

# 網膜光凝固後の創傷修復過程における塩基性線維芽細胞 増殖因子とその受容体の発現

—In situ hybridization 法による検討—

山本千加子, 緒方奈保子, 松島 正史, 高橋 寛二  
宮代 美樹, 山田 晴彦, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

## 要 約

有色ラットの眼底後極部にクリプトンレーザーによる弱度の光凝固を行い、網膜の創傷修復過程における塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)と FGF receptor 1 の messenger RNA (mRNA) の発現を、DIG ラベルプローブによる in situ hybridization 法によって検討した。正常網脈絡膜では神経節細胞層、内顆粒層にのみ bFGF と FGF receptor 1 の mRNA の発現をみた。光凝固後 3 日には凝固部の網膜下の増殖した細胞

や脈絡膜血管内皮細胞に bFGF と FGF receptor 1 の mRNA の発現をみた。この発現は 3 日以後は少しずつ減弱し、創傷修復がほぼ完成した 14 日には消失した。この結果から、bFGF がレーザー光凝固後の創傷の修復に関連していることが示された。(日眼会誌 100:270-278, 1996)

キーワード：塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF), FGF receptor 1, 創傷修復, 網膜, 網膜色素上皮

## Expression of Basic Fibroblast Growth Factor and its Receptor in the Process of Wound Healing of Rat Retina after Laser Photocoagulation

Chikako Yamamoto, Nahoko Ogata, Masashi Matsushima,  
Kanji Takahashi, Miki Miyashiro, Haruhiko Yamada  
and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

## Abstract

We investigated the expression of mRNA of basic fibroblast growth factor (bFGF) and FGF receptor 1 in rat retina after laser photocoagulation using in situ hybridization method. Pigmented rats (Brown Norway strain) received weak photocoagulation by krypton laser (500  $\mu$ m, 0.05 sec, 60 mW) in the posterior retina. On 1, 3, 5, 7, 14 days after laser photocoagulation, the rats were fixed by perfusion with phosphate-buffered 4% paraformaldehyde and the eyes were enucleated. The eyes were further fixed by immersion in the same fixative, then quickly frozen in liquid nitrogen and finally sectioned with a cryostat. In situ hybridization was performed on frozen sections with digoxigenin (DIG) labeled riboprobes synthesized from rat bFGF cDNA and FGF receptor 1 cDNA. In normal chorioretinal tissue, the signals of bFGF and FGF receptor 1 mRNA

were seen in the ganglion cell layer and inner nuclear layer. On day 3 after photocoagulation, we observed expression of bFGF and FGF receptor 1 mRNA in the proliferating retinal pigment epithelial (RPE) cells and endothelial cells of choriocapillaris at the photocoagulated lesion. We also observed expression of bFGF mRNA in some macrophage-like cells. On day 14 after photocoagulation, these expressions had disappeared. Our results suggest that bFGF may be involved in the process of retinal wound healing after laser photocoagulation. (J Jpn Ophthalmol Soc 100:270-278, 1996)

Key words: Basic fibroblast growth factor (bFGF), FGF receptor 1, Wound healing, Retina, Retinal pigment epithelium

別刷請求先：570 大阪府守口市文園町 10-15 関西医科大学眼科学教室 山本千加子  
(平成 7 年 8 月 15 日受付, 平成 7 年 12 月 14 日改訂受理)

Reprint requests: Chikako Yamamoto, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi-shi, Osaka-fu 570, Japan

(Received August 15, 1995 and accepted in revised form December 14, 1995)

## I 緒 言

網膜光凝固療法は、糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、未熟児網膜症、加齢性円板状黄斑変性症など種々の疾患の治療として臨床的に広く用いられている。弱度レーザー光凝固を行うと網膜色素上皮細胞を中心に網膜深層が凝固されて損傷されるが、その後、創傷修復が進行し、約4週後にはほぼ創傷修復が完了することが知られている<sup>1)</sup>。塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)は、網膜の多くの細胞に存在していることが確認されており<sup>2)~7)</sup>、中胚葉誘導と分化、神経栄養因子としての生物活性を示す細胞増殖因子であり、血管新生、創傷治癒の過程においても大きな役割を果たすと考えられている<sup>8)~12)</sup>。我々はレーザー光凝固後の創傷修復過程におけるbFGFの関与を調べる目的で、ラットに弱度レーザー光凝固を行い、創傷修復過程におけるbFGFとFGF receptor 1の発現をin situ hybridization法を用いて検討し、その発現を光凝固後3日~1週間の比較的早期に認めたので報告する。

## II 実験方法

### 1. 光凝固

実験動物として、体重200~300gの雄の成熟有色ラット(Brown Norway系)18匹36眼を使用した。ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)の腹腔内注射による全身麻酔下に、眼底後極部にクリプトンレーザーによる弱度の光凝固を行った。凝固条件は照射野500 $\mu$ m、照射時間0.05秒、出力60mWとし、組織観察用カバーガラスをコンタクトレンズとして用いて細隙灯顕微鏡で眼底を観察し、眼底後極部へ散在性に光凝固を行った。光凝固後、小さい白色の凝固斑を生じたが、網膜出血はみなかった。

### 2. 蛍光眼底造影

眼球摘出の前日に眼底検査、および10%フルオレセインナトリウム(フルオレサイト®)0.1mlを尾静脈から注入し、蛍光眼底造影を行った。

### 3. 組織標本の作成

In situ hybridization用の組織標本としては、光凝固後1日、3日、5日、1週、2週に、4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定を行ったのち眼球摘出し、4%パラフォルムアルデヒドで2時間、30%サッカロースで2時間浸漬固定したのち眼球を凍結し、クリオスタットで10 $\mu$ mの凍結薄切切片を作成した。

光学顕微鏡的に組織を詳細に調べる目的には、眼球摘出後2%グルタルアルデヒドで固定し、0.1Mリン酸緩衝液で24時間洗浄、前眼部を除去し網膜を細切した。この切片を1%四酸化オスミウムで後固定を1時間行い、型のごとくエタノール系列で脱水した後、エポン812に包埋した。試料はLKB ultramicrotome Vで2 $\mu$ mの

切片を作成し、トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡下で観察した。

### 4. RNAプローブの作成

ラットbFGFについては、翻訳領域のすべてを含む塩基配列1~820番目までの820塩基対のラットbFGF complementary DNA(cDNA) EcoR I fragment<sup>13)</sup>をBluescript II SK+に組み込み、サブクローニングした。サブクローニングしたcDNAの挿入方向の確認を行い、制限酵素(Xba I)を用いて直線化・linearizeした。T3 RNAポリメラーゼによるRNA転写を行うと同時にdigoxigenin(DIG)-UTPを取り込ませ、digoxigeninによる標識プローブとした。T3 promoter側にcDNAの3'端が挿入されたplasmidからantisenseプローブ、T3 promoter側にcDNAの5'端が挿入されたplasmidからsenseプローブを作成した。

ラットFGF receptor 1については、塩基配列957~1257番目までの300塩基対のラットFGF receptor 1 cDNA fragment<sup>14)</sup>を用いて、同様の過程でDIG標識非放射性RNAプローブを作成した。このfragmentは、主に細胞外領域と膜貫通領域から成り、チロシキナーゼ領域を含んでいないため、他のFGF receptorとの相同性が少なく、FGF receptor 1の特異性が高い領域である。Antisenseプローブは、cDNAを制限酵素EcoR Iで直線化・linearizeした後にT3 RNAポリメラーゼによりRNA転写を行って作成した。Senseプローブは、制限酵素Asp 718で直線化・linearizeした後にT7 RNAポリメラーゼによりRNA転写を行って作成した。

### 5. In situ hybridization法

前処置として凍結薄切切片を乾燥し、4%パラフォルムアルデヒドで再固定、洗浄、proteinase K処理を行い、内因性アルカリフォスファターゼの不活化を行った後、アルコール脱水した。組織切片上で、作成したDIG標識RNAプローブと約16時間のhybridizationを行った後、余分なプローブを洗浄し、RNase処理した。ブロッッキング処理をし、アルカリフォスファターゼ標識-抗DIG抗体で抗体反応を行った後、5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate(BCIP)とnitroblue tetrazolium salt(NBT)による発色反応でプローブの結合部位を紫色に発色させた。メチルグリーンで対比染色を行い、bFGF、FGF receptor 1それぞれのmRNAの組織での発現を光学顕微鏡下に観察した。

## III 結 果

### 1. 臨床経過

光凝固直後の白色の凝固斑は3日頃から次第に褪色し、2週後には軽い色素沈着を残して瘢痕化した。全経過を通して明らかな漿液性網膜剥離や網膜出血をみなかった。

蛍光眼底造影では、凝固部は光凝固後1日には強い過

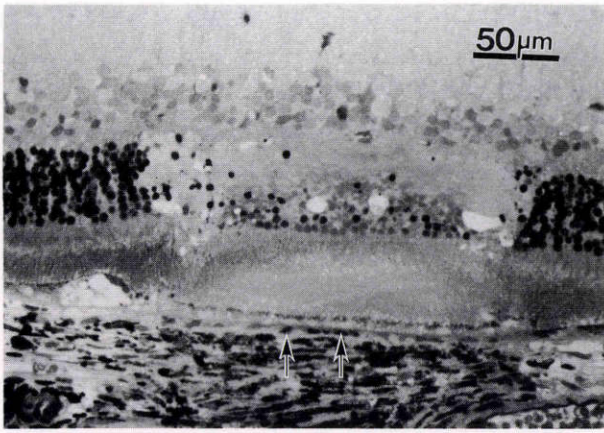


図1 光凝固後1日の光学顕微鏡所見(トルイジンブルー染色).  
凝固部の網膜には外顆粒層, 錐体杆体層, 網膜色素上皮層の細胞に凝固壊死をみた. 脈絡膜には脈絡膜毛細血管板(矢印)と, さらに深層の脈絡膜血管の閉塞がみられた. Bruch 膜の明らかな断裂はみなかった.

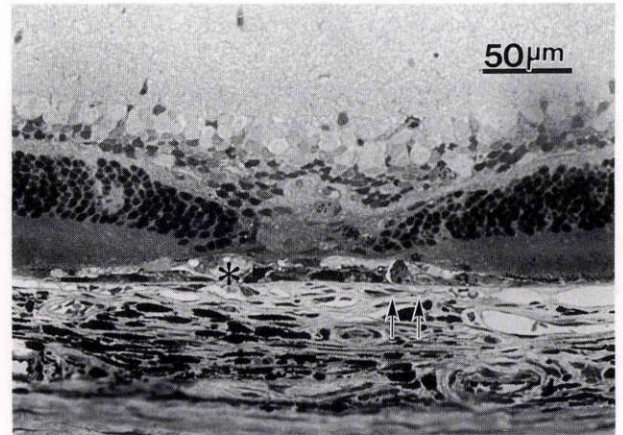


図3 光凝固後7日の光学顕微鏡所見(トルイジンブルー染色).  
網膜色素上皮細胞が Bruch 膜上を不規則に覆い(\*印), macrophage の数は減少していた. 脈絡膜毛細血管板には, 狭い管腔が形成されていた(矢印).

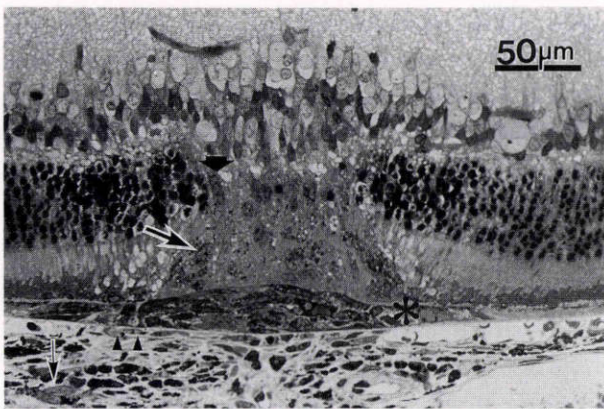


図2 光凝固後3日の光学顕微鏡所見(トルイジンブルー染色).  
凝固部の網膜の Bruch 膜上には網膜色素上皮細胞(\*印)が増殖して数層に重層し, 内顆粒層の Müller 細胞(◆印)が細胞突起を外顆粒層の視細胞消失部に伸展させて組織を充填しはじめていた. 網膜下に macrophage(大矢印)が多数出現していた. 脈絡膜には線維芽細胞(小矢印), 血管内皮細胞(▲)の増加を認めた.

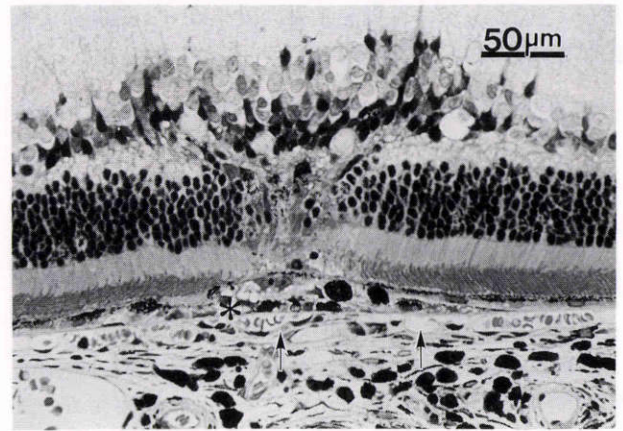


図4 光凝固後14日の光学顕微鏡所見(トルイジンブルー染色).  
網膜色素上皮細胞が Bruch 膜上を規則的に覆い(\*印), Müller 細胞が網膜色素上皮細胞と接する所まで細胞突起を伸ばして外顆粒層の視細胞消失部を充填していた. Bruch 膜の下には, 広い管腔をもつ脈絡膜毛細血管板がみられた(矢印).

図5 正常網膜(メチルグリーン染色).

a: basic fibroblast growth factor (bFGF) sense プロープで hybridization した組織の光学顕微鏡所見. 網膜, 網膜色素上皮, 脈絡膜に全く発現をみなかった. GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. b: bFGF antisense プロープで hybridization した組織の光学顕微鏡所見. 網膜神経節細胞層に強く(▲), 内顆粒層に弱い発現をみた(矢印). c: fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 sense プロープで hybridization した組織の光学顕微鏡所見. 網膜, 網膜色素上皮, 脈絡膜に全く発現をみなかった. d: FGF receptor 1 antisense プロープで hybridization した組織の光学顕微鏡所見. 網膜神経節細胞層に強く(▲), 内顆粒層に弱い発現をみた(矢印).

図6 光凝固後1日(メチルグリーン染色).

a: bFGF antisense プロープで hybridization した組織の光学顕微鏡所見. 凝固部の壊死に陥った網膜外顆粒層, 錐体杆体層, 網膜色素上皮層に特別の発現はみられなかった. b: FGF receptor 1 antisense プロープで hybridization した組織の光学顕微鏡所見. 凝固部の壊死に陥った網膜外顆粒層, 錐体杆体層, 網膜色素上皮層に特別の発現はみられなかった.

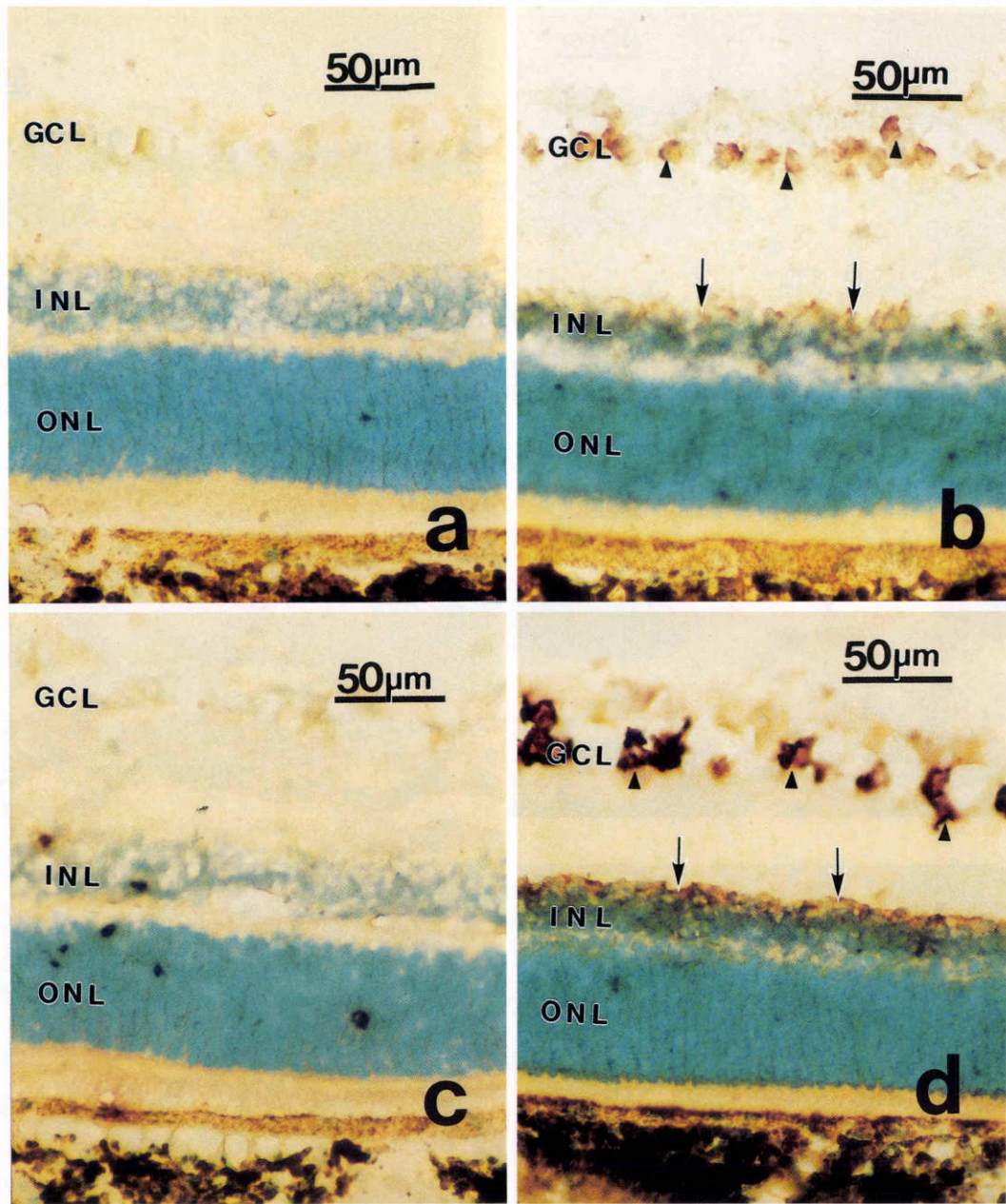


図 5

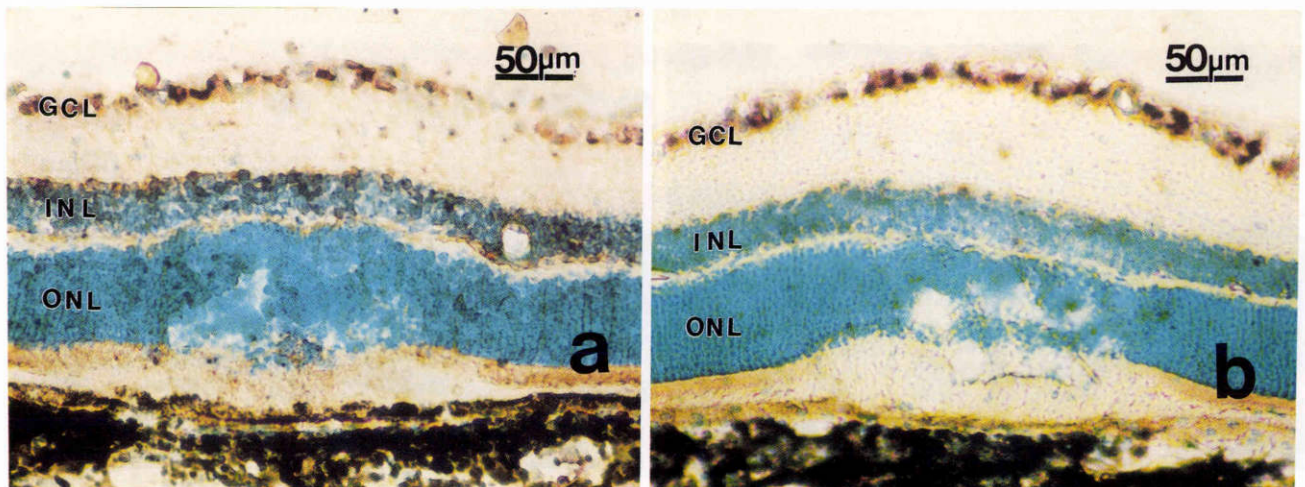


図 6

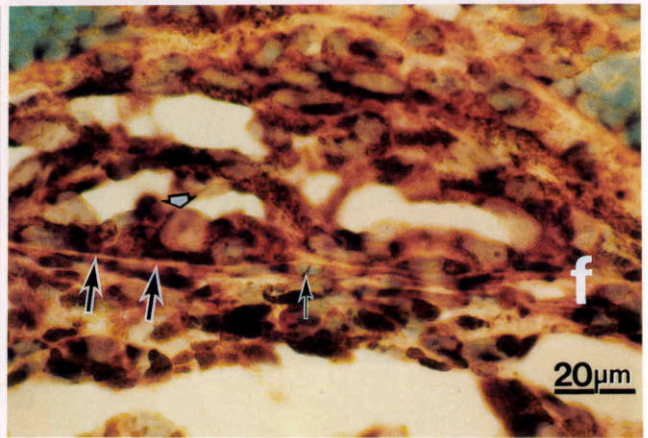
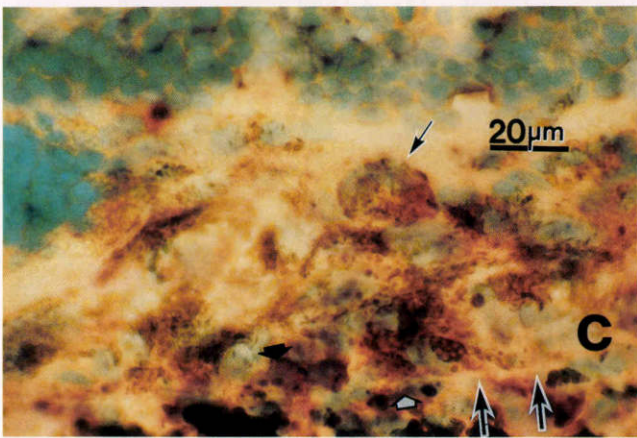
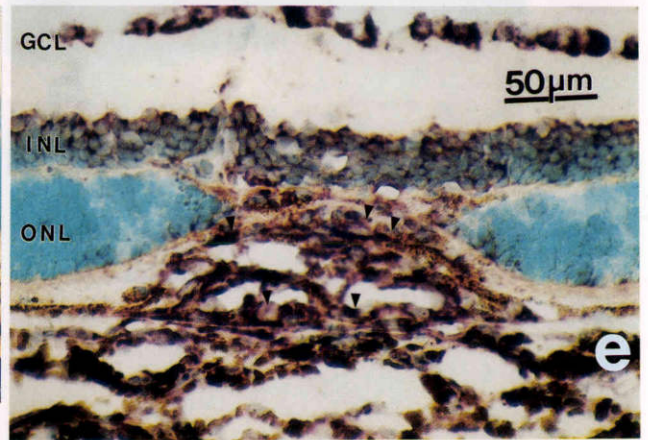
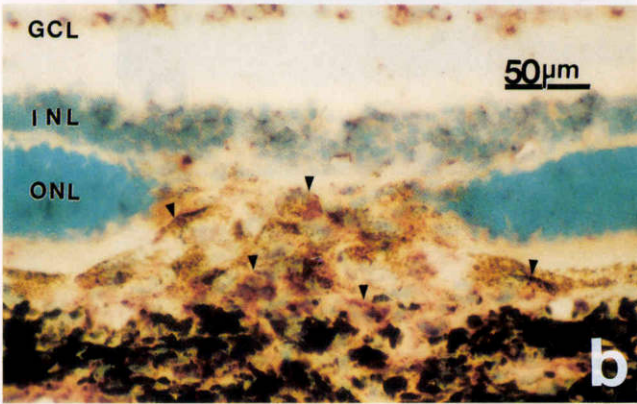
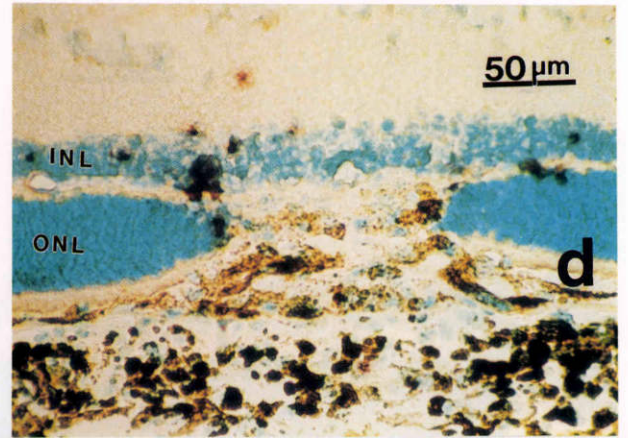
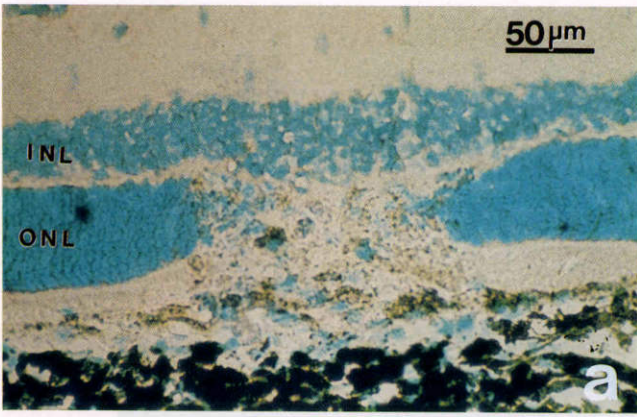


図 7

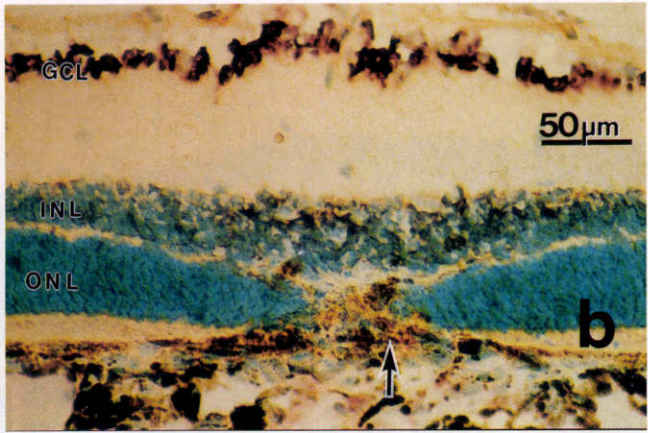
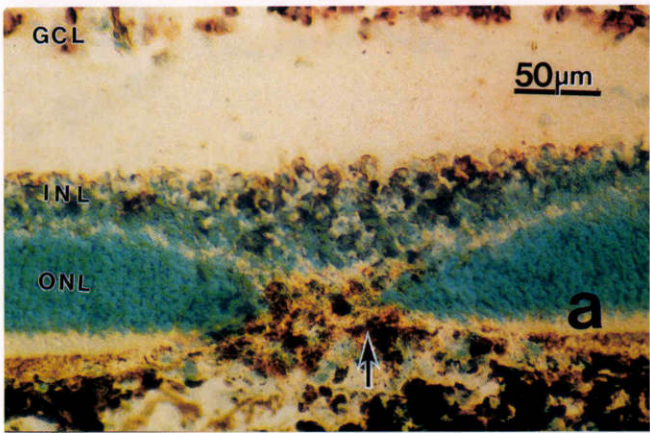


図 8

蛍光をみたが、光凝固後 3 日には弱くなり、その後は凝固部周囲に淡い過蛍光をみるのみであった。全経過を通して、新生血管の発生を疑わせる網目状の過蛍光はみなかった。

## 2. 光学顕微鏡所見

光凝固後 1 日、凝固部の網膜は外顆粒層、錐体杆体層、網膜色素上皮層の細胞に凝固壊死を生じ、凝固部の脈絡膜には脈絡膜毛細血管板と、さらに深層の脈絡膜血管の閉塞がみられた。Bruch 膜の明らかな断裂をみなかった(図 1)。

光凝固後 3 日、凝固部の網膜の Bruch 膜上には網膜色素上皮細胞が増殖して数層に重層し、内顆粒層の Müller 細胞は細胞突起を外顆粒層の視細胞の消失した部位に伸展させて組織を修復しはじめていた。網膜下には、色素を含んだ大型の macrophage が多数出現していた。脈絡膜には線維芽細胞、血管内皮細胞の増加を認めた(図 2)。

光凝固後 7 日、増殖した網膜色素上皮細胞が Bruch 膜上を不規則に覆い、網膜下の macrophage の数は減少していた。網膜外顆粒層の視細胞が消失した部位を Müller 細胞が突起を伸ばして充填していた。凝固部の脈絡膜毛細血管板には狭い管腔が形成されていた(図 3)。

光凝固後 14 日、網膜色素上皮細胞が Bruch 膜上を規則的に覆い、Müller 細胞が網膜色素上皮細胞と接する所まで突起を伸ばして視細胞の消失した部位を修復していた。脈絡膜毛細血管板は太い管腔が形成され、血流が再開していた(図 4)。

## 3. In situ hybridization 所見

正常網脈絡膜で bFGF および FGF receptor 1 の antisense RNA プローブを用いて in situ hybridization を行うと、両者ともその発現を示す紫色の発色は、網膜神経節細胞層に強く、内顆粒層に弱くみられた。それ以外の網膜の各層、網膜色素上皮層、脈絡膜には発色をみなかった(図 5 b, d)。同じく正常網脈絡膜で bFGF および FGF receptor 1 の sense RNA プローブを用いて対照として in situ hybridization すると、両者とも網膜、網膜色素上皮、脈絡膜に全く発現をみなかった(図 5 a, c)。

光凝固後 1 日、それぞれの antisense プローブで hy-

bridization した組織では、正常網脈絡膜と同様に神経節細胞層に bFGF および FGF receptor 1 の mRNA の発現がみられたが、光凝固部の壊死に陥った網膜外顆粒層、錐体杆体層、網膜色素上皮層には特別な発現をみなかった(図 6 a, b)。

光凝固後 3 日、それぞれの antisense プローブで hybridization した組織では、神経節細胞層の bFGF および FGF receptor 1 の mRNA の発現は非凝固部と変化なく、凝固部の網膜下の増殖した細胞に強い発現をみた(図 7 b, e)。これらの細胞は同時期のエボン包埋における組織所見と照らし合わせると、主に網膜色素上皮細胞と推察された。bFGF 陽性細胞の一部は macrophage とみられる細胞もあった(図 7 c)。Bruch 膜下の活性化した脈絡膜血管内皮細胞にも bFGF および FGF receptor 1 の発現を認めた(図 7 c, f)。それぞれの sense プローブで hybridization した組織では、凝固部に発現をみなかった(図 7 a, d)。

光凝固後 5 日、凝固部の網膜下に増殖した細胞や脈絡膜血管内皮細胞に bFGF および FGF receptor 1 の mRNA の発現をみた。しかしその程度は、3 日と比較するとやや弱かった。

光凝固後 7 日、それぞれの antisense プローブで hybridization した組織では、神経節細胞層の bFGF および FGF receptor 1 の mRNA の発現は非凝固部と変化なく、網膜下の細胞にはごく弱い発現をみるのみであった(図 8 a, b)。

光凝固後 14 日、それぞれの antisense プローブで hybridization した組織では、神経節細胞層の bFGF および FGF receptor 1 の mRNA の発現は非凝固部と変化なく、網膜下の細胞には全く発現をみなかった。

## IV 考 按

線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーは 1970 年代から種々の細胞から分離され、その生物学的機能が研究されてきた。すなわち、種々の細胞の分化や増殖を制御することがわかっている<sup>8)9)</sup>。FGF ファミリーに属する増殖因子の一つである塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)は、

図 7 光凝固後 3 日(メチルグリーン染色)。

a: bFGF sense プローブで hybridization した組織の光学顕微鏡所見。凝固部を含む網脈絡膜に発現はみなかった。b: bFGF antisense プローブで hybridization した組織の光学顕微鏡所見。凝固部の網膜下の増殖した細胞(▼)に bFGF mRNA の発現をみた。c: 図 b の拡大。Bruch 膜(大矢印)下の脈絡膜血管内皮細胞(◇印)や Bruch 膜上の網膜色素上皮細胞と思われる細胞(●印)に bFGF mRNA の発現をみた。また、macrophage 様の細胞(小矢印)にも bFGF mRNA の発現をみた。d: FGF receptor 1 sense プローブで hybridization した組織の光学顕微鏡所見。凝固部を含む網脈絡膜に発現はみなかった。e: FGF receptor 1 antisense プローブで hybridization した組織の光学顕微鏡所見。凝固部の網膜下に増殖した細胞(▼)に FGF receptor 1 mRNA の発現をみた。f: 図 e の拡大。Bruch 膜(大矢印)下の脈絡膜血管内皮細胞(小矢印)や Bruch 膜上の網膜色素上皮細胞(◇印)と思われる細胞に FGF receptor 1 mRNA の発現をみた。

図 8 光凝固後 7 日(メチルグリーン染色)。

a: bFGF antisense プローブで hybridization した組織の光学顕微鏡所見。凝固部の網膜下の細胞(矢印)に bFGF mRNA の発現をごく弱く認めた。b: FGF receptor 1 antisense プローブで hybridization した組織の光学顕微鏡所見。凝固部の網膜下の細胞(矢印)に FGF receptor 1 mRNA の発現をごく弱く認めた。

創傷修復過程においても重要な役割を果たすと考えられており<sup>8)</sup>、皮膚創傷部<sup>15)</sup>や脳創傷部<sup>16)</sup>においてその存在が報告され、またbFGFの投与によって創傷修復が促進されること<sup>17)</sup>やbFGFの中和抗体によって創傷修復が遅延することが報告<sup>18)</sup>されている。網膜においても、bFGFの投与によってレーザー光凝固後の創傷修復が促進されたとの報告<sup>19)</sup>がある。

本研究では、我々はレーザー光凝固後の網膜にみられる網膜色素上皮細胞を主とした創傷修復過程にbFGFがどのように関与するのかを調べるため、Bruch膜を破壊せず脈絡膜新生血管を発生させない比較的弱い凝固を行って、光凝固後の網膜におけるbFGFの発現を調べた。その結果、組織学的には、光凝固後1日、凝固部の網膜は外顆粒層、錐体杆体層、網膜色素上皮層に凝固壊死を生じ、光凝固後3日、凝固部の網膜のBruch膜上には網膜色素上皮細胞が増殖して数層に重層し、色素を含んだ大型のmacrophageが多数出現していた。内顆粒層のMüller細胞は細胞突起を外顆粒層の視細胞の消失した部位に伸展させて組織を修復しはじめていた。光凝固後7日には、ほぼ2層の網膜色素上皮細胞がBruch膜上を不規則に覆った。光凝固後14日には、Müller細胞が網膜色素上皮細胞と接する所まで突起を伸ばして、外顆粒層の視細胞の消失した部を充填しており、視細胞消失部は7日よりさらに縮小していた。単層の網膜色素上皮細胞がBruch膜上を規則的に覆っていた。

In situ hybridization法によってbFGF、FGF receptor 1のmRNAの発現をみると、光凝固後1日には凝固部の網膜下にbFGF、FGF receptor 1のmRNAの発現はなく、光凝固後3日には、凝固部の網膜下に増殖した細胞や活性化した脈絡膜血管内皮細胞にbFGF、FGF receptor 1のmRNAの発現をみた。その後5、7日を観察するとこの発現は網膜下の細胞の増殖が減少するに従って弱くなり、光凝固後14日でみられなくなった。この陽性細胞は同時期のエポソ包埋における組織所見と照らし合わせると、主に網膜色素上皮細胞と推察された。また、bFGF陽性細胞の一部はmacrophageと思われるものもあった。しかしながら、それぞれの細胞の正確な同定については、免疫電子顕微鏡法による蛋白レベルでの観察が必要であり、今後の課題と思われた。

培養網膜色素上皮細胞においてbFGFのmRNAの発現がみられると同時にFGF receptorの発現がみられることが報告<sup>20)</sup>され、bFGFの網膜色素上皮細胞におけるオートクリン作用が推察されている。また、培養血管内皮細胞においても、bFGFの産生、receptorの発現が報告<sup>21)~23)</sup>され、血管内皮細胞におけるbFGFのオートクリン作用が示唆されている。

炎症や腫瘍細胞の増殖過程<sup>24)</sup>、創傷修復<sup>16)25)</sup>など、あるいは*in vitro*<sup>26)27)</sup>の種々の条件下で活性化されたmacrophageからbFGFが合成されることが報告<sup>28)</sup>されてい

る。また、創傷部の細胞でのFGF receptor 1の発現も報告<sup>16)</sup>されている。我々の実験においても、網膜色素上皮細胞や脈絡膜血管内皮細胞と思われる細胞にbFGFとFGF receptor 1の発現を認め、macrophage様の細胞にbFGFの発現を認めたが、このことからレーザー光凝固後の網膜組織の創傷修復において、これらの細胞がbFGFを合成し、それがオートクリン、パラクリン的に作用して、網膜色素上皮細胞や脈絡膜血管内皮細胞を増殖させていることが推察された。

共同研究者の緒方<sup>29)30)</sup>、松島ら<sup>31)</sup>は、ラットの実験的脈絡膜新生血管モデルにおいて、有色ラット網膜に強い光凝固を行い、光凝固後3~14日の時期に増殖した脈絡膜血管内皮細胞と網膜色素上皮細胞にbFGFおよびFGF receptor 1のmRNAの発現を認め、bFGFはオートクリン、あるいはパラクリンの作用機序で血管新生や細胞増殖の生物活性を表していることを示した。緒方、松島らの実験は、網膜に強凝固を行いBruch膜を強く損傷し、脈絡膜新生血管を発生させたものである。我々の今回の実験は、弱い凝固なのでBruch膜の損傷が軽く新生血管の発生をみなかったが、弱度光凝固による網膜の創傷修復過程においても凝固部にbFGFの発現をみた。このことから、血管新生はbFGFの存在のみによって制御されるのではないことが示唆された。

最近、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)とbFGFは相乗的に培養ウシ毛細血管内皮細胞の増殖を促進することが報告<sup>32)</sup>されており、血管新生においてはこの2つの因子の関与が注目されている。また、transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )とbFGFは培養ウシ網膜毛細血管内皮細胞の増殖に対して相反する作用を持つとの報告<sup>33)</sup>もあり、種々の細胞増殖因子の作用は、他の細胞増殖因子の存在やその濃度に影響されることが種々の*in vitro*の研究から明らかになっている。我々の網膜色素上皮を主とした網膜外層の創傷修復過程の研究においても、他の増殖因子について今後検討してゆく予定である。

我々の実験の結果から、弱度網膜光凝固後に創傷部の網膜下に増殖した細胞や脈絡膜血管内皮細胞にbFGFとFGF receptor 1のmRNAが発現していることが示され、bFGFがレーザー光凝固後の創傷修復に関連していることが示された。

稿を終るにあたり、bFGF cDNAを分与していただいた武田薬品の五十嵐貢一氏と、FGF receptor 1 cDNAを分与していただいた大阪大学医学部第二解剖学教室の和中明生氏に深謝いたします。

本論文の要旨は、第99回日本眼科学会(1995年、名古屋)で、山本が口演した。

なお、本研究には文部省科学研究費補助金・一般研究B(宇山)および奨励研究A(緒方)、厚生省特定疾患「網膜脈絡膜萎縮症」調査研究班、日本私学振興財団学術研究振興資金の援助

を受けた。記して謝意を表します。

#### 文 献

- 1) 加藤直子, 大熊 紘, 板垣 隆, 山岸和矢, 宇山昌延: アルゴンレーザーとクリプトンレーザーの網膜脈絡膜への凝固効果の検討-1. 光凝固後早期の光学顕微鏡所見. 日眼会誌 89: 1294-1300, 1985.
- 2) Noji S, Matsuo T, Koyama E, Yamaai T, Nohno T, Matsuo N, et al: Expression pattern of acidic and basic fibroblast growth factor genes in adult rat eyes. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 343-349, 1990.
- 3) Hageman GS, Kirchoff-Rempe MA, Lewis GP, Fisher SK, Anderson DH: Sequestration of basic fibroblast growth factor in the primate retinal interphotoreceptor matrix. *Proc Natl Acad Sci* 88: 6706-6710, 1991.
- 4) Gao H, Hollyfield JG: Basic fibroblast growth factor (bFGF) immunolocalization in the rodent outer retina demonstrated with an anti-rodent bFGF antibody. *Brain Res* 585: 355-360, 1992.
- 5) Hanneken A, Baird A: Immunolocalization of basic fibroblast growth factor: Dependent on antibody type and tissue fixation. *Exp Eye Res* 54: 1011-1014, 1992.
- 6) Morimoto A, Matsuda S, Uryu K, Fujita H, Okumura N, Sakanaka M: Light and electron-microscopic localization of basic fibroblast growth factor in adult rat retina. *Okajimas Folia Anat* 70: 7-12, 1993.
- 7) Ishigooka H, Kitaoka T, Boutilier SB, Bost LM, Aotaki-Keen AE, Tablin F, et al: Developmental expression of bFGF in the bovine retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2813-2823, 1993.
- 8) Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L: Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell Differ* 19: 1-17, 1986.
- 9) Burgess WH, Maciag T: The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 58: 575-606, 1989.
- 10) Morrison RS, Sharma A, Vellis J, Bradshaw RA: Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc Natl Acad Sci* 83: 7537-7541, 1986.
- 11) Park CM, Hollenberg MJ: Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. *Dev Biol* 134: 201-205, 1989.
- 12) Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM: Photoreceptor degeneration inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347: 83-86, 1990.
- 13) Kurokawa T, Seno M, Igarashi K: Nucleotide sequence of rat basic fibroblast growth factor. cDNA. *Nucleic Acids Res* 16: 5201, 1988.
- 14) Wanaka A, Jonson EM, Milbrandt J: Localization of FGF receptor mRNA in the adult rat central nervous system by *in situ* hybridization. *Neuron* 5: 267-281, 1990.
- 15) Whitby DJ, Ferguson MWJ: Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev Biol* 140: 1375-1388, 1992.
- 16) Logan A, Frautschy SA, Gonzalez AM, Baird A: A time course for the focal elevation of synthesis of basic fibroblast growth factor and one of its high-affinity receptors (flg) following a localized cortical brain injury. *J Neurosci* 12: 3828-3837, 1992.
- 17) Mcgee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, et al: Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res* 45: 145-153, 1988.
- 18) Broadley KN, Aquino AM, Woodward SC, Buckley-Sturrock A, Sato Y, Rifkin DB, et al: Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab Invest* 61: 571-575, 1989.
- 19) Schuschereba ST, Bowman PD, Ferrando RE, Lund DJ, Quong JA, Vargas JA: Accelerated healing of laser-injured rabbit retina by basic fibroblast growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 945-954, 1994.
- 20) Sternfeld MD, Robertson JE, Shipley GD, Tsai J, Rosenbaum JT: Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor. *Curr Eye Res* 8: 1029-1037, 1989.
- 21) Sato Y, Rifkin DB: Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: Regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J Cell Biol* 107: 1199-1205, 1988.
- 22) Sato Y, Shimada T, Takaki R: Autocrinological role of basic fibroblast growth factor on tube formation of vascular endothelial cells *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 1098-1102, 1991.
- 23) Tsuboi R, Sato Y, Rifkin DB: Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. *J Cell Biol* 110: 511-517, 1990.
- 24) Schulze-Osthoff K, Risau W, Vollmer E, Sorg C: *In situ* detection of basic fibroblast growth factor by highly specific antibodies. *Am J Pathol* 137: 85-92, 1990.
- 25) Henke C, Marineili W, Jessurun J, Fox J, Harms D, Peterson M, et al: Macrophage production of basic fibroblast growth factor in the fibroproliferative disorder of alveolar fibrosis after lung injury. *Am J Pathol* 143: 1189-1199, 1993.
- 26) Greisler HP, Henderson SC, Lam TM: Basic fibroblast growth factor production *in vitro* by



- macrophages exposed to dacron and polyglactin 910. *J Biomater Sci Polym Ed* 4: 415-430, 1993.
- 27) **Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ, et al:** Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4606-4610, 1995.
- 28) **Baird A, Mormede P, Bohlen P:** Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggest its identity with macrophage derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 358-364, 1985.
- 29) **Ogata N, Matsushima M, Takahashi K, Tobe T, Takada Y, Yamamoto C, et al:** Expression of fibroblast growth factor and transforming growth factor- $\beta$  in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(Suppl): 95, 1995.
- 30) **緒方奈保子, 松島正史, 高橋寛二, 戸部隆雄, 高田百合子, 宇山昌延:** In situ ハイブリダイゼーションによる脈絡膜新生児血管発生過程での bFGF の発現. 厚生省特定疾患網脈絡膜萎縮症調査研究班, 平成 5 年度研究報告書: 53-55, 1993.
- 31) **松島正史, 緒方奈保子, 高田百合子, 戸部隆雄, 山田晴彦, 高橋寛二, 他:** 実験的脈絡膜新生血管形成過程における線維芽細胞増殖因子レセプター 1 発現の in situ hybridization による証明. *日眼会誌* 99: 642-648, 1995.
- 32) **Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J:** Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 69: 508-517, 1993.
- 33) **Bensaid M, Malecaze F, Bayard F, Tauber JP:** Opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor- $\beta$  on the proliferation of cultured bovine retinal capillary endothelial (BREC) cells. *Exp Eye Res* 48: 791-799, 1989.