

Effects of Combined Intermittent Stretching and Clenbuterol on Disuse Atrophy in Rat Soleus Muscle

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Yamazaki, Toshiaki メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00034729

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



**骨格筋萎縮の進行抑制に及ぼすストレッチと
アドレナリン受容体作用薬の併用効果**

17500351

**平成 17 年度～平成 18 年度科学研究費補助金
（基盤研究（C））研究成果報告書**

平成 19 年 3 月

金沢大学附属図書館



0800-04405-3

研究代表者 山 崎 俊 明
金沢大学 医学系研究科 教授

]

<はしがき>

寝たきりや術後の免荷状態などでみられる廃用性筋萎縮の治療および予防は、リハビリテーションにおける重要な課題のひとつである。代表者らは廃用性筋萎縮の進行予防に焦点を絞り、その効果的かつ効率的な予防方法を動物実験で検討してきた。最新の研究結果では、筋萎縮進行中に間欠的荷重を実施することで萎縮の進行を抑制可能であった。さらに、筋肥大効果が報告されているタンパク同化剤（アドレナリン受容体作用薬：Clenbuterol）との併用により、その効果が増加した。その研究において、筋のストレッチが重要な要素である可能性が判明した。

そこで本研究では、ベッド上での臨床応用を想定し1日1時間対象筋を伸張位に保持することで、廃用性筋萎縮の進行予防におけるストレッチとタンパク同化剤との併用効果を検討することを目的に実験を行った。以下にその研究成果を報告する。

□ 研究組織

研究代表者 : 山崎 俊明 (金沢大学医学系研究科教授)
研究分担者 : 横川 正美 (金沢大学医学系研究科助手)
研究分担者 : 立野 勝彦 (金沢大学医学系研究科教授)

□ 交付決定額 (配分額)

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	1,700,000	0	1,700,000
平成18年度	1,600,000	0	1,600,000
総計	3,300,000	0	3,300,000

□ 研究発表

- (1) 学会誌等 : 投稿中
- (2) 口頭発表 : Yamazaki T, et al. Effects of intermittent stretching and/or clenbuterol on disuse atrophy of rat soleus muscle. 15th International WCPT Congress (Vancouver, Canada) 2-6 June 2007. 発表予定 <採択済>
- (3) 出版物 : なし

□ 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

目次

1. 研究成果報告（和文）	1
2. 研究成果報告（英文）	25
3. 資料 I（図表）	49
① 表 1 (Table 1) : 形態的特性と筋原線維タンパク量 Morphometrical properties and myofibrillar protein	49
② 表 2 (Table 2) : 単収縮時の収縮特性 Contractile properties of twitch tension	49
③ 図 1 (Fig. 1) : 筋長および筋周径 Muscle length and circumference	50
④ 図 2 (Fig. 2) : 単収縮時の収縮時間 Contraction time at twitching	51
⑤ 図 3 (Fig. 3) : 単位断面積あたりの最大単収縮張力 Peak twitch tension	52
⑥ 図 4 (Fig. 4) : 筋線維横断面積 Cross sectional area of muscle fiber	53
4. 資料 II（統計分析結果）	55

研究成果報告
(和文)

研究課題名：

骨格筋萎縮の進行抑制に及ぼすストレッチと
アドレナリン受容体作用薬の併用効果

< 緒 言 >

近年のリハビリテーション分野では、長期臥床による悪影響の概念が普及している。具体的には、筋骨格系、心循環系、呼吸器系、代謝系、泌尿器系、消化器系、精神・神経系および皮膚（褥瘡）への影響が報告されている¹⁾。さらに、それらを原因とした機能低下が全身活動性を低下し、他の器官に影響するという悪循環も示唆されている。なかでも、不活動・不使用で生じる廃用性筋萎縮（disuse muscle atrophy）は、疾患および障害を問わず発生し、移乗や歩行などの基本的日常生活に及ぼす影響も大きい^{1, 2)}。理学療法（physical therapy）の臨床場面で遭遇することが多く、下肢筋の廃用性萎縮対策としては、早期荷重が推奨されている^{3, 4)}。しかし、全身状態や障害の程度から適用が困難な場合も多く見られる。

また、効果的・効率的な介入方法の基礎的検討が不十分であり、根拠に基づいた予防・治療法の確立が望まれている。

Brown ら³⁾はラットによる動物実験から、後肢非荷重中の一日 1 時間荷重が、廃用性筋萎縮の進行抑制手段として有用であることを報告している。著者らも廃用性筋萎縮の予防に焦点を絞り、臨床応用が可能な間欠的荷重 (intermittent weight-bearing; IWB) による効果的・効率的萎縮予防方法を研究してきた。具体的には、宇宙医学の研究で用いられる後肢懸垂 (hindlimb unweighting; HU) モデルラットを使い廃用性筋萎縮を惹起し、IWB による効果を調べた。その結果、荷重頻度、荷重時間、荷重間隔および開始時期が要因となることを報告した^{4,5)}。しかし、一日 1 時間程度の間欠的荷重では、萎縮の進行抑制は可能であるが、完全な予防は困難であった。

Roy ら⁶⁾は、下垂体切除した HU ラットヒラメ筋 (soleus muscle; SOL) に及ぼす成長ホルモン (growth hormone; GH) および insulin-like growth factor (IGF-I) と梯子昇り運動の影響を調べている。GH/IGF-I 投与または運動

のみでは、筋断面積に影響しなかった。しかし併用群で相互作用がみられたと報告している。Allen ら⁷⁾も GH/IGF-I 投与と抵抗運動の併用による萎縮抑制効果を報告している。つまり、廃用性筋萎縮進行中の GH などのホルモン投与が、運動による萎縮抑制効果を高める可能性が示唆されている。また、Herrera ら⁸⁾はラットを用いた実験で、廃用性萎縮進行中に、骨格筋萎縮予防の効果が報告されているタンパク同化作用物質 (Clenbuterol; Cb) を投与し、萎縮抑制効果を認め、早期の Cb 投与は患者に有益な萎縮遅延をもたらすことを示唆した。Hayes ら⁹⁾は Cb 投与した mdx マウスの収縮特性 (contractile properties) に関して、低強度運動負荷 (水泳) との併用効果を報告している。Cb は β 2-adrenergic agonist であり、微小重力環境における骨格筋萎縮対策として注目されている^{10,11)}。また、薬理学的にも HU 中の Cb 分布動態も調べられている^{12,13)}。そこで著者らは廃用性筋萎縮進行中における、Cb 投与と IWB の併用効果を調べた¹⁴⁾。その結果、Cb 投与は筋量、線維断面積、筋タンパク量に形態的な萎縮抑制効果を示した

が、収縮特性には効果はなかった。逆に IWB は、形態面での効果は少ないが、収縮特性といった機能面の低下抑制に関して効果的であった。また、Cb 投与と IWB の併用は、タイプ I 線維優位のヒラメ筋で効果的であった。

理学療法の臨床場面では、病状や免荷を理由に短時間でも荷重できない状況が想定される。その場合、理学療法士 (physical therapist) は萎縮抑制効果を期待し筋ストレッチを実施する。Gomes ら¹⁵⁾は短縮位に不動化 (immobilization) したラットヒラメ筋に対する週 1 回 40 分間のストレッチが筋線維萎縮の軽減に有効であると報告している。Coutinho ら¹⁶⁾も短縮位に不動化したラットヒラメ筋に対する、3 日毎のストレッチ (各 40 分) の効果を調べ、筋短縮は防げなかったが、筋線維萎縮の軽減に効果があったと報告している。著者らは、廃用性萎縮進行中の間欠的ストレッチ (intermittent stretching; IST) に関する研究で、頻度および時間が要因であることを報告してきた^{17,18)}。また、同じ 1 日 1 時間の条件設定で比較した研究結果では、IWB に比べ IST による抑制効果は少ないことも報告した¹⁹⁾。しかし、IST と Cb 投与

の併用による萎縮抑制効果を調べた研究は、筆者らが検索した限りでは見られない。そこで本研究では、廃用性筋萎縮進行中のラットヒラメ筋に対する、間欠的ストレッチと Cb 投与による併用効果を、形態および機能の両面から調べることを目的とした。本研究の仮説は、「IWB と比較するならば効果は少ないが IST は機能面での効果、Cb は形態面での効果を示し、臨床的に併用効果がある」とした。

< 方 法 >

1. 実験材料

7 週齢の Wistar 系雄ラットを 35 匹（体重 BW ; 215 ± 6g）準備し、後肢のヒラメ筋を実験材料とした。ラットは個別ケージにて、12 時間の明暗サイクル下で飼育し、餌・水の摂取は自由とした。なお、本研究計画は、金沢大学動物実験委員会にて承認された（承認番号 050301、060362）。

2. 実験方法

ラットを対照群（CON）と実験群に分けた。実験群は以下の 4 群：後肢懸垂処置群（HU）、後肢懸垂中に間欠的筋伸張を実施群（IST）、後肢懸垂中に Cb を投与する群（Cb）、および後肢懸垂中に間欠的筋伸張と Cb 投与を併用する群（IST+Cb）とした。なお、Cb を投与しない 3 群（CON、HU、IST 群）には、同条件で生理的食塩液を投与した（1.0 ml/kg）。実験期間は 2 週間とした。筆者らの先行研究²⁰⁾で記述した簡易装具を装着する方法にて後肢懸垂を実施し、廃用性筋萎縮を惹起した。この後肢

懸垂処置により、ラットの後肢は床に触れない状態となるが、前肢にてケージ内を移動でき、餌・水の摂取は可能である。間欠的伸張は、先行研究¹⁷⁾で記述した方法にて1日1時間実施した。具体的には非収縮性テープにて右足関節を背屈位に保持し、ヒラメ筋を最大伸張位とした。Cb投与(1.0 mg/kg、clenbuterol hydrochloride、Sigma Chemical)は、2-day on/2-day off法¹²⁾に従い、2週間の実験期間の初日、1、4、5、8、9、12および13日目に行った。

3. 分析

14日目に全身麻酔下にて体重を測定後、ヒラメ筋を摘出し筋湿重量(MW)を測定した。筋収縮特性測定後、筋試料は急速凍結し生化学および組織化学的分析まで-80℃で保存した。

1) 収縮特性の測定

摘出直後にヒラメ筋の安静時筋長(ML)および筋周径(MC)をキャリパーにて測定した。その後、*in vitro*で

等尺性筋収縮張力を測定した。ヒラメ筋をリンガー液中に浸し、両端を張力記録装置（LTS-500GA、共和電業）に安静時長の 110% 長で装着した。電気刺激装置（SC6、Medelec）にて最大上矩形波（0.2 ms duration）で筋を刺激し、収縮反応を記録した¹⁴⁾。分析項目は、単収縮における最大張力（Pt）、収縮時間（CT）および弛緩時間（RT）とした。

2) 組織化学的分析

ヒラメ筋腹中央部の横断凍結切片を作成し、ATPase 染色にて筋線維タイプを分類した（タイプ I・II）。先行研究に記述した方法に従い、筋線維横断面積を測定し筋萎縮の定量的指標とした。さらに、筋線維タイプ構成比率を計算し、筋萎縮の定性的指標とした¹⁴⁾。

3) 生化学的分析

Wineski ら¹³⁾と Caiozzo ら²¹⁾の方法を一部改変した方法¹⁴⁾にて、筋タンパク量を測定した。最終的には筋湿重量あたりの筋原線維タンパク量（MP）として表現した。

4) 統計学的分析

データは平均値±標準偏差（SD）で表現した。群間の比較は、一元配置分散分析（ANOVA）を行った。有意差を認めた場合（ $p < 0.05$ ）は、Scheffe's post hoc testを実施した。

< 結 果 >

1. 筋湿重量 (MW)

ヒラメ筋の MW は CON 群に比し、HU 群で 45.8%、IST 群で 52.6%、Cb 群で 69.0%、IST+Cb 群で 74.9% に有意に減少した。Cb 群および IST+Cb 群の MW は、HU 群より有意に大きかったが、IST 群と HU 群間に差はなかった。Cb 群および IST+Cb 群のヒラメ筋相対重量比 (MW/BW) は CON 群と差がなく、Cb 投与の効果が示唆された (Table 1)。

2. 筋長 (ML) および筋周径 (MC)

実験群のヒラメ筋 ML は、CON 群に比し有意に短かった。実験群間では、IST 群および IST+Cb 群の ML が HU 群より有意に長く、間欠的な筋伸張の効果が示唆された。HU 群と Cb 群間の ML に差はなかった。Cb 群および IST+Cb 群のヒラメ筋 MC は、CON 群と差がなく、Cb 投与の効果が示唆された。HU 群と IST 群間に差がなく、しかもその両群は CON 群より有意に短いことから、筋伸張は筋周径には効果的ではないことが示唆された (Table

1、Fig.1)。

3. 収縮特性

弛緩時間 (RT) は群間に差が認められなかった。Cb 群および IST+Cb 群の収縮時間 (CT) は CON 群より有意に短縮し、HU 群および IST 群の CT は CON 群と差がないことから、Cb 投与による速筋化傾向が示唆された。実験群の単収縮張力 (Pt) は、CON 群に比し有意に減少し、実験群間に差はなかった。単位断面積あたりの Pt は、IST 群が CON 群と差がなく、しかも Cb 群より有意に大きい結果から、筋伸張の効果が示唆された (Table 2、Fig.2、Fig.3)。

4. 筋線維タイプ構成および断面積 (CSA)

筋線維タイプ構成比率は、CON 群に比し Cb 群のみで有意に変化し (タイプ I 線維の減少、タイプ II 線維の増加)、Cb 投与による速筋化傾向が示唆された。タイプ I 線維の平均 CSA は、CON 群に比し、HU 群で 42.1%、IST 群で 58.3%、Cb 群で 81.0%、IST+Cb 群で 74.2% に有意

に減少し (Cb > IST+Cb > IST > HU)、全ての群間で有意差を認めた。タイプ II 線維の平均 CSA は、CON 群に比し、HU 群で 34.1%、IST 群で 61.2%、Cb 群で 47.1%、IST+Cb 群で 60.9% に有意に減少し (IST ≈ IST+Cb > Cb > HU)、IST 群と IST+Cb 群間に差は認められなかった (Table 1、Fig.4)。

5. 筋原線維タンパク量 (MP)

実験群の筋原線維タンパク量 (MP) は、CON 群に比し有意に減少した。実験群間では、Cb 群および IST+Cb 群の MP が、HU 群および IST 群より有意に大きく、Cb 投与の効果が示唆された。HU 群と IST 群間に差は認められなかった (Table 1)。

< 考 察 >

本研究は廃用性筋萎縮進行中のラットヒラメ筋に対する、間欠的ストレッチ (IST) と Cb 投与による併用効果を調べた。本研究における IST 効果は、著者らが IWB と Cb 投与の併用効果を調べた先行研究¹⁴⁾の IWB 効果に比べ少なかった。先行研究との違いは、介入処置が IWB から IST に変わったことである。介入処置時間は一日 1 時間で同じである。しかし、IWB は HU をはずし四肢荷重としたが、IST は HU 状態のまま覚醒下で実施した。つまり、ラットの全身状況は異なり、体液分布および Cb 分布動態¹²⁾が効果に影響した可能性が推測される。また、足関節の状態を考慮すると、HU 中に足関節は徐々に底屈曲位をとり、ヒラメ筋は約 10mm 短縮する²²⁾。その状態のラットを荷重した場合、足関節は他動的に背屈し、ヒラメ筋はストレッチされる。しかも体重を支えることで筋仕事量が増加し萎縮の進行抑制に効果的に作用する²³⁾と考えられる。つまり、本研究のストレッチは、ヒラメ筋に他動的ストレッチと等尺性抵抗運動を惹起するが、荷重時のような体重支持による筋仕事量の増加がない分、

萎縮抑制効果が少ないと考えられる。その点に関しては、筆者らの先行研究¹⁹⁾で確認している。

本研究では、ヒラメ筋湿重量、相対重量比、筋周径およびタンパク量においてCb投与の効果を認めた。ストレッチ効果は、ヒラメ筋長、筋線維タイプ構成比率および単収縮張力で認められた。これらの結果から、Cb投与は筋形態面に、ストレッチは収縮力という機能面で効果的と解釈できる。また、Cb投与における悪影響として、速筋化の報告がある^{24・27)}。本研究結果においてもCb投与によるタイプII線維構成比率の増加および収縮時間(CT)の短縮が認められ、速筋化が示唆された。興味深いことに、Cb投与とストレッチを併用することで、筋線維タイプ構成比率の速筋化を防ぐことが可能であった。さらに、タイプI線維断面積はIST群よりIST+Cb群が有意に大きかったが、タイプII線維断面積はIST群とIST+Cb群間に有意差がなく、Cb投与による反応に筋線維タイプ特異性¹²⁾が示唆された。また、単位断面積あたりの単収縮力は、併用群(IST+Cb群)と対照群(CON群)間で有意差がなく、予防が可能であった。これは、Cb投与のみ

では断面積の増加を認めるが、HUにより筋長が短縮し、単位断面積あたりの張力発揮には不利になることが要因と考えられる。ヒラメ筋などの羽状筋 (pinnate muscle) では、肥大により羽状角 (pinnation angle) が増加し、解剖学的断面積と生理学的断面積に違いが生じる。肥大による羽状角の増加により、筋の張力が腱に伝わる際の損失が大きくなり、張力発揮の点で不利になる²⁸⁾と考えられる。以上より、Cb投与で断面積増加を促しながら、筋ストレッチにより伸張刺激を与えることが筋張力発揮には有用と考えられる。張力発揮という機能面の効果が臨床場面には有用と考えられ、この点に関して併用効果が認められたことは本研究における重要な知見である。

Cbの作用メカニズムとして、直接作用と間接作用が示唆されている⁸⁾。Hinkleら²⁹⁾は、Cbによる筋肥大や抗萎縮効果は β_2 -adrenergic receptorによって媒介されることを報告している (直接作用)。Awedeら³⁰⁾は、Cbが筋IGF-Iのlocal expression増加に関連しており、Cbが骨格筋のIGF-I発現をmRNAおよびpeptideレベルの両方で活性化すると示唆している (間接作用)。明確な特異

的細胞間メカニズムは知られていないが、Cb 投与はタンパク合成に関連し、筋線維サイズを増加する⁸⁾と考えられている。しかし、機能面から考えると、長期臥床や免荷を想定した HU 状態の Cb 投与では、ヒラメ筋は短縮し Cb の効果を有効に発揮できないと考えられる。以上の結果を総合的に解釈すると、Cb 投与を実施する場合、(荷重できない状況下では) IST を併用することが臨床的に有用かつ重要であることが示唆される。

理学療法として薬剤投与は領域外であるが、理学療法手段としての IST や IWB の効果を高める方法として可能性がある。患者にとって有益ならば、将来的には患者の了解を得た上で、Cb 投与などとの併用が廃用性筋萎縮を最小限に抑制できるかもしれない^{31, 32)}。その際、Cb 投与のみでは速筋化の悪影響があること^{24, 27)}を考慮し、理学療法手段による介入 (IST や IWB) を併用することが必須条件である。1 日 1 時間程度の間欠的な介入では完全な萎縮予防は困難かもしれないが、筋線維タイプ特異性を考慮した介入方法を、頻度や間隔の観点から工夫することで、効果を高められる可能性がある。また、完全

に予防できなくとも、効果的・効率的な筋萎縮の進行抑制により、回復期間の短縮が期待できる。

< 結 論 >

本研究における IST 効果は、著者らが IWB と Cb 投与の併用効果を調べた先行研究の IWB 効果に比べ少なかった。Cb 投与は筋形態面に、ストレッチは収縮力という機能面で効果的であった。また、ストレッチは非荷重や Cb 投与による速筋化を防ぐことに有効であった。以上より、廃用性筋萎縮進行中のラットヒラメ筋に対する予防的介入方法として、Cb 投与による断面積減少の抑制と、筋ストレッチによる伸張刺激の併用効果の有用性が示唆された。

< 文 献 >

1. Gorbien MJ, Bishop J, Beers MH, et al. Iatrogenic illness in hospitalized elderly people. *J Am Geriatr Soc.* 1992;40:1031-1042.
2. Gogia PP, Schneider VS, LeBlanc AD, et al. Bed rest effect on extremity muscle torque in healthy men. *Arch Phys Med Rehabil.* 1988;69:1030-1032.
3. Brown M, Hasser EM. Weight-bearing effects on skeletal muscle during and after simulated bed rest. *Arch Phys Med Rehabil.* 1995;76:541-546.
4. Yamazaki T, Haida N, Tachino K. Influence of the time when weight bearing is started on disuse atrophy in rat soleus muscle. *J Jpn Phys Ther Assoc.* 2001;4:13-18.
5. Yamazaki T. Influence of hindlimb unweighting and intermittent weight bearing on dynamics of nuclei in rat soleus muscle. *J Jpn Phys Ther Assoc.* 2003;6:1-8.
6. Roy RR, Tri C, Grossman EJ, et al. IGF-I, growth hormone, and/or exercise effects on non-weight-bearing soleus of hypophysectomized rats. *J Appl Physiol.*

- 1996;81:302-311.
7. Allen DL, Linderman JK, Roy RR, et al. Growth hormone/IGF-I and/or resistive exercise maintains myonuclear number in hindlimb unweighted muscles. *J Appl Physiol.* 1997;83:1857-1861.
 8. Herrera NM, Zimmerman AN, Dykstra DD, Thompson LV. Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: A study of hindlimb-unweighted rats. *Arch Phys Med Rehabil.* 2001;82:930-934.
 9. Hayes A, Williams DA. Contractile properties of clenbuterol-treated *mdx* muscle are enhanced by low-intensity swimming. *J Appl Physiol.* 1997;82:435-439.
 10. Dodd SL, Koesterer TJ. Clenbuterol attenuates muscle atrophy and dysfunction in hindlimb-suspended rats. *Aviat Space Environ Med.* 2002;73:635-639.
 11. Abukhalaf IK, von Deutsch DA, Wineski LE, et al. Effect of hindlimb suspension and clenbuterol treatment on polyamine levels in skeletal muscle. *Pharmacology.*

2002;65:145-154.

12. von Deutsch DA, Abukhalaf IK, Wineski LE, et al. Distribution and muscle-sparing effects of clenbuterol in hindlimb-suspended rats. *Pharmacology*. 2002;65:38-48.
13. Wineski LE, von Deutsch DA, Abukhalaf IK, et al. Muscle-specific effects of hindlimb suspension and clenbuterol in mature male rats. *Cells Tissues Organs*. 2002;171:188-198.
14. Yamazaki T. Effects of intermittent weight-bearing and clenbuterol on disuse atrophy of rat hindlimb muscles. *J Jpn Phys Ther Assoc*. 2005;8:9-20.
15. Gomes ARS, Coutinho EL, Franca CN, et al. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:1473-1480.
16. Coutinho EL, Gomes ARS, Franca CN, et al. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:1853-1861.

17. Yamazaki T, Tachino K, Haida N, Tanaka S. Effect of short duration stretching under anesthesia in preventing disuse muscle atrophy in rats. *Jpn J Phys Ther.* 1995;29:135-138.
18. Yamazaki T, Tachino K, Tsukagoshi S. Effect of short duration stretching time on disuse atrophy of rat soleus muscle. *Jpn J Phys Ther.* 1999;33:834-835.
19. Yamazaki T, Tachino K. Comparison of the effects of intermittent weight bearing and short duration stretching on disuse atrophy of rat soleus muscles. *J Tsuruma Health Sci Soc.* 2004;28:91-96.
20. Yamazaki T, Haida N, Tachino K. Influence of weight bearing intervals on the prevention of disuse atrophy in rat soleus muscle. *J Tsuruma Health Sci Soc.* 2002;26:45-50.
21. Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM. Response of slow and fast muscle to hypothyroidism: maximal shortening velocity and myosin isoforms. *Am J Physiol.* 1992;263:C86-C94.

22. Ohira M, Handa H, Kawano F, et al. Regulation of the properties of rat hind limb muscles following gravitational unloading. *Jpn J Physiol.* 2002;52:235-245.
23. Riley DA, Slocum GR, Bain JLW, et al. Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J Appl Physiol.* 1990;69:58-66.
24. Stevens L, Firinga C, Gohlsch B, et al. Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279:C1558-C1563.
25. Lynch GS, Hayes A, Campbell SP, Williams DA. Effect of β_2 -agonist administration and exercise on contractile activation of skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol.* 1996;81:1610-1618.
26. Ricart-Firinga C, Stevens L, Canu MH, et al. Effect of β_2 -agonist clenbuterol on biochemical and contractile properties of unloaded soleus fiber of rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:C582-C588.
27. Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG, Etlinger JD. Slow to

- fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a beta 2-receptor agonist. *Am J Physiol.* 1988;254:E726-E732.
28. Kawakami Y, Abe T, Fukunaga T. Muscle-fiber pennation angles are greater in hypertrophied than in normal muscles. *J Appl Physiol.* 1993;74:2740-2744.
29. Hinkle RT, Hodge KMB, Cody DB, et al. Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the β 2-adrenergic receptor. *Muscle Nerve.* 2002;25:729-734.
30. Awede BL, Thissen JP, Lebacqz J. Role of IGF-I and IGFBPs in the changes of mass and phenotype induced in rat soleus muscle by clenbuterol. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E31-E37.
31. Prather ID, Brown DE, North P, Wilson J. Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids? *Med Sci Sports Exerc.* 1995;27:1118-1121.
32. Maltin C, Delday M, Watson J, et al. Clenbuterol, a β -adrenoceptor agonist, increases relative muscle

strength in orthopaedic patients. *Clin Sci.*

1993;84:651-654.

研究成果報告
(英文)

Title:**Effects of Combined Intermittent Stretching and Clenbuterol on Disuse Atrophy in Rat Soleus Muscle****Introduction**

Close attention has recently been being given, in the field of rehabilitation, to the adverse effects of prolonged confinement to bed. To put it concretely, reports have been published concerning adverse effects on the musculoskeletal, cardiovascular, respiratory, metabolic, urogenital and neuropsychiatric systems and on the skin (in the form of bedsores)¹⁾. In addition, it has also been suggested that there exists a vicious cycle, consisting of the compromised function of these systems due to being bed-ridden and the resultant reduction of systemic activity and adverse effects on other organs. Among other conditions, disuse muscle atrophy, caused by prolonged inactivity or disuse of the muscles irrespective of the type of underlying disease or disorder, has a substantial effect on the person's activities of daily living (ADL)

such as standing and walking^{1, 2)}. Clinically, disuse muscle atrophy is often seen among patients who present to receive physical therapy. Early start of weight-bearing has been recommended to prevent disuse atrophy of the leg muscles^{3, 4)}. However, early exercises of this kind are often difficult for the patient to undertake, depending on the severity of the systemic condition or disorder. Furthermore, no truly adequate basic studies have been performed as yet to establish effective and efficient means of intervention pertaining to disuse muscle atrophy. It is desirable to establish an evidence-based method of preventing and treating disuse muscle atrophy.

On the basis of the results from a study in rats, Brown et al.³⁾ reported that one-hour weight-loading per day, during a hindlimb unweighting period, is useful as a means of suppressing the progression of disuse muscle atrophy. We have also been exploring effective and efficient means of preventing atrophy by using clinically applicable program “intermittent weight-bearing (IWB)”, focusing on the prevention of disuse muscle atrophy. To put it concretely, we induced disuse muscle atrophy in a rat model of hindlimb unweighting (HU), a model

often used for space medicine, and evaluated the effects of IWB. We have reported to date that four factors (frequency, duration, interval and timing of start of weight-bearing) determine the efficacy of IWB^{4, 5)}. We also found that IWB for about one hour a day can suppress the progression of atrophy but does not allow complete prevention of atrophy.

Roy et al.⁶⁾ evaluated the effects of growth hormone (GH), insulin-like growth factor (IGF-I) and the exercise of climbing upstairs on the soleus muscle (SOL) of hypophysectomized HU rats. In their study, treatment with GH/IGF-I or exercise alone did not affect the cross-sectional area (CSA) of SOL. However, GH/IGF-I treatment combined with the exercise did affect the CSA of the SOL. Allen et al.⁷⁾ also reported effects of combined GH/IGF-I therapy and resistive exercise in suppressing muscular atrophy. These previous results suggest that treatment with hormone (GH, etc.) during progression of disuse muscle atrophy can stimulate the atrophy-suppressive effect of exercise. In an experiment using rats, Herrera et al.⁸⁾ treated rats during progression of disuse muscle atrophy with clenbuterol (Cb), a compound with anabolic effects on protein

reported to be useful in preventing skeletal muscle atrophy. Muscle atrophy was suppressed by Cb, suggesting that early treatment with Cb can significantly delay muscle atrophy. Regarding the contractile properties of mdx mice treated with Cb, Hayes et al.⁹⁾ reported that Cb used in combination with low intensity exercise (swimming) was effective on the properties. Cb is a β_2 -adrenergic agonist and has been attracting close attention as a means of coping with skeletal muscle atrophy under microgravitational environments^{10, 11)}. The distribution of Cb in skeletal muscle during HU has been analyzed pharmacologically^{12, 13)}. With these previous findings in mind, the authors evaluated the effects of Cb combined with IWB on progression of disuse muscle atrophy¹⁴⁾. Cb treatment alone suppressed muscle atrophy in terms of morphological parameters (muscle mass, CSA of muscle fiber and muscle protein content) but did not affect contractile properties. Uncombined IWB had little effects on morphological parameters but suppressed reduction in function (contractile properties). Combined IWB and Cb was useful in suppressing the atrophy of type I fiber-predominant SOL.

When physical therapy is applied clinically, it is plausible to imagine that even short-time weight-bearing is difficult depending on the condition of the patient. In such cases, physical therapists tend to apply muscular stretching with an expectation of its effect in suppressing muscle atrophy. Gomes et al.¹⁵⁾ reported that in rats whose SOL was immobilized in shortened position, once weekly 40-minute stretching was useful in alleviating atrophy of muscle fiber. Coutinho et al.¹⁶⁾ also evaluated the effects of stretching once in every 3 days (for 40 minutes each time) on rat SOL immobilized in shortened position and reported that it did not allow prevention of muscle shortening but was useful in alleviating atrophy of muscle fiber. Our previous studies on intermittent stretching (IST) during progression of disuse muscle atrophy identified frequency and duration of IST as factors determining its efficacy^{17, 18)}. In our another study¹⁹⁾ comparing IWB with IST when both therapies were applied for one hour per day, the effect in suppressing muscle atrophy was lower with IST than with IWB. To our knowledge, however, no study has been reported concerning suppression of atrophy by

a combination of IST and Cb. The present study was undertaken to evaluate the effects of Cb treatment combined with IST on rat SOL during progression of disuse muscle atrophy from both morphological and functional aspects. A hypothesis underlying this study was that IST has functional effects (although its effects are less strong than IWB) and Cb has morphological effects, thus justifying the clinical use of IST in combination with Cb.

Methods

Materials. Thirty-five male Wistar rats were prepared (age; 7 weeks, body weight; 215 ± 6 g). As experimental materials, the soleus muscle (SOL) was selected as a representative slow muscle in the hindlimb. The rats were housed in individual cages under a 12-hour light-dark cycle, and maintained on standard rat feed and water *ad libitum*.

Protocol. This experimental protocol was approved by the committee on animal experimentation of Kanazawa University (No. 050301, 060362). The rats were divided into a control group (CON) and an experimental group. The experimental group was

further subdivided into four groups: HU treatment only group (HU), HU treatment + IST group (IST), HU treatment + Cb medication group (Cb) and HU treatment + IST + Cb medication group (IST+Cb). The three groups without Cb medication (CON, HU and IST group) were injected with physiological saline under the same conditions. The experimental period was 2 weeks. Disuse atrophy was induced by the HU treatment device as described in our previous studies²⁰⁾. The hindlimb was suspended so that it did not touch the floor. During suspension, the rats could move using their forelimbs in order to consume food and water. IST was performed for one hour daily. The right SOL in the IST and IST+Cb group was maximally stretched by dorsiflexing the ankle joint with non-elastic tape¹⁷⁾. The rats were subcutaneously injected with Cb (1.0mg/kg, clenbuterol hydrochloride, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) or saline (1.0ml/kg) following a 2-day on/2-day off dosing regimen¹²⁾ for 2 weeks (days 0, 1, 4, 5, 8, 9, 12 and 13).

Muscle preparation. On Day 14, body weight (BW) was measured, and SOL was extracted under anesthesia (pentobarbital sodium, 50mg/kg, ip). After the measurement of contractile

properties, muscles were rapidly frozen and stored at -80°C until biochemical and histochemical analysis. ***Measurement of contractile properties.*** After measurement of muscle length (ML) and circumference (MC) at rest, isometric contractile properties were measured *in vitro*. The muscle was mounted onto a force-recording device (LTS-500GA, Kyowa, Japan) and bathed in Ringer's solution (25°C), which had been aerated with oxygen gas. The muscle was stretched to 110% of its resting length, stimulated with a supramaximal square wave (0.2 ms duration) delivered via two parallel platinum electrodes using an electric stimulator (SC6, Medelec, UK) ¹⁴⁾. Contractile responses were recorded and analyzed on an analog-to-digital converter coupled to a computer. The analysis parameters were peak twitch tension (Pt), contraction time (CT) and one-half relaxation time (RT) at twitching. The muscle wet weight (MW) was measured after blotting the extra solution three times using absorbent paper.

Histochemical analysis. Transverse sections were cut using a cryostat microtome at -25°C and classified into muscle fiber type (I and II) with actomyosin ATPase staining. The type proportion of SOL fibers was calculated as a qualitative index of atrophy

according to the method described in a previous study¹⁴⁾. As a quantitative index of atrophy, the CSA of more than 200 muscle fibers in each muscle was measured.

Biochemical analysis. The muscle protein concentration was obtained using a modification¹⁴⁾ of the technique described by Wineski et al.¹³⁾ and Caiozzo et al.²¹⁾. All tissue preparations were performed on ice with buffer at 4°C. Using a homogenizer, the muscle was homogenized in 10 vol of a solution containing 250 mM sucrose, adjusted to pH 6.8. This homogenate was centrifuged at 1,000 g for 10 min. using a centrifugal separator. The pellet was resuspended in 10 vol of a solution containing 175 mM KCl (Solution A). This homogenate was centrifuged again as described above. The final pellet was suspended in 300µl Solution A and used to determine the myofibrillar protein (MP) concentration. The protein concentration was determined using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay. The MP concentration was expressed as milligrams per gram muscle wet weight.

Statistical analysis. The data are expressed as mean±SD. The differences among the groups were statistically evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA). When a significant

difference was recognized ($P<0.05$), paired comparisons were performed using Scheffé's post hoc test.

Results

Muscle wet weight (MW). Compared with the CON group, MW of SOL was significantly decreased to 45.8% in the HU, 52.6% in IST, 69.0% in Cb and 74.9% in IST+Cb group. MW in the Cb and IST+Cb groups was significantly greater than that in the HU group, but there was no significant difference between the IST and HU groups. The muscle-to-body weight ratio (MW/BW) of SOL in the Cb and IST+Cb groups was not significantly different from those in the CON group, indicating the effect of Cb medication (Table 1).

Muscle length (ML) and circumference (MC). ML in all experimental groups significantly decreased compared with that in the CON group. Among the experimental groups, ML in the IST and IST+Cb groups was significantly longer than that in the HU group, indicating the effect of stretching. However, there was no significant difference between the HU and Cb groups. MC in the Cb and IST+Cb groups was not significantly different from

that in the CON group, indicating the effect of Cb medication. There was no significant difference between the HU and IST groups, and MC in these groups was significantly smaller than that in the CON group, showing that stretching did not affect MC (Table 1, Fig.1).

Contractile properties. RT did not differ among groups. CT in the Cb and IST+Cb groups was significantly shorter than that in the CON group, but CT in the HU and IST groups was not significantly different from that in the CON group, showing a tendency for fast muscle to be influenced by Cb medication. Pt in all experimental groups significantly decreased compared with that in the CON group. There was no significant difference in Pt among the experimental groups. Pt/cm² in the IST group was significantly larger than that in the Cb group, while there was no significant difference between those in the CON and IST groups, indicating the effect of stretching (Table 2, Fig.2, Fig.3).

Type proportion and cross-sectional area (CSA) of SOL. The proportion of type I fibers in the Cb group was significantly decreased compared with those in other groups. Conversely, the proportion of type II fibers in the Cb group was significantly

increased compared with those in other groups, showing a tendency toward fast muscle. Compared with that in the CON group, the mean CSA of type I fibers was significantly decreased in all experimental groups (Cb > IST+Cb > IST > HU). Similarly, the mean CSA of type II fibers was significantly decreased in all experimental groups (IST \approx IST+Cb > Cb > HU). There was no significant difference between the IST and IST+Cb groups (Table 1, Fig.4).

Protein concentration. MP concentration in all experimental groups was significantly decreased compared with that in the CON group. Among the experimental groups, MP concentration in the Cb and IST+Cb groups was significantly greater than those in the HU and IST groups, indicating the effect of Cb medication. There was no significant difference between the HU and IST groups (Table 1).

Discussion

The present study was undertaken to evaluate the effects of combined IST (intermittent stretching) and Cb treatment on SOL during progression of disuse muscle atrophy in rats. The

efficacy of uncombined IST in the present study was lower than the efficacy of uncombined IWB evaluated in our previous study¹⁴⁾ of the effects of combined IWB and Cb treatment. The present study differed from the previous study in that IST was used as the method of intervention in the present study although IWB was employed in the previous study. The duration of intervention was one hour per day in both the present study and the previous study. Unlike the previous IWB study in which the weight was applied to four extremities, without incorporating HU, the present study used IST in conscious HU rats. This means that the systemic condition of rats differed between the present and previous studies, and that the distribution¹²⁾ of body fluid and Cb during the intervention probably affected the efficacy. During HU, the ankle joint gradually assumes a position of plantar flexion, causing SOL to contract by about 10 mm²²⁾. If the rat in this state bears the load, the ankle joint will undergo passive dorsi-flexion, causing SOL to be stretched. Furthermore, bearing the body weight will increase the muscular work and thus suppress the progression of muscle atrophy²³⁾. We may therefore say that the way of

stretching, used in the present study, induces passive stretching and isometric resistant exercise of SOL but is less effective in suppressing muscle atrophy because it does not induce an increase of muscular work needed to bear the weight applied. This feature of this approach has been confirmed in our previous study¹⁹⁾.

In the present study, treatment with Cb exerted effects on the wet weight, relative weight, circumference and protein content of SOL. Stretching exerted effects on the length, twitch tension and fiber type proportion of SOL. These results may be interpreted as indicating that Cb affects muscle morphology while stretching affects the function (contractility). Many studies have reported Cb-induced shift from slow-twitch (type I) toward fast-twitch (type II) fiber types in SOL²⁴⁻²⁷⁾. Also in the present study, Cb treatment increased the proportion of type II fibers and reduced the contraction time, suggesting conversion of the muscle into fast muscle. It is noteworthy that the conversion of the muscle into fast muscle through a change in the composition of muscle fibers was prevented by the combination of stretching and Cb treatment. The CSA of type I

fiber was significantly greater in the IST+Cb group than in the IST group, while the CSA of type II fiber did not differ significantly between these two groups. This suggests that the response to Cb varies depending on type-specificity¹²⁾ of muscle fiber. The twitch tension per unit CSA did not differ significantly between the combined group (IST+Cb) and the control group, indicating that reduction in twitch tension can be prevented by this method. This result seems to be attributable to the total of the following two changes: (1) an increase in the CSA by Cb treatment, and (2) shortening of the muscle by HU, thus reducing the tension per unit CSA. In case of pinnate muscles such as SOL, hypertrophy elevates the pinnation angle, resulting in a difference between the anatomical CSA and the physiological CSA. It seems likely that the increase in the pinnation angle due to hypertrophy can cause greater loss during the transmission of muscular tension through the tendons, serving as a factor unfavorable for production of tension²⁸⁾. On the basis of these results, we may say that stimulating the extension of SOL by stretching, while stimulating the increase of CSA by Cb treatment, is useful in

promoting the production of SOL tension. Since efficacy on function (production of tension) seems to be useful in clinical cases, it is noteworthy that this effect was exerted by this combined method in the present study.

Regarding the mechanism for action of Cb, the studies reported to date suggest both direct action and indirect action⁸⁾. Hinkle et al.²⁹⁾ reported that the effects of Cb in inducing muscular hypertrophy or preventing muscle atrophy are mediated by β_2 -adrenergic receptor (direct action). Awede et al.³⁰⁾ reported that Cb is involved in an increase of local expression of IGF-I in muscles and probably activates the expression of IGF-I in skeletal muscles both at the levels of mRNA and peptide (indirect action). Although the specific inter-cellular mechanism involved in the action of Cb has not yet been fully clarified, it seems likely that Cb treatment affects protein synthesis and thus increases the size of muscle fibers⁸⁾. However, when viewed from functional aspects, Cb treatment during HU (equivalent to long-term bed-ridden patients or load-free condition) will cause shortening of SOL and will not lead to adequate manifestation of the effects of Cb.

Taken these together, we may say that if Cb is to be used for patients who cannot bear weights, its use in combination with IST will be clinically useful and important.

Although medication is usually not considered when performing physical therapy, it has the potential of elevating the efficacy of physical therapy using IST or IWB. If expected to be beneficial to the patient and if the patient consents to it in advance, the use of Cb in combination with physical therapy may provide a valid means of minimizing disuse muscle atrophy^{31, 32}). However, considering that Cb treatment alone can have an adverse effect (promotion of conversion into fast muscle)²⁴⁻²⁷), it is essential that Cb is not used separately but is combined with intervention by physical therapy (IST or IWB). Complete prevention of atrophy may be difficult by intermittent intervention for about one hour a day, but the efficacy of this kind of intervention may be elevated by using a method of intervention tailored to the type-specificity of muscle fiber and by adopting an optimal frequency and interval of intervention. Even if complete prevention is not possible, this approach is expected to shorten the time required for recovery

by effectively and efficiently suppressing the progression of muscle atrophy.

Conclusion

In summary, the efficacy of IST in the present study was lower than the efficacy of IWB evaluated in our previous study¹⁴⁾ of the effects of combined IWB and Cb treatment. However, the results may be interpreted as indicating that Cb affects muscle morphology while stretching affects the function (contractility). Furthermore, the conversion of the muscle into fast muscle through a change in the composition of muscle fibers was prevented by the combination of stretching and Cb treatment. These data suggest that the intervention of combined IST and Cb treatment during progression of disuse muscle atrophy in rats will be useful and important.

References

1. Gorbien MJ, Bishop J, Beers MH, et al. Iatrogenic illness in hospitalized elderly people. *J Am Geriatr Soc.* 1992;40:1031-1042.
2. Gogia PP, Schneider VS, LeBlanc AD, et al. Bed rest effect on extremity muscle torque in healthy men. *Arch Phys Med Rehabil.* 1988;69:1030-1032.
3. Brown M, Hasser EM. Weight-bearing effects on skeletal muscle during and after simulated bed rest. *Arch Phys Med Rehabil.* 1995;76:541-546.
4. Yamazaki T, Haida N, Tachino K. Influence of the time when weight bearing is started on disuse atrophy in rat soleus muscle. *J Jpn Phys Ther Assoc.* 2001;4:13-18.
5. Yamazaki T. Influence of hindlimb unweighting and intermittent weight bearing on dynamics of nuclei in rat soleus muscle. *J Jpn Phys Ther Assoc.* 2003;6:1-8.
6. Roy RR, Tri C, Grossman EJ, et al. IGF-I, growth hormone, and/or exercise effects on non-weight-bearing soleus of hypophysectomized rats. *J Appl Physiol.* 1996;81:302-311.
7. Allen DL, Linderman JK, Roy RR, et al. Growth

- hormone/IGF-I and/or resistive exercise maintains myonuclear number in hindlimb unweighted muscles. *J Appl Physiol.* 1997;83:1857-1861.
8. Herrera NM, Zimmerman AN, Dykstra DD, Thompson LV. Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: A study of hindlimb-unweighted rats. *Arch Phys Med Rehabil.* 2001;82:930-934.
 9. Hayes A, Williams DA. Contractile properties of clenbuterol-treated *mdx* muscle are enhanced by low-intensity swimming. *J Appl Physiol.* 1997;82:435-439.
 10. Dodd SL, Koesterer TJ. Clenbuterol attenuates muscle atrophy and dysfunction in hindlimb-suspended rats. *Aviat Space Environ Med.* 2002;73:635-639.
 11. Abukhalaf IK, von Deutsch DA, Wineski LE, et al. Effect of hindlimb suspension and clenbuterol treatment on polyamine levels in skeletal muscle. *Pharmacology.* 2002;65:145-154.
 12. von Deutsch DA, Abukhalaf IK, Wineski LE, et al. Distribution and muscle-sparing effects of clenbuterol in hindlimb-suspended rats. *Pharmacology.* 2002;65:38-48.
 13. Wineski LE, von Deutsch DA, Abukhalaf IK, et al.

Muscle-specific effects of hindlimb suspension and clenbuterol in mature male rats. *Cells Tissues Organs*. 2002;171:188-198.

14. Yamazaki T. Effects of intermittent weight-bearing and clenbuterol on disuse atrophy of rat hindlimb muscles. *J Jpn Phys Ther Assoc*. 2005;8:9-20.
15. Gomes ARS, Coutinho EL, Franca CN, et al. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:1473-1480.
16. Coutinho EL, Gomes ARS, Franca CN, et al. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:1853-1861.
17. Yamazaki T, Tachino K, Haida N, Tanaka S. Effect of short duration stretching under anesthesia in preventing disuse muscle atrophy in rats. *Jpn J Phys Ther*. 1995;29:135-138.
18. Yamazaki T, Tachino K, Tsukagoshi S. Effect of short duration stretching time on disuse atrophy of rat soleus muscle. *Jpn J Phys Ther*. 1999;33:834-835.
19. Yamazaki T, Tachino K. Comparison of the effects of

- intermittent weight bearing and short duration stretching on disuse atrophy of rat soleus muscles. *J Tsuruma Health Sci Soc.* 2004;28:91-96.
20. Yamazaki T, Haida N, Tachino K. Influence of weight bearing intervals on the prevention of disuse atrophy in rat soleus muscle. *J Tsuruma Health Sci Soc.* 2002;26:45-50.
 21. Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM. Response of slow and fast muscle to hypothyroidism: maximal shortening velocity and myosin isoforms. *Am J Physiol.* 1992;263:C86-C94.
 22. Ohira M, Handa H, Kawano F, et al. Regulation of the properties of rat hind limb muscles following gravitational unloading. *Jpn J Physiol.* 2002;52:235-245.
 23. Riley DA, Slocum GR, Bain JLW, et al. Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J Appl Physiol.* 1990;69:58-66.
 24. Stevens L, Firinga C, Gohlsch B, et al. Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279:C1558-C1563.
 25. Lynch GS, Hayes A, Campbell SP, Williams DA. Effect of

- β_2 -agonist administration and exercise on contractile activation of skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol.* 1996;81:1610-1618.
26. Ricart-Firinga C, Stevens L, Canu MH, et al. Effect of β_2 -agonist clenbuterol on biochemical and contractile properties of unloaded soleus fiber of rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:C582-C588.
27. Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG, Etlinger JD. Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a beta 2-receptor agonist. *Am J Physiol.* 1988;254:E726-E732.
28. Kawakami Y, Abe T, Fukunaga T. Muscle-fiber pennation angles are greater in hypertrophied than in normal muscles. *J Appl Physiol.* 1993;74:2740-2744.
29. Hinkle RT, Hodge KMB, Cody DB, et al. Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the β_2 -adrenergic receptor. *Muscle Nerve.* 2002;25:729-734.
30. Awede BL, Thissen JP, Lebacqz J. 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.*

2002;282:E31-E37.

31. Prather ID, Brown DE, North P, Wilson J. Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids? *Med Sci Sports Exerc.* 1995;27:1118-1121.
32. Maltin C, Delday M, Watson J, et al. Clenbuterol, a β -adrenoceptor agonist, increases relative muscle strength in orthopaedic patients. *Clin Sci.* 1993;84:651-654.

資料 I
(図表)

Table 1: Morphometrical properties and myofibrillar protein concentration in SOL (Mean±SD)

Groups(n)	CON(8)	HU(7)	IST(6)	Cb(7)	IST+Cb(7)
MW (mg)	126.9±10.5†	58.1±4.1*	66.8±5.9*	87.6±9.5*†	95.0±13.2*†
MW/BW (mg/g body weight)	0.47±0.04†	0.32±0.02*	0.36±0.04*	0.44±0.04†	0.46±0.04†
ML (mm)	24.1±0.5†	19.3±0.5*	21.5±0.6*†	19.8±0.7*	21.4±1.0*†
MC (mm)	10.3±0.8†	7.2±0.9*	7.9±0.4*	9.4±1.0†	9.0±0.9†
CSA (µm ²)					
Type I fiber	2458±773†	1035±322*	1432±498*†	1990±937*†	1822±953*†
Type II fiber	2222±491†	758±198*	1361±370*†	1047±520*†	1354±638*†
Proportion (%)					
Type I fiber	80.1±7.2	75.2±7.7	77.5±2.6	65.9±9.1*	73.8±5.4
Type II fiber	19.9±7.2	24.8±7.7	22.5±2.6	34.1±9.1*	26.2±5.4
MP (mg/g muscle weight)	109±10†	56±11*	62±10*	85±12*†	88±9*†

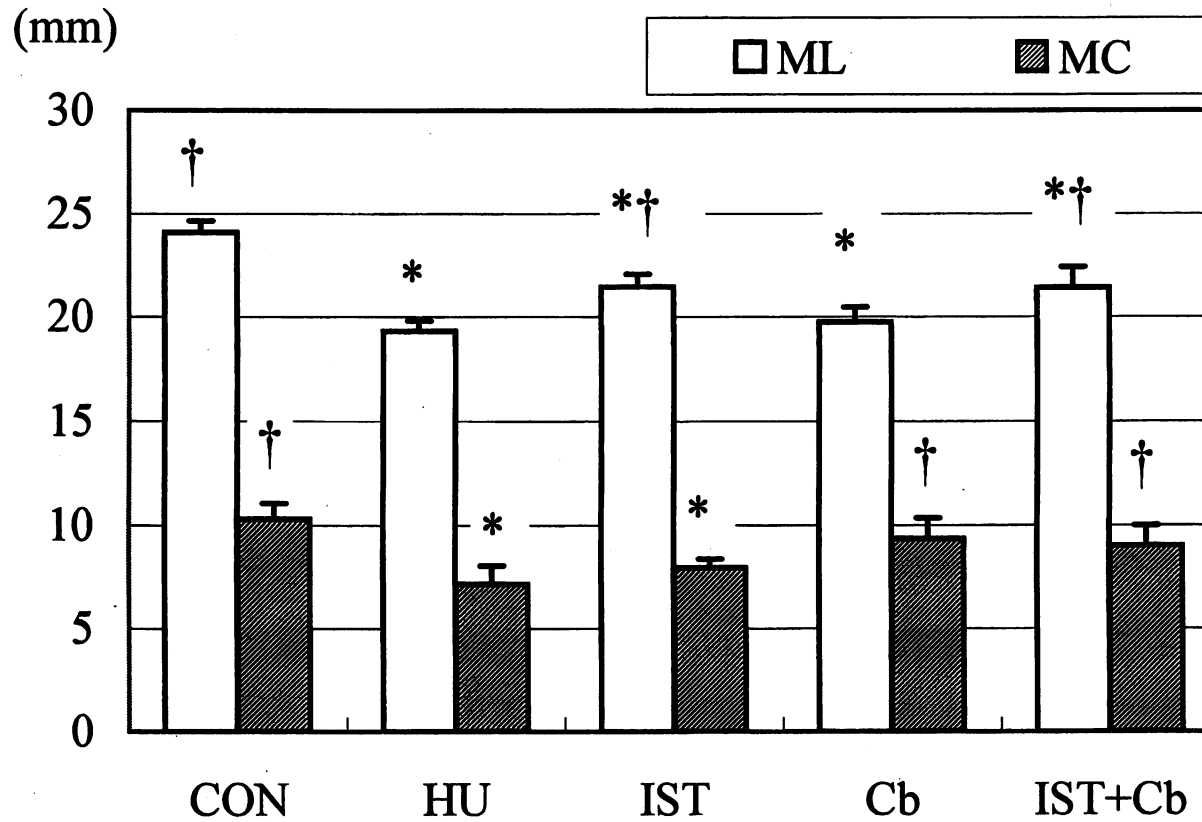
* P<0.05 when compared CON. † P<0.05 when compared HU.

Table 2: Contractile properties of twitch tension in SOL (Mean±SD)

Groups(n)	CON(8)	HU(7)	IST(6)	Cb(7)	IST+Cb(7)
CT (ms)	94.2±8.6	77.5±13.7	74.2±14.6	69.2±7.4*	73.3±5.2*
RT (ms)	221.7±19.1	207.5±36.6	171.7±27.0	179.2±49.9	178.3±30.1
Pt (N)	0.18±0.01†	0.06±0.01*	0.09±0.03*	0.06±0.02*	0.08±0.02*
Pt/cm ² (N/cm ²)	3.47±0.43†	2.10±0.44*	2.95±0.86	1.43±0.52*	1.88±0.46*

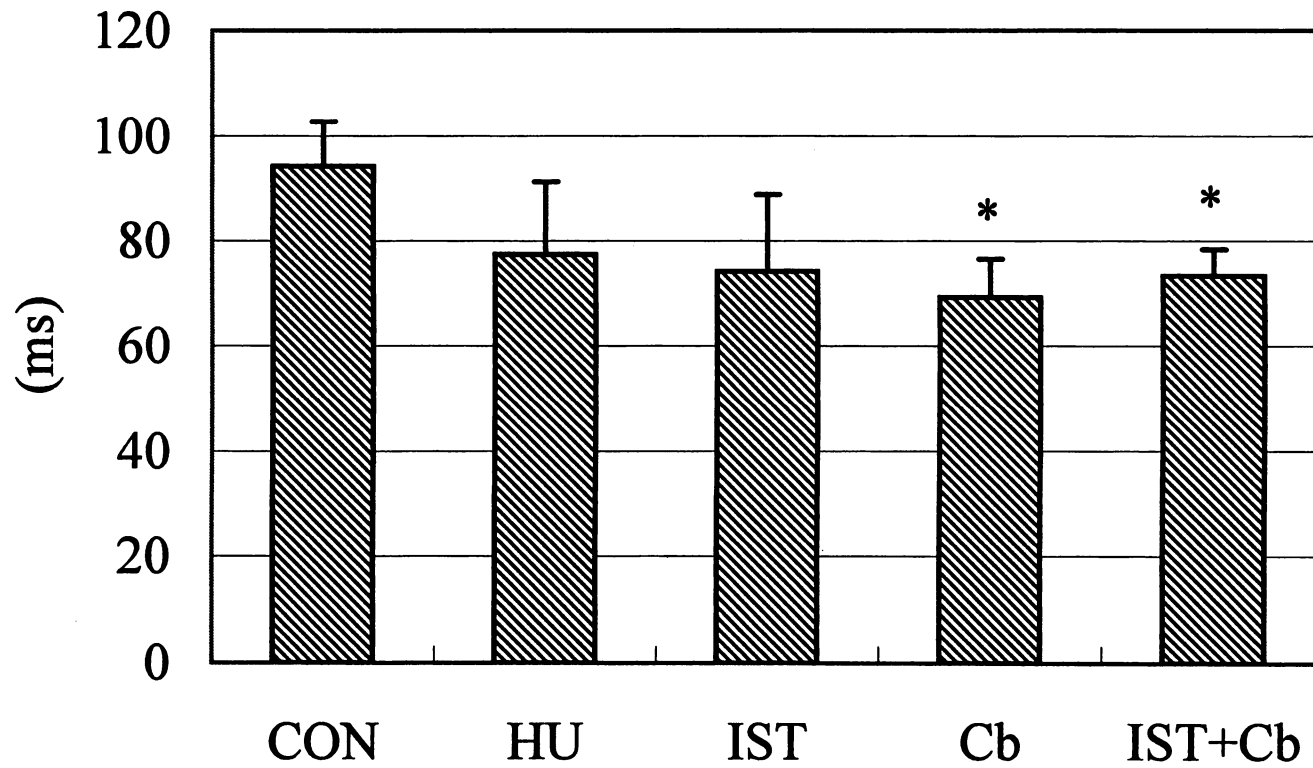
* P<0.05 when compared CON. † P<0.05 when compared HU.

Fig. 1 Muscle length (ML) and circumference (MC) in SOL



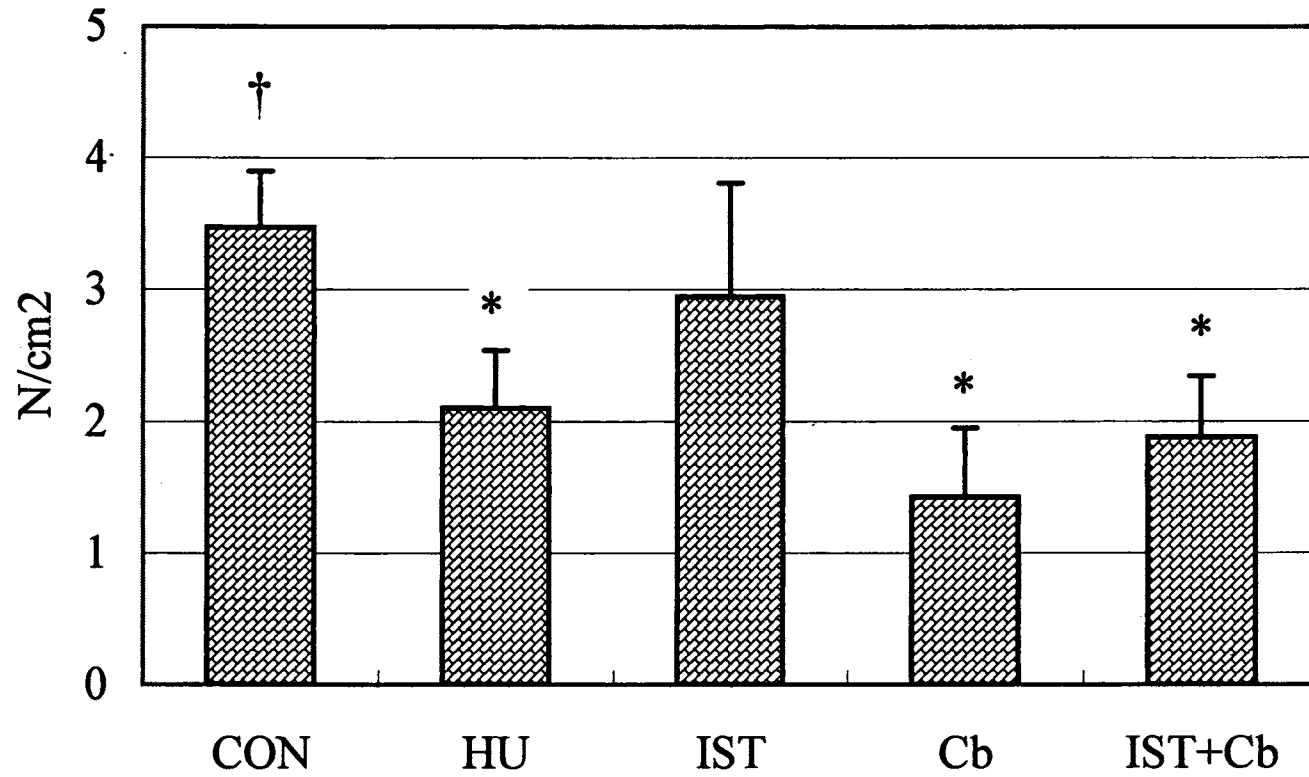
* P<0.05 when compared CON. † P<0.05 when compared HU.

Fig. 2 Contraction time (CT) at twitching in SOL



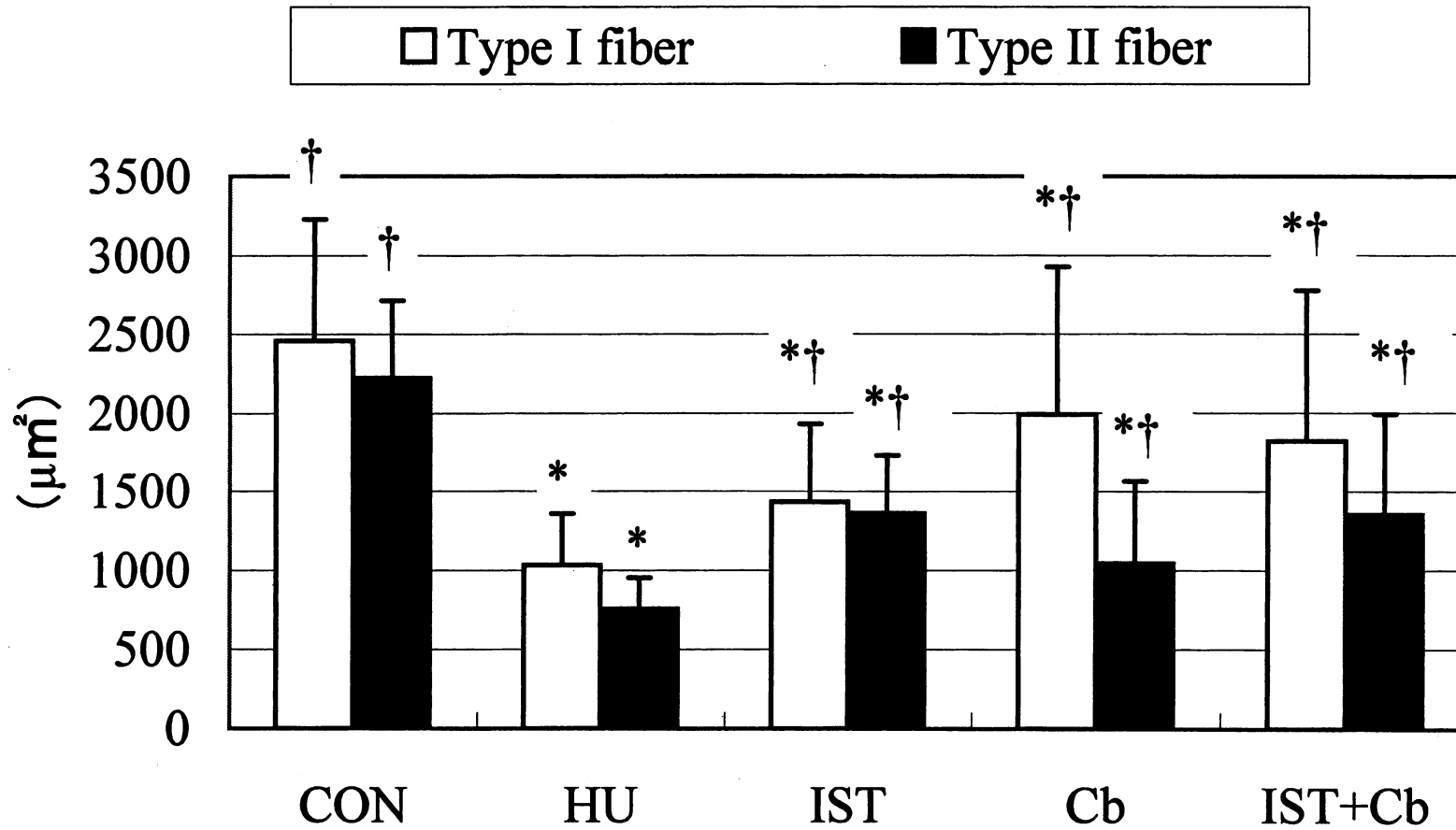
* P<0.05 when compared CON.

Fig. 3 Peak twitch tension in SOL



* $P < 0.05$ when compared CON. † $P < 0.05$ when compared HU.

Fig. 4 Cross sectional area (CSA) of muscle fiber in SOL



* P<0.05 when compared CON. † P<0.05 when compared HU.

資料Ⅱ
(統計分析結果)

分散分析表 : preBW

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	48.881	12.220	.322	.8611	1.287	.111
残差	30	1139.119	37.971				

基本統計量 : preBW

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	7	216.714	6.651	2.514
CON	8	215.000	6.256	2.212
H14	7	215.000	2.646	1.000
ST	6	212.833	5.307	2.167
STCb	7	215.143	8.335	3.150

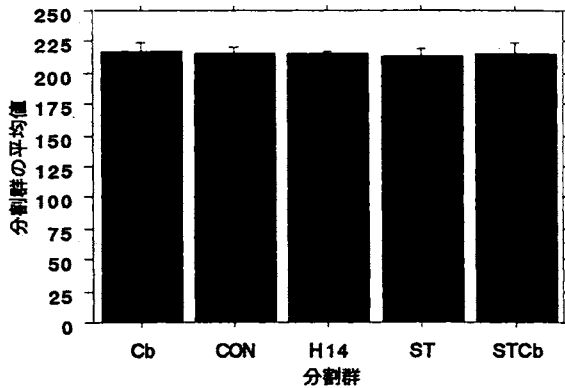
分散分析係数表 : preBW

切片	係数	標準誤差	t値	p値
切片	214.938	1.046	205.505	<.0001
GROUP: Cb	1.776	2.085	.852	.4011
CON	.062	1.985	.031	.9753
H14	.062	2.085	.030	.9765
ST	-2.105	2.212	-.952	.3488
STCb	.205			

交互作用棒グラフ : preBW

効果 : GROUP

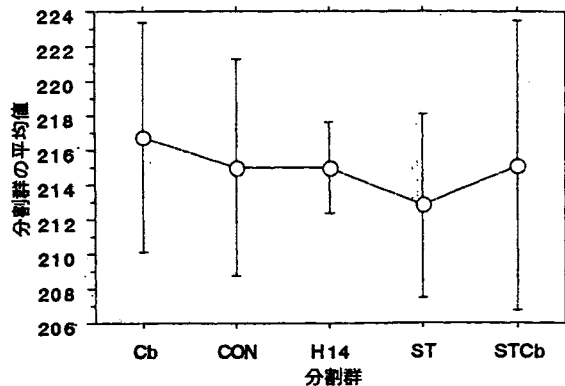
エラーバー : ± 1 標準偏差



交互作用折れ線グラフ : preBW

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



FisherのPLSD : preBW

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値
Cb, CON	1.714	6.513	.5949
Cb, H14	1.714	6.727	.6066
Cb, ST	3.881	7.001	.2668
Cb, STCb	1.571	6.727	.6368
CON, H14	0.000	6.513	.
CON, ST	2.167	6.796	.5200
CON, STCb	-.143	6.513	.9646
H14, ST	2.167	7.001	.5322
H14, STCb	-.143	6.727	.9657
ST, STCb	-2.310	7.001	.5057

Scheffe : preBW

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値
Cb, CON	1.714	10.460	.9900
Cb, H14	1.714	10.804	.9912
Cb, ST	3.881	11.245	.8621
Cb, STCb	1.571	10.804	.9937
CON, H14	0.000	10.460	.
CON, ST	2.167	10.915	.9795
CON, STCb	-.143	10.460	>.9999
H14, ST	2.167	11.245	.9817
H14, STCb	-.143	10.804	>.9999
ST, STCb	-2.310	11.245	.9768

Tukey-Kramer : preBW

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値
Cb, CON	1.714	9.246
Cb, H14	1.714	9.549
Cb, ST	3.881	9.939
Cb, STCb	1.571	9.549
CON, H14	0.000	9.246
CON, ST	2.167	9.648
CON, STCb	-.143	9.246
H14, ST	2.167	9.939
H14, STCb	-.143	9.549
ST, STCb	-2.310	9.939

分散分析表 : BW

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	41933.171	10483.293	102.811	<.0001	411.244	1.000
残差	30	3059.000	101.967				

基本統計量 : BW

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	7	198.571	8.018	3.030
CON	8	273.250	10.977	3.881
H14	7	179.714	7.228	2.732
ST	6	189.500	12.211	4.985
STCb	7	205.143	11.335	4.284

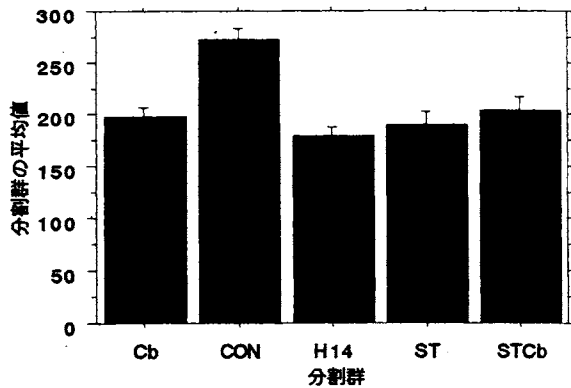
分散分析係数表 : BW

切片	係数	標準誤差	t値	p値
切片	209.236	1.714	122.078	<.0001
GROUP: Cb	-10.664	3.417	-3.121	.0040
CON	64.014	3.253	19.676	<.0001
H14	-29.521	3.417	-8.639	<.0001
ST	-19.736	3.624	-5.446	<.0001
STCb	-4.093			

交互作用棒グラフ : BW

効果 : GROUP

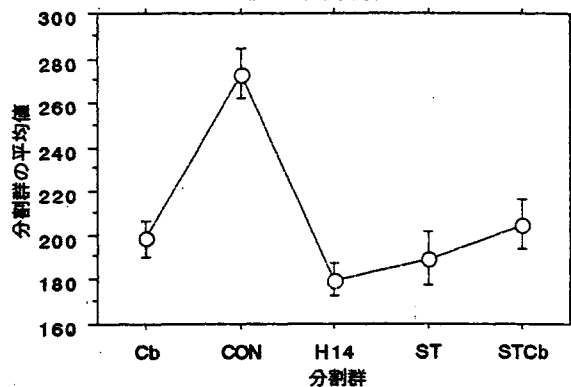
エラーバー : ± 1 標準偏差



交互作用折れ線グラフ : BW

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



FisherのPLSD : BW

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-74.679	10.673	<.0001	S
Cb, H14	18.857	11.023	.0015	S
Cb, ST	9.071	11.473	.1168	
Cb, STCb	-6.571	11.023	.2329	
CON, H14	93.536	10.673	<.0001	S
CON, ST	83.750	11.137	<.0001	S
CON, STCb	68.107	10.673	<.0001	S
H14, ST	-9.786	11.473	.0918	
H14, STCb	-25.429	11.023	<.0001	S
ST, STCb	-15.643	11.473	.0092	S

Scheffe : BW

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-74.679	17.142	<.0001	S
Cb, H14	18.857	17.704	.0319	S
Cb, ST	9.071	18.427	.6301	
Cb, STCb	-6.571	17.704	.8277	
CON, H14	93.536	17.142	<.0001	S
CON, ST	83.750	17.887	<.0001	S
CON, STCb	68.107	17.142	<.0001	S
H14, ST	-9.786	18.427	.5605	
H14, STCb	-25.429	17.704	.0018	S
ST, STCb	-15.643	18.427	.1298	

Tukey-Kramer : BW

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
Cb, CON	-74.679	15.151	S
Cb, H14	18.857	15.648	S
Cb, ST	9.071	16.287	
Cb, STCb	-6.571	15.648	
CON, H14	93.536	15.151	S
CON, ST	83.750	15.810	S
CON, STCb	68.107	15.151	S
H14, ST	-9.786	16.287	
H14, STCb	-25.429	15.648	S
ST, STCb	-15.643	16.287	

分散分析表 : MW

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	21350.120	5337.530	60.878	<.0001	243.512	1.000
残差	30	2630.280	87.676				

基本統計量 : MW

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	7	87.571	9.519	3.598
CON	8	126.875	10.535	3.725
H14	7	58.143	4.059	1.534
ST	6	66.833	5.879	2.400
STCb	7	95.000	13.153	4.971

FisherのPLSD : MW

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-39.304	9.897	<.0001	S
Cb, H14	29.429	10.222	<.0001	S
Cb, ST	20.738	10.639	.0004	S
Cb, STCb	-7.429	10.222	.1482	
CON, H14	68.732	9.897	<.0001	S
CON, ST	60.042	10.328	<.0001	S
CON, STCb	31.875	9.897	<.0001	S
H14, ST	-8.690	10.639	.1057	
H14, STCb	-36.857	10.222	<.0001	S
ST, STCb	-28.167	10.639	<.0001	S

分散分析係数表 : MW

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	86.885	1.589	54.668	<.0001
GROUP: Cb	.687	3.169	.217	.8299
CON	39.990	3.017	13.256	<.0001
H14	-28.742	3.169	-9.070	<.0001
ST	-20.051	3.361	-5.967	<.0001
STCb	8.115			

Scheffe : MW

効果 : GROUP

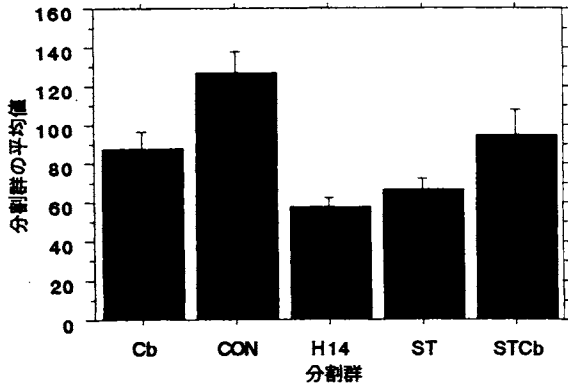
有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-39.304	15.895	<.0001	S
Cb, H14	29.429	16.417	<.0001	S
Cb, ST	20.738	17.087	.0107	S
Cb, STCb	-7.429	16.417	.6999	
CON, H14	68.732	15.895	<.0001	S
CON, ST	60.042	16.587	<.0001	S
CON, STCb	31.875	15.895	<.0001	S
H14, ST	-8.690	17.087	.6008	
H14, STCb	-36.857	16.417	<.0001	S
ST, STCb	-28.167	17.087	.0003	S

交互作用棒グラフ : MW

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



Tukey-Kramer : MW

効果 : GROUP

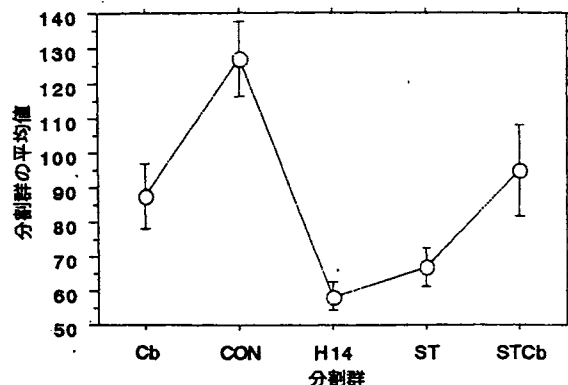
有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
Cb, CON	-39.304	14.049	S
Cb, H14	29.429	14.510	S
Cb, ST	20.738	15.103	S
Cb, STCb	-7.429	14.510	
CON, H14	68.732	14.049	S
CON, ST	60.042	14.661	S
CON, STCb	31.875	14.049	S
H14, ST	-8.690	15.103	
H14, STCb	-36.857	14.510	S
ST, STCb	-28.167	15.103	S

交互作用折れ線グラフ : MW

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



分散分析表 : MW/BM

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	.119	.030	23.282	<.0001	93.129	1.000
残差	30	.038	.001				

基本統計量 : MW/BM

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	7	.440	.041	.015
CON	8	.465	.036	.013
H14	7	.324	.018	.007
ST	6	.355	.038	.015
STCb	7	.463	.041	.016

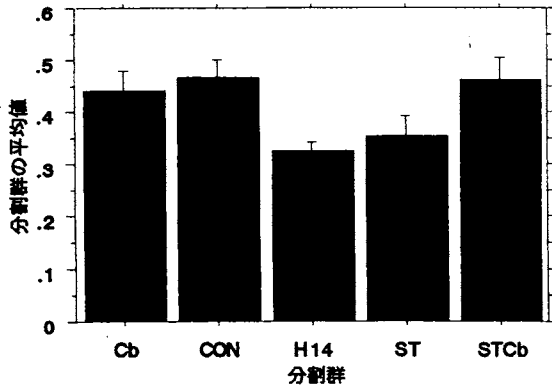
分散分析係数表 : MW/BM

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	.409	.006	67.366	<.0001
GROUP: Cb	.031	.012	2.523	.0172
CON	.056	.012	4.817	<.0001
H14	-.085	.012	-7.026	<.0001
ST	-.054	.013	-4.235	.0002
STCb	.053			

交互作用棒グラフ : MW/BM

効果 : GROUP

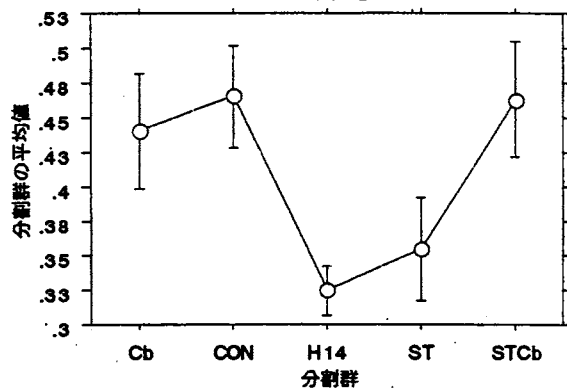
エラーバー : ± 1 標準偏差



交互作用折れ線グラフ : MW/BM

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



FisherのPLSD : MW/BM

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-.025	.038	.1874	
Cb, H14	.116	.039	<.0001	S
Cb, ST	.085	.041	.0002	S
Cb, STCb	-.023	.039	.2417	
CON, H14	.141	.038	<.0001	S
CON, ST	.110	.039	<.0001	S
CON, STCb	.002	.038	.9087	
H14, ST	-.031	.041	.1336	
H14, STCb	-.139	.039	<.0001	S
ST, STCb	-.108	.041	<.0001	S

Scheffe : MW/BM

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-.025	.061	.7680	
Cb, H14	.116	.063	<.0001	S
Cb, ST	.085	.065	.0054	S
Cb, STCb	-.023	.063	.8374	
CON, H14	.141	.061	<.0001	S
CON, ST	.110	.063	.0002	S
CON, STCb	.002	.061	>.9999	
H14, ST	-.031	.065	.6695	
H14, STCb	-.139	.063	<.0001	S
ST, STCb	-.108	.065	.0003	S

Tukey-Kramer : MW/BM

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
Cb, CON	-.025	.054	
Cb, H14	.116	.055	S
Cb, ST	.085	.058	S
Cb, STCb	-.023	.055	
CON, H14	.141	.054	S
CON, ST	.110	.056	S
CON, STCb	.002	.054	
H14, ST	-.031	.058	
H14, STCb	-.139	.055	S
ST, STCb	-.108	.058	S

分散分析表 : ML

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	105.611	26.403	53.709	<.0001	214.834	1.000
残差	30	14.748	.492				

基本統計量 : ML

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	7	19.771	.723	.273
CON	8	24.087	.546	.193
H14	7	19.343	.486	.184
ST	6	21.467	.628	.256
STCb	7	21.429	1.011	.382

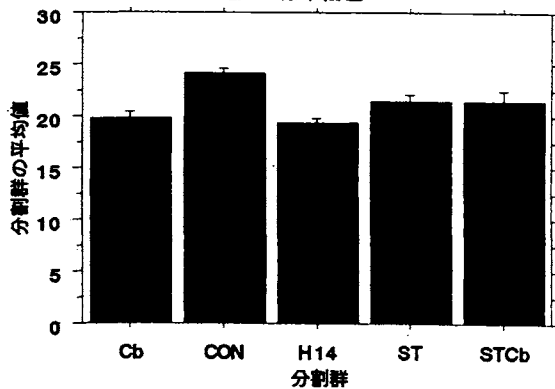
分散分析係数表 : ML

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	21.219	.119	178.304	<.0001
GROUP: Cb	-1.448	.237	-6.103	<.0001
CON	2.868	.226	12.696	<.0001
H14	-1.877	.237	-7.909	<.0001
ST	.247	.252	.983	.3337
STCb	.209			

交互作用棒グラフ : ML

効果 : GROUP

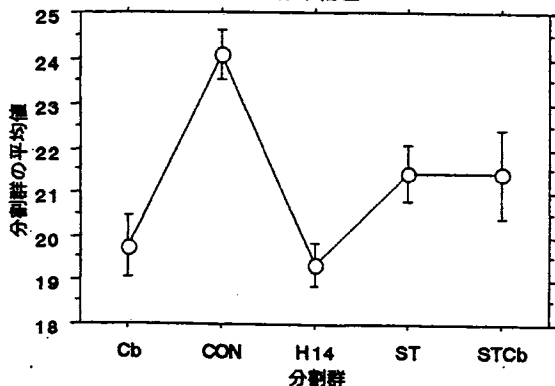
エラーバー : ± 1 標準偏差



交互作用折れ線グラフ : ML

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



FisherのPLSD : ML

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-4.316	.741	<.0001	S
Cb, H14	.429	.765	.2619	
Cb, ST	-1.695	.797	.0001	S
Cb, STCb	-1.657	.765	.0001	S
CON, H14	4.745	.741	<.0001	S
CON, ST	2.621	.773	<.0001	S
CON, STCb	2.659	.741	<.0001	S
H14, ST	-2.124	.797	<.0001	S
H14, STCb	-2.086	.765	<.0001	S
ST, STCb	.038	.797	.9229	

Scheffe : ML

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-4.316	1.190	<.0001	S
Cb, H14	.429	1.229	.8577	
Cb, ST	-1.695	1.279	.0045	S
Cb, STCb	-1.657	1.229	.0037	S
CON, H14	4.745	1.190	<.0001	S
CON, ST	2.621	1.242	<.0001	S
CON, STCb	2.659	1.190	<.0001	S
H14, ST	-2.124	1.279	.0003	S
H14, STCb	-2.086	1.229	.0002	S
ST, STCb	.038	1.279	>.9999	

Tukey-Kramer : ML

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
Cb, CON	-4.316	1.052	S
Cb, H14	.429	1.087	
Cb, ST	-1.695	1.131	S
Cb, STCb	-1.657	1.087	S
CON, H14	4.745	1.052	S
CON, ST	2.621	1.096	S
CON, STCb	2.659	1.052	S
H14, ST	-2.124	1.131	S
H14, STCb	-2.086	1.087	S
ST, STCb	.038	1.131	

分散分析表 : MC

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	43.336	10.834	15.800	<.0001	63.201	1.000
残差	30	20.571	.686				

基本統計量 : MC

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	7	9.357	.969	.366
CON	8	10.288	.762	.270
H14	7	7.171	.871	.329
ST	6	7.933	.441	.180
STCb	7	9.043	.943	.356

FisherのPLSD : MC

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-.930	.875	.0380	S
Cb, H14	2.186	.904	<.0001	S
Cb, ST	1.424	.941	.0043	S
Cb, STCb	.314	.904	.4832	
CON, H14	3.116	.875	<.0001	S
CON, ST	2.354	.913	<.0001	S
CON, STCb	1.245	.875	.0068	S
H14, ST	-.762	.941	.1086	
H14, STCb	-1.871	.904	.0002	S
ST, STCb	-1.110	.941	.0224	S

分散分析係数表 : MC

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	8.758	.141	62.315	<.0001
GROUP: Cb	.599	.280	2.136	.0409
CON	1.529	.267	5.731	<.0001
H14	-1.587	.280	-5.663	<.0001
ST	-.825	.297	-2.776	.0094
STCb	.284			

Scheffe : MC

効果 : GROUP

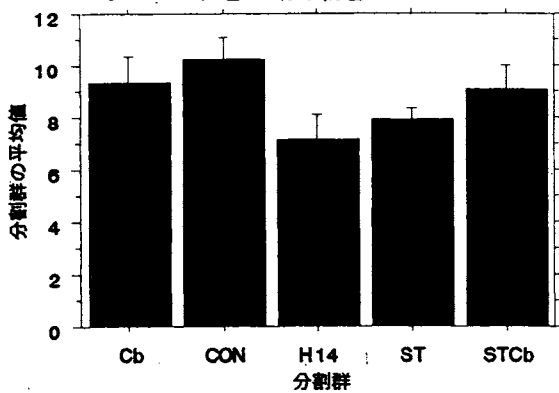
有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-.930	1.406	.3403	
Cb, H14	2.186	1.452	.0010	S
Cb, ST	1.424	1.511	.0731	
Cb, STCb	.314	1.452	.9719	
CON, H14	3.116	1.406	<.0001	S
CON, ST	2.354	1.467	.0004	S
CON, STCb	1.245	1.406	.1044	
H14, ST	-.762	1.511	.6087	
H14, STCb	-1.871	1.452	.0060	S
ST, STCb	-1.110	1.511	.2420	

交互作用棒グラフ : MC

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



Tukey-Kramer : MC

効果 : GROUP

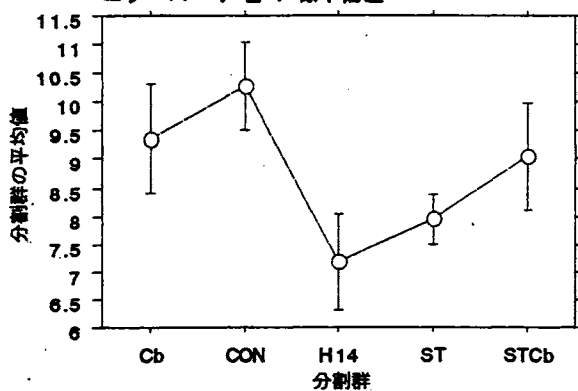
有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
Cb, CON	-.930	1.242	
Cb, H14	2.186	1.283	S
Cb, ST	1.424	1.336	S
Cb, STCb	.314	1.283	
CON, H14	3.116	1.242	S
CON, ST	2.354	1.297	S
CON, STCb	1.245	1.242	S
H14, ST	-.762	1.336	
H14, STCb	-1.871	1.283	S
ST, STCb	-1.110	1.336	

交互作用折れ線グラフ : MC

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



分散分析表 : N-% -1

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	804.284	201.071	4.235	.0080	16.941	.883
残差	29	1376.785	47.475				

基本統計量 : N-% -1

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	7	65.886	9.126	3.449
CON	7	80.143	7.195	2.719
H14	7	75.229	7.691	2.907
ST	6	77.517	2.590	1.057
STCb	7	73.757	5.447	2.059

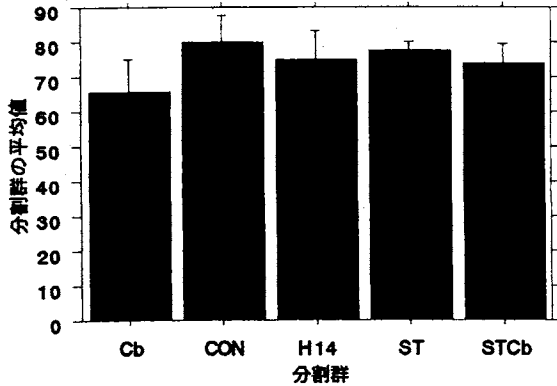
分散分析係数表 : N-% -1

切片	係数	標準誤差	t値	p値
GROUP: Cb	-8.620	2.339	-3.686	.0009
CON	5.637	2.339	2.410	.0225
H14	.722	2.339	.309	.7597
ST	3.010	2.480	1.214	.2345
STCb	-.749			

交互作用棒グラフ : N-% -1

効果 : GROUP

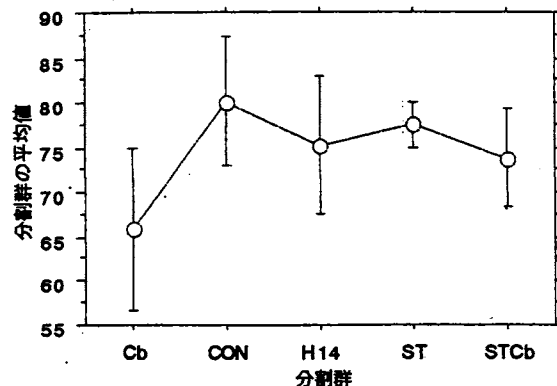
エラーバー : ± 1 標準偏差



交互作用折れ線グラフ : N-% -1

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



FisherのPLSD : N-% -1

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-14.257	7.533	.0006	S
Cb, H14	-9.343	7.533	.0168	S
Cb, ST	-11.631	7.840	.0050	S
Cb, STCb	-7.871	7.533	.0411	S
CON, H14	4.914	7.533	.1925	
CON, ST	2.626	7.840	.4987	
CON, STCb	6.386	7.533	.0936	
H14, ST	-2.288	7.840	.5552	
H14, STCb	1.471	7.533	.6924	
ST, STCb	3.760	7.840	.3348	

Scheffe : N-% -1

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-14.257	12.107	.0141	S
Cb, H14	-9.343	12.107	.1987	
Cb, ST	-11.631	12.601	.0825	
Cb, STCb	-7.871	12.107	.3565	
CON, H14	4.914	12.107	.7750	
CON, ST	2.626	12.601	.9753	
CON, STCb	6.386	12.107	.5651	
H14, ST	-2.288	12.601	.9852	
H14, STCb	1.471	12.107	.9968	
ST, STCb	3.760	12.601	.9131	

Tukey-Kramer : N-% -1

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
Cb, CON	-14.257	10.707	S
Cb, H14	-9.343	10.707	
Cb, ST	-11.631	11.145	S
Cb, STCb	-7.871	10.707	
CON, H14	4.914	10.707	
CON, ST	2.626	11.145	
CON, STCb	6.386	10.707	
H14, ST	-2.288	11.145	
H14, STCb	1.471	10.707	
ST, STCb	3.760	11.145	

分散分析表 : N-% -2

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	813.093	203.273	4.211	.0086	16.844	.878
残差	28	1351.637	48.273				

基本統計量 : N-% -2

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	7	34.114	9.126	3.449
CON	7	19.857	7.195	2.719
H14	7	24.771	7.691	2.907
ST	6	22.483	2.590	1.057
STCb	6	27.017	5.530	2.257

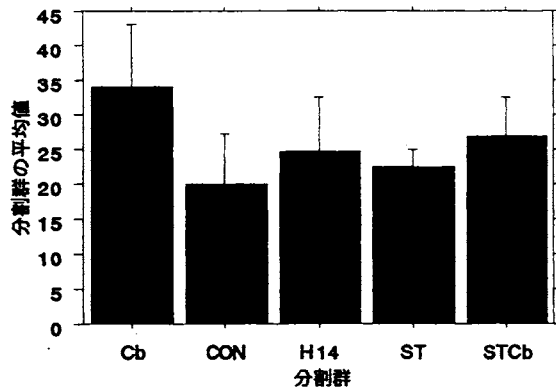
分散分析係数表 : N-% -2

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	25.649	1.213	21.146	<.0001
GROUP: Cb	8.466	2.368	3.575	.0013
CON	-5.791	2.368	-2.445	.0210
H14	-.877	2.368	-.370	.7139
ST	-3.165	2.510	-1.261	.2176
STCb	1.368			

交互作用棒グラフ : N-% -2

効果 : GROUP

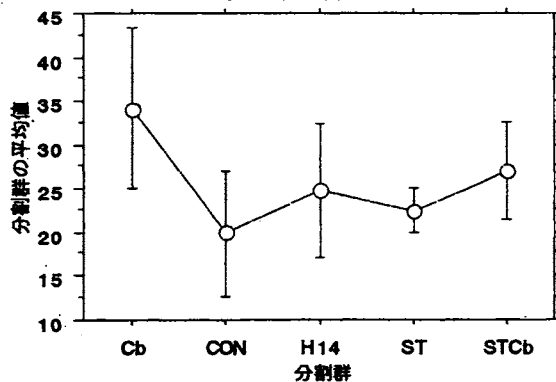
エラーバー : ± 1 標準偏差



交互作用折れ線グラフ : N-% -2

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



FisherのPLSD : N-% -2

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値
Cb, CON	14.257	7.607	.0008 S
Cb, H14	9.343	7.607	.0179 S
Cb, ST	11.631	7.918	.0055 S
Cb, STCb	7.098	7.918	.0770
CON, H14	-4.914	7.607	.1965
CON, ST	-2.626	7.918	.5025
CON, STCb	-7.160	7.918	.0746
H14, ST	2.288	7.918	.5586
H14, STCb	-2.245	7.918	.5660
ST, STCb	-4.533	8.217	.2680

Scheffe : N-% -2

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値
Cb, CON	14.257	12.237	.0156 S
Cb, H14	9.343	12.237	.2065
Cb, ST	11.631	12.736	.0875
Cb, STCb	7.098	12.736	.5099
CON, H14	-4.914	12.237	.7802
CON, ST	-2.626	12.736	.9760
CON, STCb	-7.160	12.736	.5013
H14, ST	2.288	12.736	.9856
H14, STCb	-2.245	12.736	.9866
ST, STCb	-4.533	13.217	.8626

Tukey-Kramer : N-% -2

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値
Cb, CON	14.257	10.827 S
Cb, H14	9.343	10.827
Cb, ST	11.631	11.269 S
Cb, STCb	7.098	11.269
CON, H14	-4.914	10.827
CON, ST	-2.626	11.269
CON, STCb	-7.160	11.269
H14, ST	2.288	11.269
H14, STCb	-2.245	11.269
ST, STCb	-4.533	11.695

分散分析表 : N(CSA-1)D

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
カテゴリー N(CSA-1)D	4	830018959.529	207504739.882	455.347	<.0001	1821.388	1.000
残差	3422	1559428698.535	455706.808				

基本統計量 : N(CSA-1)D

効果 : カテゴリー N(CSA-1)D

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
CON	469	2457.733	772.601	35.675
H14	1124	1034.502	322.141	9.609
Cb	496	1989.629	936.634	42.056
ST	735	1432.374	498.422	18.385
STCb	603	1822.411	953.169	38.816

FisherのPLSD : N(CSA-1)D

効果 : カテゴリー N(CSA-1)D

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
CON, H14	1423.232	72.758	<.0001	S
CON, Cb	468.104	85.247	<.0001	S
CON, ST	1025.359	78.222	<.0001	S
CON, STCb	635.322	81.489	<.0001	S
H14, Cb	-955.127	71.347	<.0001	S
H14, ST	-397.872	62.785	<.0001	S
H14, STCb	-787.909	66.811	<.0001	S
Cb, ST	557.255	76.911	<.0001	S
Cb, STCb	167.218	80.231	<.0001	S
ST, STCb	-390.037	72.723	<.0001	S

分散分析係数表 : N(CSA-1)D

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	1747.330	12.119	144.184	<.0001
カテゴリー N(CSA-1)D: CON	710.404	27.016	26.296	<.0001
H14	-712.828	19.752	-36.090	<.0001
Cb	242.299	26.422	9.170	<.0001
ST	-314.956	22.779	-13.827	<.0001
STCb	75.081			

Scheffe : N(CSA-1)D

効果 : カテゴリー N(CSA-1)D

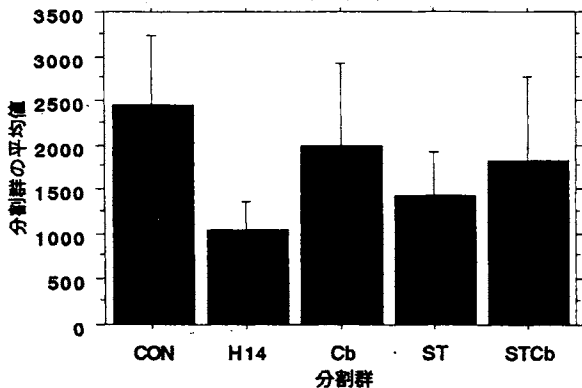
有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
CON, H14	1423.232	114.367	<.0001	S
CON, Cb	468.104	133.998	<.0001	S
CON, ST	1025.359	122.955	<.0001	S
CON, STCb	635.322	128.090	<.0001	S
H14, Cb	-955.127	112.149	<.0001	S
H14, ST	-397.872	98.690	<.0001	S
H14, STCb	-787.909	105.019	<.0001	S
Cb, ST	557.255	120.894	<.0001	S
Cb, STCb	167.218	126.113	.0022	S
ST, STCb	-390.037	114.311	<.0001	S

交互作用棒グラフ : N(CSA-1)D

効果 : カテゴリー N(CSA-1)D

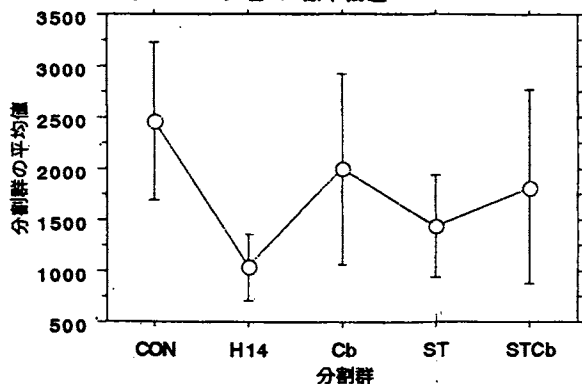
エラーバー : ± 1 標準偏差



交互作用折れ線グラフ : N(CSA-1)D

効果 : カテゴリー N(CSA-1)D

エラーバー : ± 1 標準偏差



Tukey-Kramer : N(CSA-1)D

効果 : カテゴリー N(CSA-1)D

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
CON, H14	1423.232	101.287	S
CON, Cb	468.104	118.673	S
CON, ST	1025.359	108.893	S
CON, STCb	635.322	113.440	S
H14, Cb	-955.127	99.323	S
H14, ST	-397.872	87.403	S
H14, STCb	-787.909	93.008	S
Cb, ST	557.255	107.068	S
Cb, STCb	167.218	111.690	S
ST, STCb	-390.037	101.237	S

分散分析表 : N(CSA-2)D

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
カテゴリ N(CSA-2)D	4	210561349.005	52640337.251	276.696	<.0001	1106.784	1.000
残差	1147	218212378.074	190246.188				

基本統計量 : N(CSA-2)D

効果 : カテゴリ N(CSA-2)D

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
CON	116	2222.017	491.436	45.629
H14	377	757.573	198.200	10.208
Cb	245	1047.061	520.428	33.249
ST	216	1360.551	369.612	25.149
STCb	198	1353.626	638.090	45.347

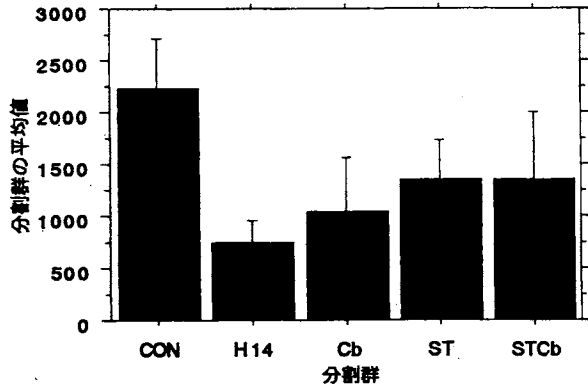
分散分析係数表 : N(CSA-2)D

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	1348.166	13.803	97.675	<.0001
カテゴリ N(CSA-2)D: CON	873.852	34.272	25.498	<.0001
H14	-590.593	22.210	-26.591	<.0001
Cb	-301.104	25.621	-11.752	<.0001
ST	12.385	26.814	.462	.6442
STCb	5.461			

交互作用棒グラフ : N(CSA-2)D

効果 : カテゴリ N(CSA-2)D

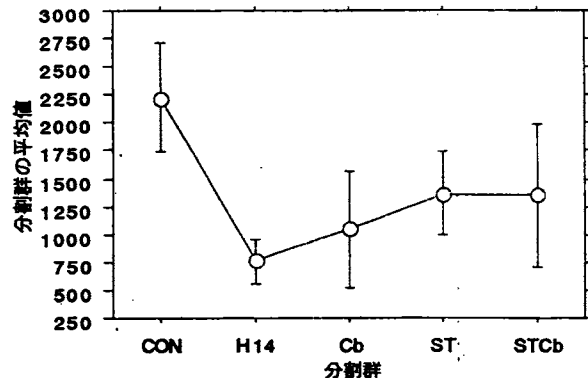
エラーバー : ± 1 標準偏差



交互作用折れ線グラフ : N(CSA-2)D

効果 : カテゴリ N(CSA-2)D

エラーバー : ± 1 標準偏差



FisherのPLSD : N(CSA-2)D

効果 : カテゴリ N(CSA-2)D

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値
CON, H14	1464.444	90.863	<.0001 S
CON, Cb	1174.956	96.451	<.0001 S
CON, ST	861.466	98.509	<.0001 S
CON, STCb	868.391	100.062	<.0001 S
H14, Cb	-289.488	70.227	<.0001 S
H14, ST	-602.978	73.029	<.0001 S
H14, STCb	-596.053	75.110	<.0001 S
Cb, ST	-313.490	79.874	<.0001 S
Cb, STCb	-306.565	81.781	<.0001 S
ST, STCb	6.925	84.199	.8718

Scheffe : N(CSA-2)D

効果 : カテゴリ N(CSA-2)D

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値
CON, H14	1464.444	142.880	<.0001 S
CON, Cb	1174.956	151.666	<.0001 S
CON, ST	861.466	154.903	<.0001 S
CON, STCb	868.391	157.344	<.0001 S
H14, Cb	-289.488	110.431	<.0001 S
H14, ST	-602.978	114.836	<.0001 S
H14, STCb	-596.053	118.108	<.0001 S
Cb, ST	-313.490	125.600	<.0001 S
Cb, STCb	-306.565	128.598	<.0001 S
ST, STCb	6.925	132.400	>.9999

Tukey-Kramer : N(CSA-2)D

効果 : カテゴリ N(CSA-2)D

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値
CON, H14	1464.444	126.402 S
CON, Cb	1174.956	134.175 S
CON, ST	861.466	137.039 S
CON, STCb	868.391	139.198 S
H14, Cb	-289.488	97.695 S
H14, ST	-602.978	101.592 S
H14, STCb	-596.053	104.487 S
Cb, ST	-313.490	111.115 S
Cb, STCb	-306.565	113.767 S
ST, STCb	6.925	117.131

分散分析表 : CT

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	2253.333	563.333	5.060	.0040	20.240	.931
残差	25	2783.333	111.333				

基本統計量 : CT

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	6	69.167	7.360	3.005
CON	6	94.167	8.612	3.516
H14	6	77.500	13.693	5.590
ST	6	74.167	14.634	5.974
STCb	6	73.333	5.164	2.108

FisherのPLSD : CT

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-25.000	12.546	.0004	S
Cb, H14	-8.333	12.546	.1835	
Cb, ST	-5.000	12.546	.4195	
Cb, STCb	-4.167	12.546	.5003	
CON, H14	16.667	12.546	.0113	S
CON, ST	20.000	12.546	.0030	S
CON, STCb	20.833	12.546	.0022	S
H14, ST	3.333	12.546	.5891	
H14, STCb	4.167	12.546	.5003	
ST, STCb	.833	12.546	.8923	

分散分析係数表 : CT

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	77.667	1.926	40.316	<.0001
GROUP: Cb	-8.500	3.853	-2.206	.0368
CON	16.500	3.853	4.283	.0002
H14	-1.167	3.853	-.043	.9658
ST	-3.500	3.853	-.908	.3723
STCb	-4.333			

Scheffe : CT

効果 : GROUP

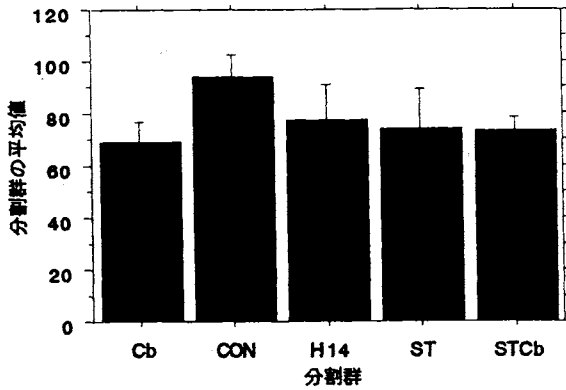
有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-25.000	20.236	.0097	S
Cb, H14	-8.333	20.236	.7588	
Cb, ST	-5.000	20.236	.9525	
Cb, STCb	-4.167	20.236	.9753	
CON, H14	16.667	20.236	.1469	
CON, ST	20.000	20.236	.0540	
CON, STCb	20.833	20.236	.0411	S
H14, ST	3.333	20.236	.9892	
H14, STCb	4.167	20.236	.9753	
ST, STCb	.833	20.236	>.9999	

交互作用棒グラフ : CT

効果 : GROUP

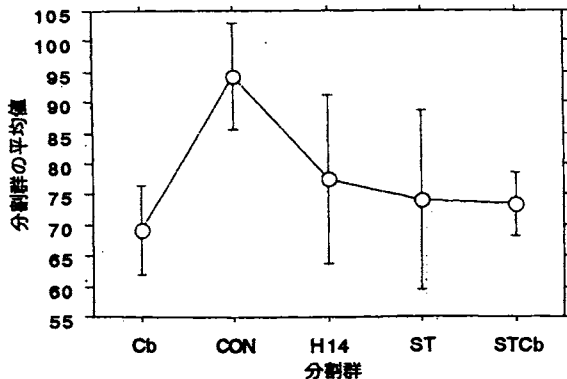
エラーバー : ± 1 標準偏差



交互作用折れ線グラフ : CT

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



Tukey-Kramer : CT

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
Cb, CON	-25.000	17.912	S
Cb, H14	-8.333	17.912	
Cb, ST	-5.000	17.912	
Cb, STCb	-4.167	17.912	
CON, H14	16.667	17.912	
CON, ST	20.000	17.912	S
CON, STCb	20.833	17.912	S
H14, ST	3.333	17.912	
H14, STCb	4.167	17.912	
ST, STCb	.833	17.912	

分散分析表 : RT

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	11308.333	2827.083	2.424	.0747	9.696	.604
残差	25	29158.333	1166.333				

基本統計量 : RT

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	6	179.167	49.942	20.389
CON	6	221.667	19.149	7.817
H14	6	207.500	36.572	14.930
ST	6	171.667	26.957	11.005
STCb	6	178.333	30.111	12.293

FisherのPLSD : RT

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値
Cb, CON	-42.500	40.609	.0409 S
Cb, H14	-28.333	40.609	.1631
Cb, ST	7.500	40.609	.7069
Cb, STCb	.833	40.609	.9666
CON, H14	14.167	40.609	.4791
CON, ST	50.000	40.609	.0178 S
CON, STCb	43.333	40.609	.0375 S
H14, ST	35.833	40.609	.0812
H14, STCb	29.167	40.609	.1516
ST, STCb	-6.667	40.609	.7381

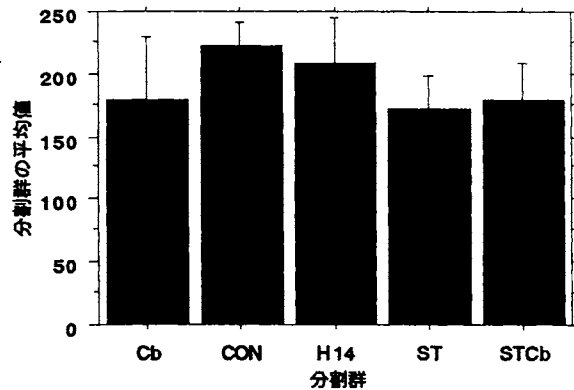
分散分析係数表 : RT

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	191.667	6.235	30.739	<.0001
GROUP: Cb	-12.500	12.470	-1.002	.3258
CON	30.000	12.470	2.406	.0239
H14	15.833	12.470	1.270	.2159
ST	-20.000	12.470	-1.604	.1213
STCb	-13.333			

交互作用棒グラフ : RT

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



Scheffe : RT

効果 : GROUP

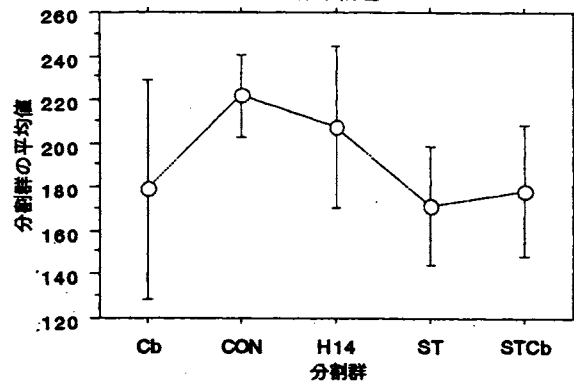
有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値
Cb, CON	-42.500	65.499	.3514
Cb, H14	-28.333	65.499	.7245
Cb, ST	7.500	65.499	.9973
Cb, STCb	.833	65.499	>.9999
CON, H14	14.167	65.499	.9704
CON, ST	50.000	65.499	.2035
CON, STCb	43.333	65.499	.3324
H14, ST	35.833	65.499	.5213
H14, STCb	29.167	65.499	.7028
ST, STCb	-6.667	65.499	.9983

交互作用折れ線グラフ : RT

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



Tukey-Kramer : RT

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値
Cb, CON	-42.500	57.975
Cb, H14	-28.333	57.975
Cb, ST	7.500	57.975
Cb, STCb	.833	57.975
CON, H14	14.167	57.975
CON, ST	50.000	57.975
CON, STCb	43.333	57.975
H14, ST	35.833	57.975
H14, STCb	29.167	57.975
ST, STCb	-6.667	57.975

分散分析表 : Pt-N

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	.060	.015	43.938	<.0001	175.752	1.000
残差	25	.009	3.434E-4				

基本統計量 : Pt-N

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	6	.062	.015	.006
CON	6	.183	.010	.004
H14	6	.064	.013	.005
ST	6	.092	.030	.012
STCb	6	.084	.018	.007

FisherのPLSD : Pt-N

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-.122	.022	<.0001	S
Cb, H14	-.002	.022	.8653	
Cb, ST	-.030	.022	.0086	S
Cb, STCb	-.022	.022	.0520	
CON, H14	.120	.022	<.0001	S
CON, ST	.091	.022	<.0001	S
CON, STCb	.100	.022	<.0001	S
H14, ST	-.029	.022	.0129	S
H14, STCb	-.020	.022	.0733	
ST, STCb	.009	.022	.4255	

分散分析係数表 : Pt-N

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	.097	.003	28.631	<.0001
GROUP: Cb	-.035	.007	-5.202	<.0001
CON	.087	.007	12.803	<.0001
H14	-.033	.007	-4.931	<.0001
ST	-.005	.007	-.695	.4937
STCb	-.013			

Scheffe : Pt-N

効果 : GROUP

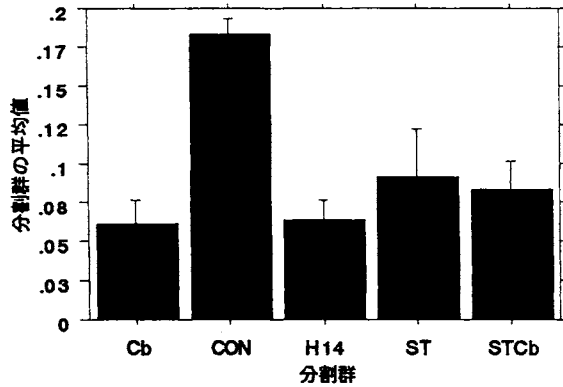
有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-.122	.036	<.0001	S
Cb, H14	-.002	.036	.9999	
Cb, ST	-.030	.036	.1206	
Cb, STCb	-.022	.036	.4058	
CON, H14	.120	.036	<.0001	S
CON, ST	.091	.036	<.0001	S
CON, STCb	.100	.036	<.0001	S
H14, ST	-.029	.036	.1614	
H14, STCb	-.020	.036	.4936	
ST, STCb	.009	.036	.9546	

交互作用棒グラフ : Pt-N

効果 : GROUP

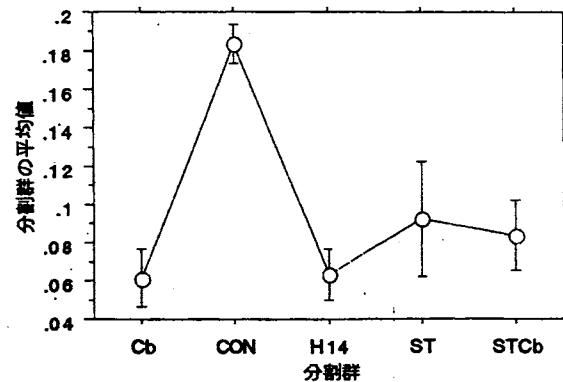
エラーバー : ± 1 標準偏差



交互作用折れ線グラフ : Pt-N

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



Tukey-Kramer : Pt-N

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
Cb, CON	-.122	.031	S
Cb, H14	-.002	.031	
Cb, ST	-.030	.031	
Cb, STCb	-.022	.031	
CON, H14	.120	.031	S
CON, ST	.091	.031	S
CON, STCb	.100	.031	S
H14, ST	-.029	.031	
H14, STCb	-.020	.031	
ST, STCb	.009	.031	

分散分析表 : Pt-N/cm²

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	16.461	4.115	12.904	<.0001	51.617	1.000
残差	25	7.973	.319				

基本統計量 : Pt-N/cm²

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	6	1.425	.522	.213
CON	6	3.467	.425	.173
H14	6	2.103	.436	.178
ST	6	2.952	.860	.351
STCb	6	1.882	.461	.188

FisherのPLSD : Pt-N/cm²

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-2.042	.671	<.0001	S
Cb, H14	-.678	.671	.0479	S
Cb, ST	-1.527	.671	<.0001	S
Cb, STCb	-.457	.671	.1736	
CON, H14	1.363	.671	.0003	S
CON, ST	.515	.671	.1268	
CON, STCb	1.585	.671	<.0001	S
H14, ST	-.848	.671	.0154	S
H14, STCb	.222	.671	.5028	
ST, STCb	1.070	.671	.0030	S

分散分析係数表 : Pt-N/cm²

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	2.366	.103	22.945	<.0001
GROUP: Cb	-.941	.206	-4.562	.0001
CON	1.101	.206	5.339	<.0001
H14	-.262	.206	-1.272	.2150
ST	.586	.206	2.842	.0088
STCb	-.484			

Scheffe : Pt-N/cm²

効果 : GROUP

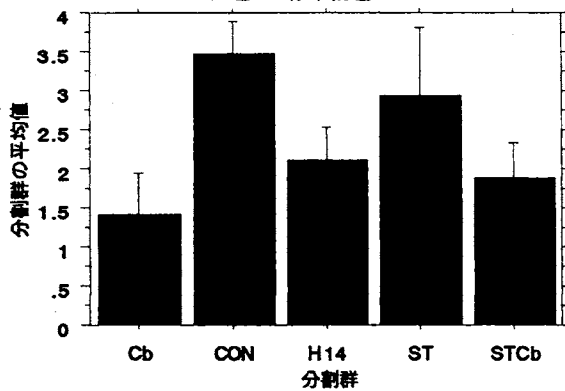
有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-2.042	1.083	<.0001	S
Cb, H14	-.678	1.083	.3865	
Cb, ST	-1.527	1.083	.0026	S
Cb, STCb	-.457	1.083	.7427	
CON, H14	1.363	1.083	.0081	S
CON, ST	.515	1.083	.6499	
CON, STCb	1.585	1.083	.0017	S
H14, ST	-.848	1.083	.1832	
H14, STCb	.222	1.083	.9758	
ST, STCb	1.070	1.083	.0541	S

交互作用棒グラフ : Pt-N/cm²

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



Tukey-Kramer : Pt-N/cm²

効果 : GROUP

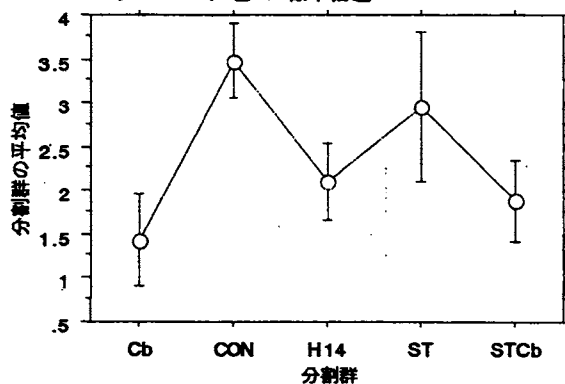
有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
Cb, CON	-2.042	.959	S
Cb, H14	-.678	.959	
Cb, ST	-1.527	.959	S
Cb, STCb	-.457	.959	
CON, H14	1.363	.959	S
CON, ST	.515	.959	
CON, STCb	1.585	.959	S
H14, ST	-.848	.959	
H14, STCb	.222	.959	
ST, STCb	1.070	.959	S

交互作用折れ線グラフ : Pt-N/cm²

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



分散分析表 : MP

	自由度	平方和	平均平方	F値	p値	ラムダ	検出力
GROUP	4	13304.024	3326.006	31.910	<.0001	127.638	1.000
残差	30	3126.963	104.232				

基本統計量 : MP

効果 : GROUP

	例数	平均値	標準偏差	標準誤差
Cb	7	85.086	11.653	4.404
CON	8	109.175	9.636	3.407
H14	7	56.414	10.720	4.052
ST	6	61.733	9.686	3.954
STCb	7	88.443	9.163	3.463

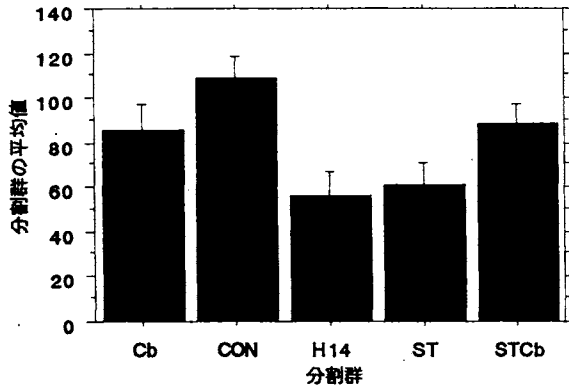
分散分析係数表 : MP

	係数	標準誤差	t値	p値
切片	80.170	1.733	46.264	<.0001
GROUP: Cb	4.915	3.455	1.423	.1651
CON	29.005	3.289	8.818	<.0001
H14	-23.756	3.455	-6.876	<.0001
ST	-18.437	3.664	-5.032	<.0001
STCb	8.273			

交互作用棒グラフ : MP

効果 : GROUP

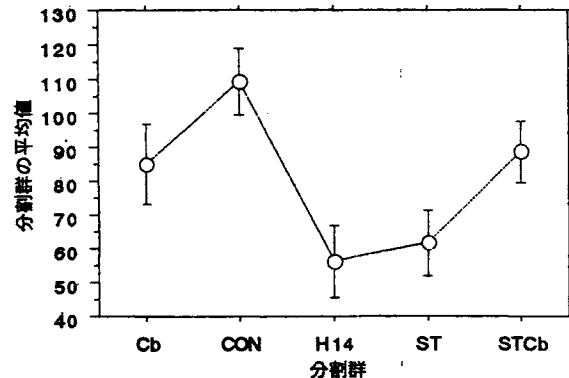
エラーバー : ± 1 標準偏差



交互作用折れ線グラフ : MP

効果 : GROUP

エラーバー : ± 1 標準偏差



FisherのPLSD : MP

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-24.089	10.791	<.0001	S
Cb, H14	28.671	11.145	<.0001	S
Cb, ST	23.352	11.600	.0003	S
Cb, STCb	-3.357	11.145	.5431	
CON, H14	52.761	10.791	<.0001	S
CON, ST	47.442	11.261	<.0001	S
CON, STCb	20.732	10.791	.0005	S
H14, ST	-5.319	11.600	.3565	
H14, STCb	-32.029	11.145	<.0001	S
ST, STCb	-26.710	11.600	<.0001	S

Scheffe : MP

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
Cb, CON	-24.089	17.331	.0027	S
Cb, H14	28.671	17.900	.0005	S
Cb, ST	23.352	18.630	.0079	S
Cb, STCb	-3.357	17.900	.9834	
CON, H14	52.761	17.331	<.0001	S
CON, ST	47.442	18.085	<.0001	S
CON, STCb	20.732	17.331	.0122	S
H14, ST	-5.319	18.630	.9256	
H14, STCb	-32.029	17.900	<.0001	S
ST, STCb	-26.710	18.630	.0019	S

Tukey-Kramer : MP

効果 : GROUP

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
Cb, CON	-24.089	15.319	S
Cb, H14	28.671	15.821	S
Cb, ST	23.352	16.467	S
Cb, STCb	-3.357	15.821	
CON, H14	52.761	15.319	S
CON, ST	47.442	15.985	S
CON, STCb	20.732	15.319	S
H14, ST	-5.319	16.467	
H14, STCb	-32.029	15.821	S
ST, STCb	-26.710	16.467	S