
原 著

コラゲナーゼ脳内出血モデル

奈良県立医科大学第2外科学教室

米澤 泰司, 榊 寿右

岡波総合病院脳神経外科

橋本 宏之

COLLAGENASE INDUCED INTRACEREBRAL HEMORRHAGE IN RATS

TAIJI YONEZAWA and TOSHISUKE SAKAKI

Second Department of Surgery, Nara Medical University

HIROYUKI HASHIMOTO

Department of Neurosurgery, Okanami General Hospital

Received April 17, 2000

Abstract : In contrast to cerebral ischemia, there have been few experimental studies on intracerebral hemorrhage (ICH), although ICH is one of the most important cerebral vascular diseases, as much so as cerebral infarction. In 1990, Rosenberg and coworkers developed an elegant rat model in which intrastriatal injection of bacterial collagenase causes bleeding into the brain tissue. This model is considered to be a reproducible method to induce a hematoma and to regulate its size depending on the amount of collagenase injected. But this reproducibility has never been discussed ; we made a modified collagenase induced ICH model in order to verify the reliability of this model.

A total 56 of adult male rats were studied. 2 μ l artificial cerebrospinal fluid, which was adjusted to a pH 7.4 by buffer, containing 0.25 unit bacterial collagenase was stereotactically injected into the left caudoputamen in 28 rats. The remaining 28 rats were injected with 0.5 unit bacterial collagenase under the same procedure. Volumetry was performed at 2, 4, 12, 24, 48, 168, and 720 hours after injection to compare the difference between groups and observe the natural history of the hematoma.

At 4 hours after injection there was a marked hematoma within the caudoputamen which stopped developing in size by 24 hours. At 24 hours, 0.25 unit collagenase caused 60 μ l hematoma and 0.5 unit collagenase caused 100 μ l hematoma. At 1 week, the hematoma was resolving and reduced the size to 35% of the maximum value. At 1 month, the hematoma represented a slit-like appearance accompanying the atrophy of ipsilateral hemisphere. The hematoma of 0.5 unit collagenase was significantly larger than that of 0.25 unit collagenase for the entire experimental period. But there was no difference between the groups concerning the time course of hematoma.

We conclude that our modified collagenase induced ICH model is quite reproducible and

most suitable for the study of ICH. This model should therefore be used for further investigation of ICH. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 51, 139~144, 2000)

Key words : intracerebral hemorrhage, collagenase, rats

結 言

脳内出血は脳梗塞とならび主要な脳血管疾患の1つであるにもかかわらず、確立された脳内出血モデルがなく基礎的研究がほとんどなされていないのが現状である。しかし、1990年 Rosenberg らはコラゲナーゼをラットの大脳基底核に注入することで脳内出血を作製することに成功し新しい脳内出血モデルとして報告した¹⁾。このモデルは再現性が高いとされているが、実際にこれを検証した報告はなされていない。今回、我々は Rosenberg らの脳内出血モデルの再現性を検討するとともに、若干の修飾を加えた、我々独自のコラゲナーゼ脳内出血モデルを作製したのでここに報告する。

材 料 と 方 法

1) 実験 1

まず、Rosenberg らの脳内出血モデルの再現性を検討するため、以下の実験を行なった。

体重 350—400 g の S-D ラットをハロセン麻酔下(0.5 %ハロセン, 30 %酸素, 70 %笑気)に stereotactic frame (Model-SR-6, Narishige, Japan)に固定した。次に顕微鏡下にメスを用いて頭皮に矢状切開を加え骨膜下に剝離し、bregma の 3 mm 左側に電気ドリルにて径 1.5 mm の骨窓を設けて、硬膜表面から深さ 5 mm の caudoputamen に 26 ゲージ針を刺入した。そして 0.25 単位および 0.5 単位のコラゲナーゼ(Type VII Sigma Chemical Co., USA)を 2 μ l の生食に溶解し、これを微量注入器(Model IM-3, Narishige, Japan)を用いてそれぞれ 10 分かけて注入した。注入後すみやかに針を抜去して閉創し、ラットを frame から自由にして 24 時間後に断頭し-20℃のクライオスタット・マイクローム(Model 5030, Bright Instrument Co., England)にて脳を 20 μ m の連続凍結切片とし image analyzer(MCID, Imaging Research Inc., Canada)を用いて血腫容積を測定した。

2) 実験 2

HEPES buffer([2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid], Nakarai Tesque, Japan)にて pH 7.4 に調整した 2 μ l の人工髄液(NaCl : 124, KCl : 3.3, KH₂PO₄ : 125, MgSO₄ : 2.4, CaCl₂ : 2.0, NaHCO₃ : 25.7, glucose : 10, 単位

mmol/L)²⁾を用いて 0.25 単位および 0.5 単位の 2 種類の濃度のコラゲナーゼ緩衝溶液を作成し、前述と同一の手術手技にて脳内血腫を作製し 2, 4, 12, 24, 48, 1 週間、1 カ月後の血腫の大きさを検討した。

実験 1, 実験 2 ともに、麻酔中は血圧、血液ガス、側頭筋温をモニターし、血圧は 100—120 mmHg, 血液ガスは PO₂ : 120 mmHg 以上, PCO₂ : 37—42 mmHg, 側頭筋温を 37.0—37.5℃の間に維持した。実験 1 においては各濃度 5 匹のラットを計 10 匹使用し、実験 2 においては各濃度、各時間ともにそれぞれ 4 匹のラットを計 56 匹使用した。実験結果は実験 1 においては t 検定にて統計処理を行ない、実験 2 においては 2 群間の血腫量の比較には t 検定を、血腫量の経時的変化については scheffe の多重比較検定にて統計処理を行い、いずれも危険率 5 % 以下で有意差有りとした。

結 果

1) Rosenberg らの実験を再現したところ、コラゲナーゼの注入 24 時間後にはいずれの群においても、全脳内出血が生じていた。0.25 単位では 67 ± 5.9 μ l, 0.5 単位では 86 ± 6.1 μ l と 0.5 単位のコラゲナーゼを用いた群の方が大きな血腫が生じる傾向が得られた。しかしながら、有意差を認めるには至らず、0.25 単位で作製した血腫のほうが 0.5 単位のものよりも大きい例が見られた。コラゲナーゼを用いると確実に脳内出血が生じることが確認できたが、血腫の再現性に関しては不満の残る結果となった(Fig. 1)。

2) 我々は独自に Rosenberg らのモデルに手を加え、溶媒としてバッファー加工人工髄液を用いた。0.25 単位、0.5 単位いずれの群においてもコラゲナーゼ注入 2 時間後には既に血腫は形成されており、4 時間後までに急速に増大し血腫は 12—24 時間で完成した。24 時間後の血腫容積は 0.25 単位では 68.3 ± 9.7 μ l で、0.5 単位では 102.0 ± 6.5 μ l であった。その後、1 週間後には血腫は cyst を形成して吸収され、0.25 単位では 23.8 ± 3.6 μ l, 0.5 単位では 35.3 ± 4.3 μ l, といずれも 24 時間の 35 % の大きさとなった。1 カ月後には血腫はスリット状の瘢痕となりその大きさは 0.25 単位では 8.3 ± 1.3 μ l, 0.5 単位では 16.3 ± 4.1 μ l とそれぞれ 24 時間の 12 %, 16 % の大きさとなり、そして患側の大脳半球はいずれも萎縮を来

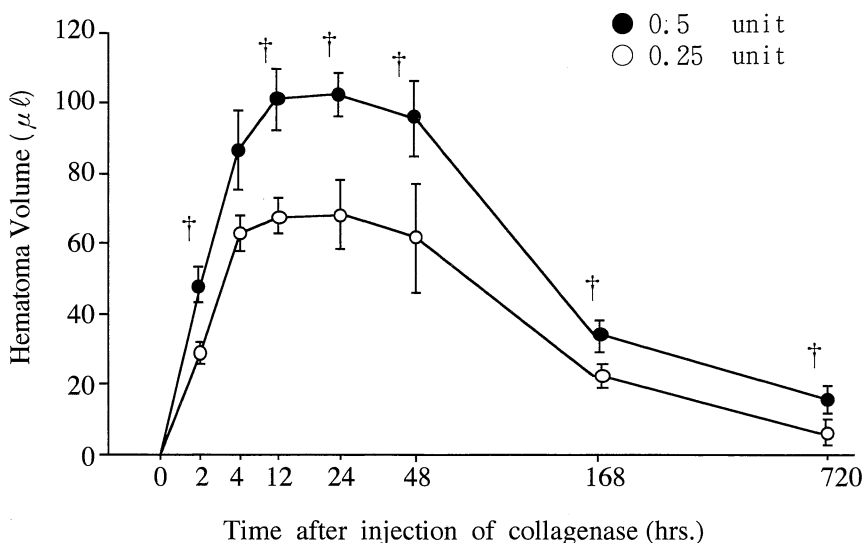


Fig. 3. Comparison of the volume of hematoma between the groups of 0.5 and 0.25 unit collagenase injected. Values are means \pm standard error of the means. †=significant difference between the groups ($P < 0.05$).

Table 1. Time course of hematoma induced by 0.5 and 0.25 unit collagenase

Collagenase	Hematoma volume (μ l)						
	2	4	12	24	48	168	720 (hrs.)
0.25 U	29.0 \pm 3.2	63.3 \pm 5.0†	68.0 \pm 4.9	63.0 \pm 15.4	68.3 \pm 9.7	23.8 \pm 3.6‡	8.3 \pm 1.3
0.5 U	47.8 \pm 4.9	86.3 \pm 11.2†	101.0 \pm 8.6	96.8 \pm 10.8	102.0 \pm 6.5	35.3 \pm 4.3‡	16.3 \pm 4.1

Values are means \pm standard error of the means. †=significant difference between 2 and 4 hours ($P < 0.05$); ‡=significant difference between 48 and 168 hours ($P < 0.05$).

らによりコラゲナーゼをラットの脳基底核に注入することで脳内血腫が作製できるという全く新しいモデルが報告され最近注目を集めている。

コラゲナーゼは *Clostridium* 属の細菌の体外毒素の1つでコラーゲンのみを特異的に加水分解する働きを有しており、一般的には培養細胞を用いた *in vitro* の実験を行う際の細胞分散酵素として用いられてきた¹⁰。人体においても白血球やある種の腫瘍細胞がコラゲナーゼを有していることが知られており¹¹、ヒト白血球をウサギの皮下に注入すると出血が生じたり¹²、腫瘍の血行性転移に関与していると考え¹³、コラゲナーゼは血管基底膜を破壊する働きを持つと報告されている。今回のモデルにおいてもコラゲナーゼが脳血管の血管基底膜を破壊させて出血が生じるものと推察される。

コラゲナーゼ脳内出血モデルは再現性が高くしかもコラゲナーゼの濃度に依存して血腫の大きさをコントロー

ルできると報告されているが^{11,14}、実際に文献を調べてみると、このモデルの再現性に関して経時的かつ詳細に検討した報告は見当たらなかった^{1,14-16}。コラゲナーゼ脳内出血モデルの再現性を検証するために我々はまず、Rosenberg のモデルを忠実に再現し0.25単位および0.5単位のコラゲナーゼを用いて脳内出血を作製した。確かにコラゲナーゼの濃度に比例した血腫が生じたが、その大きさには有意差が得られなかった。中には0.25単位の血腫の方が、0.5単位の血腫よりも大きいという例もあり、血腫の大きさをコントロールするという点では疑問の残る結果となった。そこで、我々はRosenbergのモデルに独自の工夫を加えることにした。Rosenbergらは溶媒として単に生理食塩水を用いていたが、我々はより生理的狀態に近い人工髄液をバッファーにてコラゲナーゼの最適 pH 7.4 に調整して用いることにした^{17,18}。人工髄液には Ca イオン, Mg イオンが含まれているが、こ

これらのイオンはコラゲナーゼの活性を維持する働きを有しており^{10,19)}, 結果的に我々のモデルの再現性を高めることに寄与したものと考えられる。さらに, 脳内出血が生じると血腫周辺部は酸性に傾くと考えられるが^{20,21)}, バッファーにて pH を調整したことにより酵素であるコラゲナーゼの活性を多少なりとも一定に保つように作用したものと考えられた。さらに, 当然のことながら手術中は血圧, 血液ガス, 脳温を厳しく一定に維持し, 特に, 脳温については酵素活性に影響を与える可能性が高いため慎重に 37—37.5°C に管理した。コラゲナーゼの特性を十分理解し, 一定の条件でしかも顕微鏡下に正確な定位的手術を施行した結果, 今回の実験で示したように我々独自のコラゲナーゼ脳内出血モデルでは急性期から慢性期にいたるまでいかなる時期においてもコラゲナーゼの濃度に依存して有意差のある大きさの血腫を作製することができた。しかもそれぞれの血腫の増大及び血腫の完成, その後の吸収過程に至る経時的変化は等しく, さらに臨床例との類似性を有しており, 今までの動物モデルにはない高い再現性を有することが証明された。

また, 人間の頭蓋内容積を約 2000 ml, ラットを約 2000 μ l と仮定すると 0.5 単位のコラゲナーゼで生じる 100 μ l の血腫および 0.25 単位のコラゲナーゼで生じる 60 μ l の血腫はそれぞれ臨床例での 100 ml, 60 ml に相当する。100 ml の血腫は致死的であり, ラットにおいても 100 μ l の血腫は caudoputamen をすべて被い尽くす大きさであり時には脳室内出血を来していたことより脳内出血モデルとしては 0.25 単位のコラゲナーゼが妥当と考えられる。一方, コラゲナーゼを用いて作製した脳内血腫は化学反応にもとづくもので非生理的要素があり脳内出血モデルとしては若干の問題点を有しているのも事実である。しかし, その再現性の高さと簡便さから現時点では脳内出血の研究には最も適しており, 今後はこのモデルを用いて脳内出血に関する基礎的研究を積み重ねることと治療に結びつく新たな知見を得たいと考えている。

文 献

- 1) **Rosenberg, G. A., Mun-Bryce, S., Wesley, M. and Kornfeld, M.** : Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* **21** : 801-807, 1990.
- 2) **Hiramatsu, K., Kassel, N. and Lee, K. S.** : Improved posthypoxic recovery of synaptic transmission in gerbil neocortical slices treated with a calpain inhibitor. *Stroke* **24** : 1725-1728, 1993.
- 3) **Bullock, R., Mendelow, A. D., Teasdale, G. M. and Graham, D. I.** : Intracranial haemorrhage induced at arterial pressure in the rat. part 1 : description of technique, ICP changes and neuropathological findings. *Neurol. Res.* **6** : 184-188, 1984.
- 4) **Mendelow, A. D., Bullock, R., Teasdale, G. M. and Graham, D. I.** : Intracranial haemorrhage induced at arterial pressure in the rat. part 2 : short term changes in local cerebral blood flow measured by autoradiography. *Neurol. Res.* **6** : 189-193, 1984.
- 5) **Nath, F. P., Kelly, P. T., Jenkins, A., Mendelow, A. D., Graham, D. I. and Teasdale, G. M.** : Effects of experimental intracerebral hemorrhage on blood flow, capillary permeability, and histochemistry. *J. Neurosurg.* **66** : 555-562, 1987.
- 6) **Ropper, A. H. and Zervas, N. T.** : Cerebral blood flow after experimental basal ganglia hemorrhage. *Ann. Neurol.* **11** : 266-271, 1982.
- 7) **Nehls, D. G., Mendelow, A. D., Graham, D. I., Sinar, E. J. and Teasdale, G. M.** : Experimental intracerebral hemorrhage : progression of hemodynamic change after production of a spontaneous mass lesion. *Neurosurgery* **23** : 439-444, 1988.
- 8) **Nehls, D. G., Mendelow, A. D., Graham, D. I. and Teasdale, G. M.** : Experimental intracerebral hemorrhage : early removal of a spontaneous mass lesion improves late outcome. *Neurosurgery* **27** : 674-682, 1990.
- 9) **Sinar, E. J., Mendelow, A. D., Graham, D. I. and Teasdale, G. M.** : Experimental intracerebral hemorrhage : effects of a temporary mass lesion. *J. Neurosurg.* **66** : 568-576, 1987.
- 10) **Bond, M. D. and Van Wart, H. E.** : Characterization of the individual collagenase from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* **23** : 3085-3091, 1984.
- 11) **Harris, E. D. and Krane, S. M.** : Collagenases (third of three parts). *N. Engl. J. Med.* **291** : 652-661, 1974.
- 12) **Janoff, A. and Zeligs, J. D.** : Vascular injury and lysis of basement membrane in vitro by neutral protease of human leukocytes. *Science*

- 161 : 702-704, 1968.
- 13) **Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M. and Shafie, S.** : Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284** : 67-68, 1980.
- 14) **Brown, M. S., Kornfeld, M., Mun-Bryce, S., Sibbitt, R. R. and Rosenberg, G. A.** : Comparison of magnetic resonance imaging and histology in collagenase-induced hemorrhage in the rat. *J. Neuroimag.* **5** : 23-33, 1995.
- 15) **Chesney, J. A., Kondoh, T., Conrad, J. A. and Low, W. C.** : Collagenase-induced intrasriatal hemorrhage in rats results in long-term locomotor deficits. *Stroke* **26** : 312-317, 1995.
- 16) **Del Bigio, M. R., Yan, H. J., Buist, R. and Peeling, J.** : Experimental intracerebral hemorrhage in rats : magnetic resonance imaging and histopathological correlates. *Stroke* **27** : 2312-2320, 1996.
- 17) **Kono, T.** : Purification and partial characterization of collagenolytic enzymes from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* **7** : 1106-1114, 1968.
- 18) **Van Wart, H. E. and Steinbrink, D. R.** : A Continuous Spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Anal. Biochem.* **113** : 356-365, 1981.
- 19) **Chakraborty, R. and Chandra, A. L.** : Purification and characterization of a streptomycete collagenase. *J. Appl. Bacteriol.* **61** : 331-337, 1986.
- 20) **Lassen, N. A.** : The luxury-perfusion syndrome and its possible relation to acute metabolic acidosis located within the brain. *Lancet* **2** : 1113-1115, 1966.
- 21) **Suzuki, R., Ohono, K., Matsushima, Y. and Inabe, Y.** : Serial changes in focal hyperemia associated with hypertensive putaminal hemorrhage. *Stroke* **19** : 322-325, 1988.