

原著

糖質摂取のタイミングの違いが運動後の筋グリコーゲン回復率に及ぼす影響

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

運動後の速やかなグリコーゲン回復のためには、運動終了後30分目までに糖質を摂取することが推奨されている。しかしながら、運動終了後30分目までに糖質を摂取することが望ましいとする科学的根拠はこれまでに明確に示されていない。そこで本研究では、運動後の糖質摂取のタイミングが骨格筋のグリコーゲン回復率に及ぼす効果について実験動物を対象として再評価することを目的とした。雄性ICRマウスに対し60分間のトレッドミル走行運動を行わせた後、体重1gあたり2mgの糖質を、運動直後もしくは運動終了から30、60、120分間安静状態に保った後で経口投与した。糖質投与から2時間後に前脛骨筋を摘出し、グリコーゲン濃度を測定し、2時間あたりの筋グリコーゲン回復率を算出した。その結果、運動直後に糖質を投与したマウスに比べて、運動終了30、60および120分後に糖質を投与したマウスの筋グリコーゲンの回復率は有意に低いものであった。また、糖質投与後の血漿グルコース濃度は、運動直後に投与した群で有意に高い値を示し、血漿グルコースの増加量（曲線下面積値）と筋グリコーゲン回復率の間に有意な正の相関関係が認められた。以上の結果から、運動終了30分目以降において糖質を摂取した場合には、運動直後に摂取した場合に比べて、筋グリコーゲンの回復が遅延してしまうこと、さらに、運動直後に糖質を摂取した場合には、糖の吸収が促進され、グリコーゲン合成に使用できる血中グルコース量が増加することで、筋グリコーゲンの回復が高まる可能性が示唆された。

キーワード：タイミング 筋グリコーゲン グルコース インスリン マウス

I 緒言

スポーツ現場では、1日に試合やトレーニングが複数回行われることが多い。このような場面においては、体内の貯蔵量が少ない骨格筋のグリコーゲンが徐々に減少し、パフォーマンスおよびトレーニングの質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筋グリコーゲンを次の試合やトレーニングに備えて、いかに早く元の状態に回復させられるかが重要となる。

運動後の筋グリコーゲン回復法に関しては、1980年代の後半にIvy博士の研究グループによって、どのような糖質をどれだけ、どのタイミングで摂取すべきか、ということに関する研究が精力的に行われた^{1)~3)}。その結果、運動後に糖質を摂取するタイミングに関しては、糖質を運動終了直後に摂取した場合、運動終了から2時間後に摂取した場合に比べて筋グリコーゲンの回復率が有意に高かったことを報告し

ている¹⁾。このことから、運動により減少した筋グリコーゲンを速やかに回復させるためには、運動終了後できるだけ早いタイミングで糖質を摂取することが望ましいと考えられてきた。実際に、国際スポーツ栄養学会（International Society of Sports Nutrition）が提示したスポーツ栄養に関するガイドラインによると、運動により減少した筋グリコーゲンを速やかに回復させるためには、運動終了後30分以内に糖質を摂取することが推奨されている⁴⁾。しかしながら、先述したように、運動後の糖質摂取のタイミングに関しては、運動終了直後と運動終了から2時間後に糖質を摂取した場合の筋グリコーゲン回復率を比較した結果が報告されているだけであり、運動終了後2時間より早いタイミングで糖質を摂取した際の筋グリコーゲン回復率を検討した報告はない。したがって、運動終了後30分目までに糖質を摂取することが望ましいとする科学的根拠は明確に示されておらず、運動終了直後に高まった筋グリコーゲンの回復率が運動終了後どの程度

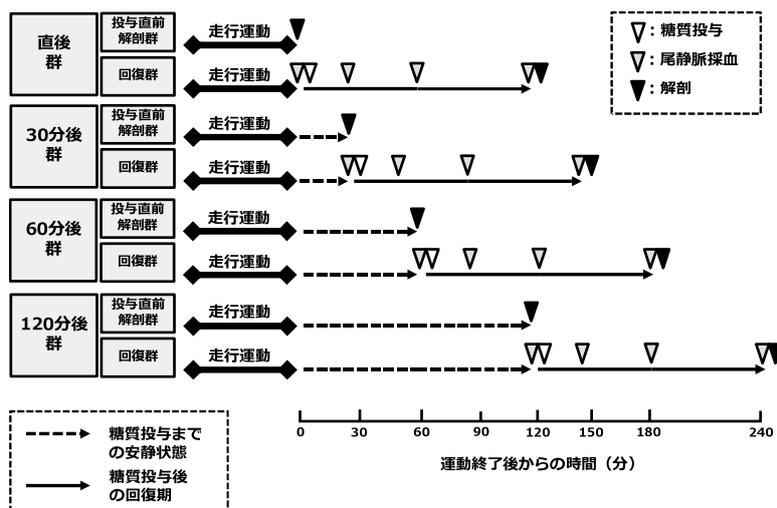


図1 実験プロトコール

の時間まで維持されるかについては必ずしも明らかとなっていない。そこで本研究では、運動終了直後から2時間目までにおける糖質摂取のタイミングの違いが筋グリコーゲンの回復率に及ぼす影響、さらには糖質摂取のタイミングの違いによってグリコーゲン回復率に違いが生じるメカニズムについても併せて検討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

実験動物として6週齢(体重28~33g)の雄性ICR系マウス52匹を日本クレア株式会社より購入した。マウスは室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、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4もしくは6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。すべてのマウスに固型飼料(CE-2、日本クレア株式会社)と水道水を自由摂取させた。なお、本研究は、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. 実験プロトコール

本実験において60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、12時頃から実験動物用トレッドミル(MK-680、室町機械株式会社)での走行運動を全てのマウスに行わせ、走行運動に十分に慣らさせた。走行時間は、1、2日目は10分間、3日目は20分間、4日目は30分間、5日目は40分間とし、20 m/minの速度での走行運動を行わせた。直前の運動の影響が本実験まで残ることを避けるために、実験前日は走行運動を行わせなかった。

実験プロトコールを図1に示した。実験当日に、マウスを1) 直後群(n=12)、2) 30分後群(n=12)、3) 60分後群(n=12)、4) 120分後群(n=12)の4群に無作為に分けた。全てのマウスに対して、実験当日の午前7時から固型飼料を取り除き、5時間の絶食を行わせた後、12時から20 m/minの速度で60分間の走行運動を行わせた。運動終了後、各群をさらに1) 糖質溶液を投与せずに投与直前のタイミングで解剖する群(投与直前解剖群:n=6)、および2) 糖質を投与し筋グリコーゲンを回復させる群(回復群:n=6)の2群に無作為に分けた。直後-回復群は運動終了直後に、30分後-回復群、60分後-回復群、および120分後-回復群は、それぞれ運動終了から30、60、120分間安静状態を保った後に糖質溶液を経口投与した。糖質溶液には、100 mg/mL濃度のグルコース溶液を用い、体重1g当たり20 μL ずつ、すなわちグルコースを体重1g当たり2.0 mgの割合で、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)を用いて投与した。投与直前解剖群は、糖質溶液投与直前のベースラインの値を得るために設け、それぞれの回復群と同じ時間だけ運動終了から安静状態を保った後、糖質溶液の投与直前のタイミングで解剖を行った。運動終了から投与までの間および投与から解剖までの間、全てのマウスは飼育ケージで安静状態を保持させた。なお、参考値として、60分間の走行運動前の筋グリコーゲン濃度を測定するために、5日間の予備走行運動を行わせた後、本実験の運動開始前に解剖する群(n=4)も設けた。

3. サンプルの採取および保存

回復群については投与液の投与前、投与30、60および120分目に尾静脈からヘパリン処理したキャピラ

リー採血管 (Thermo Fisher Scientific K. K.) を用いて採血した。採取した血液は13,000 rpmで10分間遠心分離することで血漿を得た。投与直前解剖群は糖質溶液の投与直前のタイミングで解剖を行い、一方、回復群は、投与120分目の採血後に解剖を行った。解剖は、イソフルランによる麻酔下で行った。尾部圧迫による反射が見られないことを確認し、完全麻酔下にて速やかに前脛骨筋を両脚から摘出した。右脚の前脛骨筋はグリコーゲン分析用として、一方、左脚の前脛骨筋はグリコーゲン合成に関わる細胞内情報伝達経路の活性化状態の分析用として速やかに摘出した後、直ちに液体窒素で凍結した。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

1) 筋グリコーゲン濃度

筋グリコーゲン濃度は、Lowry & Passonneauの方法⁵⁾に基づいて分析した。糖質摂取のタイミングの違いにより、その後の同一回復時間内 (2時間) における筋グリコーゲンの回復率に違いが認められるかどうかを評価するために、Ivy et al.¹⁾と同様の評価方法、すなわち2時間の回復後の筋グリコーゲン量の値から糖質摂取前の筋グリコーゲン量の値を差し引いた値を算出することとした。本研究では、Ivy et al.¹⁾の研究とは異なり、実験動物を用いているため、投与直前と投与から2時間後の筋サンプルを同一個体から採取することができない。そこで、糖質を投与する直前の筋グリコーゲン濃度として投与直前解剖群を設け、投与直前解剖群における筋グリコーゲン濃度の平均値をベースラインの値とした。このベースライン値を、糖質投与2時間後に解剖を行った回復群における各サンプルの筋グリコーゲン濃度の値から差し引くことにより、糖質を投与してから2時間の回復期における各個体の筋グリコーゲン回復率を算出した。

2) 細胞内情報伝達経路

筋グリコーゲン回復に関係する骨格筋細胞内の情報伝達経路の活性化状態をウエスタンブロットティ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テ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⁶⁾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、Polyvinylidene 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5% (w/v) スキムミルク/Tris buffered saline、0.1% Tween20 (TBS-T) を用いてブロ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-Glycogen synthase (GS)、anti-Phospho-GS、anti-AMP-activated protein kinase (AMPK)、anti-Phospho-AMPK、Cell Signaling Technology) をそれぞれ1000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 (horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rabbit IgG、Jackson Immuno Research社、5000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) 血液生化学的項目

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。血漿インスリン濃度は、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kitを用いて測定した (Insulin: Mouse Insulin ELISA、Merckodia Inc社)。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120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。

5. 統計処理

統計処理はExcel統計2015（株式会社 社会情報サービス）を用いて解析した。データはすべて平均値±標準誤差で表した。有意差検定には、一元配置の分散分析および多重比較としてFisherの最小有意差法を用いた。各項目間の相関関係は、Pearsonの相関分析を用いて検討した。いずれも危険率5%未満をもって有意とした。

Ⅲ 結果

1. 筋グリコーゲン濃度

本実験の運動開始直前に解剖を行ったマウスの前脛骨筋におけるグリコーゲン濃度は、 $56.3 \pm 4.5 \mu\text{mol/g}$ 湿重量であった。60分間の走行運動終了後、糖質投与を行わずに解剖を行う群（投与直前解剖群）の筋グリコーゲン濃度、すなわち、投与直前のベースラインのグリコーゲン濃度は、120分後群で直後群に比べて有意に高い値を示した（ $p = 0.021$ 、図2-A）。一方で、回復群における筋グリコーゲン濃度は、他の群に比べて直後群で高値を示す傾向にあったものの、全ての群間で有意な差は認められなかった。

回復群のグリコーゲン濃度の値から投与直前解剖群における筋グリコーゲン濃度の平均値を差し引くことで算出した筋グリコーゲン回復率は、直後群で他の3群に群に比べて有意に高い値を示した（vs. 30分後群： $p = 0.005$ ；vs. 60分後群： $p = 0.019$ ；vs. 120分後群： $p = 0.003$ 、図2-B）。

2. 回復中の血漿グルコースおよびインスリン濃度

回復群における糖質溶液投与後の血漿グルコース濃度の経時変化およびそのAUC値を図3-Aおよび図3-Bに示した。直後群では、2時間の回復中の血漿グルコース濃度が他の3群に比べて高値を示す傾向にあり、回復2時間の血漿グルコースAUC値は、直後群で他の3群に比べて有意に高い値を示した（vs. 30分後群： $p = 0.015$ ；vs. 60分後群： $p = 0.015$ ；vs. 120分後群： $p < 0.001$ ）。

回復群における糖質溶液投与後の血漿インスリン濃度の経時変化およびそのAUC値を図3-Cおよび図3-Dに示した。直後群および30分後群では、投与前において血漿インスリン濃度が低い値を示していたものの、投与30分目の時点においては大きな増加が認められた。その結果、回復2時間の血漿インスリンAUC値は、直後群および30分後群で60分後群および

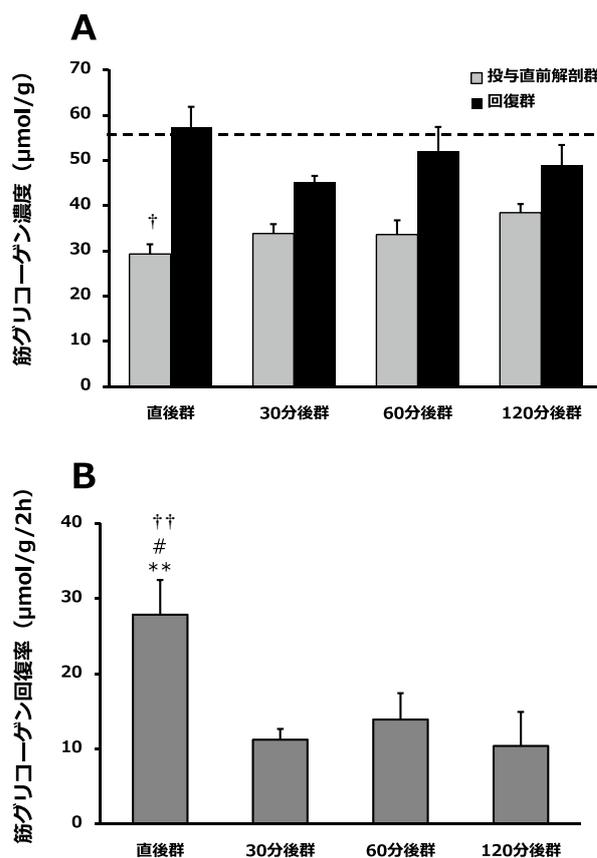


図2 糖質溶液の投与直前解剖群および回復群における筋グリコーゲン濃度 (A) と筋グリコーゲン回復率 (B)

数値は全て平均±標準誤差で表した。図2-A中の点線は運動開始前安静時の値を示す。

† $p < 0.05$ 、†† $p < 0.01$ vs. 120分後群

$p < 0.05$ vs. 60分後群

** $p < 0.01$ vs. 30分後群

120分後群に比べて有意に高い値を示した（直後 vs. 60分後群： $p = 0.001$ ；直後 vs. 120分後群： $p < 0.001$ ；30分後群 vs. 60分後群： $p = 0.030$ ；30分後群 vs. 120分後群： $p = 0.004$ ）。直後群と30分後群の間には血漿インスリンAUC値に有意な差は認められなかった。

3. 筋グリコーゲンの合成に関与する細胞内情報伝達経路の活性化状態

1) AMP依存性プロテインキナーゼ (AMPK)

AMPKは、筋収縮活動によって活性化される酵素であり、このAMPKの活性化により、骨格筋におけるインスリン非依存性の糖取り込みが促進されることが知られている⁷⁾。運動により高まったAMPK活性が、糖質溶液投与までの時間が延長するにしたがって徐々に回復（低下）し、インスリン非依存性の糖取り込みもそれに伴い低下する可能性が考えられる。そこ

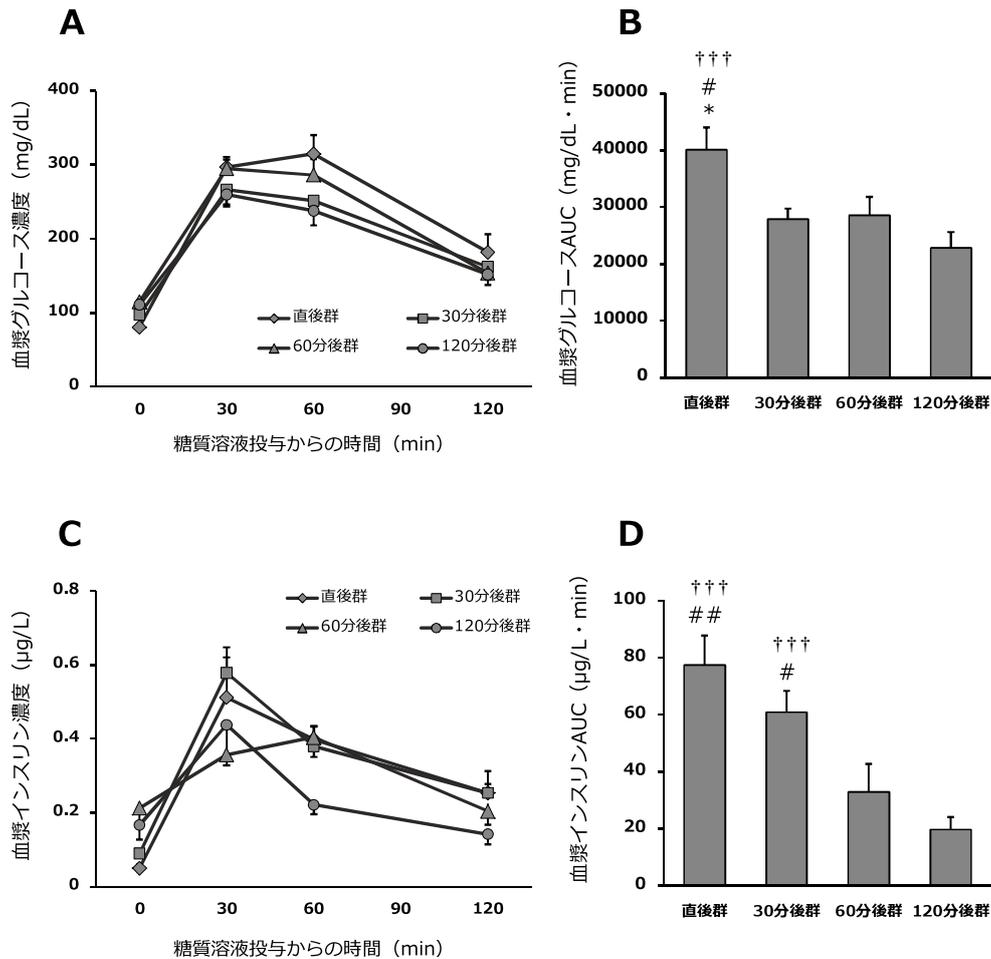


図3 糖質溶液投与のタイミングの違いが回復期の血漿グルコース (A、B) およびインスリン濃度 (C、D) に及ぼす影響

数値は全て平均±標準誤差で表した。AUC：曲線下面積

††† p<0.001 vs. 120分後群

p<0.05、## p<0.01 vs. 60分後群

* p<0.05 vs. 30分後群

で本研究では、投与直前解剖群の前脛骨筋におけるリン酸化型（活性化型）のAMPK量とAMPKの総発現量を測定し、総発現量に占めるリン酸化型の割合の比（リン酸化型AMPK/AMPK総発現量比）をAMPK活性の指標として算出した。その結果、前脛骨筋におけるリン酸化型AMPK/AMPK総発現量比には、すべての群間で有意な差は認められなかった（図4）。

2) グリコーゲン合成酵素 (GS)

GSは、グリコーゲン合成における重要な分子の一つであり、運動によって活性化することが知られている⁸⁾。運動により高まったGS活性が、糖質溶液投与までの時間が延長するにしたがって徐々に回復（低下）すると考え、投与直前解剖群の前脛骨筋におけるリン酸化型（不活性化型）GS量とGSの総発現量を測定し、

総発現量に占めるリン酸化型の割合の比（リン酸化型GS/総GS発現量比）を求めた。その結果、前脛骨筋におけるリン酸化型GS/総GS発現量比は、すべての群間で有意な差は認められなかった（図5）。

4. 血漿グルコースおよび血漿インスリンAUC値と筋グリコーゲン回復率との関係

血漿グルコースAUC値と筋グリコーゲン回復率との間に有意な正の相関関係が認められた（図6-A、 $r = 0.604$, $p = 0.002$ ）。また、血漿インスリンAUC値と筋グリコーゲン回復率の間にも有意な正の相関関係が認められた（図6-B、 $r = 0.415$, $p = 0.044$ ）。

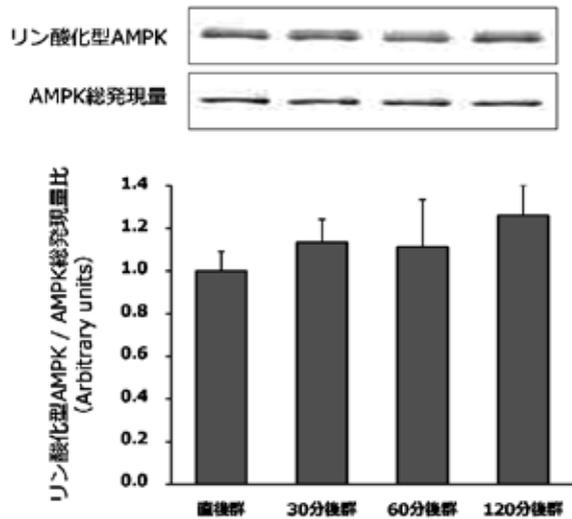


図4 運動後の糖質溶液投与までの時間が骨格筋におけるAMP依存性プロテインキナーゼの活性化状態に及ぼす影響

数値は全て平均±標準誤差で表した。

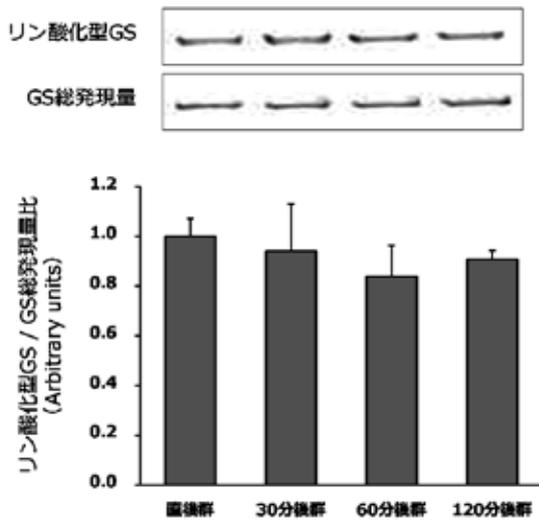


図5 運動後の糖質溶液投与までの時間が骨格筋におけるグリコーゲン合成酵素の活性化状態に及ぼす影響

数値は全て平均±標準誤差で表した。

IV 考察

国際スポーツ栄養学会が示したスポーツ栄養に関するガイドラインでは、運動により減少した筋グリコーゲンを速やかに回復させるためには運動終了から30分以内に糖質を摂取することが望ましいとされている

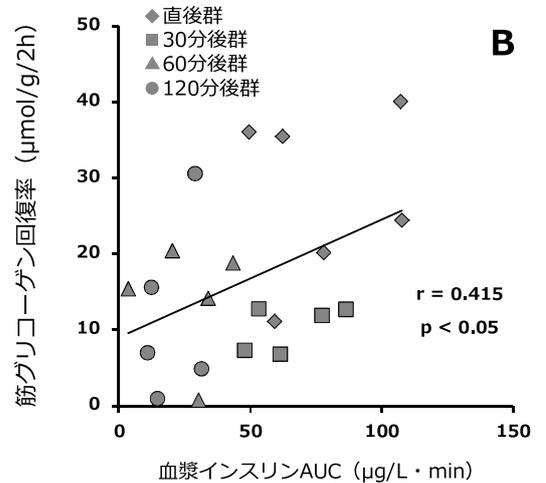
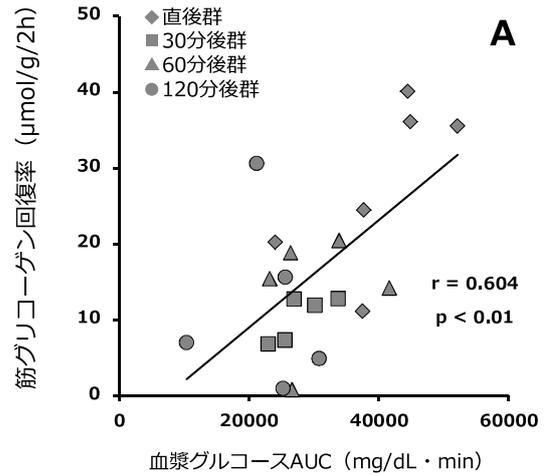


図6 糖質溶液投与後の血漿グルコースAUC値 (A) およびインスリンAUC値 (B) と筋グリコーゲン回復率との関係

AUC: 曲線下面積

る⁴⁾。しかしながら、運動終了後30分までに糖質を摂取することが望ましいとする直接的な科学的根拠はこれまで示されておらず、運動終了直後に高まった筋グリコーゲンの回復率が運動後どの程度の時間まで維持されるかについては必ずしも明らかとなっていなかった。そこで本研究では、運動後の糖質摂取のタイ

ミングに関する直接的な科学的根拠を提示するために、運動終了直後から2時間以内における糖質摂取のタイミングの違いが筋グリコーゲンの回復率に及ぼす影響について検討を行った。その結果、運動終了30分目に糖質を摂取した場合でも、運動終了直後に摂取した場合に比べて、筋グリコーゲン回復率は顕著に低下していることが明らかとなった。以上のことから、運動後の筋グリコーゲン回復を促進するためには、ガイドラインで推奨されてきた「運動終了から30分以内」ではなく、運動終了からさらに早い時間帯で糖質摂取を完了すべきであると考えられる。

骨格筋においてグリコーゲンの合成に影響を及ぼす段階として、1) 骨格筋の糖取り込み、および2) グリコーゲン合成酵素 (GS) の2つが挙げられている。運動/筋収縮活動は、インスリンとは異なる細胞内の情報伝達経路を活性化することで、骨格筋の糖取り込みを促進することが知られている⁷⁾。先行研究において、このような筋収縮活動によるインスリン非依存性の糖取り込み速度が、運動終了後30分までは高く維持されることが報告されている⁹⁾。このような先行研究の結果から、運動終了直後に糖質を摂取することで筋グリコーゲン回復が高くなるのは、筋収縮活動によるインスリン非依存性の糖取り込み速度が運動終了30分程度まで高く維持されているためであると考えられていた。

AMPKは、筋収縮活動によって細胞内のAMP/ATP比およびクレアチン/クレアチンリン酸比が増加することで活性化される⁷⁾。このAMPKの活性化により、インスリン非依存性の情報伝達経路を介して糖輸送体GLUT-4の細胞膜上への移動が引き起こされ、骨格筋の糖取り込みが促進されることが知られている⁷⁾。そこで、投与直前解剖群の骨格筋におけるAMPKの活性化状態を検討した。しかしながら、前脛骨筋におけるリン酸化型AMPK/総AMPK発現量比は、すべての群間で有意な差は認められなかった(図4)。このことから、本研究では骨格筋における糖取り込み速度の測定を行っていないが、投与開始時における非インスリン依存性の糖取り込み速度は、全ての群で同程度であり、本研究において運動終了30分目以降の糖質摂取で筋グリコーゲン回復率が低下した要因として、骨格筋におけるインスリン非依存性の血糖取り込み速度の低下が関与していた可能性は低いと考えられる。Chen et al.¹⁰⁾は、中・高強度の運動終了直後においてはAMPKの活性化が認められたものの、低強度運動の直後ではAMPKの活性化レベルは安静時と同程度であったことを報告している。本研究で行った走行運動は、走速度が20 m/minと比較的強度の低い運動であったため、運動終了直後にAMPKが活性化されず、AMPKの活性化の状態に違いが認められなかったという可能性も考えられる。今後の研究にお

いて、実際に骨格筋の糖取り込み速度の測定を行い、筋グリコーゲン回復率との関係を検討する必要があると思われる。

GSは筋グリコーゲン合成における律速酵素であり、運動によって活性化することが古くから知られている⁸⁾。本研究では、運動により高まったGS活性が、運動終了後の時間経過にともなって徐々に運動前のレベルに回復し、それが筋グリコーゲンの回復率に影響すると考え、投与直前解剖群におけるGSの活性化状態を検討した。しかしながら、骨格筋におけるリン酸化型GS/総GS発現量比は、すべての群間で有意な差は認められなかった(図5)。Ivy et al.¹¹⁾も同様に、運動終了直後と運動終了2時間後とを比較して、GSの活性化状態に有意な差がみられなかったことを報告している。したがって、運動終了直後に糖質を摂取した場合に比べて、30分目以降の糖質摂取で筋グリコーゲン回復率が低下した要因に、骨格筋におけるGS活性の低下は関与していなかったと考えられる。

Ivy et al.¹¹⁾は、糖質摂取後における血漿グルコース濃度の変化およびインスリンの分泌動態には、運動終了直後に摂取した場合と運動終了から2時間後に摂取した場合との間で違いは認められなかったことを報告している。しかしながら、本研究では、血漿グルコースのAUC値は、直後群で他の群に比べて有意に高い値を示していた(図3-A、B)。イヌを対象とした研究において、小腸におけるグルコースの吸収効率が、安静時に比べて運動後において亢進し、体内を循環するグルコース量もそれにとまって増加することや¹¹⁾、小腸に発現するグルコーストランスポーターの一つであるSodium-dependent glucose transporter-1 (SGLT-1)を介したグルコースの受動輸送が、運動後において増加することなどが報告されている¹²⁾。したがって、Ivy et al.¹¹⁾とは異なる結果が得られた原因は不明であるものの、本研究においては、運動終了直後では小腸におけるグルコースの吸収速度が高まっていたため、糖質摂取後に血漿グルコース濃度が他の群に比べて上昇したという可能性が考えられる。

運動後の筋グリコーゲン合成は、その材料である糖質の量によって規定されているため、骨格筋の血糖取り込み速度以上に小腸での糖質の吸収速度が筋グリコーゲン合成の律速段階となっている、という仮説も示されている¹³⁾。実際に、運動後に糖質を経口摂取することで得られる筋グリコーゲン回復率の最大値が、1時間あたり約40~50 $\mu\text{mol/g}$ 筋乾燥重量であることが報告されている一方で^{14)~16)}、運動後に静脈に挿入したカテーテルから十分量の糖質を注入することで、経口投与に比べて非常に高い筋グリコーゲン合成率(1時間あたり約130 $\mu\text{mol/g}$ 乾燥重量)が得られることも報告されている^{17), 18)}。これらの先行研究の結果から、小腸でのグルコースの吸収速度が、少なく

とも部分的に筋グリコーゲン回復率を制限している因子であると考えられている。上述したように、本研究では、他の3群に比べて直後群において血漿グルコースAUC値が有意に高い値を示し(図3-A、B)、さらに血漿グルコースAUC値と筋グリコーゲン回復率との間に正の相関関係が認められた(図6-A)。したがって、本研究課題では、小腸での糖の吸収速度の測定は行っていないものの、運動終了直後に小腸におけるグルコースの吸収速度が亢進したことで筋グリコーゲン合成に利用できるグルコース量が増加し、その結果、筋グリコーゲン合成率が高まった可能性が考えられる。また、血漿グルコースと同様に、血漿インスリンAUC値も、直後群において高値を示し(図3-C、D)、さらに、血漿インスリンAUC値と筋グリコーゲン回復率との間にも正の相関関係が認められた(図6-B)。インスリンは、AMPKとは異なる経路で骨格筋の糖取り込みを活性化することで筋グリコーゲンの合成を強力に促進する因子であることから、運動直後に糖質を摂取した場合には、血漿グルコース濃度の上昇によって、インスリン分泌も促進され、それによって筋グリコーゲンの回復が促進されたという可能性も考えられる。

本研究では、糖質を投与してから2時間後のグリコーゲン濃度の値(回復群)から糖質を投与する直前におけるグリコーゲン濃度の平均値(投与直前解剖群の平均値)を差し引くことで、筋グリコーゲンの回復率を算出した。直後群と120分後群を比べた場合、2時間の回復後の筋グリコーゲンの絶対値には両群間で統計的に有意な差は認められなかったのに対し(図2-A)、それぞれの投与直前解剖群の筋グリコーゲン濃度は、120分後群で直後群に比べて有意に高い値を示していた(図2-A)。したがって、120分後群においては、ベースラインの値が高くなることで、糖質摂取による筋グリコーゲン回復の余地が小さくなってしまったため、回復群と投与直前解剖群の値の差分として算出された筋グリコーゲン回復率が、直後群に比べて120分後群で過小評価されてしまったという可能性も考えられる。ただし、直後群と30分後群を比べた場合、投与直前解剖群におけるグリコーゲン濃度は両群間で有意な差は認められなかったものの、筋グリコーゲン回復率は30分後群に比べて直後群で有意に高い値を示していた。したがって、運動後の筋グリコーゲン回復率は運動終了30分後の時点ですでに低下していたと考えられる。さらに筋グリコーゲンは、一過性の運動を行った後に糖質を摂取することで、最終的には運動開始前のレベル以上に超回復することが知られている¹⁹⁾。運動終了120分後の時点で糖質を摂取しても筋グリコーゲン回復率が低下していなかったとすれば(直後群と同様に120分後群の筋グリコーゲン回復率が高い状態で維持されていたとすれば)、投与直前解

剖群における筋グリコーゲン濃度が直後群に比べて120分後群で高かったことから、120分後-回復群における筋グリコーゲン濃度は直後-回復群に比べて高い値を示し、筋グリコーゲンの超回復がすでに生じていたはずである。しかしながら、直後-回復群と120分後-回復群の筋グリコーゲン濃度の間には有意な差は認められなかった(図2-A)。さらに、直後群以外の群では、回復後の筋グリコーゲン濃度の平均値が、運動開始前の値($56.3 \pm 4.5 \mu\text{mol/g}$ 湿重量)にまで回復していなかった(図2-A)。したがって、運動終了直後に糖質を摂取した群に比べて、運動終了30分目以降に糖質を摂取した群で、筋グリコーゲン回復率が低い値を示した原因として、運動終了30分目以降に糖質を摂取する群における筋グリコーゲンの回復の余地が小さかったことが関与していたとは考えにくく、運動終了30分目以降に糖質を摂取する群における筋グリコーゲン回復率が過小評価していた可能性は低いと言えよう。

Ivy et al.¹⁾は、運動終了直後に糖質を摂取させてから2時間の回復時間における筋グリコーゲン回復率は、2時間あたり $15.4 \mu\text{mol/g}$ 湿重量であったことを報告している。一方で、本研究においても、Ivy et al.¹⁾と同様の算出方法を用いて筋グリコーゲンの回復率を求めたが、直後群の筋グリコーゲン回復率は2時間あたり $27.9 \pm 4.6 \mu\text{mol/g}$ 湿重量であり、Ivy et al.¹⁾によって報告された値の約1.8倍高い値であった。Ivy et al.¹⁾はヒトを対象として研究を行っているのに対して、本研究課題ではマウスを実験対象とした。マウスはヒトに比べて代謝回転が速いことが知られていることから、本研究において筋グリコーゲン回復率がIvy et al.¹⁾に比べて高かったのは、実験対象の違いによるものであるのかもしれない。マウスと同様の時間スケールをヒトに対してそのまま当てはめることは難しく、ヒトにおいても今回と同様の結果が得られるとは限らない。したがって、今後の研究においては、実際にヒトを対象にして本研究のように運動終了後2時間より早いタイミングで糖質を摂取した際の筋グリコーゲン回復動態を検討する必要があるだろう。

V 結論

本研究の結果、運動終了直後に比べて、運動終了30分後に糖質を摂取した場合には、すでに筋グリコーゲン回復率が低下している可能性が示唆された。したがって、運動後に減少した筋グリコーゲンを速やかに回復させるためには運動終了から30分よりも早い時間帯に糖質を摂取することが重要であると考えられる。また、運動直後に糖質を摂取した場合に筋グリコーゲン回復率が高まるメカニズムとして、小腸におけるグルコースの吸収速度の亢進が関与している可能性が示

唆された。

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) 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)
- 2) Ivy, J.L., Lee, M.C., Brozinick, J.T., et al.: Muscle glycogen storage after different amounts of carbohydrate ingestion, *J. Appl. Physiol.*, 65, 2018-2023 (1988)
- 3) Reed, M.J., Brozinick, J.T. Jr., Lee, M.C., et al.: Muscle glycogen storage postexercise: effect of mode of carbohydrate administration, *J. Appl. Physiol.*, 66, 720-726 (1989)
- 4) Kerksick, C., Harvey, T., Stout, J., et al.: International Society of Sports Nutrition position stand: nutrient timing, *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 5:17. doi: 10.1186/1550-2783-5-17 (2008).
- 5) Lowry, O.H., Passonneau, J.V.: A Flexible System of Enzymatic Analysis pp.189-193 (1972) Academic Press, New York
- 6) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685 (1970)
- 7) Fujii, N., Jessen, N., Goodyear, L.J.: AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 291, E867-E877 (2006)
- 8) Danforth, W.H.: Glycogen synthase activity in skeletal muscle. Interconversion of two forms and control of glycogen synthesis, *J. Biol. Chem.*, 240, 588-593 (1965)
- 9) Goodyear, L.J., Hirshman, M.F., King, P.A., et al.: Skeletal muscle plasma membrane glucose transport and glucose transporters after exercise, *J. Appl. Physiol.*, 68, 193-198 (1990)
- 10) Chen, Z.P., Stephens, T.J., Murthy, S., et al.: Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans, *Diabetes*, 52, 2205-2212 (2003)
- 11) Hamilton, K.S., Gibbons, F.K., Bracy, D.P., et al.: Effect of prior exercise on the partitioning of an intestinal glucose load between splanchnic bed and skeletal muscle, *J. Clin. Invest.*, 98, 125-135 (1996).
- 12) Pencek, R.R., Koyama, Y., Lacy, D.B., et al.: Prior exercise enhances passive absorption of intraduodenal glucose, *J. Appl. Physiol.*, 95, 1132-1138 (2003)
- 13) Jentjens, R., Jeukendrup, A.: Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery, *Sports Med*, 33, 117-144 (2003)
- 14) Blom, C.S.: Post-exercise glucose uptake and glycogen synthesis in human muscle during oral or i.v. glucose intake, *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 59, 327-333 (1989)
- 15) Hickner, R.C., Fisher, J.S., Hansen, P.A., et al.: Muscle glycogen accumulation after endurance exercise in trained and untrained individuals, *J. Appl. Physiol.*, 83, 897-903 (1997)
- 16) 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)
- 17) Roch-Norlund, A.E., Bergström, J., Hultman, E.: Muscle glycogen and glycogen synthetase in normal subjects and in patients with diabetes mellitus. Effect of intravenous glucose and insulin administration, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 30, 77-84 (1972)
- 18) Hansen, B.F., Asp, S., Kiens, B., et al.: Glycogen concentration in human skeletal muscle: effect of prolonged insulin and glucose infusion, *Scand. J. Med. Sci. Sports.*, 9, 209-213 (1999)
- 19) Bergström, J., Hultman, E.: Muscle glycogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man, *Nature*, 210, 309-310 (1966)

(受付日: 2016年9月3日)
(採択日: 2016年10月31日)

Original Article

Reevaluation of the effects of time of glucose ingestion on post-exercise glycogen recovery in mouse skeletal muscle

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 maximize the rate of muscle glycogen recovery, athletes are recommended to consume a sufficient amount of carbohydrate within 30 min after the exercise. The purpose of this study was to reevaluate the effects of the time of carbohydrate intake on the post-exercise glycogen resynthesis rate in mouse skeletal muscle. Male ICR mice were subjected to 60-min running exercise and then were orally administered a glucose solution (2 mg of glucose/g body weight) either immediately (0 min) or 30, 60 or 120 min after the exercise. At 2 h after the glucose administration, the tibialis anterior muscles were dissected out and the muscle glycogen concentrations were determined. The muscle glycogen resynthesis rate during the 2-h recovery period was significantly higher for the mice administered with glucose solution immediately after the exercise, compared with those fed at 30, 60, or 120 min after exercise. While no significant differences in phosphorylation statuses of AMP-activated protein kinase and glycogen synthase were seen, the increase in the plasma glucose level (area under the curve [AUC] of plasma glucose) was significantly higher for the mice administered immediately after exercise, compared with the other groups. In addition, a significant correlation was observed between the plasma glucose AUC and the muscle glycogen recovery rate. These results suggest that even a 30-min delay in the intake of carbohydrates resulted in a slower rate of muscle glycogen recovery after exercise. Furthermore, the higher rate of post-exercise glycogen resynthesis induced by the earlier ingestion of glucose appears to be caused by increases in intestinal glucose absorption and glucose availability in the systemic circulation.

Keywords: timing, muscle glycogen, glucose, insulin, mouse