

## マウスのヒラメ筋と長指伸筋におよぼすクレンブテロールの飲水投与の影響

常 川 直 子\* 北 浦 孝\*\*

### EFFECTS OF DRINKING ADMINISTRATION OF CLENBUTEROL ON SOL AND EDL OF MICE

NAOKO TSUNEKAWA and TAKASHI KITAURA

#### Abstract

A study was conducted to investigate the effects of the beta-2 receptor agonist, clenbuterol, on the slow-twitch soleus (SOL) and the fast-twitch extensor digitorum longus (EDL) muscles. Twelve male 5-wk-old mice (ddY) were divided into two groups; control (CONT, n = 6) and clenbuterol-treated (CLEB, n=6). Clenbuterol was given in the drinking water (0.02 mg/mL) for 5 weeks. Post-treatment body weights were approximately 10% greater in the CLEB group compared to CONT ( $P < 0.05$ ). In the SOL muscles of the CLEB group the wet weight and the ratio of muscle weight to body weight was significantly higher than the CONT ( $P < 0.01$ ), but not in the EDL. In the SOL muscles of the CLEB group the muscle type LDH isozyme distribution and enzymatic activity was significantly increased ( $P < 0.01$ ). However, there was no metabolic change in the EDL muscles. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of myosin heavy chain (Myosin-HC) indicated a clenbuterol-induced decrease ( $P < 0.05$ ) in the relative percentage of type I Myosin-HC with a concomitant increase ( $P < 0.05$ ) in Type II Myosin-HC in the SOL of the CLEB group. The Myosin-HC composition in the EDL was not altered. These findings suggest that clenbuterol may have induced selectively changes of muscle hypertrophy, the predominant anaerobic glycolysis, and the transition of Myosin-HC in the SOL. The differences in the two muscles can be explained by the higher number of beta-2 receptors in slow-twitch muscles.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2000, 49: 149~156)

**key words** : clenbuterol, hypertrophy, LDH, Myosin-HC, muscle type transition

#### I. は じ め に

$\beta_2$  アゴニストであるクレンブテロールは、気管支平滑筋の弛緩作用により喘息の治療薬として用いられている、その一方で骨格筋にも作用し筋の肥大を誘発させるという事実から、一般にスポーツの分野においてドーピング対象薬となっている。

クレンブテロールはアドレナリン受容体の  $\beta_2$  レセプターに結合し、adenylate cyclase (AC) を活性化させ、骨格筋細胞内での ATP からサイクリック AMP (cAMP) への合成を促進する。この cAMP 濃度の上昇に伴って cAMP 依存性プロテ

インキナーゼ (A-kinase) の活性が上昇し<sup>1)</sup>、さらにこの A-kinase の活性上昇は、解糖系の促進<sup>2)</sup> や citrate synthase (CS) の活性低下や phosphofructokinase (PFK) の活性上昇<sup>3)</sup> やタンパク合成促進<sup>2)</sup> などさまざまな変化をもたらすとされている。また核内の転写調節因子にも影響を与える可能性も報告されている<sup>4)</sup>。特に、この薬物の特徴は遅筋に強く作用し、遅筋に速筋化をもたらすとも言われており<sup>3)</sup>、その結果、収縮速度の上昇や張力増大など筋の生理学的特徴に大きな影響をもたらすと考えられる。

骨格筋においては、筋のタイプ移行(筋線維組成の変化)が高強度のトレーニング<sup>5)</sup>や不使用に

\*金沢大学大学院自然科学研究科  
〒920-1192 石川県金沢市角間町

\*\*金沢大学薬学部

〒920-1192 石川県金沢市角間町

Graduate School of Natural Science & Technology, Kanazawa University.  
Kakuma town, Kanazawa-city, Ishikawa, 920-1192, Japan

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University. Kakuma town,  
Kanazawa-city, Ishikawa, 920-1192, Japan

より生じるとされている<sup>6)</sup>。しかし、遺伝的要素の筋線維組成への関与の強さから人間におけるタイプ移行は生じにくいという報告もあり、一致した見解は得られていない<sup>7)</sup>。そこで、薬物摂取によりこの筋線維タイプ移行が容易に生じるとすると、そのタイプ移行のメカニズムの解明は筋力トレーニング方法の開発にとって重要な情報をもたらすと予測される。クレンプテロールが収縮特性に及ぼす影響は、いくつか報告されているが<sup>2, 3, 8-10)</sup>、代謝系の変化を調べたものは少ない<sup>3)</sup>。筋肥大や収縮特性の変化は Lactate shuttle を含めエネルギー代謝系の変化をとまう可能性があるが、明確な関係は得られていない。また、代謝系の特性のうち解糖系の特性は通常 PFK などの律速酵素を用いて調べられるが、ピルビン酸のアセチル CoA への酸化と乳酸への還元(乳酸生成)はエネルギー供給系の特徴を決める分岐点であり、筋の特性を知る上で重要である。Brooks ら<sup>11)</sup>は Lactate shuttle という概念からエネルギー基質としての筋肉における積極的な乳酸生成の意義を見出した。すなわち、血中からの乳酸の取り込みを含め、乳酸のピルビン酸への酸化は TCA cycle に至る酸化的代謝の促進を意味し、乳酸生成は肝臓や腎における糖新生へと至るという経路での乳酸代謝の重要性を指摘した。この乳酸代謝の筋肉細胞内での変化は Lactate dehydrogenase (LDH) アイソザイムの変化から推定することが可能であるが<sup>12)</sup>、クレンプテロールによる影響はこれまで報告されていない。従って、本研究ではクレンプテロール投与が筋肥大と筋の収縮特性および、筋肉での乳酸の代謝におよぼす影響、そしてそれらの相互関係を明らかにするという目的で、マウスを用いて調べた。なお、筋肉内での乳酸代謝の特性は LDH 活性と LDH アイソザイム分布を利用し検討した。収縮特性は種々の決定要因が存在するが、ここでは生理学的にミオシンの ATPase の活性中心をもちアクチンとのクロスブリッジ形成の主要素であるといわれるミオシンの重鎖成分(Myosin heavy chain; Myosin-HC)を用いて検討した<sup>13)</sup>。なお、この Myosin-HC のサブタイプの免疫組織染色法がモノクローナル抗体を

用いて筋線維組成を決定するために Myosin ATPase 活性染色法と平行して利用されている。

## II. 実験方法

実験は3週齢の ddY 系雄マウス12匹を入手2週間後、無作為に対照(CONT)群(n=6)とクレンプテロール投与(CLEB)群(n=6)にグループ化し、群ごとに飼育した(25×40×20 cm)。CLEB には Sigma 社のクレンプテロールを水に溶かし(0.02 mg/mL)、飲料水として投与した。一日の投与量は、飲水量より算出すると約 4 mg/kg B. W. であった。CONT には水のみを与えた。

なお、飲水と飼料(実験動物用固形飼料 MF, オリエンタル酵母工業社)は自由摂取とし、飼育室は室温25±3℃、照明は午前6時と午後6時を境とする12時間の明暗サイクルに設定した。

5週間後、マウスにペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射(30 mg/kg)で麻酔し、頸椎脱臼により処置し、筋肉の摘出を行った。摘出筋は遅筋のヒラメ筋(SOL)と速筋の長指伸筋(EDL)である。

筋肉は左右の湿重量を測定後、右脚の筋を50倍量の試料処理液(0.3 M Sucrose, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM PMSF, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)でポリトロン・ホモジナイザーを用いて均質化し、遠心分離(600×g, 5分)を行った。上清の一部は、Wroblewski-La Due の方法<sup>14)</sup>に基づいて30℃での LDH 活性値の測定に使用した。比活性値は 365 nm における1分あたりの吸光度変化の平均値から、NADH の分子吸光係数を用いて算出し(温度換算係数0.75を用いて25℃に換算)、総活性値は比活性値に使用した筋の湿重量を乗じて求めた。また上清の一部は LDH アイソザイム分析のため、ポリアクリルアミドゲル(6.5% acrylamide, 0.17% bisacrylamide, 375 mM Tris-HCl (pH 8.9), 0.05% APS, 0.05% TEMED, 45×85×1 mm)による電気泳動<sup>15)</sup>を定電流 20 mA/gel で60分間(4℃)行い、泳動終了後乳酸を基質としてニトロブルーテトラゾリウムを用いた活性染色を行った。試料は総蛋白量として約 5 μg 使用した。沈殿は再びミオシン

抽出液中 (5 mM EDTA, 5 mM DTT, 5  $\mu$ g/ml Trasylol, 0.1 M Na-pyrophosphate buffer, pH 8.6) で均質化し, 4°C で60分間抽出した後, 遠心分離 (18,000  $\times$  g, 1 hr) を行った. 上清は Myosin-HC の解析のため Talmadge & Roy の方法<sup>16)</sup> に従い試料処理を行った後, SDS 電気泳動 (8% acrylamide, 0.16% bisacrylamide, 0.2 M Tris-HCl (pH 8.8), 1 M Glycine, 0.4% SDS, 0.1% APS, 0.05% TEMED, 106 $\times$ 100 $\times$ 1 mm) を定電圧 70 V で22時間 (4°C) 行った. 泳動用試料は総蛋白量として約 500 ng/lane 負荷した. 電気泳動終了後 Oakley らの方法<sup>17)</sup> による銀染色法により可視化した. 各バンドの同定は従来の報告<sup>18)</sup> をもとに行った. ただし, マウスの Myosin-HC の Type IIa と IIx は分離困難のため同一バンドとして扱った.

蛋白濃度は BCA 法用キット (Pierce 社) を用い, bovine serum albumin (BSA) を標準として測定した.

ゲルの画像はボラロイドカメラ (CU-5 LAND CAMERA, POLAROID) で写真撮影した後, スキャナー (GT-5000 ART, EPSON) でとりこみ, 画像解析用ソフト (NIH Image 1.61) にて定量を行った. すべての統計値は平均値 $\pm$ SD で示した. 統計処理はデータの種類により F test で分散を確認したうえで t-test を行うか, または  $\chi^2$  test を行った. 有意水準は  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  とした.

### Ⅲ. 結 果

Fig. 1 に両群の体重の推移を示し, Table 1 に実験最終日の両群の体重と各群の左右平均筋湿重量および体重に対する相対筋湿重量 (体重比) を示した. Fig. 1 において CLEB では, 1 週間後から体重の増加をともなう成長の促進がみられた. その傾向はその後さらに強まり, 投与後4週目からは CLEB に有意な増加 ( $P < 0.05$ ) がみられた. Table 1 にも示したように, 最終的に体重は CONT に対し, CLEB は約10%の有意な高値を示した ( $P < 0.05$ ). また, 個々の筋をみた場合, SOL においては筋湿重量も体重比も CLEB が有意に高値を示した ( $P < 0.01$ ). 一方, EDL においては筋湿重量で CLEB に大きくなる傾向がみら

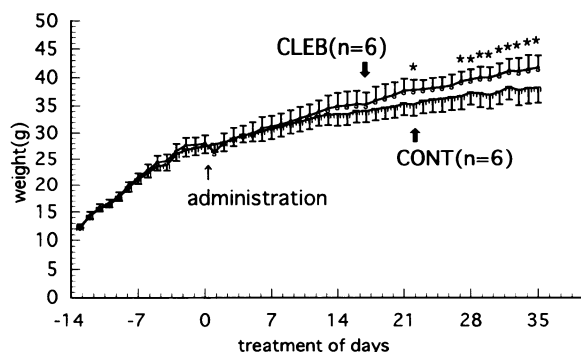


Fig. 1. Cumulative body weight changes in CONT and CLEB.

Values are means  $\pm$  SD. Clenbuterol administration started at 5 weeks of age.

Significant difference between CONT and CLEB, \* $P < 0.05$ .

Table 1. Body weight and muscle wet weight (muscle w.wt.)

|           | SOL              |                   |                    | EDL             |                  |
|-----------|------------------|-------------------|--------------------|-----------------|------------------|
|           | body weight      | muscle w.wt.      | ratio              | muscle w.wt.    | ratio            |
|           | (g)              | (mg)              | (mg/g)             | (mg)            | (mg/g)           |
| CONT(n=6) | 38.7 $\pm$ 2.55  | 9.2 $\pm$ 0.89    | 0.24 $\pm$ 0.020   | 14.4 $\pm$ 1.49 | 0.37 $\pm$ 0.047 |
| CLEB(n=6) | 42.6 $\pm$ 2.35* | 14.5 $\pm$ 3.18** | 0.34 $\pm$ 0.060** | 16.2 $\pm$ 1.65 | 0.38 $\pm$ 0.037 |

Values are means  $\pm$  SD.

The ratio represents relative weight of muscle w.wt. to body weight.

Significant difference between CONT and CLEB, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Table 2. LDH activity

|     | specific activity (IU/g w.wt.) |               | total activity (IU) |                |
|-----|--------------------------------|---------------|---------------------|----------------|
|     | CONT                           | CLEB          | CONT                | CLEB           |
| SOL | 175.8 ± 37.39                  | 221.4 ± 49.84 | 1.65 ± 0.470        | 3.14 ± 0.668** |
| EDL | 285.2 ± 75.93                  | 296.2 ± 27.00 | 4.04 ± 0.900        | 4.73 ± 0.549   |

LDH; Lactate dehydrogenase

Values are means ± SD for 6 mice in each group.

Significant difference between CONT and CLEB, \*\*P&lt;0.01.

れたものの有意な差ではなかった. 体重比でも有意な差は認められず, 筋湿重量の増加傾向は遅筋の SOL に特異的であると思われた.

Table 2 に LDH 活性値を示した. SOL では, LDH 比活性値 (specific activity) が CLEB では有意差は認められないものの, 平均値で CONT より約26%の高値を示し上昇傾向が認められ, LDH 総活性値 (total activity) では有意な上昇が認められた (P<0.01). 一方, EDL では LDH 比活性値, 総活性値ともに CONT と CLEB に有意な差は認められなかった.

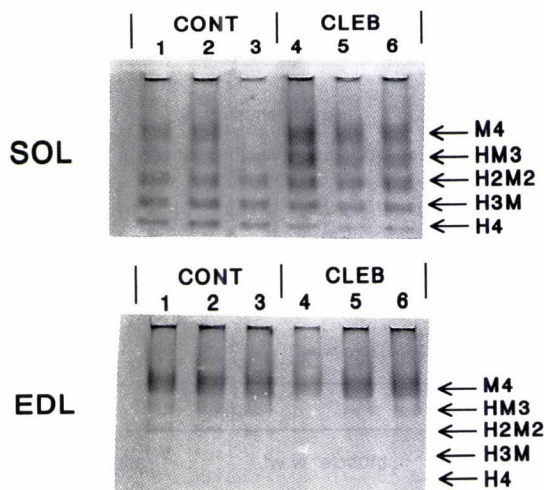


Fig. 2. LDH isozyme patterns of SOL and EDL in CONT and CLEB.

Upper: lanes 1-3, activity stained patterns of control SOLs. Lanes 4-6, the patterns from clenbuterol-treated SOLs.

Lower: lane 1-3, activity stained patterns of control EDLs. Lanes 4-6, the patterns from clenbuterol-treated EDLs.

LDH アイソザイムを Dietz 法による電気泳動により分析した結果を Fig. 2 に示した. 心筋型成分の多い H4 型から順に, H3M 型, H2M2 型, HM3 型, M4 型へと筋肉型成分の多くなるそれぞれ 5 つのアイソザイムの構成比を Fig. 3 に示した. SOL においては, CLEB で M4 型と HM3 型の増加, H4 型, H3M 型, H2M2 型では減少という有意な変化 (P<0.01) が認められ, 投与群で LDH アイソザイム分布は乳酸の酸化的性質の強い H 型を比較的多く含む遅筋型の分布から乳酸生成の性質の強い M 型を多く含む速筋型の分布に移行していた. 他方, EDL におけるアイソザイム分布は各アイソザイムでわずかな増減がみられるものの, 有意な変化は認められなかった.

収縮特性に関して Myosin-HC のアイソフォー

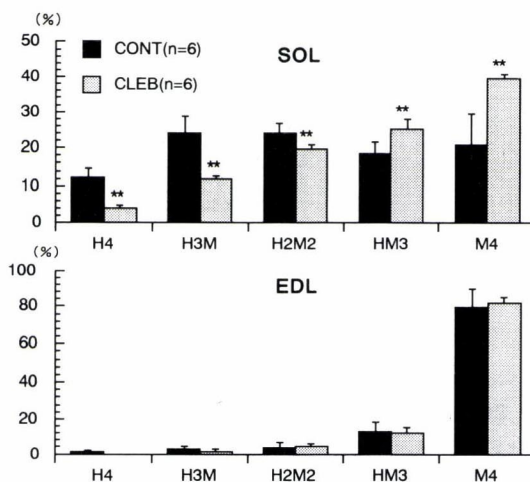


Fig. 3. Graph representing LDH isozyme distribution. Significant difference between CONT and CLEB, \*\*P<0.01.

ムの分析結果を Fig. 4 と Fig. 5 に示した. SOL においては, Myosin-HC の各タイプ (Type I, Type IIa/IIx, Type IIb) の割合は CLEB ( $36.5 \pm 3.85\%$ ,  $58.7 \pm 4.39\%$ ,  $4.7 \pm 3.70\%$ ) が CONT ( $51.0 \pm 13.14\%$ ,  $49.0 \pm 13.14\%$ ,  $0\%$ ) に比べて, Type I で約15%の減少, Type IIa/IIx で約10%の上昇を示し, 両タイプとも有意な変化 ( $P < 0.05$ ) が生じていた. さらに, CLEB には CONT では

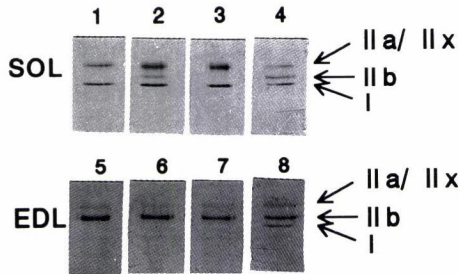


Fig. 4. Characterization of Myosin-HC in CONT and CLEB by SDS-PAGE.

Upper: Lane 1, silver stained pattern of control SOL. Lanes 2-3, the patterns from clenbuterol-treated SOLs. Lane 4, the pattern of the mixture of control SOL and EDL.

Lower: Lane 5, silver stained pattern of control EDL. Lanes 6-7, the patterns from clenbuterol-treated EDLs. Lane 8, the pattern of the mixture of control SOL and EDL.

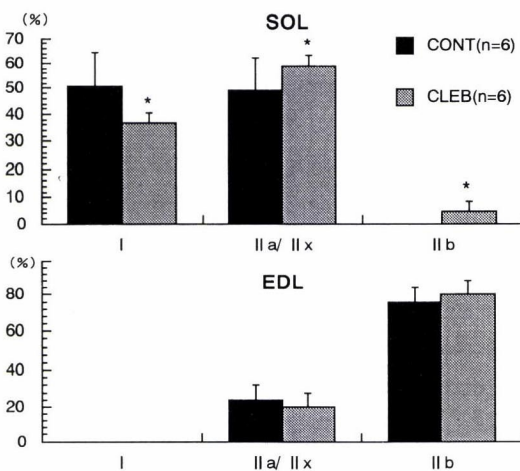


Fig. 5. Graph representing Myosin-HC composition in SOL and EDL. Values are means  $\pm$  SD.

Significant difference between CONT and CLEB, \* $P < 0.05$ .

みられなかった IIb の発現が認められたものもあった (Fig. 4 の SOL の 2). 一方, EDL においてその割合は CLEB ( $0\%$ ,  $19.7 \pm 7.95\%$ ,  $80.3 \pm 7.95\%$ ) で CONT ( $0\%$ ,  $24.0 \pm 8.24\%$ ,  $76.0 \pm 8.24\%$ ) と各サブタイプにおける変化は小さく, SOL のような有意な変化は認められなかった.

#### IV. 考察

Table 1 に示したようにクレブテロールの投与による体重の変化に関しては, 多くの報告<sup>1,3,8)</sup>と同様に, 有意な増加が認められた. 筋重量に関しては, 特に SOL で筋湿重量, 体重比ともに有意な増加 ( $P < 0.01$ ) が認められ, Dodd ら<sup>3)</sup>や MacLennan & Edwards<sup>2)</sup>, Murphy ら<sup>9)</sup>の報告と一致していた. しかし, EDL では有意な差は認められなかった. これらの違いは, EDL より SOL において影響が大きく, マウスの筋ではクレブテロールがより遅筋の SOL に強く作用しているものと思われた. Zeman ら<sup>10)</sup>は Wistar 系ラットの EDL の有意な増加を報告しており, 今回の結果と異なっている. また, その他の速筋である足底筋や, 腓腹筋での有意な増加の報告<sup>2,3,9)</sup>もなされているが, これらの結果の違いは動物種や性, あるいは投与方法もしくは筋線維組成の違い<sup>19)</sup>によるものと考えられる.

クレブテロールの乳酸代謝への影響に関しては, Fig. 2, Fig. 3 に示した LDH アイソザイムの解析結果より, SOL で特異的に有意な H 型から M 型への移行 ( $P < 0.01$ ) が認められ, H 型よりピルビン酸に対する  $K_m$  値の高い M 型の増加は高濃度のピルビン酸蓄積による乳酸生成を容易にしているものと推察された. また, Table 2 に示したように SOL における LDH の総活性値の有意な増加 ( $P < 0.01$ ) と比活性値の上昇傾向も一般に M 型の活性値が高くピルビン酸に対する  $K_m$  値が高いことから判断して, 筋量の増加をとともう乳酸の生成量の増大と筋中の乳酸濃度の急速な上昇を示唆するものであった. これらの結果は, 乳酸の代謝において乳酸生成系が解糖系代謝と平行な関係にあるという従来の観点からみると, MacLennan & Edwards<sup>2)</sup>のクレブテロール投与



実験において、解糖系の促進により SOL における乳酸濃度が有意に上昇するという報告を支持するものである。また、Dodd ら<sup>3)</sup>はクレンプテロール投与により PFK の総活性値が、遅筋の SOL では有意に上昇したが ( $P < 0.05$ )、速筋の足底筋では有意な差がみられず、遅筋で解糖系の促進がおこっていることを示唆しているが、これを無酸素的解糖系と解釈した場合今回の結果もそれを支持するものであった。今回の結果は遅筋の SOL において、 $\beta_2$  レセプターを介した cAMP の増加にともなう乳酸代謝における乳酸生成反応の促進、すなわち、無酸素的解糖系の亢進がもたらされたと推察された。また、特別な運動を負荷していない状態での遅筋においては、無酸素的条件下にはなにくいが予測されるが、クレンプテロール投与における有酸素的条件下における乳酸生成のメカニズムとして、脂肪酸の  $\beta$  酸化の亢進により筋肉内のアセチル CoA が過剰に増大し、その結果ピルビン酸脱水素酵素のアロステリック阻害が生じ細胞内のピルビン酸が増大し、LDH 特に M 型の生化学特質として乳酸生成につながっていることが考えられる。このことは  $\beta_2$  アゴニストによる脂肪酸の酸化亢進作用として十分考えられるプロセスであり<sup>20)</sup>、LDH の M 型を増大させる引き金になっている可能性が考えられた。しかし、一般的には通常の筋肉では軽度の運動持続時のような脂肪酸の  $\beta$  酸化亢進下ではクエン酸回路の反応も促進し、パストール効果が生じ、酸化系は亢進、解糖系は抑制という状態がもたらされ乳酸生成は抑制されていることから、この反応は  $\beta_2$  アゴニストの刺激による強制的な解糖系の亢進をとまなう極めて特異的な反応であると思われる。従って、この場合は本実験の結果 (Table 2) のように SOL のような脂質代謝の高い筋ほど乳酸生成が高く、必然的に M 型の LDH の増加が誘発されていることが推測された。また、クレンプテロールによる血中からの乳酸の取り込み能の低下も乳酸トランスポーターの一つである monocarboxylic acid transporter 1 (MCT1) の遅筋における mRNA の発現量の減少 (unpublished data) から予測され、乳酸生成系の促進が推察される。

収縮特性に関しては、Myosin-HC サブタイプの解析で、Fig. 4, Fig. 5 に示したように、SOL で Myosin-HC Type I の有意な減少 ( $P < 0.05$ ) と、それに伴った Type II の増加が認められた。この結果より、Myosin-HC の組成から考えて遅筋の SOL の中で速筋型の蛋白質合成が促進し、速筋化がおこっていると考えられる。これは、Dodd ら<sup>3)</sup>の速筋型の Myosin-HC の増加は SOL で生じるという報告と一致するものであった。一方、Dodd ら<sup>3)</sup>の速筋の足底筋の Myosin-HC に影響がなかったという報告と同様、今回の実験でも速筋の EDL の Myosin-HC に薬物投与の影響はなかったと推察される。

クレンプテロール投与によるタンパクの代謝回転 (ターンオーバー) に関しては、まだ不明な部分が多い。考えられる作用はタンパク合成促進作用、タンパク分解抑制作用、もしくはその二つの作用をあわせもつ可能性がある。この点に関して MacLennan & Edwards<sup>2)</sup>はクレンプテロールの投与により、タンパク合成促進作用があると報告している。しかし反対に、Reeds ら<sup>8)</sup>や Zeman ら<sup>10)</sup>はタンパク合成促進は認められず、タンパク分解抑制作用があるとしている<sup>21)</sup>。また他方では、Maltin ら<sup>22)</sup>はタンパク合成促進作用とタンパク分解抑制作用の両方があると報告している。今回の実験では、この点に関しては不明であるが、合成促進作用のみを考えた場合は、RNA 量の増大も含めタンパクの急速な合成には ATP 消費速度の増大がともなうことが予測される。また、分解抑制のみを考えた場合でも通常のタンパクのターンオーバーは存在し RNA とタンパクの合成は行われておりそのための ATP は消費され、分解抑制の結果としての筋肥大は筋組織維持の ATP 消費を増大させていることが予測される。特に両方の可能性を考えた場合では、タンパク合成に関わる ATP 消費の促進により無酸素的解糖系が亢進されるにもかかわらず、ユビキチン/プロテアソーム系で利用可能な ATP は不足し、この系でのタンパク分解作用の抑制がもたらされた可能性があり、乳酸の代謝特性の変化と筋肥大および筋タイプ移行との相互関連においてこの系の解析は興味

深い検討事項である<sup>23)</sup>。遅筋においてみられた LDH の M 型の増加 (Fig. 3) と筋肥大 (Table 1) および速筋型ミオシンの増大 (Fig. 5) はいずれがクレンブテロールによる主たる変化であるかは不明であるが、AC による ATP からの cAMP 合成などを含め、いずれの変化も ATP の急速な生成あるいは消費の関与が考えられるところから相互に影響を及ぼしあっていることが推察された。

先述したように、本研究では乳酸代謝に関しても、収縮特性に関しても速筋より遅筋でクレンブテロールの影響が強く表われた。この結果には Jensen らの報告<sup>24)</sup>にあるように、 $\beta_2$  レセプターが人、ラットにおいて、Type II 線維より Type I 線維のほうに多く存在するという事実になんらかず関係があるものと推察される。

筋線維のタイプ移行を詳細に検討するためには、本実験では確認できなかった Type IIa と IIx の分離のための技術的改善や他の収縮特性の要因としてミオシン軽鎖 (Myosin-LC) などの解析も今後必要と思われる。また個々の細胞でのタイプ移行の確認と、同一細胞のタイプ移行にかかわる核内の筋細胞特異的な転写調節因子である Myo D や myogenin<sup>4)</sup>の関与についても今後の検討課題である。

## V 要 約

本研究では、ドーピング薬に指定されているクレンブテロールを雄マウスに投与し、骨格筋の乳酸の代謝特性と収縮特性に及ぼす影響について解析した。得られた結果は次の通りである。

- (1) 成長に及ぼす影響として、投与群に体重の有意な増加が認められた。
- (2) 投与群の筋湿重量と体重比は速筋の EDL で差は認められず、遅筋の SOL では有意な増加が認められた。
- (3) 乳酸の代謝特性に関しては、投与群の遅筋の SOL において LDH 比活性の上昇傾向と LDH 総活性値の有意な上昇がみられ、Lactate shuttle における乳酸生成の促進が示された。また、投与群の遅筋の SOL においては LDH の M Type の増加も認められ、明ら

かな乳酸生成の促進を裏付けるものであった。速筋の EDL ではいずれも変化は認められなかった。

- (4) 収縮特性に関しては投与群の遅筋の SOL において Myosin-HC の Type II の割合が増加し、筋全体の速筋化が認められた。しかし、投与群の速筋の EDL においては、Myosin-HC では影響は認められなかった。

クレンブテロール投与により、速筋の EDL よりも遅筋の SOL において著明な速筋化がおこった。この結果は、 $\beta_2$  レセプターにクレンブテロールが結合し、A-kinase 系の反応が促進されたことで、乳酸生成の促進と筋肥大をともなうタンパク合成の促進またはタンパク分解抑制、あるいはそれらの相互作用の結果、筋線維タイプ移行が生じたためと推察される。

クレンブテロールは主に、 $\beta_2$  レセプターが遅筋により多く分布することから、特に遅筋により強く作用すると推察された。しかし、遅筋における筋肥大の直接的な作用機序、核内の転写調節因子、Myo D や myogenin の関与についてはまだわかっておらず、今後の検討課題である。

(受理日 平成11年11月12日)

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、ご協力をいただいた小泉輝子さんと Abstract (英文) 作成にご協力いただいた Dr. Thomas B. Kelso に深く感謝の意を表します。

なお、本研究の要旨は、第53回日本体力医学会(1998年、横浜)において報告した。

## 文 献

- 1) Moore, N. G., Pegg, G. G., and Sillence, M. N. Anabolic effects of the  $\beta_2$ -adrenoceptor agonist salmeterol are dependent on route of administration. *Am. J. Physiol.*, (1994), **267**, E475-E484.
- 2) MacLennan, P. A., and Edwards, R. H. T. Effect of clenbuterol and propranolol on muscle mass. *Biochem. J.*, (1989), **264**, 573-579.
- 3) Dodd, S. L., Powers, S. K., Vrabas, I. S., Criswell, D., Stetson, S., and Hussain, R. Effects of clenbuterol on contractile and biochemical properties of skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.*, (1996), **28**, 669-676.
- 4) Mozdziak, P. E., Greaser, M. L., and Schultz, E. Myogenin, Myo D, and myosin expression after

- pharmacologically and surgically induced hypertrophy. *J. Appl. Physiol.*, (1998), **84**(4), 1359-1364.
- 5) Simoneau, J. A., Lortie, G., Boulay, M. R., Marcotte, M., Thibault, M. C., and Bouchard, C. Human skeletal muscle fibre type alteration with high-intensity intermittent training. *Eur. J. Appl. Physiol.*, (1985), **54**, 250-253.
  - 6) Thompson, L. V., and Shoeman, J. A. Contractile function of single muscle fibers after hindlimb unweighting in aged rats. *J. Appl. Physiol.*, (1998), **84**(1), 229-235.
  - 7) Simoneau, J. A. and Bouchard, C. Genetic determination of fiber type proportion in human skeletal muscle. *FASEB J.*, (1995), **9**, 1091-1095.
  - 8) Reeds, P. J., Hay, S. M., Dorwood, P. M., and Palmer, R. M. Stimulation of muscle growth by clenbuterol: lack of effect on muscle protein biosynthesis. *Br. J. Nutr.*, (1986), **56**, 249-256.
  - 9) Murphy, R. J. L., Beliveau, L., Seburn, K. L., and Gardiner, P. F. Clenbuterol has a greater influence on untrained than on previously trained skeletal muscle in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.*, (1996), **73**, 304-310.
  - 10) Zeman, R. J., Ludeman, R., and Etlinger, J. D. Clenbuterol, a  $\beta_2$ -agonist, retards atrophy in denervated muscles. *Am. J. Physiol.*, (1987), **252**, E152-E155.
  - 11) Brooks, C. A. The lactate shuttle during exercise and recovery. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, (1986), **18**(3), 360-368.
  - 12) Larsson, L., Sjodin, B., and Karlsson, J. Histochemical and biochemical changes in human skeletal muscle with age in sedentary males, age 22-65 years. *Acta physiol. scand.*, (1978), **103**, 31-39.
  - 13) Goldspink, G. Molecular mechanisms involved in the determination of muscle fibre mass and phenotype. *Adv. Exerc. Sports Physiol.*, (1999), **5**(2), 27-39.
  - 14) Wroblewski, F., and LaDue, J. S. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, (1955), **90**, 210-213.
  - 15) Diets, A. A., and Lubrano, T. Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis. *Anal. Biochem.*, (1967), **20**, 246-257.
  - 16) Talmadge, R. J., and Roy, R. R. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J. Appl. Physiol.*, (1993), **75**(5), 2337-2340.
  - 17) Oakley, B. R., Kirsh, D. R., and Morris, N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, (1980), **105**, 361-363.
  - 18) Reiser, P. J., and Kline, W. O. Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms eight mammalian species. *Am. J. Physiol.*, (1998), **274**, C603-C614.
  - 19) Delp, M. D. and Duan, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J. Appl. Physiol.*, (1996), **80**(1), 261-270.
  - 20) Katsumata, M., Yano, H., Ishida, N., and Miyazaki, A. Influence of a high ambient temperature and administration of clenbuterol on body composition in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, (1990), **36**, 569-578.
  - 21) Benson, D. W., Foley-Nelson, T., Chance, W. T., Zhang, F., James, J. H., and Fischer, J. E. Decreased myofibrillar protein breakdown following treatment with clenbuterol. *J. Surg. Res.*, (1991), **50**, 1-5.
  - 22) Maltin, C. A., Delday, M. I., Hay, S. M., Smith, F. G., Lobby, G. E., and Reeds, P. J. Clenbuterol, a  $\beta$ -agonist, induces growth in innervated and denervated rat soleus muscle via apparently different mechanisms. *Biosci. Rep.*, (1987), **7**, 525-532.
  - 23) Costelli, P., Garcia-Martinez, C., Llovera, M., Carbo, N., Lopez-Soriano, F. J., Agell, N., Tessitore, L., Baccino, F. M., and Argiles, J. M. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *J. Clin. Invest.*, (1995), **95**(5), 2367-2372.
  - 24) Jensen, J., Brors, O., and Dahl, H. A. Different beta-adrenergic receptor density in different rat skeletal muscle fibre types. *Pharmacology & Toxicology*, (1995), **76**(6), 380-385.