

損傷脊髄修復のための基礎的実験： 血小板由来創傷治癒因子(PDWHF)による生体内血管新生

平泉 裕* 長田 茂樹** 川原 範夫**

▶ **Key words** : 脊髄損傷 (spinal cord injury), 血管新生 (angiogenesis)

損傷脊髄修復のための基礎的実験：
血小板由来創傷治癒因子 (PDWHF) による生体内血管新生

平泉 裕 長田 茂樹 川原 範夫

脊髄損傷における PDWHF の効果を血管新生の立場から検討した。猫の腰髄に 22 G テフロン針を刺入し脊髄不全損傷を作製した。PDWHF 処置群はテフロン針に PDWHF がコーティングされ、非処置群にはコーティングされない二重盲検法を採用した。臨床的には後肢運動機能、電気生理学的には各種誘発電位を測定し、3週間で脊髄を摘出し組織学的に評価した。電気生理ならびに臨床的には PDWHF 処置群、非処置群ともテフロン針刺入により脊髄不全麻痺を呈し、3週間の経過観察では PDWHF 処置群でより回復が良好と思われたが、統計学的に有意差を認めなかった。組織学的には PDWHF 処置群で著しい血管新生と血管拡張所見が損傷部周囲にみられた。今回の限局した脊髄損傷と PDWHF 供給により血管新生が誘導されることが判明し、これにより血流増加が損傷部位およびその周囲に起こると考えられた。

リハ医学 30 : 721-728, 1993

はじめに

従来より脊髄損傷に伴う脊髄変性の進行を予防し、脊髄再生を促すため種々の薬理的アプローチが試みられてきた。特に神経成長因子や他の誘導因子群においては、神経線維の成長を促進したり、神経組織修復に働く各種細胞を誘導する作用のあることが認められてきた¹⁻³⁾。本研究の目的は、実験的に作製した脊髄損傷における血小板由来創傷治癒因子 (PDWHF : platelet derived wound healing formula) の効果を、特に血管新生の立場から検討することである。PDWHF はすでに難治性の褥瘡治療においてその有効性が確認されており⁴⁾、血小板由来成長因子 (PDGF

: platelet derived growth factor), 血小板由来血管形成因子 (PDAF : platelet derived angiogenesis factor), transforming growth factor β (TGF β), 血小板因子IV (PF4 : platelet factor IV) からなる成長因子の集合体である。

対象と方法

① PDWHF の作製

マウス血小板を platelet pheresis 法により採集し、platelet buffer 中に血小板を 10^9 個/ml の濃度となるように浮遊させた。この浮遊液中に thrombin を添加することにより、血小板が活性化されて PDWHF が

1993年1月20日受付, 7月30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 金沢市宝町13-1

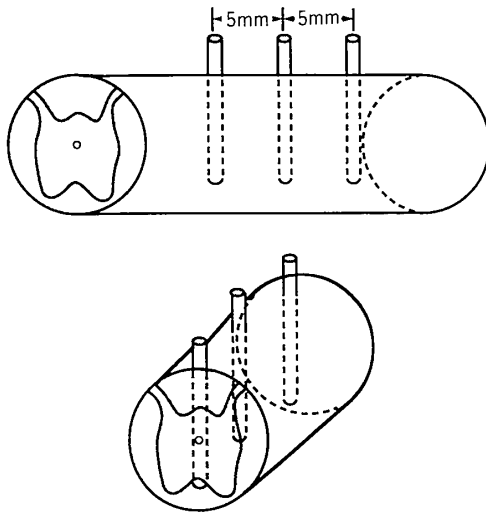


図1 脊髄損傷の作製

22G テフロン針を第2 腰髄レベルで、背側正中線より腹側に向かって4 mm 刺入。頭尾方向に5 mm 間隔で合計3本のテフロン針を刺入した。

産生されることは、1986年に共同研究者の Knighton らによりすでに報告されている⁴⁾。この1 mlの浮遊液中から血小板を除去すると、50 μ lのPDWHFを含む上清液が得られる。この上清液を、担体として使用する同容量のHydron (poly-2-hydroxyethyl methacrylate: Hydromed Sciences) と混合し、22G テフロン針にコーティングし、真空中で乾燥させた。二重盲検法による検定のために、PDWHFの代わりにplatelet buffer とHydronを混合してコーティングしたテフロン針も作製した。Hydronは成長因子を緩徐に1週間以上にわたって放出する特性をもっている⁵⁾。われわれが¹²⁵I放射性同位元素を結合させたPDWHFを用いて、*in vivo*で脊髄内PDWHF活性残存状況を調べたところ、PDWHFがテフロン針周囲10 mmまで1週間以上にわたって分布していることが判明している。

② 脊髄損傷の作製ならびに治療

雑種成猫11匹(2.5~3.5 kg)を使用した。1匹は正常脊髄解剖の観察用に使用し、残りの10匹はペントバルビタール(40 mg/kg)を腹腔内に投与して実験に使用した。手術はすべて無菌操作下で行い、L₂~L₄レベルの椎弓部を露出した後、L₂の椎弓切除術を行い、露出した脊髄を37°Cに加温した0.9%生理食塩水に浸した。脊髄の損傷は、22Gのテフロン針を露出した脊髄背側正中線上より矢状面方向に深さ4 mmほど刺入することにより作製した。テフロン針は、内筒として先

端が鋭な22G注射針が入っており、このテフロン針を体動が生じないようにできる限り緩徐に刺入した後、内筒を抜去した。テフロン針は背側正中線上を脊髄頭尾側方向に5 mm間隔で合計3本刺入した(図1)。PDWHFの投与は、テフロン針にPDWHF-Hydronをコーティングすることにより行った。10匹の脊髄損傷猫のうち、3匹は対照としてbuffer-Hydronのみをテフロン針にコーティングし、残りの7匹は二重盲検法が採用された。すなわち、テフロン針にPDWHFをコーティングする者と脊髄にテフロン針を刺入する実験者を別にして、どのテフロン針にPDWHFがコーティングされているかは最終的に組織標本の定量的観察が終了するまで公開されなかった。結果として、5匹にPDWHFが供給され、2匹はbuffer-Hydronのみがコーティングされていた。

③ 電気生理学的評価

電気生理学的評価として、下行性脊髄誘発電位(D-SCEP)、坐骨神経誘発電位(SNEP)、脊髄導出体性感覚誘発電位(S-SSEP)、皮質導出体性感覚誘発電位(C-SSEP)を、脊髄損傷作製直前、直後ならびに屠殺時に測定した。D-SCEPでは、刺激電極として2極硬膜外カテーテル電極をL₁/L₂間より挿入して10 cm頭側に設置し、0.6 mA、0.2 msec、3 Hzで刺激した。この刺激強度は脊髄損傷前の猫において波形が出現する閾値の約3倍にあたる。記録電極として5極硬膜外カテーテル電極をL₄/L₅間より挿入してL₁~L₃に設置し、単極導出した。SNEPは、刺激はD-SCEPと共通で、記録は露出させた膝窩部坐骨神経から針電極で導出した。S-SSEPとC-SSEPは、SNEPで使用した記録電極を刺激電極とし、閾値の約3倍にあたる6 mA、0.2 msec、3 Hzで刺激した。記録電極はS-SSEPはD-SCEPと共通であり、C-SSEPはCz-A1A2で記録した。

④ 術後管理ならびに臨床的評価

手術後の動物は25~28°Cに室温調節された部屋で看護され、自発的排尿に回復するまで尿道カテーテルが留置された。抗生物質は術後3日間投与された。臨床的観察は神経症状、歩行機能(表1)を含めて毎日行い、3週間後に過量のペントバルビタールを投与して屠殺した。

5 組織学的評価

損傷した脊髄を隣接する正常髄節と一緒に摘出し、10%ホルマリンで固定した。厚さ 60 μ の横断切片を作製し、H&E, Luxol fast blue-PAS (LFB-PAS), azocarmine, Laidlaw's silver 各染色を行った。定量的な血管形成の観察には、コンピュータ自動解析装置と手動装置の両方を使用した。統計学的な有意差検定は student t test を使用した。

結果

1 臨床的ならびに電気生理学的所見

D-SCEP の基本波形は大振幅の N1 とそれに続く小さな N2 からなり、SNEP は多相性の波形であった。S-SSEP は大きな N1, N2 とそれに続く小さな多相性波からなる。C-SSEP はヒトに相似した陽性波 P1, P2 からなる。

1) 脊髄損傷急性期の変化

テフロン針を脊髄に刺入した直後は、誘発電位は両群とも頂点潜時の延長と電位の低下を伴った脊髄不全損傷の状態であった。すなわち D-SCEP では損傷前の N1 平均頂点潜時が 1.46 msec, 平均電位が 210.0 μ V だったのに対し、テフロン針刺入直後は平均潜時 1.52 msec とわずかに潜時が延長し、平均電位は 117.3 μ V と 56% に低下した。この傾向は SNEP, S-SSEP, C-SSEP でも同様であるが、テフロン針刺入により一番敏感に電位の変化が起こりやすかったのが S-SSEP であり、一番電位が低下しにくいのが C-SSEP であった。これは S-SSEP での導出部が腰髄であり、テフロン針の刺入された灰白質の機能をより鋭敏に反映しているためと思われた。

臨床的観察では、麻酔覚醒直後は全例下肢の自発運動がみられなかったが、術後第 1 日目では 8 匹の運動で後肢の筋収縮または関節の自発運動が認められる不全麻痺の状態となり、前肢で這って移動した。全例で術後 2～3 日で自発運動時や観察者が猫の姿勢を変えた時に後肢の痙性を生じるようになり、以後徐々に後肢で荷重し、跛行を呈しながらも歩行するようになっていた(表 1)。尿閉は術後 3～4 日間持続し、以後徐々に自発性排尿が回復し、全例 1～2 週間で尿道カテーテルが不要になった。

表 1 術後の運動機能スコア

0	下肢の自発運動がまったくみられない。
1	下肢のわずかな自発運動がみられる。
2	下肢の明らかな自発運動がみられるが、起立できない。
3	下肢の明らかな自発運動がみられ、起立できる。
4	下肢に荷重して歩行可能だが、跛行がある。
5	正常歩行。

2) 脊髄損傷 3 週後

術後 3 週間の時点で、8 匹が後肢で荷重する歩行機能を回復した。例外として二重盲検群の #2 (PDWHF 処置) と #6 (PDWHF 非処置) の各 1 例ずつが歩行能力を再獲得できなかった。この 2 例はテフロン針を脊髄に刺入する際体動が生じており、その分脊髄損傷が強くなった可能性がある。この 2 例を除いて両群を比較してみると、運動機能スコアの改善度の平均が PDWHF 処置群 3.3 点、非処置群 2.8 点と、例数が少ないので統計学的検討はできないが PDWHF 処置群が優っていた。電気生理学的には、6 匹の動物が 3 週間目の誘発電位で電位の増加といった部分的な脊髄機能回復兆候を示したが、どの例でも S-SSEP が一番感受性が高かったことは、前述したように主に損傷した脊髄灰白質機能の改善を反映しているためと思われた。前述した理由で二重盲検群 #2 と #6 を除いて両群を比較すると、PDWHF 処置群は 4 例中 4 例とも S-SSEP の改善が認められ、非処置群では 4 例中 2 例しか改善を認めなかった。

S-SSEP の変化を具体的に示すと、脊髄損傷前は N1 の平均潜時は 2.40 msec, 平均電位は 16.1 μ V であり、脊髄損傷直後は平均潜時 2.64 msec, 平均電位 4.3 μ V (26.7% に低下) となった。この時点では脊髄損傷直後のため両群で差がなかった。しかし 3 週間後では、PDWHF 処置群では N1 の平均潜時が 2.49 msec, 平均電位が 8.1 μ V と、電位が損傷前の 50% にまで回復したのに対し、非処置群では平均時 2.79 msec, 平均電位 5.1 μ V と損傷前の 32% にとどまっており、統計学的有意差はないが PDWHF 処置群の方が回復がよいように思われた(表 2)。

2 組織学的所見

本実験は脊髄横断切片での観察であるが、PDWHF 処置群、非処置群ともにテフロン針刺入部位に一致して大きな空洞形成がみられた(図 2A～D, 3A～D)。

表 2 臨床的ならびに電気生理学的評価

	運動機能 1日→3週	誘発電位 損傷直後→3週
コントロール#1 (PDWHF -)	0→4	S-SSEP, SNEP の電位増大
コントロール#2 (// -)	2→4	S-SSEP, C-SSEP, SNEP の電位増大
コントロール#3 (// -)	1→4	
二重盲検 #1 (// +)	1→4	S-SSEP の電位増大
二重盲検 #2 (// +)	1→2	
二重盲検 #3 (// +)	1→4	S-SSEP の電位増大
二重盲検 #4 (// -)	2→4	
二重盲検 #5 (// +)	1→4	S-SSEP, C-SSEP の電位増大
二重盲検 #6 (// -)	1→3	
二重盲検 #7 (// +)	0→4	S-SSEP, SNEP の電位増大

表 3 組織学的評価 (血管数の計測)

	総血管数	血管数/1 mm ²
コントロール#1 (PDWHF -)	560	49.14
コントロール#2 (// -)	329	39.26
コントロール#3 (// -)	511	40.88
二重盲検 #1 (// +)	1118	87.69
二重盲検 #2 (// +)	847	84.57
二重盲検 #3 (// +)	1287	96.42
二重盲検 #4 (// -)	594	42.53
二重盲検 #5 (// +)	1517	123.57
二重盲検 #6 (// -)	582	48.82
二重盲検 #7 (// +)	717	89.63
正 常	549	41.51

散在する小空胞や脱髄, gliosis, 線維性癒痕組織形成などの変性所見がテフロン針刺入部周囲にみられた。テフロン針刺入部を中心にして脱髄変性の及ぶ面積は定量が困難ではあるが, PDWHF 処置群の方が非処置群に比較して小さいと思われた。組織学的にもっとも明らかな所見として観察されたのは, 血管染色標本でみられた血管の増殖であった。これらの小血管の観察は, 通常の H&E などの染色法では変性による小空胞形成との識別がきわめて困難であったが, Laidlaw's silver による毛細血管の細網線維染色により明瞭に識別できた。この PDWHF 処置群での血管新生所見は定性ならびに定量的に確認できた。すなわち, 正常の猫の脊髓横断面での血管数は 41.51 個/mm² であり, PDWHF 非処置群では 39.26~49.14 個/mm² (平均 44.1±4.6 個/mm²) であったが, PDWHF 処置群では 84.57~123.57 個/mm² (平均 96.4±15.8 個/mm²) と増加しており, 統計学的に有意であった (p<0.01) (表 3)。また, PDWHF 処置群における血管数増加と血管拡張は, 特に中心部のカテーテル刺入による空洞形成

周囲に著明であった。血管分布を定量するために脊髓横断面上の 1 区画毎 (1 区画=0.25 mm²) の血管数を計測したところ, PDWHF 非処置群では 6~26 個 (平均 16.0 個/0.25 mm²) で, 損傷した脊髓領域で軽度血管数が増加している以外, ほぼ正常猫の血管分布に近かった。一方, PDWHF 処置群では 7~77 個 (平均 33.4 個/0.25 mm²) で, 特に, 空洞形成周囲に著しい血管数増加が起きていることがわかった (図 4A, B)。

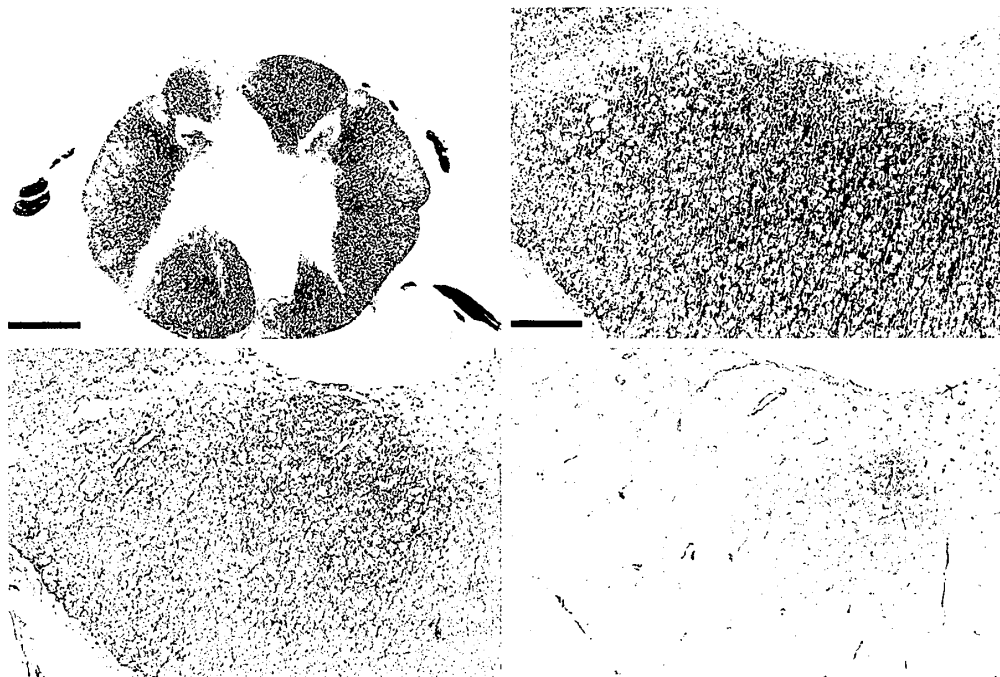
考 察

脊髓損傷修復手段の模索に関する研究は, ここ 10 年間に於いて著しい発展がなされてきたが, いまだに脊髓損傷に伴って起こる神経機能障害の進行を防止したり, 脊髓損傷後に神経機能を正常に回復させる試みに成功していないのが現状である。

① PDWHF の構成

すべての創傷の修復には, 局所に働く多種類の成長因子の影響を強く受けていることが現在判明している。今回使用した血小板由来創傷治癒因子 (PDWHF) は, 現在共同研究者が難治性の褥瘡の治療に使用している成長因子群であり, その有効性が実証されている⁴⁾。

PDWHF 中には主に 4 種類の因子 PDGF, PDAF, TGF β , PF4 が創傷治癒機転において役割を演じている。PDGF は単球に対する chemoattractant⁶⁾ であり, PDAF は血管内皮細胞に対する chemoattractant で, *in vivo* では直接の血管新生因子⁷⁾ である。TGF β は単球の chemotaxis, interleukin-1 産生, マクロファージ由来の血管新生因子の産生促進などからなる創傷治

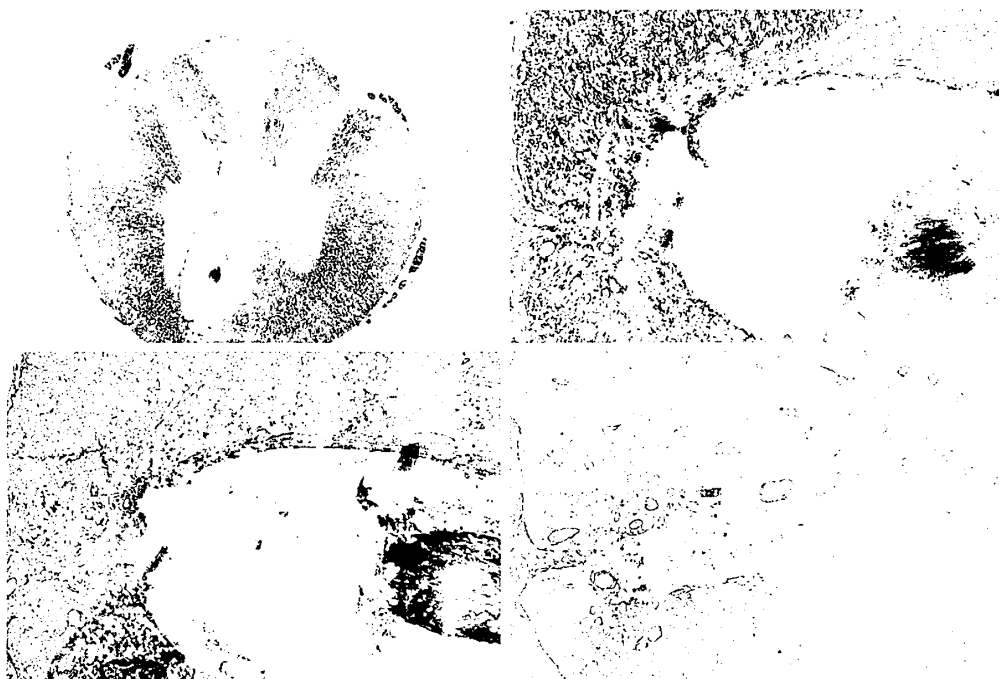


A/B
C/D

図 2 PDWHF 非処置例の脊髓横断面

A : LFB-PAS (×2) B : LFB-PAS (×10)
C : Azocarmine (×10) D : Laidlaw's silver (×10)
スケール : A = 1 mm, B ~ D : 200 μm

- A) 22G テフロン針刺入により生じた脊髓中心部の大空洞。前角部には2つの小空洞と多数の小空胞がみられる。
B~D) 脊髓前角部の拡大写真。テフロン針刺入部周辺組織に多数の小空胞形成を伴った変性像がみられる。正常猫の脊髓と血管所見に明らかな差はない。

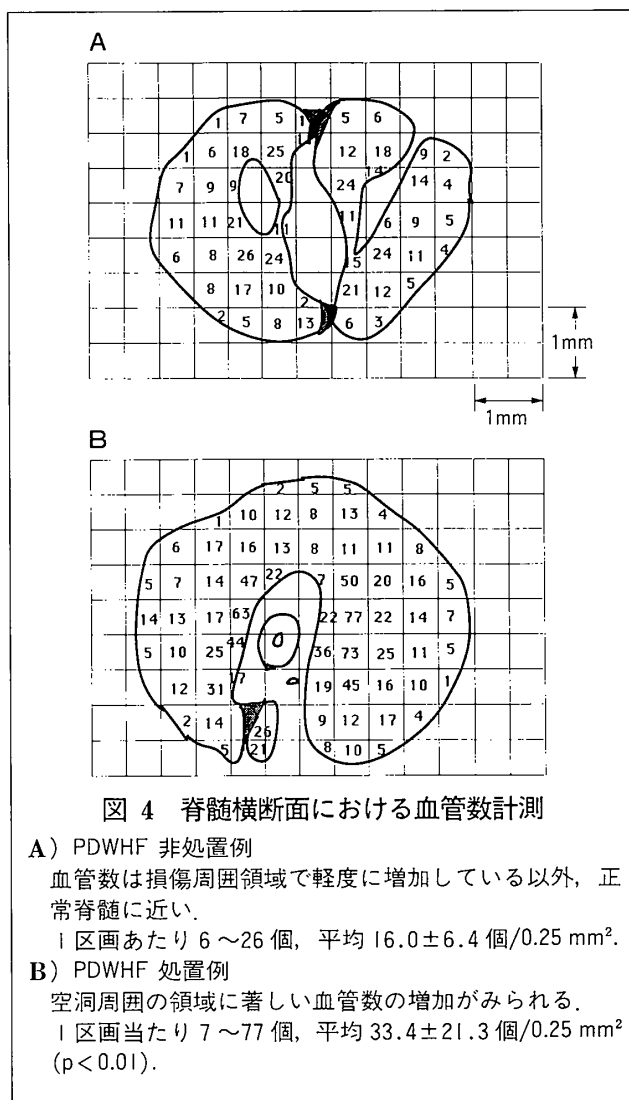


A/B
C/D

図 3 PDWHF 処置例の脊髓横断面

A ~ D の染色と拡大率は図 2 と同じ。

- A) 中心灰白質の変性は図 2 A に比べ軽度である。
B ~ D) 脊髓前角部の拡大写真。テフロン針刺入部周囲の多数の小空胞形成と思われる部分は、Laidlaw's silver 血管染色により、毛細血管増殖と血管拡張であることがわかる。



癒機転の調節機能^{8,9)}を有し、PF4 は単球に対する chemoattractant¹⁰⁾である。以上のように各因子は血管新生直接作用と同時に、共通作用として組織損傷部に遊走してきた単球がマクロファージとなりマクロファージ由来の血管新生因子を産生するのを誘導する⁴⁾。これらの成長因子群の複雑な総合作用の結果として、PDWHF により新しい毛細血管の形成が誘導されると考えられている。また同時に、これらの血小板由来の因子のいくつかは直接的または間接的にキニンの活性化を誘導し、それによってブラディキニンが産生され微小血管の拡張を引き起こすと考えられる⁴⁾。今までにも *in vitro* においては成長因子によって誘導される血管新生が報告されてきた^{6,9,11,12)}。しかし、*in vivo* で、しかも中枢神経系における血管新生を報告したのは脳における 1 例¹³⁾のみで脊髄における *in vivo* の血管新生についての報告はみられていない。

② PDWHF による脊髄損傷修復の試みについて

脊髄損傷による神経機能障害を回復させるために重要な組織学的変化として、1) 神経組織の生存や修復に必要な栄養・成長因子を供給する局所血行^{14~16)}の再構築、2) 神経要素の再生、すなわち軸索の再成長、sprouting, シナプス形成^{14,17,18)}、再髄鞘化、軸索流の回復¹⁹⁾、成長因子レセプターの産生^{20,21)}、3) 制御された結合組織の形成^{22~28)}の3つが挙げられる。実際、脊髄においては損傷領域で局所の著しい血流低下^{29~34)}が報告されており、脊髄神経組織の生存や修復に必須である成長因子群の血流を介する供給が著しく妨げられると考えられる。今回 PDWHF を使用して脊髄機能修復の可能性について検討した理由は、この点に関して PDWHF の薬理的な血管新生と血管拡張作用が有効に働く可能性があるためであり、一部の治療施設で行われてきた損傷脊髄への大網移植法³⁵⁾と概念が部分的に共通している。

③ 今回使用した脊髄損傷モデルと PDWHF 供給方法について

今回の 22 G テフロン針の脊髄実質への刺入による脊髄損傷の作製は、以前よりわれわれが軽微な脊髄不全麻痺モデルとして使用してきたものであり、脊髄圧迫損傷モデルなどと比較して臨床的にも電気生理学的にも不全損傷モデルとしてより再現性があり、限局した領域に脊髄組織の破壊を起こすことができる。テフロン針自身が脊髄の局所的損傷を引き起こし、さらにコーティングされた PDWHF が損傷を受けた周囲脊髄組織に溶出するため、圧迫性損傷による境界不鮮明な不全麻痺モデルよりも PDWHF の効果を評価しやすかった。担体として使用した Hydron は、脊髄組織中へ成長因子を緩徐に 1 週間以上にわたって放出する特性⁵⁾を有しているため、半減期の早い成長因子を長期間にわたって供給する担体として利用した。しかしながら、実際の臨床面での PDWHF 供給を考えると、テフロン針刺入によって脊髄損傷を付加することは不利であり、他の供給法を考える必要がある。

今まで神経原性の成長因子やその他の誘導物質は、主に末梢神経系から抽出されて、主に *in vitro* で研究されてきた^{36,37)}。しかしながら、PDWHF は血行由来の成長因子であり、複雑な組織修復機転を演じる *in*

in vivo において、脊髄修復に一つの役割を演じていると思われ、神経原性の成長因子との重要な相互作用を有している可能性がある。今回、実験結果を計測するにあたり、実験者の主観を除去するために二重盲検法を採用した。動物数が少ないせいもあり、統計学的に有意差のあったのは病理組織学的な血管新生所見だけであつた。そのため今回の実験だけでは組織学的な血管新生と脊髄機能修復の関係を証明するには至っていないと考えている。しかしリハビリテーション医学にとって、また脊髄損傷患者にとって、損傷脊髄の機能回復は悲願である。今後さらに *in vivo* の脊髄における PDWHF の作用の検討を継続していく必要があると考えている。

本研究を行うにあたり、PDWHF を供給していただいたミネソタ大学外科学教室 Knighton 教授ならびに研究のご指導をいただいたミネソタ大学整形外科教室 Transfeldt 助教授に深謝いたします。

本研究の一部は、第 17 回アメリカ脊髄損傷学会(平成 3 年 4 月、シアトル)ならびに第 4 回リハビリテーション医学会専門医会カレントトピックス&レクチャー(平成 4 年 11 月、東京)にて報告した。

文 献

- 1) Doherty P, Dickson JG, Flanigan TP, Walsh FS: The effect of nerve growth factor and its antibodies on neurofilament protein expression in primary cultures of sensory and spinal neurons. *Neurosci Lett* **51**: 55-60, 1984.
- 2) Hulsebosch CE, Coggeshall RE, Perez-Polo JR: Effects of nerve growth factor and its antibodies on sprouting of sensory axons following spinal cord hemisection. *Brain Res* **323**: 1-10, 1984.
- 3) 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. *Neurosurg* **26**: 37-42, 1990.
- 4) Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, et al: Classification and treatment of chronic non-healing wounds; Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg* **204**: 322-329, 1986.
- 5) Langer R, Folkman J: Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* **263**: 797-800, 1976.
- 6) 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.
- 7) Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH: Role of platelets and fibrin in the healing sequence; An *in vivo* study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg* **196**: 379-387, 1982.
- 8) Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B: Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* **105**: 1039-1045, 1987.
- 9) Wiseman DM, Polverini PJ, Kamp DW, Leibovich SJ: Transforming growth factor-beta (TGFβ) is chemotactic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun* **157**: 793-800, 1988.
- 10) Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, et al: Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4584-4587, 1981.
- 11) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* **235**: 442-447, 1987.
- 12) Ross R, Glomset JA, Kariya B, Harker L: A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 1207-1210, 1974.
- 13) Puumala M, Anderson RE, Meyer FB: Intraventricular infusion of HBGF-2 promotes cerebral angiogenesis in wister rat. *Brain Res* **534**: 283-286, 1990.
- 14) Cotman CW, Nieto-Sampedro M, Harris EW: Synapse replacement in the nervous system of adult vertebrates. *Physiol Rev* **61**: 684-784, 1981.
- 15) Paulson OB, Newman EA: Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* **237**: 896-898, 1987.
- 16) Phelps CH: The development of gliovascular relationships in the rat spinal cord; An electron microscopic study. *Z Zellforsch* **128**: 555-563, 1972.
- 17) Murray M, Goldberger ME: Restitution of function and collateral sprouting in the cat spinal cord; The partially hemisected animal. *J Comp Neurol* **158**: 19-36, 1974.
- 18) Nelson SG, Collatos TC, Niechai A, Mendell LM: Immediate increase in Ia-Motoneuron synaptic transmission caudal to spinal cord transection. *J Neurophysiol* **42**: 655-664, 1979.
- 19) Tetzlaff W, Bisby MA, Kreutzberg GW: Cytoskeletal protein changes in the axotomized facial nucleus in the rat. *J Neurosci* **8**: 3181-3189, 1988.
- 20) Eagleson KL, Raju TR, Bennett MR: Motoneuron survival is induced by immature astrocytes from developing avian spinal cord. *Dev Brain Res* **17**: 95-104, 1985.
- 21) Lindsay RM: Adult rat brain astrocytes support survival of both NGF-dependent and NGF-insensitive neurons. *Nature (Lond.)* **282**: 80-82, 1979.
- 22) Barrett CP, Donald EJ, Guth L: Differences between adult and neonatal rats in their astroglial response to spinal injury. *Exp Neurol* **84**: 374

- 385, 1984.
- 23) Collins GH, West MR : Glial activity during axonal regrowth following cryogenic injury of rat spinal cord. *Brain Res Bull* **22** : 71-79, 1989.
 - 24) Hatten ME : Neuronal Regulation of astroglial morphology and proliferation *in vitro*. *J Cell Biol* **100** : 384-396, 1985.
 - 25) Kreutzberg GW, Graeber MB, Streit WJ : Neuron-glia relationship during regeneration of motoneurons. *Metabolic Brain Disease* **4** : 81-85, 1989.
 - 26) Krikorian JG, Guth L, Donati EJ : Origin of the connective tissue scar in the transected rat spinal cord. *Exp Neurol* **72** : 698-707, 1981.
 - 27) Nieto-Sampedro M, Soneto RP, de Vellis J, Cotman CW : The control of glial populations in brain ; Changes in astrocyte mitogenic and morphogenic factors in response to injury. *Brain Res* **343** : 320-328, 1985.
 - 28) Silver J, Lorenz SE, Wohlsten 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.
 - 29) Bingham WG, Goldman H, Friedman SJ, Murphy S, et al : Blood flow in normal and injured monkey spinal cord. *J Neurosurg* **43** : 162-171, 1975.
 - 30) 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.
 - 31) Griffiths IR, Trench IG, Crawford RA : Spinal cord blood flow and conduction during experimental compression in normotensive dogs. *J Neurosurg* **50** : 360, 1979.
 - 32) Kobrine AI, Doyle TF, Matius AN : Local spinal cord blood flow in experimental traumatic myelopathy. *J Neurosurg* **42** : 144-149, 1975.
 - 33) 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.
 - 34) Wagner F, et al : Vascular phenomena in the normal and traumatized spinal cord. *Anat Rec* **163** : 281, 1969.
 - 35) Goldsmith IIS, et al : Spinal cord vascularization by intact omentum. *Am J Surg* **129** : 262-265, 1975.
 - 36) Honneger P, Lenoir D : Nerve growth factor (NGF) stimulation of cholinergic telencephalic neurons in aggregating cell cultures. *Dev Brain Res* **3** : 229-238, 1982.
 - 37) Riopelle RJ, Boegman RJ, Cameron DA : Peripheral nerve contains heterogenous growth factors that support sensory neurons *in vivo*. *Neurosci Lett* **25** : 311-316, 1981.

*

*

**Experimental Study for Recovery of Injured Spinal Cord :
In Vivo Angiogenesis by Platelet Derived Wound Healing Formula (PDWHF)**

by

Yutaka HIRAIZUMI*, Shigeki NAGATA and Norio KAWAHARA****

from

*Department of Orthopaedic Surgery, Showa University

**Department of Orthopaedic Surgery, Kanazawa University

The main purpose of this study was to investigate the usefulness of platelet derived wound healing formula (PDWHF) in experimentally induced spinal cord injuries in cats. The injury model in 10 adult cats consisted of the placement of three 22 gauge teflon catheter sheaths into the spinal cord at the L2 level. Administration of PDWHF was achieved by coating these sheaths with PDWHF in Hydron. Three animals were used as controls. In the 7 remaining cats, administration of PDWHF was double blinded. Cats were sacrificed at 3 weeks after injury and injured spinal cord segments were excised for histologic evaluation. Electrophysiologic and clinical motor function were evaluated throughout the period of observation. Evoked potentials in both groups indicated incomplete spinal cord lesions due to insertion of the needles. There appeared to be improvement of the evoked response and clinical function as a result of administration of PDWHF at 3 weeks after injury, though there was no significance. The histologic findings in the PDWHF group showed significant new vessel formation as well as dilation around the injured site. This neovascularization, both qualitative and quantitative, was noted in the PDWHF group. This information with a limited injury and simple delivery system for growth factor would suggest that there is neovascularization occurring as a result of PDWHF administration.