ラットスポンジ移植モデルにおける遺伝子組換え型 ヒト塩基性線維芽細胞成長因子の創傷治癒促進

山岡万寿夫・正木恒男・須藤勝一・志野晟生・藤田 剛*

Acceleration of wound healing by recombinant human basic fibroblast growth factor in a rat sponge-implantation model

The effect of recombinant human basic fibroblast growth factor (rhbFGF) on wound healing was studied biochemically and histologically in a rat sponge-implantation model. Administration of 2 or 10 μ g/rat of rhbFGF to a sponge piece increased the protein and DNA contents of the sponge as well as the wet weight, 1 and 2 weeks after the implantation. One week after the implantation of the rhbFGF-pellet, increases in capillary formation and infiltration of cellular and fibrillar components were histologically observed. The hemoglobin content of the sponge piece also significantly increased, suggesting that the hemoglobin content is a good biochemical marker for angiogenesis and wound healing process. The collagen content of rhbFGF-containing pellet was not significantly different from that of the control.

The effect of rhbFGF on the hemoglobin content was totally abolished by rhbFGF-neutralizing antibody. The results indicate that rhbFGF exhibits its angiogenic action *in vivo* and suggest that it accelerates wound healing.

Masuo Yamaoka・Tsuneo Masaki・Katsuichi Sudo・
Akio Shino・Takeshi Fujita*

**key words : wound healing, rat sponge-
implantation, recombinant human
basic fibroblast growth factor**

創傷治癒には、血管新生、肉芽組織の発達、コラーゲンの産生、上皮の形成などの過程が含まれる¹⁾。一方、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)は、創傷治癒において重要な血管内皮細胞や血管平滑筋細胞、線維芽細胞などの細胞増殖を促進し、血管新生を促進する^{2,3)}。したがって、bFGFは、これらの過程を促進することにより、創傷治癒を早める可能性が考えられる。大腸菌で発現された組換え型ヒトbFGF(rhbFGF)の精製標品は抽出ウシ由来bFGFと同じように血管新生活性を示すことが明らかにされている⁴⁾。

本研究は、精製された rhbFGF を使用して、ラットスポンジ移植による創傷モデルにおける作用を検討するために行った。

材料と方法

(1) 材料

rhbFGF は大腸菌で発現し、heparin-affinity カラムを使用して電気泳動的に単一の成分にまで精製された標品を当社生物工学研究所五十嵐貢一博士から供与された。bFGF の活性を中和するモノクローナル抗体は、当社生物研究所香西義雄博士から供与された。その標品中のエンドトキシン含量は、リムステストで測定すると重量比で rhbFGF の約20万分の1程度であり、実験に影響しないと判定した。プロテインアッセイキットはBio-Rad 社より、ヘモグロビン測定キットおよび一般試薬は和光純薬より、それぞれ購入した。埋め込み用スポンジは、ポリウレタン製のものを10 mM EDTA を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)、および超純水(Barnstead NANO-pure II)で洗浄後、オートクレーブで滅菌し乾燥させてから使用した。

(2) スポンジ移植法

rhbFGF を含む徐放性ペレットは、Murray らの方法⁵⁾ にほぼ従って以下のように調製した。8 % ethylene-vinylacetate copolymer(EVA)の CH₂Cl₂ 溶液 10 μ l を乾固し、そのうえで rhbFGF の溶液(2あるいは 10 μ g/5 μ l, 0.1% 卵白アルブミン, 8 mM リン酸ナトリウム, pH 7.4, 80 mM NaCl)を乾固した。さらに、そのうえに 10 μ l の EVA 溶液を乾固した後ピンセットで折りたたみ、ペレットを作成した。このペレットをスポンジ(10 mm×10 mm×6 mm)の中央部に挿入し、そのスポンジをラット(11~13週齢 SD 系雄性、日本チャールズリバー)の後背部皮下に移植した。対照群ラットには、rhbFGF のかわりに同量の BSA を含む EVA ペレットを作成してスポンジ

* Biology Research Laboratories, Research and Development Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.
武田薬品研究開発本部生物研究所

図1 スポンジからの rhbFGF の消失のタイムコース

約 1×10^5 cpm ($10 \mu\text{g}$) の ^{125}I -rhbFGF を含む ethylene-vinylacetate copolymer のペレットを挿入したスポンジをラット皮下に移植し、一定期間後に取り出してスポンジ中に残存する放射活性を測定した。(mean $\pm$ SEM) ($n=3$)

に挿入し皮下に移植した。1～3週後エーテル麻酔下にスポンジを摘出した。秤量後、スポンジを2等分し、一方を生化学的分析に使用し、他方を形態学的検索に使用した。

(3) スポンジの生化学的分析および形態学的検索

Buckley らの方法⁶⁾により、2等分したスポンジを $0.1 \text{ M NH}_4\text{OH}$ に1昼夜浸して蛋白質およびDNAを抽出した。蛋白質はプロテインアッセイキット、DNAは蛍光色素⁷⁾を使用してそれぞれ定量した。ヘモグロビンは測定キットで定量した。コラーゲン含量は、残渣を 6 N HCl 中、 110°C で1晩加水分解し、ヒドロキシプロリンを定量することにより求めた⁸⁾。

残りのスポンジは、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋薄切切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色およびアザン染色を行い検鏡した。一部のスポンジは細切し、 0.1 M リン酸緩衝2.5%グルタルアルデヒド固定液(pH 7.4, 4°C)で固定した。同じ緩衝液で洗ったあと、1%オスミウム酸液で再固定し、エタノールで脱水後、Epok 812に包埋した。超薄切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色後電子顕微鏡観察した。

(4) 中和モノクローナル抗体による rhbFGF の血管新生促進効果の阻害

rhbFGF の中和モノクローナル抗体およびマウ

ス IgG (Jackson ImmunoResearch) を 5 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)に対して透析後、セントコリン10(アミコン)で濃縮した。このモノクローナル抗体あるいはマウス IgG と rhbFGF を重量比で $100:1$ となるように混合し、 4°C で一晚ブレインキューベーションした。

ペレット当り $2 \mu\text{g}$ の rhbFGF および $200 \mu\text{g}$ のモノクローナル抗体あるいはマウス IgG を含むように徐放性ペレットを作成し、ラットの背部に移植した。1週後にスポンジを摘出し、ヘモグロビン含量を測定した。

(5) rhbFGF の標識法と徐放性ペレットからの放出

クロラミン T 法⁹⁾により rhbFGF を ^{125}I -NaI (New England Nuclear Corp.)でヨードラベル化したあと、heparin-Sepharose (Pharmacia)カラムを使用して分離精製した。 $10 \mu\text{g}$ の rhbFGF と約 1×10^5 cpm の ^{125}I -rhbFGF を含む EVA ペレットを作成し、スポンジ移植法と同様にスポンジとともにラット皮下に移植した。経日的にラットからスポンジを取り出し、ガンマカウンター(Aloka ARC-600)中で放射活性を測定した。

移植1日後には、スポンジ中に残存する放射活性は、移植前の約40%まで急激に減少し、その後は徐々に減少して、7日後では約20%が残存した(図1)。

成績

(1) 生化学的分析

rhbFGF 投与1週後のラットから摘出したスポンジは、対照と比較して、大きく、堅く、切断面はいちじるしく赤色味を帯びていた。2週以降は対照スポンジの赤色味も顕著となり、投与群との間に色調の差は認められなかった。

スポンジ湿重量は、 $10 \mu\text{g}/\text{rat}$ の rhbFGF 投与群において1および2週後、対照と比較して有意に増加した(図2a)。また、スポンジの蛋白質およびDNA含量も2および $10 \mu\text{g}/\text{rat}$ の rhbFGF 投与群において、1週後には対照と比較して有意に増加した(図2b・c)。

スポンジのヘモグロビン含量は、2または $10 \mu\text{g}/\text{rat}$ の rhbFGF 投与群において、1週後には用量依存的に顕著に増加した。しかし、2週後では、対照と投与群との間に差は認められなかった。

図2 rhbFGFによるスポンジの湿重量、蛋白質含量およびDNA含量の変化

rhbFGFを含むスポンジをラットに移植し、一定期間後に取り出してスポンジ中の各成分を測定した。a: 湿重量(mg), b: 蛋白質含量(mg/sponge), c: DNA含量(μg/sponge) (mean±SEM) (n=6).

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (t-test)

(図3a).

コラーゲン含量は、対照および投与群のいずれも時間経過とともに増加した(図3b)。しかしながら、3週まで rhbFGF 投与による促進がみられず、むしろ対照と比較してやや低値を示した。

rhbFGFのこれらの作用がその試料中に混在する物質による可能性を排除するために、*in vitro*で中和活性を持つモノクローナル抗体が、rhbFGFによるヘモグロビン含量の増加作用に及ぼす影響を調べた(図4)。

図3 rhbFGFによるスポンジ中ヘモグロビン含量およびコラーゲン含量の変化

rhbFGFを含むスポンジをラットに移植し、一定期間後に取り出してスポンジ中の各成分を測定した。a: ヘモグロビン含量(mg/sponge), b: コラーゲン含量(μg/sponge) (mean±SEM) (n=6).

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (t-test)

rhbFGFおよびマウスIgGを含むスポンジでは、対照群のスポンジにくらべて有意にヘモグロビン含量が増加していた。一方、マウスIgGのみを含むスポンジのヘモグロビン含量は対照群と差がなかった。このマウスIgGを同量のrhbFGFの中和モノクローナル抗体と置き換えると、スポンジ内のヘモグロビン含量は対照群のレベルまで低下した。

(2) 組織学的分析

スポンジを2等分し、その一方をヘマトキシリン-エオジン染色およびアザン染色し、細胞成分ならびにコラーゲン線維について形態学的に調べた。スポンジの形態学的特徴を、外、中間、および内の3層にわけ、対照と投与群とで比較した。

① 投与1週後(rhbFGF: 10 μg/rat)

対照群: スポンジ断面は投与群と比較して赤色味が少なく、スポンジの周囲の肉芽組織量が少な

表 1 rhbFGF の肉芽形成に及ぼす影響(10 μ g, 1 週)

rat No.	control						rhbFGF					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
outer zone of the sponge												
fibroblast	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+	++	++
collagen fiber	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+	+
capillary	$\pm$	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+
inflammatory cells	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+	+	$\pm$	$\pm$	+	$\pm$
middle zone of the sponge												
fibroblast	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+	+	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+
capillary	—	—	—	—	—	—	+	$\pm$	$\pm$	—	—	$\pm$
red blood cells	—	$\pm$	$\pm$	—	—	—	+	+	+	+	+	++
inflammatory cells	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+	+	+	+	++	++
fibrin network	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
inner zone of the sponge												
red blood cells	—	$\pm$	$\pm$	—	—	—	+	$\pm$	+	$\pm$	$\pm$	+
inflammatory cells	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	$\pm$	+
fibrin network	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+
capillary	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

— : no. $\pm$: slight. + : mild. ++ : moderate

図 4 中和モノクローナル抗体による rhbFGF のヘモグロビン含量の増加作用の抑制

2 μ g の rhbFGF, 2 μ g の rhbFGF と 200 μ g のマウス IgG, 2 μ g の rhbFGF と 200 μ g の rhbFGF の中和抗体を含むスポンジをラットに移植し, 1 週後に摘出してスポンジ内のヘモグロビン含量を測定した.

(mean $\pm$ SEM) (n=4). *: P<0.05(t-test)

いことが実体顕微鏡により観察された(図 5 a). スポンジ外層には軽度の線維性結合組織層の形成がみられ, 線維芽細胞, 毛細血管および少量の炎症性細胞浸潤(好中球, マクロファージ, 好酸球)がみられた(図 5 b・d). アザン染色によりコラーゲン線維束が認められた(図 5 c). 中間層にはフィブリンがスポンジの網目内に析出していたが, 細胞浸潤はわずかに認められるのみであった(図 5 b). スポンジの内層にはフィブリンの析出はわずかで, 赤血球および炎症性細胞浸潤はほとんど認められなかった(データ省略).

投与群: スポンジ断面は対照群と比較して赤色味が顕著で, スポンジ周囲の肉芽組織量は豊富に認められた(図 5 e). スポンジ外層には線維芽細胞が対照に比較して密に収束する部位が散見された(図 5 f). その部位のコラーゲン線維は比較的粗鬆であった(図 5 g). しかし, コラーゲン線維は外層から中間層にかけて対照と比較して内部にまで観察された. 好中球, マクロファージ, 好酸球などが少数みられた. 外層から中間層にかけて線維芽細胞が比較的多数みられ, 毛細血管も認められた(図 5 f・h). 内層においては, 対照と比較してフィブリンの析出とともに赤血球および好中球がやや多く認められた(図省略). 表 1 に成績の

a・e: スポンジ断面の実体顕微鏡写真

b・f: スポンジ外層から中間層にかけての HE 染色($\times 260$)

c・g: スポンジ外層から中間層にかけての Azan 染色($\times 260$)

d・h: スポンジ中間層の HE 染色($\times 520$)

a~d: 対照

e~h: 投与群

図5 rhbFGF 投与スポンジの形態学的観察

$10\mu\text{g}$ の rhbFGF とともに移植したスポンジを1週後に取り出し、ヘマトキシリン-エオジンおよびアザン染色により形態学的に観察した。

表 2 rhbFGF の肉芽形成に及ぼす影響(10 μ g, 2 週)

rat No.	control						rhbFGF					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
outer zone of the sponge												
fibroblast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
collagen fiber	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++
capillary	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
inflammatory cells	±	±	±	+	±	±	±	±	+	+	+	±
giant cells	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
middle zone of the sponge												
fibroblast	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
collagen fiber	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+	+	+
capillary	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	+
red blood cells	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
inflammatory cells	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	+	±
fibrin network	+	—	—	±	—	+	—	—	—	—	—	—
inner zone of the sponge												
red blood cells	+	++	+	+	+	+	±	+	++	±	+	±
inflammatory cells	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
fibrin network	+	++	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+
capillary	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

— : no. ± : slight. + : mild. ++ : moderate

表 3 rhbFGF の肉芽形成に及ぼす影響
(10 μ g, 3 週)

rat No.	control			rhbFGF		
	1	2	3	1	2	3
outer zone of the sponge						
fibroblast	+	+	+	+	+	+
collagen fiber	++	++	++	++	++	++
capillary	+	+	+	+	+	+
inflammatory cells	+	+	+	++	+	+
giant cells	++	++	++	++	++	++
middle zone of the sponge						
fibroblast	++	++	++	++	++	++
collagen fiber	++	++	++	+	+	++
dilatation of capillary	++	+	+	++	++	++
inflammatory cells	+	+	+	+	++	+
giant cells	++	++	++	++	++	++
edema	+	+	+	++	++	++
inner zone of the sponge						
collagen fiber	+	+	+	±	±	+
dilatation of capillary	++	+	++	++	++	++
inflammatory cells	+	+	+	+	+	+
giant cells	+	++	++	+	+	+
edema	+	+	++	++	++	++

— : no. ± : slight. + : mild. ++ : moderate.
+++ : severe

まとめを示す。

2 μ g/rat の rhbFGF 投与 1 週後においても、ほぼ同様の傾向がみられたが、コラーゲン線維は対照群と同程度であった。また、中間層および内層における細胞浸潤も軽度であった(データ省略)。

② 投与 2 週後(rhbFGF : 10 μ g/rat)

対照群 : 外層に線維性結合組織層が形成されるとともに、中間層にもよく発達したコラーゲン線維層の形成が認められた(表 2)。スポンジに接して多核巨細胞が認められた。また、中間層から内層に向けて紡錘形の細胞が多数伸長していた。この部でしばしば微小出血が認められた。

投与群 : 外層にコラーゲン線維が豊富に分布していたが、対照よりやや粗であり、細胞密度も対照よりやや粗であった。巨細胞は対照と同程度であった。中間層もコラーゲン線維が豊富に分布していたが対照よりやや粗であり、細胞密度も対照よりやや粗であった。巨細胞は対照と同程度であった。毛細血管は多数認められた。内層の細胞密度は対照と比較してやや粗であった。巨細胞は対照と同程度であった。毛細血管が多数認められた。表 2 にまとめを示す。

電子顕微鏡による観察で毛細血管の管腔が認められ、周細胞の毛細血管への付着がみられた(データ省略)。

③ 投与3週後(rhbFGF: 10 µg/rat)

全体としては2週後と同傾向にあったが、スポンジ内部の浮腫が投与群でめだった(表3)。

考 察

本研究において rhbFGF が創傷治癒を促進することを示唆する成績を得た。rhbFGF を徐放性ペレットとしてスポンジ中に挿入し、ラットに皮下移植した結果、スポンジ中の蛋白質、DNA など肉芽組織の成分が対照と比較して有意に上昇した。移植1週後、スポンジ中のヘモグロビン含量は、特に対照と比較して顕著に上昇した。光顕による観察においても rhbFGF 移植1週後のスポンジ中には毛細血管が収束している像が認められたことから、ヘモグロビン含量は、bFGF などの成長因子による血管新生および創傷治癒過程のよいマーカーと考えられる。移植2週後には対照と投与群との間でヘモグロビン含量に差はなくなり、rhbFGF の作用は血管新生を早めることにあったことがわかった。コラーゲン含量は rhbFGF 投与3週後まで対照と比較して差は認められなかった。対照群のスポンジ中コラーゲン含量が週とともにしだいに上昇しており、コラーゲン合成は対照スポンジ移植によりすでに刺激されていることがわかる。したがって、rhbFGF をさらに加えても、それ以上の促進は認められなかった可能性がある。あるいは rhbFGF にはコラーゲン合成を刺激する作用はないとも考えられる。

一方、スポンジを3層に分類して形態学的に検索した結果、コラーゲンのスポンジ中間層への移行は rhbFGF 投与群のスポンジにおいてより、一層明白に認められた。しかし、コラーゲン含量の大部分はスポンジを取り巻く肉芽組織に存在するため、rhbFGF によるスポンジ内部のコラーゲン上昇は、スポンジ全体を用いて測定したスポンジ含量に反映されなかったと思われる。スポンジ移植法そのものは肉芽組織の形成を調べるモデルであるが、移植直後は空隙がスポンジ内部の大部分を占めることから、欠損傷のモデルでもあると考えられる。したがって、欠損傷や裂傷などの創傷に対して rhbFGF を投与した場合には、上記

スポンジ中間層におけるコラーゲン含量の増加の成績に対応して、コラーゲン含量増加を伴う治癒促進が認められると予想される。rhbFGF のコラーゲン含量に及ぼす影響に結論を下すには、異物を移植する本モデル以外に欠損傷などの治癒過程におけるコラーゲン含量の変動を調べる必要があるであろう。

以上のように、高度に精製した rhbFGF 投与により創傷治癒のマーカーが動くことが示された。しかし、この作用が rhbFGF の試料中に混在する微量成分に対する非特異的な炎症反応による可能性が残るので、*in vitro* で rhbFGF の活性を中和するモノクローナル抗体(Hori ら、投稿準備中)が rhbFGF の創傷治癒促進作用に及ぼす影響を調べた。その結果、rhbFGF のスポンジ内のヘモグロビン含量増加作用が、この抗体で対照群のレベルまで抑制されたので、これらの作用が非特異的な炎症反応による可能性は少ないと考えられる。

本研究の成績を1988年7月の日本炎症学会にて報告後、組換え型 bFGF のラット皮膚裂傷モデルにおける作用についての成績が発表された¹⁰⁾。その報告では、bFGF により引っ張り力や *breaking energy* はいずれも増加したが、コラーゲン含量は有意な増加を示しておらず、本研究の成績と矛盾しない内容であった。ウシ軟骨由来の成長因子を抽出精製してスポンジ移植モデルにおいて治癒促進を調べた成績が報告されている¹¹⁾。この因子は、のちに bFGF と同一であることが明らかになったが、スポンジモデルにおいてこの因子はコラーゲン含量を増加させたと報告されている。これは組換え型 bFGF を使用した、筆者らおよび上記の皮膚裂傷モデルにおける成績とは異なる。

現時点においてこの差がなにに由来するか明らかではないが、動物組織から調製した因子の場合、抽出、精製標品中に混在する他の成長因子が、成績に影響する可能性も無視できないであろう。

文 献

- 1) Clark, R.A.F.: Overview and general considerations of wound repair. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. (ed. Clark, R.A.F., Henson, P.M.), Plenum Press, New

- York, 1988, p 3-33.
- 2) Baird, A., Esch, F., Mormede, P., Ueno, N., Ling, N., Boehlen, P., Ying, S.Y., Wehrenberg, W.B., Guillemín, R.: Molecular characterization of FGF: distribution and biological activities in various tissues. *Recent Progress in Hormone Research* 42: 143-205, 1986.
 - 3) Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L., Neufeld, G.: Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrine Reviews* 8: 95-114, 1987.
 - 4) Seno, M., Sasada, R., Iwane, M., Sudo, K., Kurokawa, T., Ito, K., Igarashi, K.: Stabilizing basic fibroblast growth factor using protein engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 701-708, 1988.
 - 5) Murray, J.B., Brown, L., Langer, R., Klagsbrun, M.: A micro sustained release system for epidermal growth factor. *In Vitro*. 19: 743-748, 1983.
 - 6) Buckley, A., Davidson, J.M., Kamerath, C.D., Wolt, T.W., Woodward, S.C.: Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7340-7344, 1985.
 - 7) Labarca, C., Paigen, K.: A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102: 344-352, 1980.
 - 8) Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G.: An assay for hydroxyproline and proline on one sample and a simplified method for hydroxyproline. *Anal. Biochem.* 63: 331-340, 1975.
 - 9) Hunter, W.M., Greenwood, F.C.: Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194: 495-496, 1962.
 - 10) McGee, G.S., Davidson, J.M., Buckley, A., Sommer, A., Woodward, S.C., Aquino, A.M., Barbour, R., Demetriou, A.A.: Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J. Surgical Res.* 45: 145-153, 1988.
 - 11) Davidson, J.M., Klagsbrun, M., Hill, K.E., Buckley, A., Sullivan, R., Brewer, P.S., Woodward, S.C.: Accelerated wound repair, cell proliferation and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived growth factor. *J. Cell Biol.* 100: 1219-1227, 1985.