

〔原著〕

カラゲニン誘発性筋炎による筋損傷モデル作製の試み

肥田 朋子¹, 古田 大輔²
真境名 佑輝², 渡邊 晶規¹
伊東 佑太¹

要 旨

筋損傷など外観から損傷の程度が不明な場合には、過度な安静や不動状態をとる可能性がある。一方、我々は関節固定による不活動状態では組織損傷を伴わない疼痛が生じることを報告している。これらを合わせて考えると、損傷後の不必要な安静・固定も疼痛発生や損傷からの回復に影響を及ぼす可能性がある。これらについて調べるためには、筋損傷モデル動物を作製する必要がある。今回はカラゲニンによる筋炎が筋損傷モデルとして有用かどうか調べることにした。カラゲニンを腓腹筋に注入し、その24時間、72時間後に筋組織を取り出して横断切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン(H-E)染色ならびにマクロファージとジストロフィンを免疫組織染色した。その結果、細胞浸潤がごく一部で認められたが、細胞膜構造に損傷はほとんど認められず、筋損傷モデルとして用いることは難しいと判断した。今後は別の方法で筋損傷モデル作製を目指す必要がある。

キーワード：筋損傷，モデル，カラゲニン，筋炎

序文

超高齢社会を迎えている昨今、健康寿命の延伸は喫緊の課題であり、運動が推奨されている[8]。それに伴って、運動への取り組み機会は増えているが同時に運動中のけがも増加している。皮膚の擦過傷は視覚的に明らかであり応急的な対処が行われやすい。また、骨折の場合も

相当の痛みや動作困難により医療機関を受診する確率が高く、治療が施される。しかし、肉離れや打撲などによる筋挫傷(筋損傷)の場合は、筋組織にどの程度の損傷が生じているかは明らかではない。そのため、自己判断で運動時痛を避けるために安静や固定を行うことも多い。

一方、筋骨格系の慢性疼痛は活動性の低い事務職に多く認められ[13]、骨折のない状態で

1 名古屋学院大学 リハビリテーション学部
2 名古屋学院大学 リハビリテーション学部学生
Correspondence to: Tomoko Koeda
Email: tomokoed@ngu.ac.jp

Received 14 December, 2021
Revised 18 January, 2022
Accepted 21 January, 2022

ギプス固定したヒト[16]や動物実験[11]では、冷覚過敏や機械痛覚閾値の低下などが報告されている。そのため、筋損傷のために一時的な安静や固定を施すと損傷以外の原因によって疼痛が引き起こされる可能性も考えられる。しかし、筋損傷からの回復過程における安静や固定が、その回復や不必要な疼痛発生に影響するかどうかについては不明である。これを解決するために、まず筋損傷の動物モデルの作製に取り組むこととした。

筋損傷モデルとしては、古くからDrop-mass法が用いられている[4, 7, 18]。これはおもりを落下させて物理的に筋損傷を引き起こすものであるが、定量的な筋損傷を一定の部位に生じさせるためには精密な落下装置を作製する必要がある。別の方法としては、伸長性収縮運動による筋損傷モデルがある。電気刺激を筋支配神経に与えて筋収縮を引き起こしながら筋長を引き延ばすモデルでは筋損傷はほとんど認められない[15]が、筋に表面電極を用いた電気刺激を加えて筋収縮を引き起こしながら筋長を引き延ばす伸長性収縮運動を繰り返し行くと筋損傷が認められることが明らかとなっている[10]。ただこの伸長性収縮による筋損傷モデル作製時にも電気刺激装置や筋を伸長させる手動ないし電動機器が必要となる。これらに対し処置が安易なものとして、ブピバカイン[2]や蛇毒のカルディオトキシン[3]などの薬剤による筋損傷モデルが知られている。しかし、これらによる筋損傷は筋全体へ広く影響が及び、臨床的な筋損傷モデルとするには不向きである。そこで、今回は起炎剤として使用されている λ -カラゲニン(以下、カラゲニン)に注目した。カラゲニンは海洋植物から抽出される多糖類で、好中球の集積や生体内で産生される侵害物質により急性炎症と痛覚過敏が生じること

が報告されている[14]。そして種々の急性炎症モデル作製に多用されており、回復の早さから他の筋損傷薬剤よりも臨床に近い筋損傷モデルが作製できるのではないかと期待した。特にカラゲニンの筋内投与によって作製された筋炎モデルにおいても、筋機械痛覚閾値の低下と炎症細胞の筋細胞への浸潤が報告されている[5]。カラゲニン投与には特別な装置の必要がなく、投与量のコントロールが容易であり、再現性の良い筋損傷モデルとなる可能性が考えられる。そこで今回はカラゲニン投与による筋炎モデルを作製し、これが筋損傷モデルとして適用となるかどうかを検討した。

材料と方法

1) 対象

対象にはWistar系雄性ラット14匹を用いた。カラゲニンを投与し24時間後に腓腹筋を採取する24h群(3匹)と、投与72時間後に腓腹筋を採取する72h群(7匹)、カラゲニンにかわり生理食塩水(以下、生食)を投与するコントロール群(以下、CON群, 4匹)に無作為に分けた。対象は、全期間を通じ明暗12時間サイクルの飼育室で給水と餌は自由に摂取できる環境で飼育した。

2) カラゲニン投与

カラゲニン(λ -Carraginan, 22049, Sigma-Aldrich)は生食で8%溶液を作製し、イソフルラン吸入麻酔下で一側腓腹筋に50 μ L注入した。針刺し位置は踵から2.5 cm近位の腓腹筋筋腹とし、脛骨に針先が当たるのを確認後、針先を5 mm浅く戻した位置とした。CON群には、同様に麻酔下で同量の生食を一側腓腹筋に注入した。

3) 疼痛行動評価

疼痛行動は、皮膚機械痛覚閾値検査と筋機械痛覚閾値検査から評価した。いずれも、あらかじめラットに測定への慣らし練習を行ってから、カラゲニンを投与し、投与前、投与6時間後、24時間後、72時間後に評価した。CON群は72時間群と同様に生食投与72時間後まで評価した。皮膚機械痛覚閾値の測定には、Electronic von Frey (38450, Ugo Basile)、筋機械痛覚閾値測定にはRandall-Selitto式鎮痛効果測定装置 (37215, Ugo Basile) を用いた。皮膚機械痛覚閾値測定では、後肢のみが出るようにした網棚にラットを乗せ、足底部の遠位1/2から1/3の領域の皮膚を刺激し、逃避反応を示した刺激量を測定した。測定は1分以上間隔を開けて5回行い、最大・最小値を除いた3回の測定値を平均してその時間の皮膚機械痛覚閾値とした。筋機械痛覚閾値の測定方法は以前の報告 [12] に準じ、皮膚機械痛覚閾値と同じく3回の測定値の平均をその時間の筋機械痛覚閾値とした。各群の測定結果は平均値と標準偏差で示した。72h群とCON群の結果は解析ソフトR4.0.2 [17] を用いて分割プロット分析を行い、有意水準を5%とした。

4) 筋採取ならびに筋の組織学的解析

筋採取は、カラゲニン投与24時間後 (24h群) および72時間後 (72h群, CON群) に行った。ペントバルビタールナトリウム水溶液 (40 mg/kg, ソムノペンチル, 共立製薬) を腹腔内投与した深麻酔下で腓腹筋を採取した。採取した腓腹筋はコルク台にトラガントガム (A3227, Sigma-Aldrich) で接着させて垂直に立て、液体窒素中で冷却したイソペンタン (25211-00, 関東化学) 内で急速凍結させた。凍結筋は-20℃に設定したクライオスタット (CM1860,

Leica) で筋腹最大周径部辺りまで切り出した後10 μ m厚に筋細胞の長軸を横断する方向に薄切した。

薄切した凍結横断切片は、筋損傷と炎症状況を確認するため、ヘマトキシリン-エオシン染色 (以下H-E染色) を施した。具体的には、Mayerのヘマトキシリン水溶液 (HX314794, Merck) に5分間浸したのち、10分間流水ですすぎ、続いて1%エオシンY (230251, Sigma-Aldrich) 水溶液に4分間浸漬したのち流水に一度浸してからアルコールで脱水し、カバーガラスで封入した。封入後、顕微鏡 (BX51, Olympus) に付帯したカメラシステム (DP71, Olympus) で観察、撮影し、デジタルデータとしてPCに取り込んだ。

さらに、連続凍結切片を用いてマクロファージの抗体である抗CD-68抗体ならびに筋膜に存在するタンパク質の一つであるジストロフィンの抗体である抗ジストロフィン抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。その際、核染色には4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール (以下DAPI, D9564, Sigma-Aldrich) を用いた。具体的には、凍結切片を4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝生食 (以下PBS, pH7.4) 液で室温にて10分間固定処理し、PBSで洗浄後、3%ウシ血清アルブミン (以下BSA)/PBS液で4℃下にて一晩ブロッキング処理した。ブロッキング後、一次抗体であるマウス抗CD-68モノクローナル抗体 (1:200, ab201340, abcam) をのせ、37℃で60分間反応させた。1% BSA/PBS液で洗浄後、もう一つの一次抗体であるウサギ抗ジストロフィンポリクローナル抗体 (H300) (1:200, sc15376, Santa Cruz) をのせ、37℃で60分間反応させた。洗浄後、二次抗体であるアレクサフロー488® ヤギ抗マウスIgG抗体 (1:400, A11001,

Thermo Fisher) およびアレクサフロー 568® ヤギ抗ウサギIgG抗体 (1:400, A11011, Thermo Fisher), DAPI (1:10000) の混合1% BSA/PBS液をのせ、遮光して37°Cで45分間反応させた。洗浄、封入後、蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus) で各励起による画像を付帯したカメラシステムで観察、撮影し、デジタルデータとしてPCに取り込んだ。各励起による画像を画像ソフト photoshop (CS4, Adobe) にて統合 (以下, merge) させ、CD-68陽性かつDAPI染色による核が認められる細胞をマクロファージと判断し、その集積を確認した。またジストロフィン陽性である筋細胞膜の連続性から筋細胞膜の損傷具合を観察した。

なお、本研究は名古屋学院大学動物実験委員会の承認 (2019-002) を得て行った。

結果

1) 疼痛行動評価

図1はCON群と72h群におけるカラゲニン投与前から投与72時間後までの皮膚機械

痛覚閾値と筋機械痛覚閾値の変化を経時的に示している。72h群の皮膚機械痛覚閾値は34.6 ~ 38.5 gの範囲で、CON群のそれは35.0 ~ 40.9 gの範囲であり、2群に差はなくカラゲニン投与による影響は認められなかった (図1A)。一方、筋機械痛覚閾値の推移は、CON群と72h群の間で有意差を認め ($p < 0.01$)、交互作用も認めた ($p < 0.01$, 図1B)。後検定の結果、投与6時間後と72時間後の両群の値に有意差を認めた ($p < 0.01$)。72h群の投与6時間後は 78.1 ± 13.9 gであり投与前の 129.6 ± 24.3 gや72時間後の 102.3 ± 9.6 gより有意に低値を示した (順に $p < 0.01$, $p < 0.05$)。それに対しCON群の筋機械痛覚閾値は 122.5 ± 14.6 から 146.5 ± 20.9 gの間で推移し、経時的な変化を認めなかった。

なお24h群の皮膚機械痛覚閾値は34.3 ~ 39.1 gであり、筋機械痛覚閾値はカラゲニン投与前から順に 134.3 ± 4.0 g, 92.7 ± 17.6 g, 97.0 ± 12.1 gと72h群と同様の変化を示した。

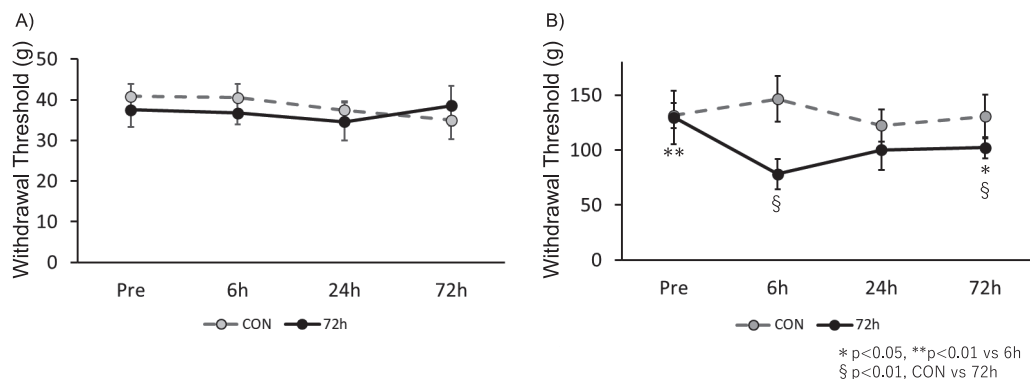


図1 カラゲニン投与による皮膚ならびに筋機械痛覚閾値の経時的変化

縦軸は皮膚 (A), 筋 (B) の機械痛覚閾値、横軸は時間。黒実線は72h群、グレー点線はCON群で各群の平均値と標準偏差を示している。72h群は投与6時間後と72時間後にCON群と有意差を認めた。また経時的にも有意差を認めた。

2) 組織学的解析

2)-1 H-E染色像

CON群, 24h群および72h群の典型的なH-E染色像を図2に示す。全群で刺入痕近くに損傷したと考えられる円形形状が崩れた筋細胞が確認できた。24h群および72h群では明らかな炎症細胞と考えられる小型の円形細胞の集積と筋細胞への浸潤が確認できた。特に24h群の1匹ではちょうど筋注した針の刺入ルートと思われる通常組織とは違った染色像を認め、その刺入口ならびに刺入後にカラゲニンを注入した領域に近い部分で多数の小型の円形細胞が見られ、貪食されている筋細胞も確認できた(図2B)。さらに刺入ルート沿線においても円形細胞が筋細胞へと浸潤し、筋細胞の形状が崩れ、エオシン染色性の劣る浸潤像が確認できた。24h群と72h群ともに小型の円形細胞は主に筋間結合組織に認められ、筋細胞の貪食像はそれに比べると軽微であった。筋間結合組織に認められる円形細胞は24時間群に比べ72h群に多く観察された。

2)-2 免疫組織化学的解析

CON群, 24h群および72h群の典型的なCD68とジストロフィンの免疫組織化学染色像を図3に示す。72h群では、筋間結合組織にCD68陽性細胞が多数認められたが、筋細胞形質膜の裏打ちタンパクであるジストロフィンの連続性は保たれていた。24h群では72h群に比べ筋間結合組織にCD68陽性細胞があまり認められなかったが、刺入部位周辺の筋細胞ではジストロフィンが不連続でCD68陽性細胞が筋細胞中に浸潤している像が確認できた。これらに比べるとCON群には、はっきりしたCD68陽性細胞は認められず、ジストロフィンの連続性も保たれていた。

考察

カラゲニンは急性炎症モデル動物作製に古くから用いられている薬物である [1]。カラゲニンを投与した72h群は筋機械痛覚閾値は投与6時間後から24時間後にかけて有意に低値を示

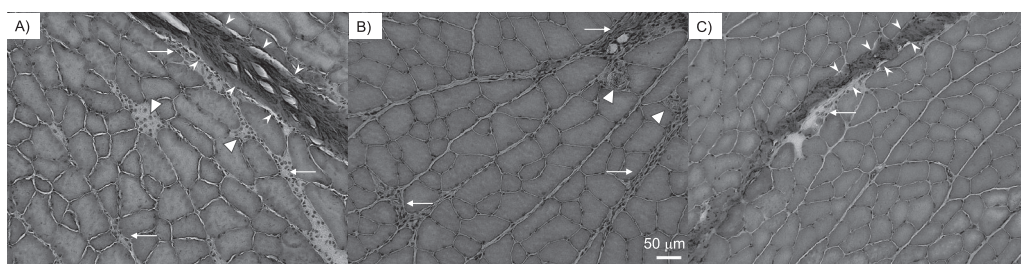


図2 カラゲニンを投与した腓腹筋のH-E染色像

A) 24h群；カラゲニン投与24時間後

右上部の高染色性の部位(➡)は刺入痕。付近に円形細胞の凝集を認める(→)。またそれらが浸潤した筋細胞(◄)も確認できる。

B) 72h群；カラゲニン投与72時間後

筋間結合組織に円形細胞の浸潤を認める(→)。またそれらが浸潤した筋細胞(➡)も確認できる。

C) コントロール群；生理食塩水投与

斜めに走る高染色性の部位(◄)は注射針の刺入痕。付近にわずかに円形細胞(→)が確認できるが全体に円形細胞はほとんど観察されない。

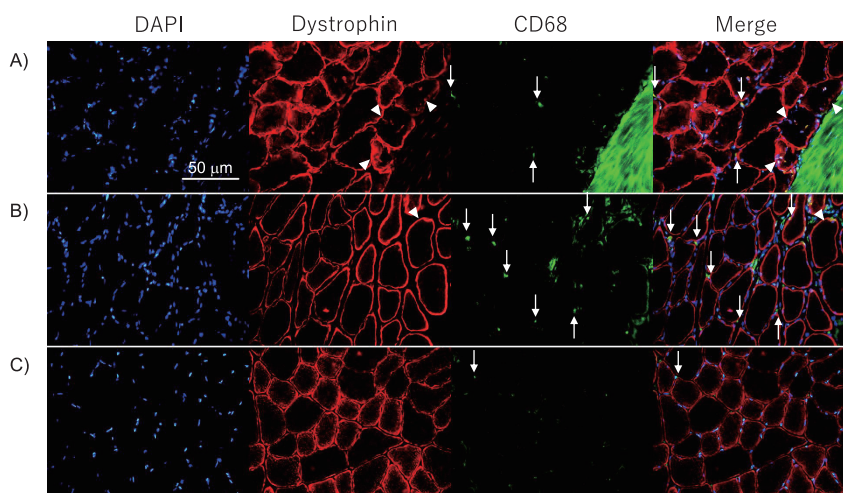


図3 カラゲニンを投与した腓腹筋の免疫組織化学染色像

A) ; 24h群, B) ; 72h群, C) ; CON群。左から順にDAPI, ジストロフィン, CD68, およびこれら3つの統合画像 (Merge) を示している。

24h群と72h群にはCD68陽性であるマクロファージ (→) が確認でき, ジストロフィンの欠損部のある貪食された筋細胞 (◄) が確認できたが多くはなかった。

したが, CON群はほぼ変化なく推移し, 72h群と有意差を認めた ($p < 0.05$)。一方, 皮膚機械痛覚閾値に対しては両群とも影響がなかった。皮膚と筋は刺激を受け取る受容器神経が違うため, 筋注したカラゲニンの影響は筋に局限して引き起こすことができたと考えられた。

H-E染色像からは特にカラゲニン注入領域周辺で円形細胞の集積が確認され, そこから離れた腓腹筋内では炎症像が全く認められない領域が広く確認できた。今回の刺入は一度腓腹筋を深層に向かって貫通し, さらに足底筋も貫通して脛骨に到達することを確認した後に針の深度を浅く戻してカラゲニンを投与した。腓腹筋のH-E染色像の薬剤残留物と考えられる像や円形細胞の集積位置から, カラゲニンは足底筋と腓腹筋の境界部分に近い領域に注入されていたことが確認できた。さらに腓腹筋浅層部においても円形細胞が多数確認できたが, これは針のルートをとって薬剤が拡散したことを示し

ていると考えられた。H-E染色による炎症状況と筋組織像の観察からは24h群, 72h群ともに刺入領域や注入領域周辺で炎症性の円形細胞の浸潤が明らかに認められた。カラゲニン投与24時間後の様子を示す24h群に比べ投与72時間後の様子を示す72h群では筋間結合組織にも炎症性の円形細胞浸潤がより多く認められた以外に大きな差はなかった。一方, CON群ではほとんど炎症細胞は確認されなかったことから, カラゲニンを投与した24h群や72h群ではカラゲニンによる炎症が生じたと考えられた。しかし, 今回の実験で用いたカラゲニン溶液のpHは測定していなかったため, 溶液そのものの水素イオン濃度が炎症に影響を及ぼしていた可能性は残されており, 本研究の限界点の一つである。

抗ジストロフィン抗体を用いて免疫組織化学染色を施したが, ジストロフィンは筋形質膜を内部から裏打ちするように分布する細胞骨格タ

ンパク質である [6]。このジストロフィンを染色すると筋細胞外周がリング状に染色される (以下, Dystrophin-ring)。伸長性筋収縮による筋損傷モデルでは, このリングの連続性が損なわれた筋に損傷が生じていることが, エバンスブルー・ダイを用いた検証で明らかになっている [9]。これを参考に本研究でも Dystrophin-ring の連続性が保たれていれば, 筋細胞に損傷が生じていないと判断した。72h 群では筋間結合組織にマクロファージが点在する状態を確認できたが, Dystrophin-ring の連続性は保たれており, 筋細胞はほとんど損傷していなかった。このような筋間結合組織でのマクロファージは 24h 群ではあまり見つからなかった。一方, 針の刺入部位周辺を観察すると Dystrophin-ring の連続性がとぎれ, CD68 陽性のマクロファージが筋細胞内に浸潤している像が確認できた。刺入部以外ではこのような像が認められていないことから, これはカラゲニンによって引き起こされる炎症による筋損傷というよりは針刺入により筋細胞が物理的に損傷された結果と考えられた。カラゲニンは起炎剤として以前から用いられているように炎症細胞は多数観察されたものの, ほとんどは注入ルートと注入部位に局限しており, 72 時間後においてもそこから少し離れた筋間結合組織にとどまっていた。そしてマクロファージによって浸潤され, 筋損傷が生じていると判断できた筋細胞は針刺入ルート近くに局限していた。たとえ針刺入をもう少し浅層にとどめたとしても, 針刺し刺激による筋損傷以外は生じにくいと考えられた。今回投与したカラゲニンは種々の急性炎症モデル作製に多用されており, 回復の早さから他の筋損傷薬剤よりも臨床に近い筋損傷モデルが作製できるのではないかと期待して実験を行った。しかし, カラゲニンの影響を受けた筋炎モデルは作製で

きたが, 目的としていた筋損傷モデルとして本モデルを適用することは難しいと結論した。今後は別の筋損傷モデルを検討し作製していきたい。

謝辞

本研究は名古屋学院大学研究助成金 2020 による成果である。

当時学生だった古田将己氏には主に行動評価をしてもらいました。ここに感謝の意を表します。

文献

- [1] Benitz KF, Hall LM. (1959) Local morphological response following a single subcutaneous injection of carrageenin in the rat. *Proceedings of the society for experimental biology and Medicine*. 102: 442-445
- [2] Benoit PW, Belt WD. (1970) Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine®). *J Anatomy* 107: 547-556
- [3] Couteaux R, Mira JC, d'Albis A (1988) Regeneration of muscles after cardiotoxin injury. I. Cytological aspects. *Biology of the Cell* 62: 171-182
- [4] Crisco JJ, Hentel KD, Jackson WO, Goehner K, Jokl P. (1996) Maximal contraction lessens impact response in a muscle contusion model. *J Biomechanics*. 29: 1291-1296
- [5] Fujii Y, Ozaki N, Taguchi T, Mizumura K, Furukawa K, Sugiura Y. (2008) TRP channels and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory

- muscle pain and delayed onset muscle soreness. *Pain*. 140: 292-304
- [6] Hoffman EP, Brown Jr RH, Kunkel LM. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 51(6): 919-928
- [7] Kami K, Masuhara M, Kashiba H, et al. (1993) Changes of vinculin and extracellular matrix components following blunt trauma to rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 25: 832-840
- [8] 厚生労働省. (2021) 健康日本21 (身体活動・運動) https://www.mhlw.go.jp/www1/topics/kenko21_11/b2f.html
- [9] Mori T, Agata N, Itoh Y, Miyazu-Inoue M, Sokabe M, Taguchi T, Kawakami K. (2014) Stretch speed-dependent myofiber damage and functional deficits in rat skeletal muscle induced by lengthening contraction. *Physiological Reports* 2(11): e12213.
- [10] Mori T, Agata N, Itoh Y, Inoue-Miyazu M, Mizumura K, Sokabe M, Taguchi T, Kawakami K. (2018) Post-injury stretch promotes recovery in a rat model of muscle damage induced by lengthening contractions. *J Physiological Sciences*. 68(4): 483-492
- [11] Nakagawa T, Hiraga S, Mizumura K, Hori K, Ozaki N, Koeda T. (2018) Topical thermal therapy with hot packs suppresses physical inactivity-induced mechanical hyperalgesia and up-regulation of NGF. *J Physiological Sciences*. 68(5): 629-637
- [12] 中村浩輔, 酒井成輝, 水野奈緒, 肥田朋子. (2015) 不動化に陥る前の運動が疼痛発生に及ぼす影響—ラットを用いたトレッドミル走での検討—. 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇. 3(2): 9-16
- [13] Nakamura M, Nishikawa Y, Ushida T, Toyama Y. (2011) Prevalence and characteristics of chronic musculoskeletal pain in Japan. *J Orthopaedic Science*. 16(4): 424-432
- [14] Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. (2003) Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain*. 104(3): 567-577
- [15] Taguchi T, Matsuda T, Tamura R, Sato J, Mizumura K. (2005) Muscular mechanical hyperalgesia revealed by behavioral pain test and c-Fos expression in the spinal dorsal horn after eccentric contraction in rats. *J Physiology*. 564: 259-268
- [16] Terkelsen AJ, Bach FW, Jensen TS. (2008) Experimental forearm immobilization in human induces cold and mechanical hyperalgesia. *Anesthesiology*. 109(2): 297-307
- [17] 対馬栄輝. (2021) 改変Rコマンダー. <http://personal.hs.hirosaki-u.ac.jp/~pteiki/>
- [18] Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. (2004) Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *International J Sports Medicine*. 25: 73-77

[Original Article]

A trial of experimental muscle damage modeling using a carrageenan-induced muscle inflammation in a rat

Tomoko Koeda¹, Daisuke Furuta²
Yuki Majikina², Masanori Watanabe¹
Yuta Itoh¹

Abstract

If the degree of damage is unknown, such as muscle injury, people may rest excessively or avoid moving the stressed joints. On the other hand, we have reported that inactivity due to joint fixation causes pain without tissue damage. Taken together, unnecessary rest and immobilization after injury may also affect pain sensation and the recovery process. To investigate whether inactivity after muscle damage affects inactivity-induced pain and the recovery process, a muscle damage model is necessary. In the present study, we investigated whether carrageenan-induced inflammation is a good model of muscle damage. We injected the inflammatory drug carrageenan into the gastrocnemius muscle. Twenty-four hours and 72 hours after injection, we removed the muscle tissue and stained a cross-section with Hematoxylin-Eosin. In another cross-section, we stained macrophages and Dystrophin using their immunohistochemical agents. As a result, we observed some infiltration of the inflammatory cells in small parts of the gastrocnemius muscle. However, no damaged cell membrane structure was visible. Therefore, we concluded that carrageenan-induced inflammation model could not be used as a muscle injury model. In the future, it is necessary to use other methods to create an alternative muscle damage model.

Keywords: muscle injury, model, carrageenan, muscle inflammation

¹ Faculty of Rehabilitation Sciences, Nagoya Gakuin University

² Undergraduate Student, Faculty of Rehabilitation Sciences, Nagoya Gakuin University