

FIGURE 2. Dynamic changes of visual acuity (VA). Average logarithm of minimal angle of resolution (logMAR) functional visual acuity (FVA) showed timewise decrease during testing in patients with Stevens-Johnson syndrome (SJS), patients with Sjögren syndrome (SS), and normal subjects, but the time-wise decline of FVA was greater in patients with SS and SJS compared with normal subjects.

TABLE 2. Changes of Visual Maintenance Ratio

| Patient | n | At 10 Seconds | At 20 Seconds | At 30 Seconds |
|---------|----|---------------|---------------|---------------|
| Normal | 20 | 0.87 ± 0.06 | 0.82 ± 0.08 | 0.77 ± 0.09 |
| SS | 40 | 0.79 ± 0.10* | 0.71 ± 0.09* | 0.70 ± 0.09 |
| SJS | 68 | 0.61 ± 0.26* | 0.55 ± 0.09* | 0.55 ± 0.18* |

SS = Sjögren syndrome; SJS = Stevens-Johnson syndrome.

* By *t* test.

**P* < .05.

between the clinical findings and mean logMAR FVA showed a relation between the presence of corneal opacity and vessels and the 10-second FVA scores.

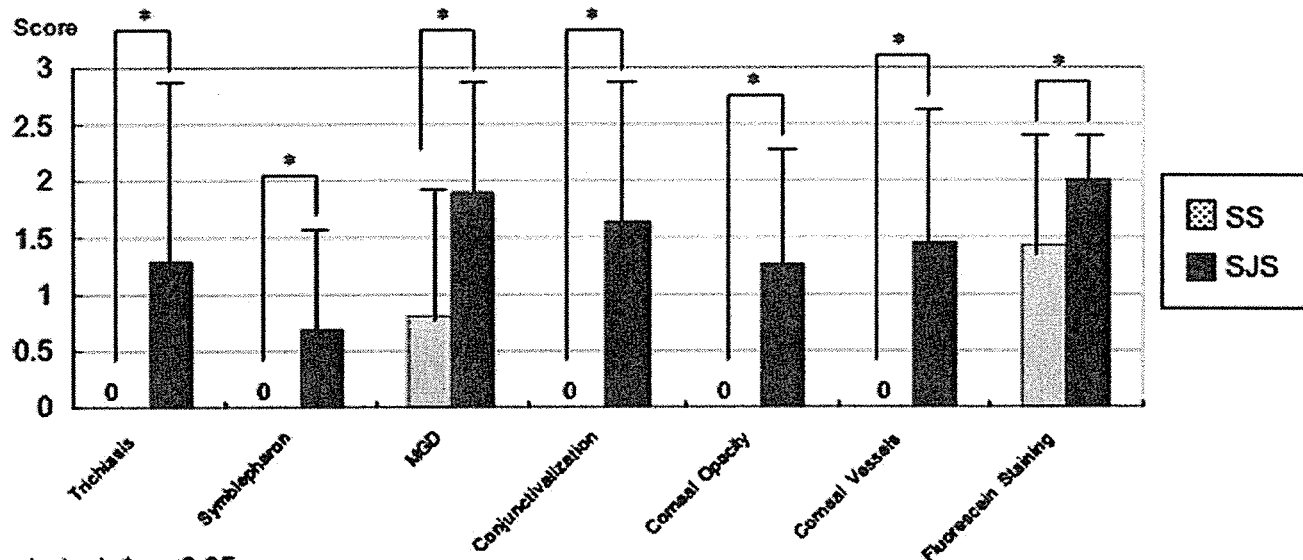
DISCUSSION

ALTHOUGH STANDARD VA TESTING IS A GOOD MEASURE of one aspect of visual function, contrast sensitivity and glare testing provide other important and detailed information on visual function. Recently, FVA testing described as "FVA without blinking" has been reported to be an important method of defining "detailed visual function."⁸ This method has been shown to be efficient in the detection of "masked impairment of visual function" in patients with dry eye who complain of decreased VA despite normal conventional VA. The definition of FVA testing has been suggested to be an important indication of an individual's performance in relation to certain daily activities involving visual performance. Vision-targeted health-related quality-of-life assessments quantify an aspect of dry eye disease distinct from "irritative dry eye symptoms or dry eye signs," which may not be measurable. The concept of FVA was first introduced by Goto and associates,⁸ who previously reported abnormalities of FVA

in subjects with dry eye. The major drawbacks in that study were the subjectivity of the method of measurement and uncertainty of the timing of FVA measurements because the VA measurements were carried out with conventional Landolt charts. Ishida and associates¹³ also reported that FVA in dry eyes was markedly lower than in control subjects, and that FVA after punctum plug insertion greatly improved. FVA has also been reported to be effective in evaluating dynamic visual function changes after laser-assisted in situ keratomileusis.²⁰

In this study, we aimed to study the changes of FVA in patients with SJS, comparing the findings with the results of patients with SS and with healthy control subjects. We chose patients with SJS because SJS is known to be associated with severe dry eyes and because of our interest in investigating the extent of differences of the tear functions and dynamic VA from patients with SS. We also assigned clinical severity scores to the examined ocular surface findings and studied the impact of clinical ocular surface findings on FVA. The FVA showed a similar timewise decline both in patients with SS and SJS. The dynamic VA decline was markedly different in both patient groups compared with healthy control subjects. It should be noted that the baseline conventional and FVA scores were similar in patients with SS and in control subjects. The baseline VA scores were much lower in patients with SJS. Statistical comparisons of VA scores in three groups with different baseline acuities and at designated testing times such as at 10, 20, or 30 seconds would have led to a biased interpretation of the functional VA results from patients with SJS as being statistically low.

In order to evaluate the decline of dynamic VA in subjects with different initial baseline VA, and to avoid the aforementioned biases, we devised VMR software, which measures the ratio of logMAR FVA at 10, 20, and 30 seconds to the baseline best-corrected logMAR con-



t - test * p<0.05

MGD: Meibomian gland dysfunction, SS: Sjogren syndrome, SJS: Stevens-Johnson syndrome

FIGURE 3. Mean clinical severity scores for trichiasis, symblepharon, Meibomian gland dysfunction (MGD), corneal conjunctivalization, corneal opacity, and corneal vessels, were much higher in patients with Stevens-Johnson syndrome (SJS) compared with patients with Sjögren syndrome (SS).

TABLE 3: Relation Between LogMAR Functional Visual Acuity and Clinical Finding Severity by Multiple Linear Regression Analysis in Patients With Stevens-Johnson Syndrome

| Characteristic | Standard Partial Regression | P |
|-----------------------------|-----------------------------|-------|
| Corneal opacity | 0.50 | .004* |
| Corneal vessel | 0.29 | .01* |
| Trichiasis | -0.13 | .20 |
| Meibomian gland dysfunction | 0.08 | .41 |
| Conjunctivarization | 0.06 | .65 |
| Symblepharon | -0.05 | .58 |
| Fluorescein staining | 0.05 | .58 |

LogMAR = logarithm of minimal angle of resolution.

t test *p < 0.05

† By t test. Dependent variables FVA at 10 seconds. Conditioned multiple correlation coefficient = 0.55.

*P < .05.

ventional Landolt VA. The mean VMRs at 10, 20, and 30 seconds were far lower in patients with SJS compared with patients with SS and normal control subjects, indicating poorer visual maintenance in patients with SJS despite a similar declining pattern of dynamic VA observed in patients with SS. We thus recommend VMR calculation for comparisons of groups with different baseline VA scores; the VMR calculations may be inserted as a database into the FVA measurement system software.

It should also be noted that 57% of patients with SJS in this study had relatively higher Schirmer test scores, and that

patients with SJS did not all have very severe dry eyes. Despite better Schirmer test scores in approximately 60% of patients with SJS, the VMR was far lower in patients with SJS compared with patients with SS, which suggested the possibility that the FVA examination may reflect the ocular surface clinical findings. Therefore, we looked into the relation between the clinical severity scores of the examined ocular surface findings and FVA at 10 seconds. We chose the 10 second examination point for this comparison because it is our experience that 10 seconds of testing is sufficient to delineate the differences between normal and dry eyes, as we previously reported.¹³ The mean clinical ocular surface finding severity scores in relation to all examined parameters were much higher in patients with SJS compared with patients with SS. We found a relation between the 10 second FVA and corneal opacity, as well as the presence of corneal vessels that we think were due to the involvement of the central corneal area by opacity or new vessels in most of the patients. Although not found to be correlated with FVA when examined alone, tear instability resulting from the combination of coexisting conjunctivalization, meibomian gland disease, trichiasis, and lid disorders with symblepharon in patients with SJS with normal tear quantity may explain the FVA decrease over 30 second testing. Other untested factors in this study, such as differences of ocular surface mucin expressions, tear film lipid, and protein and inflammatory cytokine profiles between patients with SJS and with SS, may explain the dissimilarities of the FVA patterns.

We did not find a marked relation between baseline FVA scores, conjunctivalization, and Meibomian gland dysfunction (MGD) as a result of the presence of milder

MGD in this series of patients and predominance of peripheral conjunctivalization not involving the central pupillary area. Interestingly, we did not find any relation between the FVA scores and fluorescein staining severity scores in patients with SJS this time. Our results suggest that corneal lesions involving the optical axis rather than punctuate staining seem to have more effect on the FVA scores. However, this assumption should be retested in a larger group of patients. Moreover, changes of FVA before and after treatment directed for central corneal opacities in various ocular surface diseases should be investigated in future trials. Prospective future studies in SS, non-SS, and severe dry eyes looking into the correlation of FVA scores with tear quality, quantity, ocular surface staining scores, and lipid layer interferometry grades are essential and will provide very interesting information.

It should be noted that a topical anesthetic agent was used in this study to minimize discomfort and to prevent reflex tearing and blinking. The use of a topical anesthetic agent may introduce new variables of toxicity and tolerance of toxic medications by the ocular surface in patients with dry eye. We think that future tests should be performed for 10 seconds without an anesthetic agent. In addition, studies looking into the correlation between FVA scores and severity of dry eye-related visual symptoms as assessed by visual analog scale scores would also provide invaluable information. Worsening of functional VA seems to be a common complaint in subjects with dry eye, and we think the ability to test functional VA would be helpful in patient evaluation and follow-up of treatment effects. However, more work is needed to demonstrate the usefulness and validity of this new technology.

In summary, we found the FVA measurement system to be a useful tool in the assessment of dynamic VA changes in subjects with dry eye and in normal subjects, and a promising tool for evaluating the effect of clinical ocular surface findings and their severity on dynamic VA.¹⁶

THIS STUDY WAS SUPPORTED BY AN OFFICIAL GRANT FROM the Japan Ministry of Health and Welfare, Chiyodaku, Tokyo, Japan. The authors indicate no financial conflict of interest. Involved in design and study, management, analysis and interpretation of data, and preparation of the data (M.K., M.D., M.Y., C.S., S.K., J.S., K.T.); Involved in collection of data (M.K., M.D., M.Y., C.S., S.K., J.S., K.T.); and involved in the review and approval of the final manuscript (M.K., M.D., M.Y., C.S., S.K., J.S., K.T.).

REFERENCES

- Holland EJ, Schwartz GS. Epithelial stem-cell transplantation for severe ocular-surface disease. *N Engl J Med* 1999; 340:1752-1753.
- Tsubota K, Satake Y, Kaido M, et al. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 1999;340:1697-1703.
- Dohlman C, Doane M. Keratoprosthesis in end-stage dry eye. In: Sullivan DA, editor. *Lacrimal gland, tear film, and dry eye syndromes*. New York, New York, Plenum Press, 1994; 350:561-564.
- Puangsricharern V, Tseng SCG. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-1485.
- Tsubota K. The importance of the Schirmer test with nasal stimulation [letter]. *Am J Ophthalmol* 1991;111:106-108.
- Tsubota K, Toda I, Saito H, et al. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995;102: 1486-1496.
- Kaido M, Goto E, Dogru M, et al. Punctal occlusion in the management of chronic Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 2004;111:895-900.
- Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, Tsubota K. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol* 2002;133:181-186.
- Liu Z, Pflugfelder SC. Corneal surface regularity and the effect of artificial tears in aqueous tear deficiency. *Ophthalmology* 1999;106:939-943.
- Rieger G. The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging. *Br J Ophthalmol* 1992;76:157-158.
- Goto E, Yagi Y, Kaido M, et al. Improved functional visual acuity after punctal occlusion in dry eye patients. *Am J Ophthalmol* 2003;135:704-705.
- Kojima T, Ishida R, Dogru M, et al. A new noninvasive tear stability analysis system for the assessment of dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1369-1374.
- Ishida R, Kojima T, Dogru M, et al. The application of a new continuous functional visual acuity measurement system in dry eye syndromes. *Am J Ophthalmol* 2005;139:253-258.
- Tsubota K, Satake Y, Kaido M, et al. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 1999;340:1697-1703.
- Tsubota K, Toda I, Saito H, et al. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1995;102: 1486-1496.
- Araujo OE, Flowers FP. The Stevens-Johnson syndrome. *J Emerg Med* 1984;2:129-135.
- Fox RI, Robinson CA, Curd JG, et al. Sjögren syndrome: proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum* 1986;29: 577-585.
- Bron AJ, Benjamin L, Snibson GR. Meibomian gland disease: classification and grading of lid changes. *Eye* 1991;5: 395-411.
- Toda I, Tsubota K. Practical double vital staining for ocular surface evaluation [letter]. *Cornea* 1993;12:366-367.
- Tanaka M, Takano Y, Murat D, et al. The effect of preoperative tear function on early functional visual acuity after laser-assisted in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2004;30:2311-2315.



Biosketch

Minako Kaido, MD, graduated from the Medical University of Occupational and Environmental Health, Fukuoka, Japan in 1991. She joined Dr Tsubota's dry eye and cornea team in Tokyo Dental College, Ichikawa Hospital in 1995 and has been a pivotal member of Dr Tsubota's team at Keio University School of Medicine since 2004. Dr Kaido's work is focused on treatment of dry eyes especially associated with Stevens-Johnson syndrome, functional visual acuity technology, and suture adjustment after keratoplasty.

TABLE. Intravitreal Prednisolone Sodium Succinate Injections for Persistent Diabetic Macular Edema: Qualitative (FAG) or Quantitative (OCT) Assessment of CME at 3 Months, Whereupon the Decision to Re-treat was Based

| | CME at 3 Months: FAG or OCT | CME at 6 Months: FAG or OCT |
|-----------|--------------------------------|--------------------------------|
| Worse | 2 (10.5%) | 3 (15.8%) |
| Stabile | 3 (15.8%) | 3 (15.8%) |
| Decreased | 14 (73.7%) | 13 (68.4%) |

CME = cystoid macular edema; FAG = fluorescein angiography; OCT = ocular coherence tomography.

Need for retreatment was based on fluorescein angiographic or OCT evidence of persisting (eg "worse or stabile") macular edema at 3-month follow-up. The pre- and posttreatment angiograms at 6 months were reviewed in a masked fashion.

months mean visual acuity improvement was 5.4 ETDRS letters. Visual acuity at six months was stabilized or improved in 89% of the eyes. Two (11%) of the 19 eyes had a regression in visual acuity at six months compared with preoperatively, although both eyes showed a visual improvement at three months. For all eyes, mean intraocular pressure before injection was 15.6 (\pm 3.1) mm Hg, and at six months postoperative 14.3 (\pm 2.9) mm Hg. We did not observe intraocular pressures that exceeded 22 mm Hg in any of the eyes during follow-up, and no antiglaucoma medication was needed. Retreatment rate was 1.3 injections per eye after a mean period of 13.2 weeks. Macular edema decreased in 13 eyes (69.4%) (Figure 2, Table). No other adverse events, such as endophthalmitis, vitreous hemorrhage, or retinal detachment occurred.

In summary, mean visual acuity improvement after intravitreal prednisolone sodium succinate was statistically significant compared with preoperative visual acuity up to six months postoperatively. Prednisolone sodium succinate has glucocorticoid activity, but we encountered no significant increase in intraocular pressure and no other adverse events in the small group of studied eyes during follow-up, although no risk factors for glaucoma (i.e., family history, myopia greater than 5 diopters, or a history of collagen vascular disease) were present in any of the study patients. Perhaps this may be attributable to the fact that, in contrast with the crystalline cortisone of triamcinolone acetonide, prednisolone sodium succinate is injected as a transparent solution. Although the number of eyes in this pilot study was limited, results suggest that intravitreal injection of the transparent solution of prednisolone sodium succinate may be a safe and good alternative for triamcinolone acetonide in eyes with macular edema. Because the follow-up in this study was short, long-term efficacy of intravitreal prednisolone sodium succinate needs further analysis.⁵

REFERENCES

1. Massin P, Audren F, Haouchine B, et al. Intravitreal triamcinolone acetonide for diabetic diffuse macular edema: preliminary results of a prospective controlled trial. *Ophthalmology* 2004; 111:218–224.
2. Jonas JB, Martus P, Degenring RF, et al. Predictive factors for visual acuity after intravitreal triamcinolone treatment for diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol* 2005;123:1338–1343.
3. Jonas JB, Degenring RF, Kreissig I, et al. Intraocular pressure elevation after intravitreal triamcinolone acetonide injection. *Ophthalmology* 2005;112:593–598.
4. Yu SY, Damico FM, Viola F, et al. Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide: a morphological study. *Retina* 2006;26:531–536.
5. Sutter FK, Simpson JM, Gillies MC. Intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema that persists after laser treatment: three-month efficacy and safety results of a prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial. *Ophthalmology* 2004;111:2044–2049.

A Comparison Between Cultivated and Conventional Limbal Stem Cell Transplantation for Stevens-Johnson Syndrome

Leonard P. K. Ang, FRCS, MRCOphth,
Chie Sotozono, MD, PhD,
Noriko Koizumi, MD, PhD,
Tomo Suzuki, MD, PhD,
Tsutomu Inatomi, MD, PhD,
and Shigeru Kinoshita, MD, PhD

PURPOSE: To compare the resolution of inflammation and long-term results of cultivated and conventional limbal stem cell transplantation (LSCT) in a patient with Stevens-Johnson syndrome (SJS).

DESIGN: Interventional case report.

METHODS: A 32-year-old man with SJS and bilateral total limbal stem cell deficiency underwent cultivated LSCT in the right eye, followed by conventional LSCT in the left eye three weeks later. The postoperative medication included dexamethasone 0.1% and ofloxacin 0.3% eye-drops and a tapering dose of systemic corticosteroid, cyclosporine, and cyclophosphamide. Tear samples were collected and analyzed for interleukin (IL) 8 levels.

RESULTS: Complete corneal epithelialization was achieved 48 hours after cultivated LSCT, compared with three

Accepted for publication Jul 27, 2006.

From the Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan (L.P.K.A., C.S., N.K., T.S., T.I., S.K.), and Singapore National Eye Center, Singapore (L.P.K.A.).

Inquiries to Chie Sotozono, MD, PhD, Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 kajii-cho, Hirokoji-agaru, Kawaramachi-dori, Kamigyo-ku, Kyoto, 602-0841, Japan; e-mail: csotozon@ophth.kpu-m.ac.jp

weeks after conventional LSCT. Ocular inflammation and IL-8 levels decreased more rapidly in the eye with cultivated LSCT. Four years after surgery, more severe corneal scarring and opacification were noted in the conventional LSCT eye.

CONCLUSIONS: Cultivated LSCT resulted in a better clinical result and vision, with less stromal scarring compared with conventional LSCT. (*Am J Ophthalmol* 2007; 143:178–180. © 2007 by Elsevier Inc. All rights reserved.)

SEVERE OCULAR SURFACE DISEASE AND LIMBAL STEM cell destruction arising from Stevens-Johnson syndrome (SJS) remain a major clinical challenge for ophthalmologists because these conditions do poorly with conventional corneal transplantation. Limbal stem cell transplantation (LSCT) helps to regenerate the corneal epithelium in these severely damaged eyes.¹ More recently, cultivated LSCT has also demonstrated promising results.^{2,3} However, most of these studies have been noncomparative case series. To date, to our knowledge, there has been no report comparing the relative efficacy of conventional and cultivated LSCT. We describe a comparison of the long-term efficacy of cultivated and conventional LSCT in a patient with SJS and compare the resolution of ocular inflammation by cytokine analysis.⁴

A 32-year-old man with SJS developed bilateral total limbal stem cell deficiency with subtotal persistent epithelial defects, corneal conjunctivalization, and neovascularization. His visual acuity for both eyes was 20/40, and both eyes had severe persistent inflammation. Cultivated LSCT was performed in the right eye three months after disease onset. Limbal epithelial cells of donor tissue from Northwest Lion Eye Bank were enzymatically disaggregated and cultured on a denuded amniotic membrane, as previously described.³ Surgery involved removal of the corneal pannus and scarred perilimbal tissue, application of mitomycin-C 0.04%, and transplantation of the cultivated corneal epithelial sheet.³ Postoperative medication included dexamethasone 0.1% and ofloxacin 0.3% eyedrops and a tapering dose of systemic corticosteroid, cyclosporine, and cyclophosphamide. Three weeks later, the patient underwent conventional LSCT in the left eye. Excision of the diseased tissue and mitomycin C application was similarly performed, followed by transplantation of four quadrants of limbal allografts onto the recipient limbal region. A similar postoperative medication regime was used. Tears collected before and after surgery were analyzed for interleukin (IL)-8 levels with an enzyme-linked immunosorbent assay test (ELISA) kit.⁴

Complete epithelialization was achieved 48 hours after cultivated LSCT, compared with three weeks after conventional LSCT. Ocular inflammation and IL-8 levels were noted to decrease more rapidly in the eye with cultivated LSCT compared with the conventional LSCT eye (Figures 1 and 2). The eye with conventional LSCT devel-

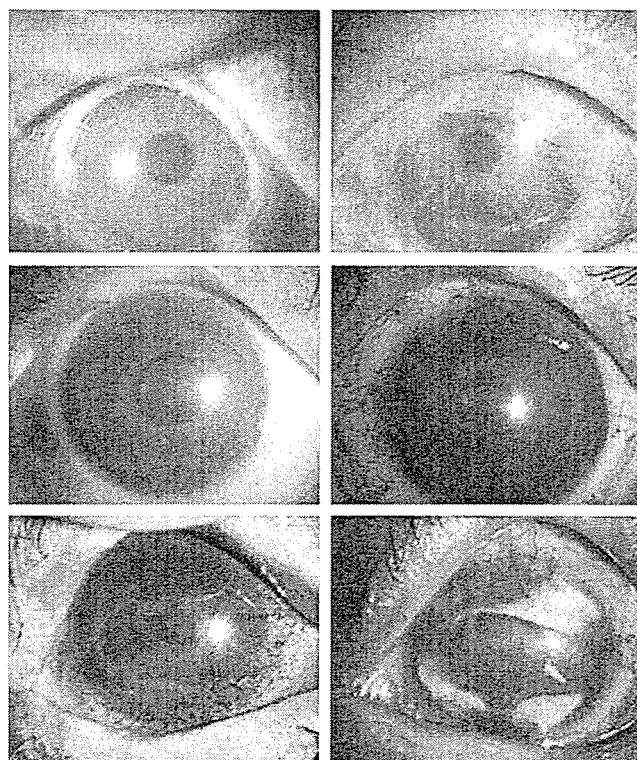


FIGURE 1. Preoperative and postoperative appearance of cultivated (left) and conventional limbal stem cell transplantation (right). (Top) Preoperative appearance. (Middle) Postoperative appearance at two months. (Bottom) Postoperative appearance at four years.

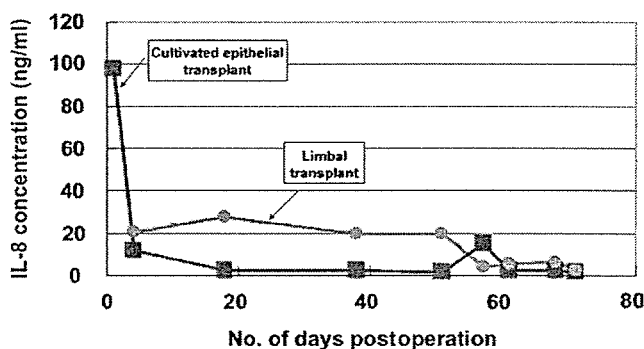


FIGURE 2. Cultivated and conventional limbal stem cell transplantation, pre- and postoperative interleukin (IL)-8 concentration in tears. A faster decrease in IL-8 levels was noted after cultivated epithelial transplantation compared with conventional limbal transplantation.

oped greater stromal scarring and vascularization, whereas the cultivated LSCT eye remained reasonably clear (Figure 1, Bottom). Four years after surgery, visual acuity was 20/30 in the right eye and 20/100 in the left eye, with more severe corneal scarring and opacification noted in the left eye. The corneal epithelium remained fairly stable in both eyes.

We compared the clinical results of conventional and cultivated LSCT in the same patient with SJS, thereby eliminating any interpatient variability. Cultivated LSCT resulted in a better clinical result and vision, with less stromal scarring compared with conventional LSCT. IL-8, a proinflammatory cytokine, was found to decrease more rapidly in the eye with cultivated LSCT. The almost immediate epithelialization achieved by the cultivated epithelial sheet, together with the use of an amniotic membrane substrate, may have contributed to faster ocular rehabilitation, with reduced inflammation and corneal scarring. Reduced stromal scarring allows repeat transplantation to be easily performed, without requiring further lamellar dissection in an already compromised cornea.⁵ This study provides valuable information regarding the effective use of cultivated LSCT for the treatment of total limbal stem cell deficiency in SJS.

THIS STUDY WAS SUPPORTED IN PART BY GRANTS-IN-AID for scientific research from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Tokyo, Japan; Research Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan; Intramural Research Fund from Kyoto Prefectural University of Medicine, Kawaramachi-dori, Kamigyo-ku, Kyoto, Japan. The authors indicate no financial conflict of interest. Involved in design and conduct of study (L.P.K.A., C.S., N.K., T.S., T.I., S.K.); Involved in collection, management, analysis and interpretation of data, and preparation of the data and revision including references (L.P.K.A., C.S., N.K., T.S., T.I., S.K.); Involved in collection of data (L.P.K.A., C.S., N.K.); and involved in management, statistical analysis and interpretation of the data, and preparation of the manuscript (L.P.K.A., C.S., N.K., T.S., T.I., S.K.).

REFERENCES

1. Kenyon KR, Tseng SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709–723.
2. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86–93.
3. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001;108:1569–1574.
4. Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res* 1998;17:673–676.
5. Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, et al. Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea* 2003;22:70–71.

Aspergillus fumigatus Colonization of Punctal Plugs

Khalid F. Tabbara, MD

PURPOSE: Punctal plugs are used in patients with dry eye syndrome to preserve the tears. In this report, I present two cases of *Aspergillus fumigatus* colonization of punctal plugs.

Accepted for publication Aug 21, 2006.

From The Eye Center and The Eye Foundation for Research in Ophthalmology, Riyadh, Saudi Arabia.

Inquiries to Khalid F. Tabbara, MD, The Eye Center, PO Box 55307, Riyadh 11534, Saudi Arabia; e-mail: k.tabbara@nesma.net.sa

DESIGN: Observational series of two cases.

METHODS: Approval was obtained from the institutional review board. Two men aged 29 and 31 years developed black spots inside the hole of punctal plug, which looked like eyeliner deposits. The deposits inside the hole of the plug in each patient were removed and cultured.

RESULTS: Cultures of the two punctal plugs black deposits grew *A fumigatus*. Bacterial cultures were negative.

CONCLUSIONS: Colonization of the punctal plug hole with *A fumigatus* was observed in two cases. It is recommended that punctal plugs be removed in patients undergoing refractive or intraocular procedures or in patients who are receiving topical corticosteroids. Current punctal plugs should be redesigned to avoid the presence of an inserter hole. (*Am J Ophthalmol* 2007;143:180–181. © 2007 by Elsevier Inc. All rights reserved.)

PUNCTAL PLUGS ARE USED FOR THE MANAGEMENT OF dry eye syndrome.^{1–4} The plugs help in preservation of tears and are indicated in certain cases of laser in situ keratomileusis and contact lens intolerance. Dry eye syndrome may compromise the ocular surface, leading to corneal erosions that may predispose the patient to microbial keratitis. Punctal plugs may cause localized entrapment and colonization of bacteria and fungi. Most of the punctal plugs have a central hole where the inserter pin is fitted for insertion of the plug. The inserter pin is withdrawn, leaving an open cavity. Colonization of organisms may occur inside the plug hole.⁵ The main purpose of this report is to present two cases of *Aspergillus fumigatus* growth inside the punctal plug hole.

• **CASE 1:** A 29-year-old man who presented with history of foreign body sensation and mucoid discharge of two years' duration. He was found to have normal vision and reduced tearing. He had bilateral pinguecula and no corneal staining. The rest of the examination was normal. The patient was diagnosed as having dry eye syndrome, and the lower puncta were occluded by Eagle FlexPlug (EagleVision, Memphis, Tennessee, USA). After insertion of the punctal plug, the patient's symptoms improved. Three months after the insertion of the plug, he came for a follow-up examination and was found to have black deposits in the punctum of the right lower lid (Figure 1). The deposits in the hole of the punctal plug were removed and cultured onto Sabouraud agar, blood agar, chocolate agar, and thioglycolate. The culture netted a pure growth of *A fumigatus*. There was no bacterial growth. The patient was followed, and he had no canaliculitis and no evidence of conjunctivitis or keratitis.

II. 解説/D. 薬疹における臓器障害を見逃さない

2. 薬疹と眼障害

外園千恵 [京都府立医科大学眼科]

▶ はじめに

Stevens-Johnson 症候群 (SJ 症候群) と中毒性表皮壊死融解症 toxic epidermal necrolysis (TEN) はいずれも重症薬疹であり、皮膚のみでなく眼表面を含む全身の粘膜にも水疱やびらんを生じる。いずれも数週間で病変が消退する self-limiting disease であるが、急性期の眼傷害は角膜穿孔や角膜感染症など重篤な眼合併症を招き、生涯にわたる視力障害をもたらす。また全身および眼局所の炎症が沈静化しても、しばしば瞼球癒着や角膜混濁などの癍痕性変化を生じ、視力障害とドライアイが慢性期 (癍痕期) の症状として持続する。

両疾患は致死的なことがあり得ることから発症時には全身管理が主体となるが、救命できた患者を長く苦しめるのは眼障害である。発症と同時に眼局所にも病変を生じていることが多く、眼合併症を可能な限り少なくするには、きわめて早期より眼科治療を開始することが必要である。

▶ I. 急性期障害

1. 眼所見

皮膚ならびに他の部位の粘膜病変とほぼ同時に、あるいは皮膚病変より半日ないし1日程度先行して急性結膜炎を生じる。具体的には結膜全体に及ぶ充血、眼瞼の発赤腫脹、眼脂がみられ、最も炎症の強い時期には、偽膜形成と角結膜上皮欠損 (重症では全角膜上皮欠損) を伴う (図1)。重症

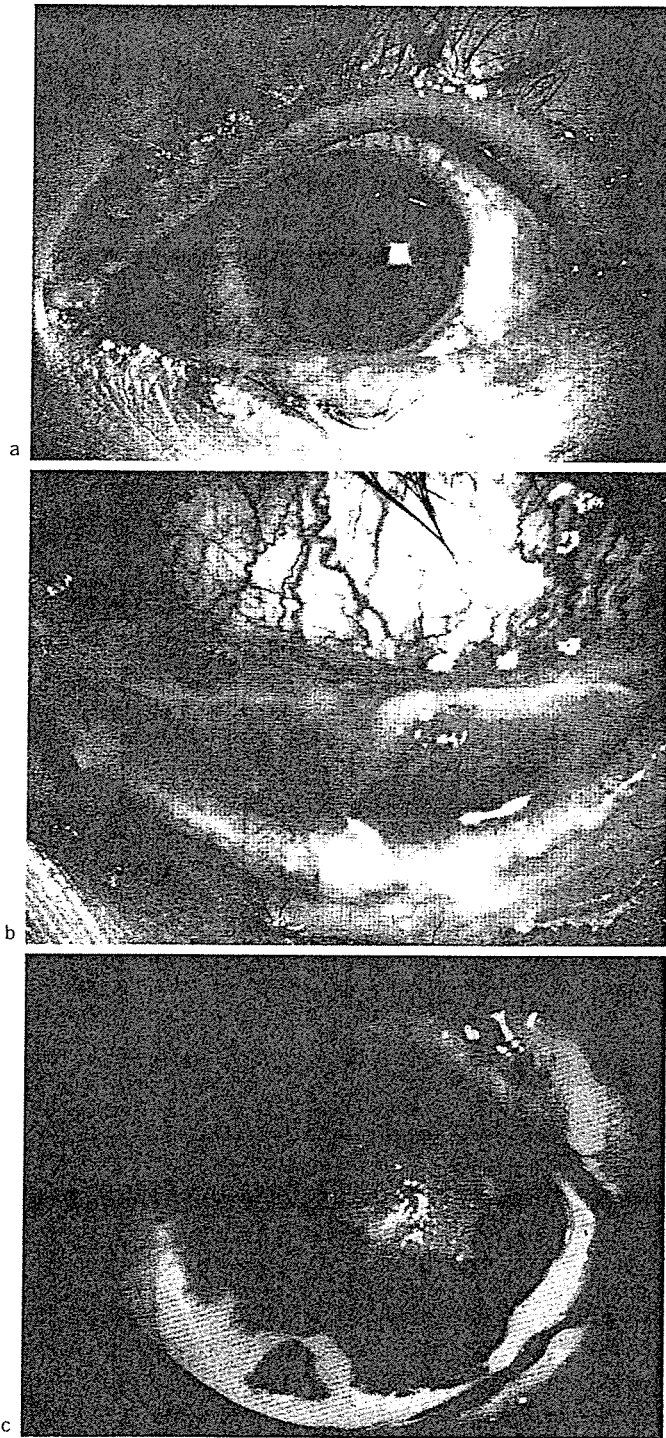
では眼瞼腫脹および瞼球癒着により開瞼すらできない状態となる。眼瞼の高度な炎症により、睫毛が脱落する。

2. 何が生じているのか?

偽膜はフィブリン、壊死を生じた上皮細胞、浸潤細胞 (主に好中球) からなり、眼表面の炎症が高度であることを示す。眼表面上皮 (角膜上皮および結膜上皮) は免疫的に攻撃され、軽症では点状の角膜上皮障害、中等症以上では角膜上皮欠損や結膜上皮欠損、あるいは広範囲な角結膜上皮欠損を生ずる。言い換えると急性期には、「眼瞼を含む眼表面全体が免疫的に攻撃され、高度な炎症と上皮障害を生じる」。この免疫異常の詳細については未だ解明されていない。

3. 角膜上皮幹細胞の消失と視力予後

角膜上皮の幹細胞は、角膜を取り囲む幅 1~2 mm の帯状部分 (角膜輪部と呼ばれる) に基底細胞の一部として存在すると考えられており、この角膜上皮幹細胞は正常時にはあまり分裂していないが、ひとたび角膜に障害が生じると速やかに分裂・増殖を繰り返し大量の角膜上皮細胞を再生する¹⁾。急性期に輪部を含む上皮欠損を生じ、角膜上皮幹細胞 (輪部上皮細胞) が消失すると、上皮欠損部は角膜上皮により修復できず周囲から伸展する結膜組織で被覆される。結膜組織は上皮のみでなく結合組織を伴って侵入するために、角膜は厚い不透明組織で覆われて表層性の角膜混濁と血管侵入をきたす (図2, 4, 5a)。一方、角膜上皮欠損



【図1】急性期の眼所見(同一症例)

a 急性結膜炎

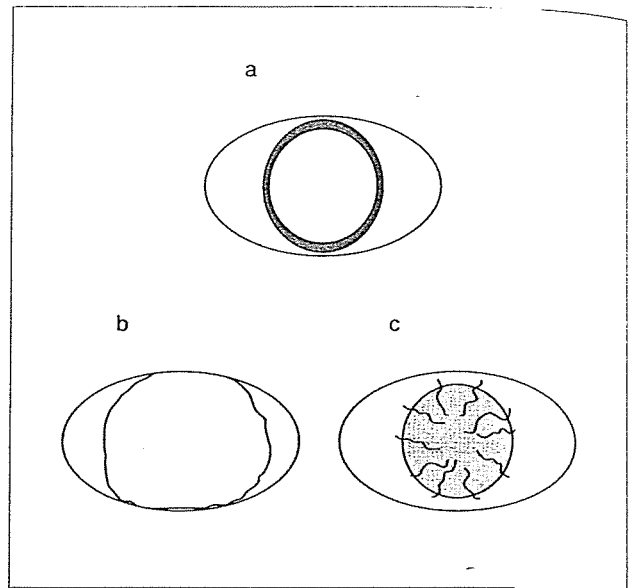
Stevens-Johnson 症候群の発症後 5 日。結膜充血，眼瞼腫脹，眼脂を認める。

b 偽膜形成

発症後 2 週。眼瞼に白色の膜様物(偽膜)を認める。

c 角膜上皮欠損

偽膜形成と同時期に角膜中央やや上側にほぼ円形の上皮欠損を生じ(緑色部分)，球結膜および眼瞼結膜にも広範囲の上皮欠損を生じた。



【図2】幹細胞の消失と予後

正常眼において角膜上皮幹細胞は，角膜を取り囲む幅 1~2mm の輪部と呼ばれる帯状部分(紫色部)に存在する(a)。SJ 症候群・TEN の急性期に広範囲の上皮欠損(緑色部分)を生じて輪部上皮が消失すると(b)，角膜は血管や結合組織を伴う結膜組織で被覆される(c)。

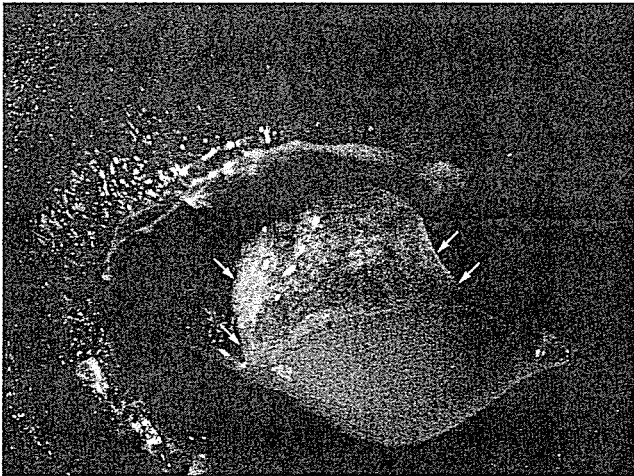
を生じても角膜上皮幹細胞が残存した場合には，上皮欠損は角膜上皮により修復され，ほぼ透明化する。このように，角膜周辺部に存在する角膜上皮幹細胞が消失するか否か，その後の角膜の透明性に大きく影響する。角膜上皮幹細胞の存在をみるには，palisades of Vogt と呼ばれる皺状構造が良い臨床指標である。

4. さらなる合併症

角膜上皮幹細胞が傷害されると上皮修復が困難となり，しばしば遷延性上皮欠損に陥る(図3)。遷延性上皮欠損は角膜感染症，角膜融解，角膜穿孔などを生じやすく，重篤な視力障害を後遺症としてもたらす。角膜上皮が広範囲に欠損しているときは医学的にはハイリスクであっても視力は比較的良好であり，患者の視力は重症度の指標とはならない。

5. 急性期の治療

眼表面の炎症，瞼球癒着を抑えて眼表面上皮を温存することと，眼表面の2次感染防止に努めることが重要である(表1)。眼表面における炎症の



【図3】遷延性上皮欠損

Stevens-Johnson 症候群の急性期に広範囲に角結膜上皮欠損(全角膜上皮欠損+結膜上皮欠損)を生じ、角膜上皮幹細胞が全周性に消失した。写真は発症後2ヵ月であるが遷延性上皮欠損(矢印、緑色部分)となっており、このような上皮欠損はさきわめて難治である。

程度、上皮欠損の範囲を把握し、治療方針を立てる。所見は日々刻々と変化するが、その推移と治療効果を見ながら、さらなる治療を進める。

1) 眼表面の消炎

ステロイドの大量全身投与に加えて、局所にもステロイドを投与する。ただし感染症発症を招くおそれがあるため、患者と家族に感染症発症のリスクと本症の視力予後について十分に説明したうえで、抗菌薬を併用しながらステロイドを投与する。具体的にはベタメタゾンの点眼(1日4回程度)が消炎のために効果的であり、炎症が高度な場合にはベタメタゾン眼軟膏を併用する。全身所見の軽減とともに眼所見の改善を得ることができれば、ゆっくりと局所ステロイド量を減量する。

2) 感染症予防

患者は眼表面に MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) を保菌しやすい。初診時に結膜囊培養あるいは分泌物の塗抹および培養検査を行い、その後は週1回程度の検査を継続する。菌を検出すれば薬剤感受性を考慮して、抗菌薬を局所投与する。患者が MRSA を保菌しやすい原因はわかっていないが、ICU での治療との関係は否定できない。

3) 偽膜除去と癒着解除

現在のところ、偽膜は除去するのが好ましいと

【表1】各時期の眼所見と治療

| | 眼所見 | 治療・処置 |
|--------------|----------------------|--|
| 急性期 | 眼表面の上皮欠損 (角膜・結膜) | 眼表面の炎症を制御(ステロイド全身・局所投与) 上皮を保護(治療用 SCL ^{*1} 装用, 眼軟膏など) |
| | 眼脂 偽膜形成 瞼球癒着 | 抗菌薬の局所投与 偽膜除去 癒着解除 |
| 慢性期 (癒着期) | ドライアイ | 人工涙液の点眼, 涙点プラグ, 涙点縫合術 |
| | 睫毛乱生 瞼球癒着 角膜混濁 | 睫毛除去 (羊膜移植, 培養口腔粘膜上皮移植) ^{*2} (輪部移植, 培養角膜上皮移植, 培養口腔粘膜上皮移植) ^{*2} |

^{*1} SCL: ソフトコンタクトレンズ

^{*2} 慢性期障害に対するこれらの手術治療は一部の機関でのみ可能

いう意見が多数を占める。生じた偽膜ははいねいに除去する。偽膜除去の操作が炎症を惹起してはならず、清潔な綿棒に絡め取るように除去するとよい。急性期に生じる瞼球癒着を放置すると強固な器質的癒着となる。点眼麻酔下に硝子棒を用いて機械的に癒着を剝離し、消炎に努める。

6. 急性期の眼傷害が遷延するとき

通常3~4週間程度で皮膚症状が落ち着いてくるが、眼の炎症所見が依然続いて角膜上皮欠損が遷延することがある(図3)。あるいは、皮膚症状が軽快したためにステロイドの全身投与量を減らしたあと、眼炎症所見が再燃することがある。充血、角膜びらんなどの炎症所見が続く場合には、眼表面の消炎を目的として、ステロイドの全身、局所投与を引き続いて行う。

ただしステロイドの副作用として眼圧が上昇することに注意を払わねばならず、漫然としたステロイド投与は避けなければならない。投薬の効果を得られず、遷延化した眼の炎症をコントロールできないときは、治療経験のある医師あるいは角膜専門医などに相談することが望ましい。

▶ II. 慢性期障害

1. 眼所見

1) 癬痕性角膜混濁

結膜上皮が血管・結合織を伴って角膜表面を被覆すると、角膜表面は不透明、凹凸不整となり、著しい視力障害をきたす。眼表面を被覆した結膜上皮は分化異常をきたし、重症では眼表面が皮膚のように角化する(図4)。

2) 眼瞼の異常

炎症の後遺症として睫毛乱生、瞼球癒着などが生ずる。

3) ドライアイ

正常の涙液は油層、水層、粘液層の3層からなり、油層はマイボーム腺、水層は涙腺、粘液層は結膜杯細胞と眼表面上皮から成分を供給される。慢性期患者の多くは、結膜の杯細胞消失によるムチン分泌不全、涙腺導管の閉塞による涙液分泌不全を伴う。さらにはマイボーム腺の腺構造が消失し、涙液減少型ドライアイに加えて蒸発亢進型ドライアイを合併する。

4) 結膜充血

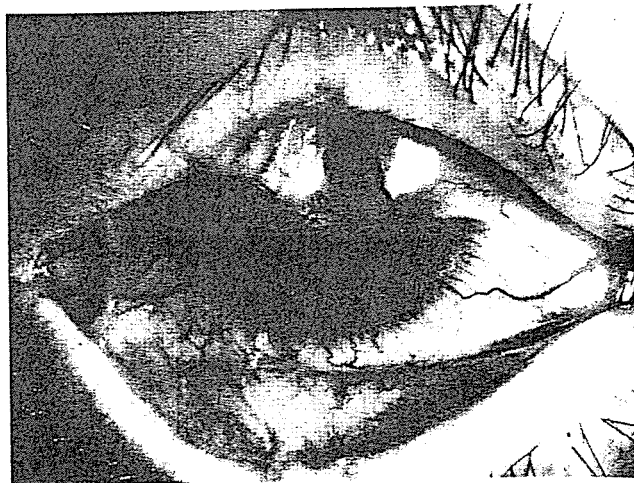
慢性期には眼表面の状態は落ち着くが、組織学的には非特異的な炎症が存在する²⁾。一部の症例では軽度の再燃を繰り返しながら病変が進行する。

2. 症状

角膜混濁による視力不良のほか、乾燥感、異物感、羞明、眼痛などが慢性期の症状として持続する。

3. 慢性期の治療

眼表面の管理が治療の主体となる。ドライアイ、睫毛乱生に対する治療を細やかに行うことが必要であり、これらを放置すると眼表面の炎症、感染症、遷延性上皮欠損などを生じて癬痕性変化をさらに進行させる可能性がある。定期的な経過観察を行い、睫毛抜去、ドライアイ治療(人工涙液の点眼、涙点プラグなど)を行う。易感染性の



〔図4〕慢性期の眼所見

上眼瞼と角膜の癒着(瞼球癒着)がある。角膜は表層性に強く混濁し、血管侵入を伴う。視力は眼前手動弁である。

傾向があり、眼脂を伴って充血を生じた場合には、結膜囊培養を行い、抗菌薬を点眼する。

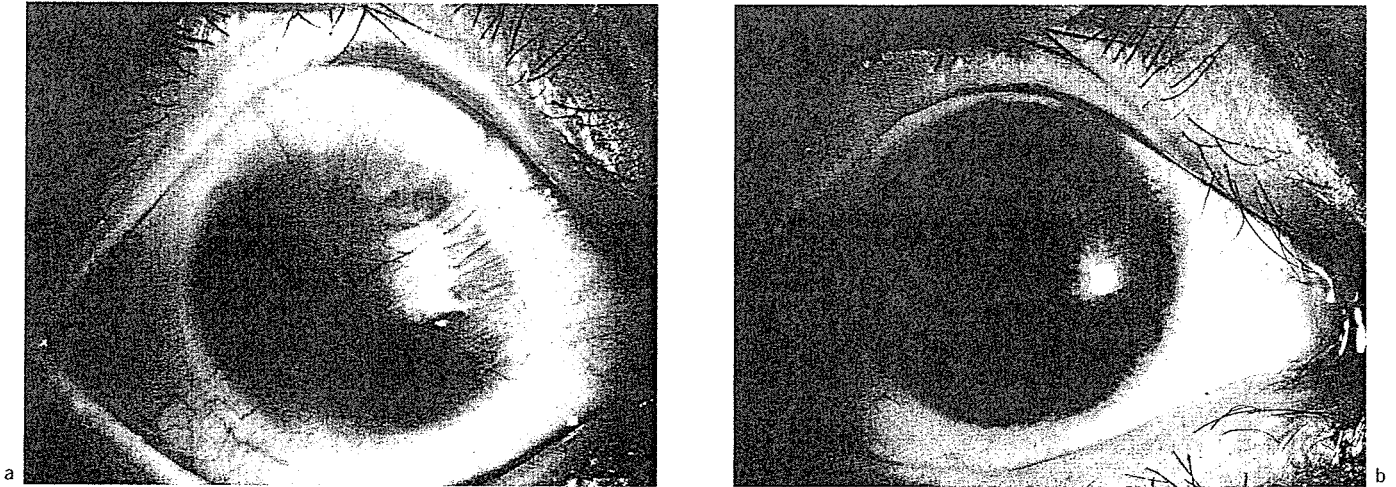
慢性期に軽度の炎症が持続、あるいは再燃を繰り返す症例がある。低濃度のステロイド点眼により炎症を抑制することは、癬痕性変化の進行防止に有用と考えられている。

▶ III. 手術治療の最前線

SJ症候群およびTENに対する角膜移植手術は、術後に著明な炎症を生じて予後不良であるために長く禁忌とされてきた。しかし近年では羊膜移植併用などにより癬痕組織の除去、癒着解除と角膜上皮移植(輪部移植など)がなされるようになってきた。

筆者らの施設では、輪部幹細胞を含む角膜上皮を分離して羊膜上に培養し、生体の角膜上皮と同様に多層化した上皮(培養角膜上皮)を作成する方法を用いて、1999年以降SJ症候群を含む難治性疾患を対象に培養角膜上皮移植を行ってきた^{3,4)}。さらに2002年以降、患者本人の細胞を用いて口腔粘膜上皮シートを作成し、培養口腔粘膜上皮移植を行っている⁵⁾。

薬疹に合併した急性期の遷延性上皮欠損は上述したようにハイリスクであるが、これまで有効な治療方法がなかった。しかし培養角膜上皮移植あ



[図5] 培養角膜上皮移植例

角膜表面に全周より結膜組織が侵入し、術前視力は0.08であった。
 表層の瘢痕組織を切除し、培養角膜上皮移植を施行し、術後視力0.8を得た。
 a 移植前, b 移植後

るいは培養口腔粘膜上皮移植の術後には、速やかな上皮化と消炎を得ることが可能であり、その後の瘢痕形成も少ない。また瘢痕性混濁に至った慢性期症例に対し、培養角膜上皮移植が視機能の回復という面で成果をあげている(図5)。培養口腔粘膜上皮移植は、透明性の面で培養角膜上皮移植よりやや劣るが、自家移植であることから拒絶反応のリスクがなく術後投薬が少なく済み、小児や高齢者に有用である。

△ おわりに

どの科の医師であってもSJ症候群, TENに遭遇する可能性をもつが、視力予後が不良であること、全身治療に加えて発症早期からの眼科治療が必要であることは意外に知られていない。全身状態が重篤であるほど眼には関心がいきにくいですが、初期より眼科医を含む医療チームが治療にあ

たることが望ましい。

文献

- 1) Cotsarelis, G et al : Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : implications on epithelial stem cells. *Cell* 57(2) : 201-209, 1989
- 2) Nishida, K et al : Epithelial hyperproliferation and transglutaminase 1 gene expression in Stevens-Johnson syndrome conjunctiva. *Am J Pathol* 154 : 331-336, 1999
- 3) Tsubota, K et al : Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 34 : 340 : 1697-1703, 1999
- 4) Koizumi, N et al : Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 119 : 298-300, 2001
- 5) Inatomi, T et al : Mid-term results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol* 141 : 267-275, 2006

最新医学・第62巻・第1号（2007年1月号 別刷）

特報 第43回ベルツ賞受賞論文

1等賞

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

| | | |
|-------|------|------|
| 木下 茂 | 外園千恵 | 稲富 勉 |
| 中村隆宏 | 小泉範子 | 川崎 諭 |
| 上田真由美 | 横井則彦 | 上野盛夫 |
| 笹井芳樹 | | |

最新医学社

特報

第43回
2006年度

ベルツ賞受賞論文

1等賞

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

木下 茂****¹ 外園千恵**¹ 稲富 勉**¹
 中村隆宏*² 小泉範子**² 川崎 諭*¹
 上田真由美*¹ 横井則彦***¹ 上野盛夫*^{1,3}
 笹井芳樹**³

Summary

The cornea is the transparent, main optical element of the eye that focuses light onto the retina, and its surface is covered by a non-keratinized, stratified epithelium that serves to protect the corneal interior from ingress by external agents. It is believed that corneal epithelial stem cells exist in the basal cell layer of the limbal region, the transitional zone between the cornea and conjunctiva on the ocular surface, and that the complete loss of corneal epithelial stem cells results in corneal scarring with vascularization which severely affects visual function. This devastating diseased state is known as corneal epithelial stem cell deficiency, the treatment of which has remained unsuccessful worldwide until recently. In efforts to solve this problem, our extensive research has focused on the development of basic understanding and novel therapeutic modalities for corneal epithelial stem cell deficiency, obtaining success in treating these corneas by regenerative medicine. Clearly, ocular surface reconstruction by tissue engineering using somatic stem cells will prove to be the next generation of therapeutic modalities.

Thus, we first investigated the transplantation of cultivated human corneal epithelial stem cells on amniotic membrane for treating corneal epithelial stem cell deficiency. The cultivated sheets were created by co-culture with 3T3 fibroblast, air-lifting, and corneal epithelial stem cell culture on amniotic membrane. These cultivated cells demonstrated the presence of keratin 3 and 12 specific to *in vivo* corneal epithelium, tight junction related proteins, and a reasonable amount of proliferative activity. Trans-

*¹ 京都府立医科大学 視覚機能再生外科学 **¹ 同 講師 ***¹ 同 助教授 ****¹ 同 教授*² 同志社大学研究開発推進機構 再生医療研究センター 講師 **² 同 助教授*³ 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター **³ グループディレクター

plantation of cultivated autologous corneal epithelial stem cell sheets in 5 unilaterally affected patients was completely successful in all cases. Cultivated allogenic corneal epithelial sheets in 36 bilaterally affected patients also survived on the corneal surface in all cases, proving quite effective in achieving ocular surface stability. A few cases, however, developed immunological rejection, opportunistic infection, etc.

Second, and in order to solve the above-mentioned problem, we established a system for the transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets. The histology of the *in vitro* oral mucosal epithelial sheets was similar to that of *in vivo* corneal epithelial sheets. Moreover, the cultivated oral mucosal epithelial sheets expressed positive for keratin 3. Since the transplantation of these sheets survived on the ocular surface and resulted in the recovery of corneal transparency, cultivated autologous oral mucosal epithelium may become a viable substitute for diseased corneal epithelium. In fact, the outcome of our clinical trials involving 45 eyes who received this type of surgery has been a resounding success. Our cultivating system, which uses amniotic membrane as a unique substrate, has proven to be successful for other purposes as well. For example, human retinal pigment epithelial cells and lenses can now be created from human ES cells on amniotic membrane, and it is also possible to produce transplantable human corneal endothelial sheets.

Third, our basic research regarding the ocular surface has successfully produced a wealth of new information. From the biological aspects, we recently showed several unique findings; one being the discovery of a cluster of ectopically-residing, self-maintaining corneal epithelial stem cells in the conjunctiva of healthy human eyes. We also discovered that the high level of thrombospondin-1 is present only just below the corneal epithelium; its unique distribution possibly related to corneal avascularity and integrity. Moreover, and from the aspects of innate immunity, we found that the ocular surface epithelium, both corneal and conjunctival, possess the toll-like receptors (TLRs) 1-10. However, the innate immune response of those TLRs is distinct from that of immune-competent cells, and we suggested that this is indicative of the symbiotic relationship between ocular surface epithelium and microbes inhabiting the ocular surface. In addition, we recently proved the presence of the protein I κ B ζ in ocular surface epithelium, and its existence there may possibly modulate the innate immune response.

As a result of our diligent research in the field of regenerative medicine, both past and present, we have made enormous progress in the basic understanding and development of new therapeutic modalities such as the transplantation of cultivated mucosal epithelial stem cell sheets. We firmly believe that our efforts will lead to the cure of all devastating ocular surface disease in the near future.

目 次

- I 緒言
 - I-1 感覚器研究における本研究の位置づけと意義
 - I-2 Ocular surface 研究の進捗状況：再生医学から粘膜免疫学そして臨床医学へ
- II 角膜の再生医学
 - II-1 歴史的背景
 - II-2 培養角膜上皮シートの研究開発
 - II-2.1 角膜上皮シート作成法の検討
 - II-2.2 自家移植の臨床成績
 - II-2.3 同種移植の免疫学的研究
 - II-2.4 同種移植の臨床成績
 - II-3 培養口腔粘膜上皮シートの研究開発
 - II-3.1 培養口腔粘膜上皮シート移植のコンセプト
 - II-3.2 培養口腔粘膜上皮シート作成法の検討
 - II-3.3 光学的改善を目的とした臨床成績
 - II-3.4 結膜嚢形成を目的とした臨床成績
 - II-4 臨床からのフィードバックと課題
 - II-4.1 角膜上皮幹細胞の理解
 - II-4.2 眼粘膜免疫の理解
 - II-4.3 涙液の評価と改善対策
 - II-4.4 臨床試験へむけた安全対策
 - II-5 副次的な研究開発
 - II-5.1 培養角膜内皮シート
 - II-5.2 羊膜を用いたヒト ES 細胞からの眼組織の再生
 - II-5.2.1 ヒト ES 細胞の入手方法，維持・継代培養方法
 - II-5.2.2 AMED 法の開発
 - II-5.2.3 ヒト ES 細胞からの中枢神経の分化誘導
 - II-5.2.4 AMED 法によるヒト ES 細胞からの眼組織分化誘導
- III 角膜上皮分化と幹細胞に関する検討
 - III-1 角膜上皮の遺伝子発現
 - III-2 角膜上皮幹細胞
 - III-3 結膜における異所性角膜幹細胞

- III-4 角膜無血管性に係わる因子
- IV 眼粘膜免疫に関する検討
 - IV-1 眼粘膜における自然免疫
 - IV-1.1 Ocular surface の非特異的感染防御機構ならびに常在細菌の存在
 - IV-1.2 Ocular surface 上皮の自然免疫と TLRs
 - IV-2 重症薬疹：Stevens-Johnson 症候群に対する取り組み
 - IV-2.1 臨床的解析
 - IV-2.2 自然免疫異常
- V 結び
- VI 引用文献

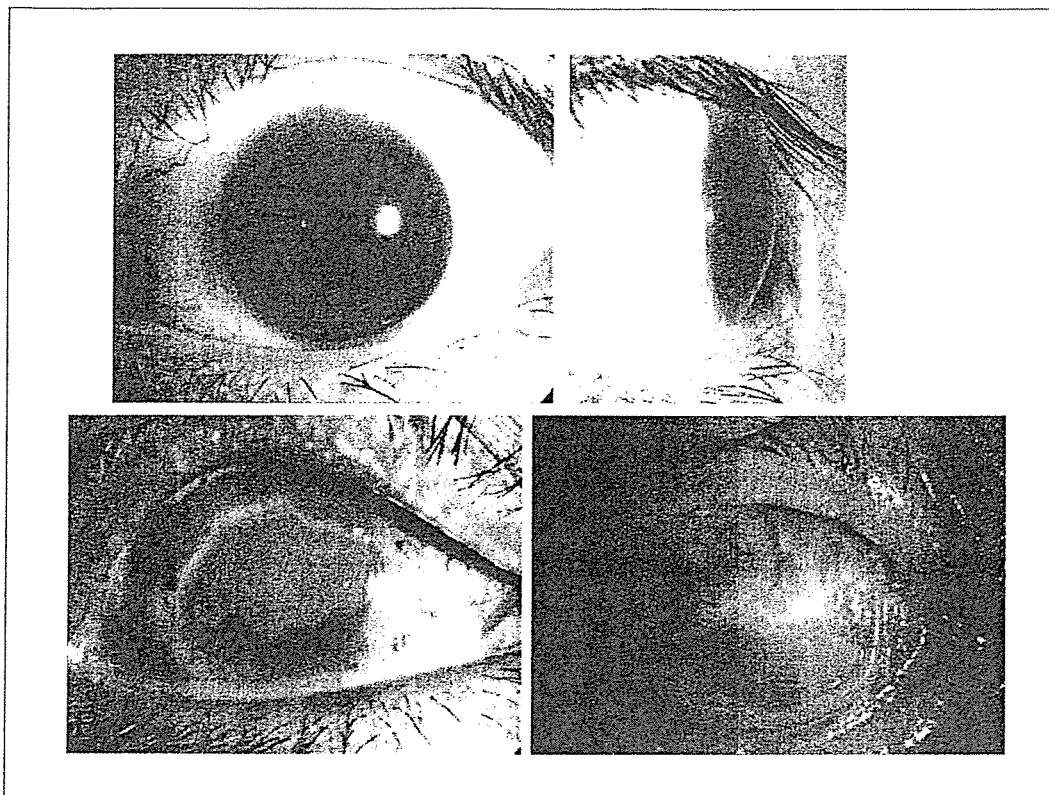
I 緒 言

- I-1 感覚器研究における本研究の位置づけと意義

感覚器のなかで、視器である「眼」は、極めて特殊に分化した臓器であり、ヒトではおよそ 400nm から 800nm までの可視光を視細胞に集光させ、その刺激を大脳で視覚情報処理することで、我々は「見る」ができている。「眼」がこのような役割を果たすためには、大きく二つの生物学的な機能が担保されている必要がある。その一つは網膜に光が到達するように角膜、水晶体、硝子体が透明性を保つことである。今ひとつは、網膜視細胞が光に反応し、視覚情報が脳に伝達することである。

我々の研究は、前者の眼組織の透明性、特に角膜の透明性、に関わるものであり、臨床現場と密接に結びついたものである。その骨子を要約すると以下ようになる。角膜が透明性を保つためには、表皮外胚葉から発生し、角膜表面を覆う、特殊に分化した粘膜上皮である角膜上皮細胞が正常に機能することが必須であるが、さまざまな疾病によりこのことが障害される。特に、角膜上皮幹細胞が障害された場合には角膜の透明性は極度に傷害され、失明状態になる(図1)。そこで、角膜上皮幹細胞を生物学的に理解し、再生医学的アプローチにより角膜上皮幹細胞疲弊症に角膜上皮幹細胞群あるいは類似

図1 正常角膜と重症角膜疾患



A：正面および側面からみた正常角膜，B：重症化学外傷の急性期における遷延性上皮欠損，
C：Stevens-Johnson 症候群慢性期の角膜混濁

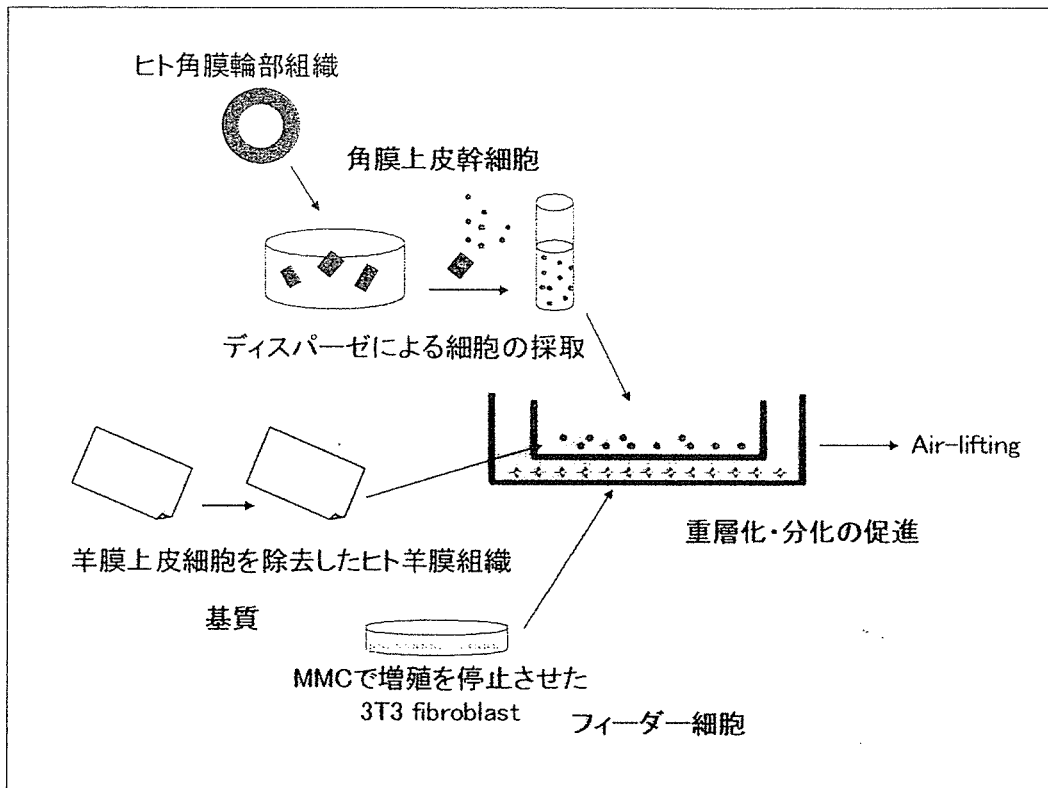
の細胞群を移植し治療しようとする研究開発を試みた。さらに、角膜上皮細胞は単に生物学的に眼表面 (ocular surface) に位置するだけではなく、眼粘膜自然免疫とも深く関係している。このため、さまざまな疾病における眼粘膜自然免疫を基礎的に理解し、角膜をターゲットにした再生医療の治療成績をさらに向上させるための研究を行った。我々の研究は、国際的にも高く評価されており、文部科学省、厚生労働省からも数多くの研究補助を得てきたトランスレーショナルな研究プロジェクトである。臨床現場においても、今まで治療不可能と考えられてきた ocular surface 疾患である角膜化学腐食、眼類天疱瘡、Stevens-Johnson 症候群などの患者に視力回復という福音をもたらしつつある。

I-2 Ocular surface 研究の進捗状況：再生医学から粘膜免疫学そして臨床医学へ
Ocular surface の重症疾患は、さまざまな薬

物療法による保存的治療あるいはいわゆる角膜移植のような外科的治療でも対応しがたく、臨床現場では永らく放置されてきたというのが現実である。このような状況で、治療法の糸口を見出すためには、角膜上皮細胞の分子細胞生物学的特徴を基礎的に理解し、新規治療方法を考案、開発することが必須であった。このため、我々は 1990 年代にはヒトゲノムプロジェクトの一環としてボディマッププロジェクトを行い、ocular surface のヒト角膜上皮細胞とヒト結膜上皮細胞の遺伝子発現プロファイルを明らかにし¹⁾²⁾、両者の遺伝子発現パターンの相違などの情報を蓄積してきた。また、角膜上皮幹細胞に関する基礎的データを蓄積してきた³⁾。さらに、角膜上皮細胞が光暴露と高酸素暴露にもかかわらず、酸化ストレスを消去する機構などにも興味を持って研究してきた。

今回の主題となる角膜再生医学には、1990 年代後半から着手した。すなわち、前述の基礎

図2 羊膜を基質とした培養ヒト角膜上皮シートの作成



的情報を基にして、角膜上皮幹細胞と羊膜を用いて同種 (allo) 培養角膜上皮シートを作成することに成功し (図2), 1999年, 京都府立医大倫理委員会の承認のもとに, プロトタイプとも言うべき培養角膜上皮シートの移植臨床試験を開始した⁴⁵⁾。その後, さまざまな試行錯誤とさらなる研究開発を経て, 臨床医学へ応用できる信頼度の高いシステムを構築した。

2001年には, 本来の再生医学的アプローチともいうべき自家口腔粘膜上皮細胞による自家 (auto) 培養口腔粘膜上皮シート作成に成功し⁶⁾, このシートを用いた移植により, 角膜再生医療への新たな糸口を見出した⁶⁻⁸⁾。現在までに, 培養角膜上皮シート移植 (auto と allo を含む) を41例44眼, 培養口腔粘膜上皮シート移植を42例45眼に施行している。さらに, ocular surface の粘膜免疫, 特に上皮細胞における Toll like receptors (TLRs) を介した自然免疫の理解は ocular surface 重症疾患の病態把握と治療に必須のものであり, 基礎研究を行っている。さらに, 本研究の副次的項目ではあるが,

関連領域で非常に大きな研究成果も得ている。例えば, 角膜上皮シート作成のための羊膜を用いた培養系から発した系で, ヒト ES 細胞から眼組織細胞の分化誘導に成功している⁹⁾。これらの研究成果は, 我々の再生医学トランスレーショナル研究がもたらしたものであり, 基礎から臨床への橋渡し研究の重要性を示すものである。我々の研究が, 再生医学の一研究分野をリードするものと確信している。

II 角膜の再生医学

II-1 歴史的背景

我々の初期の動物実験から, 角膜輪部上皮が角膜上皮創傷治癒に極めて重要な働きをすることが分かり¹⁰⁾¹¹⁾, その後 Sun らの研究グループが, 1986年, マウス輪部上皮基底細胞にケラチン3が発現していないこと¹²⁾, さらに, 1989年, slow cycling な細胞が同部位に存在することから角膜上皮幹細胞が輪部上皮基底細胞に存在する可能性を提唱した¹³⁾。一方 Tseng らが, 1995年, 羊膜 (胎盤の一部) の移植が結膜下

線維芽細胞の増殖抑制に効果を示すことを報告し¹⁴⁾, ocular surface 再建に新たな時代が訪れた。1997年, Pellegriniらは, 培養角膜上皮シート作成の成功と2例の臨床例を報告し¹⁵⁾, これが角膜再生医療の幕開けとなった。当時, 我々のグループも似かよった研究を行っていたが, この時点では一歩先を越された形となった。培養角膜上皮シート作成の研究は1980年代から行われていたが, 成功例はこの1997年のPellegriniの報告が始めてであった。

II-2 培養角膜上皮シートの研究開発

II-2.1 角膜上皮シート作成法の検討

ヒト角膜上皮は, 約50 μ mの厚さの特異に分化した非角化重層扁平上皮であり, 光学的に均一で透明な表面を形成し, 微生物や涙液蛋白の角膜内への侵入を防御する生物学的バリアーである。このように外界からのストレスに暴露されるocular surfaceに生着しうる角膜上皮シートを培養条件下で作成するためには, *in vivo*の角膜上皮細胞に類似した細胞層を*in vitro*で作成することが必要である。また, 移植時にハンドリングの容易な培養上皮シートの作成が必須である。過去には, I型およびIV型コラーゲンシートや角膜実質を基質とした培養角膜上皮シートの作成が試みられたが, 眼表面に生着する培養上皮シートの作成は困難であった。

そこで我々は, 角膜輪部上皮から角膜上皮幹細胞を採取し, 羊膜を基質として培養条件を調整し, 培養角膜上皮シート作成法の研究開発に入った。我々の目指した培養上皮シートの性状は, 基底細胞層において正常な細胞増殖と羊膜との強固な接着構造を持つこと, そして最表層細胞において強固なタイトジャンクションを構築していることであった。

羊膜は, 京都府立医科大学倫理委員会で承認された方法に従って採取し, 研究に使用した。感染症がなく合併症のない帝王切開予定の妊婦から文書による同意を得た後に, 帝王切開時に羊膜を無菌的に採取し, 洗浄した後に-80℃

で凍結保存した¹⁶⁾。ヒト羊膜はIV型およびV型コラーゲンからなる基底膜とその上を覆う1層の羊膜上皮細胞から構成される¹⁷⁾。我々は家兎の角膜上皮幹細胞を含む組織(limbal explant)を採取し, 羊膜上皮細胞の付着したヒト羊膜(上皮あり羊膜)と, 羊膜上皮細胞を0.02% EDTAで処理したのちに機械的に搔爬したヒト羊膜(上皮なし羊膜)を基質として比較検討した。その結果, 培養において上皮あり羊膜では角膜輪部上皮細胞の伸展, 増殖が羊膜上皮細胞によって著しく阻害される一方, 上皮なし羊膜では羊膜のコラーゲン基質の上を速やかに角膜輪部上皮細胞が伸展することが明らかとなった¹⁸⁾。さらに長期の培養にあたっては, 3T3 fibroblastとの共培養と, コンフルエント後の培養に培養細胞の表面を空気に接触させるair-lifting技術を用いることにより, *in vivo*の角膜上皮細胞に類似した, 重層化して形態的に分化した上皮細胞シートを作成することが可能であることがわかった。また上述の explant法によって作成した羊膜上培養角膜上皮幹細胞シートを家兎眼に移植し, 移植後の眼表面で生着することを確認した¹⁹⁾。

次に, 我々は, 家兎眼で確立した角膜上皮幹細胞培養法を応用して, Northwest Lion Eye Bank (Seattle, WA, USA)から研究目的に使用する許可を得たヒト強角膜組織から採取した角膜上皮幹細胞の培養を行った。角膜上皮幹細胞を含む培養角膜上皮シートを作成するために, ディスパーゼを用いた酵素処理により角膜上皮幹細胞を分化した角膜上皮細胞とともに細胞懸濁液(cell-suspension)として回収し, 上皮なしの羊膜上で培養するcell-suspension法による培養角膜上皮幹細胞シート作成法の有用性を検討した¹⁹⁾²⁰⁾。4週間培養して作成した培養角膜上皮幹細胞シートの性質を確認するために, *in vivo*のヒト角膜上皮細胞に特異的に発現している細胞骨格タンパクであるケラチン3およびケラチン12の発現を免疫染色で確認した。また電子顕微鏡による細胞の微細構造ならびに細胞間接着の形成を検討した。その結果,

上皮なし羊膜の上で上述のような方法で培養したヒト角膜上皮幹細胞は、表層では4-5層に重層化してケラチン3およびケラチン12を発現しており、角膜上皮細胞として分化していることが明らかとなった¹⁹⁾。また角膜上皮細胞間にはデスモゾームを、基底部の上皮細胞と羊膜基質の間にはヘミデスモゾームを形成しており、さらに、最表層細胞はタイトジャンクションを形成してバリアー機能を獲得していることが電子顕微鏡による観察により確認された²⁰⁾。重症 ocular surface 疾患では、眼瞼の異常や睫毛乱生、重症ドライアイを合併することが多く、このように優れた細胞間接着構造が発達し、バリアー機能を獲得していることは、術後の眼表面で移植した培養角膜上皮細胞が定着するために必要不可欠な要素であると考えられた。なお、基底細胞に十分な増殖能力が保持されていることは言及するまでもないことであった。

II-2.2 自家移植の臨床成績

動物およびヒトレベルで培養角膜上皮幹細胞シート作成法を確立した後、1999年より学内倫理委員会の承認を得て、培養角膜上皮幹細胞シート移植の臨床応用を開始した。臨床試験を施行するにあたり、全症例において十分なインフォームドコンセントのもとに口頭および文書で同意を取得し、手術を施行した。

まず、片眼性の重症 ocular surface 疾患に対して、健眼より少量(1×4mm)の角膜上皮幹細胞が含まれる角膜輪部組織を採取した。直ちに上皮を除去した羊膜基質上に培養した。Air-lifting法を併用して2週間で培養角膜上皮幹細胞シートを作成し、自家移植を行った²²⁾。対象症例は計5例5眼。熱・化学腐食例2例、放射線角膜炎1例、特発性2例であった。典型的な手術方法は以下のとおりである。まず輪部より約3mm外方で全周性に結膜を切開し、角膜表面および角膜周囲を覆う癬痕性結膜組織を除去した。結膜下結合組織を可能な限り切除したのち、結膜下に0.04%マイトマイシンC(MMC)に浸したスポンジを5分間作用させ、

300ml以上の生理食塩水で眼表面を十分に洗浄した。つぎに培養角膜上皮幹細胞シートをカルチャーインサートから切り出し、これを角膜輪部付近に10-0ナイロン糸で縫着した。羊膜と角膜実質間の血液貯留を防ぐためにドレナージ用小切開をシート周辺部の4箇所につき、治療用ソフトコンタクトレンズを装着して手術を終了した。コンタクトレンズは定期的に交換しながら連続装用を継続的に行った。術後の投薬としては、局所ではオフロキサシン、0.1%デキサメタゾンの点眼を行い、全身的には消炎を目的としてベタメタゾン内服(1-2mg/日)を術後1ヶ月間投与した。全例において、移植48時間後に培養上皮が角膜表面に生着していることを、フルオレセインを用いた生体染色法によって確認した。術後の経過観察中、感染症等の重篤な合併症はなく、術後4年経過した最長期間観察例でも、眼表面は引き続き自己の培養角膜上皮シートで恒常性が維持されており、良好な視力が維持されていることがわかった。以上のことより、再生医学的手法を用いた自家培養角膜上皮幹細胞シート移植は、極めて安全で有効な外科的再建法であることがわかった(図3)。

II-2.3 同種移植の免疫学的研究

片眼性疾患には前述の方法を用いることができるが、両眼性疾患あるいは急性期の疾患にはallo培養角膜上皮幹細胞シート移植を選択せざるを得ないことは納得できることである。このallo培養角膜上皮幹細胞シートの使用は生物学的には問題ないが、免疫学的には問題を生じる可能性がある。すなわち、allo培養角膜上皮幹細胞シート移植では、拒絶反応を回避することが角膜上皮幹細胞を温存する唯一の方法であり、手術の成否を決定する。そこで、マウス角膜上皮移植モデルを用いて検討したところ、マウスモデルにおけるallo角膜上皮幹細胞移植は、心臓移植などとはほぼ同時期に拒絶され、その拒絶日数は移植後約10日であった。このように免疫寛容が存在しないallo角膜上皮幹細胞移