

原著

運動後の糖質・牛乳混合物の摂取がマウス骨格筋および肝臓におけるグリコーゲン回復に及ぼす影響

稲井 真^{*1}、西村 脩平^{*1}、浦島 章吾^{*1}、野中 雄大^{*1}、木村 典代^{*2}、寺田 新^{*1}

^{*1} 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

^{*2} 高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科

本研究の目的は、糖質と牛乳の混合物摂取がインスリン分泌さらには運動後のグリコーゲン回復に及ぼす影響について検討することであった。実験1では、安静状態のC57BL/6Jマウスに対し、糖質（グルコース 2 mg/g BW、CHO群）、牛乳（40 μl/g BW、Milk群）もしくは糖質・牛乳混合物（CHO-Milk群）を経口投与し、血漿インスリン、グルコースおよび消化管ホルモンGlucose-dependent insulintropic polypeptide（GIP）の濃度変化を検討した。その結果、他の2群に比べてCHO-Milk群で血漿インスリン濃度が有意に高い値を示し、一方、血漿グルコース濃度はCHO群に比べて有意に低い値を示した。また、インスリン分泌促進効果をもつGIPの濃度は、CHO-Milk群で顕著に高い値を示し、さらに血漿GIP濃度とインスリン濃度との間には正の相関関係が認められた。実験2では、30分間の一過性の走行運動を行ったマウスに対し、実験1と同様の糖質もしくは糖質・牛乳混合物を投与し、グリコーゲン回復への影響を検討した。投与60分後における前脛骨筋および肝臓のグリコーゲン濃度は、CHO群に比べてCHO-Milk群で有意に高い値を示した。以上の結果から、糖質と牛乳の混合物の摂取は、消化管ホルモンGIPを介してインスリン分泌を促進し、運動後のグリコーゲンの回復を早める可能性が示唆された。

キーワード：牛乳 グリコーゲン GIP インスリン マウス

I 緒言

運動時には、エネルギー源として主に糖質と脂質が利用される。生体内において糖質は、主に骨格筋および肝臓にグリコーゲンとして貯蔵され、脂質の量に比べてその量に限りがある。したがって、グリコーゲンが主要なエネルギー源として利用される中・高強度の運動を長時間継続した場合、グリコーゲンが減少・枯渇することが疲労やパフォーマンス低下の原因の一つとなる¹⁾。また、実際のスポーツの現場では、一日に複数回トレーニングを行うことや、試合が繰り返されることが多い。このような場面において、徐々にグリコーゲンが減少することで、トレーニングの質やパフォーマンスが低下すると考えられる。したがって、運動によって低下したグリコーゲンを次のトレーニングや試合に備えて、いかに早く元の状態に回復させられるかがトレーニングの質やパフォーマンスの低下を予防するうえで重要となる。

運動中に減少した筋および肝臓グリコーゲンを速やかに回復させるための効果的な栄養補給法に関してこれ

まで数多くの研究が行われてきており、運動終了後できるだけ早い時間帯に体重1 kgあたり1 ~ 1.2 gの糖質を摂取することが推奨されている^{2), 3)}。また、糖質だけではなく、たんぱく質も同時に摂取することで、糖質を単独で摂取した場合に比べて、グリコーゲン合成を活性化する作用を持つインスリンの分泌量が顕著に増加し、運動後の筋グリコーゲン回復が促進されることが報告されている⁴⁾。糖質とたんぱく質を同時に摂取することによるこのようなインスリン分泌増強効果には、Glucose-dependent insulintropic polypeptide（GIP）やGlucagon-like peptide-1（GLP-1）と呼ばれる消化管ホルモンが関与していると考えられている。GIPやGLP-1は、消化管に栄養素が到達した際に、それぞれ小腸のK細胞およびL細胞から分泌されるホルモンであり、高血糖時において膵臓からのインスリン分泌を増強する作用を持つ⁵⁾。また、GIPやGLP-1は、脂質を摂取した際にも強力に分泌が促進されることが報告されている⁶⁾。最近、我々は、糖質と脂質の混合物を摂取することで、糖質を単独で摂取した場合に比べて、GIPおよびインスリン分泌が促進され、さ

らには、運動後の筋グリコーゲン回復が早まることを報告している⁷⁾。以上の先行研究の結果から、糖質とともにたんぱく質さらには脂質を含む混合物を摂取することができれば、消化管ホルモンおよびインスリン分泌を増強することで、運動後のグリコーゲン回復をさらに促進できる可能性が考えられる。

そのような、糖質とたんぱく質および脂質を同時に摂取できる食品として、牛乳が挙げられる。牛乳は、グリコーゲンの直接の材料となる糖質の含有量は必ずしも多くないものの、消化管ホルモンの分泌を刺激するたんぱく質と脂質をバランスよく含んだ食品である。したがって、糖質に加え牛乳を摂取することで、消化管ホルモンおよびインスリンの分泌に対する相加的・相乗的効果が得られ、運動後のグリコーゲン回復がさらに促進される可能性が高いと考えられる。そこで本研究では、糖質と牛乳の混合物の摂取が消化管ホルモンおよびインスリン分泌動態、さらには運動後の筋および肝グリコーゲン回復に及ぼす影響について検討することを目的とした。

II 方法

1. 実験 1

1) 実験動物および飼育条件

実験1では、安静状態のマウスを対象として、糖質と牛乳の混合溶液の摂取が、血漿インスリン、グルコースおよびインスリン分泌促進効果を持つ消化管ホルモンGIPの濃度に及ぼす影響について検討することを目的とした。実験動物として8週齢の雄性C57BL/6Jマウス30匹を日本クレア株式会社より購入した。マウスは室温 23 ± 2 ℃、7時～19時を暗期に設定した飼育室において、専用ケージで5匹ずつ飼育した。新たな飼育環境に慣れさせるために、実験までに1週間の予備飼育期間を設けた。飼育期間には、飼料として市販の固形飼料(CE-2、日本クレア株式会社)と飲料として水道水を自由摂取させた。なお、本研究における動物実験はすべて、東京大学大学院総合文化研究科・教養学部実験動物委員会の承認を得て行われた(承認番号26-1)。

2) 糖質溶液、牛乳または糖質・牛乳混合溶液の投与

実験前日の19時に固形飼料を取り除き、一晚(17時間)絶食を行った。実験当日にマウスを、1)糖質溶液を投与する群(CHO群:n=10)、2)牛乳を投与する群(Milk群:n=10)、もしくは3)糖質・牛乳の混合溶液を投与する群(CHO-Milk群:n=10)の3群に無作為に分けた。実験当日の12時からそれぞれの群にゾンデ針(株式会社夏目製作所)とシリンジ(テルモ株式会社)を用いて溶液を経口投与した。CHO群には、グルコースを50 mg/mL濃度となるよう

に超純水で溶解した糖質溶液を体重1 g当たり40 μ Lずつ(グルコースを体重1 g当たり2.0 mg)投与した。Milk群には、牛乳(100 mL中にたんぱく質3.3 g、脂質4.7 gおよび炭水化物5.0 gを含む、75 kcal/100 ml:協同乳業株式会社)を体重1 g当たり40 μ Lずつ投与した。また、CHO-Milk群には、グルコース濃度が50 mg/mLとなるように牛乳で溶解した糖質・牛乳混合溶液を体重1 g当たり40 μ Lずつを投与した。

3) サンプルの採取および保存

投与液の投与前、投与10、30および60分目にヘパリン処理したキャピラリー採血管(Thermo Fisher Scientific K. K.)を用いて尾静脈から採血を行った。採取した血液を13,000 rpmで10分間遠心分離することで血漿を得た。すべてのサンプルは分析まで -80 ℃の超低温フリーザーにて保存した。

4) 分析方法

血漿グルコース濃度は、グルコースCII-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いて測定した。血漿インスリンおよびGIP濃度は、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kitを用いて測定した(Insulin: Mouse Insulin ELISA、Merckodia Inc、GIP: Rat/Mouse GIP (Total) ELISA、EMD Millipore)。各分析項目について経時変化のグラフを作成し、投与前から投与60分目までにおける血液(血漿)中でのそれぞれの増加量の指標として、曲線下面積(Area under the curve: AUC)を算出した。

2. 実験 2

1) 実験動物および飼育条件

実験2では、糖質と牛乳の混合溶液の摂取が、運動後の筋および肝グリコーゲン回復に及ぼす影響について検討することを目的とした。実験動物として8週齢の雄性C57BL/6Jマウス24匹を日本クレア株式会社より購入した。飼育条件は実験1と同様とした。

2) 実験プロトコル

本実験において30分間の走行運動を実施できるように、実験日の6日前より5日間、トレッドミル(MK-680、室町機械株式会社)を用いた走行運動を全てのマウスに対して行わせた。走行時間は、1日目および2日目は5分間、3日目は10分間、4日目は15分間、5日目は20分間とし、15 m/minの速度で走行運動を行わせた。なお、この5日間の予備走行運動の影響が実験当日まで残らないように、実験前日は走行運動を行わせた。

実験前日の19時に固形飼料を取り除き、一晚(17時間)絶食を行った。実験当日にマウスを1)運動直後に糖質溶液を投与する群(CHO群:n=7)、2)同

じく運動直後に糖質・牛乳混合溶液を投与する群 (CHO-Milk群: n = 7)、および3) 運動直後に解剖を行う群 (Post群: n = 6) の3群に無作為に分けた。CHO群、CHO-Milk群およびPost群のマウスに対しては、15 m/minの速度で30分間の走行運動を行わせた。CHO群およびCHO-Milk群には、それぞれ実験1と同様の投与液を運動直後(溶液投与前の採血を行った後)に速やかに経口投与した。また、参考値として運動前の筋および肝グリコーゲン濃度を測定するために、運動開始直前に解剖する群 (Pre群: n = 4) も設けた。

3) サンプルの採取および保存

Pre群については運動開始直前に、Post群については30分間の走行運動終了直後にそれぞれ解剖を行った。CHO群およびCHO-Milk群については溶液の投与前および投与10、30、60分目に尾静脈から採血を行い、投与後60分目の採血終了後に速やかに解剖を行った。解剖は、イソフルランによる完全麻酔下で行った。尾部圧迫による反射が見られないことを確認した後、速やかに前脛骨筋を摘出し、直ちに液体窒素で凍結した。骨格筋は、右脚はグリコーゲン分析用とし、左脚はインスリンによる細胞内情報伝達経路の活性化状態の分析用とした。筋サンプルの摘出後に、肝臓を摘出し、同様に液体窒素で凍結した。骨格筋および肝臓サンプルは分析まで-80℃の超低温フリーザーにて保存した。

4) 分析方法

筋および肝グリコーゲン濃度は、Lowry & Passonneauの方法に基づいて分析した⁸⁾。血漿インスリンおよびグルコース濃度の分析は、実験1と同様の手法を用いて行った。

インスリンによって活性化される細胞内情報伝達分子の一つであるAktの骨格筋における活性化状態(リン酸化状態)をウエスタンブロットリング法により測定した。まず、骨格筋サンプル(前脛骨筋)を氷上にて冷却したガラス製のホモジナイザーに入れ、十分に冷却したRadioimmunoprecipitation Assay (RIPA) lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl、0.25% deoxycholic acid、1% NP-40、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、Merck Millipore社)とともにホモジナイズした。RIPA lysis bufferには、Protease inhibitor (SIGMA-Aldrich社)とPhosphatase inhibitor (PhosSTOP) (Roche Diagnostics社)をそれぞれ10 μL/ml、1錠/10 mLの割合で添加した。骨格筋ホモジネートは、凍結・溶解を2回繰り返すことで細胞内小器官を破碎し、さらにマイクロチューブローターで回転させながら4℃で1時間インキュベートすることでタンパク質を可溶化し

た。その後、700×gで5分間遠心し、上清を得た。回収した上清サンプルは、BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific K. K.)を用いてタンパク質濃度(μg/μL)を測定した。タンパク質濃度が、2.0 μg/μLとなるようにRIPA lysis bufferとSample buffer (0.25 mol/L Tris-HCl、0.02% (w/v)、Bromophenol blue (BPB)、8% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)、40% (w/v) Glycerol、20% (v/v) 2-Mercaptoethanol、pH 6.8、和光純薬工業社)を混合し、95℃で5分間加熱したものを電気泳動用のサンプルとした。サンプルは、Laemmliの方法⁹⁾に基づき、電気泳動装置(ミニプロテイン Tetra セル、Bio-Rad社)を用いて、SDS-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)法(10% Resolving gelおよび4% Stacking gel)により分離した。1レーンあたり50 μgのタンパク質サンプルをアプライし、サンプルがゲルの下端に達するまで100 Vで通電した。

電気泳動終了後、速やかにゲルを取り出し、ウエット式ブロットリング装置(Mini Trans-Blot Cell、Bio-Rad社)を用いて、200 mA/Tankで90分間通電し、Poly Vinylidene DiFluoride (PVDF) メンブレン(Merck Millipore社)にタンパク質を転写した。転写したメンブレンは10% (w/w) スキムミルク/Tris buffered saline、0.1% Tween20 (TBS-T)を用いてブロッッキング処理を室温で1時間行った。その後、5% bovine serum albumin (BSA) / TBS-T溶液で抗体(anti-Akt、anti-Phospho-Akt (Ser473)、Cell Signaling Technology)を1,000倍で希釈した溶液を用い、4℃で一晩シェーカー上で揺らしながら一次抗体反応を行った。翌日、メンブレンをTBS-Tで洗浄し、二次抗体反応(HRP-conjugated anti-rabbit IgG、Jackson Immuno Research社、5,000倍希釈)を室温で1時間行った。TBS-TおよびTBSで十分に洗浄した後、化学発光検出試薬(ECL reagent、GE Healthcare Life Sciences社)で1分間反応させた。反応終了後、抗原検出装置(Chemi Doc、Bio-Rad社)を用いて、抗原の検出を行った。検出されたバンドは定量解析ソフトウェア(Image Studio Lite Ver.33.1、LI-COR社)を用いて定量した。

3. 統計処理

本研究のデータはすべて平均値±標準誤差で示した。群間の比較には、一元配置の分散分析もしくはStudentのt検定を用いた。一元配置の分散分析の結果、主効果が認められた場合、Fisherの最小有意差法を用いて多重比較検定を行った。各項目間の相関関係は、Pearsonの相関分析を用いて検討した。いずれの検定もExcel統計2015(株式会社 社会情報サービス社)を用いて行い、危険率5%未満をもって有意とした。

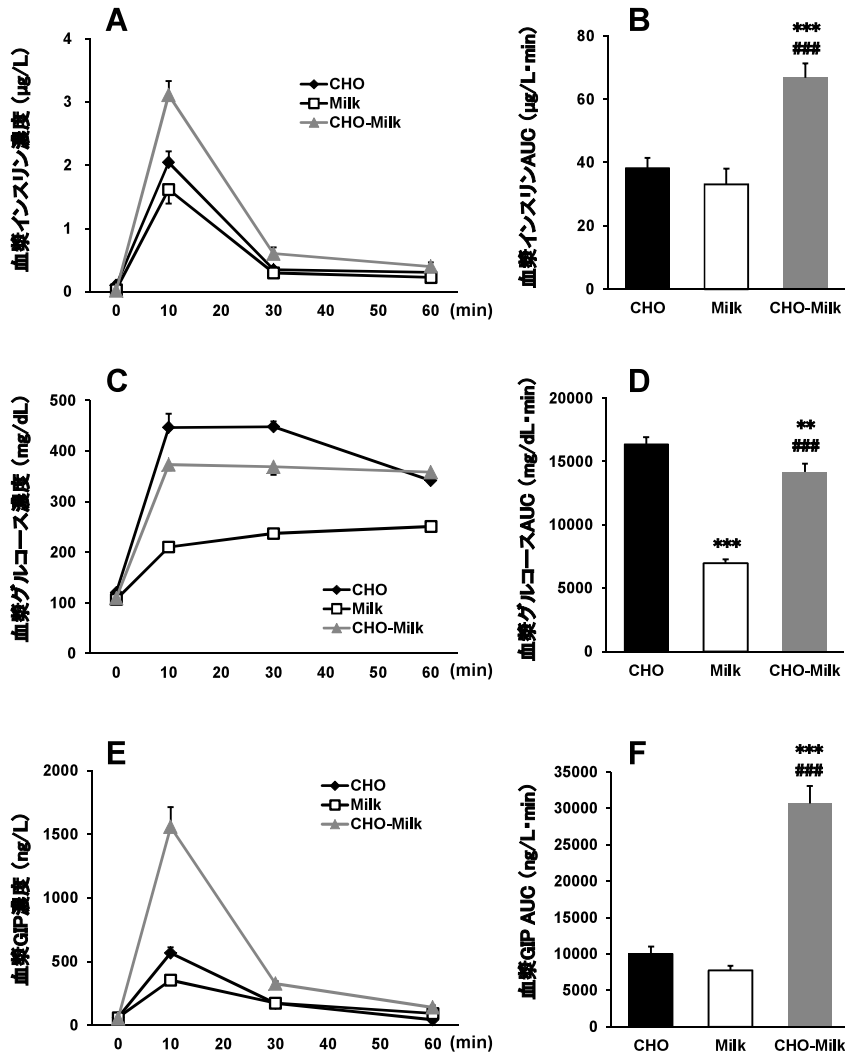


図1 安静状態のマウスにおける糖質・牛乳混合物の摂取が血漿インスリン (A、B)、グルコース (C、D) およびGIP (E、F) 濃度に及ぼす影響
 CHO: 糖質摂取群、Milk: 牛乳摂取群、CHO-Milk: 糖質・牛乳混合物摂取群
 数値は全て平均±標準誤差で表した。*** p<0.001、** p<0.01 v.s. CHO 群
 ### p<0.001 v.s. Milk 群、AUC: 曲線下面積

Ⅲ 結果

1. 実験 1

1) 血漿インスリン、グルコースおよびGIP濃度

溶液投与後の血漿インスリン、グルコース、およびGIP濃度の変化とそれらのAUC値を図1に示した。CHO-Milk群では、溶液投与10分目において血漿インスリン濃度が、CHO群およびMilk群に比べて高い値を示し(図1-A)、投与後0-60分目までのAUC値も、他の2群に比べてCHO-Milk群で有意に高い値であった(p<0.001、図1-B)。CHO群とMilk群における血漿インスリン濃度のAUC値には有意な差は認められなかった。

一方、血漿グルコース濃度は、Milk群で最も低い値を示し(図1-C)、投与60分目までのAUC値も糖質を摂取した他の2群に比べて有意に低い値を示していた(p<0.001、図1-D)。また、牛乳に加えて糖質を同時に摂取したCHO-Milk群では、CHO群よりも血漿グルコース濃度が低く推移し、投与60分目までのAUC値もCHO群に比べてCHO-Milk群で有意に低い値であった(p=0.006、図1-D)。

血漿GIP濃度は、溶液投与10分目の時点において、CHO群およびMilk群に比べてCHO-Milk群で顕著に高い値を示し(図1-E)、CHO-Milk群のAUC値は、他の2群に比べて有意に高い値であった(p<0.001、図1-F)。CHO群とMilk群における血漿GIP濃度の

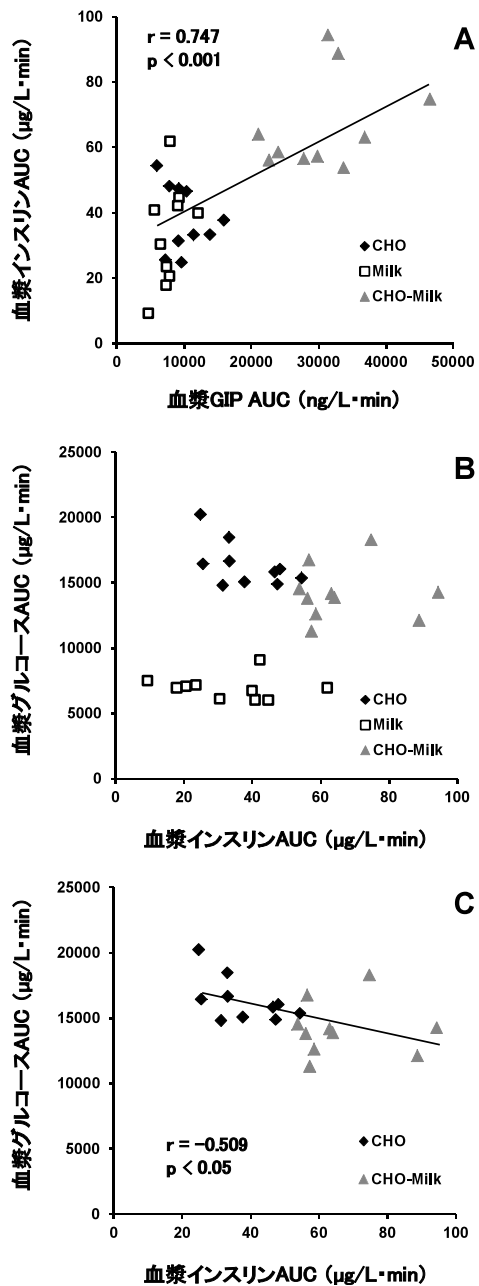


図2 血漿GIPとインスリン濃度 (A) および血漿インスリンとグルコース濃度 (B、C) の関係
 CHO: 糖質摂取群、Milk: 牛乳摂取群、CHO-Milk: 糖質・牛乳混合物摂取群
 AUC: 曲線下面積

AUC値には有意な差は認められなかった。

2) 各測定項目間の相関関係

実験1における各測定項目間の相関関係の結果を図2に示した。血漿GIPのAUC値と血漿インスリンAUC値との間に有意な正の相関関係が認められた ($r = 0.746$, $p < 0.001$) (図2-A)。3群すべてのデータ

を含めた場合、血漿インスリンAUC値と血漿グルコースAUC値との間に有意な相関関係は認められなかった (図2-B)。しかしながら、Milk群の投与液には糖質 (グルコース) が添加されていなかったため、グルコースを投与した2群 (CHO群およびCHO-Milk群) における血漿インスリンAUC値と血漿グルコースAUC値との間の関係を見たところ、両者の間に有意な負の相関関係が認められた ($r = -0.509$, $p = 0.022$) (図2-C)。

2. 実験2

1) 筋および肝グリコーゲン濃度

運動開始直前の筋グリコーゲン濃度は、1g湿重量あたり $36.0 \pm 1.1 \mu\text{mol}$ であった。CHO-Milk群の投与後60分目における前脛骨筋のグリコーゲン濃度は、運動直後に解剖を行ったPost群と比べて有意に高い値を示し ($p = 0.005$)、さらにCHO群と比べても有意に高い値を示した ($p = 0.026$) (図3-A)。また、CHO群とPost群の前脛骨筋のグリコーゲン濃度には、有意な差は認められなかった。

運動開始直前の肝グリコーゲン濃度は、1g湿重量あたり $22.6 \pm 1.1 \mu\text{mol}$ であった。CHO群およびCHO-Milk群における投与60分後の肝グリコーゲン濃度は、Post群に比べて有意に高い値であった ($p < 0.001$)。さらに、CHO-Milk群の肝グリコーゲン濃度は、CHO群に比べても有意に高い値を示していた ($p = 0.022$) (図3-B)。

2) 血漿インスリンおよびグルコース濃度

30分間の走行運動直後から投与60分目までの血漿インスリンおよびグルコース濃度の変化とそれらのAUC値を図4に示した。実験1の結果と同様に、CHO-Milk群では、投与10分目に血漿インスリン濃度が大きく上昇し (図4-A)、投与60分目までのAUC値もCHO群に比べてCHO-Milk群で有意に高い値であった ($p < 0.001$, 図4-B)。

血漿グルコース濃度も、CHO群に比べてCHO-Milk群で低値を示し (図4-C)、投与60分目までのAUC値も、CHO-Milk群でCHO群に比べて有意に低い値であった ($p < 0.001$, 図4-D)。

3) 血漿インスリン濃度とグリコーゲン濃度との関係

血漿インスリンAUC値と筋グリコーゲン濃度との間 ($r = 0.542$, $p = 0.014$) (図5-A)、同じく血漿インスリンAUC値と肝グリコーゲン濃度との間 ($r = 0.468$, $p = 0.038$) (図5-B) に有意な正の相関関係が認められた。

4) インスリンシグナル伝達分子の活性化状態

Aktは、インスリンの刺激を受けると473番目のア

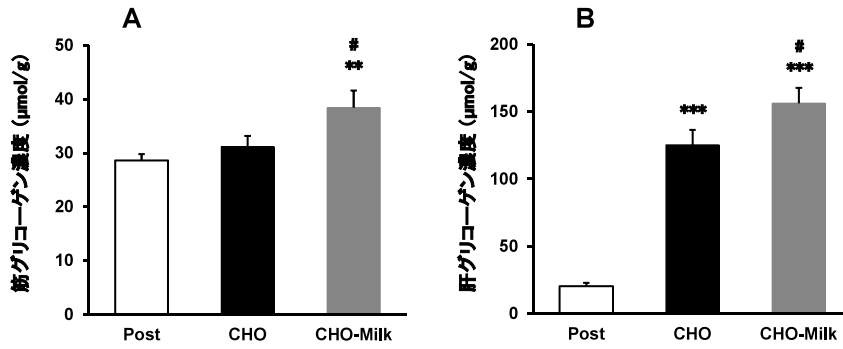


図3 運動後の糖質・牛乳混合物の摂取がマウス骨格筋 (A) および肝臓 (B) におけるグリコーゲン濃度に及ぼす影響

Post: 運動直後解剖群、CHO: 糖質摂取群、CHO-Milk: 糖質・牛乳混合物摂取群
 数値は全て平均±標準誤差で表した。*** p<0.001、** p<0.01 v.s. Post 群
 # p<0.05 v.s. CHO 群

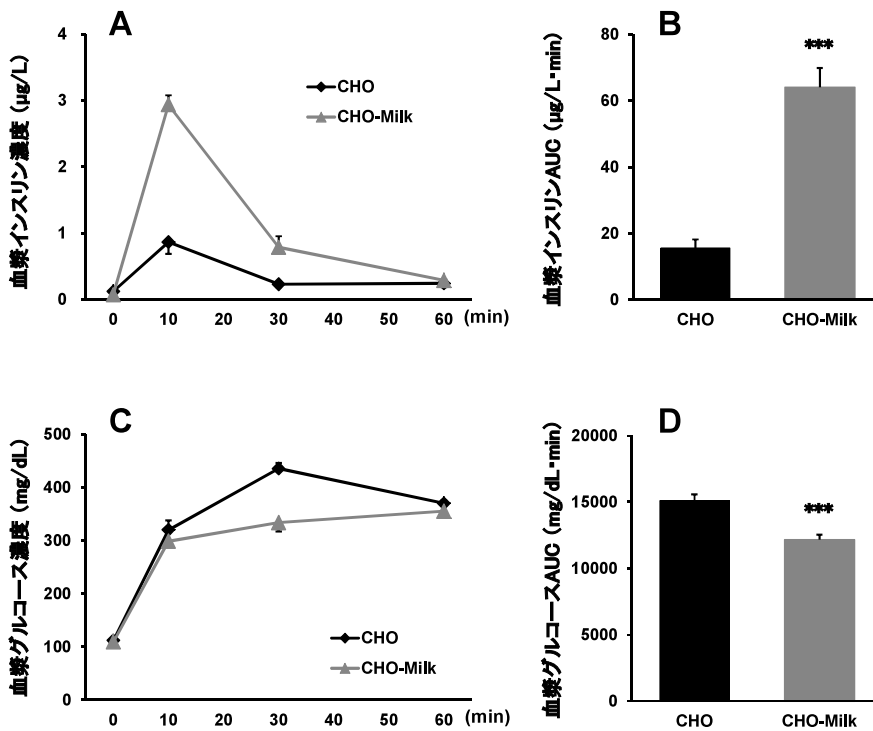


図4 運動後の糖質・牛乳混合物の摂取が血漿インスリン (A、B) およびグルコース (C、D) 濃度に及ぼす影響

CHO: 糖質摂取群、CHO-Milk: 糖質・牛乳混合物摂取群
 数値は全て平均±標準誤差で表した。*** p<0.001 v.s. CHO 群

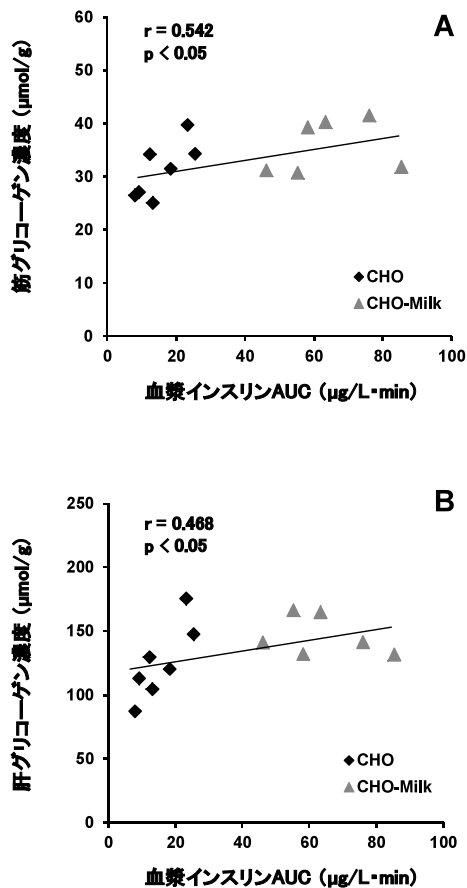


図5 血漿インスリン濃度と回復後の筋 (A) および肝グリコーゲン (B) 濃度の関係

CHO: 糖質摂取群、CHO-Milk: 糖質・牛乳混合物摂取群
AUC: 曲線下面積

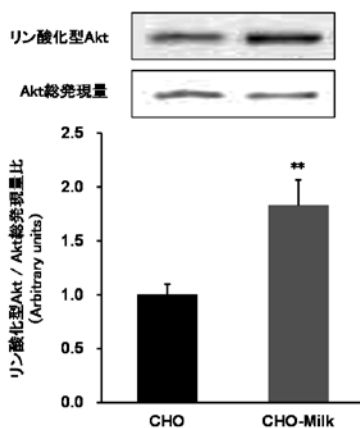


図6 運動後の糖質・牛乳混合物摂取がマウス骨格筋のAkt活性化状態に及ぼす影響

CHO: 糖質摂取群、CHO-Milk: 糖質・牛乳混合物摂取群
数値は全て平均±標準誤差で表した。** p<0.01 v.s. CHO 群

ミノ酸であるセリン (Ser473) が、リン酸化されることで活性化する¹⁰⁾。活性化したAktは、糖輸送体 GLUT-4 のトランスロケーションの増加およびグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 (GSK 3) のリン酸化・グリコーゲン合成酵素 (GS) の脱リン酸化を介して、筋グリコーゲンの合成を促進することが知られている¹⁰⁾。そこで本実験では、投与から60分目 (解剖時点) におけるAktの総発現量とリン酸化量を測定し、総発現量に占めるリン酸化型の比 (リン酸化型Akt / Akt総発現量比) をAkt活性化状態の指標として評価した。その結果、前脛骨筋におけるリン酸化型Akt / Akt総発現量比は、CHO-Milk群でCHO群に比べて有意に高い値を示した (p = 0.008、図6)。

IV 考察

本研究の主な知見は、糖質を単独で摂取した場合に比べて、糖質と牛乳の混合物を摂取することで、1) 消化管ホルモンGIPさらにはインスリンの分泌が促進され、血糖値が低下しやすくなること、および2) 運動後の筋および肝グリコーゲン回復が促進される、という2点である。

インスリンは、血糖取り込みの促進やグリコーゲン合成酵素 (GS) の活性化などの作用を持つ。したがって、運動後のグリコーゲン回復を促進するためには、インスリン分泌を高めることが重要となる。実験1において、CHO-Milk群では、投与10分目の時点において血漿インスリン濃度の顕著な増加が認められ、投与0-60分目までのAUC値も他の2群に比べて有意に高い値を示していた (図1-A, B)。また、CHO-Milk群における血漿グルコース濃度は、同量のグルコースを投与したCHO群に比べて低値を示し、AUC値もCHO-Milk群で有意に低い値であった (図1-C, D)。さらに、血漿インスリンのAUC値と血漿グルコースのAUC値との間に負の相関関係が認められた (図2-C)。これらの結果から、糖質・牛乳混合溶液を摂取することでインスリン分泌が高まり、骨格筋や肝臓などの末梢のインスリン標的組織において血糖が取り込まれ、利用されていたと考えられる。

膵臓からのインスリン分泌は、血糖値の影響だけでなく、GIPなどの消化管ホルモンの影響を強く受けることが知られている⁵⁾。GIPは小腸のK細胞から分泌される消化管ホルモンであり、それ単独ではインスリン分泌に大きな影響を及ぼさないものの、食事などを摂取した後の早い時間帯における血糖上昇時にインスリン分泌を増強する効果を持つ⁵⁾。実験1において、CHO-Milk群では投与10分目の時点において血漿GIP濃度の顕著な増加が認められ、投与0-60分目までのAUC値も同様に有意に高い値を示していた (図1-E, F)。さらに血漿GIPのAUC値と血漿インスリ

ンのAUC値との間に高い正の相関関係が認められた(図2-A)。したがって、CHO-Milk群において認められたインスリン分泌には、消化管ホルモンGIPの分泌亢進が大きく寄与していた可能性が高いと考えられる。

実験1の結果を踏まえ、実験2では、このようなインスリン分泌促進効果を持つ糖質・牛乳混合溶液を一過性の運動後に投与することでグリコーゲン回復が促進されるかについて検討した。その結果、走行運動終了直後に糖質・牛乳混合溶液を投与したCHO-Milk群では、投与60分後の筋および肝グリコーゲン濃度が、運動直後に解剖を行ったPost群だけではなく、糖質のみを摂取したCHO群に比べても有意に高い値を示していた(図3)。特に、CHO-Milk群では、1時間という短い回復時間にもかかわらず、筋グリコーゲン濃度が運動開始前の値とほぼ同程度にまで回復していた。この結果は、糖質に加えて牛乳を同時に摂取することが、運動後のグリコーゲン回復を高めるうえで効果的である可能性を示唆するものである。

実験1と同様に実験2においても、CHO-Milk群において血漿インスリン濃度が高値を示し(図4)、さらに血漿インスリンAUC値と筋および肝グリコーゲン濃度との間にも有意な正の相関関係が認められた(図5)。以上の結果から、CHO-Milk群において認められた筋および肝グリコーゲン回復の促進効果は、インスリン分泌の亢進が関与しているという可能性が支持される。

さらに、実験2では、糖質・牛乳の混合物摂取によって血中に増加したインスリンが骨格筋などにおいて実際に作用しているのか確認するために、インスリンによる情報伝達経路において重要な役割を果たしているAktの活性化状態を評価した。解剖開始から肝臓の摘出までに時間がかかったため、肝臓におけるAktの活性化状態の分析は行えなかったものの、前脛骨筋では、CHO群に比べてCHO-Milk群でリン酸化型Akt/Akt総発現量比が有意に高い値を示していた(図6)。以上の結果からも、糖質と牛乳の混合物摂取により血液中に多く分泌されたインスリンが、実際に骨格筋などにおいて作用し、グリコーゲン回復の促進に寄与していた可能性が強く支持される。

本研究課題ではCHO-Milk群の投与液として、CHO群と同量の糖質に牛乳を加えた糖質・牛乳混合溶液を用いた。牛乳にはたんぱく質および脂質が含まれるが、それぞれの代謝産物であるアミノ酸やグリセロールは、糖新生によってグルコースに変換されることが知られている。したがって、グリコーゲン合成に利用できる基質量はCHO群に比べてCHO-Milk群において牛乳の分だけ多かった可能性も考えられる。しかしながら、糖質摂取後のような血中インスリン濃度が高まった状態において、たんぱく質や脂質が糖新生に

よってグルコースに変換される可能性は低いとの報告がなされている^{11),12)}。さらに、Zawadzki et al.⁴⁾およびvan Loon et al.¹³⁾は、糖質とたんぱく質の同時摂取による筋グリコーゲン回復の促進効果を報告しているが、その際にたんぱく質から糖新生によって生成したグルコースが筋グリコーゲン回復に利用されている可能性は低いとしている。また、牛乳には5%程度の糖質が含まれるが、その約99.9%が乳糖である。乳糖はグルコースに分解・変換されるまでに時間がかかることが知られている。以上の先行研究の知見から、本研究においても、牛乳に含まれる乳糖やたんぱく質および脂質などから糖新生によって生じたグルコースが、運動後の早い時間帯における骨格筋および肝臓のグリコーゲン回復に利用された可能性は低いと考えられる。しかしながら、本研究の実験1においては、Milk群でも、糖質を摂取した場合に比べて緩やかではあるものの、血糖値の上昇が認められた(図1-C、D)。したがって、CHO-Milk群でも牛乳に含まれる乳糖やたんぱく質および脂質などから糖新生が生じていた可能性は否定できず、今後、牛乳に含まれる乳糖やたんぱく質および脂質がグリコーゲン回復に及ぼす影響についても検討する必要があると思われる。

本研究のCHO-Milk群では、単純に糖質と牛乳とを混合したものを摂取させていた。したがって、CHO-Milk群のエネルギー摂取量は、CHO群に比べて牛乳の分だけ多くなっており、今後の研究においてエネルギー摂取量を合わせた場合の効果を比較検討する必要があると考えられる。ただし、ヒトを対象とした研究では、体重1kgあたり1.2gの糖質を摂取することで、運動後の筋グリコーゲンの回復速度が最大となること、さらには、糖質摂取量をそれ以上増やしても、筋グリコーゲンの回復速度は高まらないことが報告されており^{3),13)}、本研究でも、マウスを対象としているものの、体重1kg(1g)あたり2g(2mg)という多量の糖質を投与していた。したがって、Post群との間に筋グリコーゲン濃度の有意な差は認められなかったものの(図3-A)、エネルギー摂取量をCHO-Milk群と同程度にまで高めるためにCHO群の糖質摂取量をさらに増やしたとしても、回復1時間の時点における筋および肝グリコーゲン量をこれ以上増加させること、すなわちグリコーゲン回復速度をはやめることは難しいと考えられる。

V 結論

糖質と牛乳の混合物の摂取は、消化管ホルモンGIPおよびインスリンの分泌を高め、運動後の筋および肝グリコーゲンの回復を促進する可能性が示唆された。

謝辞

本研究に対して多大な助成を賜りました牛乳乳製品健康科学会議に深く感謝いたします。

利益相反

本研究内容に関して利益相反は存在しない。

文献

- 1) Holloszy, J.O., Kohrt, W.M., Hansen, P.A.: The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise, *Front. Biosci.*, 3, D1011-1027 (1998)
- 2) Ivy, J.L., Katz, A.L., Cutler, C.L., et al.: Muscle glycogen synthesis after exercise: effect of time of carbohydrate ingestion, *J. Appl. Physiol.*, 64, 1480-1485 (1988)
- 3) Jentjens, R., Jeukendrup, A.: Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery, *Sports. Med.*, 33, 117-144 (2003)
- 4) Zawadzki, K.M., Yaspelkis III, B.B., Ivy, J.L.: Carbohydrate-protein complex increases the rate of muscle glycogen storage after exercise, *J. Appl. Physiol.*, 72, 1854-1859 (1992)
- 5) Kim, W., Egan, J.M.: The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment, *Pharmacol. Rev.*, 60, 470-512 (2008)
- 6) Flatt, P.R., Bailey, C.J., Kwasowski, P., et al: Plasma immunoreactive gastric inhibitory polypeptide in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice, *J. Endocrinol.*, 101, 249-256 (1984)
- 7) 寺田新: 脂質による消化管ホルモン分泌作用を活用した新たな筋グリコーゲン回復法の開発, *デサントスポーツ科学*, 36, 61-67 (2015)
- 8) Lowry, O.H., Passonneau, J.V.: A Flexible System of Enzymatic Analysis pp.189-193 (1972) Academic Press, New York
- 9) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685 (1970)
- 10) Whiteman, E.L., Cho, H., Birnbaum, M.J.: Role of Akt/protein kinase B in metabolism, *Trends. Endocrinol. Metab.*, 13, 444-451 (2002)
- 11) Barthel, A., Schmoll, D.: Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 285, E685-E692 (2003)
- 12) Dentin, R., Liu, Y., Koo, S. H., et al.: Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2, *Nature*, 449, 366-369 (2007)
- 13) van Loon, L.J., Saris, W.H., Kruijshoop, M., et al.: Maximizing postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid or protein hydrolysate mixtures, *Am. J. Clin. Nutr.*, 72, 106-111 (2000)

(受付日: 2016年7月12日)
(採択日: 2016年10月25日)

Original Article

Co-ingestion of milk and glucose promotes post-exercise glycogen resynthesis in mouse skeletal muscle and liver

Makoto INAI ^{*1}, Shuhei NISHIMURA ^{*1}, Shogo URASHIMA ^{*1}, Yudai NONAKA ^{*1},
Michiyo KIMURA ^{*2}, Shin TERADA ^{*1}

^{*1} Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

^{*2} Department of Nutrition, Faculty of Health and Welfare, Takasaki University of Health and Welfare

ABSTRACT

To develop a novel method of promoting glycogen recovery, we examined the effects of the co-administration of glucose and milk on insulin secretion and glycogen resynthesis in muscle and liver after exercise in C57BL/6J mice. In Experiment 1, non-exercised mice were orally administered a glucose solution (2 mg/g body weight [BW], CHO group), milk (40 μ L/g BW, Milk group), or milk containing glucose (CHO-Milk group). Blood samples were collected from the tail vein, and the levels of plasma glucose, insulin and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) were determined. Compared with the CHO and Milk groups, the CHO-Milk group had a significantly higher plasma insulin level and a lower glucose level after administration. Furthermore, the plasma GIP concentration was significantly higher in the CHO-Milk group and was positively correlated with the plasma insulin concentration. In Experiment 2, mice performed an acute bout of 30-min running exercise and were then orally given a milk and/or glucose as in Experiment 1. At 60 min after administration, the glycogen concentrations in the muscle and liver were significantly higher in the CHO-Milk group than in the CHO group. These results suggest that the co-ingestion of glucose and milk stimulates insulin secretion via gut-derived GIP and promotes muscle and liver glycogen resynthesis after exercise in mice.

Keywords: milk, glycogen, GIP, insulin, mouse