

原著

脊髄損傷に対する血小板由来創傷治癒因子 ならびに神経成長因子の効果

平泉 裕* 藤巻悦夫* 川原 範夫**

▶ **Key words** : 脊髄損傷 (spinal cord injury), 血小板由来創傷治癒因子 (platelet derived wound healing formula), 神経成長因子 (nerve growth factor), 血管新生 (angiogenesis), 軸索再生 (axonal regeneration)

要旨

脊髄損傷に対する血小板由来創傷治癒因子
ならびに神経成長因子の効果

平泉 裕 藤巻悦夫 川原 範夫

成熟 rat の第 12 胸髄を完全横断し, 死腔部に血小板由来創傷治癒因子 (PDWHF) または神経成長因子 (NGF) を含むコラーゲンゲルを充填して 1 カ月, 2 カ月または 3 カ月間飼育後, 脊髄損傷部を組織病理学的に観察した. control 群はコラーゲンゲルのみを充填した. その結果, 脊髄断端部に control 群では小径の短い軸索束しか形成されなかった. NGF 群は脊髄断端部に太い軸索束と神経腫形成を認め, 多数の生存神経細胞が観察された. 一方, PDWHF 群は脊髄断端部での血管新生が著明であった. 今回の *in vivo* 脊髄損傷モデルにおける研究で, 外因性 NGF が神経細胞生存と軸索再成長誘導に働き, PDWHF による血管新生は細胞外微小環境改善に働くと思われる. 将来の脊髄損傷のリハビリテーション医学に関ってくるアプローチになる可能性がある.

リハ医学 32: 173-183, 1995

はじめに

今回の研究の目的は, 損傷した脊髄を二次的変性壊死から救い, 軸索再生と血管再構築による脊髄微小環境の改善へ誘導することが可能かどうか検討することである.

脊髄などの中枢神経系では損傷の結果, 神経細胞の壊死や軸索変性が発生するが, 成熟した中枢神経系においても発達初期¹⁷⁾のように神経組織の生存, 機能維持および修復において neurotrophic factor に依存するかどうか興味深い問題である. 中枢神経系において, 軸索切断により標的器官または神経膠細胞に由来する neurotrophic factor の供給が枯渇し, これが逆行性変

性を起こしたり, 再生が不能となる理由であるとする報告がある⁵⁴⁾. また, 損傷した脊髄では末梢神経系以上に局所の血流障害の影響を受けやすいことも報告されてきている^{9,22,45,46)}.

損傷脊髄の二次的変性の進行を予防したり, 神経組織修復を成功に導くために, 第一に外因性の neurotrophic factor を投与して神経細胞生存または軸索成長に直接的効果を発揮するか, 今回は neurotrophic factor として最も重要とされる神経成長因子 (nerve growth factor, 以下, NGF) を投与し, 第二に局所の血管新生による神経細胞周囲の微小環境を改善させた場合に神経組織の生存と修復への誘導を期待できるか, 血小板由来創傷治癒因子 (platelet derived wound healing formula, 以下, PDWHF) を投与して検討し

1994年7月5日受付, 11月17日受理

*昭和大学医学部整形外科/〒142 東京都品川区旗の台1-5-8

**金沢大学医学部整形外科/〒920 石川県金沢市宝町13-1

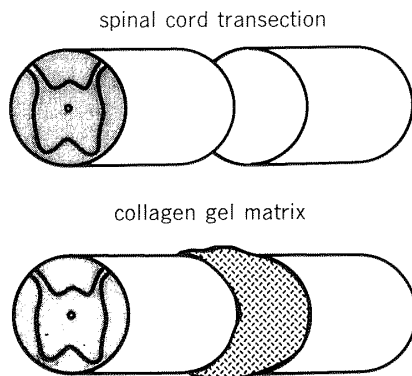


図 1 脊髄横断部の処置

脊髄断端間に生じた 2~3 mm の死腔部に充填した I 型コラーゲン溶液は、体温で 10~20 分でゲル化し脊髄両断端をコラーゲン性基質で結合するため、軸索成長を支持し、血管新生を誘導するための基質材料とした。

た。また第三に損傷部において再生軸索を支持するのに必要な基質材料として、I 型コラーゲンゲルを使用した。

対象と方法

36 匹の成熟ウイスターラット (200~250 g) をペントバルビタール 40 mg/kg の腹腔内投与により麻酔し、第 12 胸椎で椎弓切除して露出した脊髄を横断した。脊髄完全横断は、横断直後に脊髄断端が互いに反対側へ引かれ間に 2~3 mm の死腔を形成することにより確認した。手術は術野をドレープで被覆し無菌操作で行った。

損傷脊髄に対する処置として、脊髄断端間に生じた死腔部に 0.2 ml の I 型コラーゲン (Vitrogen 100®, Collagen Corporation, Palo Alto, California) を充填し、軸索成長と trophic factor 供給のための基質材料とした。本コラーゲンは 4~6°C では液状であり、37°C の体温に温められると 10~20 分で fibrillogenesis によりゲル化して脊髄両断端をコラーゲン性基質で結合した (図 1)。このコラーゲン溶液がゲル化する前に PDWHF または NGF 100 µg を溶解した。PDWHF (Curative Technologies, Inc. Setauket, New York) は複数の成長因子の集合体であり、血小板由来成長因子 (platelet derived growth factor, 以下, PDGF), 血小板由来血管形成因子 (platelet derived angiogenesis factor, 以下, PDAF), transforming growth factor-β (以下, TGFβ), 血小板因子 IV

表 1-A 軸索成長の段階的評価

0	: 瘢痕組織内への軸索成長 (-)
1	: 瘢痕組織内への軸索成長が 1 mm 以下
2	: 瘢痕組織内への軸索成長が 1 mm 以下だが、太い軸索束を形成
3	: 瘢痕組織内への軸索成長が 1~2 mm
4	: 瘢痕組織内への軸索成長が 1~2 mm で、太い軸索束を形成
5	: 瘢痕組織内への軸索成長が 1~2 mm で、太い軸索束の先端に神経腫を形成
6	: 瘢痕組織内への軸索成長が 2 mm 以上
7	: 瘢痕組織内への軸索成長が 2 mm 以上で、太い軸索束を形成
8	: 瘢痕組織内への軸索成長が 2 mm 以上で、太い軸索束の先端に神経腫を形成

表 1-B 損傷脊髄断端からの軸索成長

	control 群	PDWHF 群	NGF 群
1 カ月観察群	1.7±1.4(点)	2.1±0.6(点)	2.8±2.1(点)
2 カ月観察群	2.2±1.5	3.1±1.4	3.4±1.6
3 カ月観察群	2.7±2.7	3.8±1.5	4.1±1.7
全動物の平均	2.1±1.8	3.1±1.4*	3.4±1.8*

*p<0.05 (control 群と比較して)

(platelet factor IV, 以下, PF4) からなる。NGF は Washington University 薬理学教室 (St. Louis, MO) から供給を受けた 2.5S-NGF である^{6,18,43,55,60}。

各 12 匹の PDWHF 群, NGF 群, control 群 (I 型コラーゲンのみ) を、飼育期間によりさらに 1 カ月, 2 カ月, 3 カ月の亜群に分けた。屠殺時には動物をペントバルビタールで腹腔内麻酔後、10%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、損傷脊髄を隣接する正常髄節とともに摘出した。厚さ 60 µm の脊髄矢状断切片を作製し、H&E, Biel 銀染色, Laidlaw 銀染色, LFB-PAS 染色ならびに Masson トリクローム染色を行った。軸索再生を段階的に評価するために、脊髄断端からの軸索成長の長さ、軸索束の太さ、神経腫形成能力からみた 9 段階 (0~8 点) の分類を使用した (表 1-A)。脊髄断端部の自己融解による空洞形成の大きさについては空洞の最大径を計測し、新生血管の評価は 0.25 mm² 当たりの血管数をコンピュータ自動計測装置で測定した。統計学的有意差は student t-test で決定した。

結 果

① 脊髄断端間隙の変化

脊髄横断によって生じた死腔部にはコラーゲン性の

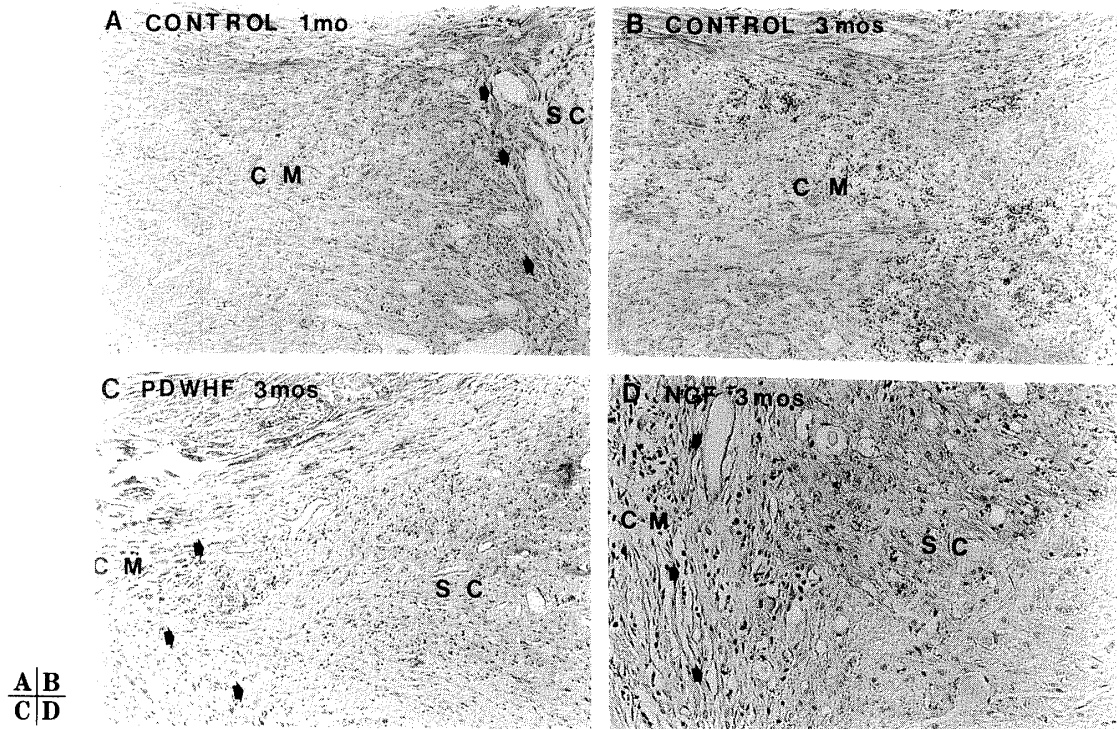


図2 脊髓断端間隙のコラーゲン性基質部の変化 (Masson トリクローム染色)

A : control 群 (1 カ月, 10 倍). 急性期では多数のマクロファージがコラーゲン性基質 (CM) 内に侵入しており, 脊髓断端部 (→) の実質では基質がところどころで脱落して空洞を形成していた.

B : control 群 (3 カ月, 10 倍). 時間経過とともに密な線維性瘢痕組織が形成され, コラーゲン性基質は減少していった.

C : PDWHF 群 (3 カ月, 10 倍). マクロファージの集積がコラーゲン性基質部と損傷脊髓の先端部 (→) で認められたが, 空洞の形成は control 群より少なかった.

D : NGF 群 (3 カ月, 20 倍). コラーゲン性基質部と脊髓先端部 (→) のマクロファージ集積ならびに脊髓先端部の空洞形成は他群より少なかった.

基質材料を充填してあったが, control 群の術後1カ月ではマクロファージ, 線維芽細胞などが同部位に浸潤し, コラーゲン線維を合成しながら徐々に線維性結合組織に置換していった. 横断された脊髓先端部にはマクロファージが集積し, 脊髓先端部の基質が脱落して多数の空洞が形成されているのが観察できた (図 2-A). 術後3カ月ではリンパ球やマクロファージの数が減少し, 線維芽細胞のネットワークの間に密にコラーゲン線維が産生され, コラーゲン線維束が太くなっていった (図 2-B). PDWHF 群でも多くのマクロファージが脊髓断端部に侵入したが, 脊髓損傷部位での新生血管は control 群より著明であった (図 2-C). NGF 群では脊髓断端部に浸潤してきたマクロファージは PDWHF 群より少なく, 遊走してきた線維芽細胞の数も PDWHF 群より少なかった (図 2-D).

② 脊髓断端部における軸索成長と神経細胞生存

損傷した脊髓実質部において, 術後1カ月の control 群では多数の神経細胞が死滅しており, 周囲には脊髓基質が脱落して空洞形成が目立った (図 3-A). 術後3カ月では, 脊髓断端実質部の空洞形成は1~3 mm (2.1 ± 1.3 mm) に拡大した (図 3-B). control 群の動物12匹のうち8匹で, 神経根から細く短い軸索束の成長が観察された (図 3-C). control 群の動物12匹のうち7匹では, 脊髓実質部からも軸索成長が観察できたが細くて短かった. 損傷脊髓実質部での基質の状態は, 軸索や神経細胞を支持するには不十分であった (図 3-D). 明らかな神経腫形成は PDWHF 群と NGF 群で観察できたが, control 群では観察できなかった. control 群の残りの4匹では軸索成長が全く起こらなかった.

PDWHF 群では, 術後1カ月には損傷脊髓断端部で多くのマクロファージが存在し, この領域では星状神経膠細胞の増殖も活発であった (図 4-A). 脊髓断端部

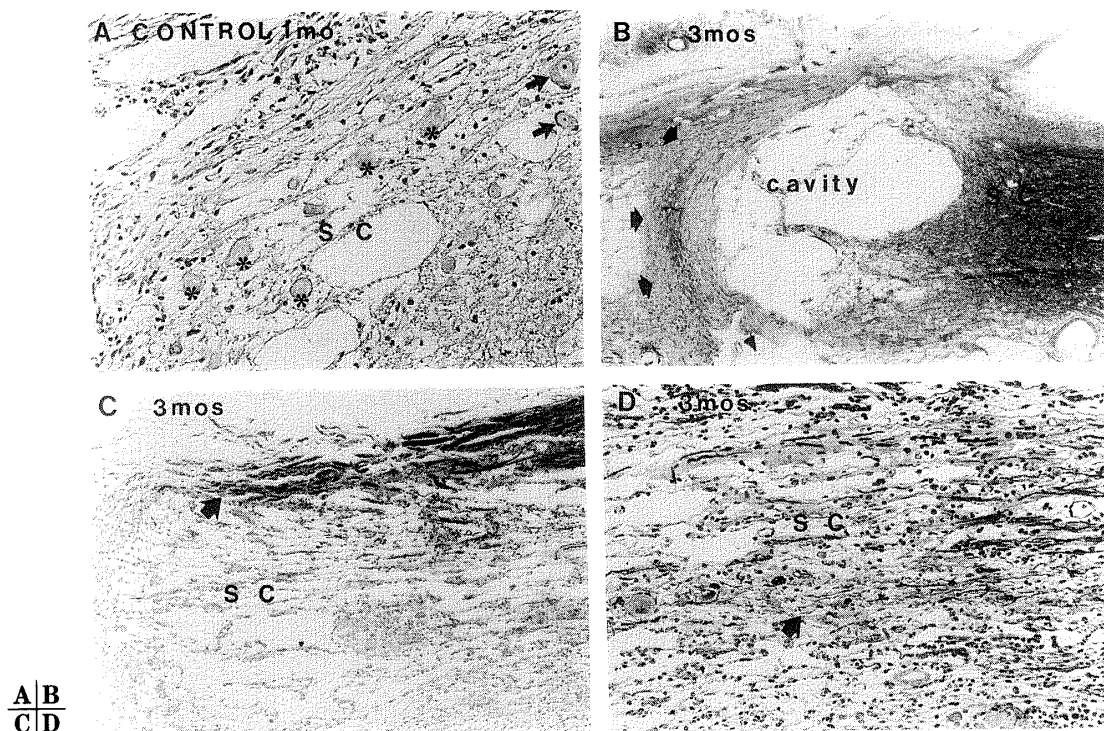


図3 脊髄損傷部の神経組織の変化 (control 群)

A: 急性期の脊髄実質部(1カ月, Masson トリクローム染色, 20倍). 損傷した脊髄実質部(SC)では基質の脱落が著しく, この領域の神経細胞は多数が死滅し(*), 生存する神経細胞(→)は少数であった.

B: 脊髄先端部(3カ月, Biel 銀染色, 4倍). 脊髄断端が厚いグリア性瘢痕組織(→)に囲まれ, 脊髄断端実質部は壊死吸収されて大空洞を形成していた. 本例は脊髄または神経根からの軸索再成長が観察できなかった例である.

C: 脊髄損傷部の神経根(3カ月, Biel 銀染色, 10倍). 神経根からの短い軸索再成長(→)が観察された例で, control 群 12匹のうち8匹でみられた. 再成長する軸索の先端が一部脊髄実質内へ侵入している.

D: 脊髄実質部(3カ月, Biel 銀染色, 20倍). 脊髄実質部に軸索再成長(→)がみられた例で, control 群では細胞外微小環境が良好でないため, 軸索の再成長する長さや数が明らかに他群より少なかった.

に生じた空洞形成の大きさは 1.3 ± 0.6 mm と control 群に比較して小さく, 統計学的に有意差をもっていた ($p < 0.05$). PDWHF 群では control 群と比較して, 明らかな軸索成長が近位側の運動神経線維束や前根神経線維束からと遠位側の後根神経節細胞由来の感覚神経線維束から起こっているのが観察できた(図 4-B). 脊髄実質部における軸索成長も観察できたが, 神経根からの軸索成長ほど豊富ではなかった. 損傷した脊髄実質部の灰白質における神経細胞の生存数は control 群よりも明らかに多かった(図 4-C). 成長している再生軸索は, 侵入してきた線維芽細胞により産生された太くて密なコラーゲン線維のバリアーに到達すると成長する方向を変更させられ, 線維性瘢痕組織の中で神経腫を形成して軸索が標的器官に伸びるのを妨げられていた(図 4-D).

NGF 群においては, 術後3カ月においても灰白質

において多数の生存神経細胞が乏突起神経膠細胞や星状神経膠細胞の集団の中に観察でき, 周囲の脊髄細胞外基質が保持されていた. 空洞形成の大きさは 1.4 ± 0.7 mm で, control 群と比較して小さかったが, 統計学的有意差はなかった(図 5-A). 軸索成長が活発で, 最も活発な軸索成長は神経根から起こっていた(図 5-B). 脊髄実質部においても軸索成長が観察され, 他の群, 特に control 群よりも豊富であった(図 5-C). 軸索成長は頭側からは下行性運動神経線維または前根神経線維から, 尾側からは上行性感覚神経線維や後根神経線維から起こっていた. 再生軸索は線維性瘢痕組織の中へ侵入すると, 密な線維性瘢痕組織にブロックされて神経腫を形成した(図 5-D). NGF 群では 12 匹の動物のうち, 太い軸索束形成が 11 例に観察され, 神経腫形成が 7 例に見られた. 統計学的には NGF 群と PDWHF 群において, control 群より明らかに活発な

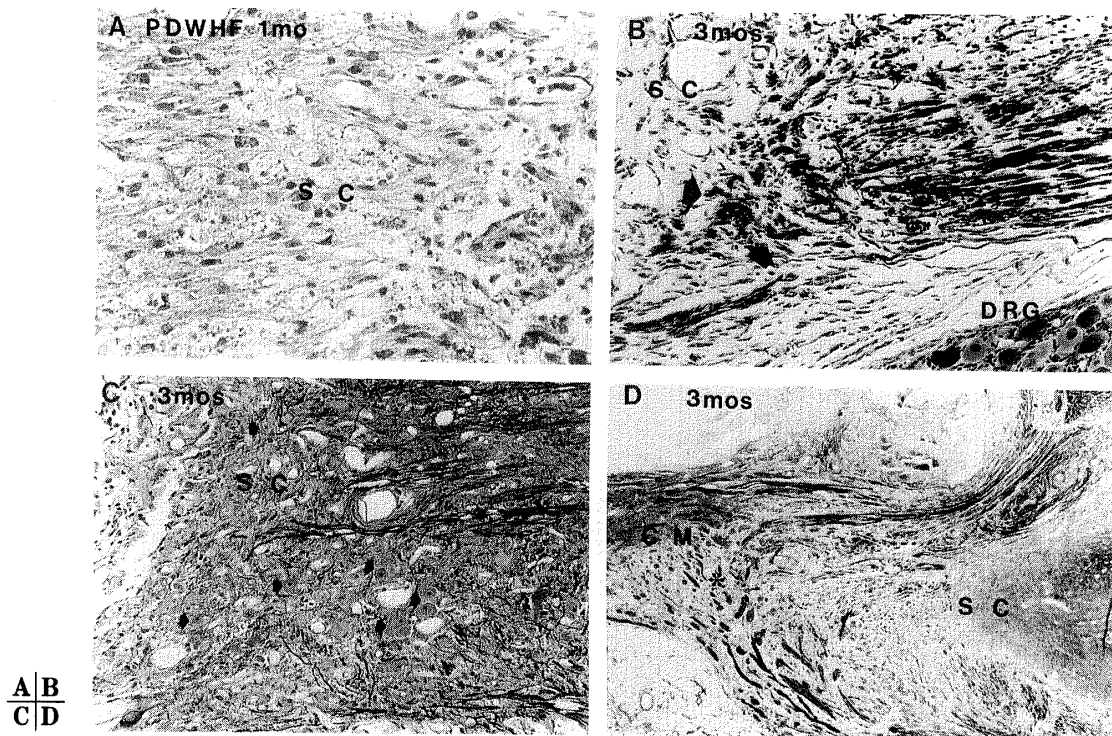


図 4 脊髄損傷部の神経組織の変化 (PDWHF 群)

A : 急性期の脊髄実質部 (1カ月, Masson トリクローム染色, 20倍). 多数のマクロファージが損傷した脊髄実質部に侵入しているが, 基質は control 群よりもよく温存されている。
 B : 脊髄損傷部の神経根 (3カ月, Biel 銀染色, 20倍). 本例では軸索再成長 (→) が背側の神経根から生じ脊髄実質内へ侵入した. 生存する後根神経節細胞 (DRG) が観察できる。
 C : 脊髄実質部 (3カ月, Biel 銀染色, 20倍). 脊髄実質部における軸索再成長は control 群よりも活発で数も多かった. 軸索と神経細胞を支持する細胞外微小環境は control 群よりも良好であり, 多数の生存神経細胞 (→) が観察できた。
 D : 脊髄先端部 (3カ月, Biel 銀染色, 4倍). 細胞外微小環境として軸索周囲の細胞外基質が軸索再成長を支持するが, 密な線維性瘢痕組織に到達すると軸索の成長方向が変えられ, 神経腫 (*) を形成した。

軸索成長が起こっていた. また, NGF 群における再生軸索束は, 統計学的有意差はないが PDWHF 群よりも長く, 太くなっていた (表 1-B).

③ 脊髄損傷部における血管新生

血管新生はコラーゲン性の基質部と損傷脊髄実質部の両方で観察された. control 群では血管新生は脊髄実質部よりも線維性組織で置換されたコラーゲン性基質部において優勢であった (図 6-A). PDWHF 群では血管新生はコラーゲン性基質部 (図 6-B) と脊髄断端の脊髄実質部 (図 6-C) の両方において優勢であった. NGF 群においても PDWHF 群と同様に血管新生がコラーゲン性基質部と脊髄実質部においてみられた (図 6-D). 統計学的には PDWHF 群と NGF 群の両方とも, control 群と比較して有意に血管数が増加し, PDWHF 群はさらに NGF 群と比較しても有意に増加していた (表 2).

考 察

① 損傷した脊髄の再生の可能性

中枢神経系が高度の損傷を受けた直後には, 損傷部位に神経壊死が発生し, 局所の血液-中枢神経関門が破綻する^{25,44)}と同時に, 血液由来のマクロファージが集積して変性した髄鞘や細胞の破片を喰食していく. こうした神経要素を取り囲む微小環境の変化のために, 損傷を直接受けなかった神経も二次的に変性壊死に陥り, 小空隙が徐々に拡大して中枢神経内の実質部に空洞を形成する²⁴⁾. これは脊髄局所の虚血, 栄養や neurotrophic factor の不在, 自己融解プロセスによって引き起こされる代謝の imbalance など複数の要因から引き起こされる^{14,23)}と考えられ, この初期損傷後に続いて起こる二次性神経壊死の波は, おそらく初期損傷自体より神経壊死にとってより大きな比率を占め

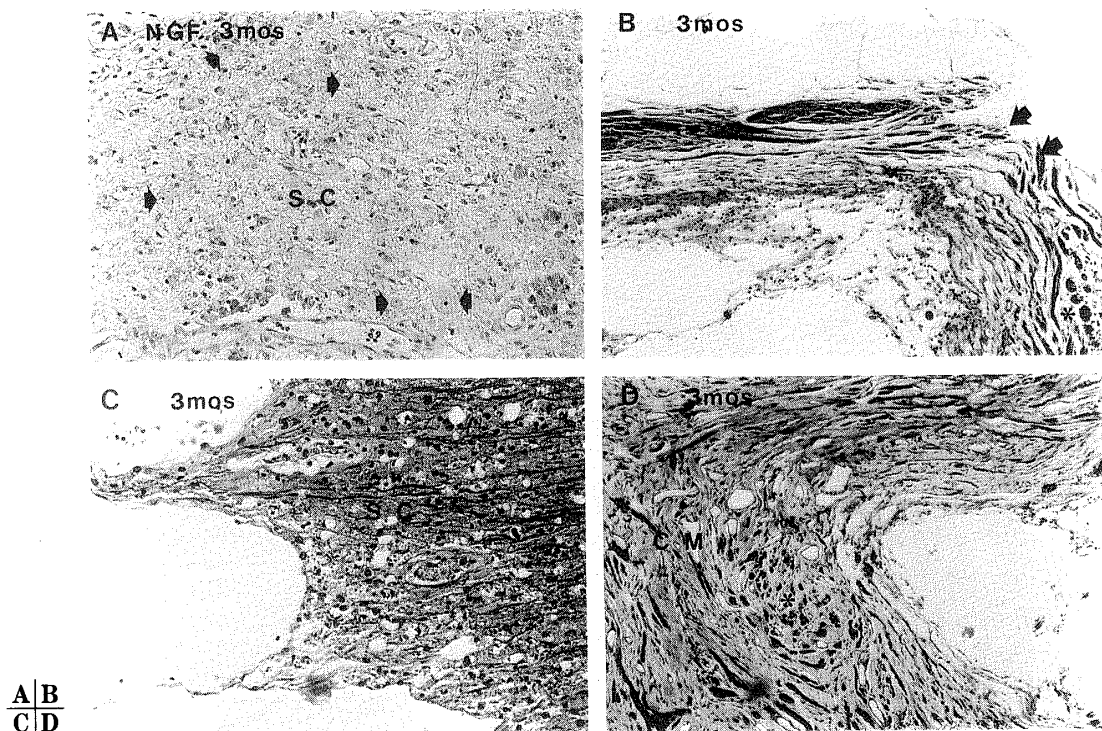


図5 脊髄損傷部の神経組織の変化 (NGF 群)

- A: 脊髄実質部 (3 カ月, Masson トリクローム染色, 20 倍). この群では細胞外微小環境が比較的よく保たれており, マクロファージの遊走が少なく, 多数の生存神経細胞 (→) がみられた.
- B: 脊髄損傷部の神経根 (3 カ月, Biel 銀染色, 10 倍). 神経根から発生した軸索再成長 (→) と神経腫形成 (*).
- C: 脊髄実質部 (3 カ月, Biel 銀染色, 20 倍). 軸索再成長が脊髄実質部において活発に数多く観察できた.
- D: 脊髄先端部 (3 カ月, Biel 銀染色, 10 倍). 再生軸索が密な線維性バリアーによって遮られ, 渦巻状の神経腫 (*) を形成していた.

ているものと考えられる. また phagocytosis が進行している間, 損傷部に隣接する部位に星状神経膠細胞が増殖して線維性の網を形成する^{1,11)}と同時に, 線維芽細胞が周囲の結合組織から損傷部に侵入してきて, 損傷した中枢神経の表面を密なコラーゲン線維の層で覆い²⁷⁾, いわゆるグリア性瘢痕組織¹⁵⁾と呼ばれるものが形成される.

今まで歴史上, 成熟した哺乳動物においては脊髄が再生することは不可能と考えられてきた^{10,12)}. しかし現在では成熟した哺乳類の中枢神経系においても, 神経細胞が損傷後に適切な細胞外微小環境に置かれれば軸索再生の能力を所有する^{8,29,44)}ことがわかってきている. 以上より, 脊髄損傷修復のための重要な研究領域は, 脊髄への外傷直後の急性期における神経細胞の変性予防と, 次に続く軸索の再成長ならびにシナプス新生を誘導することであると考えられる. 神経再生には血流を介する水溶性の trophic factor と神経突起を經由する膜に関連した neurotrophic factor の両方が

必要であるが¹⁹⁾, 脊髄損傷部においてはこうした外因性の trophic factor や栄養が枯渇し, 加えて局所の微小循環の障害^{23,39,41)}や軸索成長ならびにシナプス新生に支持的役割を演じる細胞外基質の障害などの局所微小環境の破綻が問題となり, 神経細胞や軸索周囲の良好な細胞外基質の存在と障害された血液微小循環の回復は脊髄機能維持ならびに修復過程において重要と考えられる.

② 中枢神経系における NGF の効果

末梢の交感神経では, neurotrophic factor として重要な標的器官由来の NGF が枯渇すると, chromolytic reaction が起き神経細胞の壊死を引き起こす⁵³⁾ことが知られている. この NGF は, 発達過程や損傷時, あるいは老化現象中の重要な時期において, 軸索の促芽, 成長, シナプス新生, 神経細胞壊死調節に適切な働きをしている⁴⁰⁾と考えられる. 今まで外因性に供給した NGF が, 末梢の交感神経や後根の感覚

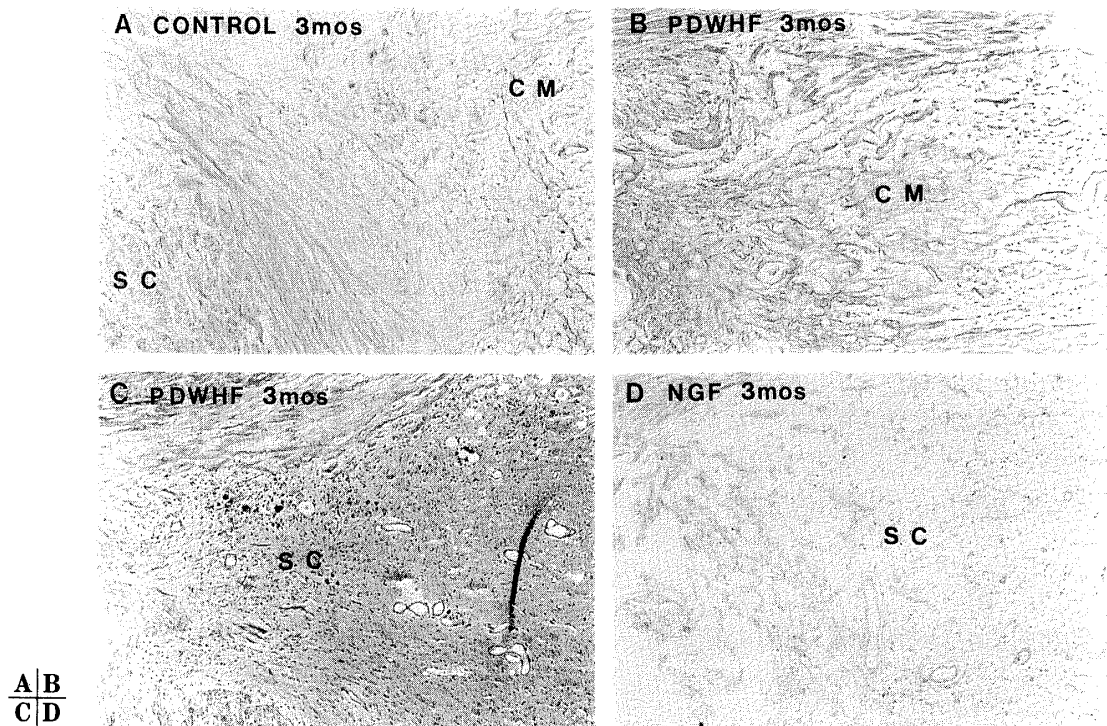


図 6 脊髄損傷部の血管新生 (Laidlaw 銀染色)

A : control 群 (3 カ月, 10 倍). control 群では血管新生が脊髄断端間隙のコラーゲン性基質部 (CM) で生じたが, 脊髄実質部 (SC) ではわずかであった.

B : PDWHF 群 (3 カ月, 10 倍). PDWHF 群ではコラーゲン性基質部 (CM) での血管新生が著明であった.

C : PDWHF 群 (3 カ月, 10 倍). PDWHF 群では豊富な血管新生が損傷した脊髄実質部 (SC) でも観察された.

D : NGF 群 (3 カ月, 10 倍). 脊髄実質部 (SC) での血管新生が観察できたが, PDWHF 群よりは少なかった.

表 2 損傷脊髄実質部における血管数

	control 群	PDWHF 群	NGF 群
1 カ月観察群	6.0±5.6	10.5± 8.2	8.9±5.6(/0.25 mm ²)
2 カ月観察群	5.8±5.0	13.2± 9.6	7.5±5.0
3 カ月観察群	3.7±4.0	16.7±10.0	9.0±5.3
全動物の平均	5.9±4.9	13.1± 9.5**	8.0±5.3*

*p<0.01, **p<0.001 (control 群と比較して)

性ニューロンに対して, 発達期または脊髄損傷後の軸索生存や成長に支持性に働くことが報告されてきたが²⁸⁾, 最近の調査では損傷した中枢神経系においても NGF の増加を示唆する証拠^{14,34,37)}や, 中枢神経が NGF receptor を所有する^{7,18,32,47,56)}ことが証明されてきており, 中枢神経系においても NGF が神経組織の生存または再生に必要な物質であると推測される. しかし実際に脊髄障害部位での *in vivo* の NGF の組織学的効果についてはまだ証明されておらず, 今回の脊髄損傷動物を用いた *in vivo* での研究で, 外因性の trophic factor 投与が神経細胞の生存を支持し, 軸索

再生が神経根からと同時に脊髄実質の灰白質からも誘導される所見が観察できた.

③ 脊髄損傷部における局所微小循環の重要性

脊髄損傷後は局所の血液-中枢神経関門が破綻しており⁴⁴⁾, 同時に脊髄損傷部位での内因性血液供給が減少^{9,22,45,46)}, この状態のために血流を介して局所に作用する脊髄再生に必要な trophic factor の供給が困難な状況に陥る. PDWHF は, PDGF, PDAF, TGFβ, PF4 からなる成長因子の集合体であり, 共通作用として単球に対する chemoattractant であるため, 間接的

にマクロファージ由来の血管新生を誘導する^{16,51,54,59}。また、TGF β ⁵⁴とPDGF^{4,26}は毛細血管内皮細胞のchemoattractantとして直接的に血管新生を誘導する作用もある。これに加えて、PDGFは乏突起神経膠細胞の増殖と分化を促進し神経組織に対し支持的に作用する³⁶。われわれは以前の報告^{22,23}で、脊髄不全損傷におけるPDWHFの血管新生効果を示したが、今回、完全脊髄横断モデルでのPDWHF投与において、血管新生による細胞外微小環境の改善が神経組織の生存および修復に有効かを検討したところ、損傷脊髄実質部において豊富な血管新生所見がみられ、神経細胞の生存と軸索再生に誘導性に働くことが示唆された。

4 脊髄損傷部における細胞外基質の重要性

神経細胞外基質は、神経要素を構築学的に支え、損傷脊髄においてはリモデリングのための空間的フレームワークを供給することによって組織修復に支持性に働く。細胞外基質の主構成要素であるコラーゲンは、細胞培養による*in vitro*の研究において細胞外基質の特性をもたせ、神経組織の分化と軸索成長を支持するためのhydrogelとして使用可能なことがわかっている³⁵。今回、I型コラーゲンを基質材料として脊髄断端間隙に充填したところ、毛細血管に富みコラーゲンが豊富な組織修復のためのテンプレート構造を供給できた。しかし、このコラーゲン性基質は2～3カ月で周囲の軟膜や血管に由来すると思われる線維芽細胞の侵入を受けており、軸索再生の際に障害となる線維性瘢痕組織のバリアー形成を完全には防止できなかった。今後さらに神経細胞外環境を維持するための基質に関する研究が必要である。従来からの観察では、中枢神経系の損傷に伴って星状神経膠細胞がグリア性瘢痕組織を形成し、それによって脊髄断端にグリア性境界膜が形成されるため再生軸索が標的器官に向かって伸長する現象に対するバリアーになると考えられてきた^{5,12,58}。一方、最近の研究では星状神経膠細胞が発達段階での軸索成長の調節^{49,50}ならびに損傷した中枢神経組織の再生に関与^{13,42,57}していることが示唆されており、また*in vitro*^{3,20,31,52}または*in vivo*³³で星状神経膠細胞がNGFを産生したり、ラミニンを産生する能力をもっている²¹ことが判明している。Phagocytosisの主役であるマクロファージにおいても組織修復に働くいくつかのtrophic factorを分泌する⁴⁸。ま

た、マクロファージ³⁸や線維芽細胞^{30,53}によるNGFの合成が*in vitro*において観察されており、以上の細胞群が必ずしも常に神経細胞の生存に対して抑制的に働くのではない²ことがわかっている。このように損傷部位での神経系の反応は非常に複雑であり、星状神経膠細胞が軸索再生に誘導性に働くよう調節することが将来的に可能か今後の課題であると考えている。

中枢神経系の再生は、成熟した哺乳類においては非常に困難なゴールであるが、それは神経細胞の内因的不能力のせいではなく、むしろ損傷した中枢神経が再生しなければならぬ中枢神経系内微小環境の複雑な機構からくる²とされている。今回のNGFとPDWHFの損傷脊髄に対する変性予防ならびに再生における効果に関する研究で、NGFとPDWHFが脊髄損傷の治癒過程に役割を演じ、他のtrophic factorとも重要な相互作用をもつことが示唆された。このような薬理的アプローチの試みが、将来の脊髄損傷患者に対するリハビリテーション医学の発展のための手掛かりとなる可能性をもっていると思われた。

本研究の一部は第31回日本リハビリテーション医学会学術集会において発表した。

文 献

- 1) Adrian EK, Williams MG : Cell proliferation in injured spinal cord. An electron microscopic study. *J Comp Neurol* **151** : 1-24, 1973.
- 2) Agnati LF, Zini I, Zoli M, Fuxe K, et al : Regeneration in the central nervous system : concepts and facts. *Adv Tech Stand Neurosurg* **16** : 3-50, 1988.
- 3) Assouline JG, Bosch P, Lim R, Kim IS, et al : Rat astrocytes and Schwann cells in culture synthesize nerve growth factor-like neurite-promoting factors. *Dev Brain Res* **31** : 103-118, 1987.
- 4) Banda MJ, Knighton DR, Hunt RK, Werb Z : Isolation of nonmitogenic angiogenesis factor from wound fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* **79** : 7773-7777, 1982.
- 5) Bernstein JJ, Bernstein ME : Neuronal alteration and reinnervation following axonal regeneration and sprouting in mammalian cord. *Brain Behav Evol* **8** : 135-161, 1973.
- 6) Bocchini V, Angeletti PU : The nerve growth factor : purification as a 30,000 molecular weight protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **64** : 787-794, 1969.
- 7) Brunello N, Reynolds M, Wrathall JR, Mocchetti I : Increased nerve growth factor receptor mRNA in contused rat spinal cord. *Neurosci Lett* **118** : 238-240, 1990.

- 8) Carlstedt T : Experimental strategies for the surgical treatment of spinal nerve root lesions. Development, plasticity and regeneration in the spinal cord : cellular and molecular interactions (proc.). Sattelite Symposium of the 3rd IBRO World Congress of Neuroscience, 1991, p.11.
- 9) Cawthon DF, Senter HJ, Stewart WB : Comparison of hydrogen clearance and ¹⁴C-antipyrine autoradiography in the measurement of spinal cord blood flow after severe impact injury. *J Neurosurg* **52** : 801-807, 1980.
- 10) Clark WE, LeGros : The problem of neuronal regeneration in the central nervous system. II. The insertion of peripheral stumps into the brain. *J Anat* **73** : 251-259, 1943.
- 11) Clemente CD : Structural regeneration in the mammalian CNS and the role of neuroglia and connective tissue. In Windle WF (ed) : *Regeneration in the Central Nervous System*. Charles C Thomas, Springfield, 1955, pp. 147-161.
- 12) Clemente CD : Regeneration in the vertebrate central nervous system. *Int Rev Biol* **6** : 257-301, 1964.
- 13) Collins GH, West NR : Glial activity during axonal regrowth following cryogenic injury of rat spinal cord. *Brain Res Bulletin* **22** : 71-79, 1989.
- 14) Cotman CW, Nieto-Sampedro M : Progress in facilitating the recovery of function after central nervous system trauma. *Ann New York Acad Sci* **457** : 83-104, 1985.
- 15) Cotman CW, Nieto-Sampedro M, Harris EW : Synapse replacement in the nervous system of adult vertebrates. *Physiol Rev* **63** : 684-784, 1981.
- 16) Deuel TF, Senior RM, Huang JS, Griffin GL : Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* **69** : 1046-1049, 1982.
- 17) Eckenstein F : Transient expression of NGF-receptor-like immunoreactivity in postnatal rat brain and spinal cord. *Brain Res* **446** : 149-154, 1988.
- 18) Fernandez E, Pallini R, Mercanti D : Effects of topically administered nerve growth factor on axonal regeneration in peripheral nerve autografts implanted in the spinal cord of rats. *Neurosurgery* **26** : 37-42, 1990.
- 19) Furukawa S, Furukawa Y : Nerve growth factor synthesis and its regulatory mechanisms : an approach to therapeutic induction of nerve growth factor synthesis. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **2** : 328-344, 1990.
- 20) Furukawa S, Furukawa Y, Satoyoshi E, Hayashi K : Synthesis and secretion of nerve growth factor by mouse astroglial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* **136** : 57-63, 1986.
- 21) Hagg T, Muir D, Engvall E, Varon S, et al : Laminin-like antigen in rat CNS neurons : distribution and changes upon brain injury and nerve growth factor treatment. *Neuron* **3** : 721-732, 1989.
- 22) Hiraizumi Y, Transfeldt EE, Kawahara N, Fiegel VD, et al : The effect of growth factor formula (platelet derived wound healing formula) in experimental spinal cord injuries. *J Am Paraplegia Soc* **15** : 7-13, 1992.
- 23) Hiraizumi Y, Transfeldts EE, Kawahara N, Sung JH, et al : *In vivo* angiogenesis by platelet-derived wound-healing formula in injured spinal cord. *Brain Res Bull* **30** : 353-357, 1993.
- 24) Kao CC, Chang LW : The mechanism of spinal cord cavitation following spinal cord transection. Part 1 : a correlative histochemical study. *J Neurosurg* **46** : 197-209, 1977.
- 25) Klatzo I : Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* **26** : 1-14, 1967.
- 26) Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schumerth S, et al : Stimulation of repair in chronic nonhealing cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet* **170** : 56-60, 1990.
- 27) Krikorian JG, Guth L, Donati E : The origin of connective tissue scar in the transected rat spinal cord. *Exp Neurol* **72** : 698-707, 1981.
- 28) Levi-Montalcini R, Calissano P : Nerve growth factor as a paradigm of other polypeptide growth factors. *Trends Neurosci* **100** : 473-477, 1986.
- 29) Linda H, Risling M, Cullheim S : 'Dendraxons' in regenerating motoneurons in the cat : do dendrites generate new axons after central axotomy? *Brain Res* **358** : 329-333, 1985.
- 30) Lindholm D, Heumann R, Hengerer B, Thoenen H : Interleukin 1 increases stability and transcription of mRNA encoding nerve growth factor in cultured rat fibroblast. *J Biol Chem* **263** : 16348-16351, 1988.
- 31) Lindsay RM : Adult rat brain astrocytes support survival of both NGF-dependent and NGF-insensitive neurons. *Nature* **282** : 80-82, 1979.
- 32) Lindsay RM, Peters C : Spinal cord contains neurotrophic activity for spinal nerve sensory neurons. Late developmental appearance of a survival factor distinct from nerve growth factor. *Neurosci* **12** : 45-51, 1984.
- 33) Lorez H, Keller F, Ruess G, Otten U : Nerve growth factor increases in adult rat brain after hypoxic injury. *Neurosci Lett* **98** : 339-344, 1989.
- 34) Manthorpe M, Nieto-Sampedro M, Skaper SD, Lewis ER, et al : Neuronotrophic activity in brain wounds of the developing rat. Correlation with implant survival in the wound cavity. *Brain Res* **267** : 47-56, 1983.
- 35) Marchand R, Woerly S, Bertrand L, Valdes N : Evaluation of two cross-linked collagen gels implanted in the transected spinal cord : stability of the matrix, scar formation and axonal regeneration. Development, plasticity and regeneration in

- the spinal cord: cellular and molecular interactions (proc.). Sattelite Symposium of the 3rd IBRO World Congress of Neuroscience, 1991, p.51.
- 36) Matthieu JM, Comte V, Honegger P : Influences of growth factors on remyelination of aggregating brain cell cultuers. Development, plasticity and regeneration in the spinal cord : cellular and molecular interactions (proc.). Sattelite Symposium of the 3rd IBRO World Congress of Neuroscience, 1991, p.54.
 - 37) Nieto-Sampedro M, Manthorpe M, Barbin G, Varon S, et al : Injury-induced neuronotrophic activity in adult rat brain : correlation with survival of delayed implants in the wound cavity. *J Neurosci* **3** : 2219-2229, 1983.
 - 38) Otten U, Weskamp G, Hardung M, Meyer DK : NGF synthesis by macrophages. *Soc Neurosci* **13** : 184, 1987.
 - 39) Paulson OB, Newman EA : Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* **237** : 896-898, 1987.
 - 40) Perez-Polo JR, Apffel L, Werrbach-Perez K : Role of central nervous system and peripheral nervous system trophic factors on free radical mediated aging events. *Clin Neuropharmacol* **9** : 98-100, 1986.
 - 41) Phelps CH : The development of gliovascular relationships in the rat spinal cord. An electron microscopic study. *Z Zellforsch* **128** : 555-563, 1972.
 - 42) Reier PJ, Perlow MJ, Guth L : Development of embryonic spinal cord transplants in the rat. *Dev Brain Res* **10** : 210-219, 1983.
 - 43) Rich KM, Luszczyński JR, Osborne PA, Johnson Jr EM : Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury. *J Neurocytol* **16** : 261-268, 1987.
 - 44) Risling M, Linda H, Cullheim S, Franson P : A persistent defect in the blood-brain barrier after ventral funiculus lesion in adult cats : implications for CNS regeneration? *Brain Res* **494** : 13-21, 1989.
 - 45) Sandler AN, Tator CH : Review of the effect of spinal cord trauma on the vessels and blood flow in the spinal cord. *J Neurosurg* **45** : 638-646, 1976.
 - 46) Senter HJ, Venes JL : Altered blood flow and secondary injury in experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg* **49** : 569-578, 1978.
 - 47) Shelton DL, Reichardt LF : Studies on the expression of the β -nerve growth factor gene in the central nervous system : level and regional distribution of nerve growth factor mRNA suggest the nerve growth factor functions as a trophic factor for several distinct populations of neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** : 2714-2718, 1986.
 - 48) Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, et al : A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* **43** : 277-286, 1985.
 - 49) Silver J, Lorenz SE, Whalsten D, Coughlin J : Axonal guidance during development of the great cerebral commissures : descriptive and experimental studies, *in vivo*, on the role of preformed glial pathways. *J Comp Neurol* **210** : 10-29, 1982.
 - 50) Smith GM, Miller RH, Silver J : Changing role of forebrain astrocytes during development, regenerative failure, and induced regeneration upon transplantation. *J Comp Neurol* **251** : 23-43, 1986.
 - 51) Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrugge B : Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* **105** : 1039-1045, 1987.
 - 52) Tarris RH, Weichsel Jr ME, Fisher DA : Synthesis and secretion of a nerve growth-stimulating factor by neonatal mouse astrocyte cells *in vitro*. *Pediatric Res* **20** : 367-372, 1986.
 - 53) Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R, Lindholm D, et al : Nerve growth factor : cellular localization and regulation of synthesis. *Cell Mol Neurobiol* **8** : 35-40, 1988.
 - 54) Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, et al : Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** : 5788-5792, 1987.
 - 55) Wayne DB, Heaton MB : The response of cultured trigeminal and spinal cord motoneurons to nerve growth factor. *Dev Biol* **138** : 473-483, 1990.
 - 56) Whittmore SR, Ebendal T, Larkfors L, Olson L, et al : Developmental and regional expression of β -nerve growth factor messenger RNA and protein in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** : 817-821, 1986.
 - 57) Wigley CB, Berry M : Regeneration of adult rat retinal ganglion cell processes in monolayer culture : comparisons between cultures of adult and neonatal neurons. *Dev Brain Res* **42** : 85-98, 1988.
 - 58) Windle WF : Regeneration of axons in the vertebrate central nervous system. *Physiol Rev* **36** : 427-440, 1956.
 - 59) Wiseman DM, Polverini PJ, Kamp DW, Leibovich SJ : Transforming growth factor-beta ($TGF\beta$) is chemotactic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun* **157** : 793-800, 1988.
 - 60) Yip HK, Johnson Jr EM : Developing dorsal root ganglion neurons require trophic support from their central processes : evidence for a role of retrogradely transported nerve growth factor from the central nervous system to the periphery. *Proc Natl Acad Sci USA* **81** : 6245-6249, 1984.

* *
**The Effect of the Platelet Derived Wound Healing Formula (PDWHF)
and the Nerve Growth Factor (NGF) on Experimental Spinal Cord Injury**

by
Yutaka HIRAIZUMI*, Etsuo FUJIMAKI* and Norio KAWAHARA**
from

*Department of Orthopaedic Surgery, Showa University School of Medicine,
**Department of Orthopaedic Surgery, Kanazawa University School of Medicine
(**Jpn J Rehabil Med 32 : 173-183, 1995**)

The main purpose of this study is to investigate the effect of platelet derived wound healing formula (PDWHF) and nerve growth factor (NGF) in the treatment of experimental spinal cord injury. PDWHF is a conglomerate of growth factors which include platelet derived growth factor (PDGF), platelet derived angiogenesis factor (PDAF), transforming growth factor-beta ($TGF\beta$) and platelet factor IV (PF IV). Complete spinal cord transection was performed at T12 and treatment of the spinal cord injury was achieved by filling the dead space with type 1 collagen gel impregnated with PDWHF, or with 2.5S-NGF. Controls were treated with only type 1 collagen gel. Animals were taken care for either 1, 2, or 3 months. Histopathologically, increased axonal regrowth was noted in animals treated with trophic factors, especially in the NGF group. Most of the control animals formed only thin, short axonal bundles, however, the NGF group formed thick axonal bundles and abundant neuroma. Axonal regeneration occurred from both the spinal cord and the nerve roots, however, the most active axonal regrowth was observed from the nerve roots. Increased angiogenesis was observed in the fibrous scar tissue and the injured spinal cord tissue in the PDWHF group. Tissue autolysis and cavity formation expanded 1~3 mm into the cord stumps. The volume of cavitation was less in the two treated groups. A greater number of surviving nerve cells were observed in this region in the NGF group. Recent studies have shown that mammalian adult CNS possesses the ability for structural and/or functional plasticity following injury under appropriate circumstances. In this study, exogenous NGF appeared to induce axonal outgrowth and nerve cell survival. PDWHF produced notable angiogenesis which seemed to improve the extracellular microenvironment. This may be important for the delivery of exogenous trophic factors, nutrients and changes of extracellular matrices to support nerve cells and axons. These pharmacological approaches with exogenous trophic factors may affect the future rehabilitational approach for the spinal cord injured patients.