

早稲田大学審査学位論文
博士（スポーツ科学）

β_2 -アゴニスト・クレンブテロールがギプス固定
およびその回復過程におけるラット骨格筋の
形態学的適応に及ぼす影響

Effects of β_2 -agonist clenbuterol on morphological
adaptation of rat skeletal muscle in response to
casted-immobilization and subsequent recovery

2020年7月

早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科

鈴木 英樹
SUZUKI, Hideki

本博士論文は以下の掲載論文をまとめたものである.

1. Suzuki H, Tsujimoto H, Shirato K, Mitsuhashi R, Sato S, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Clenbuterol attenuate immobilization-induced atrophy of type II fibers in the fast-twitch Extensor Digitorum Longus but not in the slow-twitch soleus muscle. *Glob J Hum Anat Physiol Res.* 1: 10-17. 2014. (実験 1)
2. Suzuki H & Kitaura T. Attenuating effects of clenbuterol, β_2 -agonist, on immobilization-atrophy of rat hindlimb muscle fibers. *J Phys Fitness Sports Med.* 4(5): 363-367. 2015. (文献考証)
3. 鈴木英樹, 辻本尚弥, 北浦孝, 村岡功. 萎縮ヒラメ筋の回復期におけるクレンブテロール投与の影響. *スポーツ科学研究.* 15: 77-87. 2018. (実験 2)
4. Suzuki H, Yoshikawa Y, Tsujimoto H, Kitaura T, Muraoka I. Clenbuterol accelerates recovery after immobilization-induced atrophy of rat hindlimb muscle. *Acta Histochemica.* 122: 151453. 2020. (実験 3)

目次

第1章	序章	1
1-1	研究の背景と目的	1
第2章	文献考証	4
2-1	筋線維のタイプ分類	4
2-2	筋線維の萎縮と回復	5
2-3	筋線維と筋核の変化	7
2-4	クレンブテロールの作用	10
第3章	ギプス固定中におけるクレンブテロール投与が筋萎縮抑制作用に及ぼす影響 (実験1)	12
3-1	緒言	12
3-2	方法	13
3-3	結果	15
3-4	考察	24
3-5	結論	27
第4章	クレンブテロール投与が萎縮ヒラメ筋の回復に与える影響 (実験2)	28
4-1	緒言	28
4-2	方法	29
4-3	結果	32
4-4	考察	37
4-5	結論	40
第5章	クレンブテロールが固定によるラット後肢骨格筋の萎縮後の回復に与える影響 (実験3)	41
5-1	緒言	41

5-2	方法	42
5-3	結果	45
5-4	考察	51
5-5	結論	54
第6章	総合討論	55
6-1	本研究の成果	55
6-2	本研究成果のスポーツ科学分野への応用	56
6-3	今後の課題	56
	参考文献	59
	謝辞	79

第1章 序章

1-1 研究の背景と目的

骨格筋は高い可塑性を有しており、環境を含む様々な刺激に対して応答する。本研究は骨格筋の萎縮および回復応答に対する筋特異的同化作用を有する β_2 -アドレナリン受容体作動薬の影響を組織化学的手法を用いて検討した形態学的研究である。

筋量の減少を伴う骨格筋の廃用性萎縮は、ヒトや実験動物モデルを用いて、四肢ギプス固定、ベッドレスト、関節固定、除神経、微小重力環境、尾部懸垂および全身懸垂などの条件下で研究されている (Booth and Kelso 1973, Herbison et al. 1979, Jaspers et al. 1984, Musacchia et al. 1990, Booth and Thomason 1991, Imaizumi et al. 1994, Rittweger et al. 2005, Trappe et al. 2009)。廃用性萎縮での筋量の減少は、タンパク質合成速度の低下、タンパク質分解の亢進、またはその両方の変化に起因する筋タンパク質の減少によるものである (Goldspink 1977, Hayase and Yokogoshi 1991, Jackman and Kandarín 2004, Nakai et al. 2012, Ito et al. 2013)。また、タンパク質量の低下は筋線維の萎縮を招き、その横断面積の低下は筋力の低下の原因となり筋の機能低下につながる。したがって、この萎縮の程度によっては、その後の生活活動に復帰するのにかなりの時間を要する場合も考えられる。しかし、異化状態下での筋萎縮の程度を抑えることができたり、萎縮後の回復を促進することができれば、早期の日常への復帰を図ることができると考えられる。本研究では、萎縮の軽減や萎縮後の回復の促進に対して β_2 -アドレナリン受容体作動薬であるクレンプテロールの適用を試みた。

クレンプテロール (Clenbuterol: CLE) は、喘息による気管支痙攣の治療のために以前より使用されている β_2 -作動薬であるが、タンパク質合成の亢進やタンパク質分解の阻害により筋特異的肥大を誘発する同化作用があることが知られている (Lynch and Ryall 2008)。また、CLE は様々な成長因子の分泌を亢進させ (Verhoeckx et al. 2006)て、筋肥大を加速すると報

告されている (Spurlock et al. 2006). したがって、異化状態にある骨格筋に対する CLE の投与は、その同化作用によって筋萎縮を軽減する可能性がある。既に、萎縮誘発モデルである除神経や後肢懸垂を行ったラットを用いて、CLE を投与した際の筋萎縮の抑制作用に関する数多くの研究がなされている (Maltin et al. 1986, 1987, Herrera et al. 2001, Yamazaki 2005). それらの研究では、いずれも CLE 投与による明らかな筋線維の萎縮抑制があったことを報告している。一方で、臨床的治療の一つである関節固定を用いて、CLE 投与による筋線維萎縮の抑制を調べた研究は、知る限りラットを用いた Cancelliero ら (2008)の研究だけである。将来的にヒトへの応用を想定した基礎的な研究を行うにあたり、除神経や後肢懸垂モデルに比べて関節固定モデルはより生理的に近い状態であると考えられる。そこで、本研究では、臨床的治療として用いられるギプス固定を用いて、固定中の筋の異化状態下、さらに固定解放後の同化 (回復) 状態下に CLE 投与して、その影響を調べるに至った。

実験動物を用いて通常飼育下での CLE 投与の影響を調べた多くの研究は、主に速筋での同化作用を報告している (Zeman et al. 1988, Ryall et al. 2002, Oishi et al. 2004, Yamazaki 2005, Burniston et al. 2006). また、先の除神経や後肢懸垂モデルを用いた研究においても、筋線維での萎縮抑制作用はそのタイプによって異なることを報告している。したがって、CLE 投与による骨格筋の萎縮抑制作用や回復促進作用を解明するには、異なる骨格筋間において筋線維タイプを同定した上で、その変化を観察することが重要であると考えられる。そこで、本研究では組織化学的手法を用いて、速筋と遅筋を被験筋として筋線維レベルで CLE 投与の影響を観察した。

骨格筋線維は多核細胞であり、筋線維の細胞質量の変化は筋核数の変化と密接に関係していることが報告されている (Allen et al. 1995, Hikida et al. 1997, McCall et al. 1998, Smith et al. 2000). また、一つの筋核によって遺伝発現やタンパク質合成などの機能を支配できる筋細胞質量はある程度決まっていることが報告されている (Petrella et al. 2006, O' Connor

and Pavlath 2007, Snijders et al. 2015). したがって、筋線維の萎縮や肥大に伴って筋核が増減すると考えられる。さらに、CLE は筋核の源である筋衛星細胞を活性化し、その増殖と分化を引き起こして既存の筋線維へ融合させることが報告されている (Spurlock et al. 2006). そこで、本研究では、組織化学的手法を用いて、筋核の変化を併せて観察した。

第2章 文献考証

2-1 筋線維のタイプ分類

筋線維は、骨格筋の横断切片に各種の染色を施す組織化学的手法を用いて、数種類のタイプに分類されている。Dubowitz と Pearse (1960) は、筋線維の酵素活性を基にした組織化学的方法によって、ヒトや小動物の筋線維を速筋線維 (タイプ II) と遅筋線維 (タイプ I) に大別した。Brook と Kaiser (1970) は、筋線維の ATPase の pH に対する感受性に基づくミオシン ATPase 染色により、ヒト、ラットおよびウサギの筋線維をタイプ I, IIa および IIb に分類し、さらに、ラットヒラメ筋においてタイプ I と II 線維の中間型の IIc 線維を見出した。本研究の実験 1 では、これらのタイプ分類を用いている。その後、Peter ら (1972) は、収縮特性に加えて代謝特性を含めて、モルモットとウサギの筋線維を SO (slow-twitch, oxidative), FOG (fast-twitch, oxidative, glycolytic) および FG (fast-twitch, glycolytic) に分類している。SO, FOG および FG タイプの筋線維はタイプ I, IIa および IIb 筋線維に対応し、タイプ IIc 線維は I と IIa 線維の中間型と考えられている。

Schiaffino ら (1989) は、ミオシン重鎖のタイプは筋線維で異なることに着目し、それらのモノクローナル抗体を利用した免疫組織化学的手法を用いて、ラットの筋線維をタイプ I, Ia, II d/x および IIb に分類している。さらに、Gorza (1990) は、各種 pH で処理した後の ATPase 染色とモノクローナル抗体を利用した免疫組織染色法を用いて、ラット、マウスおよびモルモットの筋線維においても、各種 pH での前処理を組み合わせた ATPase 染色により、タイプ I, IIa, IIx および IIb に分類できることを報告している。

Allen ら (1996) は、ラットヒラメ筋の筋線維を単離して、共焦点顕微鏡を用いて筋核を観察すると共に、免疫組織化学染色を行い筋線維をタイプ I, I+II および II に分類して、筋線維タイプ間で筋核についての検討を行なっている。本研究の実験 2 と 3 では横断切片上ではあるが、筋核に関する検討を行うことから、Allen らの方法を参照して筋線維をタイプ I, I+II および II に分類する免疫組織化学的染色を用いた。

2-2 筋線維の萎縮と回復

骨格筋の萎縮に関する研究は、ヒトや実験動物モデルを用いて様々な条件下で数多くの研究がなされている (Booth and Kelso 1973, Herbison et al. 1979, Jaspers et al. 1984, Musacchia et al. 1990, Booth and Thomason 1991, Imaizumi et al. 1994, Rittweger et al. 2005, Trappe et al. 2009) が、本研究では、萎縮の軽減や萎縮からの早期回復などのリハビリテーションの分野における β_2 -アドレナリン受容体作動薬のヒトへの適用を想定して、より臨床的な骨格筋の萎縮モデルとしてギプス固定を用いた研究を行った。

骨格筋の萎縮を評価する方法としてコンピューター断層撮影 (CT) を用いる方法があるが、筋萎縮に伴い浮腫や結合組織の増加が起こる可能性があるため、筋萎縮をより正確に評価するためには、筋線維の横断面の変化を捉えることが有効であると考えられる (Appell 1986a)。しかし、筋線維には異なるタイプがあり、その萎縮は一樣ではないために、骨格筋の萎縮をより正確に評価するためには、筋線維タイプ別にその横断面積を調べるのが有効である。

筋線維はタイプにより収縮特性や代謝特性が異なるが (Maltin et al. 1986, Zaman et al. 1988, Ryall et al. 2002, Ishihara et al. 2012)、速筋線維であるタイプ II 線維と遅筋線維であるタイプ I 線維に大別され、さらにタイプ II 線維は、IIa, IIb, IIc のサブタイプに分類される。筋線維は運動強度に従って、タイプ I < IIa < IIb 線維の順に動員される (Walmsley et al. 1978)。これらの筋線維 (運動単位) の活動様式から、タイプ I 線維は姿勢維持など低強度で持続的な動員がなされるのに対して、タイプ II 線維は比較的大きな張力発揮や速い収縮活動時に動員される。したがって、不活動の影響はタイプ II 線維に比べて、動員頻度が高いタイプ I 線維においてより大きいと考えられている。

ヒトや小動物における脚または後肢の固定による筋線維の萎縮に関して、タイプ II 線維の萎縮がタイプ I 線維に比べて大きかったとする報告もあるが (Herbison et al. 1978, Jaffe et al. 1978, Boyes and Johnston 1979)、多くの研究ではタイプ I 線維の萎縮が大きかったことを報告している (Booth and Kelso 1973, Tomank and Lund 1974, Edgerton et al. 1975, Häggmark et al. 1981, Appell 1986a, 1986b, Hortobagyi et al. 2000)。タイプ II 線維での萎

縮が大きかったとする報告では、ラットのそれぞれ足底筋、前脛骨筋または中間広筋を被験筋としている。それらのラットの後肢の筋は比較的タイプ II 線維の割合が高く、瞬発的な活動を行う速筋である。一方で、タイプ I 線維の萎縮が大きかったとする報告では、抗重力筋で遅筋線維の割合の高いヒラメ筋を対象とした研究が多い。したがって、固定による筋線維の萎縮は、その骨格筋の機能や筋線維組成とも関連していると考えられる。

骨格筋の萎縮はいずれも活動量の減少に伴うタンパク質合成速度の低下、タンパク質分解の亢進、またはその両方の変化に起因する筋タンパク質の減少によるものである (Goldspink 1977, Hayase and Yokogoshi 1991, Jackman and Kandarin 2004, Nakai et al. 2012, Ito et al. 2013)。遅筋線維では速筋線維に比べてタンパク質の代謝回転が速いため、萎縮がより早期に起こりやすいとする報告がある (Goldberg 1967)。また、ギプス固定により遅筋であるヒラメ筋において特定の mRNA 量が低下し、タンパク質合成が低下したことが報告されている (Babij and Booth 1988)。したがって、特に脚固定による筋萎縮は抗重力筋の遅筋で起きやすく、さらに遅筋線維であるタイプ I 線維でその影響が大きいと考えられる。

固定により誘発された下肢筋群の萎縮が解放された場合、速やかに回復に向かうことが報告されている (Booth 1978, Hortobagyi et al. 2000, Stevens et al. 2006, Christensen et al. 2008)。しかし、これらの研究では被験筋、萎縮の程度、回復期間での活動等が異なるため、骨格筋間や筋線維タイプ間での回復の違いを比較・検討することは困難である。一方で、Booth と Seider (1979) は、長期間の固定により萎縮したラットのヒラメ筋と腓腹筋の回復を比較し、筋重量、タンパク量および張力の回復が腓腹筋に比べてヒラメ筋で早かったことを報告している。遅筋線維では速筋線維よりもタンパク質代謝回転が速いこと (Goldberg 1967)、通常の手支持のための力発揮によって特定の mRNA 量が保たれている可能性があることが報告されている (Babij and Booth 1988)。さらに、固定により萎縮したラット・ヒラメ筋の回復において、ケージ内での通常活動は十分な刺激となることが報告されている (Booth 1978)。したがって、脚固定から解放された骨格筋の回復は、速筋に比べて抗重力筋である遅筋のヒラメ筋で早いと考えられる。また、ヒラメ筋は 90%以上の遅筋線維で構成され

ていることから、速筋線維に比べて回復が早いことも予測される。

一方で、不活動後の再負荷の早期に筋線維は損傷を受けることが報告されている (Itai et al. 2004, Tadball and Wehling-Henricks 2007, Ye et al. 2013)。これらは、無負荷により構造的に萎縮して脆弱化した筋線維に対して、再負荷は筋線維に損傷を与え、回復に影響を及ぼすことを示唆している。したがって、固定による萎縮や回復に関する組織化学的研究を行う場合、萎縮の程度に関与する条件を統制する必要がある。脚固定による不活動で起こる筋萎縮は様々な要因によって左右される。Will ら (1982) は、固定の研究に関するデータの比較には下記の点を考慮する必要があるとしている； 1) 固定期間、2) 通常での活動に対する不使用の程度、3) 筋線維のタイプ、4) 固定時の筋長、5) 前処理、6) 年齢と性別。したがって、一連の萎縮に関する研究を進めるにあたっては、極力上記の条件を揃えた実験を行う必要があると考えられる。

そこで本研究では、先に行われて十分な筋萎縮が観察されている研究を参考に (Sato et al. 2011c)、同週齢の雄ラットを同様な環境下で飼育し、同じナチュラルポジションでのギプス固定を採用した。これにより、上記の 1), 2), 4), 6) に関しては統一されたと考えられる。また、5) に関しても、いずれの実験においても実験手法は同じであるため問題はないと考えられる。さらに、4) の固定下での筋長に関しては、筋の短縮位と伸張位での固定では萎縮の程度も異なり、タンパク質合成と分解の変化の程度も異なる可能性がある (Tabary et al. 1972, Goldspink et al. 1977)。そこで本研究では、筋長に影響しにくいナチュラルポジションでの固定を用いた。3) の筋線維のタイプの問題に関しては、被験筋としてどの骨格筋を用いるかに関係しているため、本研究ではヒラメ筋を一貫して被験筋に用いた。また、固定後の回復に関する速筋と遅筋の比較には、同じ底屈動作に関与する後肢後方の足底筋とヒラメ筋を用いた。

2-3 筋線維と筋核の変化

骨格筋線維は多核細胞であり、その横断面積（細胞質量）の変化は筋核数の変化と密接に

関係していることが報告されている (Allen et al. 1995, Hikida et al. 1997, McCall et al. 1998, Smith et al. 2000). 一つの筋核によって遺伝発現やタンパク質合成などの機能を支配できる筋細胞質量は、筋核ドメインサイズ・DNA ユニットサイズと呼ばれている (Pavlath et al. 1989, Hikida et al. 1997, Mozdziakb et al. 1997, McCall et al. 1998, Gallegly et al. 2004).

廃用性萎縮を誘発する除神経、脊髄切断、微小重力環境、後肢懸垂、後肢固定モデルを用いた研究では、いずれも筋線維の萎縮に伴う筋核の減少を報告している (Darr and Schultz 1987, Allen et al. 1996, Viguie et al. 1997, Dupont-Versteegden et al. 1999, Wanek and Snow 2000). これらの筋線維の萎縮に伴う筋核の減少は核アポトーシスによるものと考えられている (Dupont-Versteegden et al. 1999, Libera et al. 1999, Smith et al. 2000, Always and Siu 2008). 筋線維萎縮に伴う筋核ドメインサイズに関しては、低下したという報告もあれば (Allen et al. 1996, Gallegly et al. 2004, Leeuwenburgh et al. 2005), 維持されたとする報告もある (Hikida et al. 1997, Smith et al. 2000, Bruusgaard et al. 2012). 一方で、筋核ドメインサイズが萎縮に伴って増加した報告はみられないことから、萎縮に伴う筋線維細胞質の減少に比べて核の消失は遅い可能性が考えられる.

一方で、トレッドミル走や共同筋切除術による過負荷による筋肥大に伴い、筋核が増加することが報告されている (Cabric and James 1983, Allen et al. 1995, McCall et al. 1998). 筋肥大に伴い筋核ドメインサイズの増加があった場合、そのドメインサイズには上限があるため、その上限サイズを超える前に新たな核の追加が行われると考えられている (Petrella et al. 2006, O' Connor and Pavlath 2007, Snijders et al. 2015, Lee et al. 2018). この筋核の追加の際に重要な役割を果たすのが筋衛星細胞である. 筋衛星細胞は筋線維膜と基底膜間に存在し、通常では静止状態にある (Muir et al. 1965). 筋衛星細胞は、骨格筋が損傷したり力学的負荷を受けて活性化されて増殖を開始し、その後、分化して既存の筋線維と融合するか新しい筋線維を形成することによって筋組織を再構築し肥大を促す (Hawke and Garry 2001). また、 γ 線を照射して筋衛星細胞を非活性化した場合、ある程度 (核ドメインサイズの限界) までの

回復がみられるが、その後の回復は起こらないことも報告されている (Mitchell and Pavlath 2001). さらに, Fry ら (2014) は, トランスジェニック Pax7-DTA マウスモデルを用いて, 筋衛星細胞が枯渇した筋では過負荷による筋線維の肥大が減衰することを報告している. これらのことから, 筋の成長や回復には筋衛星細胞の活性化は不可欠であると考えられる.

Chakravarthy ら(2000) は, 筋内に成長因子であるインスリン様成長因子 (Insulin-like growth factor-I: IGF-I) を投与したところ, 筋衛星細胞の増殖に伴う筋量の増加を報告している. また, McCall ら(1998)は, 共同切除術を用いて代償性肥大を起こして IGF-I を投与した場合, 非投与に比べて筋核の増加に伴う筋線維の肥大を報告している. これらのことは, 成長因子である IGF-I は核の増加を伴う筋肥大を誘発することを示している. 一方で, Awede ら (2002) は, 成熟ラットへの CLE 投与によるヒラメ筋での肥大は IGF-I と関連することを報告している. また, Young ら (2011) は, 成長期の子羊への β_2 -作動薬の投与は筋での IGF-I の増加を伴う肥大を誘発することを報告している. さらに Spurlock ら (2006) は, β_2 -作動薬である CLE の投与は筋衛星細胞の増殖と分化を引き起こして筋線維への動員を高めることを報告している. したがって, これらのメカニズムは明らかではないが, 成長因子の投与や CLE 投与による体内の成長因子の増加は, 筋核数を伴う筋肥大を誘発すると考えられる. また, 一方で恒常活性化 Akt トランスジェニックマウスでは, 筋核の増加を伴わない顕著な肥大も報告されていることから (Blaauw et al. 2009), 筋核数と筋肥大の関係を明らかにする必要がある.

筋核や筋衛星細胞の数は, 速筋に比べて遅筋で多いことが報告されており (Gibson and Schultz 1983, Hawke and Garry 2001), さらに, 萎縮に伴う筋核の変化は同一筋内でも, 筋線維のタイプで異なることが報告されている (Allen et al. 1996). したがって, 筋の萎縮や回復に伴う筋核や筋核数の変化は骨格筋や筋線維のタイプ間で異なることが考えられる.

そこで, 本研究では, 萎縮後の回復期での異なる骨格筋における CLE の回復促進作用を明らかにするために, 組織化学的に観察可能な筋核と筋量回復との関連を検討することとした.

2-4 クレブテロールの作用

クレブテロール (4-amino- α (t-butyl-amino) methyl-3,5-dichlorobenzyl alcohol; CLE) は、喘息による気管支痙攣の治療のために以前より使用されている β_2 -アドレナリン作動薬であるが、タンパク質合成やタンパク質分解の阻害によって筋肥大を誘発することが知られている (Lynch and Ryall 2008). そのため、競技スポーツにおけるドーピングとの関連では、治療目的使用に係る除外措置として非ステロイド薬としても用いられている (Akama and Abe 2013). CLE は他の β アドレナリン作動薬と比較して、 β_1 -アドレナリン受容体 (AR) と β_2 -AR の両方に対して親和性を有し、特に β_2 -AR に対して高い選択性を示す (Sato et al. 2008, 2010, 2012, Kawano et al. 2009). CLE の平衡解離定数は、 β_1 -AR と β_2 -AR に対してそれぞれ 38 nM と 6.3 nM であり、半減期は約 26 時間と比較的長い (Kopitar and Zimmer 1976, Sato et al. 2008, 2012).

CLE は、気管支平滑筋の弛緩、脂肪分解、解糖、グリコーゲン分解、血管拡張などの生理学的プロセスに影響することが知られている (Yang and Mcelligott 1984, Sato et al. 2008, 2011a). 最近の研究では、CLE の長期投与は、マウスの脾臓におけるマクロファージによる細菌クリアランスを障害し (Shirato et al. 2013), ラットにおける白血球の再配分を誘発したことを報告している (Shirato et al. 2007). そして、これらの CLE 誘発効果は、 β_2 -AR によって媒介されていた。また、 β_2 -アドレナリン刺激は、グアニヌクレオチド結合タンパク質 (G タンパク質) を活性化し、アデニルシクラーゼの活性化および環状アデノシンリン酸 (cAMP) の産生をもたらす (Sato et al. 2011b, 2013). しかし、速筋および遅筋の筋線維における β -AR の生理学的役割と分布は知られていない (Sato et al. 2008, 2010, 2012, Kawano et al. 2009).

CLE はタンパク質合成を刺激し、タンパク質分解を阻害することで筋肥大を誘発するが、CLE が筋量を増加させる正確なメカニズムは不明である (Sato et al. 2008, 2011a). 一方で、骨格筋のタンパク質分解が促進される条件下において、筋量の減少に対する CLE の抑制効果が報告されている (Harrera et al. 2001, Gonçalves et al. 2012). 異化状態下での CLE 投与

は、特定の mRNA レベルの低下を抑えることによって萎縮を抑制することが報告されている (Delday and Maltin 1997, Babij and Booth 1988). また, Yimlamai ら (2005) は、後肢懸垂中の速筋における CLE による萎縮抑制作用は、タンパク質分解経路であるユビキチン-プロテアソーム経路の筋特異的抑制によることを報告している. さらに, Kline ら (2007) は、CLE は細胞増殖に関わるタンパク質キナーゼであるセリンスレオニンキナーゼ (Protein kinase B: Akt) やラパマイシン標的分子 (mechanistic target of rapamycin: mTOR) を活性化して、後肢懸垂や除神経ラットによる後肢骨格筋の萎縮を抑制したことを報告している. しかし、これらの反応は体系的には解明されていない. また、CLE は速筋に対して選択的に肥大を引き起こす可能性があることから (Rajab et al. 2000, Kitaura et al. 2001, Sato et al. 2008)、萎縮に対する抑制効果は骨格筋線維のタイプによって異なることも考えられる.

そこで本研究では、骨格筋が異化状態にあるギプス固定中に (Tomanek and Lund 1974, Booth and Seider 1979)、筋同化作用を有する CLE を投与した場合の萎縮抑制作用について、速筋と遅筋間、さらにそれらの骨格筋において筋線維タイプ別に比較検討を行うこととした.

半月板切除患者の術後のリハビリテーションでの CLE の投与は、膝伸筋における筋力の回復を増加させることが報告されている (Maltin et al. 1993). また、CLE は中枢神経系細胞や脳組織の内因性神経成長因子の合成を亢進することから (Semkova and Krieglstein 1999)、筋萎縮性側索硬化症マウスに適用したところ、腰部運動ニューロンの消失と体重減少を抑えることができたことも報告されている (Teng et al. 2006). これらの報告は、リハビリテーション分野における CLE の適用の可能性を示している.

ギプス固定解放後に通常状態に戻した場合、萎縮した骨格筋は過負荷状態になると考えられる. McCall ら (1998) は、共同切除術により過負荷状態にした骨格筋へ IGF-I を投与した場合に、非投与に比べて筋核の増加に伴う筋線維の肥大を報告している. また、ラットや子羊への CLE 投与は、IGF-I の増加を伴う筋肥大を誘発することが報告されている (Awede et al. 2002, Young et al. 2011). したがって、固定解放後の回復期での CLE の投与は、骨格筋の萎縮からの回復を促進する可能性がある.

第3章 ギプス固定中におけるクレンプテロール投与が筋萎縮抑制作用に及ぼす影響

(実験1)

3-1 緒言

筋量の減少を伴う骨格筋の廃用性萎縮に関する研究は、さまざまな条件下で行われている (Booth and Kelso 1973, Herbison et al. 1979, Jaspers et al. 1984, Musacchia et al. 1990, Booth and Thomason 1991, Imaizumi et al. 1994, Rittweger et al. 2005, Trappe et al. 2009). 一般的に、不使用での筋量の減少は、タンパク質合成速度の低下、タンパク質分解の亢進、またはその両方の変化に起因する筋タンパク質の減少によるものである (Goldspink 1977, Hayase and Yokogoshi 1991, Jackman and Kandarin 2004, Nakai et al. 2012, Ito et al. 2013). 骨格筋における筋線維の萎縮はそのタイプによって異なっているため (Tomanek and Lund 1974, Edgerton et al. 1975), 骨格筋萎縮のメカニズムを解明するには筋線維レベルでの組織化学的研究が重要である.

骨格筋は大別して速筋線維と遅筋線維で構成されており、これらの筋線維の割合は骨格筋ごとに異なる。また、速筋線維と遅筋線維は収縮速度、形態および代謝特性が異なることから (Maltin et al. 1986, Zaman et al. 1988, Ryall et al. 2002, Ishihara et al. 2012), 骨格筋を構成するそれらの筋線維の組成の違いにより、骨格筋の特性が決定される。速筋線維または遅筋線維が豊富な骨格筋はそれぞれ速筋と遅筋であり、その典型として長指伸筋 (Extensor digitorum longus: EDL) やヒラメ筋 (Soleus: SOL) が研究において頻繁に用いられている。

β_2 -作動薬のクレンプテロール (CLE) は、スポーツドーピングにおける非ステロイド薬として用いられている (Akama and Abe 2013). CLE は β_1 -AR と β_2 -AR の両方に対して親和性を有するが、他の β アゴニストと比較して β_2 -AR に対して高い親和性を示す (Sato et al. 2008, 2010, 2012, Kawano et al. 2009). CLE の平衡解離定数は、 β_1 -AR と β_2 -AR でそれぞれ 38 nM と 6.3 nM であり、その半減期は約 26 時間と比較的長い (Kopitar and Zimmer 1976, Sato et al. 2008, 2012).

CLE は、気管支平滑筋の弛緩、脂肪分解、解糖、グリコーゲン分解、血管拡張などの生理

学的プロセスに影響することが知られている (Yang and McElligott 1989, Sato et al. 2008, 2011a). 最近の研究では, CLE の長期投与はマウスにおける脾臓の高度な食作用性マクロファージによる細菌クリアランスを障害し (Shirato et al. 2013), ラットにおける白血球の再分布を誘発することが明らかになっている (Shirato et al. 2007). これらの CLE による現象はすべて β_2 -AR を媒介している. β_2 -アドレナリン作動性刺激はグアニンヌクレオチド結合タンパク質 (G タンパク質) を活性化して, アデニルシクラーゼの活性化および環状アデノシンリン酸 (cAMP) の産生をもたらす. これらの現象も主に β_2 -AR を媒介している (Sato et al. 2011b, 2013). しかし, 速筋および遅筋の筋線維における β -AR の生理学的役割と分布は明らかではない (Sato et al. 2008, 2010, 2012, Kawano et al. 2009).

CLE はタンパク質合成を刺激するとともに, タンパク質分解を阻害することで筋肥大を誘発するが, CLE が筋力と筋量を増加させる正確なメカニズムは不明である (Sato et al. 2008, 2011). 一方で, 骨格筋のタンパク質分解が促進される条件下では, 筋量の減少に対する CLE の抑制効果が観察されている (Harrera et al. 2001, Yimlamai et al. 2005, Gonçalves et al. 2012). しかし, これらの反応は体系的には解明されていない. また, CLE は速筋に対して選択的に肥大を引き起こすが, 萎縮に対する抑制効果が骨格筋線維のタイプによって異なるかどうかは明らかでない (Rajab et al. 2000, Kitaura et al. 2001, Sato et al. 2008). そこで, 本研究では関節固定による骨格筋線維の萎縮が CLE 投与により抑制されるかを組織化学的に検討した.

3-2 方法

実験動物

7週齢のSprague Dawley系雄性ラット (CLEA, Japan) を用いて, 環境に慣らすために5日間の予備飼育を行った. 温度 (23 ~ 25°C) と湿度 (50 ~ 60%) が制御された環境下で, 12時間の明暗サイクルにてラットを個別飼育した. 実験動物用飼料 (CE-2 ; CLEA, Japan) は摂餌量が同じになるように調整し, 飲水は自由摂取とした. 実験手順と動物のケアは早稲田

大学の動物倫理委員会 (No. 2012-A003) によって承認され、ヘルシンキ宣言 (1964年) に基づいた日本生理学会の「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」に沿って実施した。

実験プロトコール

5日間の予備飼育後、ラットをCLE投与 (CLE), ギプス固定 (IMM), ギプス固定+CLE投与 (IMM + CLE) およびコントロール (Control) 群 (各群 7~9匹) にランダムに分けた。

CLE (Sigma, St. Louis, MO, USA) を0.9%生理食塩水に溶解して、0.1%CLE溶液を調製した。CLE群のラットには、CLE (1 mg /体重1kg/日) を頸背部皮下への注射 (10 : 00 ~ 10 : 30) により9日間投与した。他の群のラットには、同等の量の0.9%生理食塩水を同じ方法で投与した。

固定群のラットには、BoothとKelso (1973) の方法に従って9日間ギプス固定を行った。ギプス固定は、ペントバルビタールナトリウム (45 mg /体重1 kg) 麻酔下において、スコッチキャスト (3-J; 3M社, 東京, 日本) で膝と足首の関節を弛緩状態で行った。9日間のギプス固定後、ラットを断頭屠殺し EDLとSOLを摘出して、液体窒素で冷却したイソペンタン中にて急速凍結した。冷凍筋サンプルは使用するまで-80°Cで保存した。

組織化学分析

哺乳類の筋線維は、さまざまなpH値でのプレインキュベーション後のATPase活性の違いにより、タイプI (遅筋型) とタイプII (速筋型) に分類される。さらに、タイプII線維は酸性pHでのATPaseの安定性により、タイプIIa, タイプIIbおよびタイプIIc (IとII型の中間型) 線維に分類される (Brook and Kaiser 1970, Ishihara et al. 2012)。また、酸化系酵素活性はI型, IIa型, IIc型線維で高く、解糖系酵素活性はIIa型, IIb型, IIc型線維で高い。

本研究では、-25°Cにてマイクロトームを用いて凍結した筋サンプルより厚さ10 μ mの連続横断切片を作成し、切片をカバーグラスに取り付けて、組織化学的染色を行った。染色は酸性

(pH 4.5) またはアルカリ (pH 10.4) でプレインキュベーションした後、ミオシンATPase活性染色を行った。この染色により、EDLの筋線維はタイプI (pH 4.5で高強度)、タイプIIa (pH 4.5で低強度) およびタイプIIb (pH 4.5で中強度) に分類された (Nakatani et al. 2000)。ヒラメ筋の筋線維は、タイプI (pH 4.5で高強度、pH 10.4で低強度)、タイプIIa (pH 4.5で低強度、pH 10.4で高強度) およびタイプIIc (pH 4.5およびpH 10.4で高強度) に分類された (Nakatani et al. 1999)。各切片の顕微鏡画像の共通した部位を、CCDカメラを介してパーソナルコンピューターに取り込み、画像処理システム (Image-J; NIH, USA) を用いて、各筋線維の横断面積を計測した。筋線維のタイプ分類と横断面積の計測は、筋横断切片における深層部と表層部の合計500本について行った。

統計処理

分析値は、平均および標準誤差 (SE) で表した。実験データ分析には、二元配置分散分析 (ANOVA) とTukey-Kramer 多重比較検定を用いた。なお、有意水準は危険率5%未満とした。

3-3 結果

体重および筋重量

実験期間後の Control 群の体重 (291 ± 3 g) は、CLE 群の体重 (302 ± 4 g) と同様だったが、IMM 群の体重 (263 ± 4 g) は Control 群よりも 13%低かった。Figure 3-1A に示すように CLE 群の EDL の重量は、Control 群に比べて 17%高かった ($P < 0.001$)。対照的に、IMM 群の EDL の重量は、Control 群よりも 12%低かった ($P < 0.001$)。IMM + CLE 群の EDL の重量は、IMM 群よりも 12%高かった ($P < 0.01$)。Figure 3-1B に示すように、Control 群と CLE 群では SOL の重量に有意差は認められなかったが、IMM 群の SOL の重量は Control 群よりも 52%低かった ($P < 0.001$)。IMM + CLE 群の SOL の重量は、IMM 群の重量と同様だった。

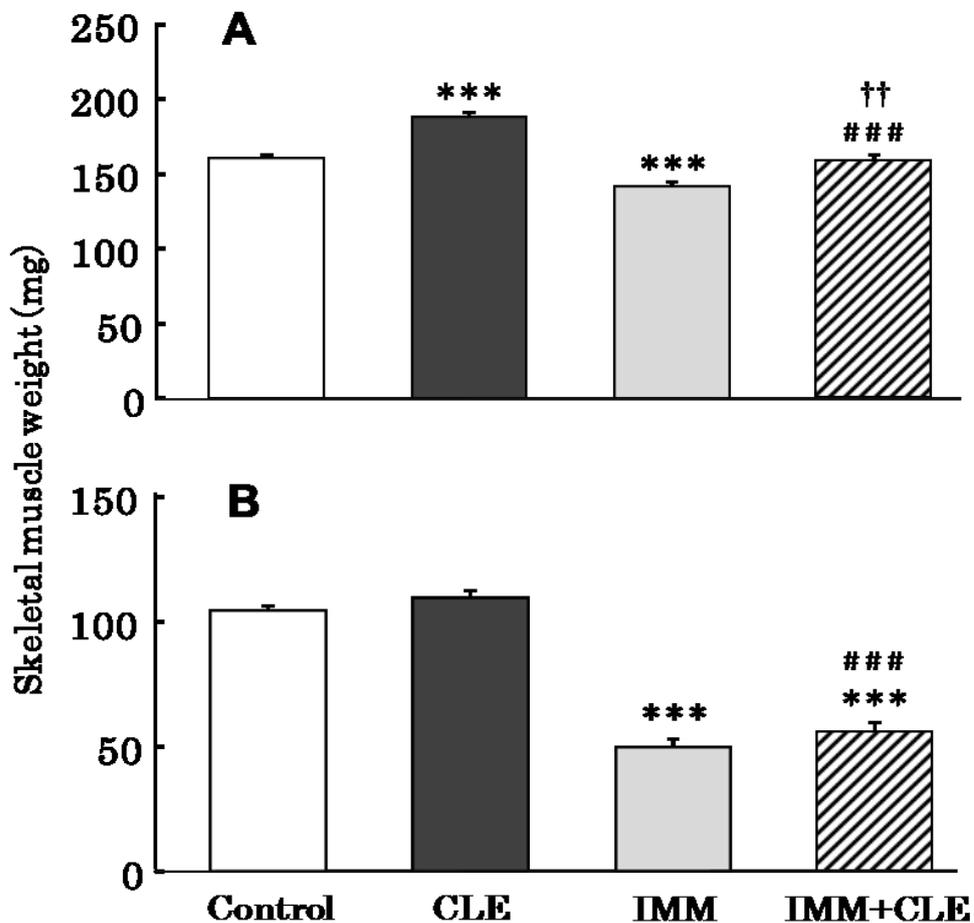


Figure 3-1: Effects of CLE and/or IMM on the muscle weights in the EDL (A) and soleus (B). Values are presented as the means \pm SE. □: control group; ■: CLE group; ◻: IMM group; ▨: IMM+CLE group. * $P < 0.001$ (vs. control group); ### $P < 0.001$ (vs. CLE group); †† $P < 0.01$ (vs. IMM group).**

筋線維のタイプ分類

Control 群の EDL における連続横断面の質的結果は、Nakatani ら (1999) の染色結果と一致していた (Figure 3-2)。しかし、EDL のタイプ I、タイプ IIa およびタイプ IIb の筋線維については、pH 10.4 でのプレインキュベーション後において、分類するのに十分に明確な染色ができなかった。Control 群の SOL における連続横断面の結果も、Nakatani ら (1999, 2000) の染色結果と一致していた (Figure 3-3)。

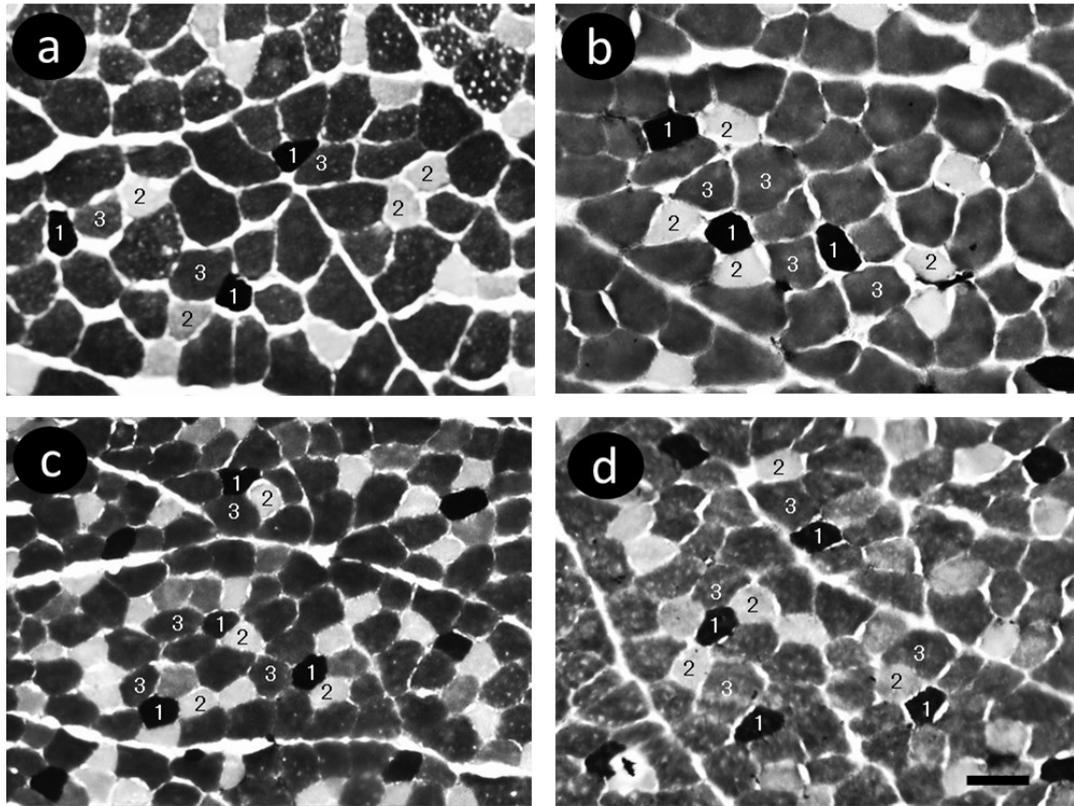


Figure 3-2: Serial transverse section of the extensor digitorum longus (EDL) muscle of rat in the control (a), CLE (b), IMM (c) and IMM+CLE (d) groups. Sections were stained for adenosine triphosphatase activity after incubation at pH 4.5. 1, type I; 2, type IIa; 3, type IIb. Scale bar: 50 μm .

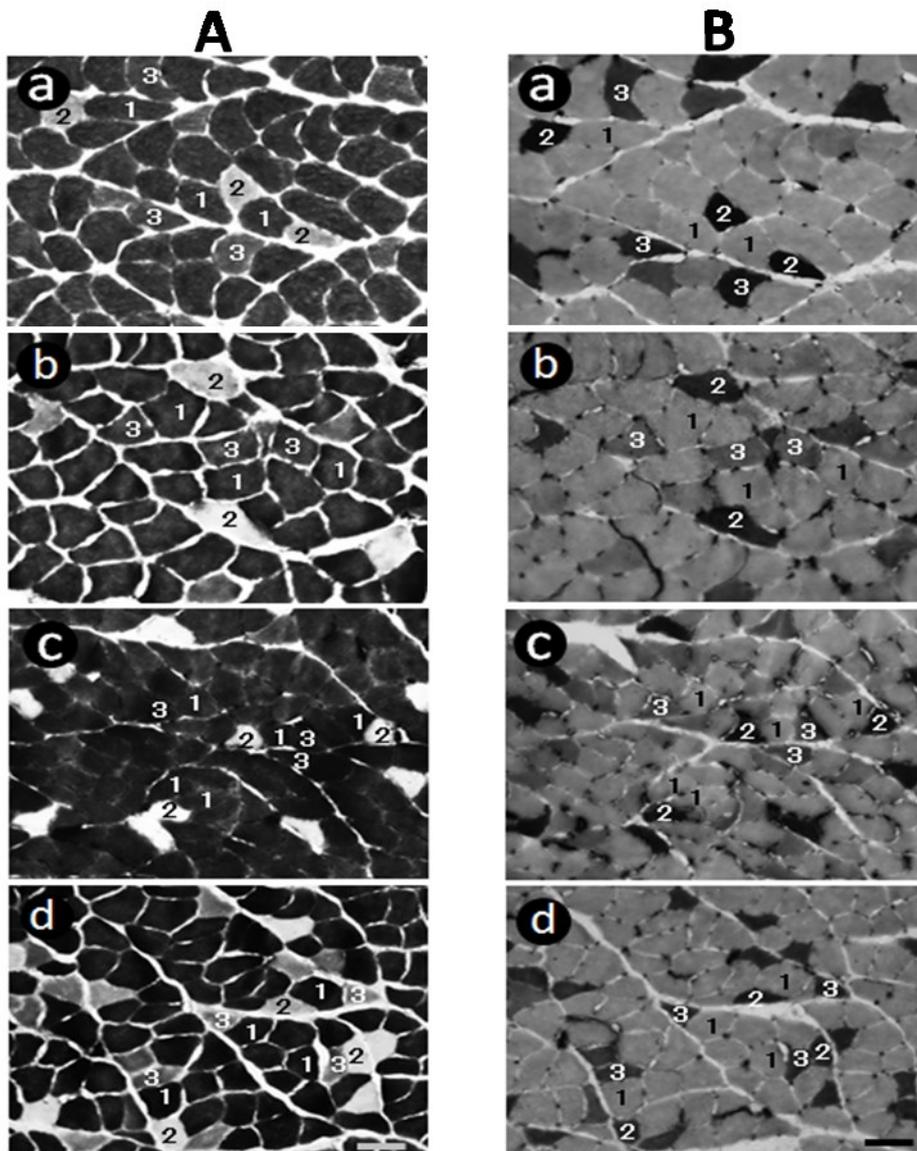


Figure 3-3: Serial transverse section of the soleus muscle of rat in the CON (a), CLE (b), IMM (c) and IMM+CLE (d) groups. Sections were stained for adenosine triphosphatase activity after incubation at pH 4.5 (A) and pH 10.4 (B). 1, type I; 2, type IIa; 3, type IIc. Scale bar: 50 μ m.

タイプ I 線維の横断面積

EDL のタイプ I 線維における横断面積の結果を Figure 3-4A に示した。CLE 群 ($956 \pm 41 \mu\text{m}^2$) の横断面積は Control 群 ($776 \pm 43 \mu\text{m}^2$) に比べて 23%大きかった ($P < 0.01$)。IMM 群

($813 \pm 48 \mu\text{m}^2$) と Control 群の横断面積は類似していたが, IMM + CLE 群 ($1,047 \pm 57 \mu\text{m}^2$) の横断面積は IMM 群に比べて 29%大きかった ($P < 0.01$).

SOL のタイプ I 線維の横断面積を Figure 3-4B に示した. CLE 群 ($2,155 \pm 89 \mu\text{m}^2$) と Control 群 ($2,052 \pm 51 \mu\text{m}^2$) の横断面積は類似していたが, IMM 群 ($1,092 \pm 89 \mu\text{m}^2$) の横断面積は Control 群に比べて 47%小さかった ($P < 0.001$). IMM 群と IMM + CLE 群 ($1,164 \pm 97 \mu\text{m}^2$) の横断面積は類似していた.

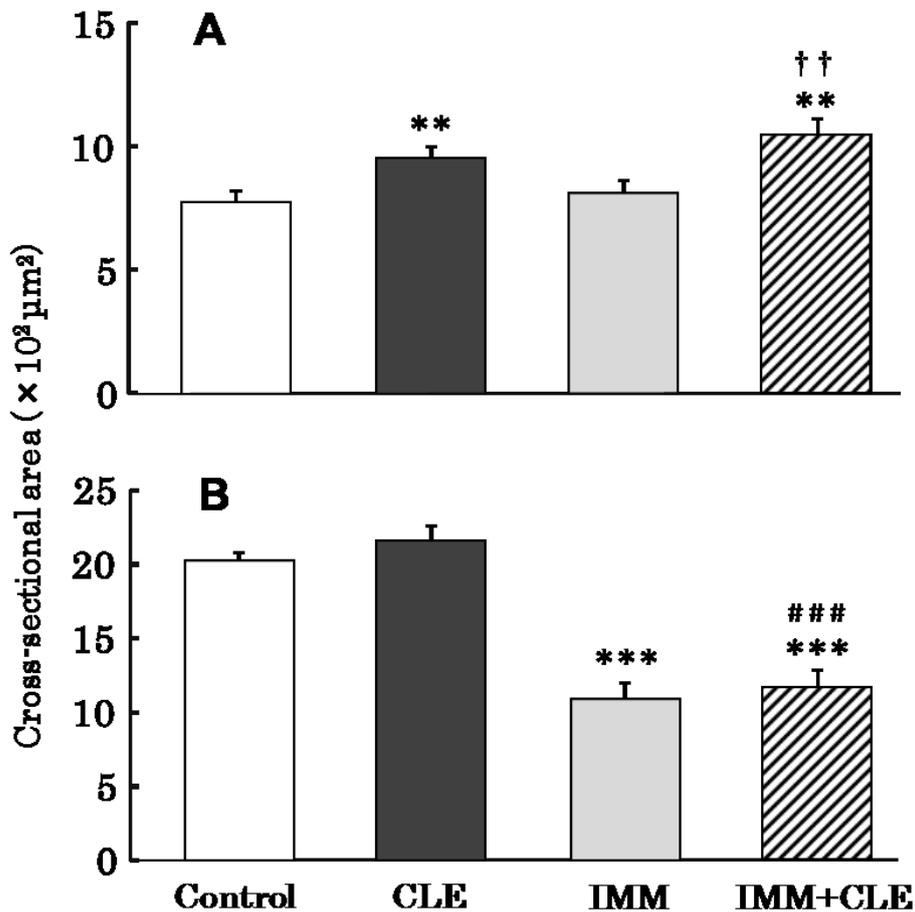


Figure 3-4: Effects of CLE and/or IMM on the cross-sectional area of type I fibers in the EDL (A) and soleus (B). Values are presented as the means \pm SE. Shading indicates groups as in Figure 3-1. ** $P < 0.05$ and * $P < 0.001$ (vs. control group); ### $P < 0.001$ (vs. CLE group); and †† $P < 0.01$ (vs. IMM group).**

タイプ IIa 線維の横断面積

EDL のタイプ IIa 線維の横断面積の結果を Figure 3-5A に示した。CLE 群 ($1,130 \pm 74 \mu\text{m}^2$) の横断面積は Control 群 ($914 \pm 41 \mu\text{m}^2$) に比べて 24%大きかった ($P < 0.05$)。対照的に、IMM 群 ($757 \pm 51 \mu\text{m}^2$) の横断面積は Control 群に比べて 17%小さかった ($P < 0.05$)。また、IMM + CLE 群 ($915 \pm 57 \mu\text{m}^2$) の横断面積は IMM 群に比べて 21%大きかった。

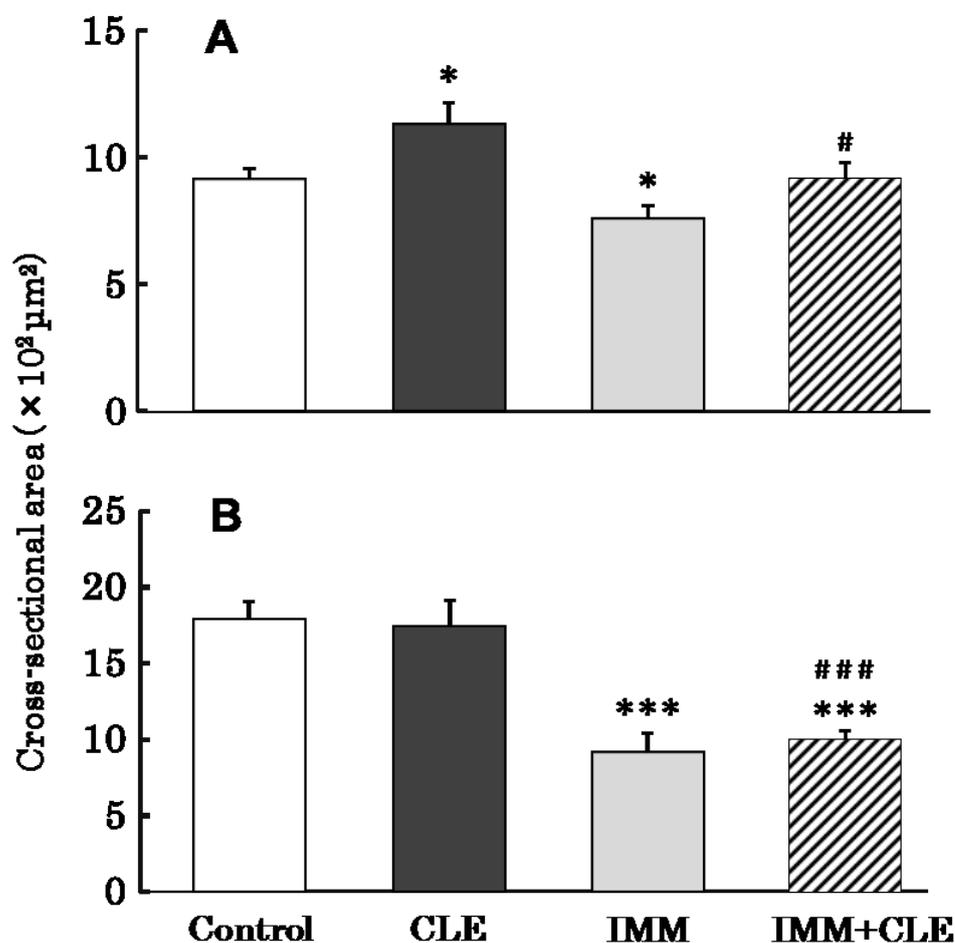


Figure 3-5: Effects of CLE and/or IMM on the cross-sectional area of type IIa fibers in the EDL (A) and soleus (B). Values are presented as the means \pm SE. Shading indicates groups as in Figure 3-1. * $P < 0.05$ and * $P < 0.001$ (vs. control group); # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ (vs. CLE group).**

SOL のタイプ IIa 線維の横断面積の結果を Figure 3-5B に示した。CLE 群 ($1,742 \pm 60$

μm^2) と Control 群 ($1,790 \pm 45 \mu\text{m}^2$) の横断面積は類似していたが, IMM 群 ($918 \pm 46 \mu\text{m}^2$) の横断面積は Control 群に比べて 49%小さかった ($P < 0.001$) . IMM 群と IMM + CLE 群 ($1,003 \pm 58 \mu\text{m}^2$) の横断面積は類似していた.

タイプ IIb およびタイプ IIc 線維の横断面積

EDL のタイプ IIb 線維の横断面積の結果を Figure 3-6A に示した. CLE 群 ($1,907 \pm 104 \mu\text{m}^2$) と Control 群 ($1,800 \pm 81 \mu\text{m}^2$) の横断面積は類似していた. IMM 群 ($1,136 \pm 35 \mu\text{m}^2$) の横断面積は Control 群に比べて 37%小さかった ($P < 0.001$) が, IMM + CLE 群 ($1,376 \pm 98 \mu\text{m}^2$) の横断面積は IMM 群に比べて 21%大きかった.

SOL のタイプ IIc 線維の横断面積の結果を Figure 3-6B に示した. CLE 群 ($1,653 \pm 127 \mu\text{m}^2$) と Control 群 ($1,512 \pm 32 \mu\text{m}^2$) の横断面積は類似していた. IMM 群 ($902 \pm 75 \mu\text{m}^2$) の横断面積は Control 群に比べて 40%小さかった ($P < 0.001$) が, IMM + CLE 群 ($900 \pm 30 \mu\text{m}^2$) と類似していた.

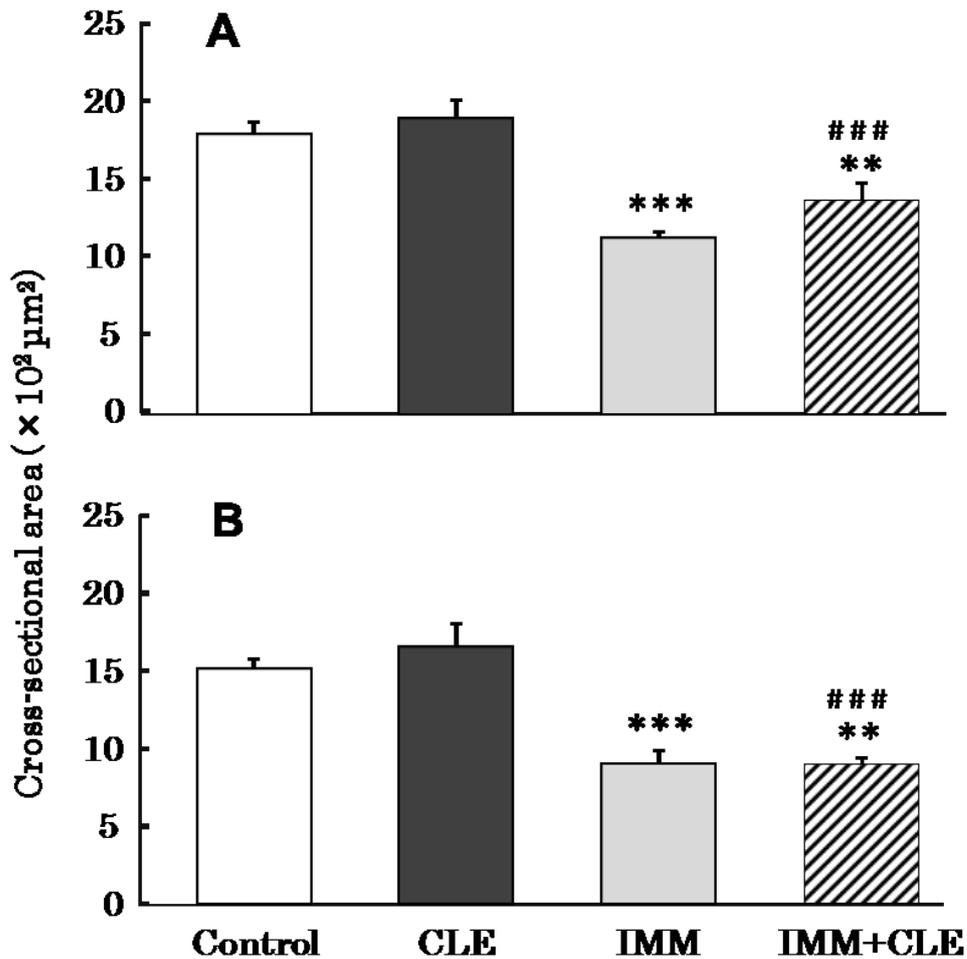


Figure 3-6: Effects of CLE and/or IMM on the cross-sectional area of type IIb fibers in the EDL (A) and type IIc fibers in soleus (B). Values are presented as the means \pm SE. Shading indicates groups as in Figure 3-1. **P < 0.01 and *P < 0.001 (vs. control group); ###P < 0.001 (vs. CLE group).**

筋線維タイプ別面積占有率

EDL のタイプ別面積占有率を Figure 3-7A に示した。タイプ I 線維の面積占有率は、IMM 群で Control 群に比べて高値を示した ($P < 0.05$) が、タイプ IIa および IIb 線維の面積占有率に顕著な変化は観察されなかった。

SOL のタイプ別面積占有率を Figure 3-7B に示した。タイプ I 線維の面積占有率は、IMM 群に比べて IMM + CLE 群で低値を示した ($P < 0.05$)。タイプ IIa 線維の面積占有率において、

Control 群に比べて CLE 群で高い値を示した ($P < 0.05$). タイプ IIc 線維の面積占有率においては, IMM 群に比べて IMM + CLE 群で高い値を示した ($P < 0.05$).

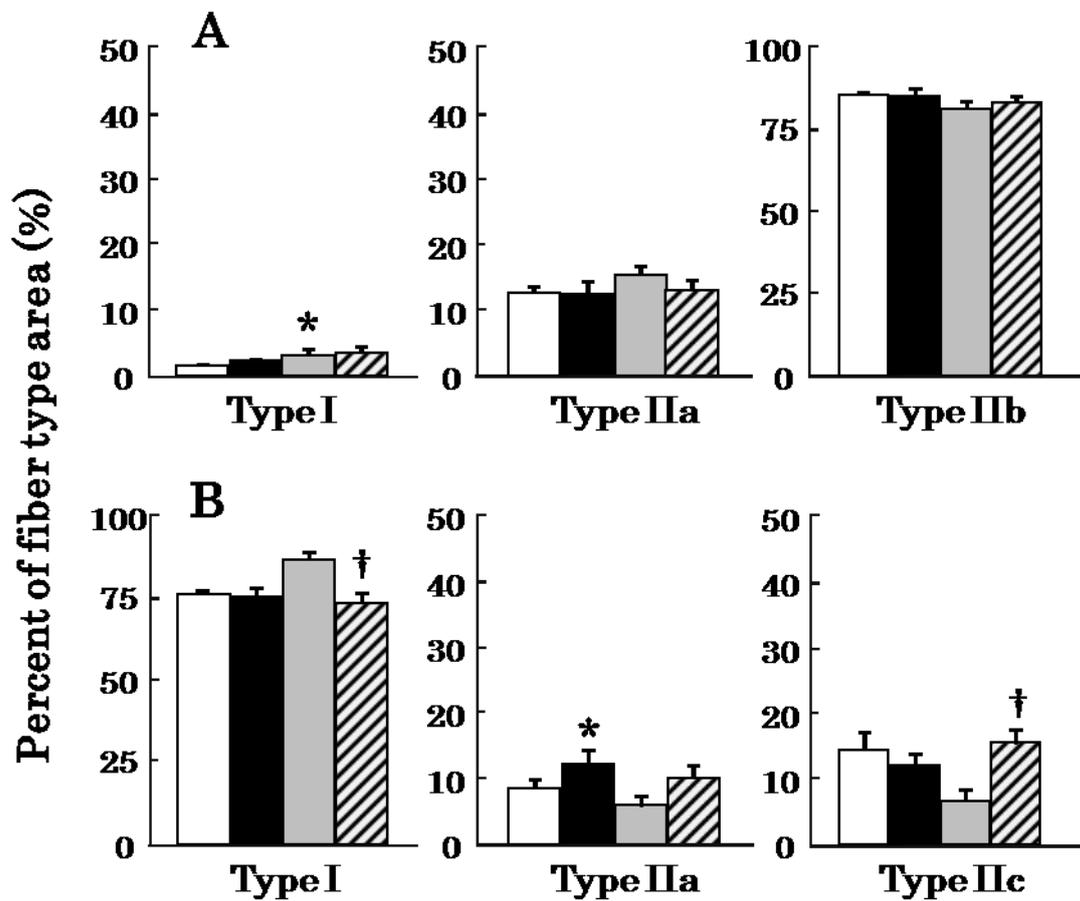


Figure 3-7: Effects of CLE and/or IMM on percent fiber type in the EDL (A) and soleus (B). Values are presented as the means \pm SE. □: control group; ■: CLE group; ▒: IMM group; ▨: IMM+CLE group. * $P < 0.05$ (vs. control group); † $P < 0.05$ (vs. IMM group).

3-4 考察

本研究において、後肢ギプス固定されたラットへの CLE 投与は、EDL の筋重量を増加させた。また、CLE 投与は EDL のタイプ I と II 線維の横断面積を増加させたが、ヒラメ筋の筋重量やタイプ I と II 線維の横断面積には影響しなかった (Figure 3-2 ~ 3-6)。EDL のタイプ IIa と IIb 線維の横断面積は、IMM 群よりも IMM + CLE 群で高値を示した (Figure 3-5 and 3-6)。さらに、いずれの群でも EDL のタイプ IIa と IIb の割合は併せて 95%以上であった (Figure 3-7A)。したがって、固定による EDL の萎縮に対する CLE の抑制効果は、タイプ II 線維の横断面積の増加と関連していると考えられた (Figure 3-2, 3-5 ~ 3-7A)。

EDL の筋線維横断面積の変化

EDL のタイプ I 線維の横断面積は IMM 群に比べて IMM + CLE 群で大きく (Figure 3-4A)、このことは EDL のタイプ I 線維は固定中にも活動でき、CLE の影響を受けていた可能性を示唆していた。本研究におけるギプス固定では、後肢のつま先は固定されていなかった。EDL は指を伸ばす働きをするため、この筋のタイプ I 線維は固定中でも動員されていた可能性がある。実際、つま先動作に関わらない SOL におけるタイプ I 線維の横断面積は Control 群よりも IMM 群で有意に小さかったが (Figure 3-4B)、EDL における IMM 群のタイプ I 線維の横断面積は Control 群と同様だった (Figure 3-4A)。ただし、これらの筋の活動の違いは筋電図等を用いて個別別に確認されていないため、この現象を明らかにするためには更なる研究が必要と考えられる。

対照的に、EDL におけるタイプ IIa と IIb 線維の横断面積は、IMM 群に比べて IMM + CLE 群のいずれのタイプの筋線維も約 20%大きかった (Figure 3-5 and 3-6)。EDL でのタイプ IIa と IIb 線維の占有率は 95%以上であり、EDL の各タイプの筋線維の占有率には CLE 投与や固定による顕著な影響は観察されなかった (Figure 3-2 and 3-7A)。これらの結果は、CLE の投与により、固定による EDL のタイプ IIa と IIb 線維における横断面積の低下が抑制される可能性を示唆している (Figure 3-2, 3-5 and 3-6)。また、これらの結果は、先の研究の

結果と一致していた (Rajab et al. 2000, Kitaura et al. 2001, Sato et al. 2008, Gonçalves et al. 2012).

SOL における筋線維横断面積の変化

固定による SOL での各タイプにおける筋線維の萎縮に対して、CLE の抑制効果は観察されなかった (Figure 3-3 ~ 3-6). しかし、CLE の投与により、固定による SOL の萎縮に伴う各タイプの筋線維における占有率の変化が抑制された (Figure 3-7B). 本研究で用いた固定期間の 9 日間は、SOL における筋線維のわずかなタイプ移行を引き起こすのに十分な期間であった可能性がある。ラットの SOL における筋線維横断面積に対する CLE の影響は、実験動物、性別、CLE の投与量およびその他の要因によって異なり、Zeman ら (1988) は、CLE 投与が SOL の筋線維に著しい変化をもたらすには、およそ 2 週間を要することを報告している。したがって、SOL の筋線維横断面積に対する CLE の影響を解明するためには、さまざまな固定期間での研究の実施が必要であるかもしれない。

筋の活動と萎縮

本研究では、固定は SOL の重量を Control 群のおよそ 50%まで低下させた。これらの結果は、先の報告 (Sato et al. 2011) の結果と一致している。また固定は、EDL のタイプ IIb 線維の横断面積をタイプ I と IIa 線維に比べて顕著に低下させた (Figure 3-4 ~ 3-6). 固定された後肢骨格筋では収縮活動は低下するが (Walmsle et al. 1978, Booth 1982, Founier et al. 1983, Ohira and Edgerton 1994, Stevens et al. 2000), 活動強度に従って筋線維はタイプ I <タイプ IIa <タイプ IIb の順に動員されていることから (Nakatani et al. 2000), 相動的な活動を担う EDL ではタイプ IIb 線維の活動量の低下が大きく、タイプ IIb 線維の萎縮が顕著だった可能性が考えられた。

対照的に、SOL のような遅筋は、タイプ I と IIa 線維で構成され、歩行や姿勢制御のような長時間の活動中に相対的に低強度の活動を示す。したがって、SOL での筋線維の顕著な萎

縮は、固定による持続的な機械的負荷の低下と密接な関係があると考えられる。Fournier ら (1983) は筋電図を用いて、ラット後肢の固定が SOL の活動を約 50%減少させることを観察した。Booth (1982) は、SOL の収縮活動が対照群よりも固定群で 5~10%低かったことを報告している。これらの結果は、SOL のタイプ I と IIa 線維の動員が固定によって著しく低下して、SOL の筋線維横断面積を小さくすることを示唆するものである。

CLE の作用

CLE の投与は骨格筋肥大を誘発し、骨格筋萎縮を抑制する (Rajab et al. 2000, Kitaura et al. 2001, Sato et al. 2011a, 2012, Gonçalves et al. 2012)。これらの CLE によって誘発される現象は、 β_2 -AR を介したタンパク質合成速度の亢進やタンパク質分解速度の低下によって引き起こされる (Kitaura et al. 2001, Sato et al. 2011a, 2012)。これらのことは、 β_2 -AR が CLE の骨格筋肥大と抗萎縮効果の両方に関与していることを示している (Kitaura et al. 2001, Sato et al. 2008, 2010, 2011a, 2012)。本研究では、これらの現象が特に EDL で特異的に起こっていた可能性が考えられた。

固定とタンパク質発現

最近、我々の研究グループは、固定がラットにおける遅筋の SOL でのグルココルチコイド受容体の mRNA 発現とタンパク質発現を選択的に低下させることを発見した (Sato et al. 2011c)。さらに、この研究では、固定による筋萎縮の程度が EDL よりも SOL で大きいことを示した。このことは、固定中の SOL の反応性が、速筋の EDL の反応性とは異なることを示唆するものである。したがって、固定中の EDL と SOL に対する CLE の萎縮に対する抑制作用に違いが生じる理由として、筋線維はそのタイプによって異なる萎縮反応メカニズムを有している可能性が考えられる。

本研究の限界

本研究では、同化作用を有する β_2 作動薬である CLE の骨格筋に対する萎縮抑制作用を検討した。本研究では筋萎縮モデルとして、臨床的治療として一般的に用いられているギプス固定を採用した。本研究で採用したラットの後肢骨格筋の固定方法は、先行研究を参考にして固定時の関節角度や固定期間の条件を決定した。しかしながら、これらの条件の組み合わせは無数にあるため、本研究結果がすべての固定条件下で得られるとは限らない。したがって、よりヒトでのギプス固定と同様な現象が得られる条件下での実証が必要である。

また、本研究で用いた筋線維分類法は、筋線維における ATPase の pH に対する感受性の違いを応用した染色方法を用いていた。骨格筋は不活動等により、収縮タンパク質におけるサブタイプの組成も変化することが知られている。採用した染色方法では、タンパク質レベルでの筋線維のタイプ移行を観察することは困難であるため、筋線維における収縮タンパク質の変化も考慮できる免疫組織化学的染色法の採用が不可欠であると考えられた。

3-5 結論

本研究では、固定による筋萎縮に対する CLE の萎縮抑制効果は、遅筋である SOL では観察されず、速筋の EDL に特異的であること、そして、筋線維の横断面積に対する CLE の影響は筋線維のタイプによっても異なることが示唆された。

第4章 クレンプテロール投与が萎縮ヒラメ筋の回復に与える影響 (実験2)

4-1 緒言

様々な原因により不活動を強いられた骨格筋では筋萎縮が生じる。不活動の一因ともなる脚の固定および固定解放後の筋の回復（再成長）に関して、ヒト (Vandenborne et al. 1998, Hortobagyi et al. 2000, Stevens et al. 2006, Christensen et al. 2008, Hvid et al. 2014) や実験動物(Booth 1978, Booth and Seider 1979, Vazeille et al. 2008, Magne et al. 2011, Lang et al. 2012)を用いた研究が数多く行われており、いずれの研究においても筋線維横断面積の不活動による低下と回復期での増加を報告している。

骨格筋線維は多核細胞であり、その横断面積（細胞質量）の変化は筋核数の変化と密接に関係していることが報告されている (Allen et al. 1995, Hikida et al. 1997, McCall et al. 1998, Smith et al. 2000)。また、一つの筋核が遺伝発現やタンパク質合成などの機能を支配できる筋細胞量の領域には上限があると考えられている (Pavlati et al. 1989)。したがって、不活動等により萎縮した筋線維で減少した筋核は (Allen et al. 1995, Hikida et al. 1997, McCall et al. 1998, Smith et al. 2000)、不活動状態から解放された再負荷過程では、その数の追加が必要になると予想される。この筋核の増加の際に重要な役割を果たすのが筋衛星細胞であり、筋衛星細胞は骨格筋が過度な力学的負荷を受けると増殖因子やサイトカインなどによって活性化されて増殖を開始し、その後、分化して既存の筋線維と融合することによって筋組織を再構築し肥大を促す (Hawke and Garry 2001)。したがって、萎縮からの回復時における筋への再負荷に伴う筋の再成長では、筋核の増加が起こるものと考えられる。

β_2 -アゴニストであるクレンプテロール (CLE) は、筋タンパク質合成の亢進、筋タンパク質分解の抑制またはその両方により骨格筋を肥大させることが報告されている (Lynch and Ryall 2008)。また、CLE は様々な増殖因子の分泌を亢進させたり (Verhoeckx 2006)、衛星細胞の増殖と分化および筋線維への動員を高めて筋肥大を促進することも報告されている (Spurlock et al. 2006)。したがって、筋萎縮後の回復期における CLE 投与には、筋核の増加

を伴う筋線維の肥大を促進する作用が期待される。

そこで我々は、固定により萎縮した骨格筋の回復期での CLE 投与の影響を、筋核と筋線維横断面積に着目して組織化学的に検討を行った。

4-2 方法

実験動物

実験には 7 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄ラット (CLEA, Japan) を 28 匹用いた。ラットは一週間の予備飼育を含め、室温 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50%、12 時間の明暗サイクルにて飼育した。給餌には固形飼料 (CE-2; CLEA, Japan) を用いて、飲水とともに自由摂取とした。実験手順と実験動物の飼養は愛知教育大学実験動物委員会の承認を得て(承認番号: 201601002)、日本生理学会の「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」に基づいて行った。

実験プロトコール

予備飼育後、ラットは無作為に 7 匹ずつ以下の 4 群に分けた。1) 後肢ギプス固定を 9 日間行うギプス群 (IMM 群)、2) ギプス群の対照群 (CON 群)、3) ギプス固定解放後に 7 日間の通常飼育を行う群 (RCON 群)、4) ギプス固定解放後の 7 日間の通常飼育中に CLE 投与を行う群 (RCLE 群)。

後肢ギプス固定は、ペントバルビタールを用いた麻酔下の弛緩状態 (底屈 20 度) で Booth と Kelso (1973) の方法に基づき、9 日間行った。ギプス固定には紙粘土で作成した副木を用いて足関節角度を一定に保ち、足関節を包帯式ギプス (スコッチキャスト 3-J ; 3M 社) で固定した。さらに膝関節も固定した (Figure 4-1)。なお、ギプス固定期間中にギプスが外れたり、足部に浮腫を起こしたラットは実験から除外したため、サンプル数は最終的に各群 7 匹となった。

ギプス固定 9 日後、IMM 群、RCON 群、RCLE 群のラットの後肢ギプスを外した。IMM 群のラットはクロロホルム麻酔下にて、頸部より放血させた後、ヒラメ筋 (Soleus: SOL) を

摘出した。同時に、CON 群のラットより同様に筋の摘出を行った。

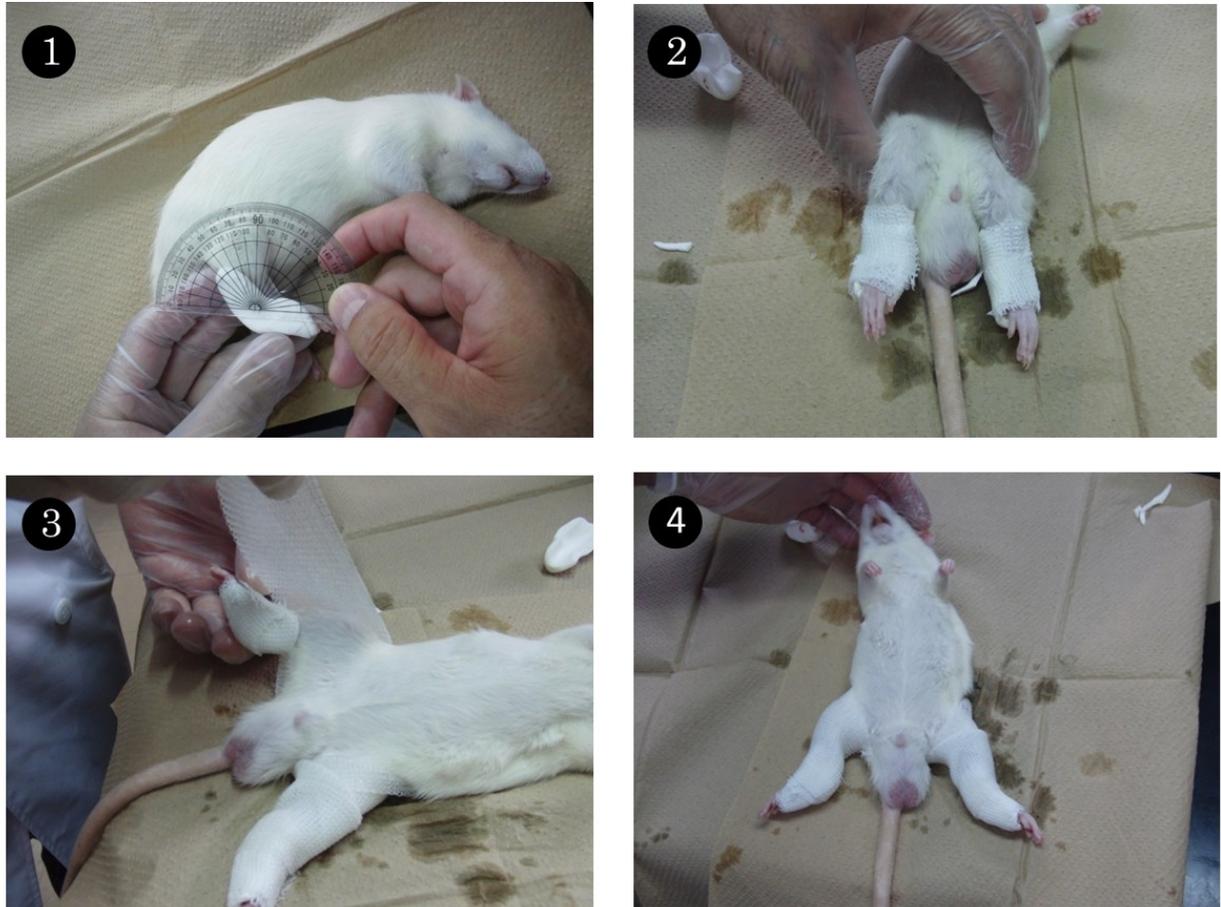


Figure 4-1. Immobilization using a plaster cast. 1) Adjustment of the ankle angle by a paper clay splint. 2) Fixed ankle joint using the bandage-type plaster cast. 3) Fixed knee joint using the same material. 4) Immobilized hind limb.

ギプス固定解放後の 7 日間の回復期間中、RCLE 群のラットには CLE 溶液 (1mg /体重 1kg / 日) を毎日頸背部に皮下注射投与した。CLE 溶液は、CLE-hydrochloride (シグマ社) を 0.9% の生理食塩水を用いて希釈して作成した。RCON 群のラットには、RCLE 群に投与した CLE 溶液と等量の生理食塩水を同様に投与した。7 日間の回復期間後、先と同様な方法で RCON 群と RCLE 群より SOL を摘出した。摘出した筋は、液体窒素で冷却したイソペンタン中にて急速凍結させ、組織化学的分析を行うまで -80°C で保存した。

免疫組織化学染色

組織化学染色のために、 -25°C でマイクロトームにて、SOLの筋腹部より厚さ $10\mu\text{m}$ の連続切片を作成し、剥離防止のコートがなされたスライドガラスに張り付けた。免疫組織化学染色は、切片を室温で約20分間乾燥させた後、リン酸緩衝液に20分間、さらにブロッキング溶液に15~20分間浸した。その後、一次抗体（遅筋型抗ミオシン重鎖抗体，M8421，SIGMA）を組織上に浸し、組織が乾燥しないように保湿チャンバーに入れて冷蔵室（ 4°C ）で一晩放置し反応させた。反応後、PBSで洗浄し、二次抗体（Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse IgG (1:200, A11001, Thermo Fisher Scientific, IL, USA)）を組織上に浸し、光を遮断して一時間反応させた後、再びPBSで洗浄した。これらの免疫組織染色が施された切片に対して、核を同定するためにDAPI染色（H1200, VECTOR）を行った後に封入した。

筋線維の分析方法

抗ミオシン重鎖抗体を用いた蛍光免疫組織染色結果とDAPI染色結果の双方の画像をパーソナルコンピュータに取り込み重ね合わせ、筋線維のタイプ分類を行うと同時に筋線維一本あたりの核を数えた（Figure 4-2）。また、画像処理ソフト（ImageJ ver. 1.51, NIH）を用いて筋線維の横断面積を計測した。なお、筋線維のタイプ分類は遅筋型抗体にポジティブだった筋線維をタイプ I とし、ネガティブだった筋線維をタイプ II とした。筋線維の横断面積と核数より一つの核あたりの支配領域サイズ（核ドメインサイズ）を算出した。

統計処理

得られたデータは平均値±標準偏差で表した。実験データの分析には Tukey-Kramer 法を用いた。統計学的有意水準は危険率 5%未満とした（ $P < 0.05$ ）。

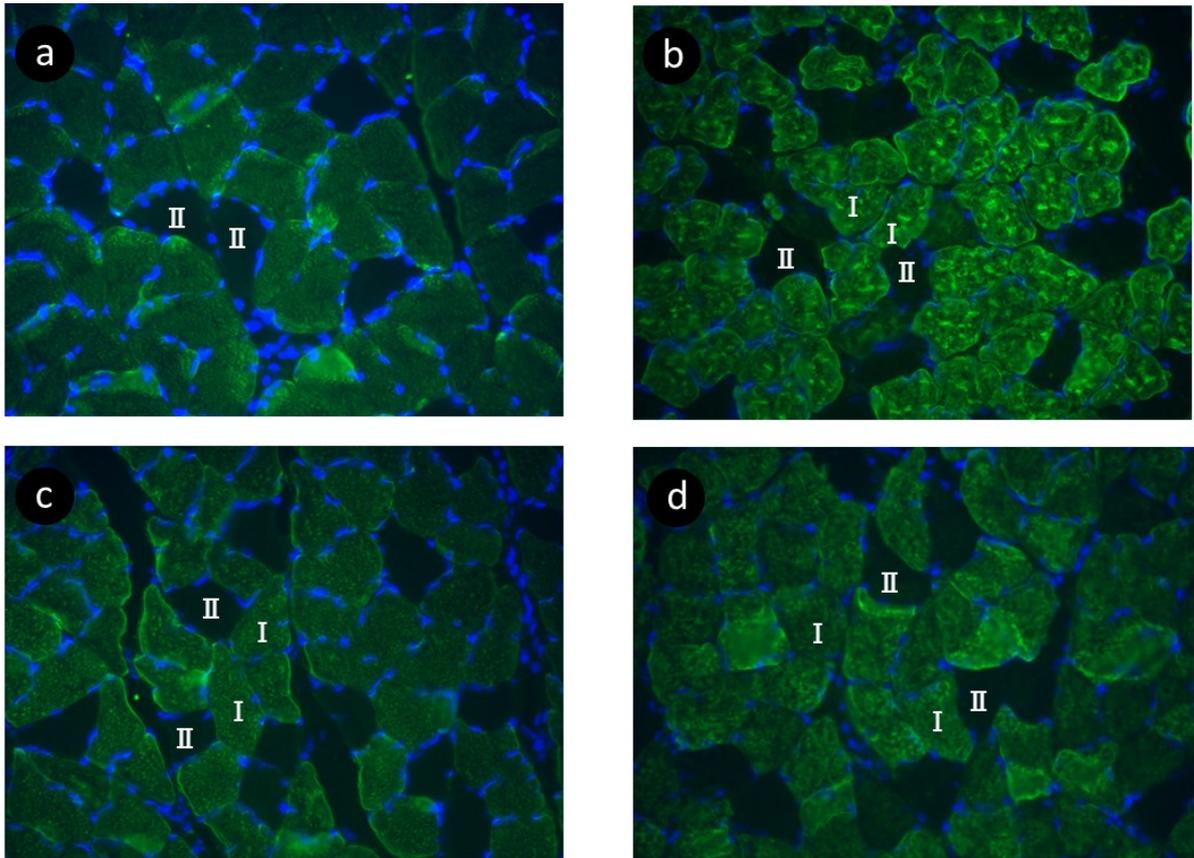


Figure 4-2. Serial transverse section of the soleus muscle of rat in the CON (a), IMM (b), RCON (c), RCLE (d) groups. Sections were stained for immunohistochemical and DAPI staining. I, type I fiber; II, type II fiber

4-3 結果

体重及び筋重量の変化

体重、筋重量および体重あたりの筋重量の結果を Table 4-1 に表した. IMM 群の体重は CON 群に比べて有意に低値を示した ($P < 0.05$). RCON 群と RCLE 群の体重には CON 群との間で有意な差はみられず, RCLE 群の体重は IMM 群に比べて有意に高い値を示した ($P < 0.05$). IMM 群の SOL の筋重量と相対的筋重量は, CON 群に比べて有意に低値を示した ($P < 0.05$). RCON 群と RCLE 群の筋重量と相対的筋重量は IMM 群と比べて有意に高値を示したが ($P < 0.05$), RCLE 群の相対的筋重量には CON 群との間で有意な差は認められなかった.

Table 4-1. Changes of body weight and soleus muscle mass

	CON	IMM	RCON	RCLE
Body mass (g)	313±23	264±21 ^a	288±16	293±17 ^b
Muscle weight (mg)	107±8	57±11 ^a	77±12 ^{a, b}	91±7 ^{a, b}
Muscle weight/body mass (mg/g)	0.34±0.02	0.22±0.03 ^a	0.27±0.04 ^{a, b}	0.31±0.03 ^b

Values are presented as the means ±SD.

Statistic: ^a $P < 0.05$ (vs. CON); ^b $P < 0.05$ (vs. IMM).

筋線維横断面積の変化

筋線維横断面積の結果を Figure 4-3 に表した. IMM 群 ($1,838 \pm 403 \mu\text{m}^2$) のタイプ I 線維の筋線維横断面積は CON 群 ($2,717 \pm 213 \mu\text{m}^2$) に比べて有意に低値を示した ($P < 0.05$). RCON 群 ($2,298 \pm 475 \mu\text{m}^2$) と RCLE 群 ($2,483 \pm 212 \mu\text{m}^2$) のタイプ I 線維の横断面積には CON 群との間で有意差はみられなかった. RCLE 群のタイプ I 線維の横断面積は IMM 群と比べて有意に高値を示した ($P < 0.05$). IMM 群 ($1,692 \pm 386 \mu\text{m}^2$) のタイプ II 線維の筋線維横断面積は CON 群 ($2,310 \pm 199 \mu\text{m}^2$) に比べて有意に低値を示した ($P < 0.05$). RCON 群 ($2,043 \pm 402 \mu\text{m}^2$) と RCLE 群 ($2,187 \pm 296 \mu\text{m}^2$) のタイプ II 線維の横断面積には CON 群との間で有意差はみられなかった.

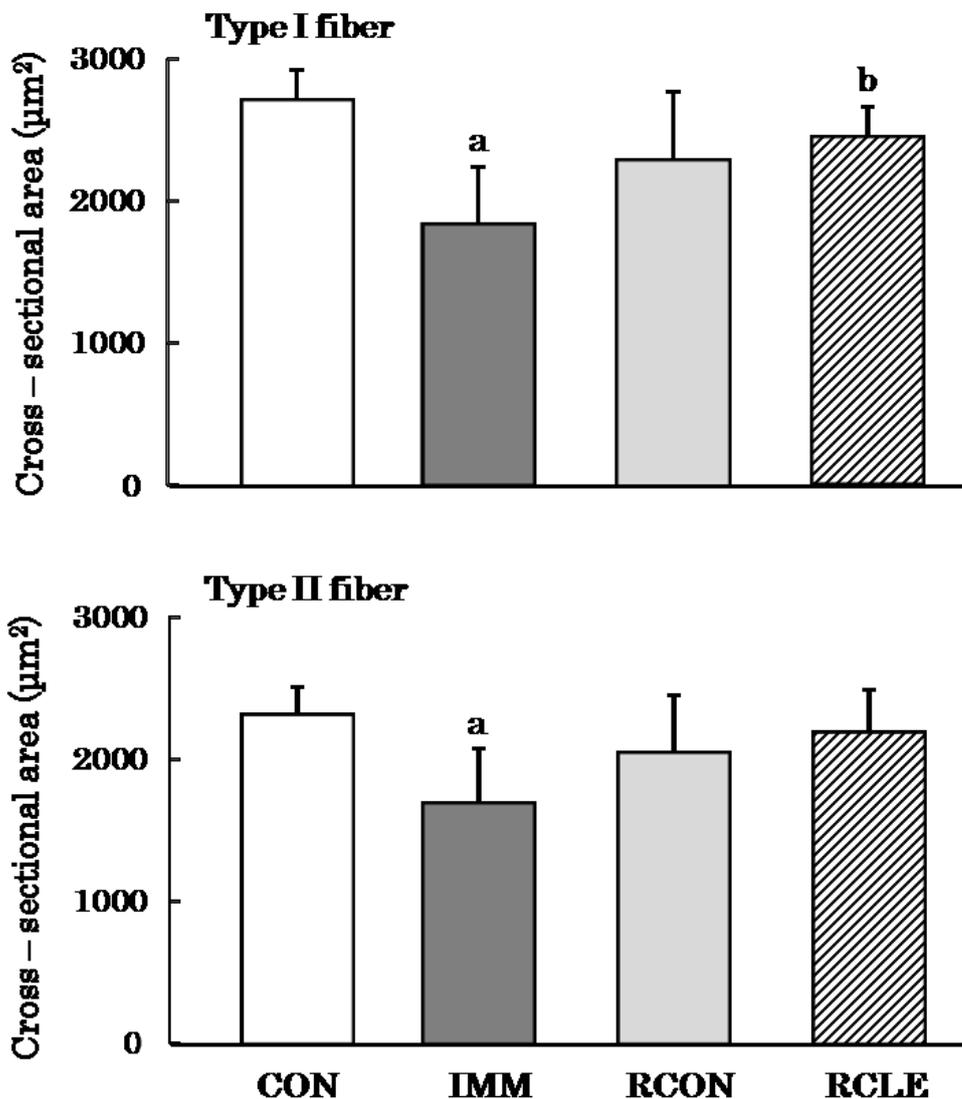


Figure 4-3. Mean cross-sectional area of each muscle fiber type in the soleus muscle from each group. Data shown are mean \pm SD. ^a $P < 0.05$ (vs. CON group) and ^b $P < 0.05$ (vs. IMM group)

筋核数及び核ドメインサイズの変化

筋線維一本あたりの核数の結果を Figure 4-4 に表した。RCON 群 (5.9 ± 1.2 個) と RCLE 群 (5.5 ± 0.6 個) のタイプ I 線維の核数は CON 群 (7.3 ± 0.7 個) に比べて有意に低値を示した ($P < 0.05$)。RCLE 群 (5.1 ± 0.9 個) のタイプ II 線維の核数は CON 群 (6.8 ± 1.0 個) に比べて有意に低値を示した ($P < 0.05$)。

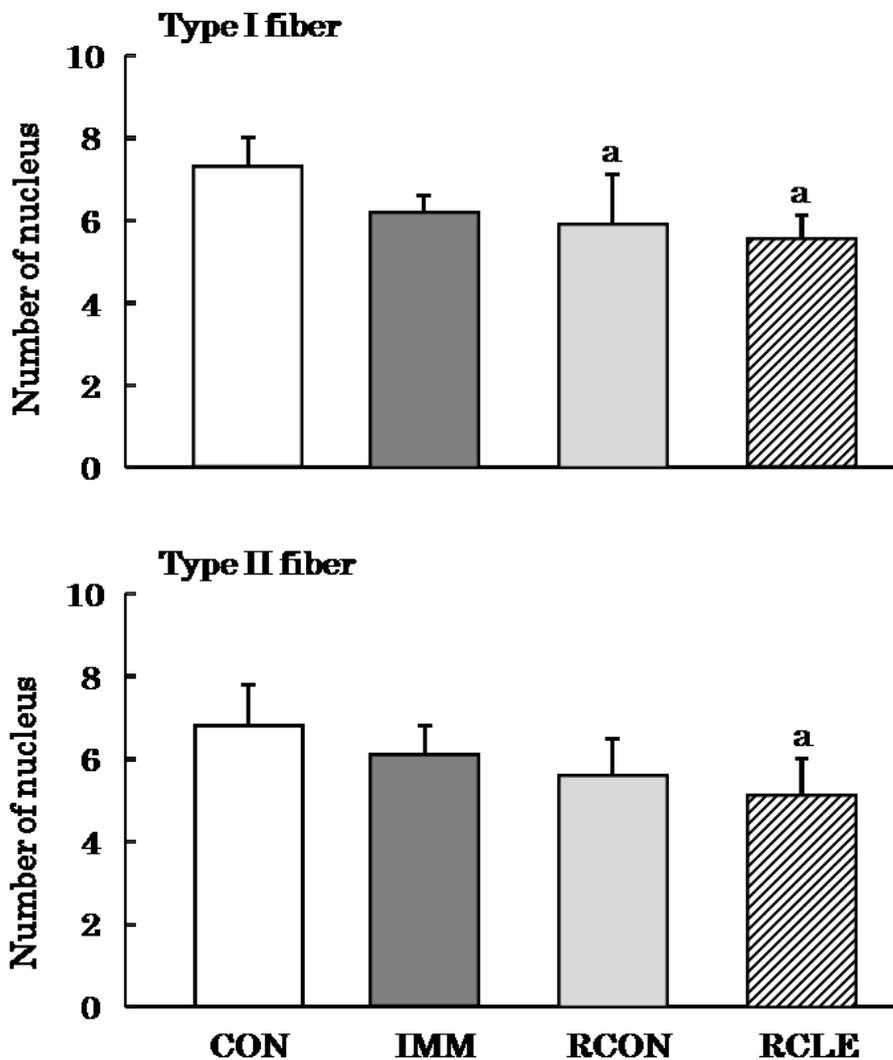


Figure 4-4. Number of nucleus in type I and type II fiber of soleus muscle in each groups. Data shown are mean \pm SD. ^a $P < 0.05$ (vs. CON group)

核ドメインサイズの結果を Figure 4-5 に表した。IMM 群 ($296 \pm 64 \mu\text{m}^2$) におけるタイプ I 線維の核ドメインサイズには、CON 群 ($372 \pm 53 \mu\text{m}^2$) との間で有意な差はみられなかった。RCON 群 ($396 \pm 67 \mu\text{m}^2$) と RCLE 群 ($447 \pm 50 \mu\text{m}^2$) のタイプ I 線維の核ドメインサイズは、IMM 群に比べて有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。IMM 群 ($275 \pm 38 \mu\text{m}^2$) におけるタイプ II 線維の核ドメインサイズには、CON ($344 \pm 53 \mu\text{m}^2$) 群との間で有意な差はみら

れなかった. RCON 群 ($363 \pm 38 \mu\text{m}^2$) と RCLE 群 ($433 \pm 47 \mu\text{m}^2$) のタイプ II 線維の核ドメインサイズは IMM 群に比べて有意に高い値を示した ($P < 0.05$). さらに、RCLE 群のタイプ II 線維における核ドメインサイズは CON 群より有意に高値を示した ($P < 0.05$).

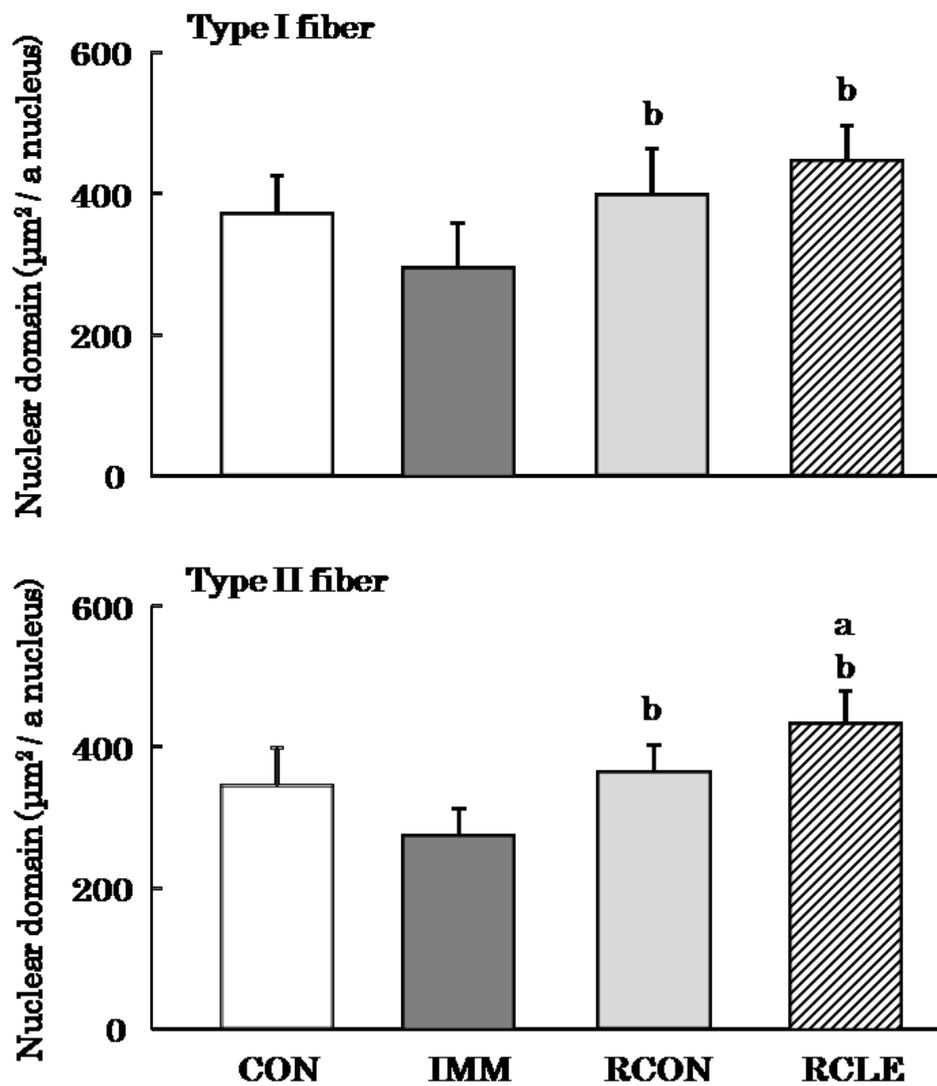


Figure 4-5. Nuclear domain in type I and type II fiber of soleus muscle in each groups. Data shown are mean \pm SD. ^a $P < 0.05$ (vs. CON group) and ^b $P < 0.05$ (vs. IMM group)

4-4 考察

本研究では、後肢固定により萎縮したヒラメ筋の回復時における β_2 -アドレナリン受容体作動薬である CLE の投与が、筋線維の横断面積、核数および核ドメインサイズに及ぼす影響を検討した。

筋線維横断面積の変化

9 日間のギプス固定後、SOL のタイプ I とタイプ II 筋線維の双方で萎縮が観察された。また、その横断面積の萎縮の程度はタイプ II 線維 (26.8%) に比べてタイプ I 線維 (32.4%) で大きい傾向にあり、先の報告 (Tomanek and Lund 1974, Edgerton et al. 1975) と同様であり、持続的活動に寄与する遅筋線維は不活動の影響をより受けやすいことが示された。

筋核数の変化

後肢固定により筋線維一本あたりの核数はタイプ I とタイプ II 線維で、それぞれ 15% と 10% 減少する傾向にあった。Wanek と Snow (2000) は、ラットの膝関節と足関節を 90 度で固定を行い、異なる固定期間 (2, 4, 6, 8, 10 日間) で電子顕微鏡を用いてヒラメ筋の筋核の観察を行った。その結果、筋核の減少は観察されなかったが筋衛星細胞の減少を報告している。また、Smith ら (2000) は、ウサギの後肢を十分に底屈させた状態で足関節の固定を行い、固定 6 日目に組織化学的分析を行い、アポトーシスによる筋核の減少を報告している。さらに、彼らは萎縮に伴う早期の核の減少は非筋核細胞のアポトーシスによる可能性を示唆している。筋衛星細胞は筋線維で観察される核の約 8% であることから (Schmalbruch and Hellhammer 1977)、筋衛星細胞が筋線維の萎縮によって優先的に消失したとしても、総核数は有意に低下しない可能性も考えられる。本研究で用いた DAPI 染色だけでは筋核と筋衛星細胞を区別することはできないが、観察された核数の減少傾向は主に筋衛星細胞の減少による可能性が高いと考えられた。

核ドメインサイズの変化

後肢固定により核ドメインサイズはタイプ I とタイプ II 線維で共に約 20%低下した。廃用性萎縮に伴う筋核ドメインサイズの変化に関しては様々な報告がある。微小重力環境により萎縮したラットの SOL では筋核ドメインサイズは遅筋線維では低下するが、速筋線維では変化しなかったことが報告されている (Allen et al. 1996)。ラット脊髄離断モデルでは、萎縮した SOL の筋線維はタイプに関わらず筋核ドメインサイズを低下させることが報告されている (Zhong et al. 2005)。ラット後肢懸垂モデルでは、SOL の筋核数の低下に比べて筋線維横断面積の低下が大きく、結果として筋核ドメインサイズの低下が起こることを報告している (Allen et al. 1997, Gallegly et al. 2004, Leeuwenburgh et al. 2005)。また、Gallegly ら (2004) は、後肢懸垂による筋核ドメインサイズの低下は懸垂開始の二週目に顕著になることを報告している。このように、筋核ドメインサイズの低下は筋萎縮の惹起の方法やその期間によって異なることが示されている。さらに、本研究と同様な後肢固定を用いた研究において、Smith ら (2000) は萎縮した SOL では筋核ドメインサイズは後肢固定 6 日でも変化しなかったことを報告している。これらのことから、本研究で用いた比較的短期間の後肢固定では、核ドメインサイズを変化させるほどの筋核または筋線維サイズの変化の程度は大きくなかったと考えられた。

CLE 投与による筋線維横断面積の変化

一週間の通常飼育回復で、タイプ I とタイプ II 線維の横断面積は、IMM 群に対してそれぞれ 25%と 21%回復し、CON 群との有意な違いはみられなかった。CLE 投与を行った場合、IMM 群の横断面積に対して、その回復率はタイプ I と II 線維でそれぞれ 33%と 29%であり、筋線維のタイプに関わらず回復が促進された。CLE 投与が骨格筋に及ぼす影響を観察した研究では、その影響は主に速筋で顕著であると報告されている (Rajab et al. 2000, Yimlamai et al. 2005, Sato et al. 2008)。一方で、それらの研究の中には、遅筋では CLE によるタンパク質の同化促進作用は観察されなかったという報告もある (Sato et al. 2008)。本研究の結果は

これらとは異なる現象を示すものであった。タンパク質の同化促進作用に及ぼす CLE の影響を個々の筋線維タイプ別に検討した報告はみられないが、遅筋と速筋ではタンパク質の同化促進作用における細胞内情報伝達経路が異なるとの報告がある (Yimlamai et al. 2005, Shi et al. 2007, Pearen et al. 2008, Kawasaki et al. 2011)。したがって、CLE に対する細胞内シグナリングの応答もタイプ I と II 線維で異なることが十分に考えられる。さらに、筋線維は一般的にタイプ I, タイプ II 線維の順に動員されるため (Henning and Lomo 1985), 本研究における固定解放後の通常活動再開においては、日常活動がタイプ I においてより過度な負荷となり、 β_2 受容体の感受性が亢進してタイプ I 線維の同化作用が刺激された可能性も考えられた。

CLE 投与による核および核ドメインサイズの変化

萎縮に伴い減少傾向にあった核は一週間では回復することなく、CLE の投与によっても回復がみられなかった。一方で、筋線維横断面積は通常回復で両タイプの筋線維ともに 20%以上の回復を示した。これらのことにより、核ドメインサイズは萎縮筋に比べて有意に高値を示した。また、CLE 投与により筋線維横断面積は約 30%増加したため、核ドメインサイズはさらに大きくなり、CON 群よりも高い値を示した。CLE は筋タンパク質の同化促進と分解抑制により、筋核の増加なしに筋線維を成長させることが報告されている (Rehfeldt et al. 1994, Rehfeldt et al. 1997)。また、筋線維横断面積の増加に伴い筋核ドメインサイズも増加するが、筋核ドメインサイズには上限が存在し、更なる横断面積の増加が起こるためには新たな筋核の追加が必要になると考えられている (O' Connor and Pavlath 2007)。このことから、本研究では、CLE により筋細胞質は増加したものの、両筋線維タイプにおいて核ドメインサイズが新たな核の追加を必要とする上限サイズには達していなかったと考えられた。

本研究の限界

本研究では、萎縮した骨格筋の回復期に同化作用を有する β_2 作動薬である CLE を投与し、

回復促進作用の有無を検討した。先の研究でギプス固定により後肢骨格筋の萎縮が確認されていることから、本研究においても同じ固定方法を用いて筋萎縮を誘発し、その後の回復を観察した。通常飼育による 7 日間の回復後、筋萎縮からの回復が観察されたが、CLE 投与による回復促進作用は小さかった。本研究は回復期間を 7 日間とし、被験筋に遅筋である SOL を用いただけであった。したがって、CLE の影響をより詳細に観察するためには、速筋を被験筋に追加したり、回復期間を変えた研究の必要性がある。

また、本研究では核の同定のために DAPI 染色を用いた、しかしながら、この染色法では毛細血管由来の核も検出してしまうため、筋衛星細胞や筋核を識別することが不可能であった。さらに、筋衛星細胞は細胞膜上に、筋核は細胞膜の内側に局在するため、これらを識別するためには、細胞膜を同定する染色法を用いることが望ましいと考えられる。

4-5 結論

骨格筋の萎縮からの回復期における CLE の投与は、遅筋である SOL の回復を促進する傾向があることが示された。

第5章 クレンプテロールが固定によるラット後肢骨格筋の萎縮後の回復に与える影響

(実験3)

5-1 緒言

不活動が骨格筋の萎縮を誘発することはよく知られている。臨床治療として用いられているギプス固定は不活動の一因でもある。ギプス固定とその後の回復での脚骨格筋の組織学的変化は、ヒト (Vandenborne et al. 1998, Hortobagyi et al. 2000, Stevens et al. 2006, Christensen et al. 2008, Hvid et al. 2014) や実験動物 (Booth 1978, Booth and Seider 1979, Vazelle et al. 2008, Magne et al. 2011, Lang et al. 2012) で広範に研究されている。これらの研究では、いずれも固定後に筋線維の横断面積は低下し、回復期間中に再成長することを報告している。筋線維は多核細胞であり、筋核数の変化は筋線維横断面積の変化と密接に関連していると報告されている (Allen et al. 1995, Hikida et al. 1997, McCall et al. 1998, Smith et al. 2000)。さらに、1つの筋核が遺伝子発現やタンパク質合成などの機能を制御できる筋細胞の領域 (筋細胞質量) には上限があると考えられている (Pavlati et al. 1989)。したがって、筋線維萎縮に関連する筋核数の減少は、回復期におけるその後の筋の再成長に伴って増加する可能性がある。

クレンプテロール (CLE) は、喘息による気管支痙攣の治療のために以前より使用されている β_2 作動薬であるが、タンパク質合成の亢進やタンパク質分解の阻害により筋肥大を誘発することが知られている (Lynch and Ryall 2008)。また、CLE は様々な成長因子の分泌を増加させ (Verhoeckx et al. 2006)、筋衛星細胞の増殖と分化およびその動員を誘導して、筋肥大を加速すると報告されている (Spurlock et al. 2006)。したがって、CLE は筋核数を増加させ、萎縮した筋線維の回復中の再成長を促進させる可能性がある。

これらの CLE の作用に着目し、この作動薬が萎縮した筋の回復を促進するか否かを確認するために、ギプス固定後の速筋の足底筋と遅筋のヒラメ筋の筋核数と筋線維横断面積を検討することとした。

5-2 方法

実験動物

7週齢SD系雄性ラット (CLEA Japan) 24匹を、5日間新しい環境に慣れさせた。ラットは、温度 (23 ~ 25 °C) および湿度 (50 ~ 60 %) の制御下にて、12時間の明暗サイクルの飼育室で、ケージにて個別飼育した。実験動物用飼料 (CE-2; CLEA, Japan) は摂餌量が同様になるように給餌し、飲水は自由摂取とした。実験手順と動物の世話は、愛知教育大学の動物倫理委員会の承認を得て(No. AUE20170102AND) , 1964年のヘルシンキ宣言に基づく日本生理学会の生理学領域における「動物実験に関する基本的指針」に従って行われた。

実験プロトコル

5日間の予備飼育後、8週齢のラットを対照群 (CON), ギプス固定群 (IMM), ギプス固定+回復対照群 (RCON) およびギプス固定+回復+CLE投与群 (RCLE) の4群に無作為に分けた (各群6匹)。IMM, RCONおよびRCLE各群のラットにはBooth and Kelso (1973) の方法に従って、9日間のギプス固定を行った。固定はペントバルビタールナトリウム (45 mg / 体重1kg) 麻酔下で、包帯式ギプスのスコッチキャスト (3-J; 3M Health Care, Tokyo, Japan) を用いて膝関節と足関節を弛緩状態で行った。9日間のギプス固定後、CON群とIMM群のラットより足底筋 (PLA) とヒラメ筋 (SOL) を摘出し、直ちに液体窒素で冷却したイソペンタン中にて急速凍結した。筋活動の違いがその回復に大きく影響する可能性が考えられることから、被験筋として同じ底屈動作に寄与する速筋の足底筋と遅筋のヒラメ筋を用いた。凍結した筋サンプルは分析まで-80°Cで保存した。CLE (Sigma) は0.9%NaCl溶液にて0.1%CLE溶液に調製した。RCLE群のラットには、2週間の回復期間の間、CLE (1mg / 体重1kg/日) を頸背部への皮下注射により投与した。この投与量は骨格筋の肥大を誘発することがすでに確認されているため (Yamazaki 2005), この投与により筋線維の萎縮後の回復を促進すると予想された。RCON群のラットには、RCLE群と等量の0.9%NaCl 溶液を同じ方法で投与した。2週間の回復期間の後、RCON群およびRCLE群のラットより、先と同様に被験筋を摘出し、

保存した.

免疫組織化学染色

本研究で使用した一次抗体は次のとおりであった： mouse monoclonal anti-slow myosin (タイプI 線維のマーカー; 1:4000; Sigma), mouse monoclonal anti-fast myosin (タイプII線維のマーカー; 1:400; Sigma), mouse monoclonal anti-M-cadherin (衛星細胞のマーカー; 1:400; BD PharMingen, San Diego, CA, USA) および rabbit polyclonal anti-Dystrophin (筋形質膜のマーカー; 1:100; Lab Vision UK, Ltd.).

筋線維同定のために免疫組織染色を行った。免疫組織染色は、 -25°C でマイクロトームにて、筋腹部より厚さ $10\mu\text{m}$ の連続筋線維横断切片を作成し、切片を剥離防止加工されたスライドガラス上に張り付けた。初めに、切片を 0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered salinePBS, pH 7.4) で調整した 4% パラホルムアルデヒド中にて 15 分間固定した後、 0.1 M PBS (pH 7.4) で洗浄した。次に、非特異的免疫反応性をブロックするために、切片を 10% 血清および 1% Triton X-100 を含む 0.1 M PBS で 1 時間インキュベートした。一次抗体を 5% 血清および 0.3% Triton X-100 を含む 0.1 M PBS で希釈して反応させた後、二次ビオチン化抗マウス IgG 抗体およびアビジン-ビオチン複合体とそれぞれ 1 時間反応させ、ペルオキシダーゼ基質キットを使用して染色した (2V-0001-10, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) (Figure 5-1).

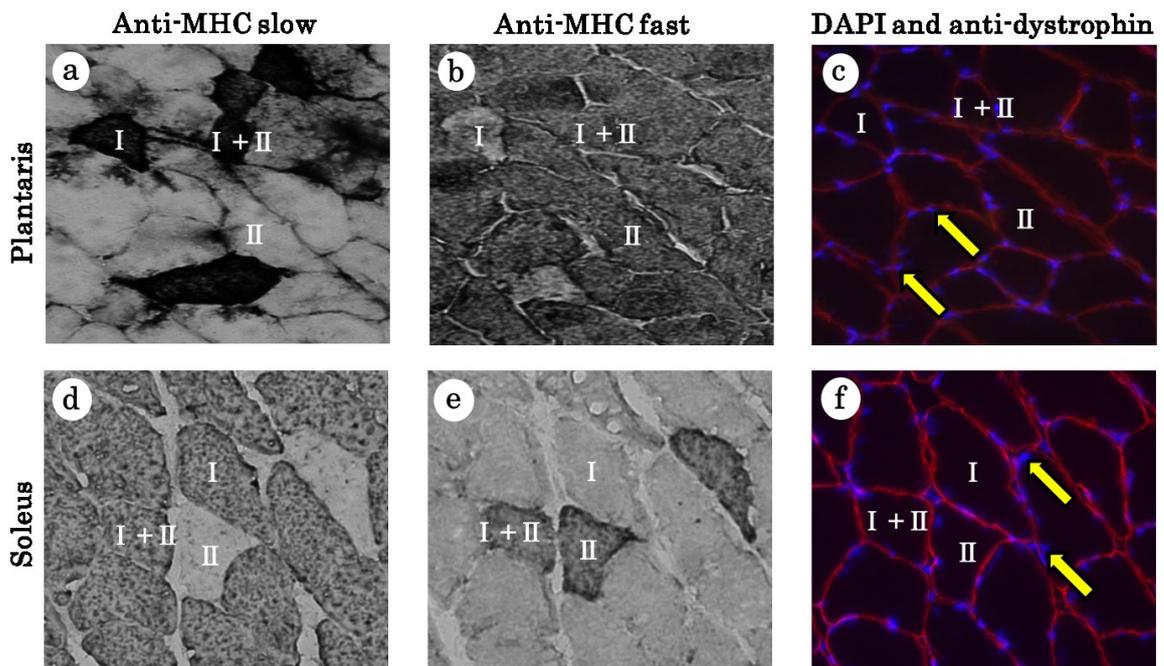


Figure 5-1. Serial cross sections immunohistochemically stained with anti-myosin heavy chain (MHC) slow (a, d) and anti-MHC fast (b, e) antibodies in plantaris (a—c) and soleus (d—f) muscles. Representative immunofluorescent staining for nuclei by DAPI and plasma membrane by anti-dystrophin antibody (c, f). Numbers indicate muscle fiber type: I, I+II, and II. Arrows identify peripherally located myonuclei.

筋衛星細胞と筋核を同定するために多重免疫蛍光染色を行った。蛍光染色は先の連続切片を用いて、はじめに先の一次抗体を用いて 4°C で 16~48 時間同時にインキュベートし、0.1 M PBS で洗浄した後、2 次抗体とともに 4°C で一晩インキュベートした。本研究では、Alexa Fluor 568-labeled goat anti-rabbit IgG (1 : 200, A11011, Thermo Fisher Scientific, IL, USA) を二次抗体として使用した。次に、切片を 0.1 M PBS で洗浄し、4 分、6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を含む Vectashield 封入剤に封入して、核を可視化した。すべての画像解析は、蛍光顕微鏡 (BX51; オリンパス, 東京, 日本) および画像処理ソフト (SR image, Roper Scientific, 東京, 日本) を使用して行った (Figure 5-1)。

筋線維の分析

筋線維のタイプ分類は、400 倍で取り込んだ顕微鏡画像をプリントアウトして行った。各部

位の画像において隣接した少なくとも 150 本以上の筋線維を、タイプ I (抗 slow myosin に陽性)、タイプ II (抗 fast myosin に陽性)、およびタイプ I + II (抗 slow myosin と抗 fast myosin の双方に陽性) に分類した (Figure 5-1)。各筋線維の横断面積は、タイプ分類を行ったすべての筋線維について、画像処理システム (Image-J; NIH, USA) を使用して計測した。筋核の同定には抗 Dystrophin 抗体 (筋形質膜) と DAPI (核) で染色した切片画像を用い、形質膜内に局在する核を用いた (Figure 5-1)。筋衛星細胞の同定には抗 M-cadherin 抗体 (衛星細胞) で染色された画像を用いて行った。しかしながら、筋衛星細胞はいくつかの切片にて、数個しか観察されなかったため、本研究では筋衛星細胞のデータは採用しなかった。

統計処理

分析データは平均および標準偏差 (SD) として示した。実験データ分析には、二元配置分散分析 (ANOVA) と Tukey–Kramer 多重比較検定を用いた。なお、有意水準は危険率 5% 未満とした。すべての統計分析には、IBM SPSS Statisticsバージョン 19.0 (IBM Japan, Ltd. Tokyo, Japan) を使用した。

5-3 結果

体重と筋重量

IMM 群 (264 ± 20 g) の体重は、CON 群 (312 ± 23 g) よりも 15% 低かった。RCON 群 (309 ± 15 g) と RCLE 群 (315 ± 14 g) の体重は、IMM 群より高く、CON 群の体重と類似していた。ギプス固定後、PLA と SOL の重量は低下していたが、回復後の両筋の重量は IMM 群の重量よりも高かった (Figure 5-2)。RCLE 群の SOL の重量は RCON 群の重量よりも高かった。

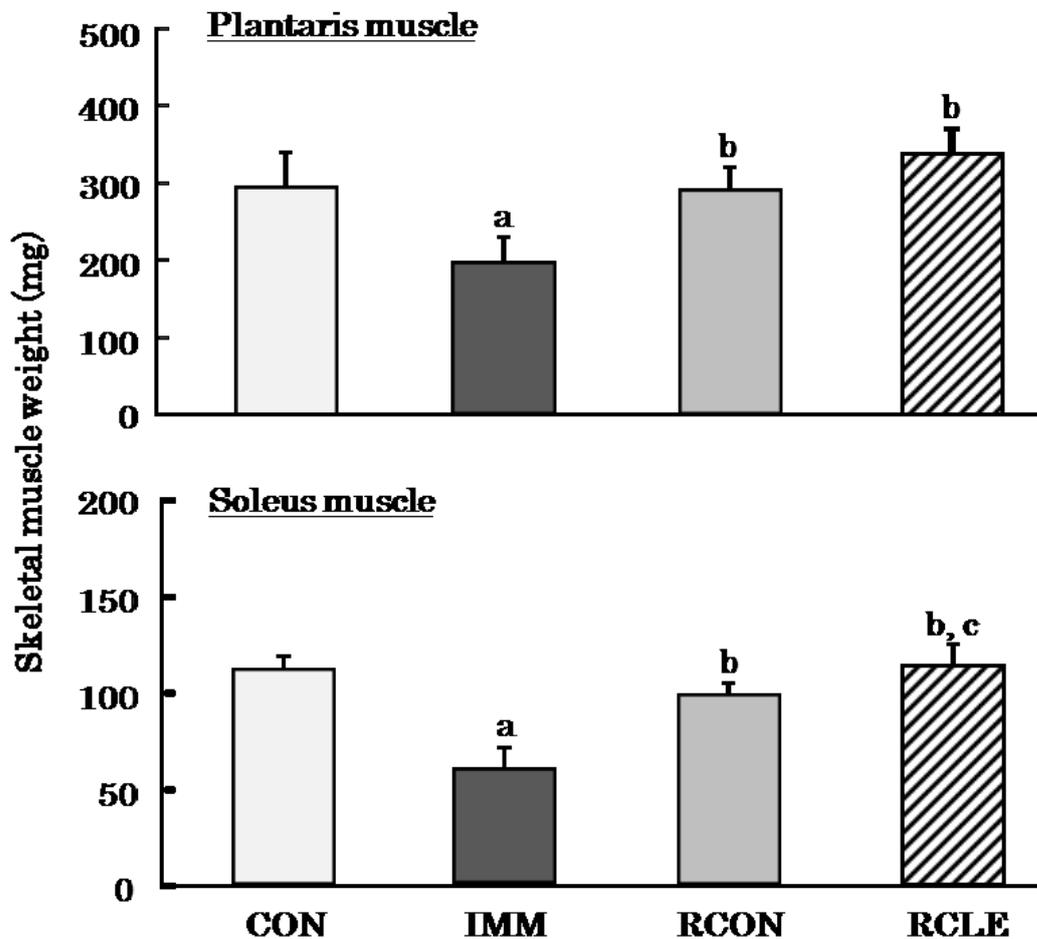


Figure 5-2. Effects of recovery and/or clenbuterol on muscle weight in plantaris and soleus muscles. Values are presented as the mean \pm SD. ^a $P < 0.05$ (vs. CON group), ^b $P < 0.05$ (vs. IMM group) and ^c $P < 0.05$ (vs. RCON group).

筋線維横断面積

PLA のタイプ I 線維の横断面積は、ギプス固定後と通常飼育での回復期間後で違いはなかったが、CLE 投与により増加していた (Figure 5-3)。SOL のタイプ I 線維の横断面積は、ギプス固定後に有意に低下したが、通常飼育での回復期間後に有意に増加し、CLE 投与によりさらに増加した (Figure 5-4)。PLA および SOL のタイプ I+II と II 線維の横断面積は、ギプス固定後に低下したが、通常飼育での回復期間後に有意に増加し、CLE 投与によりさらに増加した (Figure 5-3 and 5-4)。

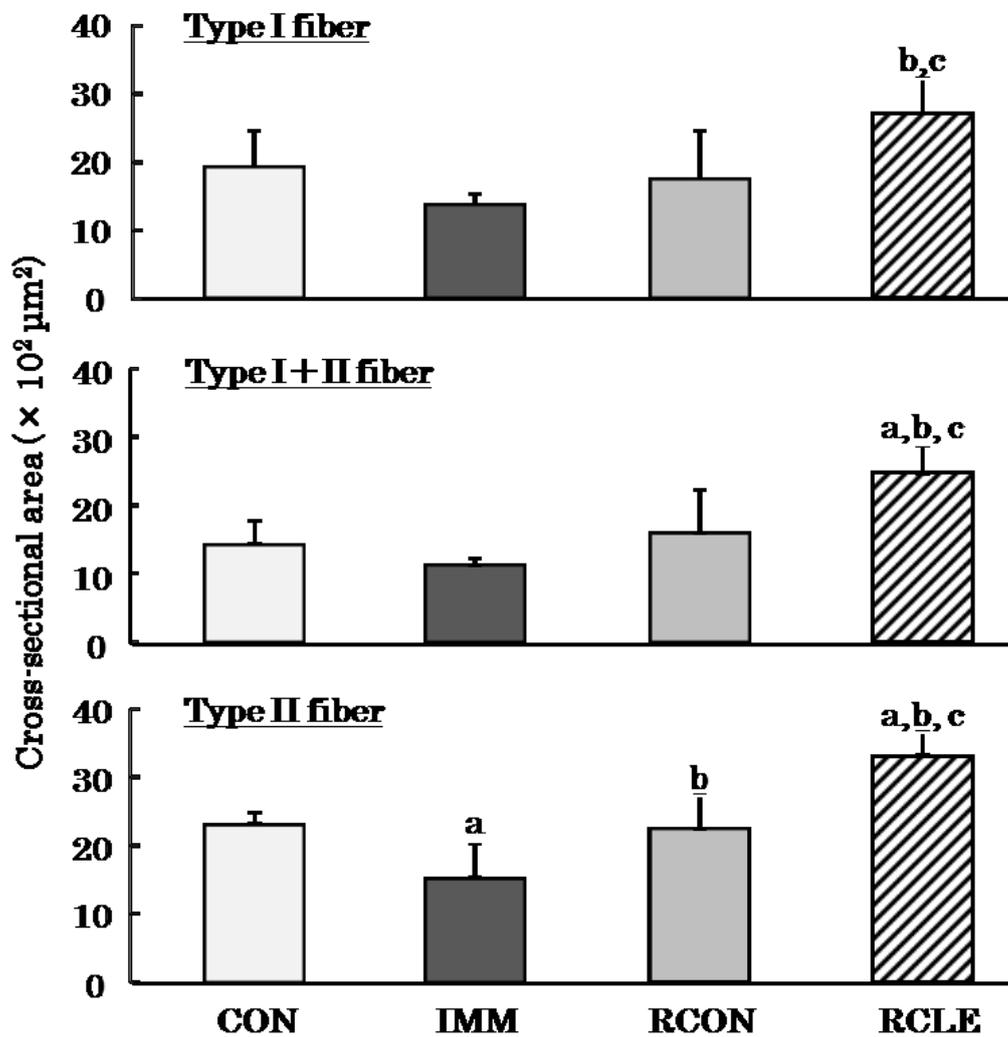


Figure 5-3. Effects of recovery and/or clenbuterol on the cross-sectional area of each type of fiber in the plantaris muscle. Values are presented as the mean \pm SD. ^a $P < 0.05$ (vs. CON group), ^b $P < 0.05$ (vs. IMM group) and ^c $P < 0.05$ (vs. RCON group).

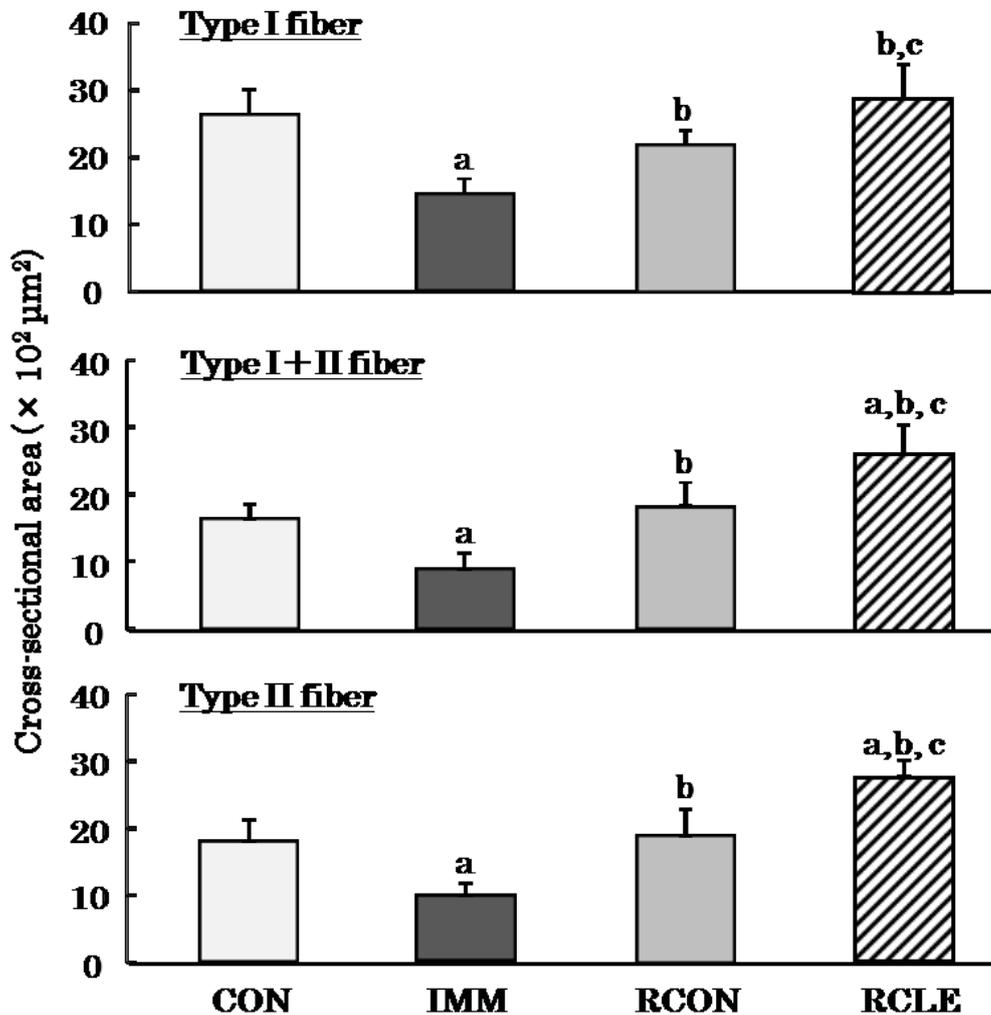


Figure 5-4. Effects of recovery and/or clenbuterol on the cross-sectional area of each type of fiber in the soleus muscle. Values are presented as the mean \pm SD. ^a $P < 0.05$ (vs. CON group), ^b $P < 0.05$ (vs. IMM group) and ^c $P < 0.05$ (vs. RCON group).

筋線維あたりの筋核数

PLA のタイプ I 線維における筋線維あたりの筋核数は、ギプス固定後と通常飼育での回復期間後に有意な変化を示さなかったが、CLE 投与により増加した (Table 5-1)。一方で、SOL のタイプ I 線維における筋線維あたりの筋核数は、固定、回復期および CLE 投与により影響を受けなかった (Table 5-2)。PLA のタイプ I+II と II 線維における筋線維あたりの筋核数は、ギプス固定後に有意な変化を示さなかったが、CLE の有無にかかわらず回復期間後に増加し

ていた (Table 5-1). 一方で, SOL のタイプ I+II と II 線維における筋線維あたりの筋核数は, 固定, 回復期および CLE 投与によっても影響を受けなかった (Table 5-2).

Table 5-1. Number of myonuclei and area of nuclear domain in plantaris muscle.

	CON	IMM	RCON	RCLE
Myonuclei (number)				
Type I fiber	1.66±0.21	1.65±0.14	1.95±0.23	2.43±0.30 ^{a, b, c}
Type I+II fiber	1.84±0.23	1.65±0.21	2.13±0.36 ^b	2.32±0.28 ^{a, b}
Type II fiber	1.98±0.22	1.70±0.13	2.32±0.23 ^{a, b}	2.57±0.10 ^{a, b}
Nuclear domain (μm²/ a nucleus)				
Type I fiber	1168±354	836±114	902±357	1148±354
Type I+II fiber	774±125	695±100	750±227	1086±239 ^{b, c}
Type II fiber	1178±127	906±320	976±241	1294±156 ^b

Values are presented as the mean ± SD.

Statistic: ^a $P < 0.05$ (vs. CON); ^b $P < 0.05$ (vs. IMM), ^c $P < 0.05$ (vs. RCON).

Table 5-2. Number of myonuclei and area of and nuclear domain in soleus muscle.

	CON	IMM	RCON	RCLE
Myonuclei (number)				
Type I fiber	2.16±0.25	1.97±0.19	1.90±0.10	1.84±0.14
Type I+II fiber	2.14±0.69	1.68±0.29	1.77±0.49	1.76±0.40
Type II fiber	2.16±0.22	1.97±0.12	1.81±0.25	1.89±0.36
Nuclear domain (μm²/ a nucleus)				
Type I fiber	1213±108	739±141 ^a	1187±112 ^b	1534±330 ^{a, b, c}
Type I+II fiber	891±354	533±162	1060±379	1597±541 ^{a, b}
Type II fiber	856±232	497±120 ^a	1039±180 ^b	1489±263 ^{a, b, c}

Values are presented as the mean ±SD.

Statistic: ^a *P* < 0.05 (vs. CON); ^b *P* < 0.05 (vs. IMM), ^c *P* < 0.05 (vs. RCON).

筋核ドメインサイズ

PLA のタイプ I 線維における筋核ドメインサイズは、固定、回復期および CLE 投与により影響を受けなかったが、SOL のそれらは、ギプス固定後に有意に低下する一方で、通常飼育での回復期間後に有意に増加し、CLE 投与によりさらに増加した (Table 5-1 and 5-2). PLA および SOL のタイプ I + II 線維における筋核ドメインサイズは、ギプス固定および通常飼育での回復期間後に有意な変化を示さなかったが、CLE 投与で増加した (Table 5-1 and 5-2).

PLA のタイプ II 線維における筋核ドメインサイズは、ギプス固定および通常飼育での回復期間後に有意な変化を示さなかったが、CLE 投与で増加した。一方で、SOL のそれらはギプス固定後に有意に低下したが、通常飼育での回復後に有意に増加し、CLE 投与でさらに増加した (Table 5-1 and 5-2).

5-4 考察

本研究では、 β_2 作動薬の CLE 投与が、速筋の PLA と遅筋の SOL において、ギプス固定による萎縮からの回復を促進するか否かを検討した。

ギプス固定が筋線維と筋核に及ぼす影響

本研究で用いたギプス固定は筋線維のタイプに関係なく筋線維萎縮を誘発し、その萎縮は PLA よりも SOL で顕著だった。これらの結果はギプス固定モデルを用いた以前の研究結果と一致していた (Tomanek and Lund 1974, Edgerton et al. 1975)。ラットの後肢固定は速筋よりも遅筋の活動性を著しく低下させることが報告されている (Booth 1982, Fournier et al. 1983)。したがって、本研究における SOL の萎縮は、用いたギプス固定による活動量の著しい低下によるものと考えられた。本研究において、筋線維あたりの筋核数は 9 日間のギプス固定後に有意な変化を示さなかった。全筋線維または電子顕微鏡を使用して 6~10 日の固定の影響を調べた研究では、筋衛星細胞の数は減少するが、筋核数は変化しないことを報告している (Smith et al. 2000, Wanek and Snow 2000)。したがって、本研究において筋核数に変化がみられなかったことは、ギプス固定期間が短かったことと関係していたのかも知れない。

筋線維萎縮を誘発する宇宙飛行および後肢懸垂モデルを使用した研究では、筋線維萎縮に伴う筋核数の減少を報告している (Allen et al. 1997, Gallegly et al. 2004, Leeuwenburgh et al. 2005)。これらのモデルでは後肢筋は無負荷状態にあるが、ギプス固定モデルの後肢筋では等尺性収縮での力発揮が可能である。したがって、これらのモデルと本研究間の筋線維の萎縮に伴う筋核数の変化の違いには、後肢筋の活動量が関連していた可能性がある。また、拮抗筋切除により無負荷にされた速筋の長指伸筋においても、筋線維萎縮に伴う筋核数の減少はみられないことが報告されている (Bruusgaard and Gundersen 2008)。そのため、これらの違いを明確にするためには、さらなる研究が必要であると考えられた。

本研究では、SOL の筋核ドメインサイズは固定後に低下していたが、PLA のそれは変わらなかった。この両筋間の違いは、SOL の筋線維が PLA に比べて著しく萎縮していた一方で、両筋の筋核数はギプス固定によっても有意な変化を示さなかったことと関連していると考えられた。筋核ドメインサイズは、一つの筋核の遺伝子産物によって制御される筋線維内の細胞質の体積であるため (Pavlath et al. 1989, Hall and Ralston 1989)、ある程度のサイズ内で維持されている。一方で、解糖系代謝に優れた筋と酸化系代謝に優れた筋では筋線維サイズと筋核数の適応変化が異なるため (Bruusgaard et al. 2003)、同一条件下でも両筋の筋核ドメインサイズが異なる可能性が考えられた。

再負荷と CLE 投与が筋線維横断面積に及ぼす影響

2 週間の回復期間後、両筋の筋線維横断面積は回復する傾向にあり、タイプ II 線維の回復はタイプ I 線維に比べて顕著であった。萎縮した筋を不活動から正常な状態に戻した場合、それらの筋は過負荷状態に曝され、筋線維が損傷し、そして再生する (Wanek et al. 2000)。さらに、筋線維は運動強度に従って、タイプ I < IIa < IIb 線維の順に動員される (Burke et al. 1973, Walmsley et al. 1978)。したがって、本研究においても回復中に、過負荷によって両筋のタイプ I + II および II 線維が動員されたため、これらのタイプの筋線維で肥大が誘発された可能性がある。また、SOL のタイプ II 線維の回復は、PLA のその回復よりも大きかった。遅筋は速筋に比べて再負荷に対する感受性が高いため (Wanek et al. 2000)、抗重力筋である SOL は、PLA に比べて再負荷の影響を受けたものと考えられる。

CLE 投与が筋線維横断面積に及ぼす影響

両筋において、CLE を投与した場合、投与しなかった通常回復の 2 倍に及ぶ筋線維横断面積の回復があり、両筋の各線維タイプにおける断面積が大幅に増加した。これらの結果は、CLE が両筋の筋線維萎縮からの回復に促進効果を有することを示すものである。CLE は遅筋に比べて速筋で肥大を誘発すると報告されているが (Sato et al. 2008, Suzuki and Kitaura

2015), 本研究では遅筋においても CLE は同化作用を促進することを示した. Maltin ら (1987) は, ラットの片側の協働筋腱切除モデルを用いて, CLE は正常なヒラメ筋に比べて過負荷状態下にあった SOL において肥大を誘発したことを報告している. したがって, ギプス固定後の通常のケージ内活動は, ギプス固定により萎縮して脆弱化した筋にとって過負荷となり, そのことが CLE の同化作用を促進したものと思われる.

CLE 投与が筋核数と筋核ドメインサイズに及ぼす影響

2 週間の回復期間後, PLA の各タイプの線維における筋核数は増加し, CLE 投与によりさらに増加した. したがって, RCON および RCLE 群の PLA での各タイプの筋線維における筋核ドメインサイズは, 筋線維の肥大にも関わらず CON 群と違いはみられなかったと考えられた. 対照的に, SOL の各タイプにおける線維の筋核数は, 筋線維の肥大(回復)にも関わらず, 2 週間の回復期間後も変化しなかったことにより, 特に RCLE 群の筋核ドメインサイズは CON 群に比べて顕著に大きかったといえる. 筋核ドメインサイズには上限があり, 筋線維の肥大に伴い, その支配サイズを超えた場合には新たな核の追加が行われると考えられている (Petrella et al. 2006, Snijders et al. 2015). したがって, 両筋間の核の追加の違いは, これらの筋核ドメインサイズにおける上限サイズ (閾値) の違いによる可能性も考えられた. 一方で, CLE は移植された骨格筋の筋衛星細胞の増殖を刺激し (Roberts and McGeachie 1992), 活性化された筋衛星細胞が既存の筋線維と融合して, 筋核の数を増やすことが報告されている (Hawke and Garry 2001, Kadi et al. 2004). さらに, CLE は遅筋よりも速筋に影響することが報告されているため (Sato et al. 2008), CLE 投与により, 速筋の筋核の数が選択的に増加した可能性が考えられる.

本研究の限界

本研究では, 萎縮した骨格筋の回復期に同化作用を有する β_2 作動薬である CLE を投与し, 回復促進作用を速筋の PLA と遅筋の SOL で比較検討した.

当初、筋核の増加に寄与する筋衛星細胞に関する知見を得ることも目的としたが、筋線維の横断切片を用いた組織化学的分析では数個の筋衛星細胞しか観察されず、それらに関して検討を行うことができなかった。本研究では筋衛星細胞の同定に抗 M-cadherin 抗体を用いたが、このマーカーの感度が十分ではなかったことが影響していたものと思われる。したがって、より感度の高い分子マーカーで検討する必要性が考えられた。また、他の理由として、本研究では分析対象に筋の横断切片を用いた二次元的な観察しか行っていないことが関係していた可能性もある。筋線維は細長い立体構造を有しているため、筋線維を単離して、三次元的な観察を行うことができれば、より詳細な筋核および筋衛星細胞の知見が得られるものと考えられた。

5-5 結論

本研究の結果は、CLE がラットの速筋と遅筋の固定による萎縮後の回復を促進することが示された。しかしながら、速筋と遅筋間の CLE に対する応答メカニズムは、筋萎縮後の回復期間中に異なっている可能性が考えられた。

第 6 章 総合討論

6-1 本研究の成果

本研究では、 β_2 -作動薬である CLE の筋同化作用が筋萎縮の抑制、筋萎縮からの回復に影響するか否かに関連して、実験 1 では筋萎縮の抑制、実験 2 と 3 では筋萎縮からの回復に関して検討した。

実験 1 において、固定による後肢骨格筋の萎縮が CLE 投与により抑制されるかを、実験動物を用いて組織化学的に検討した。その結果、CLE 投与は速筋である EDL の萎縮を抑制したが、遅筋である SOL では同様な抑制作用は観察されなかった。さらに、EDL では 95%以上の筋線維占有率を占めるタイプ II 線維で萎縮抑制作用が認められた。したがって、CLE の萎縮抑制効果は、速筋に特異的であり、また、筋線維のタイプによっても異なる可能性が示唆された。

実験 2 では、固定により萎縮した骨格筋の回復期での CLE 投与による回復促進作用を、実験動物を用いて、遅筋である SOL を被験筋として組織化学的に検討した。また、実験 2 では、筋線維タイプを同定するために、筋線維の収縮特性をより反映する免疫組織染色を用いるとともに、核を染色するために蛍光免疫染色を用いた。その結果、CLE 投与は遅筋である SOL の萎縮からの回復を促進させる傾向が認められた。また、その回復促進作用はタイプ II 線維に比べてタイプ I 線維で顕著であり、その筋線維横断面積の回復に伴う核の増加は伴わないことが示唆された。

実験 3 では、実験 2 と同様な方法を用いて、回復期間を延長して、CLE 投与による回復促進作用を速筋の PLA と遅筋である SOL を対象として組織化学的に検討した。なお、実験 3 では、筋核を同定するために、多重蛍光免疫染色を用いた。その結果、CLE 投与は PLA と SOL の両筋において、固定による萎縮後の回復を促進することを認めた。また、PLA では回復および CLE 投与による筋線維横断面積の変化に伴う筋核数の増加が観察されたが、SOL

では筋線維横断面積の変化に伴う筋核の変化は観察されず、両筋間の CLE に対する応答メカニズムは筋萎縮後の回復期間中において異なる可能性が示唆された。

一連の研究より、筋の可塑性に CLE が影響することが明らかになった。しかし、速筋では異化(不活動)と同化(回復)状態の双方で CLE の作用が観察されたのに対して、遅筋では、その作用は同化状態でしか観察されなかった。これらの結果より、速筋と遅筋では β_2 -作動薬であるクレンプテロールに対する応答が異なると考えられた。

6-2 本研究成果のスポーツ科学分野への応用

スポーツ活動における怪我の発生を完全に抑えることは不可能である。したがって、スポーツに関わる者にとって、怪我によるハンディキャップを最小限に抑えることは課題でもある。そのためには、その治療やその後のリハビリテーションをより短期間で済ませることが望まれる。本研究結果から、臨床的治療としてよく用いられる関節固定において、 β_2 -作動薬であるクレンプテロールの投与は、固定中に生じる筋萎縮を軽減できることが示唆された。また、関節固定後の萎縮した筋の回復中においても、その投与は筋の回復を促進することが示唆された。したがって、関節固定を用いた治療において、この β_2 -作動薬には治療から復帰までの時間を短縮させる可能性が期待される。しかしながら、クレンプテロールのアスリートへの使用は喘息等の治療目的に限られているため、その適用は限られた対象になると考えられる。また、実際の関節固定を用いた治療における適用に関しても、骨格筋を含めた生体の応答に関する多くの課題が考えられることから、今後さらなる研究が必要であると考えられた。

6-3 今後の課題

本研究では筋萎縮のモデルとして、ヒトへの応用も想定し、臨床的治療として一般的に用いられているギプスによる固定モデルを採用した。採用したラットの後肢固定法は、先行研

究を参考に固定時の関節角度や固定期間を設定した。しかし、これらの条件の組み合わせは無数にあるため、本研究の結果が様々な固定条件においても同様に観察されるとは限らない。特に、固定時の関節角度の違いは筋長を左右し、その筋長の違いは筋タンパク質合成や分解に影響して (Tabary et al. 1972)、筋萎縮の程度の違いとして現れる可能性がある。また、本研究では 9 日間のギプス固定を行い、この期間により顕著な後肢筋の萎縮が観察されている。しかし、実験動物とヒトではライフスパンが異なるため、同じ固定期間でも萎縮の程度はかなり異なることが考えられる。したがって、実際にヒトの治療で用いられる固定条件下と同様な現象が得られるような実験動物での条件を導き出し、研究を行う必要があると考えられる。また、本研究では、速筋の被験筋として実験 1 では長指伸筋を、実験 3 では足底筋を用いている。しかし、固定による不活動の影響は骨格筋の働きによって異なることから、研究を継続するにあたり、被験筋を統一する必要があると考えられた。

本研究で用いた CLE の投与量は体重 1kg あたり 1mg であった。この投与量は多くの実験動物を対象とした研究において、明らかな筋肥大を誘発することが実証されている。一方で、体重 1kg あたり 10 μ g の投与量でも筋の肥大効果が報告されている (Burnistion et al. 2006, 2007)。さらに、ヒトで半月板切除手術後の膝伸筋における筋力リハビリテーション中に、20 μ g の CLE を用いた 1 日 2 回投与で、筋力の回復を増加させることも報告されている (Maltin et al. 1993)。したがって、より安全で効果が得られる投与量を導くための研究も必要であると考えられる。

CLE は衛星細胞の増殖と分化およびその動員を誘導して、筋肥大を加速するため (Spurlock et al. 2006)、本研究では、回復期での CLE 投与が衛星細胞を活性化し、筋同化作用を刺激して筋の回復を促進する可能性を予想していた。そのために、衛星細胞の観察を行ったが、筋線維の横断切片を用いた組織化学的分析では数個の衛星細胞しか観察されず、それらに関して検討を行うことができなかった。本研究では衛星細胞の同定に抗 M-cadherin 抗を用いたが、このマーカーの感度は十分でなかった可能性が考えられる。したがって、より感度の高い分子マーカーを検討する必要性が考えられた。また、本研究では分析に筋の横断

切片を用いた二次元的な観察しか行っていない。筋線維は細長い立体構造を有しているため、筋線維を単離して、三次元的な観察を行うことができれば、より詳細な筋核および衛星細胞の知見が得られる可能性が考えられる。

参考文献

Akama T, Abe A (2013) Development and activities of the fight against doping. *J Phys Fitness Sports Med* 2(3): 267-274.

Allen DL, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR (1995). Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fiber. *J Appl Physiol* 78(5): 1969-1976.

Allen DL, Yasui W, Tanaka T, Ohira Y, Nagaoka S, Sekiguchi C, Hinds WE, Roy RR, Edgerton VR (1996). Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol* 81(1): 154-151.

Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Grindeland RE, Mukku V, Edgerton VR (1997). Growth hormone/IGF-I and/or resistive exercise maintains myonuclear number in hindlimb unweighted muscles. *J Appl Physiol* 83(6): 1857-1861.

Always SE, Siu PM (2008). Nuclear apoptosis contributes to sarcopenia. *Exerc Sport Sci Rev* 36(2): 51-57.

Appell HJ (1986a). Skeletal muscle atrophy during immobilization training program. *Int J Sports Med* 7(1): 1-5.

Appell HJ (1986b). Morphology of immobilized skeletal muscle and the effects of a pre- and postimmobilization training program. *Int J Sports Med* 7(1): 6-12.

Awede BL, Thissen J-P, Lebacqz J (2002). Role of IGF-I and IGF-BPs in the changes of mass and phenotype induced in rat soleus muscle by clenbuterol. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E31–37.

Babij P, Booth FW (1988). Clenbuterol prevents or inhibits loss of specific mRNAs in atrophying rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 254: C657-660.

Blaauw B, Canato M, Agatea L, Toniolo L, Mammucari C, Masiero E, Abraham R, Sandri M, Schiaffino S, Reggiani C (2009). Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *FASEB* 23: 3896-3905.

Booth FW, Kelso JR (1973). Production of rat muscle atrophy by cast fixation. *J Appl Physiol* 34(3): 404-406.

Booth FW (1978). Regrowth of atrophied skeletal muscle in adult rats after ending immobilization. *J Appl Physiol* 44(2), 225-230.

Booth FW, Seider MJ (1979). Recovery of skeletal muscle after 3 mo of hindlimb immobilization in rat. *J Appl Physiol* 47(2) 435-439.

Booth FW (1982) Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J Appl Physiol* 52(5): 113-118.

Booth FW, Thomason DB (1991). Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various model. *Physiol Rev* 71(2): 541-585.

Boyes G, Johnston I (1979). Muscle fibre composition of rat vastus intermedius following immobilization at different muscle lengths. *Pflugers Arch* 381: 195-200.

Brook MH, Kaiser K(1970). Muscle fiber type: How many and what kind? *Arch Neurol* 23(4): 369-379.

Bruusgaard JC, Liestol K, Ekmark M, Kollstad K, Gundersen K (2003). Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibers of normal mice studied *in vivo*. *J Physiol* 551(2): 467-478.

Bruusgaard JC, Gundersen K (2008). In vivo time-lapse microscopy reveals no loss of murine myonuclei during weeks of muscle atrophy. *J Clin Invest* 118(4): 1450-1457.

Bruusgaard JC, Egner IM, Larsen TK, Dupre-Aucouturier S, Desplanches D, Gundersen K (2012). No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading. *J Physiol* 113: 290-296.

Burnistion JG, Wa C, Tan L-B, Goldspink DF (2006). Dose-dependent separation of the hypertrophic and myotoxic effects of β_2 -adrenergic receptor agonist clenbuterol in rat striated muscle. *Muscle Nerve* 33(5): 655-663.

Burnistion JG, McLean L, Beynon RJ, Goldspink DF (2007). Anabolic effects of a non-myotoxic dose of the β_2 -adrenergic receptor agonist clenbuterol on rat plantaris muscle. *Muscle Nerve* 35(2): 217-223.

Cancelliero KM, Durigan JLQ, Vieira RP, Silva CA, Polacow MLO (2008). The effect of a low dose of clenbuterol on rat soleus muscle submitted to joint immobilization. *Braz J Med Biol Res* 41: 1054-1058.

Carbric M, James NT (1983). Morphometric analyses on the muscles of exercise training and untrained dogs. *Am J Anat* 166(3): 359-368.

Chakravarthy MV, Davis BS, Booth FW (2000). IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol* 89: 1365-1379.

Christensen B, Dyrberg E, Aagaard P, Kjaer M, Langberg H (2008). Short-term immobilization and recovery affect skeletal muscle but not collagen tissue turnover in humans. *J Appl Physiol* 105(6): 1845–1851.

Darr KC, Schultz E (1987). Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J Appl Physiol* 63(5): 1816-1821.

Delday MI, Maltin CA (1997). Clenbuterol increases the expression of myogenin but not myoD in immobilized rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 272: E941-944.

Dubowitz V, Pearse AGE (1960). A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. *Histochemie* 2: 105-117.

Dupont-Versteegden EE, Murphy RJL, Houle JD, Gurley CM, Petersom CA (1999). Activated satellite cells fail to restore myonuclear number in spinal cord transected

and exercised rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 277: C589-597.

Edgerton VR, Barnard RJ, Peter JB, Maier A, Simpson DR (1975). Properties of immobilized hind-limb muscles of the galago senegalensis. *Exp Neurol* 46(1): 115-131.

Fournier M, Roy RR, Perham H, Simard CP, Edgerton VR (1983). Is limb immobilization a model of muscle disuse? *Exp Neurol* 80(1): 147-156.

Fry CS, Lee JD, Jackson JR, Kirby TJ, Stasko SA, Liu H, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA (2014). Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy. *FASEB* 28(4): 1654-1665.

Gallegly JC, Turesky NA, Strotman BA, Gurley CM, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE (2004). Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. *J Appl Physiol* 97(3): 1082-1090.

Gibson MC, Schultz E (1983). Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cell. *Muscle Nerve* 6: 574-580.

Goldberg AL (1967). Protein synthesis in tonic and phasic skeletal muscle. *Nature* 216: 1219-1220.

Goldspink DF (1977). The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol (London)* 264(1): 267-282, 1977.

Gonçalves DA, Silveira WA, Lira EC, Graça FA, Paula-Gomes S, Zanon NM, Kettelhut IC, Navegantes LC (2012). Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E123–133.

Gorza L (1990). Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 38(2): 257-265.

Häggmark T, Jansson E, Eriksson E (1981). Fiber type area and metabolic potential of thigh muscle in man after knee surgery and immobilization. *Int J Sports Med* 2(1): 12-17.

Harrera NM, Zimmerman AN, Dykstra DD, Thompson LV (2001). Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: a study hindlimb-unweighted rats. *Arch Phys Med Rehabil* 82(7): 930-954.

Hawke TJ, Garry DJ (2001). Myogenic satellite cell: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91(2): 534-551.

Hayase K, Yokogoshi H (1991). Effects of suspension hypokinesia/hypodynamia on tissue turnover in rats. *Jap J Physiol* 41(3): 473-482.

Henning R, Lomo T (1985). Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* 314: 164-

Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF (1978). Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat. *Arch Phys Med Rehabil* 59(7): 301-305.

Herbison GJ, Jaweed MM, Ditunno JF (1979). Muscle atrophy in rats following denervation, casting, inflammation, and tenotomy. *Arch Phys Med Rehabil* 60(9): 401-404.

Herrera NM Jr, Zimmerman AN, Dyktra DD, Thompson LV (2001). clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: a study of hindlimb-unweighted rats. *Arch Phys Med Rehabil* 82(7): 930-934.

Hikida RS, Van Nostran S, Murray JD, Staron RS, Gordon SE, Kraemer WJ (1997). Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fiber. *Anat Rec* 247(3): 350-354.

Hortobagyi T, Dempsey L, Fraser D, Zheng D, Hamilton G, Lambert J (2000). Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J Physiol* 524(1): 293-304.

Hvid LG, Suetta C, Nielsen JH, Jensen MM, Frandsen U, Ørtenblad N, Kjaer M, Aagaard P (2014). Aging impairs the recovery in mechanical muscle function following 4 days of disuse. *Exp Gerontol* 52: 1-8.

Imaizumi K, Tachiyashiki K (1994). Analysis of the growth of rat hindlimb skeletal

muscles on the basis of DNA, RNA and protein levels. *Adv Exerc Sports Physiol* 1(1): 25-32.

Ishihara A, Nagatomo F, Fujino F, Kondo H, Tsuda K (2012). Lifestyle-related disease and skeletal muscle: A review. *J Phys Fitness Sports Med* 1(1): 17-27.

Itai Y, Kariya Y, Hoshino Y (2004). Morphological changes in rat hindlimb muscle fiber during recovery from disuse atrophy. *Acta Physiol Scand* 181: 217-224.

Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S (2013). Molecular basis of muscle hypertrophy and atrophy: potential therapy for muscular dystrophy. *J Phys Fitness Sports Med* 2(2): 179-184.

Jackman RW, Kandarín SC (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C834-843.

Jaffe DM, Terry RD, Spiro AJ (1978). Disuse atrophy of skeletal muscle: A morphometric study using image analysis. *J Neurol Sci* 35(2-3): 189-200.

Jaspers SR, Tischler ME (1984). Atrophy and growth failure of rat hindlimb muscles in tail-cast suspension. *J Appl Physiol* 57(5): 1472-1479.

Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR, Andersen JL (2004). The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in

human skeletal muscles. *J Physiol* 558(3): 1005–1012.

Kawano F, Tanihata J, Sato S, Nomura S, Shiraishi A, Tachiyashiki K, Imaizumi K (2009).

Effects of dexamethasone on the expression of β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoceptor mRNAs in skeletal and left ventricle muscle rats. *J Physiol Sci* 59(5): 383-390.

Kawasaki E, Hokari F, Sasaki M, Sakai A, Koshinaka K, Kawanaka K (2011). The effects

of β -adrenergic stimulation and exercise on NR4A3 protein expression in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci* 61: 1–11.

Kitaura T, Tsunekawa N, Hatta H (2001). Decreased monocarboxylate transporter 1 in rat

soleus and EDL muscle exposed to clenbuterol. *J Appl Physiol* 91(1): 85-90.

Kline WO, Panaro FJ, Yang H, Bodine SC (2007). Rapamycin inhibits the growth and

muscle-sparing effects of clenbuterol. *J Appl Physiol* 102: 740-747.

Kopitar K, Zimmer A (1976). Pharmacokinetics and metabolite pattern of clenbuterol in

the rat. *Arz Fors Drug Res* 26(7a): 1435-1441.

Lang SM, Kazi AA, Hong-Brown L, Lang CH (2012). Delayed recovery of skeletal muscle

mass following hindlimb immobilization in mTOR Heterozygous Mice. *PLoS ONE* 7: e38910.

Lee H, Kim K, Kim B, Shin J, Rajan S, Wu J, Chen X, Brown MD, Lee S, Park JY (2018).

A cellular mechanism of muscle memory facilitates mitochondrial remodelling following resistance training. *J Physiol* 288: 4413-4426.

Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA, Dupont-Versteegden EE (2005). Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1288-1296.

Libera LD, Zennaro R, Sandri M, Ambrosio GB, Vescovo G (1999). Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol* 277: C982-986.

Lynch GS, Ryall JG (2008). Role of β -adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev* 88(2): 729-767.

Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Claustre A, Attaix D, Anne L, Veronique S, Philippe G, Dardevet D, Combaret L (2011). Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin–proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways. *J Physiol* 589(3): 511–524.

Maltin CA, Delday MI, Reeds PJ (1986). The effect of a growth promoting drug, clenbuterol, on fiber frequency and area in hind limb muscle from young male rats. *Biosci Rep* 6(3): 293-299.

Maltin CA, Delday MI, Hay SM, Smith FG, Loblely GE, Reeds PJ (1987). The effect of the

anabolic agent, clenbuterol, on overloaded rat skeletal muscle. *Bioscience Reports* 7(2): 143-149.

Maltin CA, Delday MI, Watson JS, Heys SD, Nevison IM, Ritchie IK, Gibson PH (1993).

Clenbuterol, a β -adrenoceptor agonist, increases relative muscle strength in orthopaedic patients. *Clinical Science* 84: 651-654.

McCall GE, Allen DL, Linderman JK, Grindeland RE, Roy RR, Mukku VR, Edgerton VR

(1998). Maintenance of myonuclear domain size in rat soleus after overload and growth hormone/IGF-I treatment. *J Appl Physiol* 84(4) 1407-1412.

Mitchell PO, Pavlath G (2001). A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to

muscle growth after atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1706-1715.

Mozdziak PE, Schultz E, Cassens RG (1997). Myonuclear accretion is a major determinant

of avian skeletal muscle growth. *Am J Physiol Cell Physiol* 272: C565-571.

Muir AR, Kanji AH, Lassar AB (1965). The structure of the satellite cells in skeletal

muscle. *J Anat* 99: 435-444.

Musacchia XJ, Steffen JM, Fell RD, Dombrowski MJ (1990). Skeletal muscle response to

spaceflight, whole body suspension, and recovery in rats. *J Appl Physiol* 69(6): 2248-2253.

Nakai N, Kawano F, Ohira Y (2012). Control of muscle protein synthesis in response to

exercise and amino acids. *J Phys Fitness Sports Med* 1(2): 297-306.

Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Hirofuji C, Itoh K, Itoh M, Ishihara A (1999). Succinate dehydrogenase activities of fibers in the rat extensor digitorum longus, soleus, and cardiac muscles. *Arch Histol Cytol* 62(4): 393-399.

Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Hirofuji C, Itoh K, Itoh M, Ishihara A (2000). Cell size and oxidative enzyme activity of different types of fibers in different regions of the rat plantaris and tibialis anterior muscles. *Jap J Physiol* 50(4): 413-418.

O' Connor RS, Pavlath GK (2007). Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 103(1): 1099-1103.

Ohira Y, Edgerton VR (1994). Neuromuscular adaptation to gravitational unloading or decreased contractile activity. *Adv Exerc Sports Physiol* 1(1): 1-12.

Oishi Y, Imoto K, Ogata T, Taniguchi K, Matsumoto H, Fukuoka Y, Roy RR (2004). Calcineurin and heat-shock proteins modulation in clenbuterol-induced hypertrophied rat skeletal muscles. *Pflugers Arch* 448: 114-122.

Pavlath GK, Rich K, Webster SG, Blau HM (1989). Localization of muscle gene products in nuclear domains. *Nature* 337: 570-573.

Pearen MA, Myers SA, Raichur S, Ryall JG, Lynch GS, Muscat GEO (2008). The orphan nuclear receptor, NOR-1, a target of β -adrenergic signaling, regulates gene

expression that controls oxidative metabolism in skeletal muscle. *Endocrinology* 149(6): 2853-2865.

Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stemple KE (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pig and rabbits. *Biochemistry* 11(14): 2627-2633.

Petrella JK, Kim J, Cross JM, Kosek DJ, Bamman MM (2006). Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E937-946.

Rajab P, Fox J, Riaz S, Tomlinson D, Ball D, Greenhaff PL (2000). Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: R1076-1081.

Rehfeldt C, Weikard R, Reichel K (1994). Effects of the β -adrenergic agonist clenbuterol on skeletal muscle growth in rats. *Arch Anim Nutr* 45(4): 333-344.

Rehfeldt C, Schadereit R, Weikard R, Reichel K (1997). Effect of clenbuterol on growth, carcass and skeletal muscle characteristics in broiler chickens. *British Poultry Sci* 38(4): 366-373.

Rittweger J, Frost HM, Schiessl H, Ohshima H, Alkner, P, Tesch P, Felsenberg D (2005).

Muscle atrophy and bone loss after 90 days' bed rest and the effects of flywheel resistive exercise and pamidronate: Results from the LTBR study. *Bone* 36(6): 1019-1029.

Roberts P, McGeachie JK (1992). The effects of clenbuterol on satellite cell activation and the regeneration of skeletal muscle : an autoradiographic and morphometric study of whole muscle transplants in mice. *J Anat* 180 (Pt 1): 57-65.

Ryall JG, Gregorevic P, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS (2002). β_2 -agonist feneterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R1386-1394.

Sato S, Nomura S, Kawano F, Tanihata J, Tachiyashiki K, Imaizumi K (2008). Effects of β_2 -agonists clenbuterol on β_1 - and β_2 -adrenoceptor mRNA expression of rat skeletal and left ventricle muscle. *J Pharmacol Sci* 107(4): 393-400.

Sato S, Nomura S, Kawano F, Tachiyashiki K, Imaizumi K (2010). Adaptive effects of the β_2 -agonist clenbuterol on expression of β_1 -adrenoceptor mRNA in rat fast-twitch fiber-rich muscles. *J Physiol Sci* 60(2): 119-127.

Sato S, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K (2011a). Muscle plasticity and β_2 -adrenergic receptors: adaptive responses of β_2 -adrenergic receptor expression to muscle hypertrophy and atrophy. *J Biomed Biotechnol* 729598.

Sato S, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K (2011b). Synthesized glucocorticoid, dexamethasone regulates the expression of β_2 -adrenoceptor and glucocorticoid receptor mRNAs but not proteins in slow twitch soleus muscle of rats. *J Toxicol Sci* 36(4): 479-486.

Sato S, Suzuki H, Tsujimoto H, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K (2011c). Casted-immobilization downregulates glucocorticoid receptor expression in rat slow-twitch soleus muscle. *Life Sci* 89(25-26): 962-967.

Sato S, Shirato K, Kizaki T, Ohno H, Tachiyashiki K, Imaizumi K (2012). Effects of the β_2 -agonists and exercise on β_2 -adrenergic receptor signaling in skeletal muscles. *J Phys Fitness Sports Med* 1(1): 139-144.

Sato S, Shirato K, Mitsuhashi R, Inoue D, Kizaki T, Ohno H, Tachiyashiki K, Imaizumi K (2013). Intracellular β_2 -adrenergic receptor signaling specificity in mouse skeletal muscle in response to single-dose β_2 -agonist clenbuterol treatment and acute exercise. *J Physiol Sci* 63(3): 211-218.

Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, Gundersen K, Lomo T (1989). Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Musc Res Cell Motility* 10: 197-205.

Schmalbruch H, Hellhammer U (1977). The number of nuclei in adult rat muscle with special reference to satellite cell. *Anat Rec* 189(2): 169-176.

- Semkova I, Krieglstein J (1999).** Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. *Brain Res Rev* 30: 176-188.
- Shi H, Zeng C, Ricome A, Hannon KM, Grant AL, Gerrard DE (2007).** Extracellular signal-regulated kinase pathway is differentially involved in β -agonist-induced hypertrophy in slow and fast muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1681–1689.
- Shirato K, Tanihata J, Motohashi N, Tachiyashiki K, Tomoda A, Imaizumi K (2007).** β_2 -agonist clenbuterol induced changes in the distribution of white blood cells in rats. *J Pharmacol Sci* 104(2): 146-152.
- Shirato K, Sato S, Sato M, Hashizume Y, Tachiyashiki K, Imaizumi K (2013).** β_2 -agonist clenbuterol suppresses bacterial phagocytosis of splenic macrophages expressing high levels of macrophage receptor with collagenous structure. *Biol Pharm Bull* 36(3): 475-480.
- Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ (2000).** Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res* 302(2): 235-241.
- Snijders T, Smeets JSJ, van Kranenburg J, Kies AK, van Loon LJC, Verdijk LB (2015).** Changes in myonuclear domain size do not precede muscle hypertrophy during prolonged resistance-type exercise training. *Acta Physiol* 216(2): 231-239.

Spurlock DM, McDaneld TG, McIntre LM (2006). Changes in skeletal muscle gene expression following clenbuterol administration. *Bio Med Central* 7: 320.

Stevens L, Firinga C, Gohlsch B, Bastide B, Mounier Y, Pette D (2000). Effect of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1558-1563.

Stevens JE, Pathare NC, Tillman SM, Scarborough MT, Gibbs CP, Shah P, Jayaraman A, Walter GA, Vandenborne K (2006). Relative contributions of muscle activation and muscle size to plantarflexor torque during rehabilitation after immobilization. *Inc J Orthop Res* 24(8), 1729–1736.

Tabary JC, Tabary C, Tardieu C, Tardieu G, Goldspink (1972). Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *J Physiol* 224: 231-244.

Tadball JG, Wehling-Henricks M (2007). Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol* 578: 327-336.

Teng YD, Choi H, Huang W, Onario RC, Fronteta WR, Snyder EY, Sabharwal S (2006). Therapeutic effect of clenbuterol in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Letters* 397: 155-158.

Tomanek R J, Lund D (1974). Degeneration of different types of skeletal muscle fiber II.

Immobilization. *J Anat* 118(Pt 3): 531-541.

Trappe S, Costill D, Gallagher P, Creer A, Peters JR, Evans H, Riley DA, Fitts RH (2009).

Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. *J Appl Physiol* 106(4): 1159-1168.

Vandenborne K, Elliott MA, Walter GA, Abdus S, Okereka E, Shaffer M, Tahernia D,

Esterhai JL (1998). Longitudinal study of skeletal muscle adaptations during immobilization and rehabilitation. *Muscle Nerve* 21(8): 1006-1012.

Vazeille E, Codran A, Claustre A, Averous J, Listrat A, Bechet D, Taillandier D, Dardevet

D, Attaix D, Combaret L (2008). The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1181-1190.

Verhoeckx KCM, Doornbos RP, Witkamp RF, Greef J, Rodenburg RJT (2006).

Beta-adrenergic agonist induce the release of granulocyte chemotactic protein-2, oncostatin M, and vascular endothelial growth factor from macrophages. *Int Immunopharmacol* 6(1): 1-7.

Viguie CA, Lu D, Huang S, Rengen H, Carlson BM (1997).

Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. *Anat Rec* 248: 346-354.

- Walmsley B, Hodgson JA, Burke RE (1978).** Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *J Neurophysiol* 41(5): 1203-1216.
- Wanek LJ, Snow MH (2000).** Activity-induced fiber regeneration in rat soleus muscle. *Anat Rec* 258(2): 176-185.
- Wills CA, Caiozzo VJ, Yasukawa DI, Pretto CA, McMaster WC (1982).** Effects of immobilization on human skeletal muscle. *Orthop Rev* 11: 57-64.
- Yamazaki T (2005).** Effects of intermittent weight-bearing and clenbuterol on disuse atrophy of rat hindlimb muscles *J Jpn Phys Ther Assoc* 8: 9-20.
- Yang YT, McElligott MA (1989).** Multiple actions of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem J* 261(1): 1-10.
- Ye F, Mathur S, Liu M, Borst SE, Walter GA, Sweeney HL, Vandeborne K (2013).** Overexpression and insulin-like growth factor-1 attenuates skeletal muscle damage and accelerates muscle regeneration and functional recovery after disuse. *Exp Physiol* 98: 1038-1052.
- Yimlamai T, Dodd SL, Borst SE, Park S (2005).** Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J Appl Physiol* 99(1): 71-80.

Young OA, Watkins S, Oldham JM, Bass JJ (2011). The role of insulin-like growth factor I in clenbuterol-stimulated growth in growing lamb. *J Anim Sci* 73: 3069-3077.

Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG, Etlinger JD (1988). Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a β_2 -receptor agonist. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 254: E726-732.

Zhong H, Roy RR, Siengthai B, Edgerton VR (2005). Effects of inactivity on fiber size and myonuclear number in rat soleus muscle. *J Appl Physiol* 99(4) 1494-1499.

謝辞

本博士論文の執筆にあたり，早稲田大学大学院スポーツ科学研究科の村岡功教授には終始懇切なるご指導を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

同研究科の坂本静男教授，秋本崇之教授，ならびに順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科の内藤久士教授には博士論文の副査を快諾していただき，心より御礼申し上げます。

福山大の北浦孝教授，久留米大の辻本尚弥教授には，本研究の実施にあたり，共同研究者として様々な御助言をいただきました。ここに心から感謝の意を表します。

元早稲田大学大学院人間科学研究科の今泉和彦教授には，本研究に取り組むきっかけと叱咤激励をいただきました。ここに改めて感謝の意を表します。

最後に，常に私を支えてくれた妻裕子にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。