

原 著

(-)-エピガロカテキンガレートの摂取がラットの 廃用性筋萎縮に及ぼす影響

黒坂裕香^{*1,2}, 内藤久士^{*3}, 関根紀子^{*3}, 柿木 亮^{*3}, 湊 久美子^{*1}, 形本静夫^{*3}

*1: 和洋女子大学大学院総合生活研究科

*2: 順天堂大学大学スポーツ健康科学科学部

*3: 順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科

Effects of (-)-epigallocatechin gallate dietary intake on immobilization-induced skeletal muscle atrophy in rats

Yuka KUROSAKA^{*1,2}, Hisashi NAITO^{*3}, Noriko ICHINOSEKI-SEKINE^{*3}, Ryo KAKIGI^{*3},
Kumiko MINATO^{*1} and Shizuo KATAMOTO^{*3}

*1: Graduate School of Human Ecology, Wayo Women's University

*2: School of Health and Sports Science, Juntendo University

*3: Graduate School of Health and Sports Science, Juntendo University

Abstract

(-)-Epigallocatechin gallate (EGCg), the major polyphenol in green tea, has antioxidant properties. Some evidence suggests that oxidative stress caused by skeletal muscle disuse contributes to muscle atrophy. Thus, EGCg may attenuate muscle disuse atrophy, however, the effects of EGCg on muscle atrophy is still unknown. This study investigated the effects of EGCg dietary intake on skeletal muscle atrophy caused by immobilization in rats. Male Wistar rats (9 weeks of age, $n = 22$) were divided into two groups: control diet (Cont, $n = 11$) or EGCg diet (EGCg, $n = 11$). The rats were fed either the control diet or a 0.25% EGCg diet for 24 days. On the 15th day of the experimental period, the left hindlimb muscles were immobilized in the plantar flexion position using a plaster cast, so as to cause soleus muscle atrophy. After 10 days of immobilization, the left (casted) and right (contralateral) soleus muscles were excised. Body weight and food intake did not differ between the two groups after immobilization. Plasma levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) tended to be lower in the EGCg group than in the Cont group ($p < 0.063$). TBARS levels in the soleus muscle, however, did not differ both between the left and right limbs, and between the two groups. Additionally, the percentage of atrophy of the soleus muscle based on wet weight did not differ between the two groups. In contrast, the percentage of atrophy of the fiber cross-sectional area of the soleus muscle was significantly lower in the EGCg group than in the Cont group ($p < 0.05$). These results suggest that dietary intake of 0.25% EGCg attenuates skeletal muscle atrophy due to immobilization.

Key words: EGCg (エピガロカテキンガレート), disuse muscle atrophy (廃用性筋萎縮), oxidative stress (酸化ストレス)

I. 緒 言

外傷や障害およびその治療などに伴い運動が著しく制限された場合、骨格筋では廃用性筋萎縮が生じる。廃用性筋萎縮の背景として酸化ストレスの関与が知られており¹⁻⁵⁾、不活動に伴って生じる活性酸素の増加を最低限に

抑えることが筋萎縮の抑制に重要であると考えられている。ギプス固定による筋萎縮時の酸化ストレスの動態については、Kondo ら^{1,2)}が、ラットの足関節最大底屈位で固定した際にヒラメ筋で脂質過酸化の指標となるチオバルビツール酸反応陽性物質 (TBARS: thiobarbituric acid-reactive substances) 値が上昇することを報告している。近

年では、廃用性筋萎縮を軽減させる目的で抗酸化物質の投与が検討されており、ビタミン E^{3,6)} やエストロゲン⁷⁾、アスタキサンチン⁸⁾ などの有効性がすでに報告されている。

Rice-Evans ら⁹⁾ は、抗酸化作用を有する複数の天然に存在するフラボノイド類について、その抗酸化能をトロロックス（ビタミン E の水溶性誘導体）を基準にして比較しており、緑茶に多く含まれる成分であるカテキンが他のフラボノイド類よりも優れた抗酸化能をもつことを報告している。茶カテキンは、抗酸化作用^{10,11)} をはじめとし、血糖値上昇抑制作用¹²⁾、肥満抑制作用^{13,14)} を有する成分として注目されており、近年、飲料やサプリメント剤としての商品化が進み、一部は特定保健用食品として認定されている。また、骨格筋への作用としては、緑茶抽出物 (GTE: green tea extract) の摂取により、筋ジストロフィーモデルマウス (mdx mice) の筋機能低下と骨格筋 TBARS の増加が抑制されること¹⁵⁾、茶カテキンの摂取により、マウス尾部懸垂モデルのヒラメ筋の機能的な低下が抑制されること¹⁶⁾ が報告されている。

ところで、カテキンは、主に (-)-エピガロカテキンガレート (EGCg: (-)-epigallocatechin gallate), (-)-エピカテキン (EC: (-)-epicatechin), (-)-エピカテキンガレート (ECg: (-)-epicatechin gallate), (-)-エピガロカテキン (EGC: (-)-epigallocatechin) の 4 種類に分類されるが、中でも EGCg は、カテキン類の中で最も茶葉中の含有量が多く、他に比べて強い抗酸化能を有し、唯一細胞膜受容体が特定されている成分である^{17,18)}。様々な疾病に伴う骨格筋の萎縮に対する EGCg の有効性は、筋ジストロフィーモデルに対して骨格筋細胞のネクロシスの進行を遅延させる効果¹⁹⁾ が、癌に伴う悪液質によって生じる筋萎縮に対しては、EGCg がその進行を遅延させる効果²⁰⁾ が明らかにされており、さらに、EGCg の添加によりタンパク分解が抑制されることが筋サテライト細胞由来の筋芽細胞 (C2C12 細胞) を用いた研究で報告されている²¹⁾。しかしながら、不活動に伴う筋萎縮についての EGCg の有効性は検討されていない。

強い抗酸化作用を有する EGCg が廃用性筋萎縮を抑制できるのであれば、何らかの理由で関節の不動化や安静臥床が強いられた際に、筋萎縮の進行を最低限にとどめる成分としてその応用が期待される。そこで本研究では、ギプス固定時のラットに対する高純度 EGCg 単独成分摂取が廃用性筋萎縮に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

II. 方 法

1. 実験動物および飼育条件

実験動物には、9 週齢の Wistar 系雄性ラット (日本 SLC) を用いた。飼育期間中は、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$

に維持し、12 時間の明暗サイクルとした。被験動物は、ケージ内で 1 匹ずつ飼育し、飼料と水は自由摂取とした。1 週間の予備飼育後、群間の体重が等しくなるようにコントロール群 (Cont, $n = 11$) および EGCg 群 (EGCg, $n = 11$) に分けた。

Cont 群には標準粉末飼料 (ラボ MR ストック; 日本農産工業) を、EGCg 群には、標準粉末飼料に EGCg (EGCg: 97.7 %, ECg: 2.3 %; 三井農林) が 0.25 % の割合になるように混ぜ合わせたものを 25 日間与えた。本実験開始から 15 日目に、ペントバルビタールナトリウム ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) を用いた全身麻酔下にて、ゴム質弾性印象材 (Tosicon addition type heavy; 三金工業) を用いて、各群の左脚足関節を最大底屈位の状態で足関節周りを固め、常温重合レジジン (オストロン II; ジーシー) で不動化し、10 日間継続して足関節を固定した。ギプス固定をした左脚を固定脚とし、ギプス固定を行わなかった右脚を対照脚とした。なお、本研究は、順天堂大学動物実験委員会の承認を得て行った。

2. サンプル処理

飼育期間終了後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で後大静脈より約 3 ml の血液を採取した。採取した血液は、抗凝固剤として EDTA を加えて 3000 rpm で遠心分離し、血漿を得た。屠殺後、直ちにヒラメ筋を摘出して筋湿重量を計測し、被験筋の生体長を保持した状態で液体窒素を用いて瞬間凍結した。サンプルは、分析まで -85°C で凍結保存した。ヒラメ筋湿重量については、個体ごとに、萎縮率 = (対照脚 - 固定脚) / 対照脚 の式に当てはめて萎縮率を算出した。

3. 組織学的分析

-20°C のミクロトーム (CM3050S; LEICA) 内にて、ヒラメ筋の筋腹付近から厚さ $10 \mu\text{m}$ の連続横断切片を作成した。筋線維横断面積の測定のため、Guth and Samaha ら²²⁾ の方法による myosin ATPase 染色 (pH 4.53) を行った。染色された組織標本の中央付近を、光学顕微鏡 (BX51; オリンパス工業) に接続した顕微鏡デジタルカメラ (DP12; オリンパス工業) を介し、パーソナルコンピュータへデジタル画像として取り込んだ。このデジタル画像より、NIH Image Ver. 1.62 ソフトウェアにて筋線維横断面積を求めた。各個体の筋線維横断面積は、100 - 150 本の筋線維を測定しその平均値とし、萎縮率 = (対照脚 - 固定脚) / 対照脚 の式に当てはめて萎縮率を算出した。なお、本研究では、筋線維タイプの同定は行わなかった。

4. 生化学的分析

筋サンプルの湿重量 15 - 20 mg に対し、その 20 倍量に相当する 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え、ビーズ式細胞破碎装置 (MS-100R; トミーメディコ) を用いてホ

Table 1. Body weight and food intake.

	Cont		EGCg	
Initial body weight (g)	235.6	± 7.8	235.0	± 7.4
Final body weight (g)	263.1	± 14.7	266.1	± 9.6
Total food intake (g/day)	18.4	± 1.5	18.9	± 1.7
Total EGCg intake (mg/day)	—		47.2	± 1.9

Values are means ± SD.

モジネートした。分析には 1600 g で遠心分離後に得られた上澄みを用いた。ヒラメ筋サンプルおよび血漿中の過酸化脂質の定量には、TBARS Assay Kit (Cayman Chemical) を用いた。さらに、同一サンプルで Bradford 法²³⁾に従ってタンパク質濃度を定量し、タンパク質量あたりの相対値で TBARS を比較した。

5. 統計処理

データは、平均値 ± 標準偏差で示し、体重、摂餌量、血漿 TBARS、萎縮率に関しては、対応のない Student's *t*-test を用いて分析した。ヒラメ筋 TBARS、筋湿重量、筋線維横断面積については、二元配置分散分析を行った後に Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。すべての項目において、危険率 5 % 未満 ($p < 0.05$) をもって統計学的に有意であるとした。

III. 結 果

1. 飼育期間中の体重の変化および摂餌量

体重および摂餌量は、両群間に有意な差は認められなかった (Table 1)。EGCg 群の EGCg 摂取量は、1 日あたり 47.2 ± 1.9 mg であった。

2. 過酸化脂質

血漿 TBARS は、Con 群: 11.4 ± 3.7 nmol/L, EGCg 群: 9.7 ± 1.6 nmol/L であり、EGCg 群は、Con 群と比べ低い値であったが、統計的有意差には達しなかった ($p = 0.063$)。さらに、ヒラメ筋 TBARS では、群間に有意な差は認められず、また、対照脚と固定脚の間でも有意な差は認められなかった (Fig. 1)。

3. 筋湿重量

ヒラメ筋重量は、Con 群対照脚: 102.4 ± 7.7 mg, 固定脚: 60.4 ± 4.8 mg, EGCg 群対照脚: 100.9 ± 6.2 mg, 固定脚: 63.2 ± 7.3 mg であった。対照脚と比較して固定脚で有意に低値を示した ($p < 0.01$) もの、萎縮率では Con 群と EGCg 群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 2)。

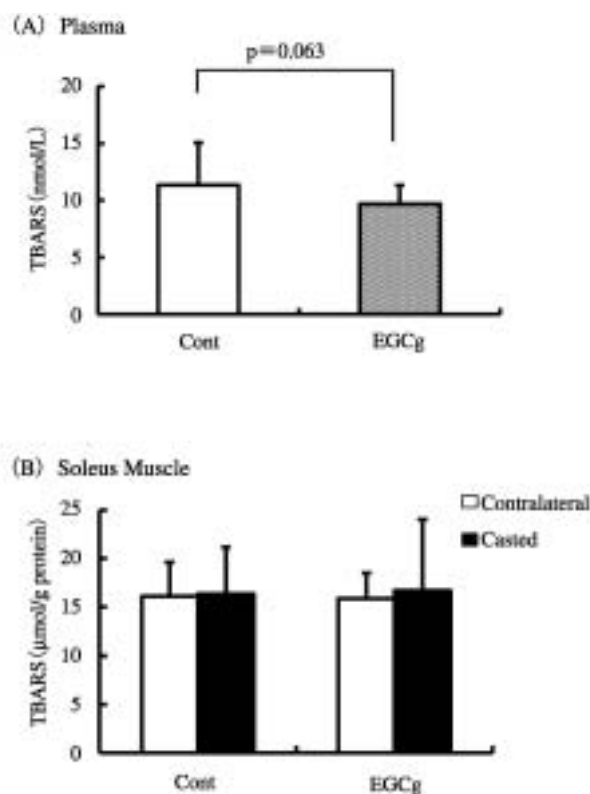


Fig. 1. Effects of (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) dietary intake on levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in the (A) plasma and (B) soleus muscle. Values are means ± SD.

4. 筋線維横断面積

筋線維横断面積は、Con群の対照脚: $2086.8 \pm 293.8 \mu\text{m}^2$, 固定脚: $1437.5 \pm 302.5 \mu\text{m}^2$, EGCg 群対照脚: $2085.5 \pm 220.0 \mu\text{m}^2$, 固定脚: $1750.4 \pm 194.4 \mu\text{m}^2$ であった。対照脚と比較して固定脚で有意に低値を示した ($p < 0.01$)。さらに、萎縮率は、Con 群で 30.58 ± 13.32 % であったのに対し、EGCg 群では 15.80 ± 7.20 % であり、EGCg 群で有意に低値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 3)。

IV. 考 察

本研究で得られた重要な所見は、ラットの足関節に最大底屈位で 10 日間のギプス固定を施し、0.25 % EGCg 含

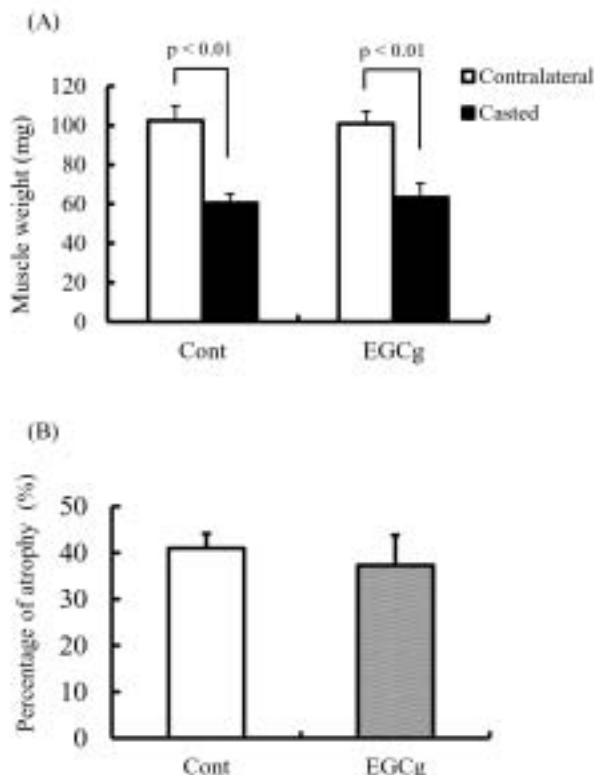


Fig. 2. Effects of (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) dietary intake on soleus muscle weight expressed as (A) wet weight and (B) percentage of atrophy. Values are means $\pm$ SD.

有餌を摂取させたところ、Cont群と比較して、EGCg群のヒラメ筋では筋線維横断面積の萎縮が有意に抑制されたことである。先行研究では、尾部懸垂モデルにおいて、茶カテキンが筋の機能的な低下を抑制することが報告されているものの¹⁶⁾、茶カテキンの一成分であるEGCgについての廃用性筋萎縮への影響は検討されていない。本研究の結果、茶カテキンに多く含まれる成分の一つであるEGCgが不活動時の筋線維横断面積の低下を抑制する働きを持つことが明らかとなった。

一般的にギプス固定による筋萎縮は、筋線維横断面積の減少に依存し、筋線維数の変化は少ないとされている²⁴⁾。そこで、筋横断面積を指標にEGCgの筋萎縮に対する効果を確認したところ、EGCg群において、筋線維横断面積の低下が有意に抑制されていた。しかしながら、筋湿重量においては、Cont群とEGCg群の間で萎縮率に差はみられなかった。尾部懸垂モデルを用いて筋機能の低下に対する茶カテキンの効果を検討したOtaら¹⁶⁾の報告でも、茶カテキン摂取による筋湿重量の違いは確認されておらず、本研究の結果と類似している。筋線維横断面積と筋湿重量の結果の違いについては、結合組織など筋線維以外の組織学的な検討を実施していないため、本研究の結果からは明らかにすることはできなかった。

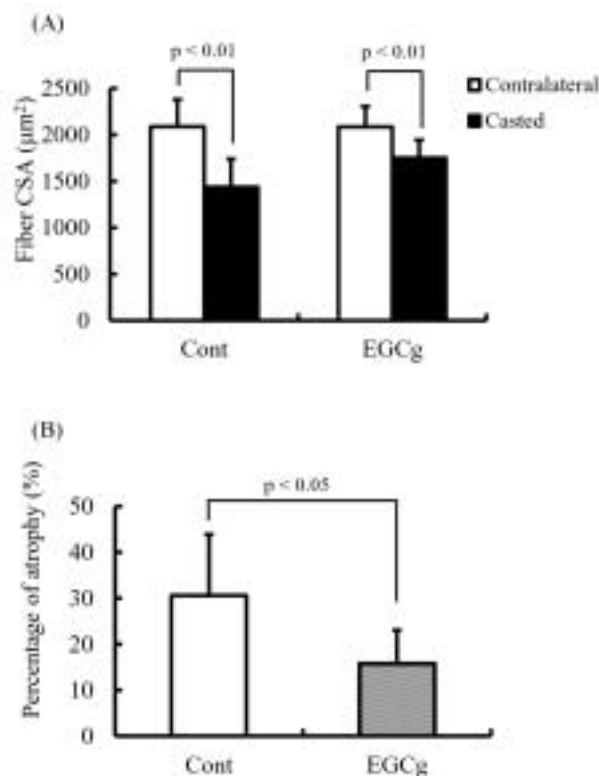


Fig. 3. Effects of (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) dietary intake on soleus muscle fiber cross-sectional area (fiber CSA) expressed as (A) fiber CSA and (B) percentage of atrophy. Values are means $\pm$ SD.

本研究で得られたEGCgの摂取による廃用性筋萎縮の抑制効果の詳細を調べるために、EGCgの抗酸化作用を血漿TBARSを指標に検討を行った。その結果、萎縮に伴うTBARS値の上昇をEGCg摂取により抑制する傾向があることが確認された ($p = 0.063$)。先行研究では、GTE²⁵⁾、EC¹⁷⁾、EGC¹⁷⁾、EGCg²⁶⁾などのカテキン類の摂取により、血漿TBARS上昇抑制効果がみられることが報告されているが、摂取期間や摂取量の違いにより、その効果の程度にばらつきがある。本研究では餌に0.25% EGCgを添加し、25日間摂取させた条件において、統計的有意差には至らなかったものの、血漿TBARSの上昇を抑制する傾向が確認された。このことから、本研究でも先行研究同様、血中レベルにおいて、EGCgが抗酸化作用を発揮していた可能性が示唆された。

経口より摂取したEGCgの一部は、腸間膜より吸収され、肝において代謝されて抱合化やメチル化などを受けた後、血液を介して各組織に移行すると考えられている¹⁷⁾。EGCgの骨格筋での作用が数多く報告されていることから^{15, 16, 19, 20)}、代謝されたEGCgは、その存在形態こそ明らかではないものの、骨格筋にも移行し作用していると予想される。そこで、本研究では、骨格筋レベルでのTBARSの検討を試みた。しかしながら、Cont群、

EGCg 群ともに萎縮が生じた筋の TBARS の値は対照脚と比較して増加しておらず、EGCg 摂取による効果も確認されなかった。先行研究では、ラットに 12 日間のギプス固定を行い、ギプス固定 8 日目から萎縮筋において TBARS が増加することを報告している^{1,3)}。先行研究と本研究での結果が異なる点については、一つは、萎縮期間や萎縮の進行速度の違いにあると考えられる。萎縮に伴う筋の TBARS の上昇が確認されている Kondo ら^{1,3)}の報告では、いずれもギプス固定 12 日目の筋湿重量の萎縮率は、約 53 ~ 54% に達していたとみられ、本研究よりも期間が長く萎縮率も大きい。一方、7 日間のギプス固定で萎縮率 40 % 程度であった別の先行研究²⁷⁾では、TBARS の上昇は確認されておらず、本研究の TBARS の結果と一致した。Desaphy ら²⁸⁾は、尾部懸垂を実施した際に萎縮が確認された複数の下肢骨格筋について萎縮率と TBARS の関係を確認しており、萎縮率が大きいほど TBARS の上昇が大きいことを報告している。このことから、本研究の結果より萎縮がさらに進行した場合に TBARS の上昇が確認されるのかもしれない。

また、別の可能性として、10 日間のギプス固定期間中に過酸化脂質の生成は増加したものの生体内の抗酸化能力が向上しそれを除去した可能性も考えられる。 O_2^- に誘導され、 H_2O_2 を産物とする Cu / Zn - SOD (Copper / Zinc superoxide dismutase) は、萎縮早期から活性が増加することが報告されている^{2, 6, 14, 29, 30)}。さらに、 H_2O_2 に誘導されるカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ^{2, 6, 14)}、ヒドロキシラジカルの生成を招く鉄イオン^{2, 6)}なども萎縮に伴って変動し、過酸化脂質の生成を左右している可能性が考えられる。したがって、ギプス固定を行っていた 10 日間のうちに、組織の過酸化脂質に対する除去機構能力が向上し、その結果、TBARS の上昇を抑制できた可能性も予想される。EGCg の抗酸化作用は、酸化ストレスが生じているときのみ発揮されと考えられていることから¹⁷⁾、本研究では EGCg が萎縮筋において抗酸化作用を発揮しているか否かを確認することはできなかった。この点については、経時的変化の観察が必要であると考えられる。

廃用性筋萎縮の進行に酸化ストレスが関与するという報告が数多くみられるものの、そのメカニズムには不明な点も多く、EGCg の廃用性筋萎縮への作用機序については明らかではない。EGCg は、抗酸化作用の他にも多くの生理作用を有し、廃用性筋萎縮抑制に関しては、抗酸化作用以外の生理作用が大きく影響した可能性も否めない。その一つとして、廃用性筋萎縮に伴い、インスリン抵抗性が生じ、骨格筋糖取り込みが減少する³¹⁾ことが知られているが、EGCg は、骨格筋における GLUT4 の細胞膜移行を促進する作用³²⁾を有することからも、糖代謝の改善を介して廃用性筋萎縮に作用した可能性も考えられる。したがって、EGCg が廃用性筋萎縮を抑制した機

序については今後の検討課題であり、抗酸化作用以外の観点からも検討していく必要があると考えられる。

本研究は、廃用性筋萎縮に対する EGCg 摂取の効果を検討し、筋線維横断面積の萎縮が抑制される効果が認められた最初の研究である。EGCg の摂取は、骨格筋レベルでの TBARS の低下には至らないものの、廃用性筋萎縮進行の抑制に効果的に作用している可能性が考えられた。

V. 結 論

EGCg の摂取が、ラットのギプス固定によって生じた廃用性筋萎縮に及ぼす影響を検討した結果、EGCg の摂取がヒラメ筋の筋線維横断面積の低下を有意に抑制することが示された。したがって、EGCg の摂取は、廃用性筋萎縮を軽減する可能性があると考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、EGCg 粉末サンプルをご提供いただきました三井農林株式会社食品総合研究所の滝晶治様、高垣晶子様に感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Kondo H, Miura M, Nakagaki I, et al.: Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*, **262**, 583-590, 1992
- 2) Kondo H, Nakagaki I, Sasaki S, et al.: Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*, **265**, 839-844, 1993
- 3) Kondo H, Miura M, Itokawa Y: Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand*, **142**, 527-528, 1991
- 4) Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC: Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **288**, 337-344, 2005
- 5) Powers SK, Kavazis AN, McClung JM: Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol*, **102**, 2389-2397, 2007
- 6) Servais S, Letexier D, Favier R, et al.: Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free Radic Biol Med*, **42**, 627-635, 2007
- 7) Sugiura T, Ito N, Goto K, et al.: Estrogen administration attenuates immobilization-induced skeletal muscle atrophy in male rats. *J Physiol Sci*, **56**, 393-399, 2006
- 8) 吉原利典, 杉浦崇夫, 芝口翼, ほか: 熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせが廃用性筋

- 萎縮に与える影響. 体力科学, **59**, 303-312, 2010.
- 9) Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, et al.: The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*, **22**, 375-383, 1995
 - 10) Miyazawa T: Absorption, metabolism and antioxidative effects of tea catechin in humans. *Biofactors*, **13**, 55-59, 2000
 - 11) 芳野恭士, 渭原寛, 木村志帆, ほか: 茶カテキンの抗酸化作用に関する研究. *J Technology and Education*, **13**, 1-7, 2006
 - 12) Matsumoto N, Ishigaki F, Ishigaki A, et al.: Reduction of blood glucose levels by tea catechin. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 525-527, 1993
 - 13) Ashida H, Furuyashiki T, Nagayasu H, et al.: Anti-obesity actions of green tea: possible involvements in modulation of the glucose uptake system and suppression of the adipogenesis-related transcription factors. *Biofactors*, **22**, 135-140, 2004
 - 14) Shimotodome A, Haramizu S, Inaba M, et al.: Exercise and green tea extract stimulate fat oxidation and prevent obesity in mice. *Med Sci Sports Exerc*, **37**, 1884-1892, 2005
 - 15) Call JA, Voelker KA, Wolff AV, et al.: Endurance capacity in maturing mdx mice is markedly enhanced by combined voluntary wheel running and green tea extract. *J Appl physiol*, **105**, 923-932, 2008
 - 16) Ota N, Soga S, Haramizu S, et al.: Tea catechins prevent contractile dysfunction in unloaded murine soleus muscle: A pilot study. *Nutrition*, **27**, 955-959, 2011
 - 17) 豊田勲: 茶の生体機能 [Ⅱ] 抗酸化作用. 伊奈和夫, 坂田完三, 富田勲ほか: 茶の科学成分と機能. p.105-118, アイケイコーポレーション, 神奈川, 2002
 - 18) Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, et al.: A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, p.380-381, 2004
 - 19) Dorchies OM, Wagner S, Vuadens O, et al.: Green tea extract and its major polyphenol (-)-epigallocatechin gallate improve muscle function in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, **290**, 616-625, 2006
 - 20) Wang H, Lai YJ, Chan YL, et al.: Epigallocatechin-3-gallate effectively attenuates skeletal muscle atrophy caused by cancer cachexia. *Cancer Lett*, **305**, 40-49, 2011
 - 21) Olivan M, Busquets S, Figueras M, et al.: Nutritional inhibition of muscle proteolysis: a role of diallyl sulphide in the treatment of muscle wasting. *Clin Nutr*, **30**, 33-37, 2011
 - 22) Guth L, Samaha FJ: Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol*, **25**, 138-152, 1969
 - 23) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254, 1976
 - 24) Cardenas DD, Stolov WC, Hardy R: Muscle fiber number in immobilization atrophy. *Arch Phys Med Rehabil*, **58**, 423-426, 1977
 - 25) Murase T, Haramizu S, Ota N, et al.: Tea catechin ingestion combined with habitual exercise suppresses the aging-associated decline in physical performance in senescence-accelerated mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **295**, 281-289, 2008
 - 26) Ishikawa T, Suzukawa M, Ito T, et al.: Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am J Clin Nutr*, **66**, 261-266, 1997
 - 27) Kondo H, Kodama J, Kishibe T, et al.: Oxidative stress during recovery from muscle atrophy. *FEBS Lett*, **326**, 189-191, 1993
 - 28) Desaphy JF, Pierno S, Liantonio A, et al.: Antioxidant treatment of hindlimb-unloaded mouse counteracts fiber type transition but not atrophy of disused muscles. *Pharmacol Res*, **61**, 553-563, 2010
 - 29) Bonetto A, Penna F, Muscaritoli M, et al.: Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy? *Free Radic Biol Med*, **47**, 906-916, 2009
 - 30) Lawler JM, Song W, Demaree SR: Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, **35**, 9-16, 2003
 - 31) 山田茂: 骨格筋萎縮の可塑性. 森谷敏夫: 運動と生体諸機能・適応と過疎性. p.108-122, 有限会社ナツプ, 東京, 1999
 - 32) Ueda M, Nishiumi S, Nagayasu H, et al.: Epigallocatechin gallate promotes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **5**, 377, 286-290, 2008