Local Irritation of Isotonic Acetic Acid Solutions of the Rabbit *M. vastus lateralis* and Confirmation of the Injected Sites

Toshiaki OCHIAI, Kiyoshi MATSUMOTO, Kiyoshi SEKITA,
Osayuki UCHIDA, Yasushi KAWASAKI
and Tsuyoshi FURUYA

*Division of Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute
of Hygienic Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan*

(Received 7 December 1984 / Accepted 5 July 1985)

One ml of 0.106%, 0.425% or 1.7% acetic acid (AA) solution, isotonic to physiological saline solution, was injected into the *M. vastus lateralis* of male Japanese white rabbits. Two, 7, 14 and 21 days after the injections, the rabbits were autopsied, and the removed muscles were observed macroscopically. After fixation with 10% neutral formalin, they were examined histologically. Hemorrhage and white degeneration of the muscles were grossly observed in 0.106%, 0.425% and 1.7% AA at 2 days. These lesions disappeared at 7 days and thereafter in 0.106% AA, and at 14 days and thereafter, except for one animal, in 0.425% AA. In 1.7% AA, these lesions were observed until 21 days, but gross hemorrhage began to recover at 21 days. The size of the lesion, which was expressed as a product of the major axis (mm) and minor axis (mm) of the lesion, showed reduction over time, especially in 1.7% AA. Histologically, swelling, necrosis and calcification of the muscle fibers and cell infiltration, hemorrhage and dilatation in the interstitium were observed after the injections of 0.106%, 0.425%, and 1.7% AA. At 7, 14 and 21 days, regeneration of the muscle fiber and fibrosis in the interstitium were observed. The injected sites were examined by injecting a chip of test-tube brush as a marker. In 20 (83%) of 24 cases, it was ascertained that the markers were injected into the *M. vastus lateralis*. The markers were found in the *M. vastus intermedius* in 3 out of 4 other cases and in the intermuscular tissue between the *M. vastus lateralis* and *M. tensor fasciae latae* in one case.

等張酢酸溶液のウサギ外側広筋 (*M. vastus lateralis*) に対する 局所障害性ならびにその投与部位の確認

落合敏秋・松本清司・関田清司
内田雄幸・川崎靖・降矢強

国立衛生試験所安全性生物試験研究センター毒性部

筋肉注射に起因すると見られた大腿四頭筋拘縮症の発生 [1] が契機となり、1979年に厚生省より「注射剤の局

所障害性に関する試験法」(案)(以下試験法と略す)が公表された[11]。試験法は動物試験法、溶血性試験法および細胞毒性試験法の3部より構成されている。動物試験法は、ウサギの外側広筋または仙棘筋に被検注射剤ならびに対照液である生理食塩液、0.75%酢酸および6%酢酸を注射し、注射後2日目、7日目に筋肉を摘出し注射部位の病変の程度を各対照液のそれと比較して、被検注射剤の局所障害性を4段階にグレード付けするものである。

しかしこの方法で各注射剤のグレード付けを行ったところ、各研究所間でそのグレードに大きな違いの生じることが認められた[7]。一方、赤石ら[1]は注射剤の浸透圧は生体のそれに近いことが望ましいと述べている。しかしこの試験法では対照液の浸透圧について触れられていない。そこで、浸透圧を生理食塩液を等張にした酢酸溶液をウサギの外側広筋に注射してその局所障害性を調べたので報告する。

なお、著者らは外側広筋への注射に際し、布巻き法[6]を用いてウサギを保定している。この方法で外側広筋に注射できるか否かを調べるために、注射部位の確認に関する実験を行った。

材料および方法

試料：生理食塩液(290mOsm/kg)と等張な0.106%, 0.425%および1.7%酢酸を用いた。試薬特級酢酸(和光純薬工業)を局方注射用蒸留水(山口製薬)で生理食塩液と等張となるように1.7%に希釈し、さらに局方注射用生理食塩液(山口製薬)で希釈することにより生理食塩液と等張な所定の濃度の酢酸溶液を作成した。これらの溶液の浸透圧をAdvanced D-II型浸透圧計(Advanced instruments, 米国)で測定したところ、0.106%; 296mOsm/kg, 0.425%; 298mOsm/kg, 1.7%; 301mOsm/kgであった。

動物：雄日本白色種ウサギ(体重2.5~3.5kg, 船橋農場産)を用いた。

ウサギを1群12匹からなる3群に分け、それぞれ0.106%酢酸群, 0.425%酢酸群および1.7%酢酸群とした。

注射：注射には1ml ディスポーザブル注射器および23ゲージディスポーザブル注射針(テルモ)を用いた。注射針の刺入の深さを一定にするために注射針の先端から1cmのところにストッパーをつけた(Fig. 1)。

注射は、発熱性物質試験法で用いられる布巻き法[6]により背臥位に固定し、外側広筋に相当する部位に行った。アルコール綿で清拭した後、注射針を皮膚に対して

Fig. 1. Illustration of chip-injection method

垂直に立て1cm刺入した。

注射部位を確認するための実験では、Fig. 1に示すようにマーカーとして試験管ブラシの毛先を約5mmに切ったものを注射針の先に入れ、注射器に入れた1/4皮下針のマンドリン(45mm)で注射液と共に組織内に押し出した。

右外側広筋に試料である酢酸溶液を、また左側には注射用生理食塩液をそれぞれ1ml 5~10秒かけて注射した。

観察：注射後2, 7, 14および21日目に各群3匹のウサギをペントバルビタールNa麻酔下(25mg/kg, i. v.)で頸動脈より放血致死させた後、左右外側広筋を摘出した。摘出筋は表面の肉眼的観察を行った後、筋肉を縦方向に切開し、断面を肉眼的に観察した。その後、10%中性ホルマリン液に固定し、パラフィン包埋および薄切の後ヘマトキシリン-エオジン染色を施し、組織学的検査に供した。

注射部位の確認の実験では、1群6匹からなる2群のウサギの右外側広筋に0.425%酢酸あるいは1.7%酢酸を、また左側に生理食塩液を各々マーカーと共に1ml注射し、その後2日目、14日目に剖検してマーカーの見られた部位を記録した。

成績

1) 注射部位の確認

2日目および14日目の合計24例のうち20例の外側広筋にマーカーを認めた。その他はマーカーが中間広筋内にあったもの3例および大筋筋膜張筋と外側広筋の間に発見されたもの1例であった。

マーカーのみられた外側広筋のうち、生理食塩液を注

Table 1. Gross findings and sizes of lesion of the *M. vastus lateralis* injected with acetic acid solution or physiological saline

	2 days after inj.					7 days after inj.					14 days after inj.					21 days after inj.					
	Anim.	Gross findings ^{a)}			Size ^{b)}	Anim.	Gross findings			Anim.	Gross findings			Anim.	Gross findings						
		No.	H	WD			No.	H	WD		No.	H	WD		No.	H	WD	No.	H	WD	No.
0.106 % AA sol. ^{c)}	3	— ^{e)}	—	0	1	—	—	0	2	—	—	0	4	—	—	0	0	—	—	0	0
	6	+	+	51	5	—	—	0	7	—	—	0	8	—	—	0	0	—	—	0	0
	9	±	—	10	10	—	—	0	11	—	—	0	12	—	—	0	0	—	—	0	0
0.425 % AA sol.	15	+	—	72	13	—	—	0	14	—	—	0	16	—	—	0	0	—	—	0	0
	18	+	±	160	17	+	+	110	19	—	—	0	20	—	—	0	0	—	—	0	0
	22	+	+	189	21	+	+	60	23	—	—	0	24	—	±	0	0	—	±	32	32
1.7 % AA sol.	27	+	+	600	25	+	+	342	26	+	±	70	28	+	±	70	70	±	±	125	125
	30	+	+	480	29	+	+	300	31	±	+	270	32	—	+	270	270	—	+	140	140
	33	+	+	630	34	±	+	90	35	±	+	250	36	—	+	250	250	—	+	54	54
PS ^{d)}	3	—	—	0	1	—	—	0	2	—	—	0	4	—	—	0	0	—	—	0	0
	6	+	±	49	5	—	—	0	7	—	—	0	8	—	—	0	0	—	—	0	0
	9	±	—	2	10	—	—	0	11	—	—	0	12	—	—	0	0	—	—	0	0
	15	—	—	0	13	—	—	0	14	—	—	0	16	—	—	0	0	—	—	0	0
	18	+	—	10	17	—	—	0	19	—	—	0	20	—	—	0	0	—	—	0	0
	22	±	—	7	21	—	—	0	23	—	—	0	24	—	—	0	0	—	—	0	0
	27	+	—	2	25	—	—	0	26	—	—	0	28	—	—	0	0	—	—	0	0
	30	+	—	2	29	—	—	0	31	—	—	0	32	—	—	0	0	—	—	0	0
	33	—	—	0	34	—	—	0	35	—	—	0	36	—	—	0	0	—	—	0	0

a) H : Hemorrhage, WD : White degeneration
b) Sizes of the lesion are expressed as a product of major axis (mm) and minor axis (mm) of lesion of the *M. vastus lateralis* injected with acetic acid solution or physiological saline.
c) Acetic acid solution
d) Physiological saline
e) — : none ± : slight + : moderate or marked

射した例では、2日目では平均(±標準偏差) 33 ± 8 (mm^2 , $n=3$) の広がりをもつ出血がみられ、その中心部にマーカーが確認された。14日目では、肉眼的には変化はみられなかった。0.425% 酢酸を注射した筋肉では2日目では 173 ± 35 ($n=2$)、14日目では 25 ± 31 ($n=3$) の出血がみられ、出血の中央部には調理肉様を呈す白変化[9]がみられた。1.7% 酢酸では2日目では 236 ± 52 ($n=3$)、また14日目では 112 ± 28 ($n=3$) の出血がみられ、中央部は白変化を呈していた。そして各酢酸とも変化部の中央付近にマーカーである毛先が発見された。

2) 等張酢酸溶液の局所障害性

① 肉眼的所見

Table 1 に各動物の肉眼的所見と出血あるいは白変化からなる変化部の長径と短径の積を示した。

生理食塩液では2日目では9例中6例に出血がみられ、そのうち1例では白変化が認められた。7日目以後は肉眼的に変化は認められなかった。0.106% 酢酸では、2日目において2例に軽度ないし中等度の出血がみられ、うち1例は出血の中央部に白変化が観察された。7日目以後変化は観察されなかった。0.425% 酢酸では2日目および7日目では出血および白変化が認められたが、14日目では変化はなく、21日目では1例に軽度の白変化が認められた。1.7% 酢酸では、いずれの観察時期においても白変化を認め (Fig. 2)、特に2日目では、1例に白変化の中央部が褐色を呈しているのが観察された。また出血は、14日目および21日目では各々2例で軽度になるかあるいは消失していた。

Table 2 に変化部の長径と短径の積を各群の平均値で示した。0.425% および 1.7% 酢酸では日数の経過と共に低値に推移した。

② 組織学的所見

Table 3 に組織学的所見を示した。

0.106% 酢酸では、2日目および7日目では筋線維の極軽度ないし軽度の筋線維の膨化および間質の拡張ならびに円形細胞浸潤が観察されたが、14日目および21日目では変化はなかった。0.425% 酢酸では2日目および7日目では筋線維の膨化および壊死がみられるが、14日目ではこの両変化はなく、21日目では1例に軽度の壊死が認められた。7日目以後1例に筋線維の再生像を認めた。間質には2日目および7日目では円形細胞あるいは好酸性細胞の浸潤、出血および間質の拡張などがみられ、7日目以後正常組織と変性壊死組織との境界部に結合組織線維の増殖 (Fig. 3) が各観察時期で2ないし3例みられる。1.7% 酢酸では、全例に筋線維の膨化、壊死 (Fig. 4) がみられ、さらに7日目以後筋線維の再生像が観察された (Fig. 5)。間質には、細胞浸潤、出血および拡張がみられた。さらに0.425% 酢酸と同様に7日目以後変性壊死した筋線維と正常組織との境界部に結合組織線維の増殖がみられた。これらの線維は Azan-Mallory 染色により青染された (Fig. 6)。

生理食塩液では、2日目に筋線維の膨化、壊死および間質の細胞浸潤などがみられたが、7日目以後は変化は認められなかった。

考 察

等張酢酸溶液のウサギ外側広筋への影響を調べるために、浸透圧を生理食塩液と等張となるように調整した0.106%、0.425% および 1.7% 酢酸を各々1 ml 注射して注射後2, 7, 14 および 21 日目に剖検した。

その結果、0.106% 酢酸は、2日目では3例中2例に出血、1例に白変化を認めるが、7日目では変化はみられ

Table 2. Average sizes of gross lesion of the *M. vastus lateralis* injected with acetic acid solution or physiological saline

	Days after injection			
	2	7	14	21
0.106 % acetic acid sol.	20 ± 27 (3) ^{a)}	0 (3)	0 (3)	0 (3)
0.425 % acetic acid sol.	140 ± 61 (3)	57 ± 55 (3)	0 (3)	11 ± 18 (3)
1.7 % acetic acid sol.	570 ± 79 (3)	244 ± 135 (3)	197 ± 110 (3)	106 ± 46 (3)
Physiological saline	8 ± 16 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (9)

a) Average sizes of gross lesion are expressed as mean $\pm$ S. D. of a product of major axis (mm) and minor axis (mm) of gross lesion of the *M. vastus lateralis* injected with acetic acid solution or physiological saline in 3 or 9 animals. Figures in parentheses are the number of animals examined.

Table 3. Histological findings of the *M. vastus lateralis* injected with acetic acid solution or physiological saline

Findings	0.106 % AA ^{a)}				0.425 % AA				1.7 % AA				PS ^{b)}			
	2 ^{c)}	7	14	21	2	7	14	21	2	7	14	21	2	7	14	21
No. of animals examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	9	9	9	9
Muscle fiber																
Swelling ± ^{d)}	3	1			1											
+					2	2			3	2	1	3	2			
++					1				1	2						
Necrosis ±					1								1			
+					3	2		1	1	3	1	2	2			
++									2		2	1				
Calcification ±									1		1					
+		1			1		1		2	2	1					
++											1					
Regeneration +					1	1	1		2	3	3					
Interstitium																
Round cell infiltration ±	1	1			1	1	1		1				3			
+	2				3	2			3	2	3		2			
++										3						
Eosinophilic cell infiltration +					3				3	3			2			
Hemorrhage ±					1	1										
+					2	1			1	3	1		2			
++									2			1				
Dilatation ±	1	1			1											
+	1				1	2					1	3	1			
++					2				3		2					
Fibrosis ±					1	2	1									
+					2		1				2	2				
++											3	1	1			

a) acetic acid solution b) Physiological saline c) Days after injection

b) ± : very slight + : slight ++ : moderate

なかった。組織学的には2日目および7日目で筋線維に軽度の変性を認めたが、壊死はみられなかった。0.425%酢酸では2日目および7日目で白変化と出血がみられたが、14日目以後では1例を除いてこれらの変化は消失していた。組織学的には、肉眼所見と一致して筋線維の壊死や間質の出血は14日目で消失していた。

1.7%酢酸は21日目まで白変化を認めるが、出血は14日目で軽度となり、21日目では2例で認めることができなかった。これらのことは組織学的所見とも一致して、

21日目では筋線維の壊死がみられるが、出血は軽度あるいは消失していた。

さらに0.425%, 1.7%酢酸では7日目以後、筋線維の再生像あるいは間質の線維増殖が観察された。間質にみられた線維は Azan-Mallory 染色に青染することより、膠原線維であることがわかった。

これらの肉眼的および組織学的変化の程度（変化部の大きさも含む）あるいは回復時期に明らかな用量関係がみられ、2日目に観察された肉眼的および組織学的変化

は濃度および注射後の経過日数に依存して縮小あるいは回復に向うものと思われた。今回認められた組織学的変化は種々の薬剤を筋肉注射した時にみられる変化〔2～4, 10, 12〕と同様のものではあった。

府川ら〔4〕は、生理食塩液で希釈した0.047～96 v/v %酢酸溶液注射時の肉眼的変化には、暗赤色調あるいは鮮紅色調の変色部分をもつ壊死領域がみられ、日数の経過と共にその変色部分は消失し、7日目以後では壊死領域のみが残存することを報告し、変化には濃度による質的差異は認められず、障害領域の大きさと治癒日数にのみ差があったと述べており、今回の実験結果によく一致していた。また濃度の概ね等しい酢酸では回復の時期も府川らの結果とはほぼ一致していた。

一方、磯部ら〔5〕は、6 %酢酸水溶液をウサギに筋肉注射したところ、注射後1日目から7日目まで肉眼的変化に回復がみられなかったことを報告している。また、蒸留水、0.106%および0.425%酢酸水溶液を注射して、その後2日目、7日目に剖検したところ、蒸留水と同程度の変化がみられ、用量関係および回復の傾向は認められなかった（未発表）。これらのことから、注射剤の局所障害性試験の対照液として酢酸を用いる場合は、酢酸を生理食塩液で希釈するか、または生理食塩液と等張にすることが重要と思われた。

今回の方法での外側広筋への注射の成功率は83%（20/24例）であった。これはラットで報告されている大腿四頭筋に筋肉注射した時の成功率（81%）〔8〕とほぼ同様であった。このことから、今回布巻き法〔6〕を用いてウサギを保定して注射したことは適切であったと思われる。しかし、成功率を上げるためには、保定、特に後肢の保持方法が大切であると思われる〔8〕ので、この点について今後改良を加えたい。

要 約

生理食塩液を等張となるように調整した0.106%, 0.425%および1.7%酢酸の各1mlを雄日本白色種ウサギの外側広筋に注射し、注射後2, 7, 14および21日目に屠殺剖検した。摘出筋は肉眼的観察の後、10%中性ホルマリン液に固定し組織学的検査に供した。筋肉の出血および白変化が注射後2日目で0.106%, 0.425%および1.7%酢酸に肉眼的に観察された。これらの変化は0.106 %酢酸では注射後7日目以後では観察されず、0.425 %酢酸では14日目以後、1例を除いて観察されなかった。1.7 %酢酸では21日目までこれらの変化がみられたが、出血

の程度は21日目で回復の傾向にあった。変化部の長径と短径の積で示される変化部の大きさは時間の経過と共に縮小した。特に1.7%酢酸で明らかであった。組織学的には、筋線維の膨化、壊死および石灰化ならびに間質の細胞浸潤、出血、拡張が0.106%, 0.425%および1.7%酢酸で観察された。注射後7, 14および21日目で筋線維の再生および間質の結合組織線維の増殖が、0.425%, 1.7%酢酸で観察された。試験管ブラシの毛先をマーカーとして注入する方法で注射部位の確認を行ったところ、注射した24例中20例（83%）でマーカーが外側広筋に注入されていることがわかった。その他の4例は中間広筋に注入されているもの3例、外側広筋と大腿筋膜張筋の筋間にみられたもの1例であった。

稿を終るにあたり、注射部位の確認法について御教示を賜った武田薬品工業株式会社中央研究所新谷茂博士ならびに御校閲を賜った国立衛生試験所毒性部長戸部満寿夫博士に深甚の謝意を表わす。また実験に協力を惜しまなかった毒性部臼井章夫君に感謝する。本研究は厚生科学研究費の援助により行った。なお、研究の一部は第30回実験動物談話会（1983, 東京）において発表した。

文 献

- 〔1〕 赤石英・押田茂実・高橋由美子（1974）. 薬剤に関する医療事故について. 月刊薬事, **16**, 901～909.
- 〔2〕 赤塚謙一・橋本孝雄・竹内 幸一・竹内みどり・神田 実喜男（1979）. ブタ前立腺エキス（Rabaveron®）の局所刺激性試験 ウサギへの筋肉内注射における形態学的検討. 応用薬理, **18**, 181～190.
- 〔3〕 Cioc, M., and von Schilling, B. (1965). Changes in muscular tissue produced by injection of some known drugs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **7**, 179～189.
- 〔4〕 府川和永・伊東義彦・三崎則幸・坂東和良（1975）. 刺激性試験法に関する研究（第1報）酢酸筋注射時の障害組織回復試験. 薬学雑誌, **95**, 1307～1316.
- 〔5〕 磯部 竹雄・小田島 寿子・竹内 祐幸・宇高 奎二（1981）. Flunitrazepam のウサギに対する局所皮膚ならびに筋肉刺激性試験. 応用薬理, **22**, 47～55.
- 〔6〕 刈米達夫・石館守三・長瀬雄三監修（1976）. 発熱性物質試験法. 第九改正日本薬局方解説書, B-176, 日本公定書協会編, 広川書店, 東京.
- 〔7〕 厚生省薬務局安全課資料, 1983.
- 〔8〕 信永 利馬・高橋 和明・岡本 道生・若藤 清匡・川西 広明（1974）. 注射による投与とその問題点（ラットを例にあげて）. 免疫実験操作法 B, pp. 713～729, 日本免疫学会編, 日本免疫学会, 金沢.
- 〔9〕 新谷 茂・川路尚徳・米田友彦・山崎実・中村桃吉・梶原 疆（1963）. クロモマイシン A₃ の局所障害に関する実験的研究. 武田研究所年報, **22**, 227～253.
- 〔10〕 内田 寛（1976）. 筋注射剤の溶血性, 筋肉障害性およびそ

の回復性について. 応用薬理, **12**, 95~113.

- [11] 薬事日報, 5818号 (1979年1月23日). 薬事日報社.
- [12] Yamazaki, M., Maeda, M., Tsukamoto, T., Tsukamoto, T., Iwanaga, M., and Shintani, S. (1972).

Observation on the local tissue toxicity of Enramycin in experimental animals. *J. Takeda Res. Lab. (Takeda Kenkyu Sho Hō)*, **31**, 263~281.

Explanation of figures

- Fig. 2. Gross appearance of the muscle (right) 7 days after the injection of 1.7% AA solution. White degeneration, surrounded with hemorrhage, is seen on the cut surface of the muscle. No macroscopical lesion is seen in the another muscle injected with physiological saline.
- Fig. 3. A micrograph of the muscle 7 days after the injection of 0.425% AA solution. Connective tissue proliferation is seen between the normal and necrotic tissue (H-E stain, $\times 40$).
- Fig. 4. A micrograph of the muscle 2 days after the injection of 1.7% AA solution.

- Marked degeneration and necrosis of the muscle fiber, cell infiltration and hemorrhage are seen (H-E stain, $\times 100$).
- Fig. 5. A micrograph of the muscle 21 days after the injection of 1.7% AA solution. Regeneration of the muscle fiber is seen as giant cells with connective tissue proliferation, cell infiltration and hemorrhage (H-E stain, $\times 100$).
- Fig. 6. A micrograph of the muscle 7 days after the injection of 1.7% AA solution showing proliferation of collagenous fibers in the interstitium (Azan-Mallory stain, $\times 100$).

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6