi K, Kociok N, Jousen A.M, Kinoshita S: Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 245(1): 123-34, 2007.
7. Ang LP, Sotozono C, **Koizumi N**, Suzuki T, Inatomi T, Kinoshita S: A comparison between cultivated and conventional limbal stem cell transplantation for Stevens-johnson syndrome. Am J Ophthalmol. 143(1): 178-80, 2007.
8. Sotozono C, Ang LPK, **Koizumi N**, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi

N, Kaido M, Murato D, Shimazaki J, Tsubota K, Masakazu Yamada, Kinoshita S: A new grading system for the evaluation of chronic ocular manifestations in patients with Stevens-Johnson syndrome. Ophthalmology. in press.

#### 日本語論文

なし

#### 2. 学会発表

1. Cannon C.J, Boote C, **Koizumi N**, Kinoshita S, Meek K.M: Collagen Fibril Structure and Organization Within Amniotic Membranes Used in Ocular Surface Regeneration. 2006 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, U.S.A., 2006.5.2.
2. Sotozono C, **Koizumi N**, Yamasaki K, Inatomi T, Kinoshita S: Interleukin-8 Levels In Human Tears During Diseased Ocular Status. 2006 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, U.S.A., 2006.5.3.

3. Nakamura T, **Koizumi N**, Sotozono C, Kinoshita S: Effect of Autologous Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation on Ocular Surface Reconstruction. 2006 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, U.S.A., 2006.5.4.
4. 西田潤一、小泉範子、木下茂、伊藤正行、高野頌：眼科領域における噴霧点眼による微量薬液投与。日本医工学治療学会第23回学術大会，大阪，2007. 2. 11.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名                             | 巻号  | ページ       | 出版年  |
|--|--|----------------------------------|-----|-----------|------|
| Nakamura T, Ang L PK, Rigby H, Sekiyama E, Inatomi T, <b>Sotozono C</b> , Fullwood NJ, <b>Kinoshita S</b>  | The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens Johnson syndrome.           | <b>Invest Ophthalmol Vis Sci</b> | 47  | 909-916   | 2006 |
| Kawasaki S, Tanioka H, Yamasaki K, Yokoi N, Komuro A, <b>Kinoshita S</b>   | Clusters of Corneal Epithelial Cells Reside Ectopically in Human Conjunctival Epithelium.  | <b>Invest Ophthalmol Vis Sci</b> | 47  | 1359-1367 | 2006 |
| Nakamura T, Inatomi T, <b>Sotozono C</b> , Ang LPK, <b>Koizumi N</b> , Yokoi N, <b>Kinoshita S</b>   | Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal equivalents for the treatment of severe ocular surface disease.                 | <b>Ophthalmology</b>             | 113 | 1765-1772 | 2006 |
| Tanioka H, Kawasaki S, Yamasaki K, Ang LP, <b>Koizumi N</b> , Nakamura T, Yokoi N, Komuro A, Inatomi T, <b>Kinoshita S</b>   | Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation. | <b>Invest Ophthalmol Vis Sci</b> | 47  | 3820-3827 | 2006 |
| Ang LPK, Nakamura T, Inatomi T, <b>Sotozono C</b> , <b>Koizumi N</b> , Yokoi N, <b>Kinoshita S</b>   | Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplantation for severe ocular surface disease  | <b>Arch Ophthalmol</b>           | 124 | 1543-1551 | 2006 |
| Ueta M, <b>Sotozono C</b> , Tokunaga K, Yabe T, <b>Kinoshita S</b>   | Strong association between HLA-A*0206 and Stevens-Johnson syndrome in the Japanese.  | <b>Am J Ophthalmol</b>           | 143 | 367-368   | 2007 |
| Ueta M, <b>Sotozono C</b> , Inatomi T, Kojima K, Tashiro K, Hamuro J, <b>Kinoshita S</b>   | Toll like receptor 3 gene polymorphisms in Japanese patients with Stevens-Johnson syndrome.  | <b>Br J Ophthalmol</b>           |     | in press  | 2007 |
| <b>Sotozono C</b> , Ang LPK, <b>Koizumi N</b> , Higa shihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi N, Kaido M, Dogru M, Shimazaki J, <b>Tsubota K</b> , Yamada M, <b>Kinoshita S</b> | A new grading system for the evaluation of chronic ocular manifestations in patients with Stevens-Johnson syndrome.                            | <b>Ophthalmology</b>             |     | in press  |      |
| Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, <b>Sotozono C</b> , Yokoi N, <b>Kinoshita S</b>  | Mid-term results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation.                         | <b>Am J Ophthalmol</b>           | 141 | 267-275   | 2006 |

|  |  |                               |     |             |      |
|--|--|-------------------------------|-----|-------------|------|
| Inatomi T,<br>Nakamura T, Kojyo<br>M, <b>Koizumi N,</b><br><b>Sotozono C,</b><br><b>Kinoshita S</b>  | Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty.                                    | <b>Am J Ophthalmol</b>        | 142 | 757-764     | 2006 |
| Kaido M, Dogru M,<br>Yamada M, <b>Sotozono C,</b><br><b>Kinoshita S,</b><br>Shimazaki J,<br>Tsubota K                                      | Functional visual acuity in Stevens-Johnson syndrome.  | <b>Am J Ophthalmol.</b>       | 142 | 917-922     | 2006 |
| Ang LP, <b>Sotozono C,</b><br>Koizumi N, Suzuki T,<br>Inatomi T,<br><b>Kinoshita S</b>   | A comparison between cultivated and conventional limbal stem cell transplantation for Stevens-Johnson syndrome.  | <b>Am J Ophthalmol.</b>       | 143 | 178-180     | 2007 |
| <b>外園千恵</b>  | 薬疹と眼障害.  | 皮膚科診療プラクティス<br>薬疹を極める (塩原哲夫編) | 19  | 259-263     | 2006 |
| <b>木下 茂、外園千恵、</b><br>稲富勉、中村隆宏、<br><b>小泉範子、</b> 川崎諭、<br>上田真由美、横井則彦、<br>上野盛夫、<br>笹井芳樹  | 再生医学による重症角膜疾患の新規治療法開発への戦略的研究。(ベルツ章受賞論文)  | 最新医学                          | 62  | 132-180     | 2007 |
| Yang L, Yamasaki K,<br>Shirakata Y, Dai X,<br>Tokumaru S, Yahata Y,<br>Tohyama M, Hanakawa Y,<br>Sayama K, <b>Hashimoto K</b>              | Bone morphogenetic protein-2 modulates Wnt and frizzled expression and enhances the canonical pathway of Wnt signaling in normal keratinocytes.                                  | <b>J Dermatol Sci.</b>        | 42  | 111-119     | 2006 |
| Dai X, Sayama K, Yamasaki K,<br>Tohyama M, Shirakata Y,<br>Hanakawa Y, Tokumaru S,<br>Yahata Y, Yang L,<br>Yoshimura A, <b>Hashimoto K</b> | SOCS1 negative feedback of STAT1 activation is a key pathway in the dsRNA-induced innate immune response of human keratinocytes.   | <b>J Invest Dermatol.</b>     | 126 | 1574-1581   | 2006 |
| Yahata Y, Shirakata Y,<br>Tokumaru S, Yang L,<br>Dai X, Tohyama M,<br>Tsuda T, Sayama K,<br>Iwai M, Horiuchi M,<br><b>Hashimoto K</b>      | A novel function of angiotensin II in skin wound healing: Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via HB-EGF-mediated EGF receptor transactivation. | <b>J Biol Chem</b>            | 281 | 13209-13216 | 2006 |
| Yang L, Shirakata Y,<br>Shudou M, Dai X,<br>Tokumaru S, Hirakawa S,<br>Sayama K, Hamuro J,<br><b>Hashimoto K</b>                           | New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane.  | <b>Cell Tissue Res</b>        | 326 | 69-77       | 2006 |

|   |   |                                   |     |             |      |
|---|---|-----------------------------------|-----|-------------|------|
| Sayama K, Hanakawa Y, Nagai H, Shirakata Y, Dai X, Hirakawa S, Tokumaru S, Tohyama M, Yang L, Sato S, Akira S, <b>Hashimoto K</b> | Transforming growth factor beta activated kinase 1 is essential for differentiation and the prevention of apoptosis in epidermis.             | <b>J Biol Chem.</b>               | 281 | 22013-22020 | 2006 |
| Shiraishi K, Yamasaki K, Nanba D, Inoue H, Hanakawa Y, Shirakata Y, <b>Hashimoto K</b> , Higashiyama S                            | Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. | <b>Oncogene</b>                   | 26  | 339-348     | 2007 |
| Shirakata Y, Kishimoto J, Tokumaru S, Yamasaki K, Hanakawa Y, Tohyama M, Sayama K, <b>Hashimoto K</b>                             | Epiregulin, a member of the EGF family, is over-expressed in psoriatic epidermis.   | <b>J Dermatol Sci</b>             | 45  | 69-72       | 2007 |
| Nanba D, Kinugasa Y, Morimoto C, Koizumi M, Yamamura H, Takahashi K, Takakura N, Mekada E, <b>Hashimoto K</b> , Higashiyama S     | Loss of HB-EGF in smooth muscle or endothelial cell lineages causes heart malformation.   | <b>Biochem Biophys Res Commun</b> | 350 | 315-321     | 2006 |
| Komatsuzawa H, Ouhawa K, Yamada S, Fujiwara T, Sayama K, <b>Hashimoto K</b> , and Sugai M   | Innate defences against methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) infection.   | <b>J Pathol</b>                   | 208 | 249-260     | 2006 |
| Yoshida M, Hamada T, Amagai M, <b>Hashimoto K</b> , Uehara R, Yamaguchi K, Imamura K, Okamoto E, Yasumoto S, Hashimoto T          | Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP-230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid.           | <b>J Dermatol Sci</b>             | 41  | 21-30       | 2006 |
| Niiya H, Lei J, Guo Y, Azuma T, Yakushijin Y, Sakai I, Hato T, Tohyama M, <b>Hashimoto K</b> , Yasukawa M                         | Human herpesvirus 6 impairs differentiation of monocytes to dendritic cells.  | <b>Exp Hematol</b>                | 34  | 642-653     | 2006 |
| Cao F, Hata R, Zhu P, Ma YJ, Tanaka J, Hanakawa Y, Hashimoto Y, <b>Hashimoto K</b> , Niinobe M, Yoshikawa K, Sakanaka M           | Overexpression of SOCS3 inhibits astroglialogenesis and promotes maintenance of neural stem cells.  | <b>J Neurochem</b>                | 98  | 459-470     | 2006 |



|   |  |   |     |           |      |
|---|--|---|-----|-----------|------|
| Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Sayama K, <b>Hashimoto K</b> , Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H            | Antimicrobial peptides human b defensins stimulate keratinocyte migration, proliferation of proinflammatory cytokines and chemokines.                                | <b>J Invest Dermatol</b>                  | 127 | 594-604   | 2006 |
| Shimmura S, Miyashita H, Higa K, Yoshida S, Shimazaki J, <b>Tsubota K</b>                               | Proteomic analysis of soluble factors secreted by limbal fibroblasts.  | <b>Mol Vis</b>                            | 12  | 478-484   | 2006 |
| Shimmura S, Miyashita H, Uchino Y, <b>Tsubota K</b> et al.  | Microkeratome-assisted deep lamellar keratoprosthesis (DLKPro).  | <b>Br J Ophthalmol</b>                    | 90  | 826-829   | 2006 |
| Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, <b>Tsubota K</b>   | Ocular surface epithelium epithelial cells upregulate HLA-G when expanded in vitro on amniotic membrane substrates.  | <b>Cornea</b>                             | 25  | 715-721   | 2006 |
| Uchino Y, Shimmura S, Miyashita H, Taguchi T, Kobayashi H, Shimazaki J, Tanaka J, <b>Tsubota K</b>      | Amniotic membrane immobilized poly (vinyl alcohol) hybrid polymer as an artificial cornea scaffold that supports a stratified and differentiated corneal epithelium. | <b>J Biomed Mater Res B Appl Biomater</b> |     | in press  | 2007 |
| Yoshida S, Shimmura S, Kawakita T, Den S, Shimazaki J, <b>Tsubota K</b>                                 | Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surface.   | <b>Invest Ophthalmol Vis Sci</b>          | 47  | 4780-4786 | 2006 |
| Yoshida S, Shimmura S, Matsuzaki Y, Okano H, <b>Tsubota K</b>   | Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea.  | <b>Stem Cells</b>                         | 24  | 2714-2722 | 2006 |
| Higa K, Shimmura S, Kawakita T, Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda K, Shimazaki J, <b>Tsubota K</b>        | Proliferation and differentiation of transplantable epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier.                                       | <b>Invest Ophthalmol Vis Sci</b>          | 48  | 597-604   | 2007 |
| Wei Zhang, Takashi Suzuki, Atsushi Shiraishi, Ichiroh Shimamura, Yoshitsugu Inoue, <b>Yuichi Ohashi</b> | Dendritic keratitis caused by an acyclovir-resistant herpes simplex virus with frameshift mutation.  | <b>Cornea</b>                             | 26  | 105-106   | 2007 |
| Masahiko Yamaguchi, Miki Kutsuna, Toshiko Uno, Xiodong Zheng, Toshiniko Kodama, <b>Yuichi Ohashi</b>    | Marx line fluorescein staining line on the inner lid as indicator of meibomian gland function.   | <b>Am J Ophthalmol</b>                    | 141 | 669-675   | 2006 |
| Junji Narioka, <b>Yuichi Ohashi</b>   | Changes in Lumen Width of Nasolacrimal drainage system after a drenergic and cholinergic stimulation.  | <b>Am J Ophthalmol</b>                    | 141 | 689-698   | 2006 |

|   |   |   |     |         |      |
|---|---|---|-----|---------|------|
| Yasuaki Yamamoto, Toshihiko Uno, Katsumi Shisida, Longquan Xue, Atsushi Shirashi, Xiaodong Zheng, <b><u>Yuichi Ohashi</u></b>           | Demonstration of aqueous streaming through a laser iridotomy window against the corneal endothelium.                            | <b>Archives of Ophthalmology</b>        | 124 | 387-393 | 2006 |
| Shiro Mizoue, Masaru Iwai, Ayumi Ide, Jun Suzuki, Masatsugu Horiuchi, <b><u>Yuichi Ohashi</u></b>                                       | Role of Angiotensin II receptor subtypes in conjunctival wound healing.   | <b>Current Eye Research</b>             | 31  | 129-136 | 2006 |
| <b><u>Koizumi N</u></b> , Rigby H, Fullwood N.J, Kawasaki S, Tanioka H, Koizumi K, Kociok N, Jousseaume A. M, <b><u>Kinoshita S</u></b> | Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. | <b>Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol</b> | 245 | 123-134 | 2007 |

# The Use of Autologous Serum in the Development of Corneal and Oral Epithelial Equivalents in Patients with Stevens-Johnson Syndrome

Takahiro Nakamura,<sup>1,2</sup> Leonard P. K. Ang,<sup>1,3</sup> Helen Rigby,<sup>4</sup> Eiichi Sekiyama,<sup>1</sup> Tsutomu Inatomi,<sup>1</sup> Chie Sotozono,<sup>1</sup> Nigel J. Fullwood,<sup>4</sup> and Shigeru Kinoshita<sup>1</sup>

**PURPOSE.** To evaluate the use of autologous serum (AS) from patients with severe ocular surface disease (OSD) in the development of transplantable corneal and oral epithelial tissue equivalents and to compare it with the use of conventional culture methods by using fetal bovine serum (FBS).

**METHODS.** AS was obtained from patients with severe OSD secondary to Stevens-Johnson syndrome. Corneal and oral epithelial cells were cultivated in medium supplemented with either AS or FBS. Corneal and oral epithelial equivalents were constructed on denuded amniotic membranes. The bromodeoxyuridine (BrdU) ELISA cell proliferation assay and colony-forming efficiency (CFE) of cells cultivated in AS- or FBS-supplemented media were compared. The morphologic characteristics and the basement membrane assembly of cultivated epithelial equivalents were analyzed by light and electron microscopy, as well as by immunohistochemistry.

**RESULTS.** BrdU proliferation assay and CFE analysis showed that human corneal and oral epithelial cells cultivated in AS-supplemented media had comparable proliferative capacities compared with FBS-supplemented media. The corneal and oral epithelial equivalents cultivated in AS- and FBS-supplemented media were morphologically similar and demonstrated the normal expression of tissue-specific keratins and basement membrane assembly. The presence of a well-formed stratified epithelium, a basement membrane, and hemidesmosomal attachments was confirmed by electron microscopy.

**CONCLUSIONS.** AS-supplemented cultures were effective in supporting the proliferation of human corneal and oral epithelial cells, as well as the development of transplantable epithelial equivalents. The use of AS is of clinical importance in the development of autologous xenobiotic-free bioengineered oc-

ular surface equivalents for clinical transplantation. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:909–916) DOI:10.1167/iovs.05-1188

Severe ocular surface disease (OSD), arising from conditions such as Stevens-Johnson syndrome (SJS) and ocular cicatricial pemphigoid, is a potentially devastating condition with significant visual morbidity. In such cases, the corneal epithelial stem cells in the limbus are destroyed, resulting in invasion of the corneal surface by surrounding conjunctiva, neovascularization, chronic inflammation, ingrowth of fibrous tissue, and stromal scarring.<sup>1–3</sup> Conventional corneal transplantation in these patients is associated with dismal results. Alternative methods such as keratoepithelioplasty and limbal transplantation have been used to reconstruct these severely damaged eyes, with improved clinical outcomes.<sup>4,5</sup> More recently, cultivated corneal epithelial stem cell transplantation has demonstrated promising results and has gained general acceptance as an effective treatment modality.<sup>6–9</sup> We,<sup>10</sup> together with other investigators,<sup>11</sup> have also demonstrated the effective use of autologous cultivated oral epithelial transplantation for the treatment of severe OSD, with the advantage that this reduces the risk of allograft rejection and the need for long-term steroids or immunosuppression.

The currently preferred method of cultivating corneal or oral epithelial cells requires the use of xenobiotic materials, such as fetal bovine serum (FBS) and 3T3 feeder cells, in the culture system. Various serum-free culture systems, developed to obviate the need for FBS, have mainly been used to study the roles of various growth factors.<sup>12–14</sup> The clinical use of these serum-free culture systems has been limited because of their lower efficacy for cell propagation compared with bovine serum-supplemented medium. In the development of tissue equivalents for clinical transplantation, the ideal culture condition is one that is safe from disease transmission, as well as being able to support cell proliferation and differentiation. The use of autologous human serum as an alternative to FBS is therefore significantly advantageous, because it eliminates the need for bovine material in the culture process. This is particularly important when *ex vivo* expanding cells for clinical transplantation, because it reduces the risk of transmission of diseases, for example, spongiform encephalitis, or other unknown infections.

Ang et al.<sup>15</sup> previously showed that human serum was able to support the *in vitro* and *in vivo* proliferation of cultivated human conjunctival cells. We wanted to determine whether autologous serum (AS) from patients with severe OSD was similarly efficacious in supporting cell proliferation, as well as the development of cultivated ocular surface epithelial equivalents, compared with conventional FBS supplemented culture conditions. We also sought to show that these transplantable bioengineered epithelial equivalents bore similar morphologic characteristics and differentiation-related keratin expression as the tissue of origin and possessed the necessary cell-to-cell and cell-to-substrate junctional elements (such as integrins and hemidesmosomes) for ensuring graft integrity after transplan-

From the <sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan; <sup>2</sup>Research Center for Regenerative Medicine, Doshisha University, Kyoto, Japan; <sup>3</sup>Singapore National Eye Center, Singapore; and <sup>4</sup>Institute of Environmental and Natural Sciences, Lancaster University, Lancaster, United Kingdom.

Supported in part by Grants-in-Aid for scientific research from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; a research grant from the Kyoto Foundation for the Promotion of Medical Science; and the Intramural Research Fund of Kyoto Prefectural University of Medicine.

Submitted for publication September 6, 2005; revised October 27, 2005; accepted January 11, 2006.

Disclosure: T. Nakamura, None; L.P.K. Ang, None; H. Rigby, None; E. Sekiyama, None; T. Inatomi, None; C. Sotozono, None; N.J. Fullwood, None; S. Kinoshita, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Takahiro Nakamura, Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kawaramachi Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0841, Japan; tnakamur@ophth.kpu-m.ac.jp.

tation. To our knowledge, a study of this nature has not been previously reported. This study has important clinical implications, because it provides the basis for developing safer autologous bioengineered tissues for clinical transplantation.

## MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures and clinical applications introduced here were approved by the Institutional Review Board for Human Studies of Kyoto Prefectural University of Medicine; prior informed consent was obtained from all patients in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki for research involving human subjects.

### Preparation of Amniotic Membrane

Human amniotic membranes (AM) were obtained from mothers who had undergone cesarean sections. Under sterile conditions, the membranes were washed with PBS that contained antibiotics (5 mL 0.5% levofloxacin) and were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in modified medium (Dulbecco's modified Eagle's medium; GibcoBRL, Rockville, MD) and glycerol (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) in the ratio of 1:1 by volume. Immediately before use, the AM was thawed, washed three times with sterile PBS that contained antibiotics, and cut into pieces approximately  $4 \times 4$  cm in size. The overlying amniotic epithelial cells were removed by incubation with 0.02% EDTA (Nacalai Tesqu Co., Kyoto, Japan) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 2 hours, followed by gentle scraping with a cell scraper (Nunc International, Naperville, IL).

### Subjects and Harvesting of Serum

Patients with severe OSD secondary to SJS were enrolled in the study. These patients manifested severe destruction of the ocular surface, limbal stem cell deficiency, total conjunctivalization of the cornea, and conjunctival cicatrization. The patients comprised 1 male and 3 females; their ages ranged from 27 to 69 years (mean,  $49.3 \pm 22.4$  years). AS was obtained from these patients. Venesection was performed at the antecubital fossa under aseptic conditions; 30 mL of blood was collected into a sterile container, centrifuged, and filtered; the resultant serum (approximately 10 mL) was purified. Each patient's serum was stored in sterile tubes at  $-30^{\circ}\text{C}$ . For experimental controls, we used 4 randomly selected distinct lots of FBS (ICN Inc., Aurora, OH).

### Cultivation of Human Corneal and Oral Epithelial Cells

**Corneal Epithelial Culture.** Because all these patients had bilateral limbal stem cell deficiency, with the absence of any normal corneal epithelium, corneal epithelial cells were obtained from human corneoscleral rims from the Northwest Lion Eye Bank (Seattle, WA). These corneoscleral rims were first incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 hour with 1.2 IU dispase to separate the epithelial cells, as previously described.<sup>16</sup> Cells from the limbal and peripheral corneal region were carefully separated from the underlying stroma.

**Oral Epithelial Culture.** We obtained oral mucosal biopsy specimens ( $2\text{--}3$  mm<sup>2</sup>) from these patients and volunteers while they were under local anesthesia. The submucosal connective tissue was removed with scissors to the extent possible; the resulting samples were then incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 hour with 1.2 IU dispase, as previously described,<sup>17</sup> and were treated with 0.05% Trypsin-EDTA solution for 10 minutes at room temperature to separate the cells.

After cell separation, the resultant corneal and oral epithelial cells were then seeded onto tissue culture dishes at a density of  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. The culture medium consisted of defined keratinocyte growth medium (KGM; Amnitect, Tokyo, Japan) supplemented with

5% AS or 5% FBS, as well as insulin (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cholera toxin (0.1 nmol/L), human-recombinant epidermal growth factor (10 ng/mL), and penicillin-streptomycin (50 IU/mL).<sup>18</sup> Cultures were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5% CO<sub>2</sub>-95% air incubator, and the medium was changed every day.

### Quantitation of Proliferative Capacity and Clonal Growth of Cells

The following proliferation assays were used to assess the proliferative capacity of the cells cultured with either AS- or FBS-supplemented media.

**Bromodeoxyuridine (BrdU)-ELISA Cell Proliferation Assay.** The proliferative capacity of human corneal or oral epithelial cells (passage 1) was determined by a BrdU-ELISA cell proliferation assay (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) by using a previously reported protocol.<sup>15,19</sup> Analyses were performed on the sixth day of passage. Cultured cells were incubated with 10  $\mu\text{M}$  BrdU-labeling solution for 20 hours at  $37^{\circ}\text{C}$ , followed by washing with 250  $\mu\text{L}$  PBS that contained 10% serum per well. They were fixed with 70% ethanol in hydrochloric acid for 30 minutes at  $-20^{\circ}\text{C}$  and incubated with 100  $\mu\text{L}$  of monoclonal antibody against BrdU for 90 minutes, followed by 100  $\mu\text{L}$  peroxidase substrate per well. The BrdU absorbance in each well was measured directly with a spectrophotometric microplate reader at a test wavelength of 450 nm and a reference wavelength of 490 nm. This gave us a measure of the degree of cell proliferation, which we termed the proliferation index (PI). Each sample was cultured in triplicate.

**Colony-forming Efficiency.** The clonal growth ability of cultured corneal or oral epithelial cells by using AS- and FBS-supplemented media was determined by the colony-forming efficiency (CFE). Cells were plated at a clonal density of 1000 cells onto 6-well culture dishes. A colony was defined as a group of eight or more contiguous cells.<sup>15,19</sup> The colonies were fixed on day 8, stained with 0.1% Truidine blue and counted independently by 3 investigators; the data were then averaged. Each sample was cultured in triplicate.

The CFE was defined as follows

$$\text{CFE (\%)} = \frac{\text{Colonies formed at the end of growth period}}{\text{Total number of viable cells seeded}} \times 100 (\%)$$

### The Development of Corneal and Oral Epithelial Equivalents

Corneal and oral epithelial cells were initially enzymatically separated as described above. The separated cells were then seeded onto denuded amniotic membranes spread on culture inserts in 6-well culture plates, at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well. These were cocultured with mitomycin-C-inactivated 3T3 fibroblasts ( $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>).<sup>17,18</sup> The cells were incubated with AS- and FBS-supplemented culture media, as described above. The cultures were submerged in medium for 2 weeks and then exposed to air by lowering the medium level (airlifting) for 1 to 2 days. Cultures were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5% CO<sub>2</sub>-95% air incubator, and the medium was changed every day.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies of several tissue-specific keratins and basement membrane-related proteins in corneal and oral epithelial sheets cultivated by using AS- or FBS-supplemented media were carried out by following our previously described method.<sup>20,21</sup> Normal human cornea and oral samples were also examined for comparison. Briefly, cryostat sections (7- $\mu\text{m}$  thick) were placed on gelatin-coated slides and air-dried, then rehydrated in PBS at room temperature for 15 minutes. To block nonspecific binding, the tissues were incubated with 2% BSA at room temperature for 30 minutes. Subsequently, the sections were incubated at room temperature for 1 hour with the primary antibody (Table 1), then washed three times in PBS that contained 0.15% Triton