非荷重期間の相違が廃用性筋萎縮後の ラットヒラメ筋の回復過程に与える影響

*Influence of Differences in the Duration of Hindlimb Suspension on the Process
of Recovery from Disuse Muscle Atrophy of Rat Soleus Muscles*

都志 和美¹⁾ 山崎 俊明²⁾

KAZUMI ZUSHI, PT¹⁾, TOSHIAKI YAMAZAKI, PT, PhD²⁾

¹⁾ Department of Rehabilitation, Minamigaoka Hospital: 2-125 Magae, Kanazawa City, Ishikawa 921-8831, Japan.
TEL+81 76-298-3366 E-mail: minami-riha@minamigaoka-hp.or.jp

²⁾ Department of Physical Therapy, School of Health Science, Kanazawa University

Rigakuryoho Kagaku 28(3): 365–370, 2013. Submitted Nov. 7, 2012. Accepted Dec. 29, 2012.

ABSTRACT: [Purpose] We investigated the influence of differences in the duration of hindlimb suspension (HS) on myofiber hypertrophy. [Subjects] Twenty-eight male Wistar rats were used. [Method] Rats were randomly assigned to groups for 7 days of HS (H7), or HS and 1 day of reloading (W1), 3 days of reloading (W3), or 7 days of reloading (W7). The results were compared with the control, and 14 days of HS and reloading groups (C, H14, R1, R3, R7) of our previous study using the same conditions. [Result] Myonuclear numbers were significantly decreased in the H14 group compared with the C group. Myofiber necrosis was significantly increased in the H14 group compared with the C group. Myofiber cross-sectional area was significantly increased in both the W1 (9%) and R1 groups (5%) compared with the H7 and H14 groups, respectively. [Conclusion] The results suggest that the earlier myofiber was reloaded, the greater the myofiber hypertrophy.

Key words: atrophy, reloading, myonuclear number

要旨:〔目的〕非荷重期間の相違が再荷重後の筋肥大に与える影響を検討すること。〔対象〕Wistar 系雄ラット 28 匹の右側ヒラメ筋。〔方法〕7 日間の後肢懸垂 (H7)、懸垂後に再荷重 1 日 (W1)、3 日 (W3)、7 日 (W7) を加えた 4 群を設定し、同条件の先行研究のコントロール群 (C)、後肢懸垂 14 日間の実験群 (H14, R1, R3, R7) と、比較・検討した。〔結果〕H7 群は C 群と有意差がなかったが、H14 群では、筋核は有意に減少し、壊死線維は有意に増加した。筋線維横断面積は、非荷重群と比較し、W1 群で 9%、R1 群で 5% 有意に増加した。〔結語〕非荷重期間が短いほど、再荷重初期の筋線維横断面積増加率が大きかった。

キーワード: 廃用性筋萎縮、再荷重、筋核数

¹⁾ 扇翔会南ヶ丘病院 リハビリテーション部: 石川県金沢市馬替 2 丁目 125 番地 (〒921-8141) TEL 076-298-3366

²⁾ 金沢大学 医薬保健研究域保健学系

I. はじめに

廃用症候群は、長期臥床や疾病などによって引き起こされる全身の活動性低下による二次的な障害であり、循環機能の低下、筋骨格系の萎縮などが起き¹⁾、リハビリテーションの対象となる。廃用性筋萎縮は運動機能の低下を招くため、長期臥床の原因であった本疾患の治療後にも、活動性を低下させる悪循環に陥る可能性がある。そのため、長期臥床中に起こる廃用性筋萎縮の進行を抑制する事や、出来る限り早期に萎縮筋の回復を促すことが重要である。動物実験では、筋萎縮進行中に荷重刺激²⁾や伸張刺激^{3,4)}を加えることにより、筋萎縮が抑制されることが諸家によって報告されている。

実際の臨床場面では、廃用性筋萎縮進行中に治療的介入を行えることは少なく、ある程度筋萎縮が進行した状態から理学療法の介入が開始される場合が多い。早期に介入出来れば、廃用性筋萎縮の進行を抑制し、その後の筋再生・肥大も円滑に起こり、治療効果が高いと推測される。また、動物実験において、後肢懸垂やギプス固定などによって惹起された萎縮筋は、正常筋に比べ脆弱化しており⁵⁾、荷重刺激を与えると、筋損傷が発生しやすいことが報告されている⁵⁻⁸⁾。筋萎縮の進行に伴い、萎縮に伴う筋損傷の程度や荷重刺激開始に伴う損傷の程度も変化すると考えられる。しかし、筋萎縮や筋損傷の程度の相違が筋再生・肥大の過程に与える影響についての報告は少ない。

骨格筋線維は多核細胞であり、多数の筋核と、それらを囲む細胞質で構成されている。一つの筋核の遺伝子によって支配・調節される限られた筋細胞質を筋線維のDNAユニットサイズ・筋核ドメインサイズと呼ぶ⁹⁻¹³⁾。上記の概念に沿い、筋核ドメインサイズが遺伝子によって調節されているとすれば、非荷重や再荷重などの機械的刺激の変化に伴う筋線維横断面積の変化は筋核数の減少・増加が主要であると考えられる。しかし、廃用性筋萎縮においては、筋核数と筋核ドメインサイズが共に減少すると報告されている^{10,13,14)}。

廃用性筋萎縮に対して、再荷重を行った場合、筋萎縮に伴い減少した筋核数と筋核ドメインサイズの増加と同時に、萎縮や荷重刺激開始によって発生した壊死線維の再生が起こると考えられる。壊死線維の再生は、筋衛星細胞が活性化し、既存の筋線維に融合することで開始され、新たに筋核が発生する¹⁵⁾。そのため、筋萎縮の進行程度や筋損傷の程度により、筋核の再発生と筋核ドメインサイズの肥大が筋線維横断面積の変化に相違を与える可能性がある。

我々は、先行研究¹⁶⁾の結果より、再荷重開始直後は肥大反応が壊死線維の再生よりも多くの割合で起こっている可能性と、筋核数の変化が筋線維の肥大反応に影響を及ぼしている可能性を推察した。そこで、本研究では、

先行研究¹⁶⁾とは異なった非荷重期間で惹起された廃用性筋萎縮筋の再生・肥大過程を分析し、先行研究¹⁶⁾の結果と比較・検討を行った。本研究の目的は、筋線維壊死と筋線維横断面積・筋核・筋核ドメインサイズの観点から非荷重期間の相違が再荷重後の筋線維の肥大・再生反応に与える影響を明らかにし、早期介入の重要性についての一助となる事である。

II. 対象と方法

1. 対象

実験対象は8週齢のWistar系雄ラット28匹の右側ヒラメ筋とした。

2. 方法

筋萎縮の惹起には、山崎ら¹⁷⁾の後肢懸垂法を使用した。ラットに麻酔下で金属支柱を組み込んだジャケットを支柱が背部に来るように装着し、上部・下部体幹および尾部中枢を固定した。その後、前肢のみがケージの床につくように懸垂した。ラットは前肢を使用して前後・回転運動が可能で、ケージ内を移動し、水・餌は自由に摂取できる状態であった。実験群として、非荷重群、再荷重群を設定した。非荷重群は、後肢懸垂を1週間(H7群 n=7)行った。再荷重群は1週間の後肢懸垂後に再荷重1日(W1群: n=7)、再荷重3日(W3群: n=7)、再荷重7日(W7群: n=7)を与えた3群とした。本実験は、先行研究¹⁶⁾と同条件で行った。非荷重開始前の8週齢のラットをコントロール群(C群: n=7)とし、C群および、2週間の非荷重群(H14群: n=7)、本研究と同様の再荷重期間を設けた再荷重群(R1群, R3群, R7群, 各n=7)の結果は、先行研究¹⁶⁾のデータを使用した。本実験は動物実験委員会の承認を得て実施した(No.AP091350)。

実験期間終了後、体重を測定し、右側ヒラメ筋を摘出した。筋湿重量測定後、液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結し、分析まで-70℃で保存した。筋腹中部における凍結横断切片(6μm, 8μm)を、クライオスタット(サクラファインテックジャパン社製、ティシュー・テック クライオ3)を用いて作製し、免疫蛍光抗体法を用いたジストロフィン・DAPIの染色(6μmを使用)とHematoxylin-Eosin染色(以下、HE染色, 8μmを使用)を行った。免疫蛍光抗体法後に、染色切片の蛍光顕微鏡写真をもとに各筋あたり中央部、周辺部合わせて100本以上の筋線維を対象に筋核数の計測、画像解析ソフトimageJ (Broken Symmetry Software)を用いて筋線維横断面積を測定した。筋核は、ジストロフィンによって染色された筋細胞膜の内側でDAPIによって染色された核とした。計測された全筋核数を筋線維数で除し、一つの筋線維あたりの筋核数を算出した(筋核数(個) = 全筋核数(個) / 全筋線維数(個))。筋核ドメインサイズは、筋

線維横断面積の合計を全筋核数で除して算出した（筋核ドメインサイズ（ $\mu\text{m}^2/\text{個}$ ）＝筋線維横断面積の合計（ μm^2 ）/全筋核数（個））。HE染色後に、染色切片の顕微鏡写真をもとに、各群あたり2500本以上の筋線維中の壊死線維数を測定した。壊死線維数を全筋線維数で除し、出現割合を算出することで、壊死線維の発生を相対的に評価した。本研究における壊死線維とは、筋線維内に貪食細胞の浸潤が認められるもの、あるいは筋線維の染色性が著しく低下している物を壊死像とした¹⁵⁾。

統計学的分析として、2週間の廃用性筋萎縮過程、H14群における萎縮・回復過程と、H7群における萎縮・回復過程を、それぞれ一元配置分散分析を行い、有意差を認めた場合はBonferroniの多重比較を行った。壊死線維の出現割合は、 χ^2 検定を用い、下位補正として、Bonferroniの方法を用いた。すべての統計処理は統計ソフトSPSS（IBM SPSS）を使用した。測定値は平均値±標準偏差（SD）で表現し、有意水準は5%とした。

III. 結 果

平均筋線維横断面積は後肢懸垂によって、C群と比較し、H7群は85%、H14群は65%に減少し、共に有意差を認めた。筋核数については、C群と比較し、H7群は有意な減少が認められなかったが、H14群は有意な減少が認められた。筋核ドメインサイズについては、H7群、H14群共に低下傾向を示したが、有意差は認められなかった。廃用性筋萎縮に伴う壊死線維の発生は、C群と比較し、H14群は有意に増加したが、H7群ではほとんど増加しなかった（表1）。

非荷重7日後の再荷重によって、W1群は軽度ではあるが、筋線維の腫脹が確認された（図1）。C群と比較し、85%に減少した平均筋線維横断面積は、W1群において94%に増加、W3群において90%まで減少、W7群において115%に増加した。再荷重に伴う増加傾向が認められ、全ての再荷重群はH7群と比較し、有意な増加が認められた。しかし、W3群においてのみW1群に比較し、減少を認めた。C群と比較し、W7群でのみ有意な増加を認めた。筋核数・筋核ドメインサイズは、C群・H7群に比較し、再荷重による有意な増加は認められなかった。再荷重開始に伴い壊死線維の発生割合は有意に増加

したが、W1群をピークにその後は減少傾向を示した（表2）。

非荷重14日後の再荷重によって、R1群は筋線維の腫脹が確認された。また、R1群・R3群では単球の浸潤があり、壊死線維の発生が認められた（図1）。C群と比較し、65%に減少した平均筋線維横断面積は、R1群において70%に増加、R3群において66%まで減少、R7群において91%に増加した。R1群、R7群はH14群と比較し、有意な増加が認められた。R3群はR1群より有意に減少し、H14群との間に有意差が認められなかった。全ての再荷重群はC群と比較し、有意に減少していた。筋核数については、全ての再荷重群が増加傾向を示したものの、H14群と比較し、有意な増加は認められなかった。しかし、H14群、R1群、R3群はC群と比較し有意に減少していたが、R7群ではC群との間に有意差が認められなかった。筋核ドメインサイズについては、再荷重により増加傾向を示したが、全ての群間において有意差が認められなかった。再荷重に伴い壊死線維の発生割合は有意に増加したが、R1群をピークに、その後は減少傾向を示した（表3）。

IV. 考 察

本研究において、平均筋線維横断面積は7日間の後肢懸垂により有意に減少したが、筋核数・筋核ドメインサイズは共に減少傾向を示すが有意差は認められなかった。Mitchellらは、骨格筋の80%は筋原線維タンパクで構成されているため、筋原線維タンパクの合成と分解の不均等化は筋質量の低下を招くと報告している¹⁸⁾。また、Wangらは、後肢懸垂によって、筋核数の減少だけでなく、筋核のDNA濃度の低下を報告し、非荷重によって筋核の機能が低下し、タンパク合成と分解の不均等が起こると推察している¹⁰⁾。非荷重7日間における廃用性筋萎縮には、非荷重による筋核数の減少傾向と、筋核の機能低下による筋核ドメインサイズの減少傾向がともに平均筋線維横断面積の減少に関与していると考えられる。一方、非荷重期間が14日間となると、筋核ドメインサイズは減少傾向のみで有意差は認められなかったが、筋核数は有意に減少していた。Allenらは、14日間の後肢懸垂によりアポトーシス核が著明に増加した¹⁹⁾と報告しており、

表1 筋萎縮過程

群名 (n)	筋線維横断面積 (μm^2)	筋核数 (個)	筋核ドメインサイズ ($\mu\text{m}^2/\text{個}$)	壊死線維発生割合 (%)
C (7)	2180 ± 590	1.02 ± 0.12	2099 ± 368	0.12
H7 (7)	1845 ± 667*	0.96 ± 0.13	1988 ± 296	0.13
H14 (7)	1418 ± 710*	0.83 ± 0.08*	1760 ± 404	0.58*

n：対象ラット数、*：p<0.05（C群と有意差あり）

図1 各群における代表的なHE染色画像

← : 単球の浸潤

←..... : W1・R1群は他群に比べ、やや筋線維が丸く、腫脹が観察された。

表2 非荷重7日群に対する再荷重の効果

群名 (n)	筋線維横断面積 (μm^2)	筋核数 (個)	筋核ドメインサイズ ($\mu\text{m}^2/\text{個}$)	壊死線維発生割合 (%)
C (7)	2180 $\pm$ 590	1.02 $\pm$ 0.12	2099 $\pm$ 368	0.12 ^{†‡}
H7 (7)	1845 $\pm$ 667* ^{†‡§}	0.96 $\pm$ 0.13	1988 $\pm$ 296	0.13 [†]
W1 (7)	2043 $\pm$ 666# [§]	0.94 $\pm$ 0.13	2253 $\pm$ 399	0.83* ^{#§}
W3 (7)	1954 $\pm$ 672# ^{†§}	0.96 $\pm$ 0.12	2085 $\pm$ 278	0.53*
W7 (7)	2510 $\pm$ 839* ^{†‡}	1.02 $\pm$ 0.10	2505 $\pm$ 343	0.10 [†]

n : 対象ラット数, * : $p < 0.05$ (C群と有意差あり), # : $p < 0.05$ (H7群と有意差あり), † : $p < 0.05$ (W1群と有意差あり), ‡ : $p < 0.05$ (W3群と有意差あり), § : $p < 0.05$ (W7群と有意差あり)

表3 非荷重14日群に対する再荷重の効果

群名 (n)	筋線維横断面積 (μm^2)	筋核数 (個)	筋核ドメインサイズ ($\mu\text{m}^2/\text{個}$)	壊死線維発生割合 (%)
C (7)	2180 $\pm$ 590	1.02 $\pm$ 0.12	2099 $\pm$ 368	0.12 ^{#†‡}
H14 (7)	1418 $\pm$ 710*	0.83 $\pm$ 0.08*	1760 $\pm$ 404	0.58* ^{†‡}
R1 (7)	1519 $\pm$ 590 [#]	0.85 $\pm$ 0.04*	1855 $\pm$ 500	1.47* ^{#‡§}
R3 (7)	1441 $\pm$ 634 [†]	0.84 $\pm$ 0.13*	1846 $\pm$ 437	0.95* ^{#†}
R7 (7)	1987 $\pm$ 780 [#]	0.88 $\pm$ 0.09	2363 $\pm$ 639	0.54 [†]

n: 対象ラット数, *: $p < 0.05$ (C群と有意差あり), #: $p < 0.05$ (H7群と有意差あり), †: $p < 0.05$ (R1群と有意差あり), ‡: $p < 0.05$ (R3群と有意差あり), §: $p < 0.05$ (R7群と有意差あり)

我々の結果は先行研究と一致した見解を示した。非荷重期間が長期間となると、筋核の機能低下による、筋核ドメインサイズの減少傾向だけでなく、筋核数の減少が著明となり、平均筋線維横断面積の減少に関与してくると考えられる。

非荷重、再荷重開始に伴う影響として、壊死線維の発生割合を分析・検討した。非荷重に伴う壊死線維の発生割合については、H7群ではC群と差がなかったが、H14群ではC群よりも有意に増加していた。筋萎縮によって筋の脆弱化が起こる⁵⁾ことは報告されているが、本研究の結果より、筋萎縮の進行に伴い、筋の脆弱化が進行していくことが示された。非荷重7日、14日によって惹起された萎縮筋に1日間の再荷重を加えた際、非荷重期間の相違によって筋萎縮の進行程度は異なるが、W1, R1群で壊死線維は有意に増加した。萎縮筋に対する荷重刺激が筋損傷を引き起こす⁵⁻⁸⁾ことは、先行研究により報告されている。本研究の結果より、筋損傷の程度は筋萎縮の程度が大きいほど著明となると考えられる。本研究の再荷重期間を通して、壊死線維の発生割合が徐々に減少したのは、壊死線維は早急に再生反応を開始するため¹⁵⁾と考えられる。

平均筋線維横断面積は再荷重に伴い、増加傾向を示したが、萎縮期間の相違に関わらず、再荷重1日目に対して再荷重3日目に有意な減少が認められた。Krippendorfらは、12.5日の非荷重後の再荷重12-48時間において筋線維の腫脹と、マクロファージの活性化、単球の浸潤が起こったと報告している²⁰⁾。筋活動が増加する時期におけるマクロファージの活性化は筋損傷を示す⁹⁾と報告されている。本研究における再荷重1日目の平均筋線維横断面積の増加は、荷重刺激に伴う筋線維の肥大反応と、過負荷による筋損傷によって筋線維の腫脹が起きた可能性がある。本研究のHE染色画像において、再荷重開始直後に筋線維腫脹、単球の浸潤が示され(図1)、筋損傷の指標となる壊死線維の増加も確認されている。筋損傷のピークは再荷重2日目である²¹⁾という報告があり、再荷重3日目の平均筋線維横断面積の減少は再荷重という

過負荷による筋損傷のピークが過ぎたため、筋線維腫脹の軽減が起きた可能性があげられる。

再荷重1日目の平均筋線維横断面積の増加割合に注目すると、W1群が9%, R1群が5%であった。筋損傷に伴う筋線維腫脹の影響を、R1群がW1群より多く受けている可能性を含めると、再荷重が筋線維横断面積の肥大に与える効果は後肢懸垂期間が短期間であるほど大きいと考えられる。また、H7群は筋核数の有意な減少が起こっていない点、H14群との大きな相違点である。そのため、筋核数が維持されていることが、再荷重開始初期の筋線維横断面積の肥大反応に影響を与えている可能性が考えられる。筋核ドメインサイズの増加割合を見ると、共に有意差はないものの、W1群はH7群より13%, R1群はH14群より2%の増加を示した。筋核数が維持されることによって、より円滑に筋核ドメインサイズの増加が起こり、筋線維横断面積の増加に関与したと考えられる。

再荷重初期においては、非荷重期間の相違によって平均筋線維横断面積の増加割合に相違を認めたが、再荷重3~7日目の増加割合は共に25%と相違がなかった。萎縮筋の再生・肥大中は筋核数と筋核ドメインサイズの増加が同時に起こり¹³⁾、中長期的にみると、筋核数の減少が筋肥大の進行程度に大きな影響を与えない可能性がある。また、非荷重14日後の7日間の再荷重によって、筋核数の有意な増加は認められなかったが、コントロール群と比較し、有意差を認めないレベルまで増加した。よって、再荷重により筋核数が増加したことから、非荷重14日後の再荷重3~7日目の平均筋線維横断面積の増加割合が向上していた点に関連している可能性がある。しかし、W7群は萎縮前より有意に増加しているが、R7群は萎縮前より有意に減少したままである。以上より、再荷重3~7日の間の増加割合に差は無くとも、筋萎縮の程度が少ないほど、短期間で萎縮前のレベルまで回復することが出来るといえる。

本研究の結果より、廃用性筋萎縮に対して早期に荷重刺激を開始することによって、筋萎縮の進行を抑制する

ことが出来、より速く萎縮前の状態に改善できることは明らかである。また、筋萎縮に伴う筋核数の減少は、再荷重初期には肥大反応の低下を招く可能性もあるが、筋核自体も再荷重によって増加するため、中長期的に見ると肥大反応の程度そのものには影響を与えない可能性がある。筋線維壊死については、非荷重期間が長期間となるほど発生割合が増加し、筋の脆弱化が示された。また、再荷重に伴う筋損傷は萎縮の程度が深刻であるほど著明であるが、中長期的には筋損傷の発生が必ずしも筋肥大を妨げるとはいえないことが示唆された。しかし、我々の以前の研究¹⁶⁾において、再荷重初期の筋線維横断面積の増加には、筋再生より筋肥大がより多く関与する可能性が示唆されており、本研究で認められた再荷重初期の平均筋線維横断面積の増加割合の相違に壊死線維の発生割合が影響を与えた可能性も考えられる。再荷重に伴う筋損傷の発生は避けられない現象であるが、ストレッチや温熱などの刺激を加えることで筋損傷の発生を抑制し、円滑で効率的な筋肥大を促進し、治療効果を上げる事が出来る可能性があり、さらなる検討が必要であると考えられる。

萎縮筋における筋核数の増加や、壊死線維の再生時には筋衛星細胞が働く^{7,13,15)}。よって、筋肥大過程時にどのタイミングで筋衛星細胞が活性化するかを分析検討することで、筋核数の減少と壊死線維の発生が筋肥大に与える影響をさらに明らかにすることが出来、今後の課題として挙げられる。

謝辞 本研究の一部は、科学研究費（基盤研究C）の助成を受けて実施した。

引用文献

- 1) 原田 孝, 遠藤 剛: 廃用症候群と骨萎縮ならびに腰痛症. *MB Med Reha*, 2001, 10: 22-28.
- 2) 山崎俊明, 灰田信英, 立野勝彦: 荷重がラット廃用性萎縮予防に及ぼす効果: 週内頻度からの検討. *理学療法科学*, 1995, 22(3): 108-113.
- 3) Williams PE: Effect of intermittent stretch on immobilized muscles. *Ann Rheum Dis*, 1988, 47(12): 1014-1016.
- 4) Sasa T, Sairyo K, Yoshida N, et al.: Continuous muscle stretch prevents disuse muscle atrophy and deterioration of its oxidative capacity in rat tail-suspension models. *Am J Phys Med Rehabil*, 2004, 83(11): 851-856.
- 5) 井上貴行, 沖田 実, 高橋裕司・他: 不動終了後のラットヒラメ筋に対する間歇的伸張運動が関節可動域と筋線維に及ぼす影響. *理学療法科学*, 2007, 34(1): 1-9.
- 6) Tidball JG, Henricks WM: Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fiber growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol*, 2007, 578(Pt 1): 327-336.
- 7) Nguyen HX, Tidball JG: Null mutation of gp91phox reduces muscle membrane lysis during muscle inflammation in mice. *J Physiol*, 2003, 553(Pt 3): 833-841.
- 8) McClung JM, Davis JM, Carson JA: Ovarian hormone status and skeletal muscle inflammation during recovery from disuse in rats. *Exp Physiol*, 2006, 92: 219-232.
- 9) McCall GE, Allen DL, Linderman Jk, et al.: Maintenance of myonuclear domain size in rat soleus after overload and growth hormone/IGF-I treatment. *J Appl Physiol*, 1998, 84(4): 1407-1412.
- 10) Wang XD, Kawano F, Matsuoka Y, et al.: Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290(4): 981-989.
- 11) Hikida RS, Van Nostran S, Murray JD, et al.: Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fibers. *Anat Rec*, 1997, 247(3): 350-354.
- 12) Mozdziak PE, Pulvermacher PM, Schultz E: Unloading of juvenile muscle results in a reduced muscle size 9 wk after reloading. *J Appl Physiol*, 2000, 88(1): 158-164.
- 13) Mozdziak PE, Pulvermacher PM, Schultz E: Muscle regeneration during hindlimb unloading results in a reduction in muscle size after reloading. *J Appl Physiol*, 2001, 91(1): 183-190.
- 14) Allen LD, 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(6): 1857-1861.
- 15) 埜中征哉: 臨床のための筋病理 (第2版). 埜中征哉 (編), 日本医事新報社, 東京, 1993, pp36-39.
- 16) Zushi K, Yamazaki T: The effect of reloading on disuse muscle atrophy: Time course of hypertrophy and regeneration focusing on the myofiber cross-sectional area and myonuclear change. *J Jpn Phys Ther Assoc*, 2012, 15(1): 1-8.
- 17) 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): 1-8.
- 18) Mitchell PO, Pavlath GK: A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(5): 1706-1715.
- 19) Allen DL, Linderman JK, Roy RR, et al.: Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1997, 273(2 Pt 1): 579-587.
- 20) Krippendorff BB, Riley DA: Distinguishing unloading-versus reloading-induced changes in rat soleus muscle. *Muscle Nerve*, 1993, 16(1): 99-108.
- 21) Tidball JG, Berchenko E, Frenette J: Macrophage invasion does not contribute to muscle membrane injury during inflammation. *J Leukoc Biol*, 1999, 65(4): 492-498.