スポーツ科学研究, 15, 77-87, 2018 年

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

Effects of clenbuterol administration on the atrophied soleus muscle during recovery period

鈴木英樹 [1], 辻本尚弥[2], 北浦　孝[3], 村岡　功[4]
[1]愛知教育大学保健体育講座
[2]久留米大学人間健康学部スポーツ医科学科
[3]金沢大学国際基幹教育院
[4]早稲田大学スポーツ科学学術院

Hideki Suzuki[1], Hisaya Tsujimoto[2], Takashi Kitaura[3], Isao Muraoka[4]
[1]Department of Health and Physical Education, Aichi University of Education
[2]Faculty of Human Health, Kurume University
[3]Institute of Liberal Arts and Science, Kanazawa University
[4]Faculty of Sport Sciences, Waseda University

キーワード:ギプス固定, 回復, クレンブテロール, 筋線維, 核
Key words:cast-immobilization, recovery, clenbuterol, muscle fiber, nucleus

[Abstract]

Using immunohistochemical method, we investigated whether daily administration of clenbuterol (CLE; 1mg/kg body weight per day) accelerate the regrowth of casted-immobilization(IMM)-induced atrophy of soleus muscle fibers. Adult male Sprague-Dawley rats were assigned to control(CON), IMM, IMM+normal recovery contorol(RCON) and IMM+normal recovery with CLE-administration(RCLE) groups. IMM were maintained for 9 days, and the period of recovery was for 7 days. 9 days of hindlimb IMM induced muscle atrophy with decrease of fiber area. After 7days of recovery period, the muscle weights in the RCON and RCLE groups were higher than those in the IMM group. The cross-sectional area of type I fibers was higher in RCLE group than in the IMM group. Nucleus number of type I fibers in the RCON and RCLE groups was lower than in the CON group. Nuclear domain size of type I and type II fibers in the RCON and RCLE groups was higher than in the IMM group. These results suggest that CLE accelerate the regrowth of atrophied soleus fiber without the increase of nucleus.

スポーツ科学研究, 15, 77-87, 2018 年, 受付日:2018 年 3 月 9 日, 受理日:2018 年 10 月 7 日
連絡先: 鈴木英樹 〒448-8542 刈谷市井ケ谷町広沢 1 愛知教育大学保健体育講座
hsuzuki@auecc.aichi-edu.ac.jp

Ⅰ 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 (Christensen et al., 2008, Hortobagyi et al., 2000, Hvid et al., 2014, Stevens et al., 2006, Vandenborne et al., 1998) や実験動物 (Booth F., 1978, Booth & Seider, 1979, Lang et al., 2012, Magne et al., 2011, Vazeille et al., 2008) 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からなる組織であり,

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, 一つの筋核が遺伝子発現やタンパク質合成などの機能を支配できる筋細胞の領域には上限があると考えられている(Palvlath et al., 1989). したがって, 不活動等により萎縮した筋線維で起こる筋核数の低下は(Allen et al., 1995, Hikida R.S., 1997, McCall et al., 1998, Smith et al., 2000), 不活動状態から解放された再成長過程では, 筋核数の増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衛星細胞であり, 骨格筋が過度な力学的負荷を受けると衛星細胞は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ブテロールは, 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双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, クレンブテロール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, 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クレンブテロール投与には, 衛星細胞の増殖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, 固定後により萎縮した骨格筋の回復期でのクレンブテロール投与の影響を, 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.

Ⅱ 方法

1.実験動物

実験には7週齢のSprague-Dawley(SD)系雄ラット(日本クレア)を28匹用いた. ラットは一週間の予備飼育を含め, 室温 25±1℃, 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 ; 日本クレア)を用いて, 飲水と共に自由摂取とした. 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.

2.実験手順

予備飼育後, ラットは無作為に以下のグループに分け, 各群7匹を, 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クレンブテロール投与を行う群(RCLE 群)に割り当てた.

後肢ギプス固定は, ペントバルビタールを用いた軽麻酔下の弛緩状態(底屈約 20 度)で Booth と Kelso(1973)の方法に基づき, 9日間行った. ギプス固定は紙粘土で作成した副木を用いて足関節角度が一定(底屈約 20 度)になるようにした後, 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 1 参照). 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.

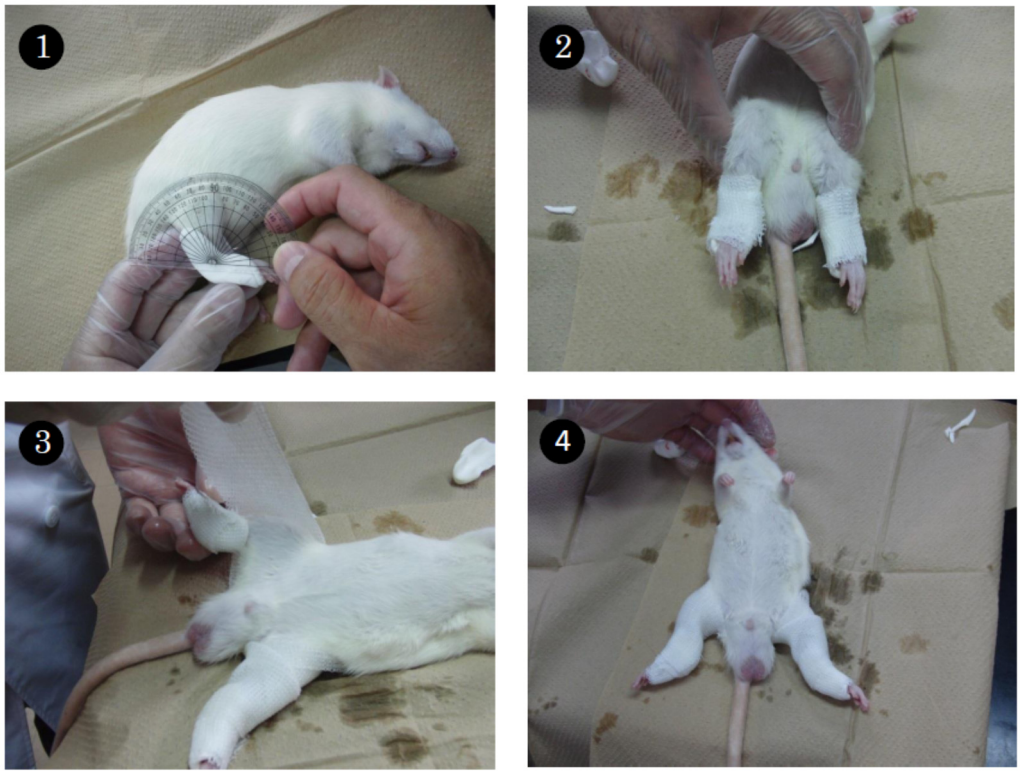

Figure 1. Immobiliozation using a plaster cast. 1) Adjustment of the ankle angle by a paper clay splint. 2) Fixed ankle joint using the bandage-type plaster cast. 3) Fixed knee joint using the same material. 4) Immobilized hind limb.

ギプス固定 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.

ギプス固定解放後の 7 日間の回復期間中, RCLE 群のラットにはクレンブテロール(CLE)溶液(1mg / kg / day)を毎日頸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頸部に皮下注射投与した. 7 日間の回復期間後, 先と同様の方法で RCON 群と RCLE 群よりヒラメ筋を摘出した. 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℃で保存した.

3.組織化学染色

組織化学染色のために, −25℃に設定したクリオスタットにて, ヒラメ筋の筋腹部より厚さ 10μm の連続切片を作製し, 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 分間浸して行った. その後, 一次抗体(遅筋型抗ミオシン重鎖抗体, SIGMA M8421)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℃)で一晩放置し反応させた. 反応後, PBS で洗浄し, ビオチン化二次抗体(抗マウス IgG)を組織上に浸し, 一時間反応させた後, 再び PBS で洗浄した. さらに, アビジン−ビオチン溶液に一時間反応させた後, ペルオキシダーゼ DAB 基質キット(Vector SK-4100)を用いて発色させた. 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(VECTOR H1200)を行った後に封入した.

4.筋線維の分析

抗ミオシン重鎖抗体を用いた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 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.

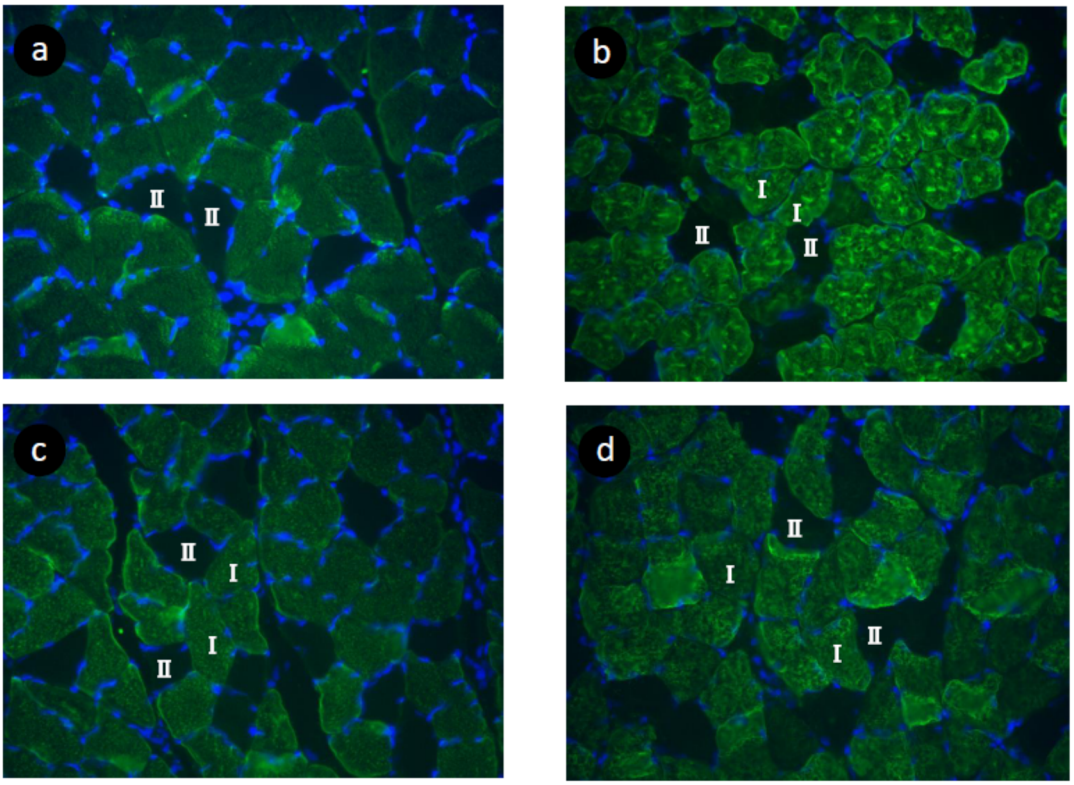

Figure 2. Serial transverse section of the soleus muscle of rat in the CON (a), IMM (b), RCON (c), RCLE (d) groups. Sections were stained for immunohistchemical and DAPI staining.
Ⅰ, type Ⅰ fiber ; Ⅱ, type II fiber

5.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($p<0.05$).

Ⅲ 結果

体重, 筋重量および体重あたりの筋重量の結果を Table 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 群のヒラメ筋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($P < 0.05$), 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 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).

筋線維横断面積の結果を Figure 3 に表した. IMM 群(1838±403 μm²)のタイプⅠ線維の筋線維横断面積は CON 群(2717±213 μm²)に比べて有意に低値を示した($P < 0.05$). RCON(2298±475 μm²)と RCLE 群(2483±212 μm²)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(1692±386 μm²)のタイプⅡ線維の筋線維横断面積は CON 群(2310±199 μm²)に比べて有意に低値を示した($P < 0.05$). RCON(2043±402 μm²)と RCLE 群(2187±296 μm²)のタイプⅡ線維の横断面積には CON 群との間で有意差は見られなかった.

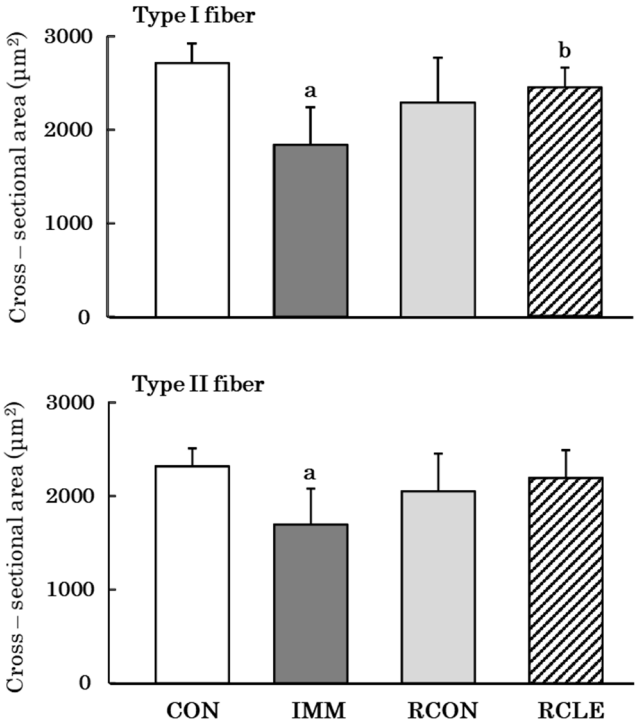

Figure 3. Mean cross – sectional area of each muscle fiber type in the soleus muscle from each group. Data shown are mean ± SD. [a] P < 0.05 (vs. CON group) and [b] P < 0.05 (vs. IMM group)

筋線維一本あたりの核数の結果を Figure 4 に表した. RCON(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).

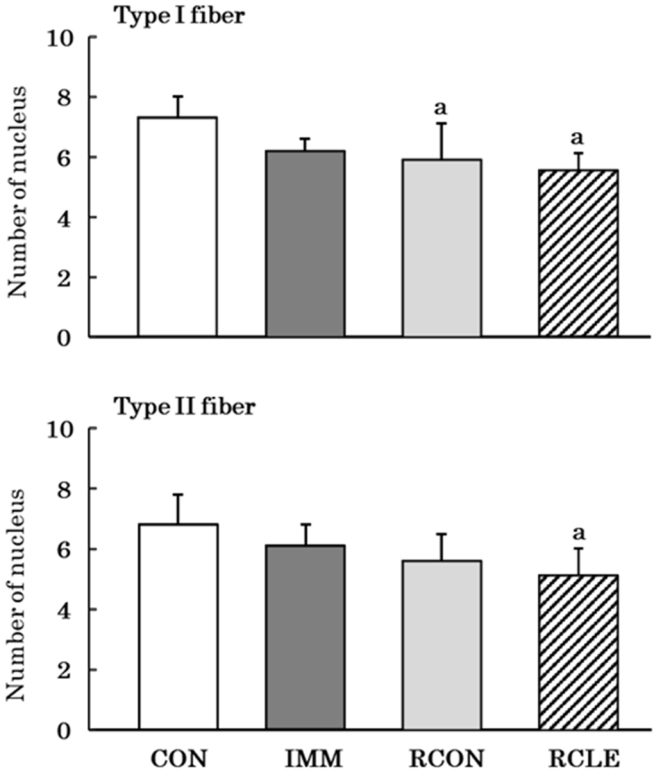

Figure 4. Number of nucleus in type I and type II fiber of soleus muscle in each groups. Data shown are mean ± SD. [a] P < 0.05 (vs. CON group)

核ドメインサイズの結果を Figure 5 に表した. IMM 群(296±64 μm^2)のタイプⅠ線維の核ドメインサイズには CON 群(372±53 μm^2)との間で有意な差はみられなかった. RCON(396±67 μm^2)と RCLE 群(447±50 μm^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±38 μm^2)のタイプⅡ線維の核ドメインサイズには CON(344±53 μm^2)群との間で有意な差はみられなかった. RCON(363±38 μm^2)と RCLE 群(433±47 μm^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, RCLR 群のタイプⅡ線維の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).

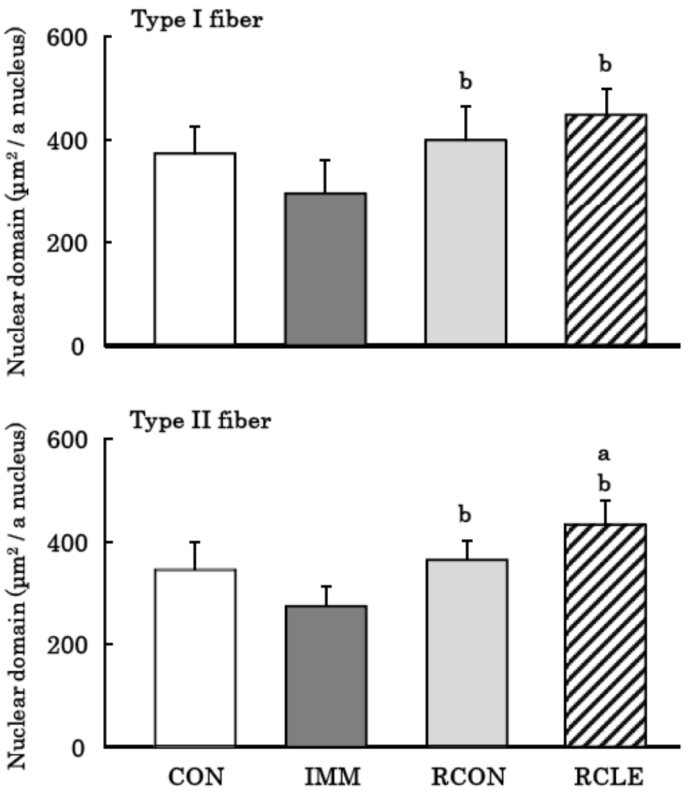

Figure 5. Nuclear domain in type I and type II fiber of soleus muscle in each groups. Data shown are mean ± SD. [a] P < 0.05 (vs. CON group) and [b] P < 0.05 (vs. IMM group)

Ⅳ 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クレンブテロールの投与が，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．

9 日間の後肢固定後，ヒラメ筋のタイプ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(Edgerton, et al., 1975, Tomanek and Lund, 1974)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．

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 and 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)で電子顕微鏡を用いて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．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)，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衛星細胞の区別をすることはできないが，観察された核数の減少の傾向は主に衛星細胞の減少による可能性が高いと考えられた．

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．宇宙飛行により萎縮したラットのヒラメ筋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，萎縮したヒラメ筋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，ヒラメ筋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)は萎縮したヒラメ筋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数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.

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なかった. クレンブテロール投与を行った場合，その回復はタイプⅠとⅡ線維で，IMM 群の横断面積に対してそれぞれ 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. クレンブテロール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, Sato et al., 2008, Suzuki et al, 2015, Yimlamai et al., 2005). 一方で，それらの研究の中には，遅筋ではクレンブテロール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, Suzuki et al, 2015). 本研究の結果はこれらとは異なる現象であった. タンパク質の同化促進作用に及ぼすクレンブテロール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(Kawasaki et al., 2010, Pearen et al., 2008, Shi et al., 2007, Yimlamai et al., 2005). したがって，クレンブテロール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 Lømo, 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るため，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.

萎縮に伴い減少傾向にあった核数は一週間では回復することなく，クレンブテロール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，クレンブテロール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. クレンブテロール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，クレンブテロールにより筋細胞質は増加したものの，両筋線維タイプで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のではないかと考えられた.

以上のことから，骨格筋の萎縮からの回復期におけるクレンブテロールの投与は，遅筋線維を多く含むヒラメ筋の回復を促進する作用があることが示された. また，その促進作用は筋線維の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.

V 謝辞

本研究に際しては，文部科学省科学研究費助成事業(平成 28 年度～平成 30 年度，研究代表者：鈴木英樹，基盤研究 C，課題番号

16K01725)の助成を受けた.

Ⅵ 引用・参考文献

- Allen D.L., Monke S.R., Talmadge R.J., Roy R.R., Edgerton V.R. (1995) Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fiber. J. Appl. Physiol., 78, 1969-1976.
- Allen D.L., Yasui W., Tanaka T., Ohira Y., Nagaoka S, Sekiguchi C., Hinds W.E., Roy R.R., Edgerton V.R. (1996) Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. J. Appl. Physiol., 81, 145-151.
- Allen D.L., Linderman J.K., Roy R.R., Grindeland R.E., Mukku V., Edgerton V.R. (2007) Growth hormone/IGF-I and/or resistive exercise maintains myonuclear number in hindlimb unweighted muscle. J. Appl. Physiol., 83, 1857-1861.
- Booth F.W., Kelso J.R. (1973) Production of rat muscle atrophy by cast fixation. J. Appl. Physiol. , 34, 404-406.
- Booth, F. (1978) Regrowth of atrophied skeletal muscle in adult rats after ending immobilization. J. Appl. Physiol., 44(2), 225-230.
- Booth, F., Seider M.J. (1979) Recovery of skeletal muscle after 3 mo of hindlimb immobilization in rat. J. Appl. Physiol., 47, 435-439.
- 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, 1845–1851.
- Edgerton V.R., Barnard R.J., Peter J.B., Maier A., Simpson D.R. (1975) Properties of immobilized hind-limb muscles of the galago seneggalensisi. Exp. Neurol., 46, 115-131.
- Gallegly J. C., Turesky M.A., Strotman B.A., Gurley C.M., Peterson C.A., Dupont-Versteegden E.E. (2004) Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. J Appl. Physiol., 97, 1082-1090.
- Hawke T.J., Garry D.J. (2001) Myogenic satellite cell: physiology to molecular biology. J. Appl. Physiol., 91, 534-551.
- Henning R., Lømo T. (1985) Firing patterns of motor units in normal rats . Nature, 314, 164-166.
- Hikida R.S., Van Nostran S., Murray J.D., Staron R.S., Gordon S.E., Kraemr W.J. (1997) Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fiber. Anat. Rec. , 247, 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, 293-304.
- Hvid, L.G., Suetta, C., Nielsen, J.H., Jensen, M.M., 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.
- 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.
- Lang, S.M., Kazi, A.A., Hong-Brown, L., Lang, C.H. (2012) Delayed recovery of skeletal muscle mass following hindlimb immobilization in mTOR Heterozygous Mice. PLoS ONE, 7, e38910.
- Leeuwenburgh C., Gurley C.M., Strotman B.A., Dupont-Versteegden E.E. (2005) Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. , 288, R1288-R1296.
- Lynch G.S., Ryall J.G. (2008) Role of β-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease.

Physiol. Rev., 88, 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, 511–524.
- McCall G.E., Allen D.L., Linderman J.K., Grindeland R.E., Roy R.R., Mukku V.R., Edgerton V.R. (1998) Maintenance of myonuclear domain size in rat soleus after overload and growth hormone/IGF-I treatment. J. Appl. Physiol., 84, 1407-1412.
- O' Connor R .S., Pavlath G.K. (2007) Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. J. Appl. Physiol., 103, 1099–1103.
- Pavlath G.K., Rich K., Webster S.G., Blau H.M. (1989) Localization of muscle gene products in nuclear domains. Nature, 337, 570-573
- Pearen M.A., Myers S.A., Raichur S., Ryall J.G., Lynch G.S., Muscat G.E.O. (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, 2853–2865.
- Rajab P., Fox J., Riaz S., Tomlinson D., Ball D., Greenhaff P.L. (2000) Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. Am J Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol., 279, R1076–R1081.
- Rehfeldt C., Weikard R., Reichel K. (1994) Effects of the β-adrenergic agonist clenbuterol on skeletal muscle growth in rats. Arch. Anim. Nutr., 45, 333-344.
- Rehfeldt C., Schadereit R., Weikard R., Reichel K. (1997) Effect of clenbuterol on growth, carcase and skeletal muscle characteristics in broiler chickens. British Poultry Sci., 38, 366-373.
- Sato S., Nomura S., Kawano F., Tanihata J., Tachiyashiki K., Imaizumi K. (2008) Effect of the β2-agonist clenbuterol on β1- and β2-adrenoceptor mRNA expression of rat skeletal and left ventricle muscles. J. Pharmacol., 107, 393-400.
- Schmalbruch H., Hellhammer U. (1977) The number of nuclei in adult rat muscle with special reference to satellite cell. Anat. Rec., 189, 169-176.
- Shi H., Zeng C., Ricome A., Hannon K.M., Grant A.L., Gerrard D.E. (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–C1689.
- Smith H.K., Maxwell L., Martyn J.A., Bass J.J. (2000) Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. Cell Tissue Res., 302, 235-241.
- Spurlock D.M., McDaneld T.G., McIntre L.M. (2006) Changes in skeletal muscle gene expression following clenbuterol administration. Bio Med Central, 7, 320.
- Stevens, J.E.. Pathare, N.C., Tillman, S.M., Scarborough, M.T., Gibbs., C.P., Shah, P., Jayaraman, A., Walter, G.A., Vandenborne, K. (2006) Relative contributions of muscle activation and muscle size to plantarflexor torque during rehabilitation after immobilization. Inc. J. Orthop. Res., 24, 1729–1736.
- Suzuki H., Kitaura T. (2015) Attenuating effects of clenbuterol, β2-agonist, on immobilization-induced atrophy of rat hindlimb muscle fibers. J. Phys. Fitness Sports Med., 4, 363-367.

・ Tomanek R. J., Lund, D. (1974) Degeneration of different types of skeletal muscle fiber II. Immobilization. J. Anat., 118, 531-541.
・ Yimlamai T., Dodd S.L., Borst S.E., Park S. (2005) Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. J. Appl. Physiol., 99, 71–80.
・ Vandenborne, K., Elliott, M.A., Walter, G.A., Abdus, S., Okereka, E., Shaffer, M., Tahernia, D., Esterhai, J.L. (1998) Longitudinal study of skeletal muscle adaptations during immobilization and rehabilitation. Muscle & Nerve 21, 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–E1190.
・ Verhoeckx K.C.M., Doornbos R.P., Witkamp R.F., Greef J., Rodenburg R.J.T. (2006) Beta-adrenergic agonist induce the release of granulocyte chemotactic protein-2, oncostatin M, and vascular endothekial growth factor from macrophages, Int. Immunopharmacol., 6, 1-7.
・ Wanek L.J., Snow M.H. (2000) Activity-induced fiber regeneration in rat soleus muscle. Anat. Rec., 258, 176-185.
・ Zhong H., Roy R.R., Siengthai B., Edgerton V.R. (2005) Effects of inactivity on fiber size and myonuclear number in rat soleus muscle. J Appl. Physiol., 99, 1494-1499.