

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11360

研究課題名（和文）超音波診断装置を用いた、筋損傷の診断及び治療の質的向上を目指した基礎研究。

研究課題名（英文）Basic research aiming to improve the diagnosis and treatment of skeletal muscle injury using ultrasound technique

研究代表者

金本 隆司（Kanamoto, Takashi）

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20512049

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋損傷のエコー画像と組織所見の関係や、エコーガイド下薬液注入の意義についての十分なエビデンスはない。本研究では、骨格筋損傷におけるエコーの活用を検討するため、エコーを併用したカルジオトキシン（CTX）誘発筋損傷モデル・筋断裂を伴う外傷性重症筋挫傷モデルを新規考案・作成した。CTX注入24時間後の筋損傷部位をエコーで定量評価し、組織染色による評価と比較したところ、強い相関が見られた。エコーガイド下に筋損傷部にFast Green溶液を注入すると、損傷部の筋繊維を中心に染色領域が観察された。エコーによる外傷性骨格筋損傷の定量評価の可能性とエコーガイド下溶液注入の意義を支持する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷による骨格筋損傷において、エコーによる診断や血腫吸引・薬液注入などのエコーガイド下介入が頻用される。しかし、その定量性や手技が治療成績に及ぼす影響に関する十分なエビデンスは無い。本研究の成果はエコーによる外傷性骨格筋損傷の定量評価の可能性とエコーガイド下溶液注入の意義を支持するものであり、今後の治療へのフィードバックが期待される。

研究成果の概要（英文）：There is insufficient evidence regarding the relationship between ultrasound imaging and tissue findings in skeletal muscle injury and the significance of ultrasound guided drug infusion. In this study, a new cardiotoxin (CTX)-induced muscle injury model and a traumatic severe muscle contusion model with muscle rupture were designed and created to investigate the usefulness of ultrasound in the treatment of skeletal muscle injury. 24 hours after CTX injection, quantitative assessment of the muscle injury lesion by ultrasound was compared with tissue staining. A strong correlation was observed between these two assessments. When Fast Green solution was injected into the injured area under ultrasound guidance, areas of staining were observed around the muscle fibers in the injured area. The results support the possibility of quantitative evaluation of traumatic skeletal muscle injury by ultrasound and the significance of ultrasound guided solution injection.

研究分野：スポーツ医学、リハビリテーション

キーワード：骨格筋損傷 超音波診断装置/エコー 動物モデル エコーガイド下インターベンション

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

肉離れや筋挫傷などの筋損傷は、運動器の外傷・オーバーユースで最も頻度の高い疾患であり、近年の検査機器（MRI や超音波診断装置/エコー）の進歩によって、筋損傷の診断精度は著しく向上した。その一方で、組織治癒の評価や治療に関しての解決すべき問題は多い。一般に骨格筋の自然治癒能は旺盛で、外科的治療を要する頻度は低い。しかし、疼痛遺残や筋出力低下、高い再損傷率など、復帰を目指す場合にアスリートやスポーツ愛好家の障害となるケースは少なくない。この問題点の根底には、損傷した筋組織の治癒に関する客観的評価法の欠落がある。エコーは、受傷現場での使用も含めて検査場所の制約が少なく、非侵襲の繰り返し検査が低コストで可能、MRI を上回る空間解像度を有するなどの利点を持ち、筋損傷の診断精度は極めて高い。これらの特性を考慮した場合、エコー所見から損傷部の治癒状態、とくに強度を判断するための知見の蓄積はすなわち、確実な治療方針決定のための重要なツールとなることが期待できる。

## 2. 研究の目的

筋損傷の治癒・再生の基礎研究によって、筋線維再生に重要な遺伝子群や中心となる細胞群などが明らかになってきた。一方、生物学的評価と生体力学的評価を関連付けた報告は稀である。本研究課題では、治癒過程にある損傷筋組織の組織像および遺伝子発現の変化が生体力学的・機能的変化を反映すると仮定して、①「筋組織の機能的治癒」を示す組織学像・遺伝子発現の同定、②エコー画像評価と組織学的/分子生物学的評価の比較検討、③治療介入法の評価へのエコーの応用、の3つを当初の目的とした。研究期間中に得られた結果などから目的の再設定を行い、筋損傷の診断と治療においてのエコーの有用性を上げることを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、動物モデルを対象に、骨格筋損傷の受傷から治癒における組織学的評価と分子生物学的評価を行い、エコー画像評価と比較することを主たる方法とした。

○3種の筋損傷モデルの作成：临床上、肉離れ及び筋挫傷を生じる大腿四頭筋をターゲットとして研究を開始した。遺伝子発現解析や組織評価の再現性を考慮して、過去に報告も多い前脛骨筋を対象とするモデルを選択するに至った。CTX 注入モデル；エコーガイド下に確認しながら、目的とする筋組織への確実な薬液注入を非侵襲的に行う手技で作成したが、エコーの経験の少ない複数の研究者によっても再現性高く作成が可能であった。筋挫傷モデル（contusion）；オリジナルのドロップマス法を参考に、体表に接触した金属板に重量の大きな重錘を低い高さから落下させることによって、安定した損傷が作成できるような工夫を行った。損傷後の前脛骨筋をエコーで確認し、筋断裂を示唆する hypoechoic lesion が確認できた個体を抽出し、その後の評価に用いた。筋裂傷モデル（laceration）；過去の報告を参考に、前脛骨筋の正中より少し頭側に筋肉全体の幅 75%・深さ 50%の切創を作成した後、筋膜・皮膚を縫合した。

○組織学的評価：イソペンタン・液体窒素で凍結した組織から作成した短軸切片（厚さ 10  $\mu$ m）を用いた。HE 染色によって筋損傷部を含めた形態評価を行い、筋損傷部が最大となる切片を用いて筋損傷部の面積を計測した（lenaraf220b）。筋繊維を Acti-stain555、マクロファージを抗 F4/80 抗体、筋周膜を抗 collagen1 抗体、をそれぞれ用いて染色した。

○エコー評価：超音波診断装置（SONIMAGE HS1 コニカミノルタ社）のリニアプローブ HL18-4 を用いた。CTX 注入後の筋損傷評価には、前脛骨筋全長を評価して、hypoechoic lesion が最大となる短軸画像を取得して、面積定量を行った。

○エコーガイド下溶液/細胞注入：50-100  $\mu$ l の CTX (10  $\mu$ M) を注入して作成した筋損傷部をエコーで確認し、同部にマイクロシリンジを用いて  $1 \times 10^6$  個の GFP (+) 細胞を懸濁した 1% ファストグリーン 100  $\mu$ l を注入した。

○遺伝子発現解析：前脛骨筋正中 2/3 から抽出した tRNA を用いて、qPCR 及び RNA-seq を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

## 4. 研究成果

### 成果① 再現性の担保された骨格筋損傷モデル 2 種の新規考案と作成

筋損傷は高頻度外傷であり、おおくは保存的治療により対応される。しかし、機能低下の残存や高頻度の再発などの問題点があり、スポーツ活動のみならず、職種によっては ADL 上の支障が

問題となる場合もしばしばである。その改善を目指した研究を行う場合、動物疾患モデルが非常に重要となる。本研究では、エコーを活用することによって、薬剤誘導性筋損傷モデル（CTX モデル）と筋膜損傷を伴う重症骨格筋挫傷モデルを考案し、作成した。

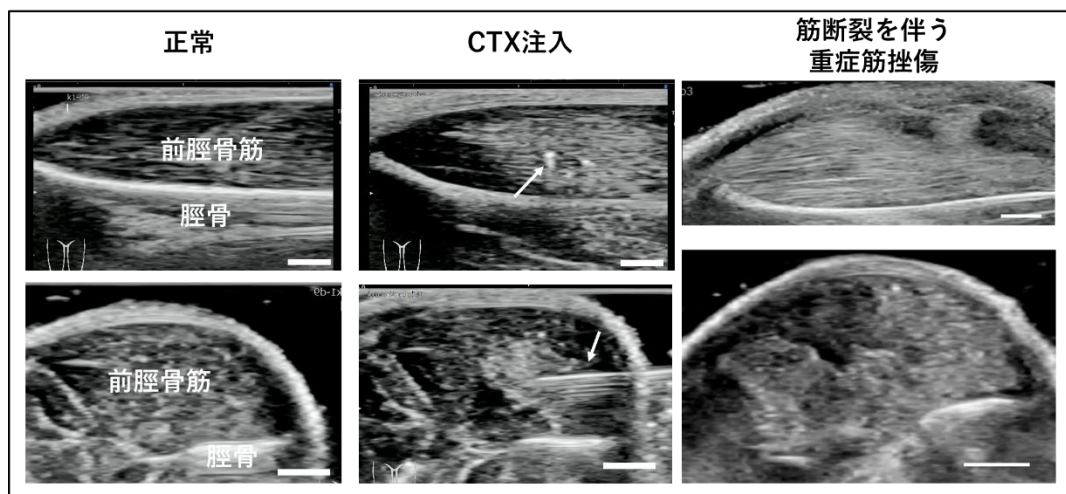


図 1. ラット前脛骨筋の長軸（上段）と短軸（下段）エコー像

CTX 注入時のエコー像では、注入に用いた注射針が hyperechoic 像として確認される。先端を中心、筋組織に浸潤する薬液が周囲組織より高エコー像として観察された。筋挫傷モデルでは、筋膜の delle と同深部の筋組織内に低エコー像が観察される。Sacrifice 時に確認した筋断裂の存在とは高い一致率を示した。

## 成果② エコーによる損傷骨格筋組織の定量評価とその質的・量的検討

エコーは臨床において筋損傷の診断に頻用され、設備と技術が伴う場面では第一選択と言える画像モダリティである。しかし、描出されるエコー画像と実際の損傷筋組織との対応を示した報告は限定的であり、この事実が治癒過程にある筋組織の評価基準の欠落の原因と考えられる。本研究で標準化した CTX 誘導性筋損傷を対象に、エコー画像と組織学的所見の比較を行った。

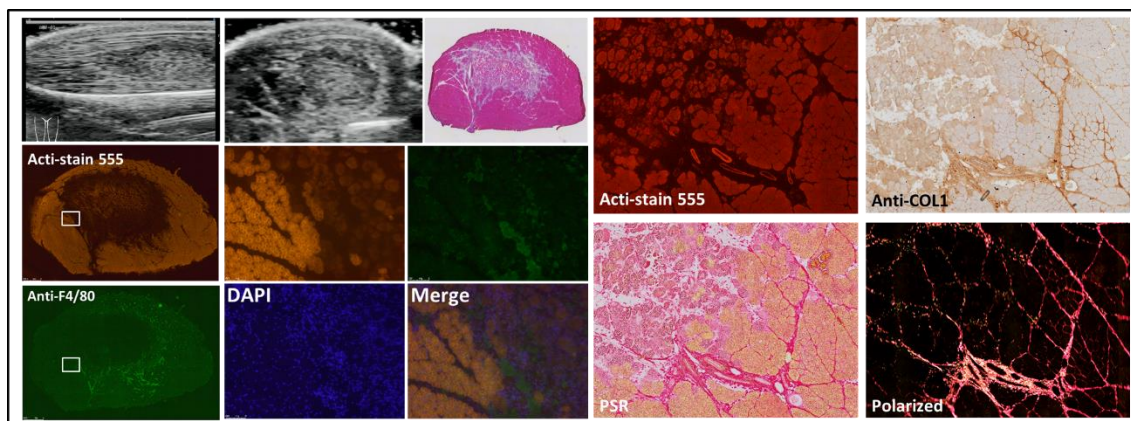


図 2. CTX 誘導性筋損傷のエコー画像と組織学的所見の比較

CTX 注入薬液注入 24 時間後のエコーでは、健全な筋線維の高エコーパターンが消失した低エコー領域が、短軸像・長軸像で観察された。エコー観察後に作成したサンプルの HE 染色では、エオジンの染色性が低下した損傷部が見られ、同領域には phalloidin に染色される筋

線維は見られず、領域の一部にはマクロファージマーカーの発現を認めた。損傷領域の Collagen1 シグナルは低下しており、筋内膜・筋周膜への PSR 染色像は断片化されていた。

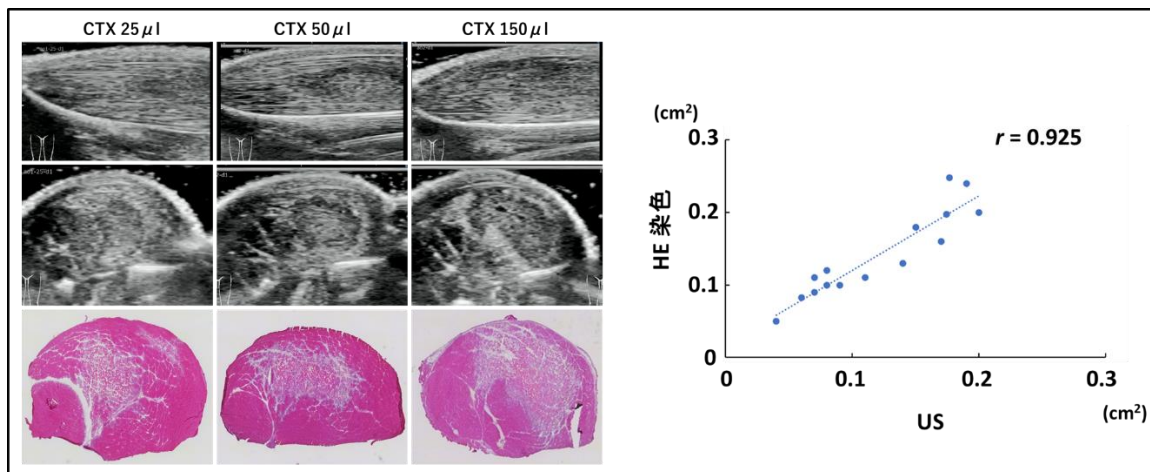


図 3. のエコー画像と HE 染色所見における CTX 誘導性筋損傷の定量評価

損傷領域が最大となる横断面において、それぞれエコー画像と HE 染色像で計測した損傷領域面積は、強い相関を示した ( $r = 0.925$ ;  $p < 0.0001$ ) (Fig. 3)。また、CTX 注入量と筋損傷領域面積にも相関がみられた ( $r = 0.796$ ;  $p = 0.0004$ )。

### 成果③ エコーガイド下染色液注入による骨格筋損傷への介入手技の検討

区域麻酔や膿瘍・血腫吸引などに代表されるようにエコーガイド下インターベンションは、様々な場面で必須の手技となっている。筋ジストロフィーなどの筋疾患への薬剤投与や細胞移植は多くの臨床研究が行われており、今後の発展が期待されている。外傷性筋損傷を対象とした報告は渉猟する範囲では存在せず、筋損傷治療におけるエコーの活用のために必要な検討と判断した。CTX 誘導性筋損傷部へのエコーガイド下に染色液注入を行い、その分布を検討した。

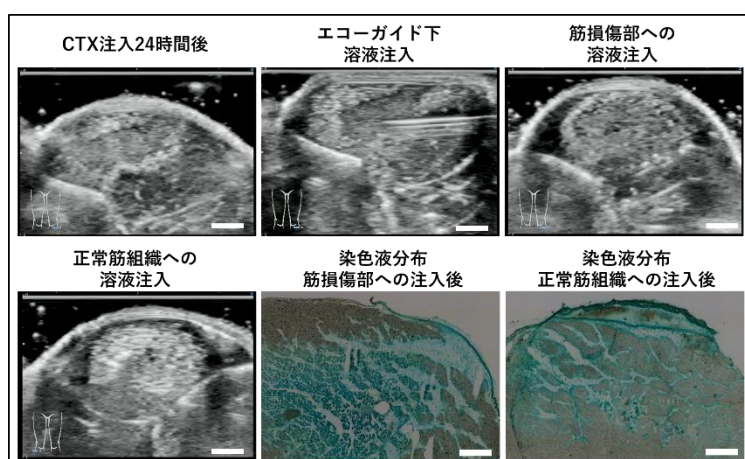


図 4. CTX 誘導性筋損傷部へのエコーガイド下溶液注入

CTX 注入 24 時間後の筋損傷部に、エコーガイド下にファストグリーン溶液を注入した。注入時には筋組織断面の増大が確認されたが、病巣部のエコー輝度の目立った変化は認めなかつ



た。健常筋組織への細胞懸濁溶液の注入でも同様に筋組織断面の増大は確認されたが、病巣部への注入とは異なり、注入部が高エコー像をしめした。注入直後の組織学的評価において、CTX 注入を受けた筋では筋損傷部の筋線維を中心に広い範囲でファストグリーン染色が観察された一方で、正常筋では筋周膜に一致したファストグリーン染色が観察され、染色された筋線維は筋周膜に接する一部にのみ観察された。

#### 成果④ 骨格筋損傷の遷延治癒に関与するメカニズムの探索

多くの骨格筋損傷は保存療法で対応され、一定の期間で患者は日常生活や競技に復帰する。しかし、機能障害の残存や再損傷がしばしば問題となり、損傷筋組織の治癒不全がその根源的な問題と認識されている。本研究で作成した筋断裂を伴う重症筋挫傷モデルと鋭的な切創による laceration モデルの損傷・治癒過程の組織学的/遺伝子発現解析評価をおこなうことで、骨格筋損傷の遷延治癒に関与する分子メカニズムの探索を目指した。新規に考案・作成したモデルがそれぞれ特徴的な遺伝子発現変動を示すことが確認され、モデル間で異なる発現変動を示す遺伝子クラスターの同定は、組織解析や行動解析などに立脚した表現型を評価する基礎データとなることが期待される。

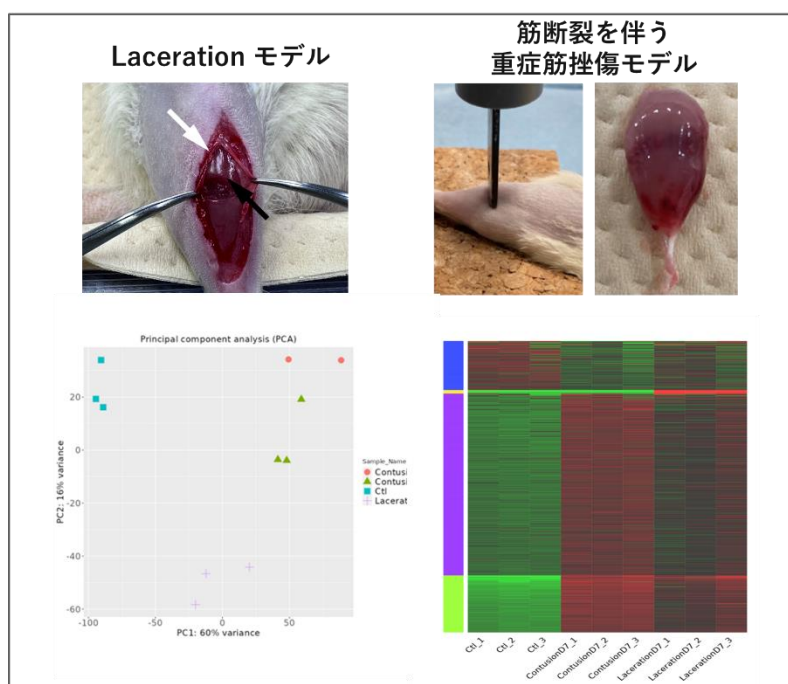


図 5. Laceration モデルと重症筋挫傷モデルの治癒過程の比較

RNA-seq による網羅的遺伝子解析の結果、損傷モデルの遺伝子変化にそれぞれ特徴があることが示された。また、モデル間で異なる発現変動を示す遺伝子クラスターが同定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本 清満 , 金本 隆司 , 佐藤 世羅 , 宮崎 亮 , 中田 研
2. 発表標題 筋損傷のエコー画像は, 治癒過程の筋組織像を反映する エコーガイド下薬剤注入による骨格筋損傷モデルの活用
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎 亮 , 金本 隆司 , 施 ブン , 大谷 俊哉 , 中田 研
2. 発表標題 筋挫傷では, 受傷初期の強い炎症反応と筋基底膜の破壊が起こり, 筋線維再生の遅延および筋出力低下を生じる
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中田 研  (Nakata Ken)  (00283747)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授    (14401)	
研究分担者	前 達雄  (Mae Tatsuo)  (10569734)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教授    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------