

Basic fibroblast growth factor (b-FGF) のヒト胎盤組織内濃度の測定及びその妊娠に伴う変動に関する研究

山梨医科大学産婦人科教室

長坂 正仁 安水 洸彦 長坂 久司 加藤 順三

The Determination of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) in Human Placental Tissue and the Changes in bFGF during Pregnancy

Masahito NAGASAKA, Takehiko YASUMIZU, Hisashi NAGASAKA
and Junzo KATO

Department of Obstetrics and Gynecology, Yamanashi Medical College, Yamanashi

概要 困難といわれている bFGF の組織内定量法を検討し、妊娠初期、中期前半、中期後半、後期、過期の合計62症例の胎盤組織内 bFGF 濃度の変動を観察し、その生理的意義を確認した。

1) 胎盤1kg より bFGF の精製を行い約28 μ g/kg (組織重量) の精製物を得た。回収率は17.1 $\pm$ 7.4%であった。

2) 精製物は SDS-PAGE で単一バンドとなり、抗 bFGF monoclonal 抗体と免疫活性を有し分子量は16kDa であった。

3) bFGF の RIA による胎盤組織内濃度は初期11.81 $\pm$ 2.11, 中期前半20.45 $\pm$ 4.85, 中期後半9.52 $\pm$ 5.02, 後期7.41 $\pm$ 2.07, 過期7.75 $\pm$ 1.86 (fmol/mg protein) であった。この結果は bioassay とも相関し胎盤の発生、完成及び機能に細胞増殖因子及び血管新生因子としての bFGF が強く関与していることが証明された。

Synopsis The purpose of this study is to develop an assay system for quantification of bFGF in human tissue and to investigate the changes in bFGF content in the human placenta during pregnancy. Sixty-two placental tissue samples from various stages of normal pregnancies were collected.

Approximately 28 μ g bFGF was obtained per 1kg of placental tissue. The recovery rates were 17.1 $\pm$ 7.4%. The purified samples were confirmed as bFGF by SDS-PAGE and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) with anti-human bFGF monoclonal antibody.

The bFGF readings in the human placenta determined by RIA were 11.81 $\pm$ 2.11fmol/mg protein (first trimester), 20.45 $\pm$ 4.85 (early second trimester), 9.52 $\pm$ 5.02 (late second trimester), 7.41 $\pm$ 2.07 (third trimester), and 7.75 $\pm$ 1.86 (post trimester). The placental bFGF were significantly high in the early stage of second trimester and declined gradually during the remainder of the pregnancy. The RIA values were correlated closely with the values obtained by bioassay.

These results demonstrate that our assay system provides a tool for the quantification of bFGF in biological samples and suggest that bFGF, the active mitogen and angiogenic factor, participates in the formation of the human placenta.

Key words: Basic fibroblast growth factor (bFGF) • Placenta • Monoclonal antibody

緒 言

Fibroblast growth factor (FGF) は、1974年に Gospodarowicz により細胞成長因子として牛下垂体より分離された⁷⁾⁸⁾。初期の段階では、その名が示すようにマウス BALB/c 3T3細胞など fibroblast の増殖刺激因子として認識されていた

が、その後、血管内皮細胞を含む、ほとんどすべての中胚葉由来細胞に対して活性を持つことが証明された¹³⁾。現在では、1. growth activity すなわち mitogenic activity, DNA 合成促進作用, 2. in vivo での血管新生作用さらに、3. morphogen (細胞分化作用)¹⁰⁾としての強力な生物学的活性が

確認されている。また、FGFの構造についての研究も進み、現在まで7種類の関連蛋白が同定され、FGFsあるいはFGFファミリーとの呼称が一般的となつた。FGFファミリーの中でもbasic FGF (bFGF) はいち早く単離、精製され、総合的な分析が最も進んでいて、これらFGFsの典型とされている。

前述のFGFsの特徴的生物作用、さらに研究に供給されているヒトbFGFがほとんど胎盤抽出物であることからFGFs、とくにbFGFが胎生期の胎児-胎盤発育にも重要な役割を演じていると推察されるものの¹⁵⁾、この領域に関する具体的な報告は現在までみられない。その理由の一つにbFGFの生体組織内定量法がまだ完全には確立されていないことが挙げられる。

具体的には、bFGFは生物活性が強力なため逆に生体組織内含量は極めて微量であり、その抽出自体が困難であること⁶⁾、また、radioimmunoassay (RIA) や生物学的測定 (bioassay) の方法も報告されているものの、bFGFはmonoclonal抗体を利用しても非特異的反応が多く定量には抽出後の部分精製が必要になることなどにより培養細胞などの単純な系でしか使用されていないことが、組織内bFGF定量の障害となつている。

そこで、本研究ではヒト胎盤からbFGFを分離、精製の後、抗bFGF polyclonal抗体を用いたRIAにて単位蛋白量当りのbFGF量を計測し同時にbioassayも施行することによりその信頼性を確認するという手段を用いて胎盤組織内bFGF定量を試みた。さらに胎盤組織内bFGF含量の妊娠に伴う変動を観察することにより、ヒト胎生におけるFGFの生理的意義を検討した。

研究方法

1. 材料

山梨医科大学附属病院及び協力が得られた山梨県内の医療施設で、患者及び家族の同意を得たうえで、人工流産及び分娩時に胎盤あるいは絨毛組織を採取し試料とした。内訳は初期(12週未満)32例、中期前半(14~16週)6例、中期後半(20~24週)6例、満期(37~40週未満)12例及び過期(41週以上)6例である。試料は母体妊娠経過、超音

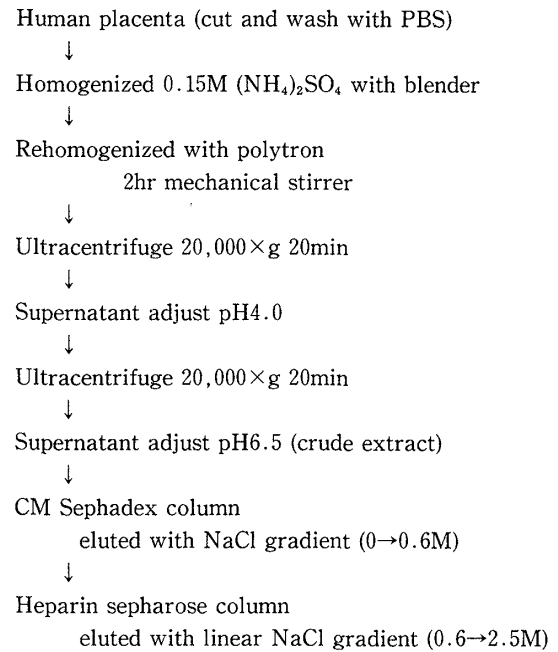


図1 Preparation procedure of FGF

波による妊娠中の胎児及び附属物計測、娩出後の児、胎盤及び絨毛所見で正常妊娠とみなされたもののみに限定してある。

2. 方法

1) 組織からbFGFの抽出、精製

試料は採取後、氷冷のまま可及的速やかに実験室に持ち帰り、Gospodarowicz et al.⁹⁾の方法(図1)に従つてbFGFの抽出を開始した。

組織は細切後、0.15M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (weight/volume=1/3) 中で、Homogenizer AM-3 (日本精機) で5分間、さらにPolytron (Kinematica) にて3分間homogenizeし2時間の攪拌後、20,000g、20分間、超遠心して、可溶分画を0.5Mリン酸にてpH 4.0に調整、再度超遠心(20,000g、20分間)して、その上澄を4M NaOHにてpH 6.5に調整した。これを粗抽出液とし、これに含まれる蛋白量を測定後、あらかじめ100mM sodium phosphate pH 6.0にて平衡化しておいた carboxymethyl Sephadex (CM Sephadex) C-50, cation exchange column, $2.6 \times 100\text{cm}$ (Pharmacia) に添加し、100mM sodium phosphate, pH 6.0で洗浄、続いて0.15M NaCl, 0.6M NaCl in 100mM sodium phosphate, pH 6.0にて溶出、0.6M NaCl分画を採取した(図2)。これをさらに、heparin

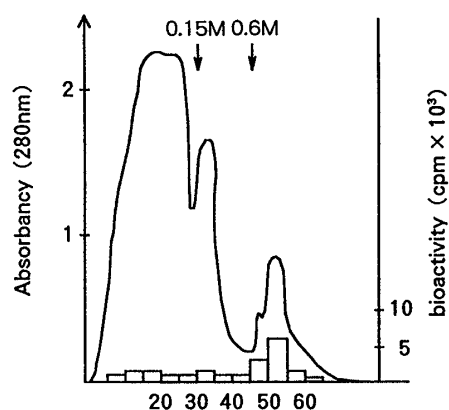


図2 CM Sephadex column 200ml 0.15M 及び0.6 M NaCl in 100mM Sodium phosphate pH 6.0での溶出パターン。
fraction size 10ml, column size 2.6×100cm, flow rate 1ml/min

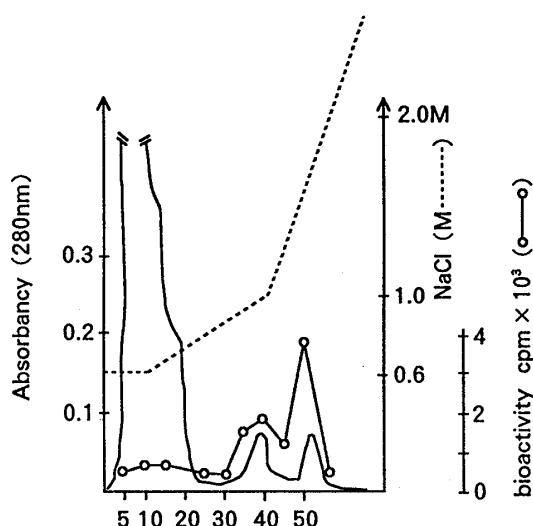


図3 Heparin Sepharose affinity chromatography 0.6~2.5M NaCl in 10mM Tris HCl pH 7.4による溶出パターン。

Sepharose CL-6B, affinity chromatography (Pharmacia) に添加し0.6~2.5M NaCl in 10 mM Tris HCl pH 7.4の濃度勾配溶出により約2.0M NaCl から溶出する蛋白ピークの分画を採取した(図3)。

溶出液は UA-5 detector (ISCO) で、280nmでの吸光度を測定し、各分画は PD-10 column (Pharmacia) にて脱塩後、以下の研究に供した。なおこの操作はすべて4℃の環境下に行つた。

2) 本抽出、精製法による bFGF 分離の確認、及び回収率の検討

精製物の分子量と免疫活性の検討には Laemmli 法を用いた sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) と抗 human bFGF monoclonal 抗体 (MAb78) を使用して enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) により分析した。SDS gel は10~20% gradient gel (第一化学)、分子量マーカーは Pharmacia より購入した。発色には Coomassie Brilliant Blue 及び Konica immunostaining HRP kit IS-50B (Konica) を使用した。

MAb78は human b-FGF cDNA による recombinant bFGF を BALB/c mouse に免疫して、hybridoma から作製した抗体で、武田薬品工業株式会社より供与をうけた¹⁷⁾。

1) の精製操作における bFGF 精製回収率は、満期胎盤組織 6 検体を試料として後述の bioassay を用いて検討した。

3) RIA

1) で抽出、精製した bFGF 分画を bFGF radioimmunoassay (RIA) キット (Amersham) を用いて測定した。キット内容は bovine recombinant bFGF, ¹²⁵I-bFGF, rabbit 抗 bFGF 抗体, donkey 抗 rabbit serum 付着 magnetizable polymer からなる。

本 bFGF 抗体は bovine recombinant bFGF 100%, human recombinant bFGF に95%の交叉反応を示し、Des 1~15 bFGF (bovine), acidic FGF (bovine), インターロイキン (IL)-1 α (human), IL-1 β (human) にはそれぞれ0.01%以下の交叉である³⁾。また本キットによる bFGF 測定の sensitivity は12.5fmol/ml であつた。測定値は粗抽出液中の蛋白量当りで表現した。

4) Bioassay

RIA に用いたものと同じの試料を BALB/c 3T3 clone A31細胞 (Cancer Research Resources Bank) の DNA への³H-methyl thymidine (New England Nuclear) 取り込みを利用して生物活性としての細胞増殖作用を測定した。

測定方法は、Klagsbrun et al.¹²⁾の方法に基づき以下のごとく行つた。96穴 microtissue culture plate (Falcon) に1well 当たり 1×10^4 個の細胞を

10% fetal bovine serum を含む Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM: Flow Lab.) で incubate (37°C, 95% air, 5% CO₂) し, confluent に至った後, 培養液の交換なしで 4 日間培養, 細胞を静止状態に至らしめた. 洗浄後検体とともに 500nCi/well の ³H-methyl thymidine を加え, 48 時間の培養を行い, well を十分洗浄後, 0.25% トリプシン 0.02% EDTA にて細胞を剥離し, Cell Harvester (PHD) にて各 well 中の ³H-DNA を回収し liquid scintillation counter (Packard) で測定した. Control として血清無添加の DMEM を back ground とし, 最大活性の指標として 10% fetal bovine serum を用いた. 活性値は RIA と同様, 粗抽出液中の蛋白量を基準として表現した.

5) 蛋白定量

蛋白定量は bovine serum albumin (nutritional biochemical) を standard とし, Bradford 法⁵⁾により測定した.

6) 統計的方法

結果は, 平均値 (M) ± 標準偏差 (SD) にて示し各群間の検定には t 検定を用いた.

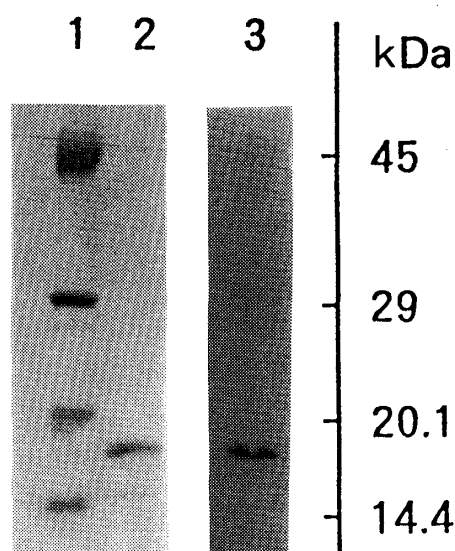


図4 SDS PAGE analysis

lane 1: Protein standard mixture including ovalbumin (M.W. 45,000), carbonic anhydrase (M.W. 29,000), soybean trypsin inhibitor (M.W. 20,100), α -lactalbumin (M.W. 14,400), lane 2: 1 μ g human placental b-FGF, lane 3: Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot (EITB) with MAb78

成 績

1. 精製物の特性

精製物を加熱処理後, Laemmli 法にて泳動する SDS-PAGE にて単一バンドとなり, 分子量は 16 kDa であった (図 4). SDS gel から Clear Blot Membrane-P (Atto) に転写 (western blot) したものを Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot (EITB) によつて上記の単一バンドは MAb78 にて発色を見た (図 4). この結果, 本抽出・精製法にて bFGF の分離, 精製が確認された.

2. bFGF 抽出過程における精製及び回収率

後期胎盤 6 個からの粗精製物は平均総蛋白量 21,812mg, maximal mitogenic effect 1×10^5 ng/ml, half maximal activity (ED₅₀) 8×10^3 ng/ml で, Gospodarowicz et al. の提唱する unit 法で表現すると, total activity は 2.727×10^6 units であった (図 5, 表 1).

CM Sephadex での溶出パターンは図 2 に示すごとく, 0.6M NaCl での peak に最も高い bioactivity ($6,984 \pm 1,048$ cpm) を認め, 蛋白の回収量は 121mg, maximal mitogenic effect 1×10^3 ng/ml, half maximal activity 6×10^3 ng/ml, total activity 2.017×10^6 units, recovery of biological activity 74%, 精製率は 133 倍 (いずれも平均) であった (図 2, 5, 表 1).

Heparin Sepharose の溶出パターン (図 3) で

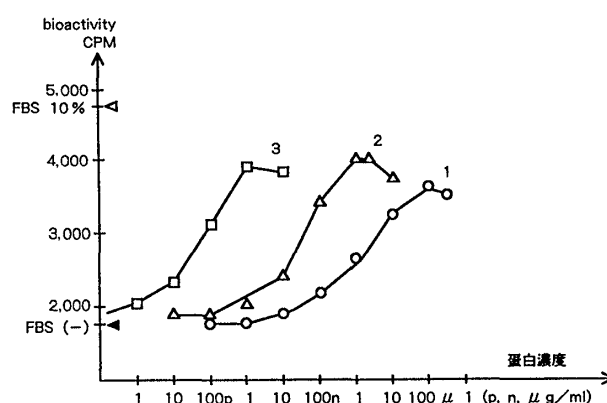


図5 各精製段階の濃度増殖曲線

1. ○: crude extract, 2. △: CM Sephadex, 3. □: Heparin Sepharose
◁ FBS 10% のコントロールは 4,800 cpm, ◀ FBS (-) のコントロールは 1,800 cpm

表1 ヒト胎盤 (1kg) からの FGF 精製

精 製 分 画	蛋白量 (mg)	最大活性 (ng/ml)	ED ₅₀ * (ng/ml)	全活性** ($\times 10^6$ units)	回収率*** (%)	精製率 (倍)
粗抽出物	21,812	1×10^5	8×10^3	2.7265	100	1
CM Sephadex	121	1×10^3	6×10	2.0167	74.0	133
heparin Sepharose	0.028	1	0.06	0.4667	17.1	133,333

* : ED₅₀は最大活性の50%の生物活性を有する濃度と定義する。

** : 1 units は最大活性の50%を必要とする FGF の量と定義する。

*** : 回収率は粗抽出液の活性に対する比率である。

は, 1.1M NaCl に小さい peak, 2.0M NaCl にこれより大きい peak となりそれぞれ bioactivity を認めるが, MAb78に対する immuno activity は 2.0~2.5M NaCl の分画にのみ認めた. 蛋白質の回収量は0.028mg, maximal mitogenic effect 1 ng/ml, half maximal activity 0.06ng/ml, total activity 0.467×10^6 units, 精製率は133,333倍(いずれも平均)であつた(図3, 5, 表1). Bioactivity である回収率は $17.0 \pm 7.4\%$ となり, 比較的良好であつた.

3. 臨床試料にみる bFGF 値及び bFGF 活性

初期胎盤(絨毛)は1例当りの採取試料が少量のため2~3例分を集めて1試料とし, 抽出, 精製した. 中期前半以降の試料はそれぞれ単独に処理し, 定量した.

1) RIA

胎盤組織内 bFGF 量 (fmol/mg protein) は初期で 11.8 ± 2.1 , 中期前半で 20.5 ± 4.9 , 中期後半で 9.5 ± 5.0 , 満期で 7.4 ± 2.1 , 過期妊娠で 7.8 ± 1.8 となり, 中期前半は他のどの時期よりも有意($p < 0.025$)に高く, また初期と満期の間にも有意差($p < 0.01$)を示した(図6).

2) Bioassay

胎盤組織内 bFGF bioactivity は $\text{cpm} \times 10^3 / \text{mg protein}$ で表現した. 初期で 3.23 ± 0.26 , 中期前半 3.77 ± 0.21 , 中期後半 2.66 ± 0.61 , 後期 2.57 ± 0.33 , 過期 2.64 ± 0.33 と, RIA 同様, 初期では比較的高値で中期前半にピークとなり, 満期では低下する. 症例数が少ないため中期前半の高値は有意とはならなかつたが, 初期と後期の間には有意の差 ($p < 0.025$) が存在した(図7). 同一検体における bioassay と RIA 値との間には, 若干の変

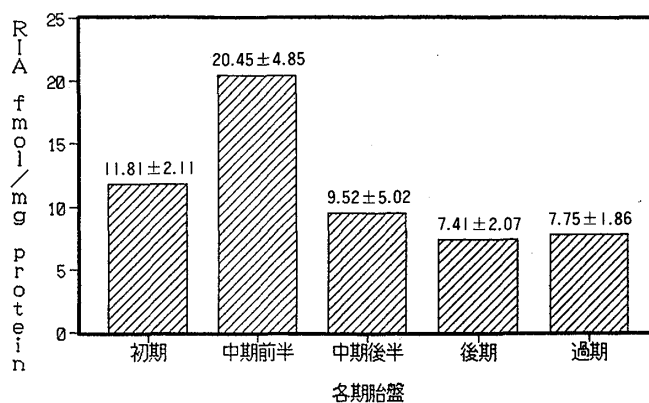


図6 各期胎盤組織内 bFGF

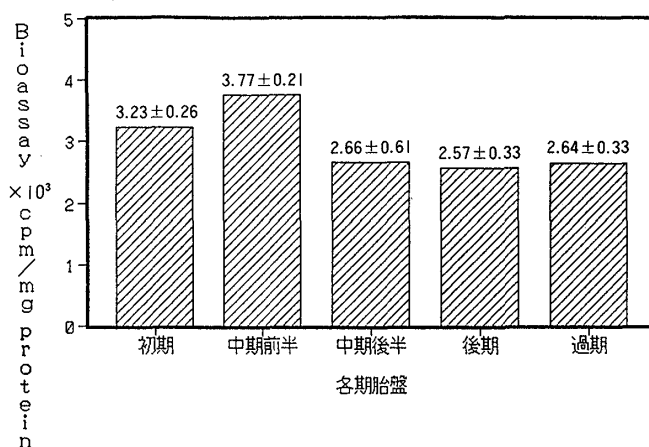


図7 各期胎盤組織内 bFGF の生物活性

動はあるものの, 一定の相関を示した.

考 案

1. 胎盤組織中 bFGF の測定法について

bFGF の作用を分析するうえで, 一つの大きな障害となつているのが, bFGF 放出機構がまだ未解明であるという点である. bFGF mRNA 翻訳による生成物はすべて分泌放出を指令するシグナル配列を欠如しているとの指摘がある. bFGF の 18kDa 型の最初の 9 個のアミノ酸がシグナルに

なつているという説もあるが²⁾、これとて教科書的シグナル配列としては余りにも短い。18 kDa型FDFの生体内原型である牛脳下垂体bFGFはこの配列を欠いている¹⁰⁾。これはbFGFが典型的なautocrine因子であることを間接的に証明するものであるが、血中や体液中の含有量を測定することにより、その物質の生理的作用を推察するという通常の研究手段のためには大きな障害となる。また、bFGFの生体組織内濃度は相対的に極めて微量であり、さらにbFGFは組織内ではヘパリン様物質やヘパラン硫酸に代表されるextracellular matrixと結合して存在するため¹¹⁾、簡単な抽出法では分離することが困難である。

現在の遺伝子工学のレベルでは、recombinantヒトbFGFや抗bFGF抗体を作製することは困難ではなく、既にいくつかのRIAシステムが報告され、良好な結果を得ている。しかし、前述の理由により生体内濃度についての検討はいまだなされていない。そこで、本研究では組織内よりbFGFを分離、精製し、RIAにより定量し、その信頼性を3T3細胞を利用したbioassayにて再検討するという方法をとった。

Bioassayの材料となる細胞としては、牛大動脈内皮細胞や毛細血管内皮細胞がbFGFに対するレセプター数が豊富でかつ、より特異的であるが、研究に必要な細胞を入手するのが困難であること、また過去に著者らが3T3細胞を用いbFGF様蛋白の活性を測定し、満足できる結果を得ていることから¹⁾、3T3細胞を使用した。

本研究で抽出、精製した胎盤抽出物はSDS-PAGEにて、単一バンドとなり、分子量が16kDaであること、かつ抗ヒトbFGF抗体を用いたEITBによりバンドを生じたことによりbFGFであることが確認された。また、満期産胎盤1kgから28 μ gの精製物(bFGF)が得られたが、これはGospodarowicz et al.⁹⁾や、Biswas et al.⁴⁾の報告とほぼ一致し、本精製法が現段階では、良好な方法であることが示された。精製回収率が17%と低値なのは、bFGFの組織内含量が極めて低く、かつ容器やクロマトグラフィー基剤に不可逆的に吸着

されるためと思われる。本法のごとく2種のクロマトグラフィー系を使用する抽出法での難点ではあるが、6個の胎盤からの回収率にそれほど大きい差がないことより、本研究のように相対評価を目的とした含有量検討には問題がないと考える。

RIAとbioassay値の相関は比較的良好であった。本研究に用いたRIAの抗体はaFGF及びbFGFと構造的相似性を持つIL-1 α 、IL-1 β との交差は0.01%であること、またbioassayで問題になるEGFなどのgrowth factorが本抽出法ではaFGFを含めほぼ完全に除外されることから、この結果は理論的には予想できる。しかし、FGFsなどのautocrine物質を免疫学的に定量した場合には常にbioassayを用いた検討を行わねば測定結果に対する疑問が付きまとう。Bioassayの裏付けを得た本研究の結果は、一定の抽出、精製操作を加えれば生体組織中bFGF定量が可能であることを示すものである。

2. 胎盤組織内bFGFの妊娠に伴う変動について

胎盤組織内bFGF濃度は粗抽出液中の全蛋白量に対するbFGF量によつて比較し、初期胎盤は比較的高値で、中期前半にピークとなり以後漸減する。

中期前半期(妊娠14~16週)は産科臨床上考えられている胎盤の組織構築、機能完成の時期であり、強力なgrowth factor、angiogenic factorであるbFGFの胎盤組織内濃度がこの時期にpeakを示すことは胎盤組織の増殖、分化、血管網新生にbFGFの関与を間接的に示唆するものである。

妊娠24~28週及び妊娠28~32週の胎盤も採取可能であったが、この時期に分娩となる症例は、早産、重症妊娠中毒症などいずれも妊娠経過が正常とは見なせぬため、本研究の対象とはならなかった。また、過期妊娠で満期妊娠と差がなかったことは、母体と胎児(新生児)に異常のない過期妊娠では胎盤組織の老化などの現象が顕著でないためと思われる。bFGFの産生異常と流産、IUGR、妊娠中毒症などの異常妊娠との関連はさらに追及されねばならないが、胎盤の完成時にこのような変動を示すbFGF以外のgrowth factorが報告

されていないこと、そして bFGF が血管新生などの特徴的な生物活性を持つことから、bFGF が胎盤形成に関与していることは十分推察されうる。

結 語

bFGF は組織内濃度が微量であること、かつ構造的複雑さから、その研究は培養細胞を中心とする in vitro の領域をなかなか脱出できない状況にある。しかし、本研究により生体組織内 bFGF 定量が可能であることが証明され、かつ妊娠時の胎盤形成に bFGF が関与していることが示唆された。この領域の研究が発展し、不妊、不育、IUGR、妊娠中毒症などの生殖医学領域の諸問題の解明、さらには子宮内膜症などの研究の一助となることを願うものである。

稿を終わるに臨み、抗体の提供などのご協力を頂いた武田薬品株式会社に深謝する。本論文の要旨は第42回日本産科婦人科学会学術講演会及び第63回日本内分泌学会秋期学術大会にて発表した。また研究費は文部省科学研究費 62570745, 01570922 によるものである。

文 献

1. 安水洗彦, 三橋直樹, 加藤順三: ヒトにおける卵巣性成長因子の存在, およびその性状についての検討. 日産婦誌, 38: 663, 1986.
2. Abraham, J.A.: Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. Science (Wash. D.C.), 233: 45, 1986.
3. Baird, A., Bohlen, P., Ling, N. and Guillemin, R.: Radioimmunoassay for fibroblast growth factor (FGF): Release by the bovine anterior pituitary in vitro. Regulatory Peptides, 10: 309, 1985.
4. Biswas, S.B., Hammond, R.W. and Anderson, L.D.: Fibroblast growth factors from bovine pituitary and human placenta and their functions in the maturation of porcine granulosa cells in vitro. Endocrinology, 123: 559, 1988.
5. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248, 1976.
6. Ferrara, N., Schweigener, L., Neufeld, G., Mitchell, R. and Gospodarowicz, D.: A novel function for pituitary follicular cells: The production of basic fibroblast growth factor.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 5773, 1987.
7. Gospodarowicz, D.: Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. J. Biol. Chem., 250: 2515, 1975.
8. Gospodarowicz, D.: Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. Nature 249: 123, 1974.
9. Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui, G.M., Fujii, D.K., Baird, A. and Bohlen, P.: Fibroblast growth factor in the human placenta. Biochem. Biophys. Res. Commun., 128: 554, 1985.
10. Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigener, L. and Neufeld, G.: Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. Endocrine Rev., 8: 95, 1987.
11. Gospodarowicz, D., Neufeld, G. and Schweigener, 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 Differentiation, 19: 1, 1986.
12. Klagsbrun, M., Langer, R., Levensen, R., Smith, S. and Lilletein, C.: The stimulation of DNA synthesis and cell division in chondrocytes and 3T3 cells by a growth factor isolated from cartilage. Exp. Cell Res., 105: 99, 1977.
13. Klagsbrun, M. and Shing, Y.: Heparin affinity of anionic and cationic capillary endothelial cell growth factors: Analysis of hypothalamus-derived growth factors and fibroblast growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 805, 1985.
14. Makris, A., Klagsbrun, M.A., Yasumizu, T. and Ryan, K.J.: An endogenous ovarian growth factor which stimulates BALB/3T3 and granulosa cell proliferation. Biol. Reprod., 29: 1135, 1983.
15. Olwin, B.B. and Hauschka, S.D.: Identification of the fibroblast growth factor receptor of Swiss 3T3 cells and mouse skeletal muscle myoblasts. Biochem., 2: 3487, 1986.
16. Rifkin, D.B. and Moscatelli, D.: Recent developments in cell biology of basic fibroblast growth factor. J. Cell Biol., 109: 1, 1989.
17. Seno, M., Iwane, M., Sasada, R., Moriya, N., Kurokawa, T. and Igarashi, K.: Monoclonal antibodies against human basic fibroblast growth factor. Hybridoma, 8: 209, 1989.

(No. 7114 平3・11・5受付)