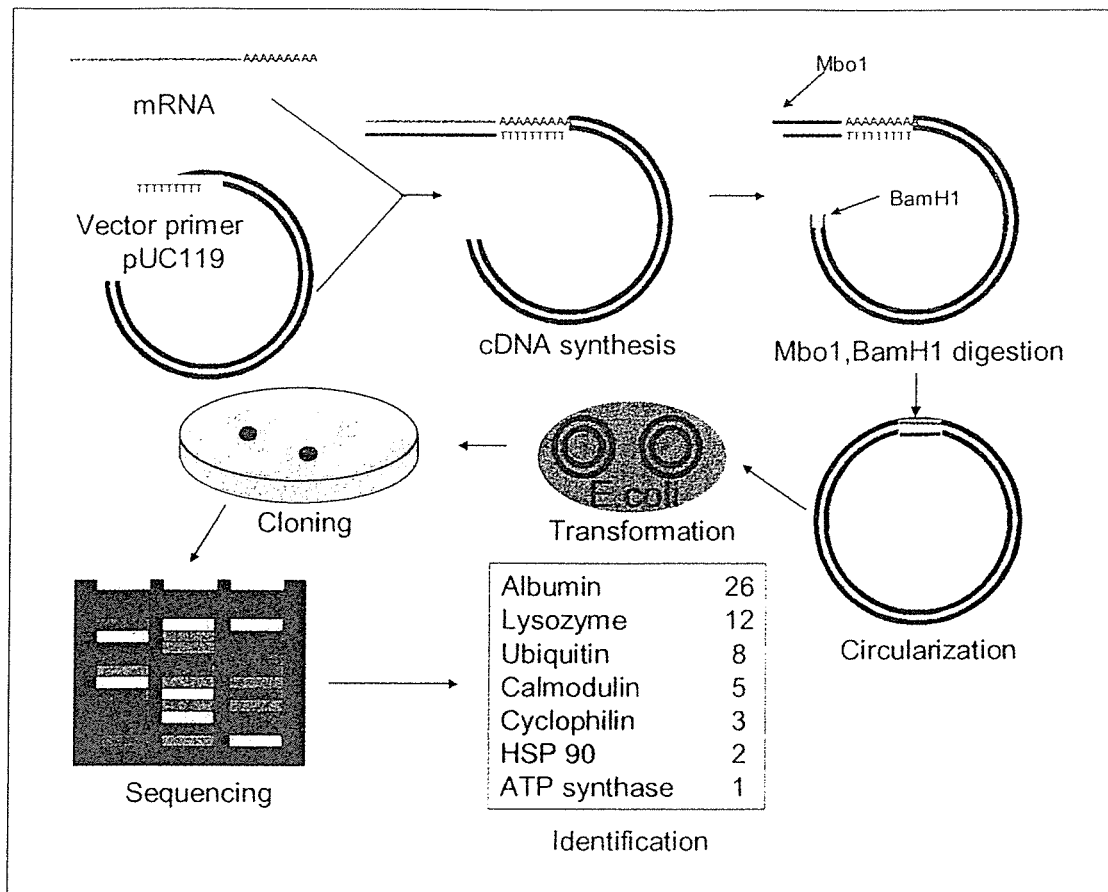


図24 Bodymap project における遺伝子発現解析法



pUC119 プラスミドベースのベクタープライマーにて cDNA 合成を行い、制限酵素で消化した後に環状化し、大腸菌に組み込みクローニングする。Poly A の逆方向よりシーケンスして、得られた配列を GS (Gene Signature) とし、フィルタリング、クラスターリングの後、GenBank データベースに対して類似性検索を行い遺伝子同定、リスティングを行った。

Reis-Bucklers 角膜変性症の原因遺伝子であることが明らかとなっている⁷⁵⁾。結膜上皮細胞についての解析では、全く異なった遺伝子発現パターンを示し¹⁾、眼表面という同一の環境にあり、組織学的にも類似した形態を示すにもかかわらず、二つの細胞は細胞機能的に大きく異なることが示された。

III-2 角膜上皮幹細胞

角膜上皮細胞には、独自の幹細胞が角膜と結膜の境界部である輪部に存在することがほぼ確実となっている。免疫染色の結果より p63⁷⁶⁾、ABCG2⁷⁷⁾ を初めとする様々な遺伝子が角膜上皮幹細胞のマーカーとして報告されている。我々は角膜上皮幹細胞の細胞学的性質を理解す

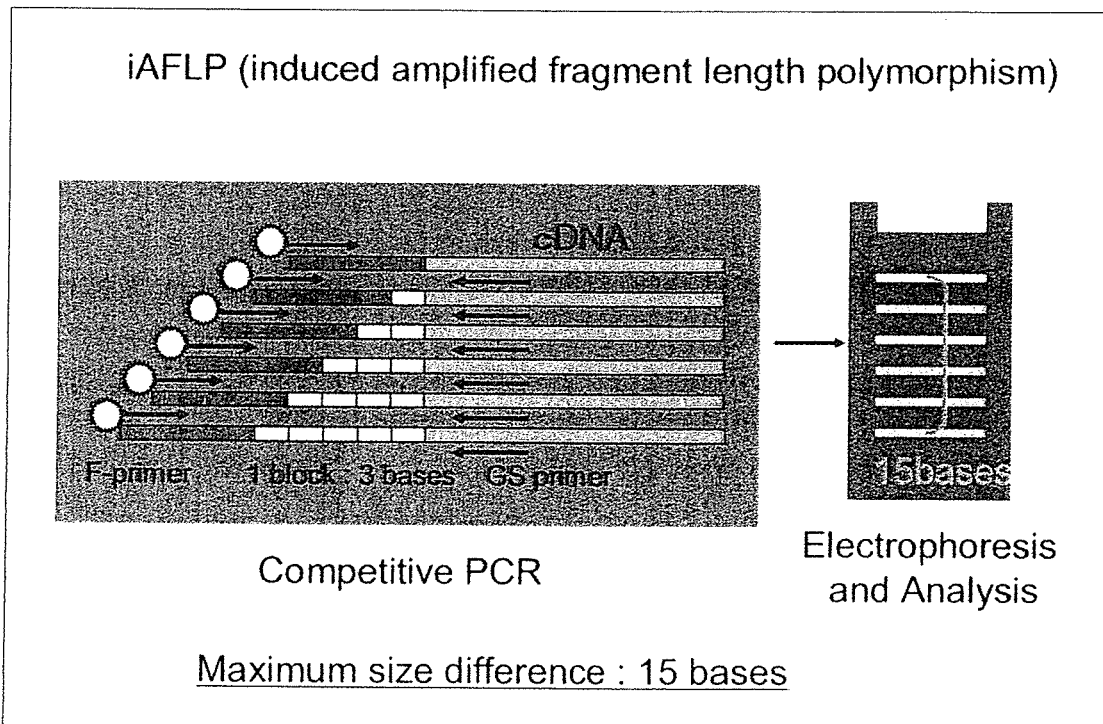
るために遺伝子発現解析を行った。方法はレーザーマイクロキャプチャーを用いて、角膜、輪部、結膜の上皮細胞を基底層、中間層、表層の3つの部位に分けて採取、RNA を抽出し、iAFLP 法によって相対的遺伝子発現解析を行った (図26)。対象とした遺伝子は角膜上皮細胞特異的な遺伝子と機能的に興味深い遺伝子あわせて約 500 とした。遺伝子発現データをクラスター解析したところ、角膜上皮幹細胞を多く含むと考えられる輪部基底細胞は角膜上皮細胞の全ての層と輪部の中間層、表層とはかなり異なる遺伝子発現パターンを示した (図27)。また輪部基底細胞に特異的に発現していた遺伝子のなかでも p75NTR (低親和性 NGF レセプター) は、角膜上皮細胞の幹細胞マーカーであ

図25 角膜上皮細胞における上位発現遺伝子リスト

Order	GS	Occurrence	Definition
1	GS02186	73	sulfated glycoprotein-2 / ApoJ / SP_40,40 / TRMP2
2	GS08025	55	Human mRNA for K12 keratin
3	GS00533	31	ferritin H chain
4	GS06069	28	aldehyde dehydrogenase type III (ALDHIII)
5	GS01706	26	CAPL protein
6	GS01919	22	calcyclin / growth factor-inducible 2A9 / prolactin receptor-associated protein (PRA)
7	GS00336	16	homologue to yeast ribosomal protein L41
8	GS00155	15	thymosin beta-4 / promyelocytic leukemia cell
8	GS00001	15	transforming growth factor-beta induced
10	GS00019	14	elongation factor 1-alpha (clone CEF4)
10	GS00418	14	ribosomal protein L9
10	GS00339	14	NAD(P)H:quinone oxidoreductase
13	GS01808	12	thymosin beta-10
14	GS00163	11	acidic ribosomal phosphoprotein P1
14	GS00463	11	lactate dehydrogenase-A (LDH-A)

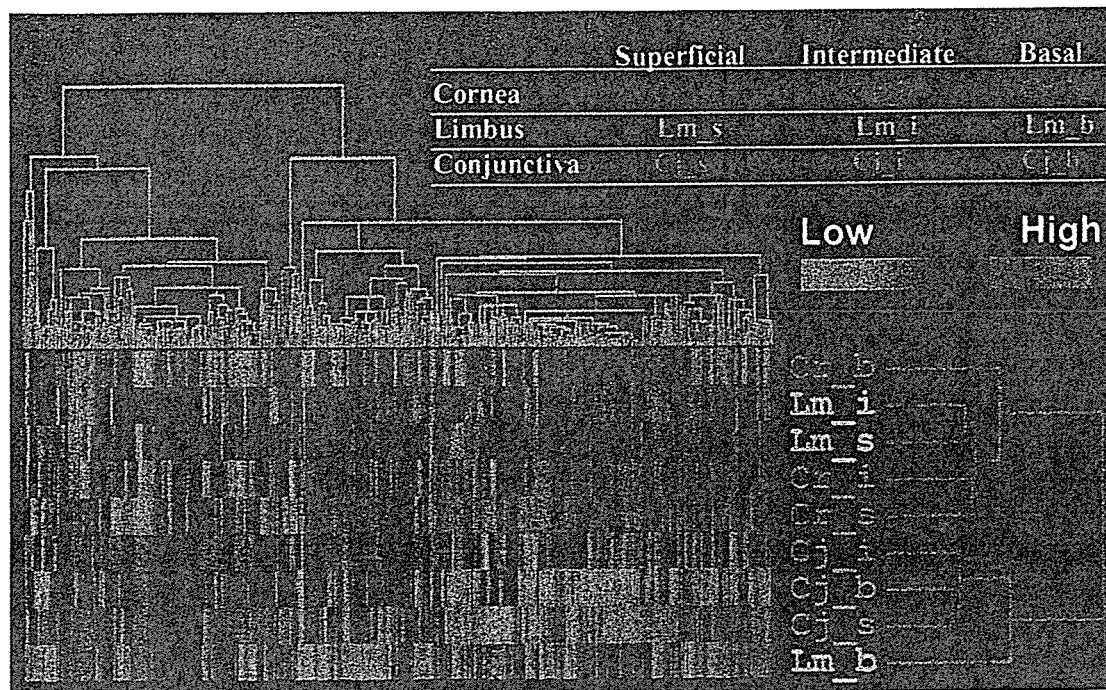
角膜上皮細胞で最も優位に発現している遺伝子は ApoJ で、角膜上皮細胞特異的のマーカであるケラチン 12 は 2 番目に優位な遺伝子であった。

図26 iAFLP による相対的遺伝子発現解析法



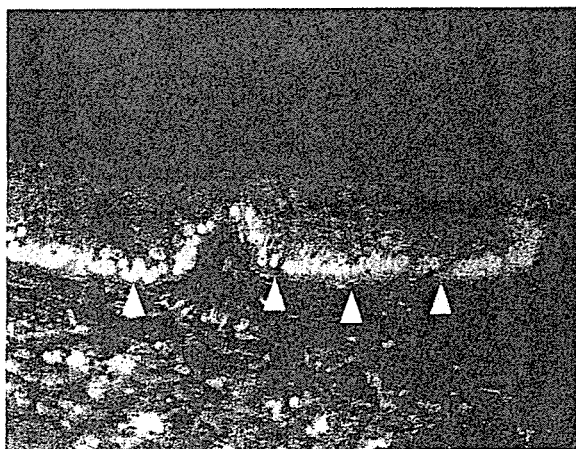
二本鎖 cDNA を制限酵素で消化して、サンプル毎に長さの異なるアダプターを付加する。サンプルを混合した後、制限酵素切断部位の近傍に設置した遺伝子特異的プライマーとアダプターに対する蛍光標識プライマーにて PCR を行う。得られた産物をシーケンサーにて電気泳動すると 3 塩基毎のラダーとなるが、各々の蛍光輝度は各サンプルの遺伝子発現相対量を反映している。

図27 眼表面上皮の層ごとの遺伝子発現解析



眼表面上皮（角膜：Cr，輪部：Lm，結膜：Cj）の基底層（b），中間層（i），表層（s）の遺伝子発現解析結果をクラスター解析したもの。角膜の全ての層と輪部の中間層と表層は類似した遺伝子発現パターンを示したが，ステムセルの存在する輪部上皮細胞はこれらとも，結膜上皮細胞とも違う独特の遺伝子発現パターンを示した。

図28 角膜輪部上皮における p75NTR の発現



p75NTR は角膜輪部基底層において優位な発現を示す。

る可能性を示し，実際，この遺伝子産物は免疫染色で輪部基底層に特異的に発現していた（図28）。この p75NTR は，食道，子宮頸部，胃粘膜上皮細胞において幹細胞マーカーである可能性が報告されている。

p63は，p53 のホモログとしてクローニン

グされ，これまでに 6 個以上の alternative spliced form が発見されている⁷⁸⁾。ノックアウトマウスの解析により，この遺伝子は特に表皮細胞の発生・分化過程において重要であることが示されている⁷⁹⁾。また角膜上皮細胞においても p63 陽性細胞が高いコロニー形成能を持ち，幹細胞の性質を色濃く持つことが示されている⁷⁶⁾。数あるアイソフォームのなかでも幹細胞維持に特に重要と考えられているのは N 末端の転写活性ドメインを欠く ΔNp63 で，p53 に対する dominant negative effect を持つものと考えられている。p53 は癌抑制，細胞周期停止，アポトーシス，細胞・個体老化に関与するとされ，幹細胞のように個体の一生を通して細胞増殖機能を維持する必要がある細胞にとっては忌むべき存在となる。したがって，ΔNp63 はこの p53 機能の阻害によって幹細胞機能の維持に積極的に関わっている可能性がある。我々は眼表面の上皮細胞において，p63 のどのアイソフォームが関わっているかを検討した。方法は

角膜、輪部、結膜上皮の基底層、中間層、表層の細胞をレーザーマイクロキャプチャーにて選択的に採取し、RNA を抽出して cDNA を合成し、PCR にて cDNA 全体を均一に増幅した。増幅後の cDNA を鋳型として p63 のアイソフォーム特異的なプライマーを用いて PCR を行った。結果として輪部と結膜上皮の基底層～中間層にて $\Delta Np63\alpha$ が発現しており、他のアイソフォームの発現は認められなかった (図29)。このことから眼表面上皮細胞の幹細胞維持において $\Delta Np63\alpha$ が重要な働きを持つことが示唆された⁸⁰⁾。

Ⅲ-3 結膜における異所性角膜幹細胞

Ocular surface を構成する角膜上皮細胞と結膜上皮細胞は、輪部を境として棲み分けているものとこれまで考えられてきた。しかしながら我々は、結膜上皮の中に角膜上皮細胞の特異的マーカーであるケラチン 12 陽性の細胞群が存在することに以前から気づいていた。そこで、我々は結膜上皮中にこのような細胞がどの程度存在するのか、そしてそれはケラチン 12 を発現している結膜上皮細胞であるのか、あるいは結膜上皮中に異所性に存在する角膜上皮細胞クラスターであるのかを検討した。方法はヒト角膜組織、結膜組織に対して免疫染色を行い、ケラチン 12 陽性の細胞群の存在様式を検討し、結膜組織より剥離した結膜上皮細胞に対して FACS、ウエスタンブロッティング、RT-PCR でケラチン 12 陽性細胞の存在率、ケラチン 12 遺伝子の発現について検討した。また結膜組織をケラチン 12 に対して免疫染色し、その連続切片においてケラチン 12 陽性および陰性の細胞群をレーザーマイクロキャプチャーにて選択的に採取し、RNA を抽出、iAFLP 法にて角膜上皮細胞、結膜上皮細胞とともに角膜上皮細胞特異的な 288 遺伝子について遺伝子発現パターンを検討した。結果として、輪部より 5 mm 以上離れた結膜組織 10 例中 9 例においてケラチン 12 陽性細胞が認められ、このような細胞の存在が一般的であることが示された (図30)。

FACS、ウエスタンブロッティング、RT-PCR の結果より、個体差はあるものの結膜上皮には 0.2% から 1.7% 程度のケラチン 12 陽性細胞が存在することが明らかとなった (図31)。しかしながら結膜上皮と角膜上皮の間には明確な境界がないため、輪部上皮の一部が結膜上皮のなかに広がっているという可能性も考えられる。そこで角膜上皮には存在しない杯細胞とケラチン 12 陽性細胞の位置関係について検討したところ、ケラチン 12 陽性細胞群に極めて近接した杯細胞の存在も確認され (図32)、ケラチン 12 陽性細胞の一部は結膜上皮の中に存在していることが証明された。iAFLP による遺伝子発現解析結果によると、結膜上皮中のケラチン 12 陽性細胞の遺伝子発現パターンは角膜上皮細胞のそれと極めて一致しており、また逆に結膜上皮中のケラチン 12 陰性細胞の遺伝子発現パターンは結膜上皮細胞のそれと極めて一致していることが明らかとなり (図33)、結膜上皮中のケラチン 12 陽性細胞は角膜上皮細胞と同等の細胞学的性質を持つことが示された。これらの細胞は結膜上皮のなかに異所性に存在する角膜上皮幹細胞とその分化した細胞群であると我々は考えている⁸¹⁾。

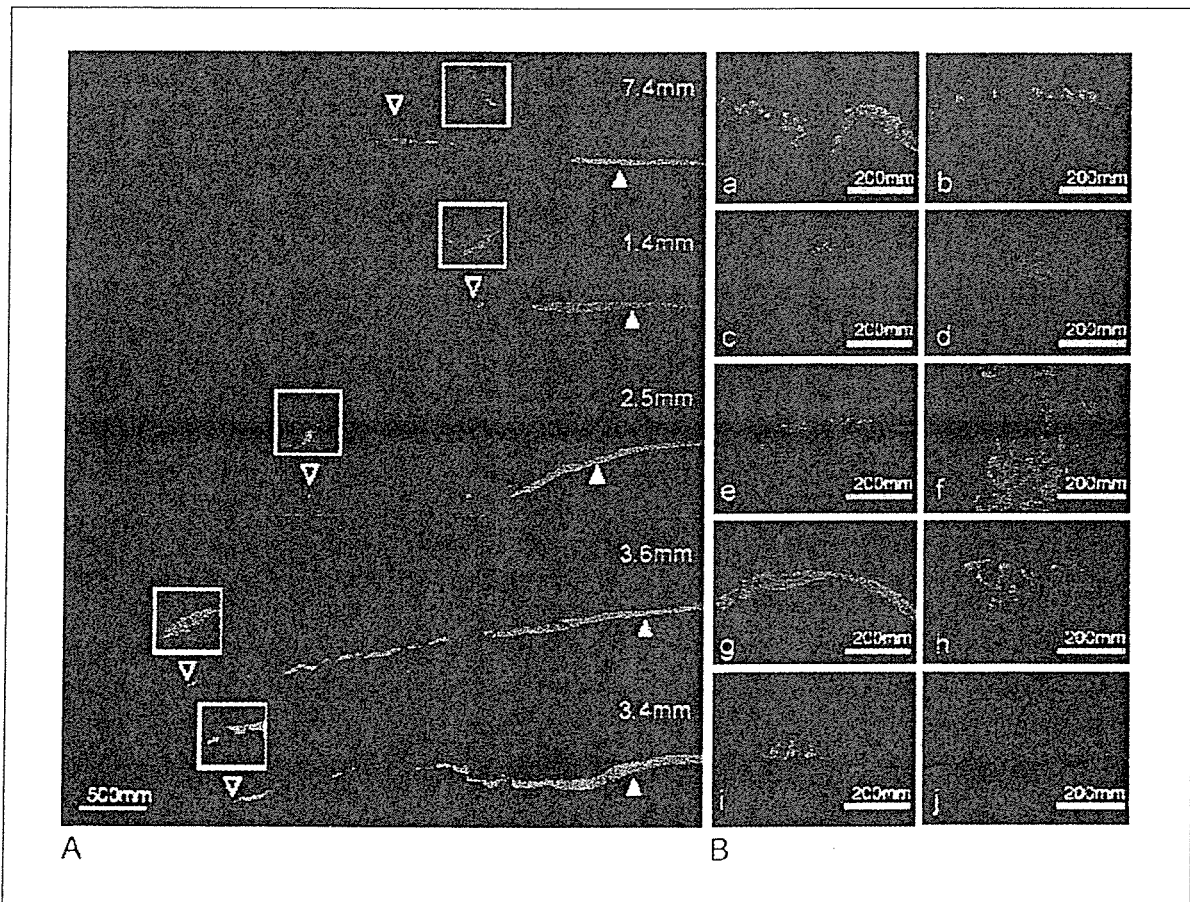
結膜上皮のなかに角膜上皮幹細胞クラスターが存在するのであれば、結膜上皮は角膜上皮細胞の代用細胞として使用できる可能性が出てくる。両眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症では、allo 培養角膜上皮幹細胞シート移植や auto 培養口腔粘膜上皮シート移植が行われているが、前述した口腔粘膜上皮のように、自家結膜上皮細胞を角膜上皮代用細胞として使用することができれば、極めて有効な治療となる可能性がある。我々はヒト結膜上皮細胞が角膜上に移植できるかどうか、移植手術後にも透明性が良好に維持されるかどうかについて検討した。方法は、ヒト結膜組織より酵素的に結膜上皮細胞を剥離したのちヒト羊膜上に播種して培養し、結膜上皮シートを作成した (図34, 35)。作成した上皮シートを家兎角膜上に異種移植し、免疫抑制薬の使用のもとに移植後の上皮の状態を観察した。

図29 眼表面上皮における p63 アイソフォームの発現

	Cornea			Limbus			Conjunctiva			Southern Blotting	
	Superficial (n=3)	Intermediate (n=3)	Basal (n=3)	Superficial (n=3)	Intermediate (n=3)	Basal (n=2)	Superficial (n=3)	Intermediate (n=3)	Basal (n=2)		
TA domain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNo domain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
a (upper)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
b (lower)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TAp63a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TAp63b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TAp63g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNp63a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNp63b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNp63g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Keratin 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta actin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

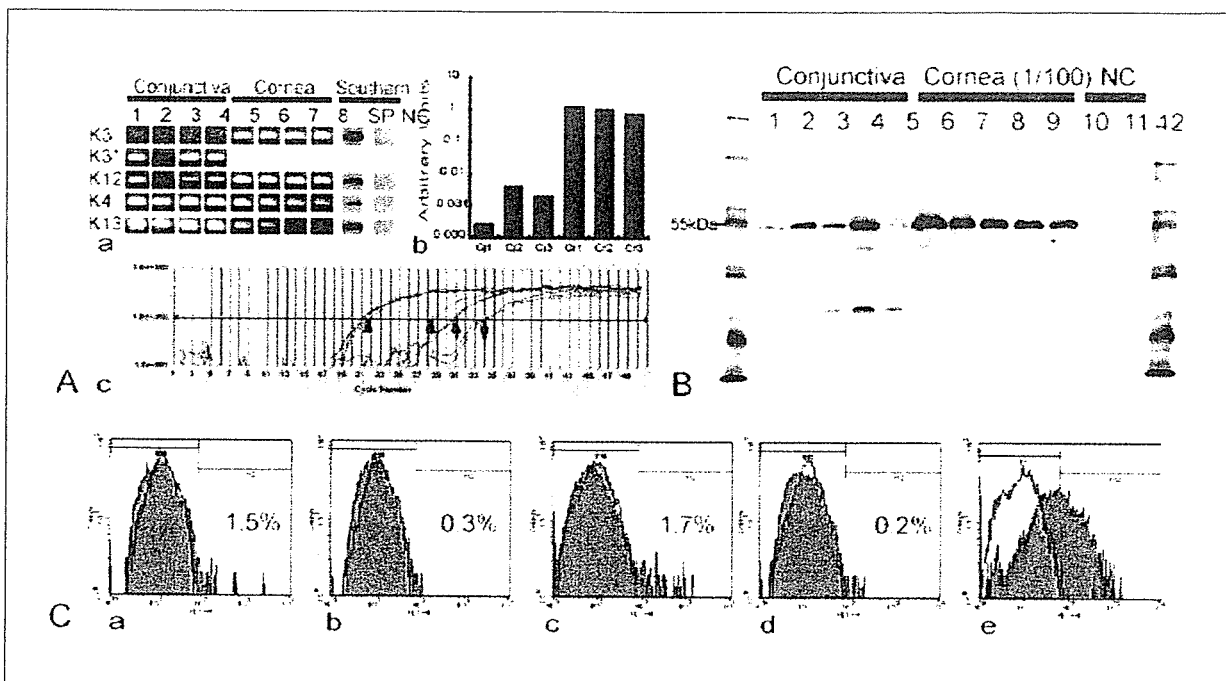
眼表面上皮の基底層，中間層，表層をレーザーマイクロキャプチャーで採取し，RNA 抽出，cDNA 合成後に PCR にて均一に増幅する。増幅した cDNA を鋳型として p63 の各アイソフォームについて PCR を行ったところ，輪部と結膜の基底層～中間層において ΔNp63 アイソフォームが検出された。

図30 結膜におけるケラチン 12 陽性細胞群



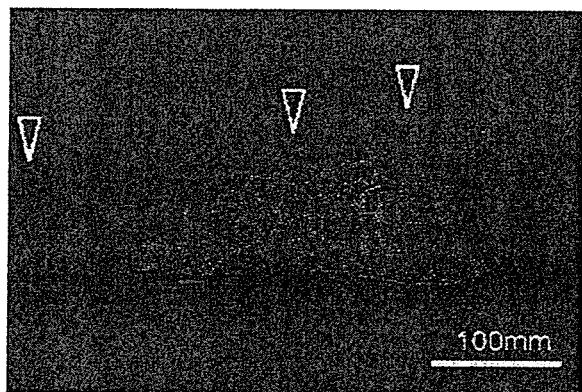
ケラチン 12 陽性細胞群はボーマン膜終端より最長で 7.5mm の位置においても認めることができた (A)。また輪部から 5 mm 以上離れた結膜組織 10 例中 9 例においてケラチン 12 陽性細胞が認められた (B)。

図31 結膜上皮におけるケラチン 12 の発現



結膜上皮におけるケラチン mRNA (A), 12 タンパク (B), 細胞 (C) の存在を検討した. 個人差はあるものの, 結膜上皮の中には約 0.2~1.7% のケラチン 12 陽性細胞が存在していた.

図32 ケラチン 12 陽性細胞群と杯細胞



ケラチン 12 陽性細胞群 (緑) に極めて近接して, 杯細胞 (矢頭) の存在が確認された.

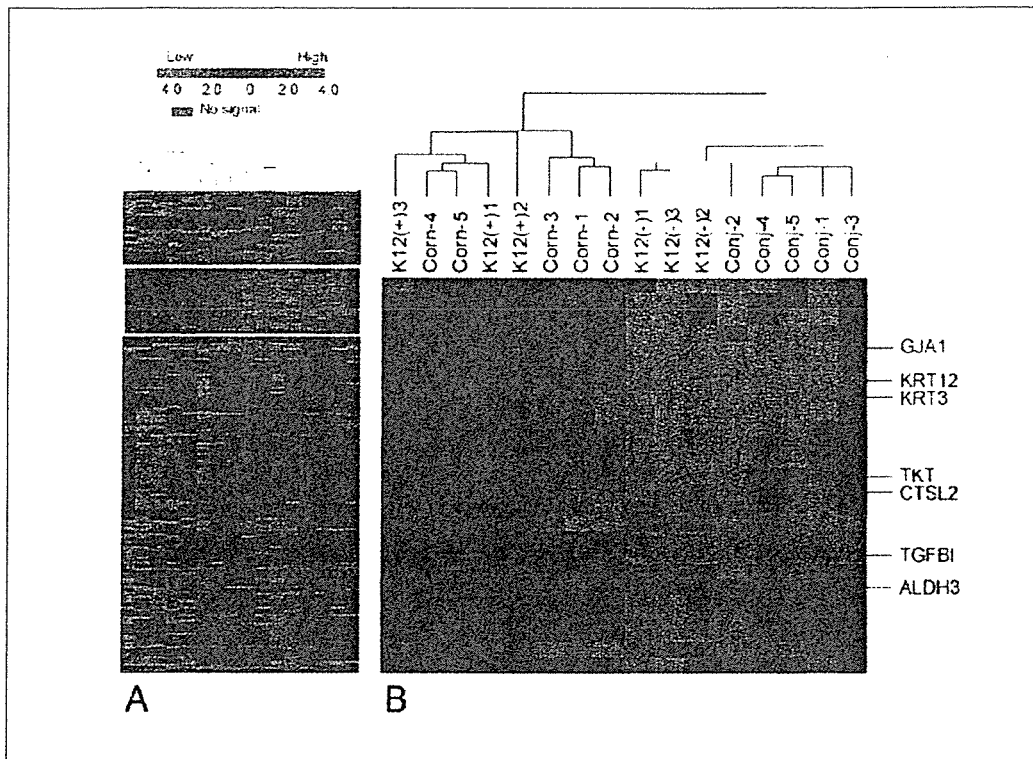
また移植後 2 週間, 1 ヶ月後の角膜を採取して, 培養上皮とともに組織学的, 免疫組織学的解析を行った. 結果として我々の作成したヒト培養結膜上皮シートは家兎角膜上で手術後 2 週間, 1 ヶ月においても良好に維持され, 手術および手術後のストレスに十分耐える物理的・細胞組織学的強度を備えていることが証明された (図36). 採取した組織を電子顕微鏡にて観察したところ, 移植後の培養結膜上皮ではマイクロ

ビライ, デスモゾーム, ヘミデスモゾーム, タイトジャンクション等の微細構造が培養中の結膜上皮のそれと比べ, 明らかに *in vivo* の状況に近いものとなっていた (図37). これらの組織の免疫組織学的検討では, 培養中および移植後の培養ヒト結膜上皮シートは *in vivo* 結膜上皮細胞の性質を維持していたが, 一方で角膜上皮の特異的マーカーであるケラチン 12 も発現しており, 先に述べた異所性角膜上皮細胞の性質も同時に維持しているものと考えられた (図38). このことから角膜上に移植した場合には, 角膜上皮細胞の細胞学的特性を発現して有効に働くのではないかと期待される⁸²⁾.

III-4 角膜無血管性に係わる因子

角膜は生体内で無血管性を維持する数少ない組織であり, この機構には角膜上皮が深く関係すると想像されてきた. 実際, 培養角膜上皮シートは新生血管を誘発しないが, 培養口腔粘膜上皮シートは新生血管をわずかに誘発する⁸³⁾. そこで, ヒト角膜上皮細胞と結膜上皮細胞を採取して, 主要な 36 の血管新生関連因子の発現

図33 結膜上皮に存在するケラチン 12 陽性細胞群の遺伝子発現パターン



結膜上皮内に存在するケラチン 12 陽性細胞群 [K12(+1), K12(+2), K12(+3)] およびケラチン 12 陰性細胞群 [K12(-)1, K12(-)2, K12(-)3] をレーザーマイクロキャプチャーにて採取して、iAFLPにて遺伝子発現解析を行い、角膜上皮細胞 (Corn-1~5) と結膜上皮細胞 (Conj-1~5) と比較した。クラスター解析によって、ケラチン 12 陽性細胞群は角膜上皮細胞と、ケラチン 12 陰性細胞群は結膜上皮細胞と同じ遺伝子発現パターンを示した。

図34 ヒト羊膜上におけるヒト結膜上皮細胞の培養

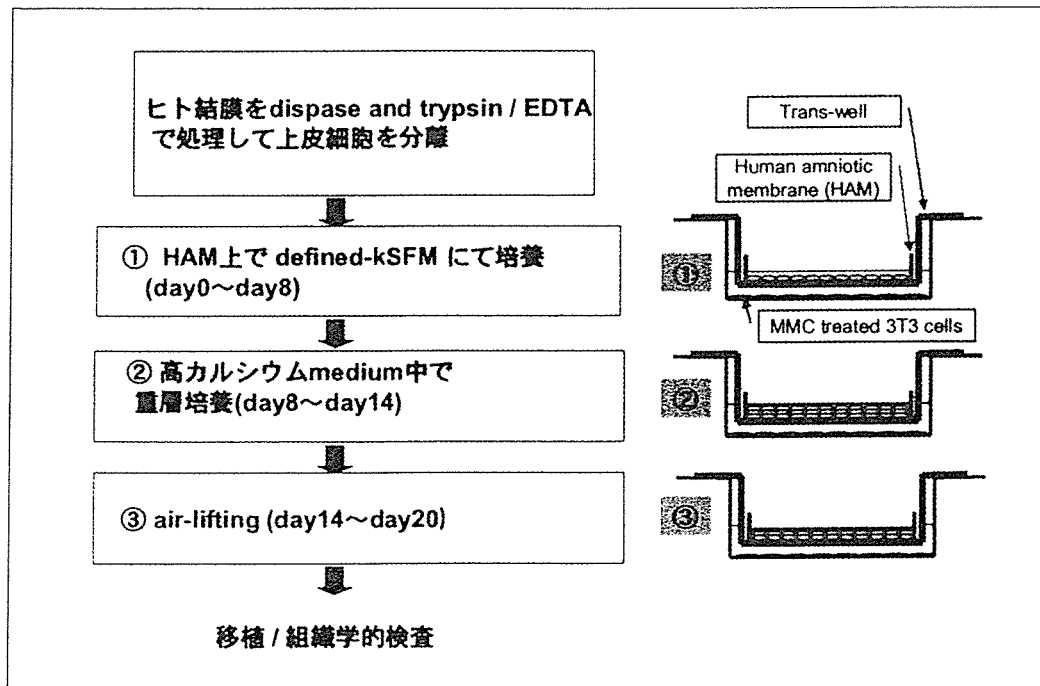
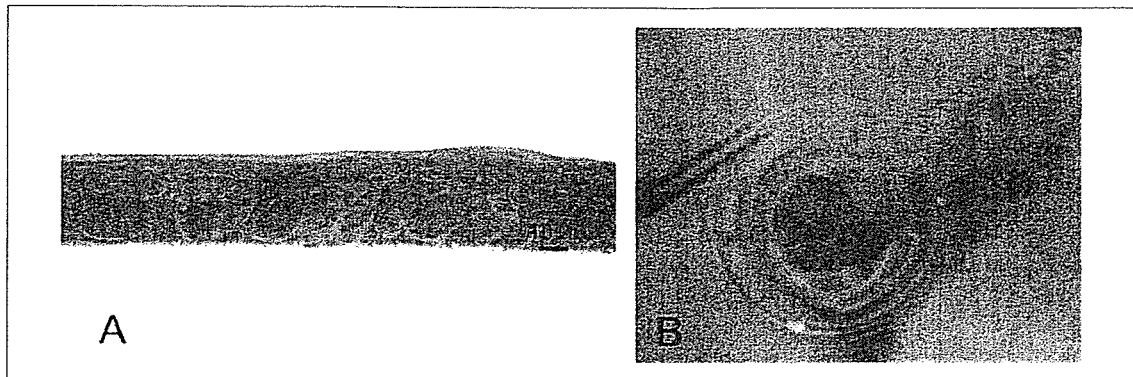
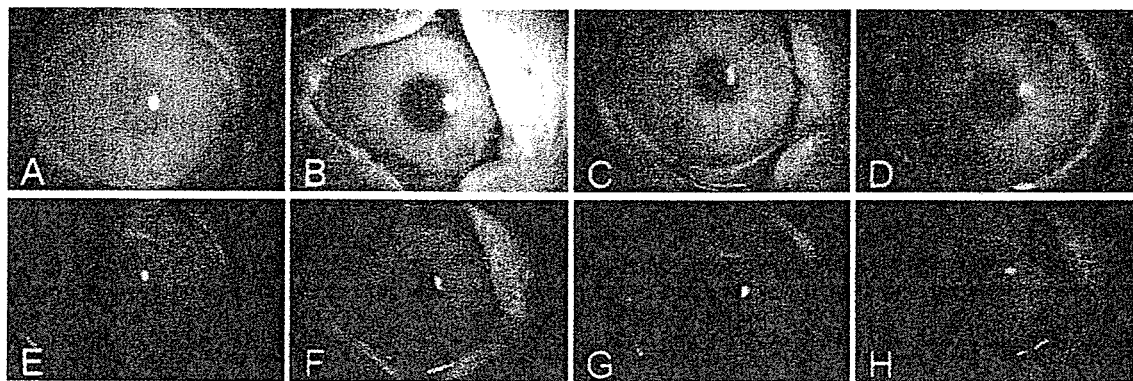


図35 培養ヒト結膜上皮シート



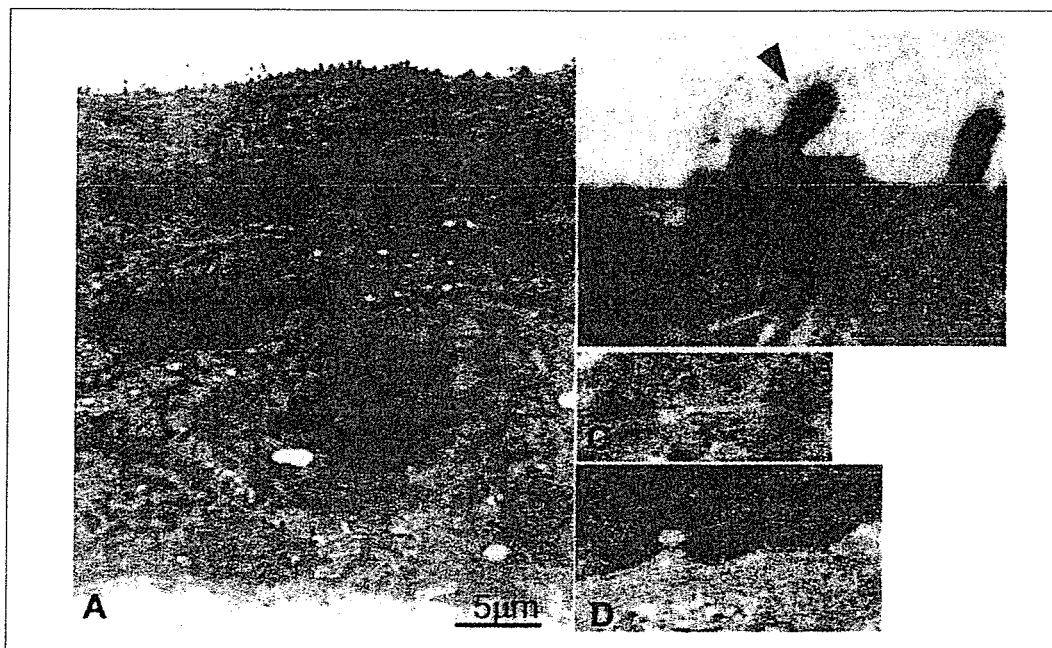
ヒト結膜上皮細胞は4-5層に重層化しており（A：トルイジンブルー染色）、透明性は良好である（B）。

図36 家兔角膜上への培養結膜上皮シート移植後の前眼部所見



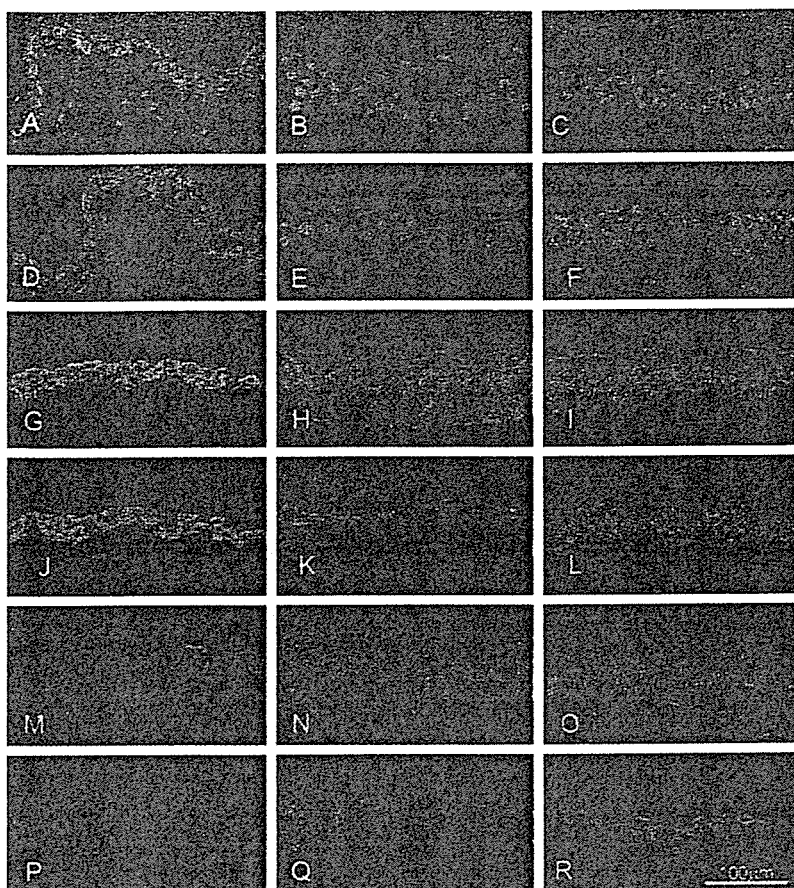
培養結膜上皮シート移植直後（A・E）、4日後（B・F）、14日後（C・G）および1ヵ月後（D・H）、全観察期間を通じて上皮欠損を認めなかった（下段はフルオレセイン染色）。

図37 家兔眼に移植した後に摘出した上皮の透過型電子顕微鏡観察像



A：生着上皮全体像，B：矢頭 マイクロビリ，矢印 タイトジャンクション様構造，C：デスマソーム，D：ヘミデスマソーム

図38 培養結膜上皮シートおよび生着上皮の免疫組織学的検討



in vivo 結膜上皮 (A・D・G・J・M・P), 培養結膜上皮 (B・E・H・K・N・Q), 生着上皮 (C・F・I・L・O・R), 蛍光免疫染色 (緑): Muc 5AC (A-C), Muc 4 (D-F), CK13 (G-I), CK4 (J-L), CK3 (M-O), CK12 (P-R), 対比染色 (赤) プロピジウムアイオダイド

を introduced amplified fragment length polymorphism (iAFLP) 法で比較し, その後 real time PCR, *in situ* hybridization 法, 免疫染色法, 免疫電顕法で確認を行った. iAFLP の結果, thrombospondin-1 (TSP-1) の発現のみが角膜上皮において有意に亢進しており, この結果は real time PCR などで確認された. TSP-1 の局在は, 角膜上皮基底細胞内基底側, 角膜上皮下ボーマン膜に認められたが, 結膜上皮には認めなかった. 単一の血管新生抑制因子の欠落では角膜血管新生はきたさないと報告もあり, 角膜無血管は種々血管新生関連因子の発現バランスにより制御されていると推測されるが, 主要血管新生抑制因子のひとつである TSP-1

が, 結膜には存在せず, 角膜上皮下に存在することは非常に興味深いことである. また, この TSP-1 は種々細胞外マトリックスと高い親和性を持つことが報告されており, 角膜上皮基底細胞から分泌された TSP-1 がボーマン膜中の細胞外マトリックスに結合し, 角膜の無血管性維持に寄与している可能性が示唆される⁸⁴⁾.

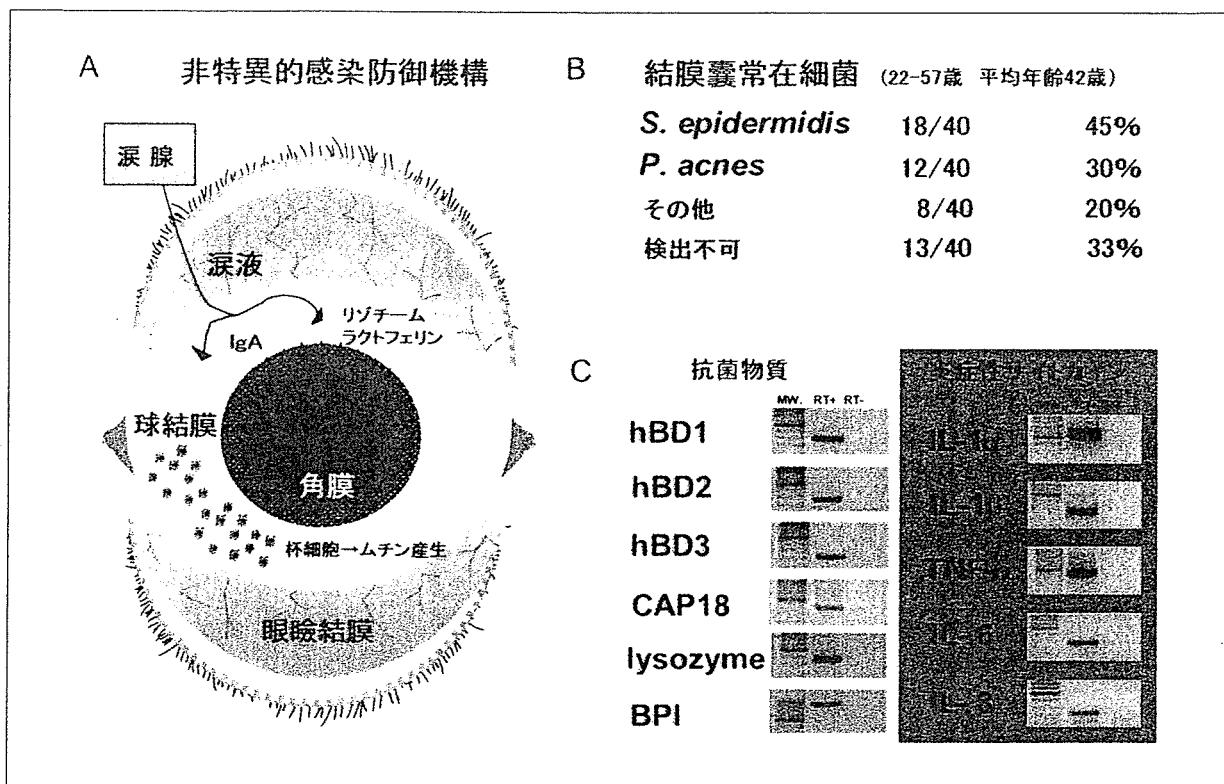
IV 眼粘膜免疫に関する検討

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

Ocular surface は角膜上皮と結膜上皮で構成される粘膜であり, 常に外界と接触し, 外界か

図39 眼表面における常在細菌の存在と非特異的感染防御機構



A：眼表面の非特異的感染防御機構， B：眼表面の常在細菌， C：角膜上皮細胞の RT-PCR

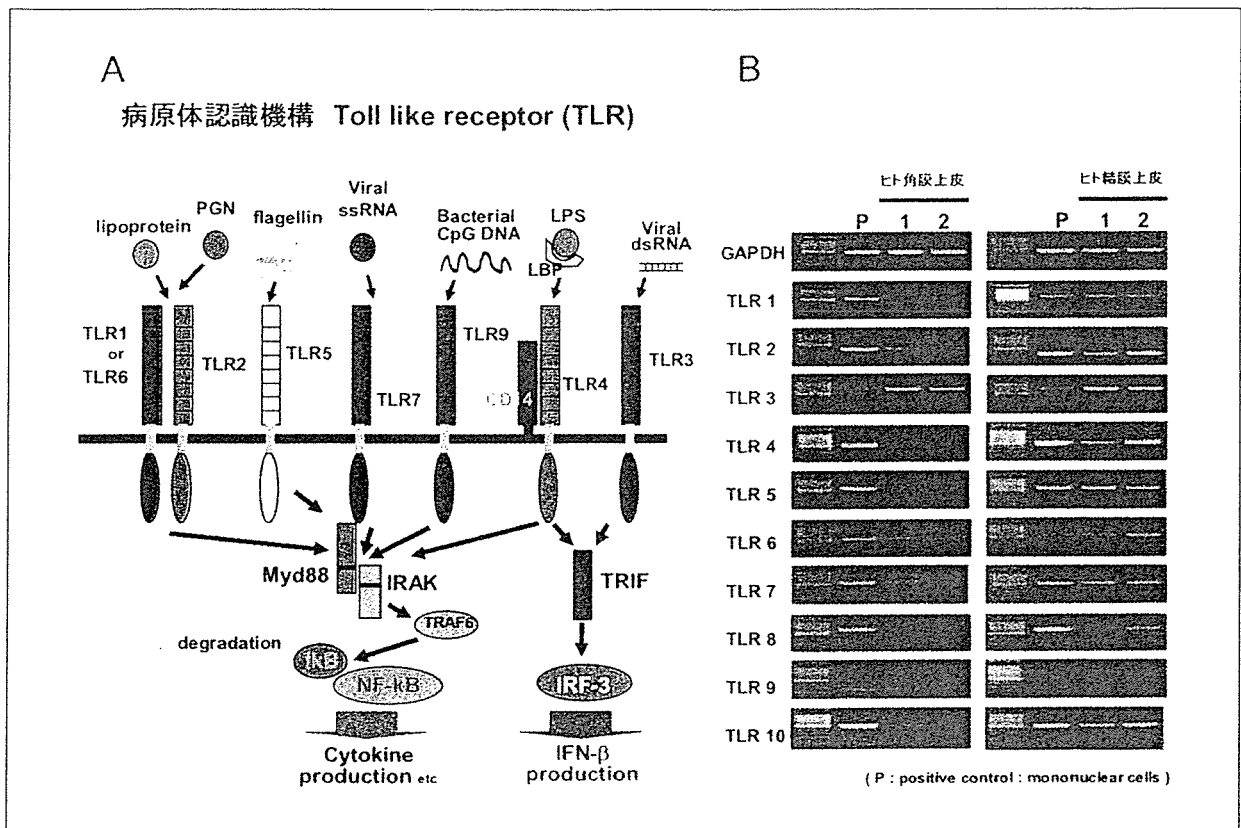
らの異物や微生物の侵入の危険にさらされている。涙液中には IgA, リゾチーム, ラクトフェリンなどの抗菌物質が存在し, また結膜杯細胞からムチンが産生され, 細菌・異物の除去に働いている。このように眼表面には, 非特異的感染防御機構が存在する (図39A)。その一方で, 眼表面には常在細菌が存在する。我々は, 22歳から57歳 (平均年齢42歳) の健常人40人における結膜嚢の細菌検出率を調べたところ, 45% に表皮ブドウ球菌が, 30% にアクネ菌が検出された (図39B)。従来より粘膜上皮は, 主として物理的バリアーとして働くとみなされていたが, 最近では上皮細胞自身が, 各種のサイトカインや抗菌物質を産生し, 生体防御の第一線を担っていることが明らかとなってきた。角膜上皮細胞自身も, 抗菌物質や炎症性サイトカインを産生する能力を有し (図39C), IL (interleukin)-1 α の刺激により IL-6, IL-8 や β -defensin 2 の産生が亢進される⁸⁵⁾。しかし, 眼表面には常在細菌が存在するにもかかわらず,

健常状態では炎症を認めない。このことは, マクロファージやリンパ球などの免疫担当細胞が, 細菌の菌体成分に反応して炎症を惹起するのは対照的である。

IV-1.2 Ocular surface 上皮の自然免疫と TLRs

細菌やウイルスなどの病原微生物の侵入に対する感染防御機構は, 自然免疫と獲得免疫に分類される。獲得免疫は, 抗原特異的 Tリンパ球と Bリンパ球によって誘導されるが, クローン増殖する必要があるために, 機能するまでに数日かかる。これに対して自然免疫は, 獲得免疫が働く前の感染早期に働く防御機構である。これまで自然免疫とは, 好中球やマクロファージなどの貪食細胞, 補体, 抗菌物質などを中心とした非特異的防衛機構であると考えられてきた。しかし近年, TLRs が微生物の構成成分を特異的に認識し, 自然免疫において重要な役割を担っていることが明らかとなった⁸⁶⁾。

図40 Toll like receptors (TLRs)



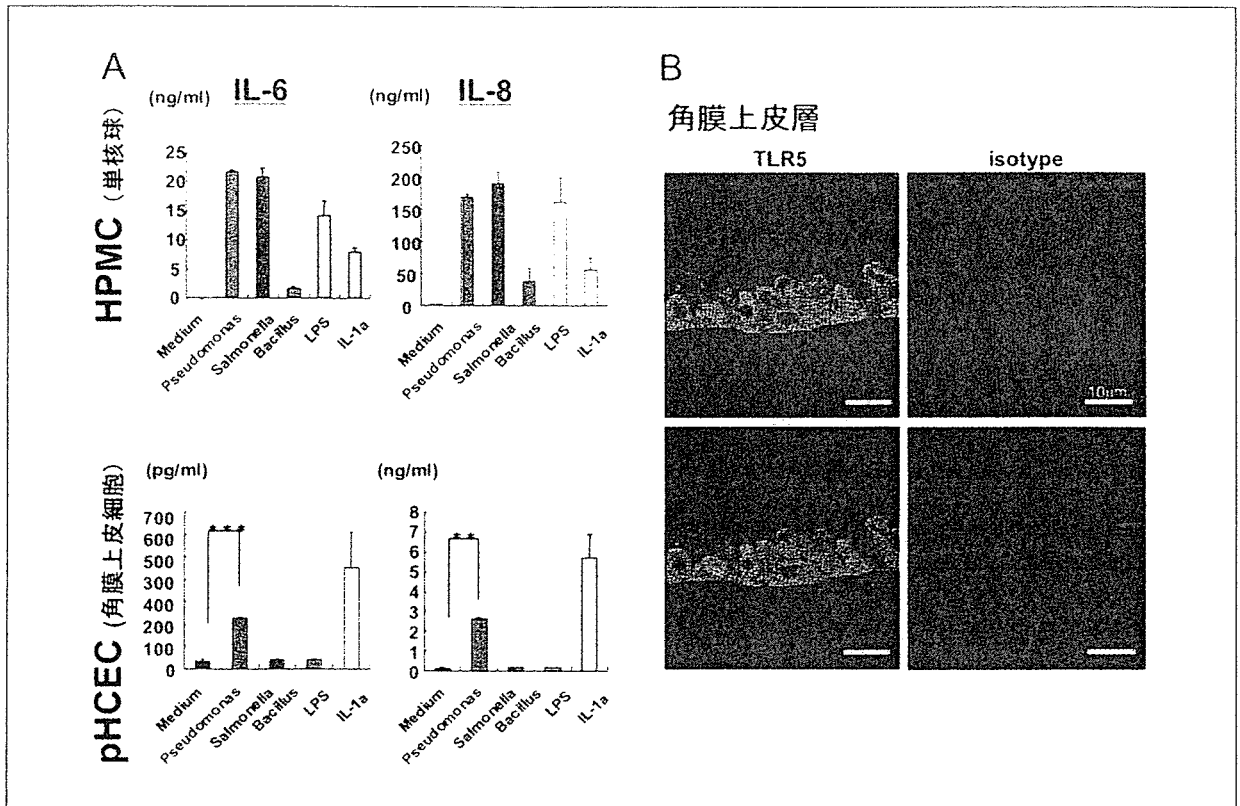
A : 病原体認識機構としての各 TLR, B : 眼表面上皮における TLRs の発現

TLRs は、タンパク質結合モチーフであるロイシンに富む領域 (leucin-rich repeat : LRR) を細胞外に有し、LRR を介して細菌、ウイルス、または真菌といったさまざまな病原微生物の構成成分を認識する (図40A)。ヒトでは 11 種類 (TLR1-TLR11) の TLRs が同定され、グラム陽性菌の細胞壁に多量に含まれるペプチドグリカン (PGN) の一成分であるリポタンパク質や真菌の細胞壁成分であるチモザン (zymosan)、鞭毛の構成成分であるフラジェリン、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖 (LPS)、ウイルスの構成成分を認識している。さらに最近では、これらの TLRs が病原微生物を認識し宿主自然免疫応答を惹起することで、獲得免疫系を効果的に活性化することも明らかとなった⁸⁶⁾。

近年この TLRs が、免疫担当細胞だけでなく腸管上皮などの粘膜上皮細胞に発現していることが報告された。我々は、眼表面上皮におけ

る TLRs の発現について解析を行ったところ、遺伝子発現レベルでは TLR1-10 のうち、結膜上皮はすべてを発現し、角膜上皮では TLR8 以外の全てが発現していた (図40B)。また、培養角膜上皮細胞を用いてタンパクレベルでの発現や菌体成分による刺激実験を行ったところ、グラム陰性菌の菌体成分である LPS で刺激した角膜上皮細胞は、炎症性サイトカイン IL-6, IL-8 を産生しなかった。角膜上皮細胞では、TLR4 の発現は細胞内に局在し、そのことが炎症反応を惹起しないことに関与していると考えられた⁸⁵⁾。PGN で刺激した角膜上皮細胞も、同様に炎症性サイトカインを産生せず、これは TLR4 同様に TLR2 発現が角膜上皮細胞では細胞内に局在するためであると考えられた⁸⁵⁾。また我々は、細菌の鞭毛成分であるフラジェリンに対して、角膜上皮細胞が炎症性サイトカインを産生するかどうか解析した。その結果、眼表面の病原菌である緑膿菌 (*Pseudo-*

図41 角膜上皮とTLR5

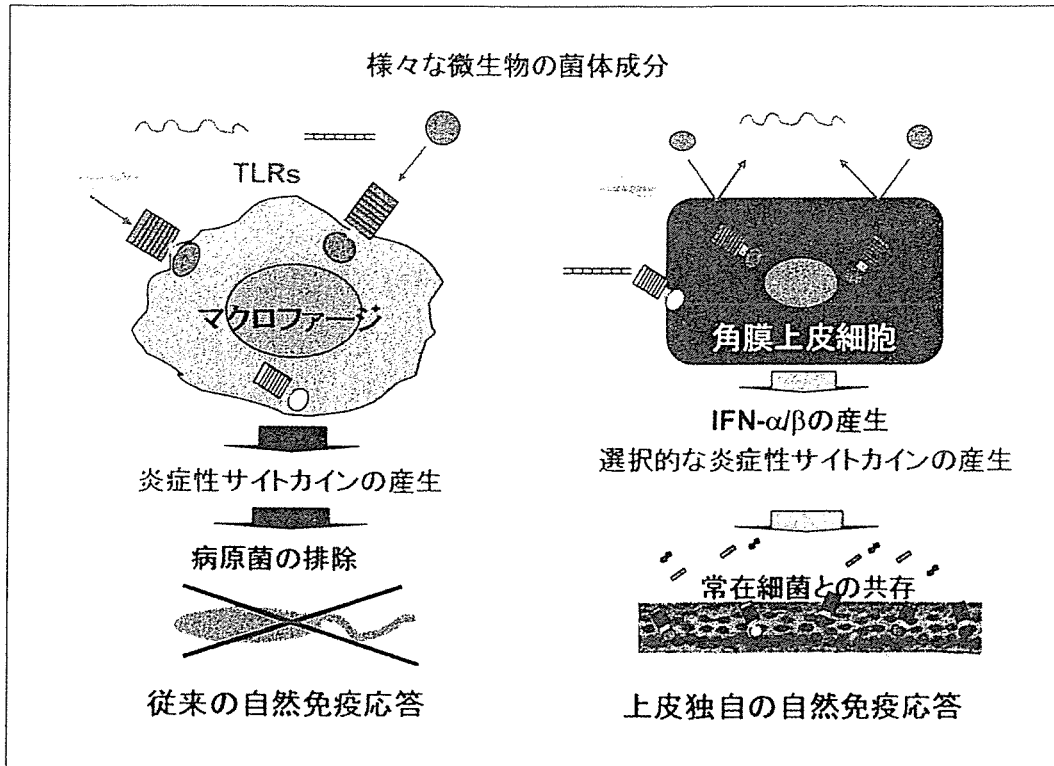


A：細菌の鞭毛成分フラジェリンに対する角膜上皮細胞の反応性
B：角膜上皮層における TLR5 局在（免疫染色）

monas aeruginosa) 由来のフラジェリンに対しては炎症性サイトカインを産生するが、眼表面とは無関係のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) や眼表面の常在細菌であるバチルス菌 (*Bacillus subtilis*) のフラジェリンに対しては、角膜上皮細胞が炎症性サイトカイン IL-6, IL-8 を産生しないことを解明した⁸⁷⁾(図41A)。さらに、角膜上皮の免疫染色を行ったところ、表層細胞層には TLR5 のタンパクの発現を確認できず、主に基底細胞層に TLR5 のタンパクの発現が確認された⁸⁷⁾(図41B)。このことは結膜上皮においても同様であった。この結果より、眼表面上皮細胞は TLR5 を介して眼表面の病原菌由来のフラジェリンに対して炎症性サイトカインを産生するが、上皮欠損のない健全な眼表面では TLR5 は機能していないと考えられる。上記で使用した LPS, PGN, Pam₃CSK4, 緑膿菌ならびにサルモネラ菌, バチルス菌由来のフラジェリンは、いずれも末梢血単核球では

著しい炎症性サイトカインの産生を誘導することを確認できており、角膜上皮細胞と免疫担当細胞では、同じように TLRs を発現していてもその局在や機能が異なることが示唆された⁸⁵⁾⁸⁷⁾⁸⁸⁾。ウイルスによって合成される二本鎖 RNA を認識する TLR3 を、角膜上皮は発現していたが、単球などの免疫担当細胞が細胞内に TLR3 を発現しているのとは対照的に、角膜上皮細胞では TLR3 を細胞表面に発現していた⁸⁸⁾。また、二本鎖 RNA と同源性を示す polyI:C で刺激したとき、角膜上皮細胞は炎症性サイトカイン IL-6, IL-8 を産生するだけでなく、IFN- β mRNA を結膜線維芽細胞の約 10 倍、末梢血単核球の約 500 倍発現した⁸⁸⁾。IFN- β は、抗ウイルス作用だけでなく抗炎症作用もあり、我々は眼表面が常在細菌に対して容易に炎症を起こさない機構に、この TLR3 が関与している可能性について現在検討している。さらに我々が結膜上皮細胞についても検討したとこ

図42 粘膜上皮細胞独自の自然免疫機構の存在



ろ、結膜上皮細胞も角膜上皮細胞と同じ自然免疫応答を示した。角膜とは構造的に異なった結膜上皮細胞も角膜上皮と同様に、免疫担当細胞である末梢血単核球とは異なった自然免疫応答を有することは、これら ocular surface 上皮細胞が、ocular surface に常在細菌が存在するにもかかわらず健全な眼表面には炎症が生じない機構に大きく関与している可能性を示すものである。マクロファージなどの免疫担当細胞では、様々な菌体成分を TLRs を介して認識し、炎症を惹起し、病原菌を排除する。これは従来から考えられている自然免疫応答である。しかし、眼表面上皮などの常在細菌と接している粘膜上皮では、マクロファージとは、TLRs の局在もその機能も異なっていることが明らかとなってきたことより、これらの粘膜上皮細胞独自の自然免疫機構が、常在細菌と共存する上で必要不可欠なものであるに違いないと我々は考えている（図42）。

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

Stevens-Johnson 症候群と中毒性表皮壊死症 (toxic epidermal necrolysis,) は全身の皮膚・粘膜傷害と高熱で発症する重篤な疾患である。Stevens-Johnson 症候群の約 60%, 中毒性表皮壊死症の約 90% は薬剤が誘因とされることから、これらは重症薬疹、すなわち皮膚以外の臓器にも重篤な症状を発現する薬疹として位置づけられている。いずれも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。この二つの疾患は、同じ範疇の疾患と理解され、眼科領域では併せて広義の Stevens-Johnson 症候群と呼称している。急性期には、角膜穿孔や角膜感染症など重篤な眼合併症を招き、重篤な視力障害をもたらす。全身の炎症が沈静化した慢性期にも、瞼球癒着や角膜混濁などの癥痕性変化が高頻度に生じ、視力障害とドライアイが持続する⁸⁹⁾⁹⁰⁾。病態は未だ不明であり、有効な治療法も確立していない。

図43 Stevens-Johnson 症候群の視力と眼所見

眼所見	相関係数	p値
血管侵入	-0.8097	<.0001
角膜混濁	-0.7839	<.0001
結膜侵入	-0.7260	<.0001
瞼球癒着	-0.6485	<.0001
生体染色 (SPK)	-0.6014	<.0001
輪部上皮消失	-0.5502	<.0001
涙点閉鎖	-0.5180	<.0001
マイボラインの異常	-0.4875	<.0001
角化	-0.4765	<.0001
M腺圧出油脂の異常	-0.4531	<.0001
充血	-0.3833	<.0001
睫毛乱生	-0.3585	<.0001
上皮欠損	-0.1691	0.0473

我々は慢性期 Stevens-Johnson 症候群患者の視力に影響する因子を明らかにするため、多施設スタディとして眼科に通院する慢性期患者 73 名 [男性 33 名, 女性 40 名, 年齢 10~83 歳 (平均 48 歳)] の病歴, 視力, 眼所見を解析した⁹⁾。これらの発症年齢は 2~69 歳 (平均 28 歳), 罹患期間は 1~54 年 (平均 19 年) であった。このうち, 眼表面再建術を実施していない 138 眼の視力は, 0.01 未満が 42 眼, 0.01 以上 0.1 未満が 32 眼, 0.1 以上 1.0 未満が 36 眼, 1.0 以上が 28 眼であり, 約半数が 0.1 未満と極めて低視力であった。これらの結果より, 若年期に本症を発症して視力障害に陥り, その後長く眼科に通院する患者の多いことが明らかとなった。眼合併症 13 項目を 4 段階にスコア化して評価したところ, すべての項目が視力と相関し, なかでも角膜血管侵入, 角膜混濁, 結膜侵入が高い相関を示した (いずれも $P < 0.0001$) (図43)。興味深いことには, 輪部上皮 (palisades of Vogt) の消失, 言い換えれば角膜上皮幹細胞の喪失が, 該当率, 重症度ともに最も高く (図44), さらに多変量解析の結果より輪部上皮消失が視力低下に大きく影響することが判明した。輪部上皮の消失は本症の急性期に生

じるため, 急性期に輪部上皮の消失を回避することが, 良好な視力予後につながることを考えられた。慢性期の持続炎症を検討するために, 患者より涙液を採取し, 炎症に関わる因子として IL-8 の濃度を測定したところ, 本症では他疾患に比べて極めて高い値を示した (図45)。今後の詳細な検討が必要な分野である。

Stevens-Johnson 症候群は角膜上皮幹細胞疲弊症を示す代表的な眼疾患である。本症を角膜再生医療的アプローチで治療するとともに, 自然免疫異常の病態を明かすことができれば, 本疾患の予後を改善するのみならず, あらゆる重症 ocular surface 疾患治療のストラテジーを解き明かす鍵になると考えられる。

IV-2.2 自然免疫異常

Stevens-Johnson 症候群の ocular surface に認められる易感染性, そして結膜囊細菌の増殖が関係すると考えられる異常炎症所見は, 炎症性腸疾患と類似していると考えられる。炎症性腸疾患の病態には, 常在細菌に対する異常な炎症反応, すなわち自然免疫応答異常が関与することがわかってきている³³⁾³⁴⁾。例えば, TLRs の重要なシグナル因子である Myd88 欠損マウ

図44 眼所見 13 項目のうち該当率、重症度率の高かった項目

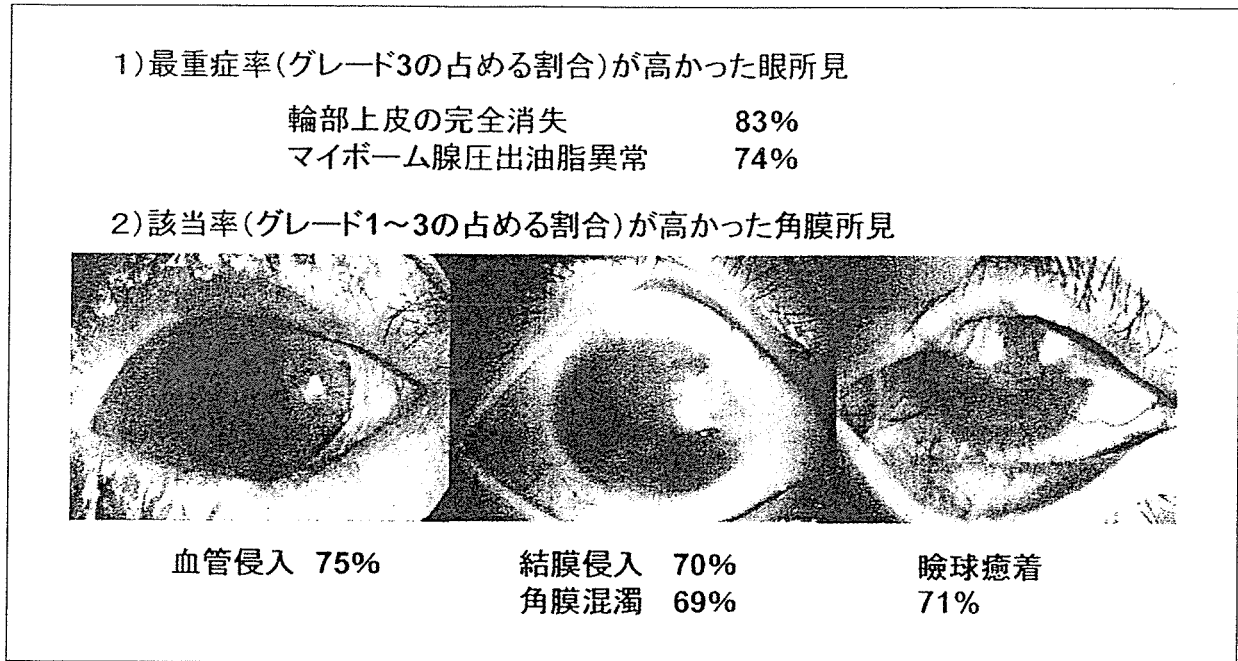


図45 種々の角膜疾患における涙液中 Interleukin-8 濃度

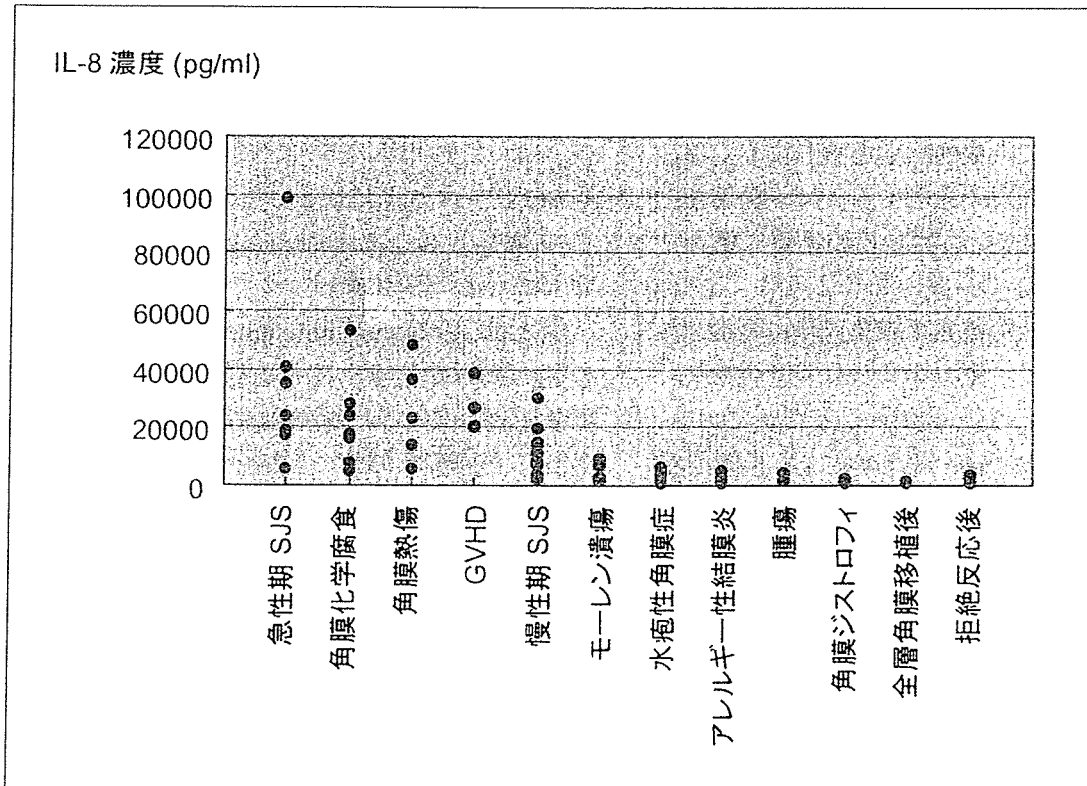
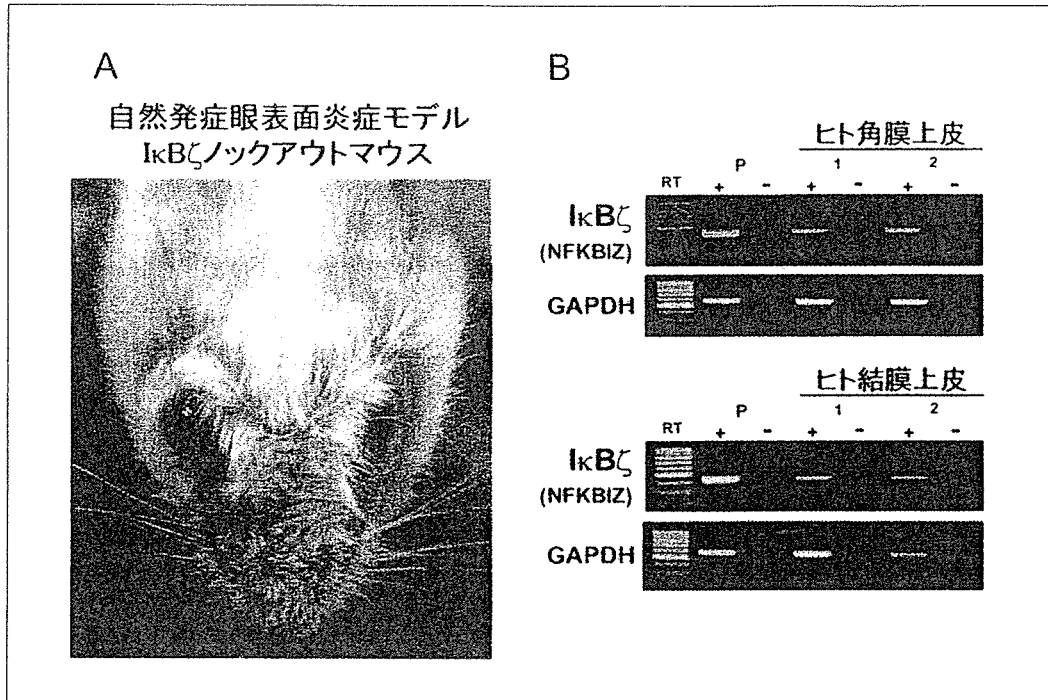


図46 眼表面と I κ B- ζ 

A : 自然発症の眼表面炎症モデル I κ B- ζ のノックアウトマウス
B : ヒトの眼表面における I κ B- ζ の発現

スでは、誘導した腸炎が悪化する³⁵⁾。Myd88が欠損すると単球などの免疫担当細胞では各種菌体成分に対して炎症性反応を生じにくくなるにもかかわらず腸炎が悪化するのは、腸管などの粘膜面では TLRs が恒常性の維持に働いていることを示唆している。このように、TLRs を代表とする自然免疫系は感染防御に重要であるばかりではなく、種々の免疫性炎症性疾患にも深く関与していることがわかってきている。我々は、ocular surface においても、自然免疫応答異常が ocular surface 炎症に関与していると考えている。TLRs のシグナル因子であり、NF- κ B の regulator の一つである I κ B- ζ のノックアウトマウスでは、杯細胞の消失を伴う ocular surface 炎症を自然発症する³²⁾ (図46 A)。このことは、ocular surface の炎症制御に I κ B- ζ が深く関わっていることを示唆するものであり、I κ B- ζ を介した自然免疫応答の異常が炎症を惹起することを示している。また、このマウスを Balb/c 背景に純系化したところ、口囲周囲の皮膚炎も明らかとなった。この

皮膚炎は、表皮にアポトーシス細胞を伴い、アレルギー炎症とは異なる様相を示しており、我々は、このマウスが、Stevens-Johnson 症候群のモデルマウスになると考えている。さらに、この I κ B- ζ は、ヒトの ocular surface でも発現している (図46 B)。

我々は、Stevens-Johnson 症候群に自然免疫応答の異常が関与する可能性について、現在、解析を進めている。患者末梢血単球をもちいた遺伝子発現解析では、自然免疫応答が誘導された状態において、I κ B- ζ の発現が患者において有意に低下しているという結果を得ており、また、候補遺伝子アプローチによる遺伝子多型解析においても、自然免疫関連遺伝子において、健常人と Stevens-Johnson 症候群の間で、有意差を認めている。このように、自然免疫に着目することにより、今まで病因・病態の不明であった本疾患の病態が解明される可能性がある。

V 結 び

難治性 ocular surface 疾患には外科的治療

は禁忌と考えられた時代があった。しかし、その多くが角膜上皮幹細胞疲弊症であることが分かり、角膜上皮幹細胞を適切に移植することができれば、臨床的には病態の寛解と視力改善を得られるようになってきた。この再生医学的な粘膜上皮幹細胞シート移植は、基礎的研究データの積み重ねから発した新しい治療概念の想起であり、新しい治療法として始動しつつある。我々の研究成果の臨床への本当の応用には、さまざまな安全性試験と客観的有用性の確認が必要であるが、一步一步着実に進んでおり、標準的な治療方法になることを期待する次第である。国際的にみても、我々の研究成果を地球規模で広く活用してもらうことにより、視力改善の希望を失った多くの患者を救うことができると考えている。一方、再生医学的な角膜再生アプローチの術後管理には、ocular surface の常在細菌叢と自然免疫に関する豊富な知識が必要とされており、我々の角膜再生医学もいよいよ第二段階に入ったと考えている。

VI 引用文献

- 1) Nishida K, Adachi W, Shimizu-Matsumoto A, Kinoshita S, Mizuno K, Matsubara K, Okubo K: A gene expression profile of human corneal epithelium and the isolation of human keratin 12 cDNA. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (9): 1800-1809, 1996.
- 2) Dota A, Nishida K, Adachi W, Nakamura T, Koizumi N, Kawamoto S, Okubo K, Kinoshita S: An expression profile of active genes in human conjunctival epithelium. *Exp Eye Res* 72 (3): 235-241, 2001.
- 3) Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, Okubo K: Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res* 20 (5): 639-673, 2001.
- 4) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S: Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108 (9): 1569-1574, 2001.
- 5) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S: Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 119 (2): 298-300, 2001.
- 6) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S: Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 88 (10): 1280-1284, 2004.
- 7) Kinoshita S, Koizumi N, Nakamura T, Yamada J, Sotozono C, Inatomi T: Concept and clinical application of cultivated epithelial transplantation. *The Ocular Surface* 2: 21-33, 2004.
- 8) Kinoshita S, Nakamura T: Development of cultivated mucosal epithelial sheet transplantation for ocular surface reconstruction. *Artif Organs* 28 (1): 22-27, 2004.
- 9) Ueno M, Matsumura M, Watanabe K, Nakamura T, Osakada F, Takahashi M, Kawasaki H, Kinoshita S, Sasai Y: Neural conversion of ES cells by an inductive activity on human amniotic membrane matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (25): 9554-9559, 2006.
- 10) Kinoshita S, Friend J, Kiorpes TC, Thoft RA: Keratin-like proteins in corneal and conjunctival epithelium are different. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 (5): 577-581, 1983.
- 11) Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA: Limbal epithelium in ocular surface wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23 (1): 73-80, 1982.
- 12) Schermer A, Galvin S, Sun T T: Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103 (1): 49-62, 1986.
- 13) Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun T T, Lavker RM: 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.
- 14) Kim JC, Tseng SC: Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14 (5): 473-484, 1995.

- 15) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M: Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349 (9057): 990-993, 1997.
- 16) Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S: Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 19 (1): 65-71, 2000.
- 17) Koizumi N, Kinoshita S: Ocular surface reconstruction, amniotic membrane, and cultivated epithelial cells from the limbus. *Br J Ophthalmol* 87 (12): 1437-1439, 2003.
- 18) Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ: Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (9): 2506-2513, 2000.
- 19) Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, Kinoshita S: An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (7): 2114-2121, 2002.
- 20) Koizumi N, Rigby H, Fullwood NJ, Kawasaki S, Tanioka H, Koizumi K, Kociok N, Jousseaume AM, 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*: 2006.
- 21) Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Koizumi N, Dota A, Mochida C, Kinoshita S: Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Exp Eye Res* 76 (6): 735-743, 2003.
- 22) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S: Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand* 82 (4): 468-471, 2004.
- 23) Maruyama K, Yamada J, Sano Y, Kinoshita S: Th2-biased immune system promotion of allogeneic corneal epithelial cell survival after orthotopic limbal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 (11): 4736-4741, 2003.
- 24) Ang L, 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*. (in press)
- 25) Cooper LJ, Fullwood NJ, Koizumi N, Nakamura T, Kinoshita S: An investigation of removed cultivated epithelial transplants in patients after allocultivated corneal epithelial transplantation. *Cornea* 23 (3): 235-242, 2004.
- 26) Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, Fullwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M, Koizumi N, Inatomi T, Sano Y, Kinoshita S: The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 (1): 106-116, 2003.
- 27) Nakamura T, Kinoshita S: Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea* 22 (7 Suppl): S75-80, 2003.
- 28) 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.
- 29) Nakamura T, Ang LP, Rigby H, Sekiyama E, Inatomi T, Sotozono C, Fullwood NJ, Kinoshita S: The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 (3): 909-916, 2006.
- 30) 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*. (in press)
- 31) Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M: Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (27): 9523-9528, 2005.

- 32) Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, De Luca M: Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 145 (4): 769–782, 1999.
- 33) Hugot J P, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard J P, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C A, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel J F, Sahbatou M, Thomas G: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411 (6837): 599–603, 2001.
- 34) Ogura Y, Bonen D K, Inohara N, Nicolae D L, Chen F F, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr R H, Achkar J P, Brant S R, Bayless T M, Kirschner B S, Hanauer S B, Nunez G, Cho J H: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411 (6837): 603–606, 2001.
- 35) Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R: Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118 (2): 229–241, 2004.
- 36) Sotozono C, Inagaki K, Fujita A, Koizumi N, Sano Y, Inatomi T, Kinoshita S: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infections in the cornea. *Cornea* 21 (7 Suppl): S94–101, 2002.
- 37) King-Smith P E, Fink B A, Fogt N, Nichols K K, Hill R M, Wilson G S: The thickness of the human precorneal tear film: evidence from reflection spectra. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (11): 3348–3359, 2000.
- 38) Gipson I K: Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res* 78 (3): 379–388, 2004.
- 39) Nishida K, Yamanishi K, Yamada K, Dota A, Kawasaki S, Quantock A J, Kinoshita S: Epithelial hyperproliferation and transglutaminase 1 gene expression in Stevens-Johnson syndrome conjunctiva. *Am J Pathol* 154 (2): 331–336, 1999.
- 40) Yokoi N, Bron A, Tiffany J, Brown N, Hsuan J, Fowler C: Reflective meniscometry: a non-invasive method to measure tear meniscus curvature. *Br J Ophthalmol* 83 (1): 92–97, 1999.
- 41) Yokoi N, Bron A J, Tiffany J M, Kinoshita S: Reflective meniscometry: a new field of dry eye assessment. *Cornea* 19 (3 Suppl): S37–43, 2000.
- 42) Yokoi N, Bron A J, Tiffany J M, Maruyama K, Komuro A, Kinoshita S: Relationship between tear volume and tear meniscus curvature. *Arch Ophthalmol* 122 (9): 1265–1269, 2004.
- 43) Yokoi N, Komuro A: Non-invasive methods of assessing the tear film. *Exp Eye Res* 78 (3): 399–407, 2004.
- 44) Maruyama K, Yokoi N, Takamata A, Kinoshita S: Effect of environmental conditions on tear dynamics in soft contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (8): 2563–2568, 2004.
- 45) Yokoi N, Maruyama K, Kinoshita S, Bron A J, Tiffany J M: Dynamic changes in tear meniscus curvature at the rigid contact lens edge. *Cornea* 22 (3): 226–229, 2003.
- 46) Oguz H, Yokoi N, Kinoshita S: The height and radius of the tear meniscus and methods for examining these parameters. *Cornea* 19 (4): 497–500, 2000.
- 47) Yokoi N, Kinoshita S, Bron A J, Tiffany J M, Sugita J, Inatomi T: Tear meniscus changes during cotton thread and Schirmer testing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (12): 3748–3753, 2000.
- 48) Ishibashi T, Yokoi N, Bron A J, Tiffany J M, Komuro A, Kinoshita S: Retention of reversibly thermo-gelling timolol on the human ocular surface studied by video meniscometry. *Curr Eye Res* 27 (2): 117–122, 2003.
- 49) Ishibashi T, Yokoi N, Kinoshita S: Comparison of the effects of topical levobunolol and timolol solution on the human ocular surface. *Cornea* 22 (8): 709–715, 2003.
- 50) Yokoi N, Takehisa Y, Kinoshita S: Correlation of tear lipid layer interference patterns with the diagnosis and severity of dry eye. *Am J Ophthalmol* 122 (6): 818–824, 1996.
- 51) Ishibashi T, Yokoi N, Kinoshita S: Comparison of the short-term effects on the human corneal surface of topical timolol maleate with and

- without benzalkonium chloride. *J Glaucoma* 12 (6): 486-490, 2003.
- 52) Ichijima H, Yokoi N, Nishizawa A, Kinoshita S: Fluorophotometric assessment of rabbit corneal epithelial barrier function after rigid contact lens wear. *Cornea* 18 (1): 87-91, 1999.
- 53) Niiya A, Yokoi N, Matsumoto Y, Komuro A, Ishibashi T, Tomii S, He J, Kinoshita S: Effect of beta-blocker eyedrops on corneal epithelial barrier function. *Ophthalmologica* 214 (5): 332-336, 2000.
- 54) Taniguchi T, Yamamoto T, Mochizuki K, Haque MS, Kitazawa Y, Yokoi N, Komuro A, Kinoshita S: Epithelial barrier function of the filtering bleb conjunctiva and the cornea after trabeculectomy with mitomycin C. *J Glaucoma* 5 (4): 233-236, 1996.
- 55) Tanihara H, Yokoi N, Komuro A, Honda Y, Kinoshita S: Prolonged impairment of peripheral corneal epithelium barrier function after successful trabeculectomy. *Am J Ophthalmol* 123 (4): 487-493, 1997.
- 56) Yokoi K, Yokoi N, Kinoshita S: Impairment of ocular surface epithelium barrier function in patients with atopic dermatitis. *Br J Ophthalmol* 82 (7): 797-800, 1998.
- 57) Yokoi N, Kinoshita S: Clinical evaluation of corneal epithelial barrier function with the slit-lamp fluorophotometer. *Cornea* 14 (5): 485-489, 1995.
- 58) Yokoi N, Komuro A, Nishida K, Kinoshita S: Effectiveness of hyaluronan on corneal epithelial barrier function in dry eye. *Br J Ophthalmol* 81 (7): 533-536, 1997.
- 59) Yokoi N, Niiya A, Komuro A, Yokogaki S, Naka H, Awata T, Honma Y, Yamada J, Tei M, Kinoshita S: Effects of aldose reductase inhibitor CT-112 on the corneal epithelial barrier of galactose-fed rats. *Curr Eye Res* 16 (6): 595-599, 1997.
- 60) Yokoi N, Mossa F, Tiffany JM, Bron AJ: Assessment of meibomian gland function in dry eye using meibometry. *Arch Ophthalmol* 117 (6): 723-729, 1999.
- 61) Yokoi N, Komuro A, Maruyama K, Kinoshita S: New instruments for dry eye diagnosis. *Semin Ophthalmol* 20 (2): 63-70, 2005.
- 62) Mathers WD, Daley T, Verdick R: Video imaging of the meibomian gland. *Arch Ophthalmol* 112 (4): 448-449, 1994.
- 63) Ang LP, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S: Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplants for severe ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 124: 1543-1551, 2006.
- 64) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LP, 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: 1765-1772, 2006.
- 65) Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono C, Nakamura T, Shimizu Y, Kinoshita S: Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (1): 93-99, 2004.
- 66) Nakamura T, Inatomi T, Sekiyama E, Ang LP, Yokoi N, Kinoshita S: Novel clinical application of sterilized, freeze-dried amniotic membrane to treat patients with pterygium. *Acta Ophthalmol Scand* 84 (3): 401-405, 2006.
- 67) Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, Kinoshita S: Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (3): 800-806, 2004.
- 68) Suemori H, Yasuchika K, Hasegawa K, Fujioka T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N: Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem Biophys Res Commun* 345 (3): 926-932, 2006.
- 69) Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28 (1): 31-40, 2000.
- 70) Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi