

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300221

研究課題名(和文)筋スティフネスの分子メカニズムとその応用

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of muscular stiffness and their application to human physiology

研究代表者

石井 直方 (ISHII, NAOKATA)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：20151326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト骨格筋の活動時スティフネス(AS)および安静時スティフネス(PS)を超音波剪断波エラストグラフィーで測定した。その結果、1)等尺性収縮におけるASが収縮張力および太いフィラメントと細いフィラメントのオーバーラップ量に比例すること、2)等張力性収縮におけるASが伸張性条件下では短縮性条件下より小さいこと、3)筋疲労に伴いASと筋電図平均振幅値の関係が筋線維タイプ依存的に変化すること、4)PSが低強度の持続的筋緊張によって増大し、動的筋収縮によって低下することなどが明らかになった。これらは、生体内の筋スティフネスが、主にアクチン-ミオシン間の結合に由来することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms underlying active stiffness (AS) and passive stiffness (PS) of human skeletal muscle were investigated in vivo, by using supersonic shear-wave measurements. In isometric contractions, AS was proportional to both the activation level of muscle and the amount of overlap between thick and thin filaments. In isotonic contractions, the ratio between contractile force and AS (force/AS) was larger under the eccentric condition than under the concentric condition. Muscular fatigue caused changes in the relationship between AS and EMG amplitude apparently in a fiber type dependent fashion. Sustained muscular tone with low activation level caused a slight increase in PS, whereas repeated dynamic contractions caused a transient decrease in PS. These results suggest that muscular stiffness is mainly originated from interactions between actin and myosin and its quantification in vivo is useful to investigate the state of muscle during a variety of human movements.

研究分野：筋生理学

キーワード：筋スティフネス、超音波剪断波、長さ-張力関係、長さ-スティフネス関係、伸張性収縮、短縮性収縮、クロスブリッジ、筋疲労

1. 研究開始当初の背景

身体運動における骨格筋の機能を評価する上で、筋力、収縮速度などに加え、筋の「硬さ」（スティフネス）やその逆数である柔軟性は重要な要素となる。筋スティフネスは、1) 活動時スティフネス (Active stiffness; AS) と、2) 安静時スティフネス (Passive stiffness; PS) に大別される。

1) 活動時スティフネス (AS) : 筋収縮中の長軸方向のスティフネスをさす。骨格筋単一筋線維では通常、長軸方向に 1 kHz 以上で微小な長さ変化を与え、張力応答を記録することにより測定される。これまでの研究から、AS は伸張の瞬間に結合しているアクチン-ミオシンクロスブリッジによって発生することが明らかとなっている。したがって、単一筋線維では、時間平均としての AS は筋線維の発揮張力に一次比例する。

ヒト生体内において、収縮中の AS を測定することができれば、筋活動レベル、筋内部での筋線維の動員様態、共同筋間での活動貢献度、深層部筋の活動など、多様なテーマへの活用が可能と考えられる。しかし、こうした発想の研究はこれまでほとんど行われてこなかった。

2) 安静時スティフネス (PS) : 受動的スティフネスともいい、関節柔軟性の一要素となり、身体運動機能に深く関わる。関節柔軟性（あるいは関節の固さ）には、少なくとも関節そのものの構造、関節周囲の結合組織、筋自体の PS の 3 者が関与する。通常行われている単一関節まわりの受動的トルク測定では、これらをすべて含む「硬さ」を測定することになるので、PS を評価することはできない。さらに、筋自体の PS の起源に関しても、緊張や反射による微小な筋活動、安静時に残存するクロスブリッジ、タイチンなどの細胞骨格タンパク質、筋内結合組織など、さまざまな可能性が示唆されてきた。

近年、ガン検診などを目的とし、組織硬度を可視化・定量化できる「超音波剪断波エラストグラフィ」(Supersonic shear-wave elastography ; 以後 SWE と略) という手法が急速に発展してきており、この手法がヒト生体内での筋スティフネスの測定に応用できる可能性がある。この方法は、生体組織にフォーカスした超音波をあて、そこに生じた剪断波の伝搬速度から組織硬度 (剪断弾性率) を算出するものである。ダイナミックレンジなどに問題点を残すものの、我々の予備的研究では、上記研究への応用が十分に可能と考えられる段階に至っていた。

2. 研究の目的

本研究は、主に SWE 用いてヒト骨格筋の AS と PS をさまざまな条件下で測定し、それらの分子的機構にアプローチするとともに、身体深層部筋の筋活動推定などへの応用を試みることを目的とした。具体的なテーマは以下の通り：

(1) 筋活動レベルと AS

等尺性随意収縮および電気刺激による収縮における発揮張力と AS の関係を調べる。両者の間に線形あるいはそれに近い関係があれば、AS を筋活動レベルの指標として用いることが可能と考えられる。

(2) 筋の長さ と AS

筋の長さを様々に変えた条件で等尺性収縮を行い、長さ-張力関係および長さ-AS 関係を得る。両者を比較することにより、AS が太いフィラメントと細いフィラメントの間のオーバーラップに比例するかを調べる。

(3) 動的収縮における AS

等張力性条件下での動的収縮を用い、短縮速度と AS の関係につき調べる。特に、短縮性条件と伸張性条件の間でどのような差異があるかを検討する。

(4) 筋疲労時の協働筋における AS

複数の協働筋を用いる筋力発揮課題を用い、筋疲労とともに協働筋間で AS および筋電図振幅がどのように変化するかを調べる。

(5) 筋活動が PS に及ぼす影響

長時間にわたる姿勢維持に代表される筋緊張の持続や、動的筋収縮の繰り返しが PS にどのような影響を及ぼすかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 被検者および対象とする筋

健常な成人男女 (延べ 45 名、平均年齢 28 歳) を被検者とし、上記テーマに応じて前頸骨筋、上腕二頭筋、下腿三頭筋、僧帽筋、腸肋筋を対象とした。筋活動は随意および経皮的電気刺激 (80 Hz, 0.5 ms の矩形刺激) によって行われた。収縮中の筋活動レベルは、表面筋電図を用いた定法により推定した。

本研究は、東京大学「ヒトを対象とした研究に関する倫理委員会」の指針に従って行い、事前に同委員会の承認を得た上で行った。

(2) 筋スティフネスの測定

活動時および安静時スティフネス

(AS および PS) は、市販の超音波剪断波エラストグラフィ装置 (Aixplorer, Supersonic Imagine, France) に、15 MHz リニアプローブ (SL15-4, Supersonic Imagine) を装着して行った。超音波 B モード画像を手がかりに筋の長軸方向にプローブをセットし、自作のプローブガイドでその位置を固定した。図 1 に、前頸骨筋の随意および電気刺激による 5 秒間の収縮時の画像を示す。ステイフネス計測範囲内(四角で示された領域)の剪断弾性率(筋長軸方向のヤング率に相当する)が疑似カラーで示されている。画像を参照しながら、筋の表層付近と深部腱膜付近から、ピクセルごとの計測値の分散が 30%以内に入る条件を満たす領域(円形、直径 3 mm)を指定し、それらの領域の剪断弾性率(単位は kPa)の平均値を AS とした。

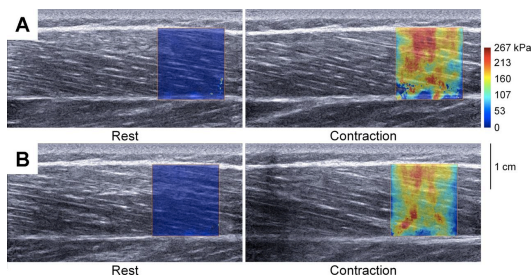


図 1 前頸骨筋の随意収縮 (A) および電気刺激による収縮 (B) における超音波剪断波画像(いずれも等尺性)。左に安静時、右に収縮時の画像を示す。剪断弾性率が疑似カラーで示されており、収縮中にステイフネスが増大していることがわかる。

(3) 筋の張力および筋線維長の推定

筋活動に伴う関節トルクは、主に自作の多機能型ダイナモメータを用いて測定した。さらに、超音波画像から得られた羽状角、および先行研究で報告されているモーメントアーム長をもとに、関節トルク値を筋線維長軸方向の張力に変換した。筋線維長は、超音波画像より得られる筋束長 (fascicle length) に比例するものとした。

4. 研究成果

(1) 筋活動レベルと AS

前頸骨筋をさまざまな強度で電気刺激した場合の、等尺性収縮張力と AS の関係を図 2 に示す。AS は張力に一時比例することから、活動状態の筋線維数、あるいは時間当たりに結合するクロスブリッジ数を反映するものと考えられる。このことは、AS がさまざまな身体運動における個々の筋の活動レベルを推定するために有用な指標となることを示唆する。一方、随意収縮における張力と AS にも相関が見られたものの、

線形性はそれほど強くなく、協働筋の活動の変化が関節トルクに影響を及ぼしていることが示唆された。

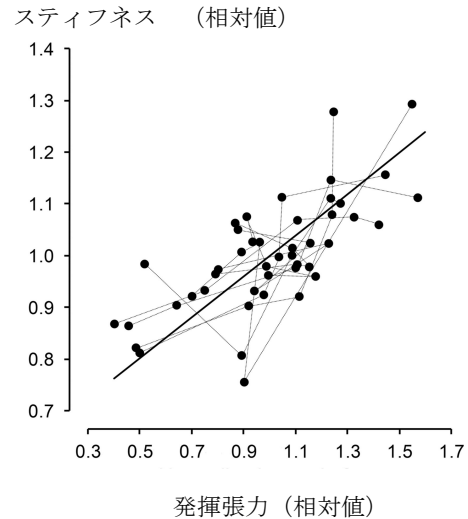


図 2 電気刺激による前頸骨筋収縮時の張力と AS の関係。(N=9)

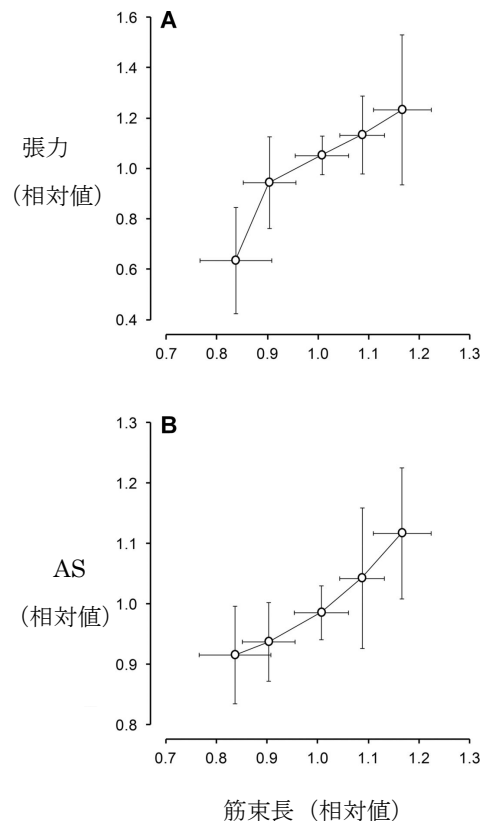


図 3 前頸骨筋の電気刺激による収縮時の筋束長-張力関係 (A) および筋束長-AS 関係。各点は平均値±標準偏差 (SD) を示す。(N=9)

(2) 筋の長さ と AS

足関節角度を自然位 (0°) を中心として -15° から $+40^\circ$ の範囲で変え、最大強度の電気刺激を与えた場合の等尺性足関節背屈トルクと AS を測定した。図 3 に、その結果より得られた筋束長-張力関係

(A) および筋束長-AS 関係 (B) を示す。両関係は定性的によく一致し、前頸骨筋は生体内の可動域において、主に長さ-張力関係の上向域にあること、および筋の伸張とともに、力発揮に有効な太いフィラメントと細いフィラメントのオーバーラップ量が増大することが示された。一方、筋束長の短い領域において張力には急激な減少が見られ、短縮に伴って筋内圧の増加など、収縮張力と逆向きの力が発生することが示唆された。

また、電気刺激による収縮と、随意最大収縮における筋束長-AS 関係を比較すると、図 4 のようになった。この結果から、随意収縮においては、筋束長の短い領域において筋活動の抑制が起こることが示唆された。

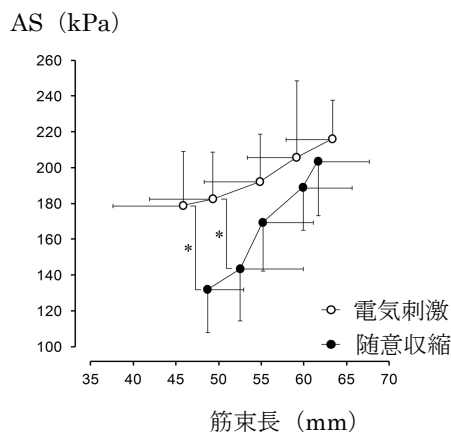


図 4 電気刺激による収縮 (○) および随意最大収縮 (●) における筋束長-AS 関係。各点は平均値 \pm SD、*は有意差 ($P < 0.05$) を示す。(N=9)

(3) 動的収縮における AS

肘屈筋 (上腕二頭筋) を対象とし、等張力性短縮、等尺性、等張力性伸張のそれぞれの条件における AS を測定した。等張力性ダイナモメータを用い、等尺性最大筋力の 30~50% に相当する負荷を、肘関節角度 40° から 100° の範囲にわたり、 6° s^{-1} の速度で挙上/降下した。等尺性収縮は肘関節角度 90° で行った。その結果、発揮張力が同一という条件のもとでは、AS の値は等尺性 = 短縮性 > 伸張性となることがわかった (図 5)。また、張力と AS の比 (張力/AS) は伸張性 > 短縮性 = 等尺性となり、伸張性収縮においては、クロスブリッジ当

りの発揮張力が増加し、筋線維内部の収縮装置に強い力学的ストレスが作用することが示唆された。

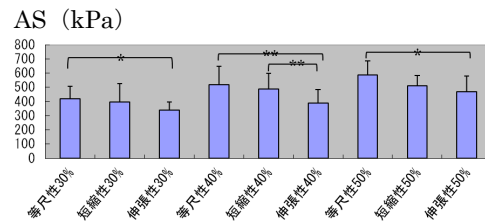


図 5 等尺性最大張力の 30、40、50% の負荷条件のもとでの、短縮性、等尺性、伸張性収縮時の AS。平均値 \pm SD、*、**は有意差 (*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$) を示す。(N=9)

(4) 筋疲労時の協働筋における AS

足関節底屈筋 (下腿三頭筋: 腓腹筋内・外側頭およびヒラメ筋) を対象とし、協働筋群を構成するそれぞれの筋における AS が筋疲労とともにどのように変化するかを調べた。測定課題として、等尺性随意最大トルクの 0~60% に相当する足関節底屈トルクを 25 秒間でランプ状に発揮し、それぞれの筋における AS と表面筋電図平均振幅値 (RMS) を測定した。疲労課題としては、5 秒間の等尺性最大収縮 \times 10 回を 1 セットとし、1 分間の休息を挟んで 9 セット行った。疲労課題の前後で同一の測定課題を行った結果、AS 平均値は腓腹筋内側頭で増加し、ヒラメ筋で減少した。一方、筋電図 RMS 値は、腓腹筋内側頭で減少し、ヒラメ筋では変化がなかった。腓腹筋外側頭では、これらの値にも変化がみられなかった。これらの結果から、高強度の繰り返し筋活動によって、協働筋間で異なる疲労の様相が発現し、特に速筋線維が優位と考えられる腓腹筋内側頭では、筋活動レベルの低下が起こる一方で、筋活動レベル当たりの AS が増大することが示唆された。こうした変化は、筋線維内の ADP 濃度の増加などによって、クロスブリッジの解離速度が低下するために起こると考えられる。

(5) 筋活動が PS に及ぼす影響

長時間にわたる姿勢維持などによって、筋の「こり」や関節可動域の減少が起こることはよく知られる。そこで、低強度の持続的筋活動および動的筋活動が安静時スティフネス (PS) に及ぼす効果を調べた。まず、僧帽筋および腸筋筋を対象とし、着座姿勢 (上肢を水平位にし、支持台の上に置く) を 10 分間維持している

間の AS と、その前後の PS を測定した。PS の測定は、僧帽筋に対しては上肢を下垂した安静座位、腸筋に対しては安静横臥位で行った。その結果、着座姿勢中の AS は両方の筋で時間とともに増加し、等尺性最大収縮時の値の約 20% に達した。着座姿勢維持課題の終了後の PS は課題前のレベルに向かって減少したが、30 分程度の間やや高値を示した。一方、課題終了時に筋力発揮を伴う動的ストレッチを行うと、急速な PS の低下が見られた。一方、上腕二頭筋を対象として、等尺性最大筋力の 30% の負荷を 50 回挙上する課題の前後で PS を測定したところ、課題後の PS が一過的に課題前のレベルを超えて低下する現象が見られた。これらの結果は、PS の一部が安静時に残存するクロスブリッジ、あるいは微少な筋活動による AS 成分を含むことを示唆する。

しかし、PS 自体の絶対値が小さく、またその値が測定時の肢位に影響されることから、今後さらに精度の高い測定による検討が必要と考えられる。

(6) 総括と今後の展望

本研究の結果から、超音波剪断波エラストグラフィにより得られる AS が、時間当たりに結合するクロスブリッジ数を反映することが示唆された。このことから、さまざまな身体運動中に個々の筋の AS を測定することにより、それらの筋の発揮張力を個別に推定することが可能と考えられる。一方、生体内の筋は異なるタイプの筋線維からなる不均一な組織であるため、筋線維タイプごとの AS-収縮張力関係や、運動単位の局在などが、筋全体の AS に影響を及ぼすと考えられる。これらについての知見を得ることが今後の課題といえる。

一方、当初の段階で本研究の主要なテーマのひとつであった深層部筋の活動の検出については、思うように研究が進まなかった。その理由として、通常のリニアプローブでは体表面から 50 mm 程度の深部までが測定限界であったこと、深部観察に適したコンベックスプローブでは、張力と AS の間の線形性が良好でなかったことなどがあげられる。これらの欠点をクリアできる測定器が開発されることを期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Watanabe, Y., Tanimoto, M., Oba, N., Sanada, K., Miyachi, M. and Ishii, N. Effect of resistance training using body weight in the elderly: comparison of resistance exercise movement between slow and normal speed movement. *Geriatrics Gerontol.*, in press,

2015. 査読有 DOI: 10.1111/ggi.12427.

- ② Sasaki, K., Toyama, S. and Ishii, N. Length-force characteristics of in vivo human muscles reflected by supersonic shear imaging. *J. Appl. Physiol.*, **117**, 153-62, 2014. 査読有 DOI: 0.1152/jappphysiol.01058.
- ③ Watanabe, Y., Madarame, H., Ogasawara, R., Nakazato, K. and Ishii, N. Effect of very low-intensity resistance training with slow movement on muscle size and strength in healthy older adults. *Clin. Physiol. Funct. Imaging*, **34**, 463-470, 2014. 査読有 DOI: 10.1111/cpf.12117.
- ④ Watanabe, Y., Tanimoto, M., Ohkane, A., Miyachi, M. and Ishii, N. Low-intensity resistance exercise with slow movement and tonic force generation increases muscle size and strength in older adults. *J. Aging Phys. Activity*, **21**, 71-84, 2013. 査読有 DOI: none.
- ⑤ Kawada, S., Wada, E., Matsuda, R. and Ishii, N. Hyperbaric hyperoxia accelerates fracture healing in mice. *PLoS ONE*, **8**, e72603, 2013. 査読有 DOI: none.
- ⑥ Kawabata, M., Goto, K., Fukuzaki, C., Sasaki, K., Hihara, T. and Ishii, N. Acceleration patterns in the lower and upper trunk during running. *J. Sport Sci.*, **31**, 1841-1853, 2013. 査読有 DOI: 10.0180/0260414.2013.805884.
- ⑦ Ogasawara, R., Kobayashi, K., Tsutaki, A., Lee, K., Abe, T., Fujita, S., Nakazato, K. and Ishii, N. mTOR signaling response to resistance exercise are altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, **114**, 934-940, 2013. 査読有 DOI: 10.1152/jappphysiol.01161.2012.
- ⑧ Makanae, Y., Nakazato, K. and Ishii, N. Vitamin C administration attenuates overload-induced skeletal muscle hypertrophy in rats. *Acta Physiol.*, **208**, 57-65, 2013. 査読有 DOI: 10.1111/apha.12042.
- ⑨ Ogasawara, R., Yasuda, T., Ishii, N. and Abe, T. Comparison of muscle hypertrophy following 6-month 3 of continuous and periodic strength training. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **113**, 975-985, 2013. 査読有 DOI: 10.1007/s00421-012-2511-9.
- ⑩ Kobayashi, Y., Kubo, J., Matsubayashi, T., Matsuo, A., Kobayashi, K. and Ishii, N. Relationship between bilateral differences in single-leg jumps and asymmetry in isokinetic knee strength. *J. Appl. Biomech.*, **29**, 61-67, 2013. 査読有 DOI: none.
- ⑪ Ishii, N., Ogasawara, R., Kobayashi, K. and Nakazato, K. Roles played by protein metabolism and myogenic progenitor cells in exercise-induced muscle hypertrophy and their relation to resistance training regimens. *J. Phys. Fitness Sports Med.*, **1**, 83-94, 2012. 査読有 DOI: none.
- ⑫ Sasaki, K., Tomioka, Y. and Ishii, N. Activation of fast-twitch fibers assessed with twitch potentiation. *Muscle & Nerve*, **46**, 218-227, 2012. 査読有 DOI: 10.1002/mus.23290.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ishii, N. Resistance-exercise induced endocrine activation and its mechanism. 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 18 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市)。
- ② 石井直方：低負荷強度レーニングのメ

- カニズムと応用. 第64回日本体育学会, 招待講演, 2013年8月29日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県・草津市).
- ③ 石井直方: スロートレーニングの効果とそのメカニズム. 第23回日本臨床スポーツ医学会学術集会. 招待講演, 2012年11月3日, 横浜プリンスホテル (神奈川県・横浜市).

[図書] (計 3 件)

- ① 石井直方: 運動に関わる筋肉のしくみ. 新星出版社, 東京, 2014, 総ページ数 191.
- ② 石井直方・岡田隆.: 骨と関節のしくみ・はたらきパーフェクト事典. ナツメ社, 東京, 2013, 総ページ数 207.
- ③ 石井直方・荒川裕志: 筋肉のしくみ・はたらきパーフェクト事典. ナツメ社, 東京, 2012, 総ページ数 272.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 直方 (ISHII NAOKATA)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号: 20151326

(2) 研究分担者

中里 浩一 (NAKAZATO KOUICHI)
日本体育大学・保健医療学部・教授
研究者番号: 00307993

(3) 研究分担者

佐々木 一茂 (SASAKI KAZUSHIGE)
日本女子大学・家政学部・講師
研究者番号: 00451849

(4) 研究分担者

越智 英輔 (OCHI EISUKE)
岡山大学・教育学研究科 (研究院)・講師
研究者番号: 90468778

(5) 連携研究者