

2018年度 公益財団法人 ミズノスポーツ振興財団 研究助成報告書
筋疲労は stretch-shortening cycle による筋力増強効果を減弱させるか？
-筋疲労状態におけるタイチンの弾性の意義-

福谷充輝¹

¹立命館大学 スポーツ健康科学部

1. 緒言

身体運動パフォーマンスは、主動作である短縮性収縮の前に反動動作として伸張性収縮を行うことで増強する。この現象は stretch-shortening cycle (SSC) とよばれており (Cavagna et al. 1968, Bosco et al. 1982)、多くのスポーツ動作や日常動作において活用されている。このように広く活用されていることもあり、SSCに関する研究は非常に多く行われているが、そのメカニズムについては依然、議論が続いている状態である。

これまで、SSCによる筋力増強効果 (SSC effect) は、腱に蓄積される弾性エネルギー (Finni et al. 2001)、および伸張反射 (神経の興奮性促通) (Dietz et al. 1979) によってもたらされると考えられていた。しかしながら、腱が存在せず、筋収縮を神経の興奮ではなくカルシウムイオン濃度で一定に制御した状態であっても明確な SSC effect が確認されているため (Fukutani et al. 2017)、上述の2つ以外の要因も SSC effect に貢献していることは明らかである。そこで、筋線維に蓄積される弾性エネルギーに着目した。伸張性収縮によって筋線維が引き伸ばされた時、筋線維の中にあるタイチンも引き伸ばされるため弾性エネルギーが蓄積する。近年、申請者は、タイチンに蓄積した弾性エネルギーが SSC effect に貢献していることを示唆する結果を得た (Fukutani et al. 2017)。もしこの仮説が正しいのであれば、筋疲労した状態、つまり、アクチンとミオシンの相互作用が阻害された状態においても、筋疲労していないフレッシュな状態と同様に、タイチンに弾性エネルギーが蓄積され、フレッシュな状態と同等の SSC effect が得られる可能性がある。タイチンは筋線維内の構造を保つ支柱のようなものであるため、筋疲労の有無でその構造や張力への貢献が変化するとは考えにくい。事実、申請者は、フレッシュな状態と筋疲労を誘導した状態では、伸張性収縮によってタイチンに蓄積する弾性エネルギーは変わらないことを示した (Fukutani and Herzog 2018a)。これらのことを踏まえると、タイチンの弾性によってもたらされる SSC effect は、筋疲労状態でも低下しない可能性がある。そこで本研究では、SSC effect の程度をフレッシュな状態と筋疲労状態で比較することで、タイチンの SSC effect への貢献の有無、さらには筋疲労状態における SSC の意義を検証する。

2. 方法

2.1 サンプル

本研究はウサギの大腰筋 (N=18) を対象として実験を行った。実験開始に先立ち、所属機関の動物実験委員会の承認 (AC16-0013) を得た。

2.2 実験装置のセットアップ

ペントバルビタールの静脈注射によってウサギを安楽死させた後に大腰筋を抽出した。抽出した大腰筋を木の棒に括り付け (図 1 左上図)、グリセロールを 50% 含んだ水溶液の中に浸し、-20 度で 2 週間から 4 週間保管することで結合組織を分解した。実験当日に、実体顕微鏡下 (SMZ1500、ニコン) で単一の筋線維を抽出し (図 1 左下図)、筋サンプルの右端を筋力計 (Model400A、Aurora Scientific) に、左端をモーター (Model308B、Aurora Scientific) に固定した (図 1 右図)。この筋サンプルを、カルシウムを含まない水溶液内に浸すことで、安静状態を維持させた。その後、サルコメアの長さをレーザー回折法にて計測し (1508P-1、JDSU)、サルコメアの長さを $2.4 \mu\text{m}$ にセットした。実験を通して筋サンプルの温度を一定に保つため、実験室内の温度を 20 度前後 (21.1 ± 0.2 度) に調節した。

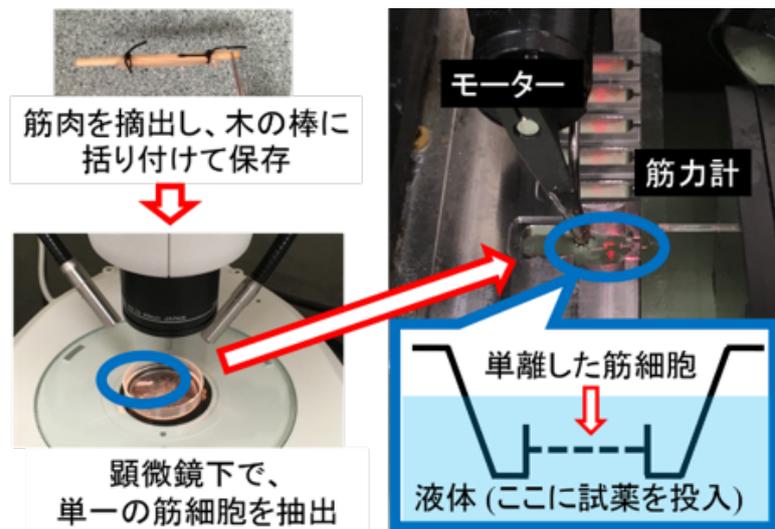


図 1. セットアップの外観

2.3 実験方法と測定

本研究では、筋疲労状態を化学的に模倣するため、2,3-Butanedione 2-monoxime (BDM) を用いた。BDM はクロスブリッジの回転を抑制することが知られており (Herrmann et al. 1992, Higuchi and Takemori 1989)、BDM を加えることによって筋力を低下させる事ができる。そこで本研究では、筋疲労状態を模倣するため、BDM10mM を加えた条件 (BDM10mM 条件) と、筋疲労のない通常の条件

(Normal 条件) を用いた。各条件において、SSC 試行と Control 試行 (pure shortening 試行) を行い、Control 試行時の筋力を基準とした、SSC 試行における相対的な発揮筋力 (%) を SSC effect として算出し、Normal 条件と BDM10mM 条件間で比較した。Normal 条件と BDM10mM 条件の実施順はランダムとした。

SSC 試行では、平均サルコメア長が $2.4 \mu\text{m}$ になるように筋線維の長さを調節し、カルシウムを含んだ水溶液を加えることで筋収縮 (等尺性収縮) を誘発した。筋力が定常状態に達した後、平均サルコメア長が $3 \mu\text{m}$ になるまで筋線維を 2 秒間伸長し (伸張性収縮)、その直後に平均サルコメア長が $2.4 \mu\text{m}$ になるように筋線維を 2 秒間短縮させた。短縮終了 15 秒後にカルシウムを含まない水溶液に切り替えることで筋収縮を終えた。pure shortening 試行では、平均サルコメア長が $3.0 \mu\text{m}$ になるように筋線維の長さを調節した後に筋収縮 (等尺性収縮) を誘発した。筋力が定常状態に達した後、平均サルコメア長が $2.4 \mu\text{m}$ になるように筋線維を 2 秒間短縮させ、短縮終了 15 秒後にカルシウムを含まない水溶液に切り替えることで筋収縮を終えた。よって、pure shortening 試行においては伸張性収縮、すなわち SSC effect を含まない。SSC 試行および pure shortening 試行の順番はランダムとし、試行間には 2 分間以上の休息を挟んだ。

2.4 統計

SSC effect の指標として、短縮性収縮中の機械的仕事を算出し、これを SSC 試行と pure shortening 試行間で比較し相対値として表すことで SSC effect を算出し、SSC effect を Normal 条件と BDM10mM 条件間で比較した。また、SSC 試行における短縮性収縮終了 15 秒後に計測した等尺性収縮筋力を、pure shortening 試行における短縮性収縮終了 15 秒後に計測した等尺性収縮筋力を比較し相対値として表すことで、タイチンの弾性エネルギーによる効果の指標である residual force enhancement (RFE) を、RFE after SSC という指標として設定し、Normal 条件と BDM10mM 条件間で比較した。これらの Normal 条件、BDM10mM 条件間の比較に加えて、短縮性収縮開始時の筋力 (force at the onset of shortening)、短縮性収縮終了時の筋力 (force at the end of shortening)、短縮性収縮終了 15 秒後の筋力 (force 15 s after the shortening) を計測し、SSC 試行および pure shortening 試行間、Normal 条件および BDM10mM 条件間で比較し、より詳細に、タイチンの SSC への貢献を検証した。統計解析は、対応のある t 検定を用いた。有意水準は $\alpha < 0.05$ とした。統計解析は SPSS バージョン 20 (SPSS、IBM) を用いて実施した。

3. 結果

SSC effect に関しては、Normal 条件が $168.7 \pm 6.2\%$ 、BDM10mM 条件が $204.9 \pm 14.2\%$ であり、筋疲労を誘発した状態において有意に大きな SSC effect が認められた ($p < 0.001$) (図 2)。

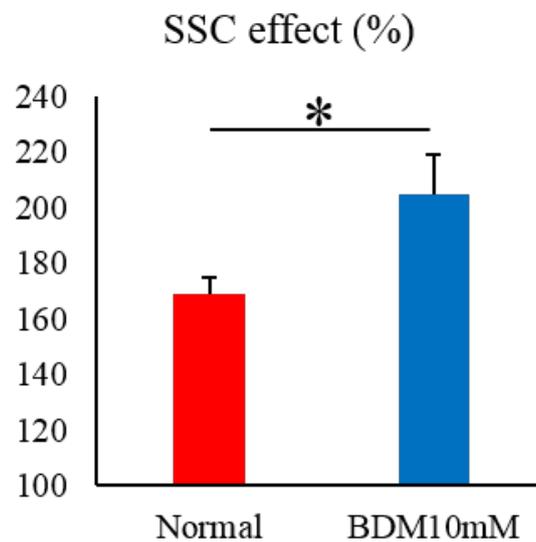


図 2. SSC effect の程度。pure shortening 試行時の短縮性収縮中の仕事量を 100%とし、SSC 試行時の短縮性収縮中の仕事量を相対値で表したものを SSC effect とした。Normal は筋疲労のない状態、BDM10mM は筋疲労がある状態の SSC effect の程度を示す。*: $p < 0.05$

RFE after SSC に関しては、Normal 条件が $99.3 \pm 5.3\%$ 、BDM10mM 条件が $101.0 \pm 3.7\%$ であり、両条件間において有意差は認められなかった ($p = 0.066$) (図 3)。

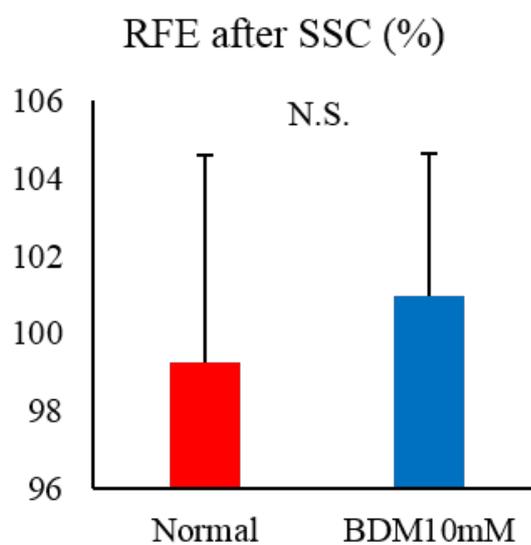


図 3. RFE after SSC の程度。pure shortening 試行時の SSC 後の等尺性収縮筋力を 100%とし、SSC 試行時の SSC 後の等尺性収縮筋力を相対値で表したものを RFE after SSC とした。Normal は筋疲労のない状態、BDM10mM は筋疲労がある状態の RFE after SSC の程度を示す。

Force at the onset of shortening に関しては、Normal 条件、BDM10mM 条件ともに、SSC 試行は pure shortening 試行時よりも有意に大きな筋力が確認された (Normal 条件、BDM10mM 条件ともに $p < 0.001$) (図 4)。

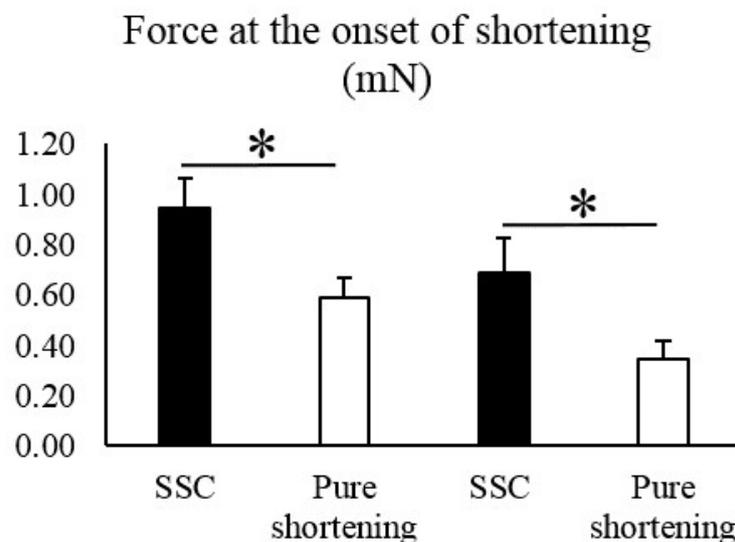


図 4. Force at the onset of shortening。SSC 試行時、および pure shortening 試行時の、短縮性収縮開始時の筋力を force at the onset of shortening とした。左側の 2 つは筋疲労のない状態 (normal 条件)、右側の 2 つは筋疲労がある状態 (BDM10mM 条件) の筋力を示す。*: $p < 0.05$

Force at the end of shortening に関しては、Normal 条件、BDM10mM 条件ともに、SSC 試行は pure shortening 試行時よりも有意に大きな筋力が確認された (Normal 条件、BDM10mM 条件ともに $p < 0.001$) (図 5)。

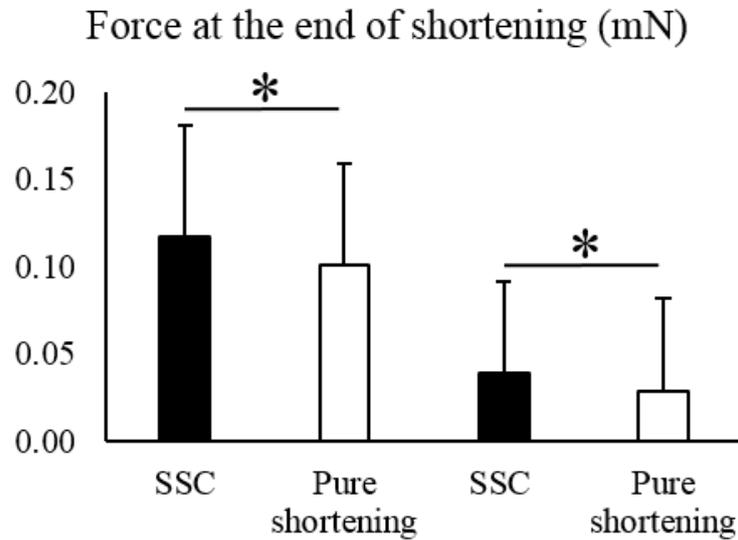


図 5. Force at the end of shortening。SSC 試行時、および pure shortening 試行時の、短縮性収縮終了時の筋力を force at the end of shortening とした。左側の 2 つは筋疲労のない状態 (normal 条件)、右側の 2 つは筋疲労がある状態 (BDM10mM 条件) の筋力を示す。*: $p < 0.05$

Force 15 s after the shortening に関しては、Normal 条件、BDM10mM 条件ともに、SSC 試行と pure shortening 試行間で有意な差は確認されなかった (Normal 条件 $p < 0.584$ 、BDM10mM 条件 $p < 0.643$) (図 6)。

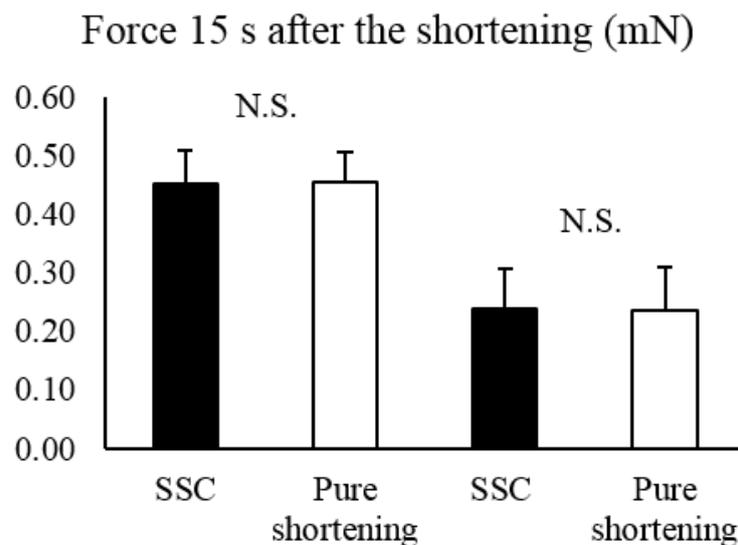


図 6. Force 15 s after the shortening. SSC 試行時、および pure shortening 試行時の、短縮性収縮終了 15 秒後における筋力を force 15 s after the shortening とした。左側の 2 つは筋疲労のない状態 (normal 条件)、右側の 2 つは筋疲労がある状態 (BDM10mM 条件) の筋力を示す。

4. 考察

本研究では、BDM というクロスブリッジの活動を阻害する試薬を用いることで筋疲労状態を模倣し、筋疲労状態と通常の状態での SSC effect の程度が異なるかどうかを確認した。仮に SSC effect がクロスブリッジによってもたらされているのであれば、クロスブリッジの活動が阻害された状態では、SSC effect は小さくなると考えられる。しかしながら、SSC effect は筋疲労状態において大きいことが確認された。この結果は、クロスブリッジ以外の要素、すなわちタイチンの弾性が SSC effect に貢献しているという仮説を支持するものである。

SSC の伸張性収縮局面において筋線維が引き伸ばされた時、筋細胞の骨格として機能しているタイチンも引き伸ばされる。近年、受動的 (筋細胞内へのカルシウムイオン放出を伴わない状態) ではなく能動的 (筋細胞内へのカルシウムイオン放出を伴う状態) に筋線維を引き伸ばしたときには、タイチンの弾性係数が一時的に増大する residual force enhancement (RFE) という現象が確認されており (Joumaa et al. 2008, Leonard et al. 2010)、タイチンにより多くの弾性エネルギーが蓄積する可能性がある。この伸張性収縮によって得られた弾性エネルギーを、その後の短縮性収縮中に利用することによって、より大きな機械的仕事、すなわち大きな筋力を獲得できる可能性がある。このタイチンの弾性エネルギーは、タイチンの構造的な要因により生じるものであり、アクチンとミオシンの相互作用のように筋疲労によって変化することはないと考えられる。事実、タイチンの弾性エネルギーに由来する RFE は、通常状態においても筋疲労状態においても変化がないということを示唆する結果が得られている (Fukutani and Herzog 2018a)。したがって、タイチンの弾性エネルギーが SSC effect に貢献しているのであれば、筋疲労においてクロスブリッジによる力生成が減弱したとしても、通常時と同程度の SSC effect が獲得出来る可能性がある。本研究では、筋疲労状態においては通常時よりも、相対的に大きな SSC effect が確認された。この結果は、筋疲労状態においてはクロスブリッジによる力が減弱することで、クロスブリッジ以外の要素、すなわちタイチンの相対的貢献が増大する状態になり、かつ、タイチン由来の SSC effect は通常状態でも筋疲労状態でも同程度生じたため、相対的な SSC effect は筋疲労状態において大きくなったことに由来すると考えられる。

一方、SSC 終了 15 秒後の筋力に関しては、Normal 条件、BDM10mM 条件ともに、SSC 試行、pure shortening 試行間で違いはみられず、タイチンの弾性エネルギーに由来していると考えられている RFE 効果は確認されなかった。通常、この結果は、本研究で採用した伸張性収縮プロトコルでは

RFE が生じていないという解釈になるが、本試行においては必ずしもそのような解釈にはならない。なぜならば、RFE 効果は、伸張性収縮の後に短縮性収縮を行うと減弱すること (Fukutani and Herzog 2018b) が明らかになっているため、伸張性収縮によって RFE は生じていたが、この RFE 効果が短縮性収縮終了後、すなわち SSC 終了 15 秒後に消失してしまった可能性も考えられるからである。事実、本研究の SSC 試行と同一の長さ変化、および伸長速度で伸張性収縮を行い、その後短縮性収縮をしない条件であれば、RFE が生じることを確認しているため (Fukutani and Herzog 2018a)、本研究の伸張性収縮後にも RFE が生じていたと考えるのが妥当である。すなわち、本研究において、RFE 効果は SSC 効果の一部を担っていると考えられるが、この効果は短縮性収縮による RFE 相殺効果が大きくなっていない短縮性収縮の前半においてのものであり、短縮性収縮が終了するときには RFE 効果の大部分が消失していたと考えられる。

本研究の限界としては、あくまで力学応答の違いからタイチンの SSC effect への貢献を推測したに過ぎない点が挙げられる。本研究で観測された力学応答は、クロスブリッジによって説明することは難しい一方で、タイチンの弾性エネルギーを加味すればうまく説明することが出来るため、現時点での作業仮説を立てる上では意義深いものだと考えられる。しかしながら、SSC 中におけるタイチンのふるまいを直接的に観察しているわけではない。申請者の知る限り、世界的にもみてもタイチンという分子の挙動を、SSC 中に観察した研究は存在しないため、この点を解決することが当該分野のブレイクスルーを生むための鍵と考えられる。

5. 結論

SSC effect は、BDM によってクロスブリッジの活動を抑制した状態、すなわち筋疲労態においても低下することではなく、相対的にみると通常状態よりも大きな SSC effect が確認された。この結果を踏まえると、少なくとも SSC effect の一部は、クロスブリッジ以外の要因によって生じていると考えられる。すなわち、SSC effect の一部は、タイチンによってもたらされている可能性が示唆された。今後、この仮説をより強固なものとするためには、SSC 中におけるタイチンの動態を可視化することで明らかにする必要がある。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたって、公益財団法人ミズノスポーツ振興財団の皆様には多大なご支援を頂きました。ここに感謝申し上げます。また、カルガリー大学の Walter Herzog 教授には、実験実施やデータ解釈に関し、多くのサポートやアドバイスをいただきました。ここに感謝申し上げます。

7. 参考文献

1. Bosco C, Ito A, Komi PV, Luhtanen P, Rahkila P, Rusko H, Viitasalo JT. Neuromuscular function and mechanical efficiency of human leg extensor muscles during jumping exercises. *Acta Physiol Scand.* 114(4):543-50. 1982.
2. Cavagna GA, Dusman B, Margaria R. Positive work done by a previously stretched muscle. *J Appl Physiol.* 24(1):21-32. 1968.
3. Dietz V, Schmidtbleicher D, Noth J. Neuronal mechanisms of human locomotion. *J Neurophysiol.* 42(5):1212-22. 1979.
4. Finni T, Ikegawa S, Komi PV. Concentric force enhancement during human movement. *Acta Physiol Scand.* 173(4):369-77. 2001.
5. Fukutani A, Herzog W. Residual Force Enhancement Is Preserved for Conditions of Reduced Contractile Force. *Med Sci Sports Exerc.* 50(6):1186-1191. doi: 10.1249/MSS.0000000000001563. 2018a.
6. Fukutani A, Herzog W. Residual Force Enhancement Is Attenuated in a Shortening Magnitude-dependent Manner. *Med Sci Sports Exerc.* 50(10):2007-2014. doi: 10.1249/MSS.0000000000001670. 2018b.
7. Fukutani A, Joumaa V, Herzog W. Influence of residual force enhancement and elongation of attached cross-bridges on stretch-shortening cycle in skinned muscle fibers. *Physiol Rep.* 5(22). pii: e13477. doi: 10.14814/phy2.13477. 2017.
8. Herrmann C, Wray J, Travers F, Barman T. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry.* 31(48):12227-12232. 1992.
9. Higuchi H, Takemori S. Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *J Biochem.* 105(4):638-643. 1989.
10. Joumaa V, Leonard TR, Herzog W. Residual force enhancement in myofibrils and sarcomeres. *Proc Biol Sci.* 275(1641):1411-9. doi: 10.1098/rspb.2008.0142. 2008.
11. Leonard TR1, DuVall M, Herzog W. Force enhancement following stretch in a single sarcomere. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299(6):C1398-401. doi: 10.1152/ajpcell.00222.2010. 2010.