

〔原著〕

ドロップマス法による筋損傷モデル作製の 試みと対側肢への影響

肥田 朋子¹, 久貝 晃太^{1,2}, 矢野 晃成^{1,3}
吉満 楓馬^{1,4}, 渡邊 晶規¹, 伊東 佑太¹

要 旨

筋損傷後の回復に安静固定が及ぼす影響を調べる第一段階として、重錘を落下させて筋を損傷させるドロップマス法により、ラット腓腹筋損傷モデルの作製を試みた。また、重錘を落下させない対側がコントロールとなり得るかについても検討した。筋損傷後1, 3, 7, 14, 21日目に、筋組織を取り出して横断切片を作製し、組織学的ならびに免疫組織学的に解析した。また損傷前ならびに組織取り出し日に筋機械痛覚閾値を測定した。その結果、1日目には炎症性細胞の凝集が、3日目以降では再生筋細胞が観察され、筋損傷モデルが作製できたと判断した。筋損傷の影響による筋機械痛覚閾値の低下は、3日目に有意に両側で認められ ($p < 0.05$)、損傷を引き起こしていない対側にも影響が及んでいたが、筋の組織像は健常筋と同様であった。疼痛行動評価を行う研究では、反対側をコントロール肢として利用することは難しいことが明らかとなった。

キーワード：重錘落下, 筋損傷, 筋機械痛覚閾値, 反対側

序文

筋損傷は不慣れた運動時の特に伸張性収縮筋に生じやすく、またスポーツや転倒時などの打撲などによっても生じることがある。体表面からはその損傷の程度は不明で、自身の疼痛感覚が受診するかどうかの主な判断材料となるが、

一般的には骨折しているかどうかのみに注意が注がれ、筋損傷については全く意識されていない。その結果、筋損傷に対しての適切な処置が行われず関節可動域制限や歩行障害などの後遺症が残ることもある。また、その後の回復に固定を含めた安静や種々理学療法が及ぼす影響についても十分な検討が行われていない。そのた

1 名古屋学院大学 リハビリテーション学部

2 愛知医科大学 運動療育センター

3 名古屋掖済会病院 リハビリテーション科

4 小牧ようてい記念病院 リハビリテーション科

筆頭著者連絡先：052-678-4078（内5710）

Correspondence to: Tomoko Koeda

Email: tomokoed@ngu.ac.jp

Received 19 July, 2023

Revised 24 August, 2023

Accepted 1 September, 2023

め、筋損傷モデルを作製し、安静・固定あるいは理学療法効果について検討していくことは重要である。我々は、この課題を解決するために、以前カラゲニン炎症モデルが筋損傷モデルとなり得るか検討した [8]。カラゲニン炎症モデルは、起炎剤となるカラゲニンを筋注して作製するため、投与部位や投与量ならびに薬物濃度などがコントロールしやすく、さらに特別な装置は不要である。これらのことからカラゲニン炎症モデルにより筋損傷を引き起こすことが可能であれば、再現性の高い筋損傷モデルができると期待し検討した。その結果、単核細胞が筋細胞に浸潤し、さらにエオシン染色性の劣る貪食像が確認できた。しかし単核細胞は筋束周囲に多く認められ、貪食像は軽微であった。マクロファージのマーカーであるCD68と筋細胞形質膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンによる免疫組織化学染色像を観察したところ、カラゲニン投与時の刺入部周辺ではジストロフィンの不連続像が確認でき、CD68陽性細胞が筋細胞中に浸潤している像も確認できたが、刺入部以外では認められなかった。そのため、カラゲニン筋注による筋損傷モデルの作製は難しいと結論した [8]。

そこで、今回はドロップマス法を検討することとした。ドロップマス法は重錘を経皮的に落下させ筋損傷を引き起こす方法で、Kvistらの報告 [9] が最初である。ドロップマス法には大きく2つの方法があり、相対的に重い重錘を相対的に低いところから落下させる方法と、重錘の重さが軽く高いところから落下させる方法である。錘の重さは軽い方で171g、高さは100~110cm [4, 10, 16, 19] で、重い方は640~700gで、高さは25~30cmである [3, 5, 7]。接触面が平面の場合と半球の場合があるが、半球の方が損傷の程度はひどくなる [4,

17]。落下させる高さが高いと、それだけ操作領域が広がり、設置場所も制限される。さらに、落下位置にズレが生じやすいことが危惧される。本学でドロップマス法を実施するためには、上記条件を満たす装置の作製が必要である。そこで今回は錘の重さを重くして近距離から落下させる方法を採用し、ドロップマス装置を自作し、自作した装置で過去の報告同様に筋損傷を引き起こすことが可能かどうか調べた。

また、今後本モデルを使用して筋損傷にかかわる実験を行っていくうえで、使用個体数の削減を進める必要がある。そのため対側肢を対照群とすることが可能かどうか確認することも重要である。一側刺激に対する影響を調べる研究の中には、対側を対照群として用いた報告もある [14, 16] が、特に痛覚閾値に関しては、中枢を介して対側に影響を及ぼすことも報告されている [15, 18]。そのため、皮膚ならびに筋機械痛覚閾値を損傷側だけでなく非損傷側でも測定し、筋組織とともに本モデルで反対側が対照群となり得るか併せて検討した。

対象と方法

1) 対象

対象は7週齢の雄性Wistar系STラット10匹を用い、馴化期間を1週間設け、8週齢で左腓腹筋に重錘を落下させた。重錘落下から1, 3, 7, 14, 21日目に腓腹筋を採取する2匹を無作為に決定した。左腓腹筋を損傷群 (n=10, 以下損傷側) とし、反対側腓腹筋は対照群 (n=10, 以下非損傷側) とした。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可能な環境で飼育した。

本研究のすべての実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針」に従い、

名古屋学院大学動物実験委員会の審査，学長の承認を得て行った（2019-002）。

2) 方法

2)-1 ドロップマス装置

ドロップマス装置（図1）は，落下時の損傷部位へのズレを最小限にするために落下位置が最も低い，Kamiら [7] の方法を参考に，重さ640gの真鍮棒（直径0.9cm）をガイドチューブ（内径1cm）の中に通し，高さ25cmから落下させることができるように作製した。真鍮棒の先端は平面とした。損傷部位は踵から2.5cm近位の左腓腹筋筋腹とした。ラットをイソフルラン吸入麻酔下で剃毛処理を施し，腓腹筋を確認した後に損傷させる皮膚上にマーキングした。腹臥位，下肢外旋位をとらせた後，ガイドチューブを介して腓腹筋に衝撃が加わるように重錘を1回落下させ，筋損傷モデルを作製した。

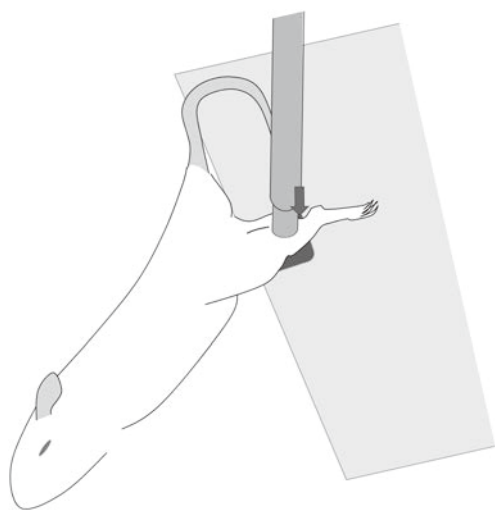


図1 ドロップマス装置のイメージ図

直径0.9cm，重さ640gの真鍮棒をガイド棒の中に通し，ガイド棒を枠に固定してドロップマス法筋損傷装置を作製した。麻酔下のラットを下肢外転・外旋位として腓腹筋筋腹外側部に真鍮棒を25cmの高さから落下させた。

2)-2 筋の組織学的解析

損傷1，3，7，14，21日目に2匹ずつ深麻酔下にて両側腓腹筋を採取した。採取した腓腹筋は先の報告 [8] に準じて急速凍結させ，後日薄切するまで-80℃で保存した。筋のスライス標本は，この凍結した腓腹筋ブロックをクリオスタット（CM1860，Leica）で筋腹部分まで切り出したのち，10μm厚に薄切し，ヘマトキシリン-エオシン（HE）染色ならびに抗CD68抗体，抗ジストロフィン抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。これらの染色方法は先の報告 [8] に準じた。作製した筋スライス標本は，デジタルカメラシステムで観察，撮影し，PCに取り込んだ。免疫組織化学染色を施した各励起による画像は画像ソフトPhotoshop®（CS4，Adobe）にて統合させ，CD68陽性かつ4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール（以下DAPI，D9564，Sigma-Aldrich）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。

2)-3 疼痛行動評価

疼痛行動は，自由行動時の歩行観察と皮膚ならびに筋機械痛覚閾値検査から評価した。自由行動時の観察は，午前10時から午後2時の間で実施し，それぞれ数分とし毛繕いのタイミングにかからない時点とした。機械痛覚閾値検査は，いずれも，馴化期間に測定への慣らし練習を行い，重錘を落下した1日後から各筋採取日まで，採取日に合わせて測定した。皮膚機械痛覚閾値の測定には，Electronic von Frey（38450，UgoBasile）を用いた。皮膚機械痛覚閾値の測定方法は，以前の報告 [8] に準じ，1分以上間隔をあけて5回測定し，最大・最小値を除いた3回の測定値を平均してその日の皮膚機械

疼痛閾値とした。筋機械痛覚閾値測定には、Randall-Selitto式鎮痛効果測定装置（37215, UgoBasile）を用いた。圧子は直径1cmのものをを用いたが、その他の筋機械痛覚閾値測定の方法は以前の報告〔13〕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日の筋機械痛覚閾値とした。各群の対象数は日を追うごとに減少するため、損傷7日目までデータ取得が可能であった6匹の測定結果を損傷前から損傷7日目までの痛覚閾値として平均値と標準偏差で示した。14ならびに21日目の測定結果は21日目に組織を取り出した2匹の平均値を参考値として示した。

2)-4 統計解析

損傷7日目までの機械痛覚閾値評価には分割プロット分散分析を、解析ソフトR2.8.1を用いて行った。有意水準は5%とした。

結果

1) 歩行観察

麻酔下で重錘を落下した後のラットは、覚醒とともに動きだすも荷重は非損傷側に偏倚していた。足関節の蹴りだし動作は両側に認められた。損傷3日目には、まだ非損傷側へ偏倚した状態での歩行が認められたものの、比較的活発に活動する様子も観察された。損傷5日目以降は荷重割合が左右同等となり損傷前と同様の活発な行動が観察された。

2) 組織学的解析

非損傷側では損傷1日目からすべての時期で特異的な炎症性細胞は認められなかった（図2A）。一方損傷側は損傷1日目に細胞内や細胞間に浸潤する円形細胞が多数観察され、筋損傷が観察された（図2B）。損傷3、7日目では、細胞内や細胞間に浸潤する円形細胞が腓腹筋のごく一部に観察され、また再生した筋細胞を

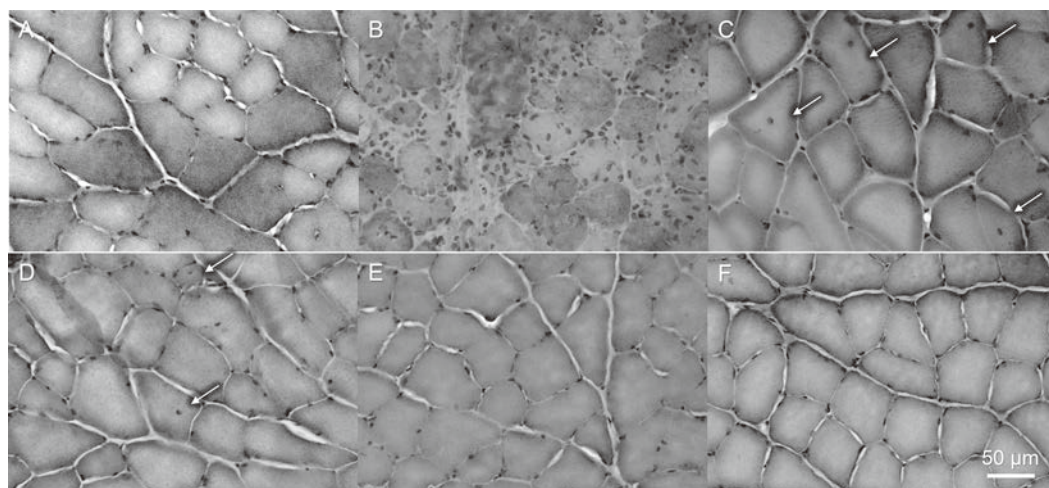


図2 筋損傷前後の腓腹筋横断像

A) 非損傷側（損傷7日目の像であるが1日目も同様であった）、B) 損傷1日目、C) 損傷3日目、D) 損傷7日目、E) 損傷14日目、F) 損傷21日目のヘマトキシリン-エオシン染色像。スケールは50 μm を示す。⇨は中心核線維を示す。損傷1日目には壊死筋細胞が確認され、損傷3、7日目には中心核線維が確認されたが、損傷14日以降は非損傷側や健常の筋組織と差を認めなかった。

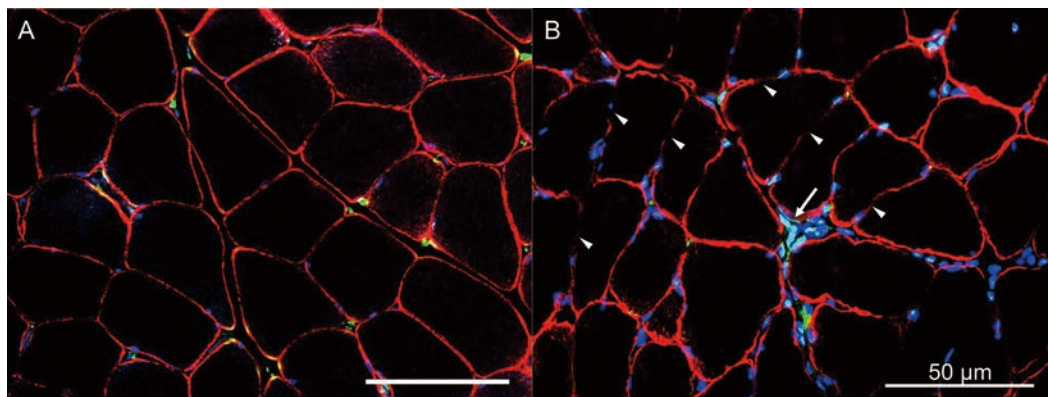


図3 腓腹筋の免疫染色画像

A) 非損傷側, B) 損傷1日目の腓腹筋。赤はジストロフィン, 緑がCD68, 青が核を染色しており3色を重ね合わせた画像を示している。B) ではCD68陽性で核が重なっている水色(⇐)や筋細胞以外の核が細胞間隙に確認でき, ジストロフィンの欠損部のある損傷した筋細胞(⇐)が確認できた。

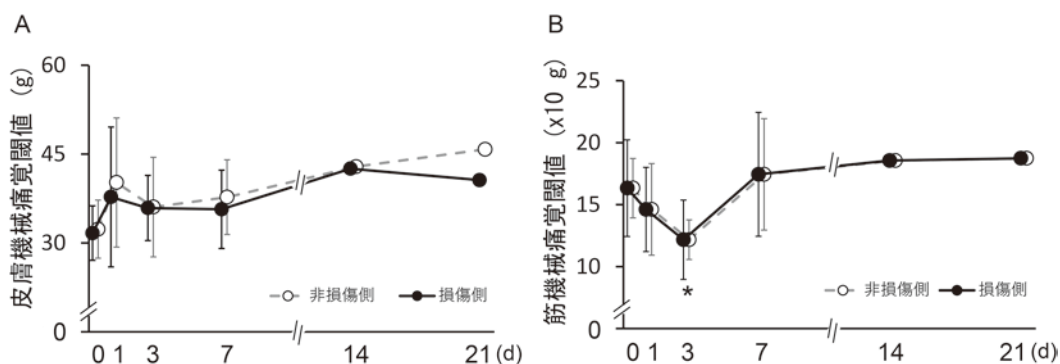


図4 皮膚ならびに筋機械痛覚閾値の経時的変化

縦軸は皮膚(A)ならびに筋(B)機械痛覚閾値を, 横軸は損傷日を0とした経過日数を示す。黒丸実線が損傷側, 白丸グレー点線が非損傷側。7日目までは $n=6$, 14日目以降は $n=2$ 。* $p < 0.05$ vs Day 0 (d)。

示す中心核線維が観察された(図2C, D)。損傷14, 21日目では健常筋細胞と同様で円形細胞の凝集や中心核線維も観察されなかった(図2E, F)が, 腓腹筋外側頭の外縁の一部には円形細胞が観察された。

損傷1日目の免疫組織化学染色像を図3Bに示す。非損傷側(図3A)では, 炎症症状を示すCD68陽性細胞はほとんど認められず, 細胞膜の連続性も保たれていた。一方, 損傷側では, 筋間結合組織にCD68陽性細胞や筋衛星細胞な

ど筋細胞以外の核と思われるDAPI染色像が多数認められた。さらに, 細胞膜が不明瞭になっている様子も観察された。

3) 疼痛行動評価

皮膚ならびに筋機械痛覚閾値の結果を図4に示す。皮膚機械痛覚閾値は35g前後で推移して両側間に差を認めず, 損傷側, 非損傷側ともに経時的な変化にも差を認めなかった。筋機械痛覚閾値も両側に差を認めなかったが, 損傷3日

目に両側ともに損傷前と比較して有意に低値を示した ($p<0.05$)。

考察

本研究では、ドロップマス装置を作製し、その装置を用いて筋損傷モデル作製を試みたところ、損傷1日目には壊死筋細胞が多数認められた。壊死筋細胞は筋細胞内に貪食細胞の浸潤が認められるもの、あるいは筋細胞の染色性が著しく低下し、細胞が消化されたと判断される線維との定義 [1] から断定した。Kamiら [7] は損傷2日目に観察していたが、図2Bと同様に壊死筋細胞が多数観察されており、本装置を用いた筋損傷モデルの作製に成功したと判断した。さらに、筋細胞が損傷すれば細胞膜の裏打ちタンパク質が非連続になること、炎症によりマクロファージが観察されることが想像されるため、これらを標識することでさらに筋損傷状況が明らかにできるのではないかと考え免疫組織化学染色を施した。図2BのようにHE染色像で著しく損傷した筋細胞の残骸が見られる場所で、免疫染色像では細胞膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンの連続性は完全に途切れており、HE染色像と同様の様子を観察することが難しかった。一方、図3のような免疫染色像は一部ジストロフィンの連続性が保たれていないものの、周囲には連続性が保たれた部分が残存しているような箇所であり、そこではマクロファージが多数細胞間隙に確認できた。HE染色像では筋細胞の断片の確認はしやすい反面、細胞浸潤する前の損傷した筋細胞やマクロファージの同定がしにくいこと、ジストロフィンとCD68の免疫染色像ではマクロファージの同定、細胞浸潤する前の段階の細胞膜損傷した筋細胞の同定がしやすい反面、損傷後期の

細胞膜損傷が著しい筋細胞を確認しにくいことを念頭に筋損傷の程度を観察することが大事であることが確認できた。

損傷3日目と7日目には筋再生像の特徴である中心核線維が観察され、14日目と21日目には中心核線維もなくなり健常筋と同程度の筋細胞サイズまで回復していた。この回復の過程は成書 [12] に示されている経過と比較して同等か少し早い進行であった。重錘落下部の筋は基底膜だけでなく細胞膜も損傷することで筋細胞内に Ca^{2+} の流入が一気に生じるため、タンパク質分解も進行が早かった可能性が考えられた。そのため、一般的な過程で観察される線維崩壊までの過程が短縮されるような形で進み、マクロファージの侵入などが速やかに開始され、筋衛星細胞の分裂と筋管細胞の融合も全体として早期から開始された結果、損傷3日目には再生筋細胞が確認されたのではないかと考える。また行動観察結果においても損傷3日目には損傷側の非荷重状態が残っているものの、活発な行動も散見され、5日目にはほとんど損傷前の様子と区別がつかない状況にまで荷重程度が回復していたことから損傷の回復が進んでいることがうかがえた。

さらに、同様のドロップマス法を用いた Sakumaら [16] や Kamiら [7] の報告に比べても、本研究の方が損傷からの回復が早期であった。Sakumaらは軽い重錘を1m落下させて筋損傷を起こしていたが、Kamiらの落下条件は今回の研究と同じであった。Sakumaらの別の報告 [19] から、Sakumaらが用いた重錘は接触面が球状であった可能性が高く、今回私たちが使用した真鍮棒の接触面は平らであったのに比べて損傷強度が強かった可能性が考えられた。Kamiら [7] は、損傷5日目に線維芽細胞様の細胞や新しい筋管細胞も観察されたと報

告しているが、本研究における3日目や7日目の組織像観察では比較的外側のごく限られた部位で貪食細胞の浸潤像が確認できたのみで、明らかな線維芽細胞は確認できなかった。損傷を与える重錘の質量や高さはKamiらと本研究は同様であったものの、何らかの条件の違いが損傷の程度に差を与えたのかもしれない。また今回損傷部として薄切した部位は、重錘が落下した腓腹筋筋腹中央部辺りであったが、平らな重錘の外周が接する、筋腹のより近位部の方がストレスを受けやすかった可能性があり、今後は起始部に近い重錘落下部と重錘の直接刺激が加わらない境界部の組織像を確認していく必要がある。一方Kamiの別の報告[6]では、損傷1週間後には再生筋細胞が認められており、本研究で7日目に中心核線維が観察された点は矛盾しなかった。

今回作製したドロップマス装置は落下距離を数センチから90cmまで調節可能であるため、落下高位を調節することで損傷の程度もコントロールできる可能性があり、今後の研究発展にも寄与する結果を得ることができた。一方、非損傷筋には、壊死筋細胞や再生筋細胞は確認できず、健常筋細胞と同様であった(図2A, 4A)。そのため筋組織の変化を確認する際には、非損傷側を対照群として調べることは可能であると判断した。

筋損傷状態では疼痛が生じていると想像されるものの、これまでのドロップマス法において痛覚閾値を測定した報告はなく、今回疼痛状況を初めて明らかにした。皮膚機械痛覚閾値は損傷後の経時的な変化に有意差を認めず、皮膚痛覚への影響はなかった。一方、筋機械痛覚閾値は、損傷3日目において損傷側だけでなく非損傷側も低値を示し、損傷前と比較して有意であった。筋損傷の影響は、筋機械痛覚閾値に影

響を与えたものの皮膚機械痛覚閾値には影響を与えなかったことから、ドロップマス法は経皮的なアプローチであるが筋損傷のみを引き起こすことが示され、この点からも筋損傷モデルは作製できたと判断できた。今回は筋取り出しの各タイミングで対象動物が2匹と限られており、7日目より後の痛覚閾値変化は21日目まで飼育可能であった2匹の参考値となってしまったが、7日目以降はほとんど変化を認めないことが想像できた。しかし筋機械痛覚閾値の測定は、損傷筋を圧迫する必要があったため、従来使用していた直径2.6mmより太い10mmの圧子を用いた。そのため、細かい閾値の変化がとられきれなかった可能性が残され、今後は圧子を従来の太さに変えて検討することも必要だと考える。

筋の損傷像は損傷側にのみ認められ、非損傷側には影響していなかったことから、非損傷側の痛覚閾値低下は、中枢神経系を介した反応であると考えられる。Radhakrishnanら[15]は、一側下肢に起炎剤を投与した際の疼痛評価を両側下肢と比較していたが、濃度が高い起炎剤を投与した際には反対側にも影響が及んでおり、本研究の結果と同様であった。損傷側の痛覚神経線維が興奮性を高めることで中枢神経系も感作され、神経性炎症によって対側の神経系も感作されたと考えられた[11]。一方で、ギプス固定後に筋機械痛覚閾値は低下することが知られている[13, 14]が、Nishigamiら[14]は一側上肢固定に対する疼痛系への影響をカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の発現している後根神経節細胞の大きさを両側比較して解析している。DRG細胞の個体差を考えると対側比較できる方がばらつきを最小限にすることが可能で、また実験動物数を削減できるメリットもある。ギプス固定では炎症を生じない

ことが明らかにされている [21] ことから、ギブス固定モデルの場合は、今回の筋損傷モデルや炎症モデルのような痛覚神経線維の中枢性感作が生じないために対側への影響はほとんどないのかもしれない。また、今回のような筋損傷においても後根神経節細胞における CGRP 発現を対側と比較している報告 [16] もあり、本モデルにおいても後根神経節細胞での解析に対側を利用することが可能かどうか改めて検討する必要がある。現時点では、少なくとも疼痛行動評価は対側を対照群として利用することが難しいことが明らかとなった。

筋損傷の組織的な変化では損傷1日目是最も壊死筋細胞の多い状況であり、3日目には再生筋細胞が認められるまでに回復していた。それに対し、筋機械痛覚閾値は3日目に最も低値を示した。この時間的なズレに対し2つの仮説を立てた。一つ目は、脊髄損傷時に認められる脊髄ショックのように、筋損傷により運動神経と感覚神経が共に一時的に機能喪失に近い状態に陥った結果、損傷1日目には逃避反射が引き起こされにくく、損傷3日目には神経の機能低下からの回復も認められたために逃避反射系も回復し、閾値低下が示されたのではないかと考えた。二つ目は、発痛増強物質や発痛物質が炎症性細胞の活性化により細胞から放出されたり産生されるため、作用するタイミングが少し遅れることに影響しているのではないかと考えた。これらについては今後検討する必要がある、課題である。

まとめ

重錘を落下させるドロップマス装置を作製し、ラット腓腹筋に筋損傷を作製した。損傷1日目には壊死筋細胞が多数観察され、筋損傷モ

デル作製は成功した。筋の組織学的な損傷から回復過程について検討するには非損傷側を対照群とすることが可能であるが、筋機械痛覚閾値のような疼痛行動評価には非損傷側は対照群とすることができず、別個体で対照群を用意する必要がある。

謝辞

本研究は名古屋学院大学研究助成（2020～2022年度）の成果である。なお、本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。

文献

- [1] 坂野裕洋, 沖田実, 鈴木重行, 井上貴行, 吉田奈央, 小林由依, 高浪美香, 林綾子 (2009) ギブス固定後の再荷重によるラットヒラメ筋の筋線維損傷に対する温熱負荷の影響. 理学療法学. 36(2): 33-40
- [2] Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J, et al. The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. Am J Sports Med 1999 Jan-Feb; 27 (1): 2-9
- [3] Chongsatientam A, Yimlamai T (2016) Therapeutic Pulsed Ultrasound Promotes Revascularization and Functional Recovery of Rat Skeletal Muscle after Contusion Injury. Ultrasound Med Biol 42(2): 2938-2949
- [4] Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM (1994) A muscle contusion injury model. Am J Sports Med 22: 702-710
- [5] Fisher BD, Baracos VE, Shnitka TK, Mendryk SW, Reid DC (1990) Ultrastructural events following acute muscle trauma. Med Sci Sports Exerc 22 (2): 185-93
- [6] 岩田晃, 上勝也 (2005) ラット骨格筋再生

- 過程における歩行動作と筋組織の特徴. *J Rehabil Health Sci* 3: 27-30
- [7] Kami K, Masuhara M, Kashiba H, Kashiba H, Noguchi K, Senba E (1993) Changes of vinculin and extracellular matrix components following blunt trauma to rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 25 (7): 832-840
- [8] 肥田朋子, 古田大輔, 真境名佑輝, 渡邊晶規, 伊東佑太 (2021) カラゲニン炎症による筋損傷モデル作製の試み. 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇. 11 (2): 1-11
- [9] Kvist H, Jarvinen M, Sorvari T (1974) Effect of mobilization and immobilization on the healing of contusion injury in muscle: a preliminary report of a histological study in rats. *Scand J Rehabil Med.* 6 (3): 134-140
- [10] Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST (2005) Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil* 86 (7): 1304-1310
- [11] Matsuda M, Huh Y, Ji RR (2019) Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. *J Anesth* 33(1): 131-139
- [12] 中野治郎 (2019) 筋損傷. 沖田実, 松原貴子, 森岡周編. 機能障害科学入門. 第1版. 九州神陵文庫, 福岡, pp 129-151
- [13] 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
- [14] Nishigami T, Osako Y, Tanaka K, Yuri K, Kawasaki M, Ikemoto T, McLaughlin M, Ishida K, Tani T, and Ushida T (2009) Changes in calcitonin gene-related peptide expression following joint immobilization in rats. *Neurosci Lett* 454: 97-100
- [15] Radhakrishnan R, Moore SA, and Sluka KA (2003) Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* 104: 567-577
- [16] Sakuma Y, Miyagi M, Inoue G, Ishikawa T, Kamada H, Yamauchi K, Orita S, Suzuki M, Oikawa Y, Inage K, Kubota G, Sainoh T, Sato J, Takahashi K, Ohtori S (2016) Muscle injury in rats induces upregulation of inflammatory cytokines in injured muscle and calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglia innervating the injured muscle. *Muscle Nerve* 54: 776-782
- [17] Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. (2008) The inflammatory response to skeletal muscle injury. *Sports Med* 38(11): 947-969
- [18] Sulka KA, Kalra A, Moore SA (2001) Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve* 24: 37-46
- [19] Suzuki M, Inage K, Sakuma Y, Orita S, Yamauchi K, Suzuki T, Suzuki M, Kubota G, Oikawa Y, Sainoh T, Sato J, Fujimoto K, Shiga Y, Abe K, Kanemoto H, Takahashi K, Ohtori S (2016) Effect of administration of antibodies against nerve growth factor in a rat model of muscle injury. *Injury Int J Care Injured* 47: 609-612
- [20] Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST (2004) Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med* 25: 73-77
- [21] 山本綾, 古島泰子, 長谷川多美子, 肥田朋子 (2009) ラット足関節不動化による活動制限は痛みを促進する. 理学療法学. 36 (6): 305-311

[Original Article]

A trial of experimental muscle damage modeling using the drop-mass method in rats, and confirmation of contralateral effects

Tomoko Koeda¹, Kota Kugai^{1,2}, Kousei Yano^{1,3}
Fuma Yoshimitsu^{1,4}, Masanori Watanabe¹, Yuta Itoh¹

Abstract

As a first step to investigate the effects of rest and immobilization on recovery after muscle injury, we attempted to create a rat gastrocnemius muscle injury model using the drop-mass method, in which the muscle is injured by dropping a weight. We also examined whether the contralateral side, on which no weight was dropped, could serve as a control. Muscle tissue was removed at 1, 3, 7, 14, and 21 days after injury, and transverse sections were prepared for histological and immunohistological analysis. The pressure stimulus-evoked withdrawal thresholds were measured before injury and on the day of tissue removal. The results showed that inflammatory cell aggregation was observed on Day 1, and regenerating muscle cells were observed on Day 3, indicating that a muscle injury model had been created. The contralateral muscle was almost as normal as healthy muscle. However, the muscle mechanical withdrawal threshold was significantly reduced bilaterally on Day 3 ($p < 0.05$), and injury was affected on the uninjured contralateral side. It was evident that it is difficult to use the contralateral side as a control limb in studies assessing pain behavior.

Keywords: drop-mass, muscle injury, muscular mechanical withdrawal threshold, contralateral limb

1 Nagoya Gakuin University

2 Aichi Medical University

3 Nagoya Ekisaikai Hospital

4 Komaki Yotei Memorial Hospital