

博士（人間科学）学位論文

古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方  
は  
ファットローディング効果を併せもつ

**The classic one week glycogen-loading regimen additionally  
changes the fat-loading to skeletal muscles**

2013 年 1 月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

篠原 暁子

**Shinohara, Akiko**

| 研究指導教員： 福林 徹 教授

## 目 次

---

### 第1章 序論

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 第1節 緒言 .....                       | 2  |
| 1. 研究の端緒                           |    |
| 第2節 文献研究 .....                     | 3  |
| 1.2.1. グリコーゲンローディング処方の沿革           |    |
| 1.2.2. 脂肪の蓄積およびファットローディングの意義と沿革    |    |
| 1.2.3. 骨格筋細胞内のグリコーゲンおよび脂肪とインスリンの関係 |    |
| 1.2.4. 組織化学的分析の必要性                 |    |
| 1.2.5. 文献研究のまとめ                    |    |
| 第3節 本研究の目的 .....                   | 11 |

### 第2章 成人男性による古典的1週間グリコーゲンローディング処方の ファットローディング効果の検証

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 第1節 目的 .....                        | 16 |
| 第2節 実験方法 .....                      | 16 |
| 2.2.1. 被験者                          |    |
| 2.2.2. 最大酸素摂取量測定                    |    |
| 2.2.3. 実験スケジュール                     |    |
| 2.2.4. 運動試験                         |    |
| 2.2.5. 血液分析                         |    |
| 2.2.6. 呼気ガス測定                       |    |
| 2.2.7. 統計分析                         |    |
| 第3節 結果 .....                        | 22 |
| 2.3.1. 血清グルコース濃度                    |    |
| 2.3.2. 血清遊離脂肪酸濃度                    |    |
| 2.3.3. エネルギー消費量                     |    |
| 2.3.4. 呼吸交換比                        |    |
| 第4節 考察 .....                        | 30 |
| 2.4.1. グルコース摂取による脂肪組織からの脂肪酸抑制効果について |    |
| 2.4.2. グリコーゲンローディング効果について           |    |
| 2.4.3. ファットローディング効果について             |    |
| 2.4.4. 食事期間の効果について                  |    |
| 2.4.5. 第2章のまとめ                      |    |

### 第3章 ラットの尺側手根伸筋による古典的1週間グリコーゲンローディング処方 のファットローディング効果の解明

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 第1節 目的                            | 35 |
| 第2節 実験方法                          | 35 |
| 3.2.1. 実験対象、実験群、実験食、および実験スケジュール   |    |
| 3.2.2. 運動負荷法                      |    |
| 3.2.3. 組織化学的手法                    |    |
| 3.2.4. 統計分析                       |    |
| 第3節 結果                            | 44 |
| 3.3.1. 骨格筋細胞内グリコーゲン顆粒濃度           |    |
| 3.3.2. 骨格筋細胞内グリコーゲン含量             |    |
| 3.3.3. 骨格筋細胞内脂肪滴                  |    |
| 3.3.4. 骨格筋細胞内脂肪滴含量                |    |
| 第4節 考察                            | 52 |
| 3.4.1. 骨格筋細胞内グリコーゲン顆粒と脂肪滴の含量と分布特性 |    |
| 3.4.2. 第3章のまとめ                    |    |

### 第4章 ラットのヒラメ筋による古典的1週間グリコーゲンローディング処方 のファットローディング効果の検討

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 第1節 目的                              | 61 |
| 第2節 実験方法                            | 61 |
| 4.2.1. 実験対象、実験群、実験食、および実験スケジュール     |    |
| 4.2.2. 運動負荷法                        |    |
| 4.2.3. 組織化学的手法                      |    |
| 4.2.4. 統計分析                         |    |
| 第3節 結果                              | 63 |
| 4.3.1. 骨格筋細胞内グリコーゲン顆粒濃度             |    |
| 4.3.2. 骨格筋細胞内グリコーゲン含量               |    |
| 4.3.3. 骨格筋細胞内脂肪滴                    |    |
| 4.3.4. 骨格筋細胞内脂肪滴含量                  |    |
| 第4節 考察                              | 71 |
| 4.4.1. 骨格筋細胞内グリコーゲン顆粒および脂肪滴の含量と分布特性 |    |
| 4.4.2. 第4章のまとめ                      |    |

## 第5章 総合考察

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 第1節 総合考察 .....           | 76 |
| 5.1.1. ファットローディングの意義と鈴木説 |    |
| 5.1.2. 研究の限界             |    |
| 5.1.3. 本研究の有用性および今後の課題   |    |

## 第6章 結論

|              |    |
|--------------|----|
| 第1節 結論 ..... | 82 |
| 5.1.1. 目的    |    |
| 5.1.2. 結論    |    |

|          |    |
|----------|----|
| 謝辞 ..... | 85 |
|----------|----|

|            |    |
|------------|----|
| 参考文献 ..... | 86 |
|------------|----|

## 図一覧

### 第1章

- 図1 グリコーゲンローディング&ファットローディングの推測されるメカニズム

### 第2章

- 図2 成人男性被験者による実験スケジュール  
図3 運動試験日のスケジュール  
図4 血清グルコース濃度  
図5 血清遊離脂肪酸濃度  
図6 エネルギー消費量  
図7 呼吸交換率

### 第3章

- 図8 ラットによる実験スケジュール  
図9 ラットの1日の食餌および運動時間スケジュール  
図10 骨格筋切片のグリコーゲン染色画像  
図11 骨格筋切片の脂肪滴染色画像  
図12 尺側手根伸筋のグリコーゲン染色写真 (PAS染色)  
図13 尺側手根伸筋に占めるグリコーゲン顆粒濃度  
図14 尺側手根伸筋の脂肪滴染色写真 (Oil red O染色)  
図15 尺側手根伸筋に占める脂肪滴面積の割合

### 第4章

- 図16 ヒラメ筋のグリコーゲン染色写真 (PAS染色)  
図17 ヒラメ筋に占めるグリコーゲン顆粒濃度  
図18 ヒラメ筋の脂肪滴染色写真 (Oil red O染色)  
図19 ヒラメ筋に占める脂肪滴面積の割合

## 表一覧

### 第2章

表1 1日のエネルギー摂取量

表2 血清グルコース濃度

表3 血清遊離脂肪酸濃度

表4 エネルギー消費量

表5 呼吸交換率

### 第3章

表6 尺側手根伸筋に占めるグリコーゲン顆粒濃度

表7 尺側手根伸筋に占める脂肪滴面積の割合

### 第4章

表8 ヒラメ筋に占めるグリコーゲン顆粒濃度

表9 ヒラメ筋に占める脂肪滴面積の割合

## 研究業績

本論文の内容の一部は以下の学術雑誌に掲載されている.

1. Shinohara A, Takakura J, Yamane A, Suzuki M. (2010)  
Effect of the classic 1-week glycogen-loading regimen on fat-loading in rats  
and human. *J Nutr Sci Vitaminol.* **56**:299-304

本論文の内容の一部は以下の学会において発表されている.

(国内学会)

1. 篠原暁子、山根明、福林徹  
グリコーゲンローディング処方 of ファットローディング効果の検討.  
第 67 回日本体力医学会, 予稿集: 214.

# 第1章 序論



## 第1節 緒言

### 1. 研究の端緒

炭水化物と脂質はエネルギー燃料として重要である。このエネルギー燃料を分解して得られるエネルギー源としてのグリコーゲンと脂肪をより多く獲得・利用することで、運動パフォーマンスを向上させようとする研究の代表的なものに、古典的1週間グリコーゲンローディング法がある<sup>(1,2)</sup>。この古典的1週間グリコーゲンローディング法は、食事と運動を組み合わせることで骨格筋細胞内により多くグリコーゲンを貯蔵させようとするものである。この方法において、グリコーゲンをより多く蓄積させるためには、グリコーゲンを一度枯渇させることが重要であり、このグリコーゲンの枯渇によりグリコーゲン蓄積の超回復が起こり、より多くグリコーゲンが蓄積されると言われている<sup>(3,4)</sup>。そして、より多くのグリコーゲンの蓄積は、パワー・スピードなどの運動パフォーマンスを向上させ、特に持久性の運動パフォーマンスを向上させる効果がある<sup>(5-7)</sup>。

一方、脂質が持久性の運動パフォーマンスを向上させるとの報告もある。これに関連する先行研究によれば、脂肪の摂取を多くすると脂質のエネルギー代謝が活性化してスタミナが持続することや<sup>(8,9)</sup>、7-28日間の高脂肪食の摂取は、持久性運動の成績を低下させないばかりか、高炭水化物食に比べ、かえって成績がよくなる場合があることが報告されている<sup>(9)</sup>。

脂肪の蓄積は、トリグリセリドとして主に皮下脂肪組織、腹腔内脂肪組織、骨格筋細胞内に蓄積され貯蔵される<sup>(10)</sup>。この中でもエネルギー源として直接利用される骨格筋細胞内に蓄積されたトリグリセリドは、脂肪滴としてミトコンドリアに近接して貯蔵される<sup>(11)</sup>。そして、この骨格筋細胞内に脂肪滴として蓄積された脂肪は、脂質酸化によるエネルギー源の約10~50%を占めているとい

う報告もあり、持久性運動中に利用される脂質の中でも重要なエネルギー源として役割を果たしている<sup>(12-15)</sup>。

このように、エネルギー源としてのグリコーゲンを骨格筋細胞内に蓄積させるためにグリコーゲンローディング処方の研究がなされているようであるが、骨格筋細胞内の脂肪もエネルギー源として重要な役割を果たしていることから、脂肪を効率的に骨格筋細胞内に取り込む方法が明らかになり、両者をバランスよく細胞内に貯蔵することができれば有用な知見となろう。

## 第2節 文献研究

ここでは、古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方が、骨格筋細胞内にグリコーゲンを蓄積させるだけでなく、脂肪も併せて蓄積させる可能性を検討するために文献研究を行う。

### 1.2.1. グリコーゲンローディング処方の沿革

1939 年、スウェーデンの Christensen と Hansen は、高炭水化物食と高脂肪食をそれぞれ摂取した後の持久性運動の持続時間について検討した<sup>(23)</sup>。その結果、持久性運動の持続時間は高炭水化物食摂取群が高脂肪食摂取群の 2 倍以上となり、炭水化物の摂取量の多少が持久力に影響を与えることが指摘された。

そして、1960 年代後半には、食事と運動を組み合わせた研究が行われ、骨格筋グリコーゲンに超回復が生じることを示した<sup>(3)</sup>。その研究では、片脚のみ自転車運動を疲労困憊に至るまで行なったのち、高炭水化物食を摂取することで骨格筋グリコーゲン量がどのように回復するのかを検討している。その結果、自転車運動を疲労困憊に至るまで行なった片側脚の骨格筋グリコーゲン量は一時

的に低下したが、そののち高炭水化物食を摂取することで高炭水化物食摂取 3 日後には、骨格筋グリコーゲン量は休ませていた脚に比べ約 2 倍に増加し、グリコーゲンの超回復が生じることが明らかとなった。この研究結果から、骨格筋グリコーゲンを超回復させるには、運動によって一旦骨格筋グリコーゲンを減少させることが必要であると指摘している。

この研究結果を受け、骨格筋グリコーゲン含量を一旦枯渇させたあとに、高炭水化物食摂取する方法を用いた研究が行われている。その結果、高脂肪食に比べ高炭水化物食を摂取すると骨格筋グリコーゲン含量が多くなり、持久性運動能力が高まることを指摘している<sup>(4,24,25)</sup>。

これらの研究結果は、持久性運動パフォーマンス向上には、運動前に骨格筋グリコーゲンの蓄積が重要であることを示唆したものである。

これらの知見をもとに、Åstrand は今日における古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方と呼ばれる運動と栄養の処方を提案した<sup>(26)</sup>。これは、試合の約 7 日前に激しい運動により骨格筋内グリコーゲン含量を低下させ、次の 3 日間は低炭水化物食（高脂肪＋高タンパク質食）で骨格筋内グリコーゲン含量を徹底的に低下させ、最後の 3 日間は高炭水化物食に切り替えて骨格筋グリコーゲン蓄積を最大化させる方法である。

この方法を行うと、骨格筋グリコーゲン貯蔵はグリコーゲン貯蔵処方前の 1.5 ～2 倍に超回復するという報告もある<sup>(27)</sup>。

また、長時間の運動中に骨格筋内グリコーゲンが枯渇すると筋肉が動かせなくなってしまう、運動パフォーマンスが大きく低下するとの指摘もあり<sup>(24,28)</sup>、マラソンやトライアスロンなど長時間の競技前には、骨格筋に十二分にグリコーゲンを蓄積させるための古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方が実践される<sup>(4)</sup>。

しかし、古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方には、以下のような短所もあった。①低炭水化物食の期間に低血糖になりやすく、やる気がなくなること、②低炭水化物食から高炭水化物食に切り替えると、高炭水化物食は高線維でもあることから、下痢や腹痛を起こすことがあること、③1 週間の期間は長すぎる、などがあげられる<sup>(29)</sup>。

そのため、これらの短所を取り除いた処方可能なグリコーゲンローディング処方が提案された。この方法は、70～75%VO<sub>2</sub>max の運動強度で、運動負荷時間を徐々に短縮していくテーパリング（漸減）方法である。期間の前半（大会 6 日前から 3 日間）は 50～55%炭水化物食、後半（残り 3 日間）は 60～70%炭水化物食を摂取するもので、その結果、古典的 1 週間グリコーゲンローディングとほぼ同じ量のグリコーゲンが蓄積することが明らかになった<sup>(30)</sup>。

以上の文献研究から、グリコーゲンローディング法の持久性運動能力の向上作用は明らかになりつつあるが、そのメカニズムはいまだ十分に解明されていない<sup>(9,31)</sup>ものの、グリコーゲンローディング処方には 1 週間にわたる厳密な古典的処方およびテーパリング（漸減）方法の 2 つがあることが明らかになった。

### 1.2.2. 脂肪の蓄積およびファットローディングの意義と沿革

#### （1）脂肪の重要性と脂肪の役割

一般成人の研究結果では、肝臓と筋にグリコーゲンとして 8000kJ (2000kcal) 程度貯蔵することができるが<sup>(32)</sup>、骨格筋運動のために必要なエネルギー源として骨格筋と肝臓に貯蔵されるグリコーゲン量は限られている。したがって、より多くのグリコーゲンを必要とするマラソンやトライアスロンといった持久的競技では<sup>(4)</sup>、貯蔵されたグリコーゲンが枯渇してしまう心配がある<sup>(24,28)</sup>。

このグリコーゲンを補う役割をするエネルギー源が脂肪である。運動中のエネルギー源としての脂肪は  $38\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$  (9kcal) の熱量を持ち、グルコースと同じ質量あたりでは炭水化物の  $18\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$  (4kcal) の2倍以上の熱量をもつため、脂肪は持久性運動のもうひとつの重要なエネルギー源とされている<sup>(11)</sup>。

脂肪はトリグリセリドとして主に皮下脂肪組織、腹腔内脂肪組織、骨格筋繊維内に脂肪滴として蓄積されている<sup>(11)</sup>。脂肪組織の主な役割は脂肪を貯蔵すること、そして必要に応じて貯蔵脂肪を分解して血液中に脂肪酸とグリセロールを放出することである。脂肪は短期間のエネルギー源として貯蔵されるグリコーゲンと比較して長期間のエネルギー源として蓄えられると考えられている。

運動を継続すると脂肪組織における脂肪分解が促進され、血中の遊離脂肪酸濃度が上昇する。この現象に対応して、エネルギー代謝に占める脂肪酸酸化の割合も上昇する。すなわち、脂肪は持久性運動における重要なエネルギー源であり、持久運動時のグルコースの節約に寄与しているとも考えられる。

## (2) 骨格筋細胞内脂肪 (Intramuscular triglyceride: IMTG)

脂質エネルギー源の中心的役割を担う脂肪として、骨格筋繊維内に蓄積される骨格筋細胞内脂肪 (Intramuscular triglyceride: IMTG) がある<sup>(33-36)</sup>。骨格筋細胞内脂肪はミトコンドリアに近接して存在し、すばやく利用されることを目的に貯蔵されていると考えられている<sup>(11)</sup>。

骨格筋細胞内脂肪は持久性運動時の脂質酸化によるエネルギー源の約 10～50%を占めているという報告があり、持久運動中に利用される脂質の中で中心的な役割を果たしているとされている<sup>(31,37-40)</sup>。また、骨格筋細胞内脂肪は、運動後の脂肪滴のサイズ減少<sup>(41)</sup>やマラソン直後の骨格筋細胞内脂肪の減少<sup>(17)</sup>、そして骨格筋細胞内脂肪の貯蔵増加が起こった後、全身運動時に骨格筋細胞内脂

脂肪がより多く利用される可能性を示唆する報告がある<sup>(42-44)</sup>。一方で、骨格筋細胞内脂肪量が長時間運動後において有意な減少がみられなかったという報告もある<sup>(17,45-50)</sup>。

これらの報告は、運動時における骨格筋細胞内脂肪の貯蔵と利用は運動状況に影響され<sup>(34)</sup>、骨格筋細胞内脂肪が運動時に酸化されるのか否か、酸化されるのならばどれくらいの割合なのかは明らかにされていない<sup>(51,52)</sup>。

### (3) ファットローディングの意義

骨格筋細胞内により多く脂肪を蓄積するための方法として、ファットローディングが提案されている。この方法は、高脂肪食の摂取によって、骨格筋細胞内にエネルギー源となる脂肪をより多く貯蔵させるものである<sup>(2)</sup>。

高脂肪食摂取に関する先行研究では、約 60%の高脂肪食を 1-4 週間程度食べ続けていると、高炭水化物食を食べている人に比べて脂肪の  $\beta$  酸化系の酵素活性が高まり、この状態で運動を行なうとグリコーゲンを節約する効果があり、限界までの運動時間や最大酸素摂取量が増大するという報告がある<sup>(48)</sup>。また、40~68%の高脂肪食の摂取でファットローディング効果を得たという報告<sup>(14,53,54)</sup>や、5-6 日間高脂肪食摂取後 1 日高炭水化物食を摂取してファットローディング効果を得たという報告<sup>(9,14,53,55)</sup>、そして、脂肪の摂取が増大すると脂肪のエネルギー代謝が活発化してスタミナが持続するという報告<sup>(30,56)</sup>がある。さらに長期間高脂肪食を摂取していると、逆に運動能力の低下や、トレーニング効果が高炭水化物摂取と比較して減少するなどの問題点も報告されている<sup>(48)</sup>。

これに対し、2%脂肪含有という低脂肪の高炭水化物食を 7 日間摂取すると骨格筋細胞内脂肪貯蔵量は減少するという報告もある<sup>(57)</sup>。

### 1.2.3. 骨格筋細胞内のグリコーゲンおよび脂肪とインスリンの関係

骨格筋細胞内グリコーゲンと脂肪の関係を考える上で、インスリン抵抗性に関する知見は重要である。ここでは、インスリン抵抗性とグリコーゲンおよび脂肪との関連性について概括する。

安静時の骨格筋細胞内脂肪の貯蔵は、非常に食事構成の影響を受けやすく、急激な<sup>(16,17)</sup>、そして長期間の<sup>(18)</sup>高脂肪食摂取により骨格筋内脂肪の貯蔵を増加させるという報告がある。骨格筋内脂肪の貯蔵の増加は、インスリン感受性を低下させ、インスリンの抵抗性を大きくする。この作用は、脂肪細胞への過剰な脂質(中性脂肪)の蓄積の増加と細胞内へのグルコース取り込みとを抑制する生理的な防御反応といわれており、高脂肪食を摂取することは、インスリンの標的臓器である肝臓、骨格筋において脂肪を蓄積させ、代謝異常を招くとされている<sup>(36)</sup>。

これに関連する先行研究では、3日間の高脂肪食が前脛骨筋の骨格筋細胞内脂肪を増加させ、インスリン感受性を低下させるという報告や<sup>(19)</sup>、骨格筋における中性脂肪の蓄積量が多いほどインスリン感受性が低下するという報告があり<sup>(58)</sup>、骨格筋細胞内脂肪がインスリン抵抗性と関連することが指摘されている<sup>(19,58,59)</sup>。

ところが、持久性の運動アスリートでは骨格筋細胞内脂肪が増加していても、インスリン抵抗性の低下作用はないという報告がある<sup>(20,21)</sup>。運動をすることで血液中のインスリン濃度が低く抑えられるためである。このインスリン濃度の抑制により、肝臓をはじめすべての臓器から糖や脂肪酸が血液中に放出され、各臓器への糖の取り込みも一時的に抑制される。特に、長期の運動トレーニングは、血液中のインスリン濃度を常に低い値に維持させる<sup>(22)</sup>。しかし、筋肉の

輸送担体（GLUT4）は筋収縮によってトランスロケーションを起こすため<sup>(22)</sup>、骨格筋のインスリン感受性は高進し、骨格筋には優先的に糖が供給されるためとされている<sup>(22)</sup>。

このようなことから、運動によってトレーニングされた競技選手は、骨格筋細胞内脂肪量が増加しているにもかかわらず、インスリン感受性が高いとされている<sup>(20,36)</sup>。この現象は“アスリートパラドックス”と言われ、持久性の高負荷のトレーニングあるいは長期にトレーニングされた骨格筋の適応現象と考えられている<sup>(20,36)</sup>。

インスリン抵抗性が低い運動中に濃い糖溶液を摂取すると、高血糖を避けるためインスリン濃度が上昇し、各臓器が糖や脂肪の取り込みを始め、低血糖と脂肪酸の供給低下を起こす<sup>(22)</sup>。これは、インスリンショックと呼ばれる現象である。一般に、この現象を避けるため、運動前や運動の初期には濃い糖液を飲んではいけないとされている。

しかしながら、供給が間に合わず、低血糖と脂肪酸の低下を引き起こすことは、その低下した分量のエネルギーを供給することで解消される可能性もある。

これらの知見は、高脂肪食を高炭水化物食の前に摂取することにより、インスリン分泌の抑制状態を作出し、筋収縮を伴う運動を継続することで、筋のインスリン感受性を高め、骨格筋細胞内にグリコーゲンと脂肪を共存させることが可能であることを推測させる。

#### 1.2.4. 組織化学的分析の必要性

骨格筋細胞内脂肪に関する測定は、間接的測定および直接的測定に分けることができる。また、直接的測定は、非侵襲的測定と侵襲的測定に分けることができる。



間接的測定には、呼吸商による測定がある。

直接的測定における非侵襲的測定には、CT（コンピューター断層撮影）、MRI（核磁気共鳴画像法）、<sup>1</sup>H-MRS 法（プロトン磁気共鳴分光法）がある<sup>(60)</sup>。CT 法と MRI 法は、一度に広範囲を測定でき、測定の再現性も良いという長所があるが、骨格筋細胞内脂肪と骨格筋細胞外脂肪を分離して測定することができないという短所もある<sup>(60)</sup>。<sup>1</sup>H-MRS 法は骨格筋骨格筋のプロトンスペクトルのピークが骨格筋細胞内脂肪(1.3-1.4ppm)と骨格筋細胞外脂肪(1.5-1.6ppm)で異なることから、骨格筋細胞内脂肪と骨格筋細胞外脂肪を分離して測定することができ、測定の再現性が良いという長所がある<sup>(11)</sup>。しかしながら、骨格筋細胞内脂肪と骨格筋細胞外脂肪のピークが部分的に重なり合うため、骨格筋細胞内脂肪と骨格筋細胞外脂肪の測定が困難であるという短所もある。また、機器分析における技術的難しさもある<sup>(58)</sup>。

一方、直接的測定における侵襲的測定には、組織学的手法がある。この方法は、骨格筋細胞の切片を作成し電子顕微鏡により確認する手法、または切片を染色し、光学顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いた手法がある<sup>(60)</sup>。いずれも侵襲的な方法であるという短所はあるが、電子顕微鏡の長所は、細胞内の構造を詳細に確認することができ、多くの形態学的な情報を得ることができる。しかし、画像が狭い範囲になるため比較的広範囲の定量化はしにくい<sup>(60)</sup>。光学顕微鏡および蛍光顕微鏡では、細胞内の詳細な構造を確認できないものの、電子顕微鏡に比べ広範囲の細胞内の分布を確認することができ、複数の染色と合わせることも可能で、定量的分析も可能である<sup>(11)</sup>。

#### 1.2.5 文献研究のまとめ

ここでは、以上の文献研究から得られた知見をまとめる。

古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方が、骨格筋細胞内にグリコーゲンを蓄積させるだけでなく、脂肪も併せて蓄積させていることを検討するために文献研究を行ってきたが、それに見合う知見を得られなかった。

しかしながら、これらの文献研究からは、グリコーゲンローディング処方に関して、古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方と 3 日間でグリコーゲンを蓄積させる処方があるとの知見を得られた。また、高脂肪食を中心としたエネルギー摂取により、インスリン分泌の抑制状態を作出し、筋収縮運動を継続することで骨格筋のインスリン感受性を高進させ、骨格筋細胞内にグリコーゲンと脂肪を共存させることが可能であることを推測させた。さらに、骨格筋細胞内を観察するためには、組織化学的に分析することが望ましいとの知見も得た。

以上のことから、古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方が、グリコーゲンローディング効果だけでなくファットローディング効果を併せもつかを究明するためには、光学顕微鏡および蛍光顕微鏡を使用した組織化学的手法により定性的に骨格筋細胞内グリコーゲンおよび脂肪の分布状況を確認し、かつ定量することが望ましいと考えられる。

### 第 3 節 本研究の目的

そこで、本研究では、古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方がファットローディング効果を併せもつかを組織化学的分析方法により、定性的かつ定量的に明らかにすることを目的とした。

この目的を達成するために、以下の研究課題を設定し、究明した。

#### (研究課題 1)

古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方（高脂肪食 3 日間—高炭水化物食 3 日間）することで、骨格筋細胞内脂肪が高率で利用される可能性について、利用の有無を代謝のパターンで判断することとし、その指標は呼吸交換比率を用いることとした。

骨格筋細胞内脂肪の利用をみるためには、骨格筋細胞内脂肪に新たな脂肪が取り込まれないよう、遮断する必要がある。骨格筋に新たに取り込まれる脂肪は血中に遊離脂肪酸として存在していたものであり、この血中遊離脂肪酸は、体内の脂肪組織である皮下や腹腔内にトリグリセライドとして存在していたものが、血中に放出されたものである。そこで、脂肪利用を骨格筋細胞内脂肪に限るためには、皮下や腹腔内のトリグリセライドの血中放出を抑制するために、血管内にグルコースを投与する方法を用いる必要がある。これにより、皮下や腹腔内のトリグリセライドから血中に放出された遊離脂肪酸が抑制された状況で、脂質代謝が促進されれば、骨格筋細胞内脂肪を利用して運動していた可能性が高まると評価できるのではないかと考えられる。

そこで、第 2 章では、上記の仮説から、成人男性を被験者に古典的 1 週間グリコーゲンローディング法を処方し、骨格筋細胞内脂肪が運動中に骨格筋細胞内脂肪が高率で利用される可能性について生理学的に検討する。

#### (研究課題 2)

古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方を行なった時のファットローディング効果を確認するためには、疲労困憊に至る運動を負荷し、骨格筋細胞内の脂肪滴の貯蔵状態を確認しなければならない。

そこで、第3章では、疲労困憊に至る運動を負荷したあと、ラットをグリコーゲンローディング処方する高脂肪食（3日間）—高炭水化物食（3日間）群と高炭水化物食を6日間食餌させる高炭水化物食—高炭水化物食群に分け、尺側手根伸筋細胞内のグリコーゲン含量と脂肪含量を組織化学的手法により定性的かつ定量的解析し、経日変動を比較・検討した。

### （研究課題3）

古典的1週間グリコーゲンローディング処方を行なった時のファットローディング効果は、疲労困憊に至らない運動を負荷においても認められるかを検討することとした。

そこで、第4章では、疲労困憊運動の負荷を軽減した条件設定のもと、ラットをグリコーゲンローディング処方する高脂肪食（3日間）—高炭水化物食（3日間）群と高炭水化物食を6日間食餌させる高炭水化物食—高炭水化物食群に分け、ヒラメ筋のグリコーゲン含量と脂肪含量を組織化学的により定性的かつ定量的に解析し、経日変動を比較・検討した。

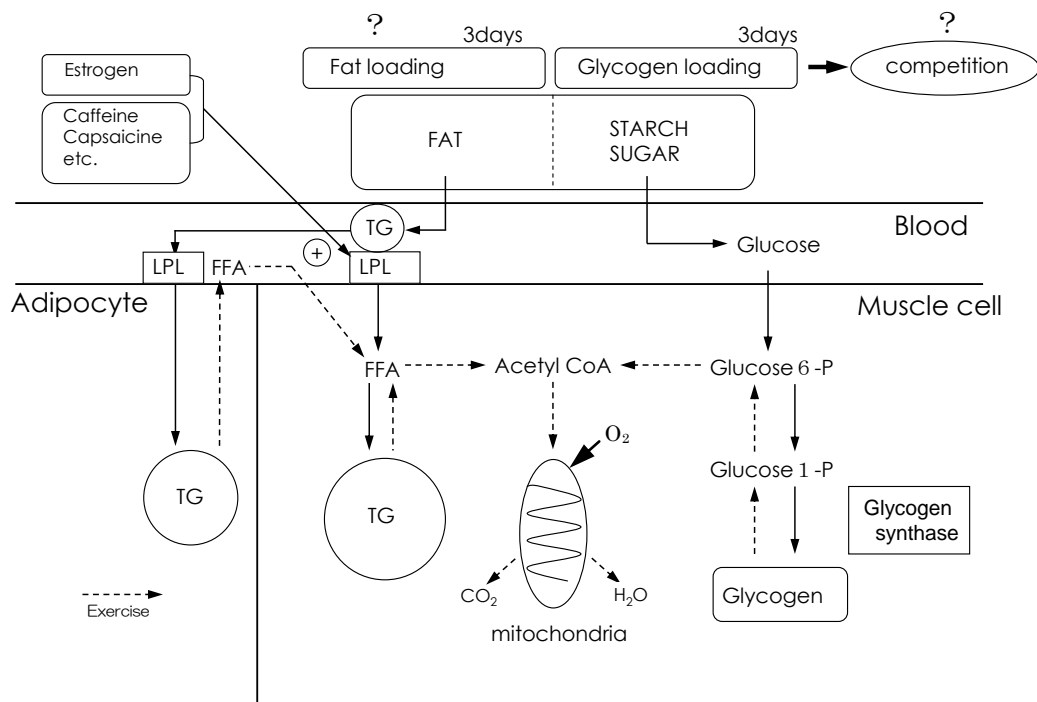


図1 グリコーゲンローディング&ファットローディングの推測されるメカニズム (筆者作図)

## 第2章 成人男性による古典的1週間グリコーゲンローディング 処方脂肪ローディング効果の検証

## 第1節 目的

健康な成人男性を被験者として、古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方において高脂肪食 3 日間—高炭水化物食 3 日間摂取後の運動中に骨格筋細胞内脂肪が高率で利用される可能性について検討する。

## 第2節 実験方法

### 2.2.1. 被験者

被験者は、運動習慣を週 5—6 日、1 日 3—4 時間程度持つ健康な成人男子大学生 6 名〔年齢：21.5±1.8 歳、身長：170.5±5.5 cm、体重：67.8±7.1 kg、最大酸素摂取量（VO<sub>2</sub>peak）：55.2±5.3 ml/kg/min〕とした。被験者には早稲田大学スポーツ科学学術院研究倫理審査委員会の承認を得た研究計画書に従って、本研究の目的や内容を十分に説明し、実験に協力する旨の同意を得た。

### 2.2.2. 最大酸素摂取量測定

本実験での運動強度を決定するために、本実験の前に自転車エルゴメータ（Monark 818E, Sweden）を用いて漸増負荷運動試験を実施し、各被験者の最大酸素摂取量（VO<sub>2</sub>peak）を測定した。

### 2.2.3. 実験スケジュール（図 2）

連続 7 日間からなる 2 つの栄養条件の下に 2 群設定し、実験をおこなった。一つの栄養条件は高脂肪食—高炭水化物食群であり、1 日目—3 日目の 3 日間に高脂肪食(たんぱく質：脂質：炭水化物= 22：72：6%，3450 kcal / 日)を摂

取し、4日目-6日目の3日間に高炭水化物食（たんぱく質：脂質：炭水化物=19：15：66%，3526 kcal / 日）<sup>(9,14,53)</sup>を摂取した。もう一つの条件は、1日目-6日目の6日間高炭水化物食（たんぱく質：脂質：炭水化物=19：15：66%，3526 kcal / 日）を摂取する（表 1）、高炭水化物食-高炭水化物食群である。高脂肪食と高炭水化物食の脂肪および炭水化物のエネルギーを同程度の比率で吸収させるために、脂肪（高脂肪食）および炭水化物（高炭水化物食）のエネルギー比率が約70%になるように設定した。それぞれの摂食処方は2週間から2ヶ月の間においてランダムにクロスオーバーテストを行った。1日目に骨格筋内グリコーゲンを枯渇させるための運動を負荷し、そして7日目に自転車エルゴメータによる運動試験を実施した。



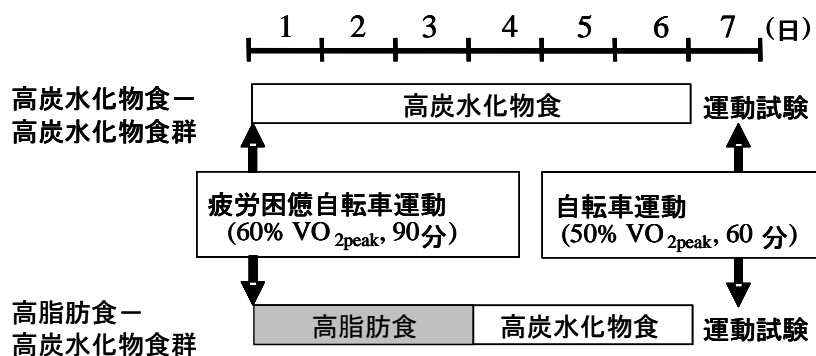


図 2 成人男性被験者による実験スケジュール

表 1 1日のエネルギー摂取量

|    | 高炭水化物食<br>(kcal) | 高脂肪食<br>(kcal) | 運動試験日<br>(kcal) |
|----|------------------|----------------|-----------------|
| 朝食 | 1034             | 740            | 1034            |
| 昼食 | 931              | 940            |                 |
| 夕食 | 1291             | 1516           |                 |
| 間食 | 270              | 254            |                 |
| 合計 | 3526             | 3450           | 1034            |

#### 2.2.4. 運動試験

被験者には 1 日目に骨格筋内のグリコーゲンを枯渇させるために、60%  $\text{VO}_2\text{peak}$  の自転車エルゴメータを 90 分間負荷した。そして、2 日目から 6 日目の間には 1 日おおよそ 3-4 時間程度、日常生活程度の運動を行った。

7 日目には自転車エルゴメータで運動試験を行った (図 3)。被験者は運動試験の 3 時間前に朝食を摂取し(たんぱく質 : 脂質 : 炭水化物 = 22 : 15 : 63 %) <sup>(61)</sup>、運動試験開始 2 時間前に研究室に集まった。室温 24°C、湿度 45% に設定した実験室で 30 分間安静を維持し、その後 10 分間呼気ガスを採取した。脂肪細胞からの脂肪酸動員を抑制して骨格筋細胞内脂肪を供給させるために、運動開始 1 時間前と 30 分前に体重当たり 0.5g 相当の 5% グルコース溶液 (0.5g / 体重 kg) を摂取した。その後、被験者に自転車エルゴメータを用いて 50%  $\text{VO}_2\text{peak}$  の運動試験を 60 分間負荷した。採血は運動試験 60 分前と運動開始直前、30 分後、運動終了直後、及び運動終了 30 分後に採血した。そして、呼気ガスは運動開始 15 分前から 5 分間と運動の開始から終了まで 11-15 分、26-30 分、41-45 分、56-60 分の 4 回採取した。

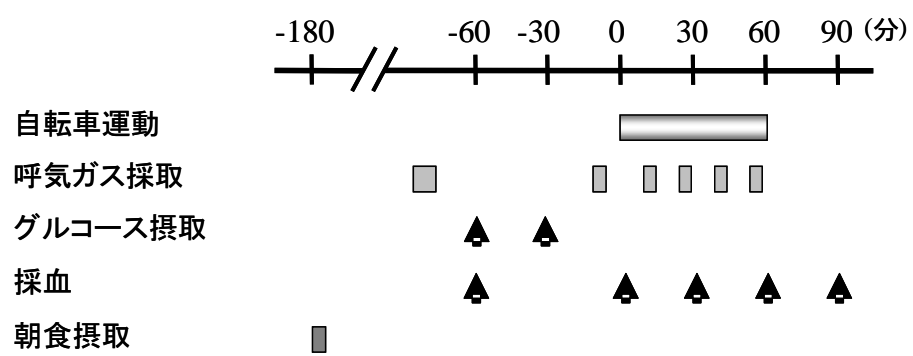


図3 運動試験日のスケジュール

### 2.2.5. 血液分析

血中のグルコースと遊離脂肪酸の変動を確認するために、運動開始 60 分前、運動開始直前、運動開始後 30 分、終了直後、および運動終了 30 分後の計 5 回採血を行なった。マルチ・ランセット S (アークレイ株式会社、京都) を用いて指先を穿刺し、出血した部位から血液をマイクロキャピラリーで採取した。1 回の採血で 2 本 (約 60 $\mu$ l $\times$ 2 本) を採取し、血液を直ちに遠心分離し (H-1200m、コクサン社製)、分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。血清のグルコースと遊離脂肪酸濃度の分析にはグルコース CII-テストワコー (和光純薬工業株式会社、大阪) と NEFA C-テストワコー (和光純薬工業株式会社、大阪) を用いた。

### 2.2.6. 呼気ガス測定

呼吸交換比 (RER)、およびエネルギー消費量を算出するために、呼気ガスの測定を行った。安静時 1 回、および運動中 4 回の計 5 回、被験者に 2 方向バルブのマスクを装着し、コンピューターと連動した呼吸代謝測定装置 (AE-300S、ミナト社製、東京) を用いて、酸素摂取量 ( $\text{VO}_2$ ) と二酸化炭素排出量 ( $\text{VCO}_2$ ) を測定した。

### 2.2.7. 統計分析

高炭水化物食-高炭水化物食群と高脂肪食-高炭水化物食群の群間のデータの有意性をウィルコクソン符号順位で比較検定した。

## 第3節 結果

### 2.3.1 血清グルコース濃度 (表2) (図4)

運動開始 60 分前、運動開始直前、運動開始後 30 分、終了直後、および運動終了 30 分後の血清グルコース濃度は、高脂肪食－高炭水化物食群でそれぞれ  $89.9 \pm 8.2$ 、 $104.3 \pm 14.1$ 、 $67.5 \pm 14.7$ 、 $73.0 \pm 15.3$ 、および  $87.2 \pm 20.1 \text{mg/dl}$  であり、高炭水化物食－高炭水化物食群ではそれぞれ  $90.3 \pm 9.6$ 、 $109.2 \pm 16.2$ 、 $79.5 \pm 22.4$ 、 $73.7 \pm 13.5$ 、および  $80.9 \pm 12.8 \text{mg/dl}$  であった。血清グルコース濃度について両条件間に有意な差はみられず、全体として安静時レベルを維持した。

表 2 血清グルコース濃度

|                | 安静時      | 運動開始直前     | 運動開始後30分  | 運動終了直後    | 運動終了30分後  |
|----------------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 高脂肪食-高炭水化物食群   | 89.9±8.2 | 104.3±14.1 | 67.5±14.7 | 73.0±15.3 | 87.2±20.1 |
| 高炭水化物食-高炭水化物食群 | 90.3±9.6 | 109.2±16.2 | 79.5±22.4 | 73.7±13.5 | 80.9±12.8 |

(mg/dl)

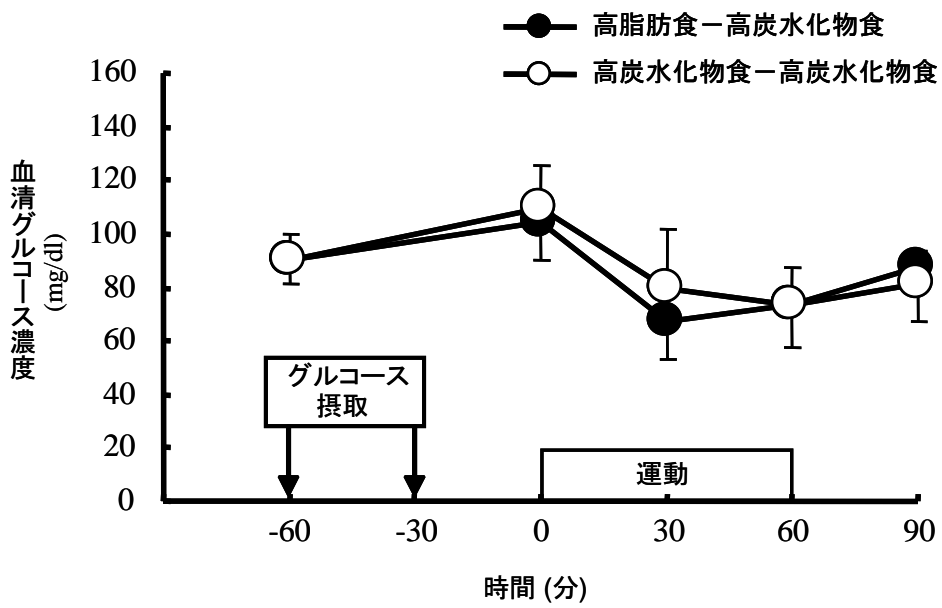


図 4 血清グルコース濃度

実験 7 日目の血清グルコース濃度。平均値±標準偏差 (n=6)

### 2.3.2. 血清遊離脂肪酸濃度 (表 3) (図 5)

運動開始 60 分前、運動開始直前、運動開始後 30 分、終了直後、および運動終了 30 分後の血清遊離脂肪酸濃度は、高脂肪食－高炭水化物食群でそれぞれ  $0.19 \pm 0.08$ 、 $0.13 \pm 0.03$ 、 $0.16 \pm 0.04$ 、 $0.21 \pm 0.08$ 、および  $0.36 \pm 0.21 \text{mEq/l}$  であり、高炭水化物食－高炭水化物食群ではそれぞれ  $0.19 \pm 0.03$ 、 $0.19 \pm 0.08$ 、 $0.21 \pm 0.08$ 、 $0.26 \pm 0.12$ 、および  $0.39 \pm 0.23 \text{mEq/l}$  であった。全ての時点で、血清遊離脂肪酸濃度について両条件間に有意な差はみられなかった。

表 3 血清遊離脂肪酸濃度

|                | 安静時       | 運動開始直前    | 運動開始後30分  | 運動終了直後    | 運動終了30分後  |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 高脂肪食-高炭水化物食群   | 0.19±0.08 | 0.13±0.03 | 0.16±0.04 | 0.21±0.08 | 0.36±0.21 |
| 高炭水化物食-高炭水化物食群 | 0.19±0.03 | 0.19±0.08 | 0.21±0.08 | 0.26±0.12 | 0.39±0.23 |

(mEq/l)

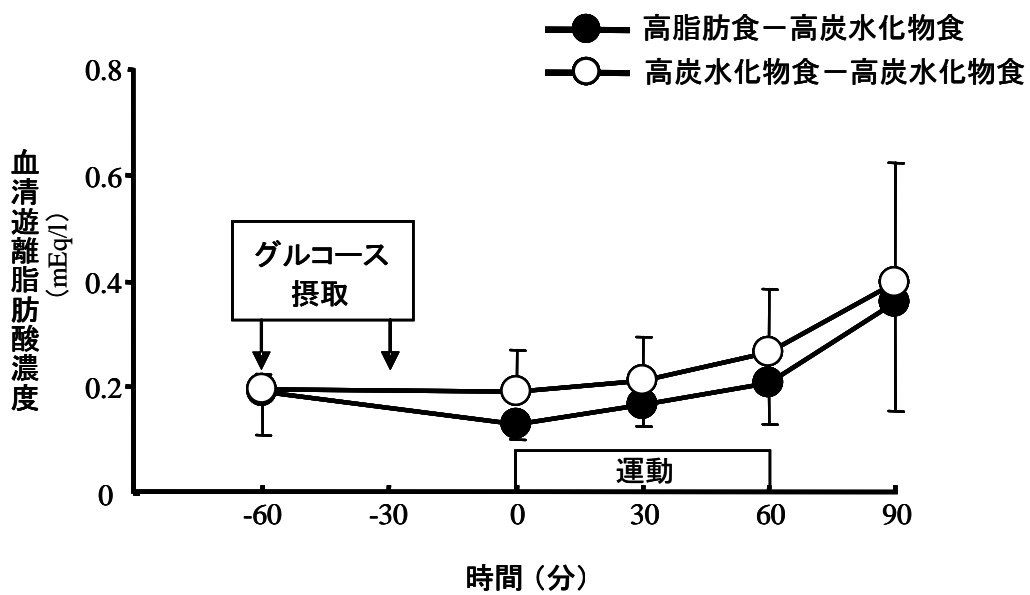


図 5 血清遊離脂肪酸濃度

実験 7 日目の血清遊離脂肪酸濃度。平均値±標準偏差 (n=6)



### 2.3.3. エネルギー消費量 (表 4) (図 6)

運動開始直前、運動開始 11-15 分、26-30 分、41-45 分、および 56-60 分後のエネルギー消費量は、高脂肪食-高炭水化物食群でそれぞれ  $23.6 \pm 3.8$ 、 $150.1 \pm 25.5$ 、 $155.4 \pm 23.1$ 、 $151.8 \pm 24.4$ 、および  $154.4 \pm 27.0 \text{kcal/5min}$  であり、高炭水化物食-高炭水化物食群ではそれぞれ  $25.4 \pm 5.4$ 、 $141.5 \pm 19.1$ 、 $143.5 \pm 21.8$ 、 $144.0 \pm 19.4$ 、および  $146.8 \pm 17.2 \text{kcal/5min}$  であった。全ての時点で、両条件間に有意な差はみられなかった。

表 4 エネルギー消費量

|                | 運動開始直前   | 運動開始後<br>11-15分 | 運動開始後<br>26-30分 | 運動開始後<br>41-45分 | 運動開始後<br>56-60分 |
|----------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 高脂肪食-高炭水化物食群   | 23.6±3.8 | 150.1±25.5      | 155.4±23.1      | 151.8±24.4      | 154.4±27.0      |
| 高炭水化物食-高炭水化物食群 | 25.4±5.4 | 141.5±19.1      | 143.5±21.8      | 144.0±19.4      | 146.8±17.2      |

(kcal/5min)

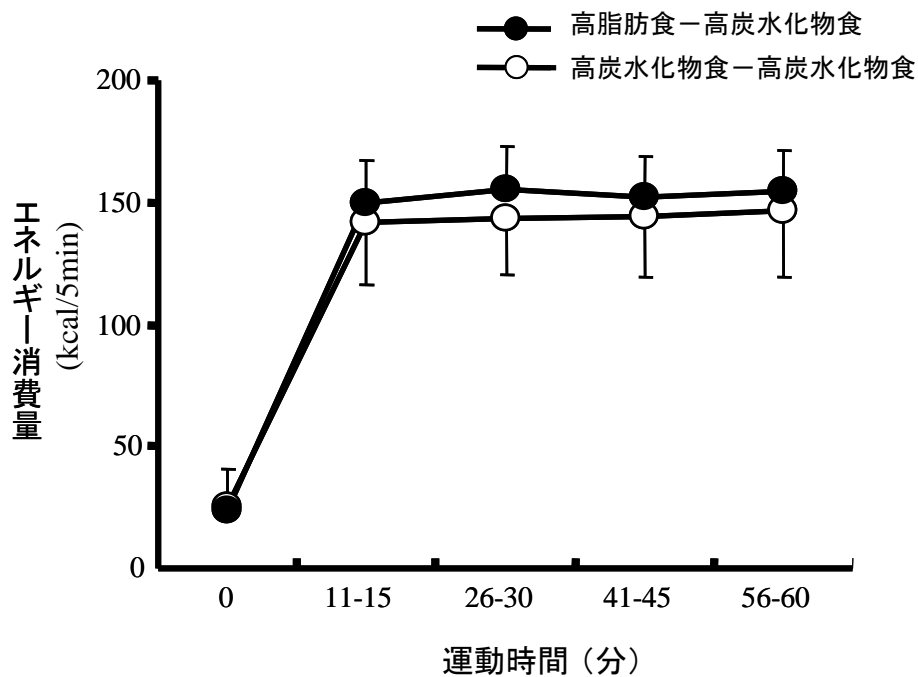


図 6 エネルギー消費量

実験 7 日目、運動試験におけるエネルギー消費量。平均値±標準偏差 (n=6)

#### 2.3.4. 呼吸交換比（表 5）（図 7）

運動開始直前、運動開始 11-15 分、26-30 分、41-45 分、および 56-60 分後の呼吸交換比は高脂肪食-高炭水化物食群でそれぞれ  $0.92 \pm 0.04$ 、 $0.91 \pm 0.06$ 、 $0.88 \pm 0.04$ 、 $0.86 \pm 0.05$  mg/dl、および  $0.86 \pm 0.04$  であり、高炭水化物食-高炭水化物食群ではそれぞれ  $0.95 \pm 0.03$ 、 $0.96 \pm 0.05$ 、 $0.93 \pm 0.04$ 、 $0.92 \pm 0.05$  および  $0.90 \pm 0.04$  mg/dl であった。呼吸交換比は運動開始 11-15 分、26-30 分、および 41-45 分後に、高炭水化物食-高炭水化物食群で高脂肪食-高炭水化物食群よりも有意に高い値を示した。

表 5 呼吸交換率

|                | 運動開始直前    | 運動開始後<br>11-15分 | 運動開始後<br>26-30分 | 運動開始後<br>41-45分 | 運動開始後<br>56-60分 |
|----------------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 高脂肪食-高炭水化物食群   | 0.92±0.04 | 0.91±0.06       | 0.88±0.04       | 0.86±0.05       | 0.86±0.04       |
| 高炭水化物食-高炭水化物食群 | 0.95±0.03 | 0.96±0.05       | 0.93±0.04       | 0.92±0.05       | 0.90±0.04       |

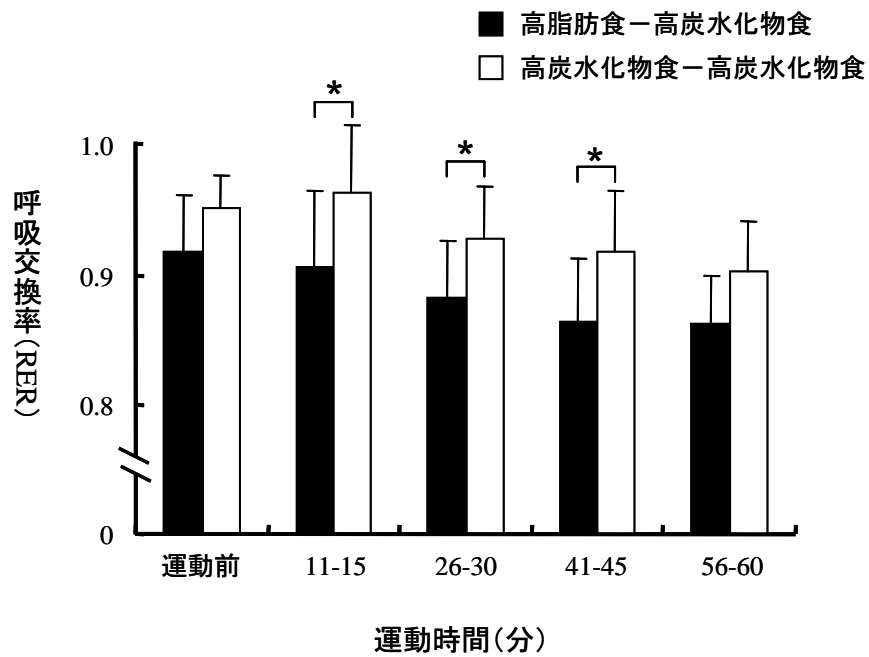


図 7 呼吸交換率

実験 7 日目、運動試験における呼吸交換率。平均値±標準偏差 (n=6)  
高炭水化物食-高炭水化物食 vs.高脂肪食-高炭水化物食, \*: p<0.05

## 第4節 考察

本研究は、従来グリコーゲンにのみ注目されてきた古典的1週間グリコーゲンローディング法において、グリコーゲンローディング効果と共にファットローディング効果を持っているのではないかという視点から、第2章では、栄養処方後の7日目の運動中に、骨格筋細胞内脂肪が積極的にエネルギーとして利用される可能性を、成人男性を被験者とする生理学的研究により検討した。

### 2.4.1. グルコース摂取による脂肪組織からの脂肪酸抑制効果について

皮下や腹腔内の脂肪組織から血中に放出された遊離脂肪酸が抑制された状況で、脂質代謝が促進されれば、骨格筋細胞内脂肪を利用して運動していた可能性が高まると考え、皮下や腹腔内の脂肪組織からの血中放出を抑制するために、血管内にグルコースを投与した。これにより、図4の血清グルコース濃度は両条件群とも安静時レベルを維持し、両条件群間に有意な差がなかった。このことは、2回に分けて投与したグルコースが、運動中両条件群とも血中に放出され一定の濃度を保っていたことを示している。

また、血清遊離脂肪酸は両条件群とも低レベルで推移した。これらの結果から、運動前に摂取したグルコースによって、運動中の皮下や腹腔内の脂肪組織からの脂肪酸動員が抑制できたと考えられる。

血清遊離脂肪酸濃度がグルコース摂取後1時間低下傾向にあったが、それは運動前のグルコース摂取により、脂肪酸のエステル化が進んだこと、ならびにインスリンが分泌された結果、皮下や腹腔内の脂肪組織からの脂肪酸の動員が抑制されたためと考えられる。インスリンは、脂肪分解の最も影響力の強い抑制物質であり、グリセロール3-リン酸の利用を高め、脂肪分解時、放出された

脂肪酸のエステル化を促進し、トリグリセリド合成を刺激するといわれている<sup>(56)</sup>。

#### 2.4.2. グリコーゲンローディング効果について

骨格筋内のグリコーゲン含量を測定するには生筋を採取しなければならない。しかしながら、生筋を採取することは不可能であるため、本研究ではグリコーゲンローディング効果について、骨格筋内グリコーゲン量を測定していない。先行研究では、高脂肪食を 5 日間摂取した後、1 日間 75%の高炭水化物食を摂取すると、6 日間高炭水化物食を摂取した場合と同レベルまでグリコーゲンが増大するという報告がある<sup>(53)</sup>。

したがって、本研究における高脂肪食－高炭水化物食摂取群の摂取方法である 3 日間の高脂肪食摂取後に 3 日間の高炭水化物食を摂取する方法では、骨格筋内グリコーゲン量は実験開始 1 日目よりも増大し、グリコーゲンローディングがおこなわれていると仮定した。

#### 2.4.3. ファットローディング効果について

運動中の呼吸交換率（図 7）は運動開始、11－15 分後、26－30 分後、および 41－45 分後で高脂肪食－高炭水化物食群において、高炭水化物食－高炭水化物食群よりも有意に低い値を示した。図 6 のエネルギー消費量が両群間で差がなく推移したのにもかかわらず、呼吸交換比率は高脂肪食－高炭水化物食群では脂質代謝の寄与率が有意であった。このことは、高脂肪食－高炭水化物食群は高炭水化物食－高炭水化物食群に比べ、糖質代謝とともに運動中のエネルギー源として脂肪酸の酸化分解がより積極的に行なわれていたことを意味すると考えられる。

したがって、高脂肪食－高炭水化物食群は3日間高脂肪食－3日間高炭水化物食摂取によって骨格筋細胞内脂肪の蓄積が促され、運動中にそれが利用された可能性があると考えられる。先行研究では、運動中にグルコースを摂取すると、骨格筋内グリコーゲンの利用は低下したが、骨格筋細胞内脂肪の利用は抑制されなかったという報告<sup>(40)</sup>があり、この報告は本研究から得られたグリコーゲンの利用に比べ、脂肪の酸化が有意であったとの結果と一致している。

#### 2.4.4. 食事期間の効果について

脂質のみの代謝を示す呼吸交換比率値は0.71とされる。最大酸素摂取量の30～40%で運動を開始したときの呼吸交換比率は0.8－0.85であり、次第に低下して脂肪をエネルギー源として利用する比率が高くなるといわれている<sup>(62)</sup>。そして最大酸素摂取量の60%以下の運動では呼吸交換比率はおよそ0.85程度であり、エネルギー源として糖質と脂質が半々に使用されるといわれている<sup>(63)</sup>。本研究では、最も低い値でも高脂肪食－高炭水化物食群の41－45分と56－60分で0.86であった。先行研究では、5日間高脂肪食を摂取した後、1日高炭水化物食を摂取し、最大酸素摂取量70%の運動を行なったときの呼吸交換比率は、120分間の間に0.86から0.82に推移している<sup>(53)</sup>。

骨格筋細胞内脂肪の貯蔵量は実験期間中の食事の影響が大きいという報告<sup>(2,8)</sup>があることから、骨格筋細胞内脂肪の貯蔵と酸化は、食事の組成および摂取期間の影響が大きいと考えられる。

以上のことから、運動後、3日間高脂肪食－3日間高炭水化物食摂取により、骨格筋内脂肪が高率で利用される可能性が示唆された。

#### 2.4.5. 第2章のまとめ

以上、得られた知見をまとめると次のようになる

- ① 成人男性における実験では、高脂肪食－高炭水化物食群と高炭水化物食－高炭水化物食群で 7 日目の運動試験中の血清グルコース濃度、および血清遊離脂肪酸の濃度に有意な差がみられなかった。
- ② 7 日目の運動試験中のエネルギー消費量は、両群に有意な差がなかった。しかしながら、呼吸交換率について運動開始 11 分後から、高脂肪食－高炭水化物食群は高炭水化物食－高炭水化物食群に比べ、エネルギー代謝中に脂質代謝の占める割合が大きく、糖質代謝とともに運動中のエネルギー源として脂肪酸の酸化分解がより積極的に行なわれていた。
- ③ 以上のことから、高脂肪食－高炭水化物食群では、運動中の皮下や腹腔内の脂肪組織からの脂肪酸動員が抑制され、脂質代謝の貢献度が糖質代謝より高いことから、運動中骨格筋細胞内脂肪が高率で利用される可能性が示唆された。



### 第3章 ラットの尺側手根伸筋による古典的1週間グリコーゲン ローディング処方ofファットローディング効果の解明

## 第1節 目的

第2章で成人男性について、高脂肪食－高炭水化物食を摂取した古典的1週間グリコーゲンローディング処方において、運動中、骨格筋内脂肪が高率で利用される可能性が示唆され、糖質代謝と共に脂質代謝も積極的に行われていたことが明らかになった。

そこで、第3章では、骨格筋細胞内にグリコーゲンおよび脂肪がどのくらい蓄積されているのか、また、蓄積されているとしたらどのように蓄積されているのかを明らかにするために、ラットの尺側手根伸筋を用いて組織化学的にグリコーゲンローディング処方のファットローディング効果を究明する。

## 第2節 実験方法

### 3.2.1. 実験対象、実験群、実験食、および実験スケジュール (図 8, 9)

平均体重 200 g の 6 週齢 Wistar 系雄ラット 36 匹 (日本クレア (株)、東京) を 1 週間予備飼育した。予備飼育期間には実験動物用粉末飼料 CE-2 (日本クレア (株)、東京) の食餌を与え、予備飼育期間と本実験期間を通して、1 日 2 食制とした。予備飼育開始 3 日目から 6 日間、実験開始日の前日までラットを 1 日 30 分遊泳させ、トレーニングさせた<sup>(64-66)</sup>。そして、本実験開始日 (1 日目) に 6 匹を除き 30 匹に疲労困憊遊泳運動を負荷した。非運動ラット 6 匹と、疲労困憊運動負荷ラットのうち 6 匹を屠殺したあと、残りのラットを高炭水化物食－高炭水化物食群 (n=12) および高脂肪食－高炭水化物食群 (n=12) に分けた。本実験期間中の食餌成分は高脂肪食 (たんぱく質 : 脂質 : 炭水化物 = 25 : 70 : 5 %, 551 kcal / 100 g)、高炭水化物食 (たんぱく質 : 脂質 : 炭水化物 = 25 : 5 :

70 %, 330 kcal / 100 g) とし、飲水は自由とした。実験期間中 (6 日間) 2、3、5、および 6 日目には、10 分の遊泳運動を負荷した。高炭水化物食—高炭水化物食群には実験開始 1 日目の夜から 7 日目の朝まで高炭水化物食をあたえ、実験 4 日目と 7 日目 (実験終了日) に 6 匹ずつ屠殺した。高脂肪食—高炭水化物食群には実験開始 1 日目の夜から 4 日目の朝までの初め 3 日間に高脂肪食、その後 4 日目夜から 7 日目朝までの 3 日間には高炭水化物食を与え、4 日目と 7 日目に 6 匹ずつ屠殺した。

実験飼育室の明暗サイクルは 7:00—19:00 を明期、19:00—7:00 を暗期とした。9:30—および 18:30—に、1 食あたり 8.5 g / 匹の食餌を与えた。

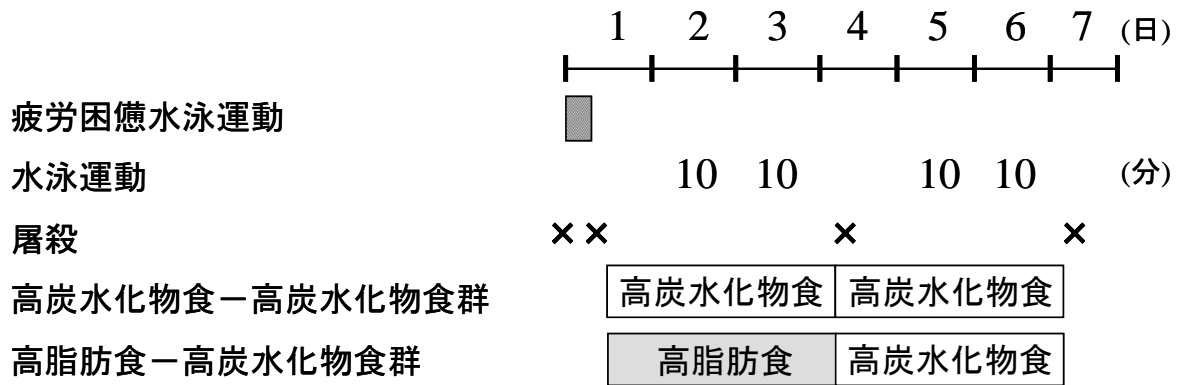


図 8 ラットによる実験スケジュール



図 9 ラットの 1 日の食餌および運動時間スケジュール

### 3.2.2. 運動負荷法

プラスチック製バケツ（直径 500×高さ 545 mm）に深さ 50cm まで温水（32～37 °C）をいれた遊泳運動装置で、ラットを遊泳させた。予備飼育開始 3 日目から 6 日間、1 日目の前日まで体重あたり 1～2 %の錘を胴体に装着して、ラットを 1 日 30 分遊泳させた<sup>(64-66)</sup>。1 日目の疲労困憊運動では、ポンプから管を通じて水中に空気泡を送って表層を流水させ負荷をかけた。体重あたり 1～2%の錘を胴体に着けて、12-19 時に疲労困憊まで約 4 時間遊泳させた。疲労困憊の判断は、水面からラットが 7 秒以内に水面に浮上しなくなった時点とした。実験 2、3、5、および 6 日目には、錘を装着せずに 13-15 時に 10 分間遊泳させた。

### 3.2.3. 組織化学的手法

ラットをエタノール吸気法で麻酔し、前腕の伸筋部の一つである尺側手根伸筋を摂取したあと、ドライアイス-アセトンで凍結し、分析まで-80°Cで保存した。

凍結した骨格筋の中間部よりクリオスタットで 10 $\mu$ m の凍結切片を得た。予備実験において、骨格筋の起始部、中間部、停止部の切片を染色し、脂肪滴の分布を確認した結果、ほぼ同じ割合で分布していたことを確認したため、本実験では骨格筋の中間部の切片を使用した。切片をスライドグラスに貼り付けて 60 分間風乾させた。脂肪滴を Oil red O 法<sup>(8)</sup>、グリコーゲンは Periodic acid-Schiff (PAS) 法<sup>(67)</sup>を用いてそれぞれ染色した。

#### (1) グリコーゲン染色 (Periodic acid-Schiff (PAS) 染色法)

PAS 法を用いて染色した切片を光学顕微鏡(BX61; Olympus Optical, Tokyo, Japan)で映し出し、染色された切片の光学顕微鏡の画像を 3 枚（各画像

173,304 $\mu\text{m}^2$ ) ランダムにデジタルカメラ (C9100; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan, DP70; Olympus Optical, Tokyo, Japan) で $\times 20$  に撮影した。そして、この撮影した画像をコンピューターに取り込み、それぞれの画像に占めるグリコーゲン濃度をフリーソフトの NIH image の image J for Windows software version 1.40 を用いて解析した。PAS 染色により紫色に染められたグリコーゲンの画像 (図 10) をグレースケールに変換し、濃度ヒストグラムを取得した。なお、図 10 の白色の細胞はグリコーゲンが枯渇している細胞である。

さらに、濃度ヒストグラムを数値化し、画像中における各画素値を求めた。その後、Excel のワークシートに読み込み、平均画素値を算出した。各群のグリコーゲン量の値として、各群 6 匹それぞれの画像の平均を出し、各群 6 匹の平均を群の平均とした。

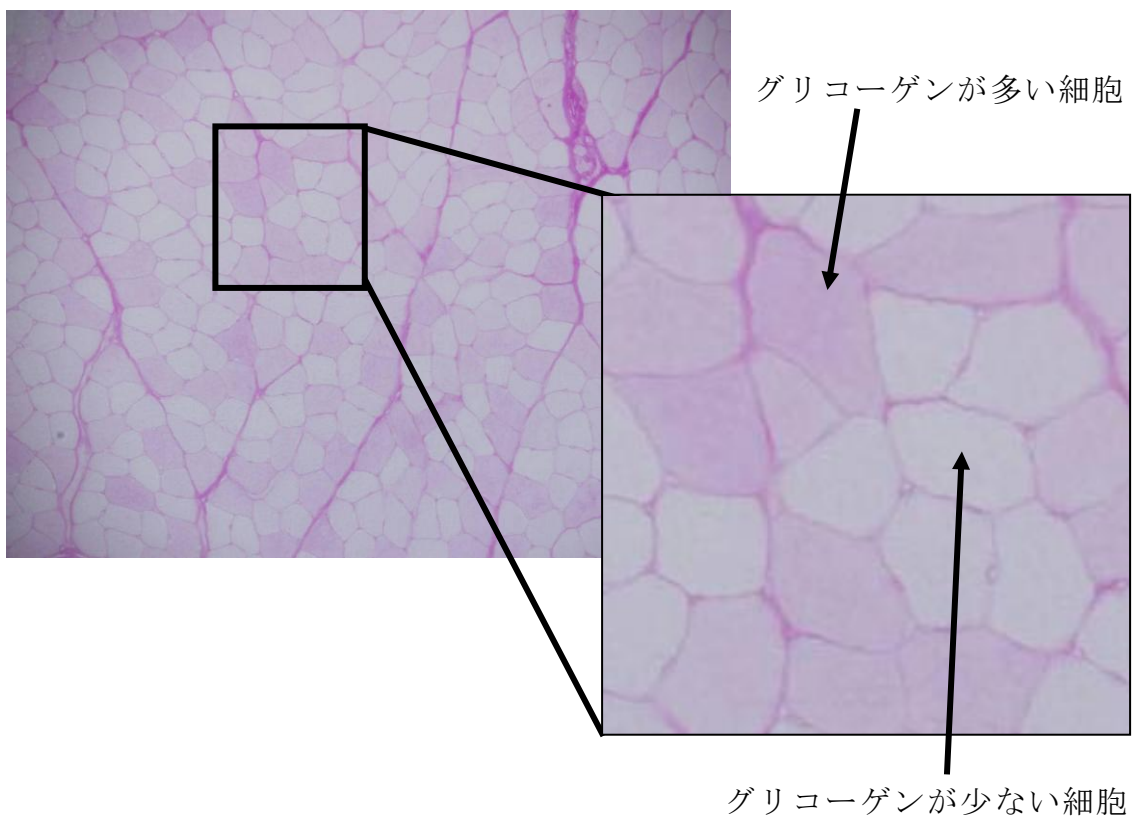


図 10 骨格筋切片のグリコーゲン染色画像

## (2) 脂肪滴染色 (Oil red O 染色法)

Oil red O 染色した切片を蛍光顕微鏡 (BX61; Olympus Optical, Tokyo, Japan) で映し出し、染色された切片の蛍光顕微鏡による画像を 5 枚 (各画像  $31,117\mu\text{m}^2$ ) ランダムにデジタルカメラ (C9100; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan, DP70; Olympus Optical, Tokyo, Japan) で  $\times 20$  に撮影した。図 11 は、Oil re O 染色した切片を蛍光顕微鏡で映し出し、デジタルカメラで  $\times 20$  に撮影した画像であるが、明るく光っている点が細胞内に貯蔵されている脂肪滴である。そして、この撮影した画像をコンピューターに取り込み、それぞれの画像に占める脂肪滴の染色面積を NIH image の image J for Windows software version 1.40 を用いて解析した。その後、コンピューターの画面上で閾値を設定し、脂肪滴部分の選択を行い、脂肪滴として光る部分を黒く、その他の部分を白く二値値し、不要な部分は消去した。黒色と白色の画像中に占める割合を算出することで、脂肪滴の細胞中に占める割合を算出した。測定値を Excel のワークシートに読み込み、各画像の全体の面積を算出し、脂肪滴部分の面積と画像全体の面積から切片画像中における脂肪滴部分の割合 (%) を算出した。そして、各群 6 匹それぞれの画像中の平均を出し、各群 6 匹の平均を各群の脂肪滴含量の割合 (%) とした。



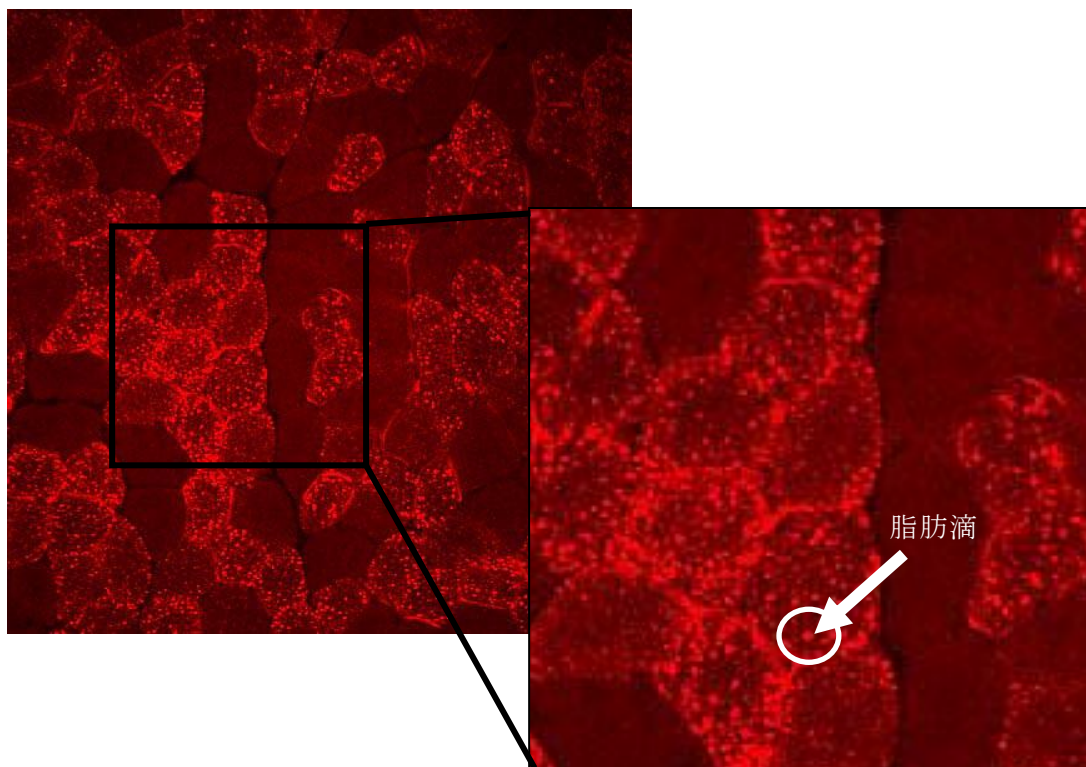


図 11 骨格筋切片の脂肪滴染色画像

#### 3.2.4. 統計分析

高脂肪食－高炭水化物食群と高炭水化物食－高炭水化物食群における骨格筋内脂肪量とグリコーゲン量の値に関して、2群間の比較には Mann-Whitney U 検定を用い、各群間の実験期間中の経日変動の比較にはチューキー検定法を用いた。

## 第3節 結果

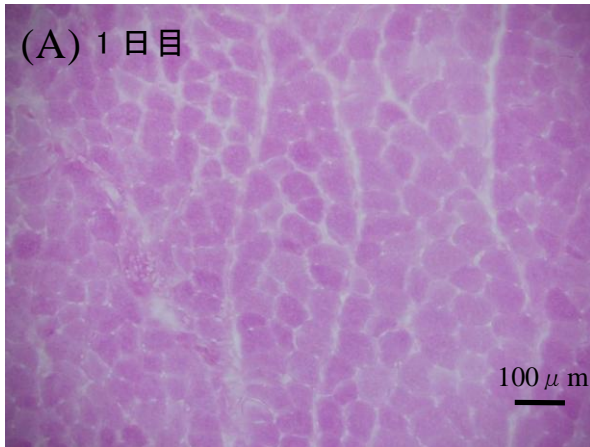
### 3.3.1. 骨格筋細胞内グリコーゲン顆粒濃度

図12は、高脂肪食－高炭水化物食群と高炭水化物食－高炭水化物食群の尺側手根伸筋からスライスして得られた切片のグリコーゲンを染色したグリコーゲン顆粒濃度の写真である。本研究では、試料として用いた筋をスライスして得られた切片からランダムに3枚抽出して分析を行ったが、ここで示した染色写真は、その3枚の中の1枚である。

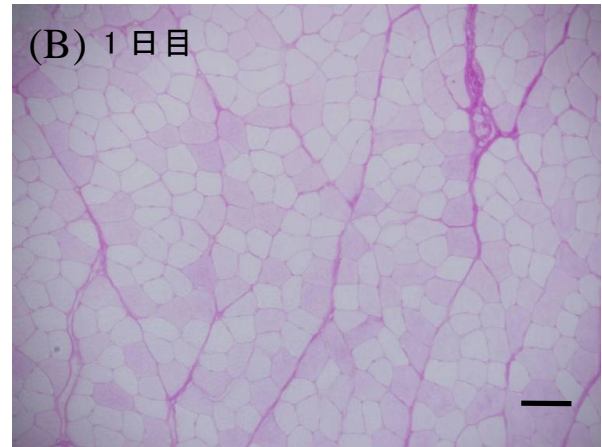
(A)は疲労困憊運動前の染色画像、(B)は疲労困憊運動後の染色画像、(C)は4日目の高脂肪食摂取後の高脂肪食－高炭水化物食群の染色画像、(D)は4日目の高炭水化物食摂取後の高炭水化物食－高炭水化物食群の染色画像、(E)は7日目の高炭水化物食摂取後の高脂肪食－高炭水化物食群の染色画像、(F)は7日目の高炭水化物食摂取後の高炭水化物食－高炭水化物食群の染色画像をそれぞれ示している。

また、画像の紫色の染色濃度が高いほど、骨格筋細胞内にグリコーゲンが多く取り込まれ貯蔵されていることを示しているが、グリコーゲン染色を施したラットの切片は、同一ラットの切片ではないため、得られた画像間での比較には限界がある。

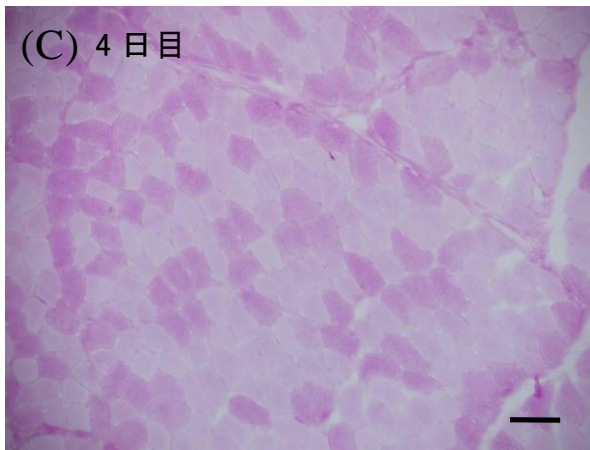
切片中の細胞はすべての細胞で染色されていることから、細胞間で隔たりなくグリコーゲン顆粒が蓄積されているが、細胞毎の濃度に差異があり含量は異なった。また、グリコーゲン顆粒の減少過程には各細胞の染色濃度に差異がみられ、細胞毎の濃淡に違いがみられた。



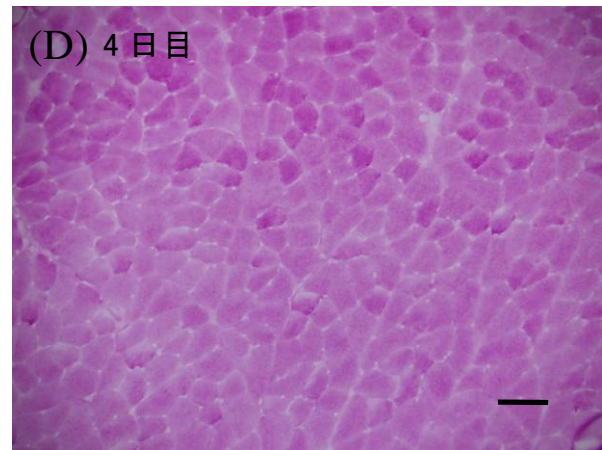
疲労困憊運動前



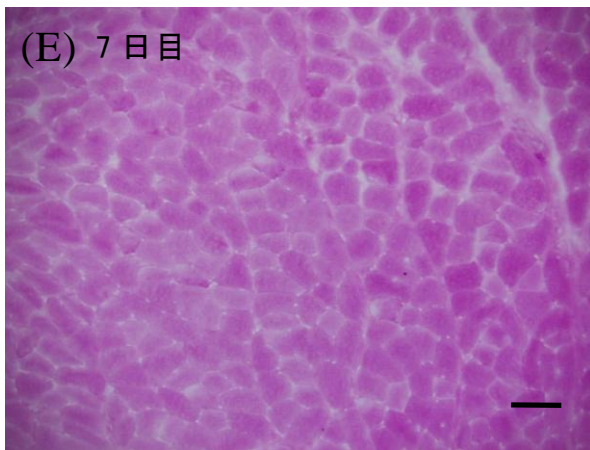
疲労困憊運動後



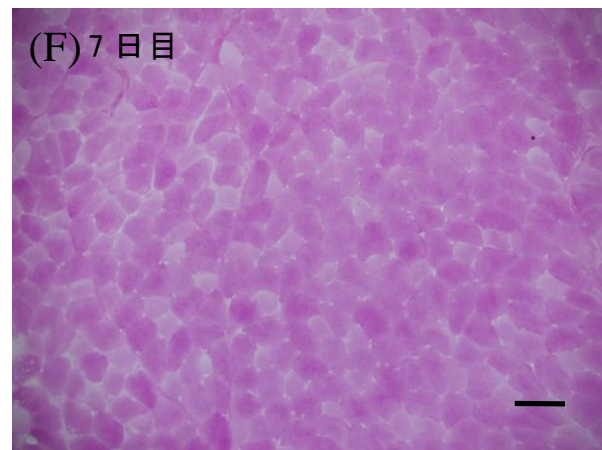
高脂肪食－高炭水化物食群



高炭水化物食－高炭水化物食群



高脂肪食－高炭水化物食群



高炭水化物食－高炭水化物食群

図 12 尺側手根伸筋のグリコーゲン染色写真(PAS 染色)

(A) 疲労困憊運動前 (B) 疲労困憊運動後 (C) 高脂肪食摂取後 4 日目  
(D) 高炭水化物食摂取後 4 日目 (E) 高炭水化物食摂取後 7 日目 (F) 高炭水化物食摂取後 7 日目

### 3.3.2. 骨格筋細胞内グリコーゲン含量

図 13 は、図 12 の染色写真に占めるグリコーゲンの顆粒濃度を分析し、グリコーゲン顆粒濃度として示したものである。このグリコーゲン顆粒濃度は、骨格筋細胞内のグリコーゲン含量を反映していることから、ここでは、グリコーゲン顆粒濃度を骨格筋細胞内のグリコーゲン含量とした。

図 13 を見ると、骨格筋細胞内グリコーゲン含量は 1 日目の疲労困憊運動前 ( $79.0 \pm 8.8$ ) から運動直後 ( $50.4 \pm 8.1$ ) に 36% 減少した ( $p < 0.01$ )。その後、高炭水化物食—高炭水化物食群では 1—3 日の高炭水化物食期後である 4 日目の骨格筋細胞内グリコーゲン含量 ( $98.2 \pm 3.8$ ) は、疲労困憊運動前 ( $79.0 \pm 8.8$ ) から比べて 24% 増加 ( $p < 0.05$ ) した。また、4—6 日の高炭水化物食期後である 7 日目の骨格筋細胞内グリコーゲン含量 ( $96.9 \pm 12.2$ ) は疲労困憊運動前 ( $79.0 \pm 8.8$ ) と比べると 18% 増加 ( $p < 0.05$ ) していたが、4 日目に比べると有意な差が認められなかった。4 日目の高脂肪食—高炭水化物食群 ( $75.9 \pm 3.5$ ) と高炭水化物食—高炭水化物食群 ( $98.2 \pm 3.8$ ) には有意な差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。一方、高脂肪食—高炭水化物食群では 1—3 日の高脂肪食期後である 4 日目の骨格筋細胞内グリコーゲン含量 ( $75.9 \pm 3.5$ ) は疲労困憊運動前 ( $79.0 \pm 8.8$ ) と有意な差が認められなかったが、疲労困憊運動前のレベルに回復した。また、4—6 日の高炭水化物食期後の 7 日目 ( $102.4 \pm 14.2$ ) には疲労困憊運動前 ( $79.0 \pm 8.8$ ) に比べ 30% 増量 ( $p < 0.01$ ) した。さらに、1—3 日の高脂肪食期後の 4 日目 ( $75.9 \pm 3.5$ ) と 4—6 日の高炭水化物食期後の 7 日目 ( $102.4 \pm 14.2$ ) の骨格筋細胞内グリコーゲン含量は著しく増加 ( $p < 0.01$ ) していた。7 日目における筋肉グリコーゲン含量は高炭水化物食—高炭水化物食群に比べて高脂肪食—高炭水化物食群では高値を示したものの、有意な差は認められなかった。

表 6 尺側手根伸筋繊維に占めるグリコーゲン顆粒濃度

|                 | 疲労困憊運動前  | 疲労困憊運動後  | 4日目      | 7日目        |
|-----------------|----------|----------|----------|------------|
| 高脂肪食-高炭水化物食群    | 79.0±8.8 | 50.4±8.1 | 75.9±3.5 | 102.4±14.2 |
| 高炭水化物食群-高炭水化物食群 |          |          | 98.2±3.8 | 96.9±12.2  |

(AU)

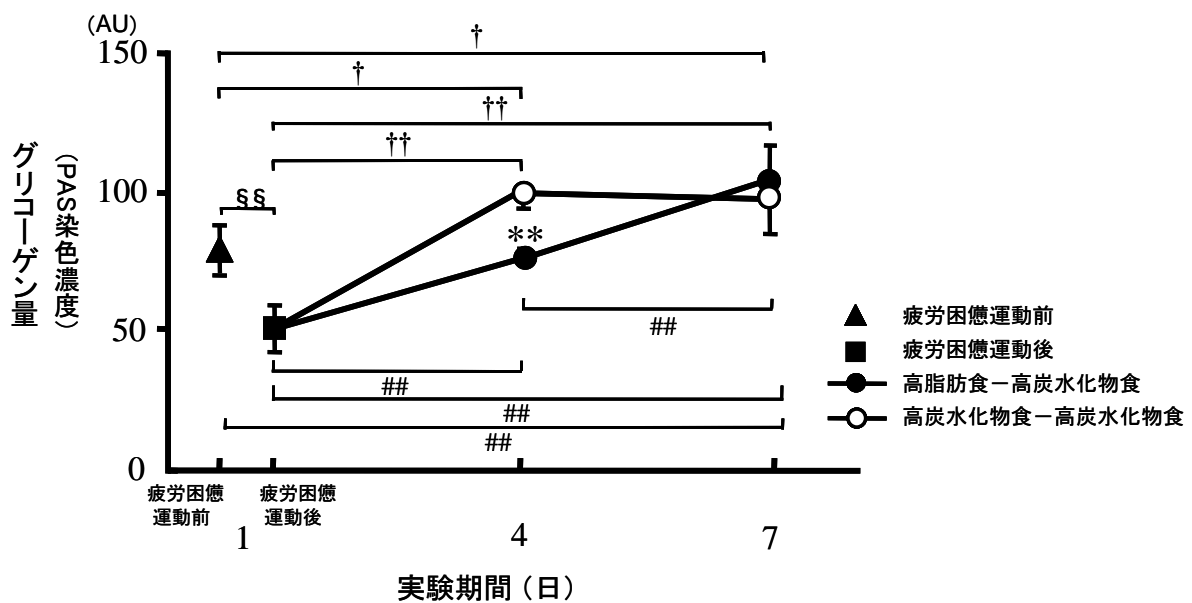


図 13 尺側手根伸筋繊維に占めるグリコーゲン顆粒濃度

平均値±標準偏差 (n=6)。 疲労困憊運動前 vs.疲労困憊運動後, §§ : p < 0.01 ;  
 疲労困憊運動前 vs. 疲労困憊運動後 vs. 4日目高脂肪食-高炭水化物食 vs.  
 7日目高脂肪食-高炭水化物食, ## : p < 0.01 ; # : p < 0.05 ;  
 疲労困憊運動前 vs. 疲労困憊運動後 vs. 4日目高炭水化物食-高炭水化物食 vs.  
 7日目高炭水化物食-高炭水化物食, †† : p < 0.01 ; † : p < 0.05 ;  
 4日目高脂肪食-高炭水化物食 vs. 4日目高炭水化物食-高炭水化物食, \*\* : p < 0.01 ;

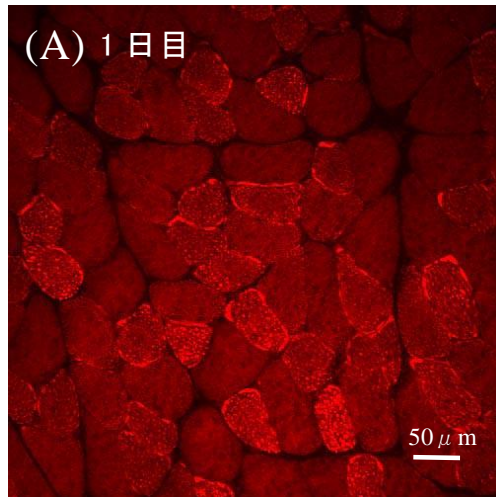
### 3.3.3. 骨格筋細胞内脂肪滴

図 14 は、高脂肪食－高炭水化物食群と高炭水化物食－高炭水化物食群の尺側手根伸筋からスライスして得られた切片の脂肪滴を染色した写真である。本研究では、試料として用いた筋をスライスして得られた切片からランダムに 5 枚抽出して分析を行ったが、ここで示した染色写真は、その 5 枚の中の 1 枚である。

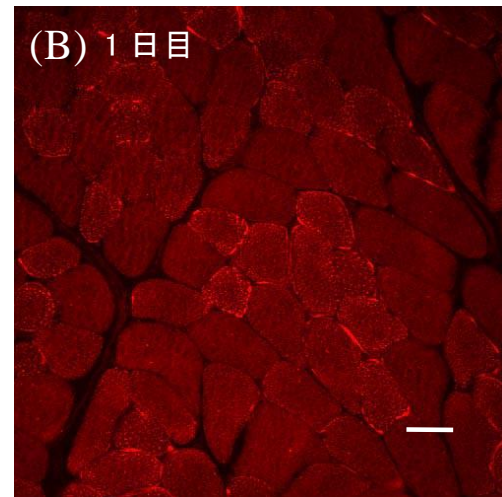
(A) は疲労困憊運動前の染色画像、(B) は疲労困憊運動後の染色画像、(C) は 4 日目の高脂肪食摂取後の高脂肪食－高炭水化物食群の染色画像、(D) は 4 日目の高炭水化物食摂取後の高炭水化物食－高炭水化物食群の染色画像、(E) は 7 日目の高炭水化物食摂取後の高脂肪食－高炭水化物食群の染色画像、(F) は 7 日目の高炭水化物食摂取後の高炭水化物食－高炭水化物食群の染色画像をそれぞれ示している。

また、細胞中の明るく光っている点が細胞内に貯蔵されている脂肪滴であるが、染色を施したラットの切片は、同一ラットの切片ではないため、得られた画像間での比較には限界がある。

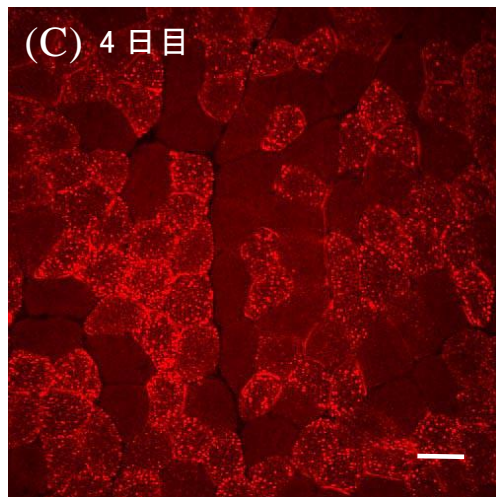
各画像とも脂肪滴が蓄積されている細胞と蓄積されていない細胞があった。また、細胞内の脂肪滴の蓄積は細胞膜に隣接して細胞を縁取るように貯蔵されていた。



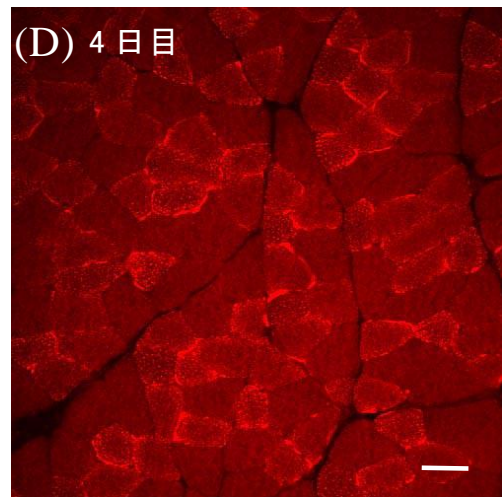
(A) 1日目  
疲労困憊運動前



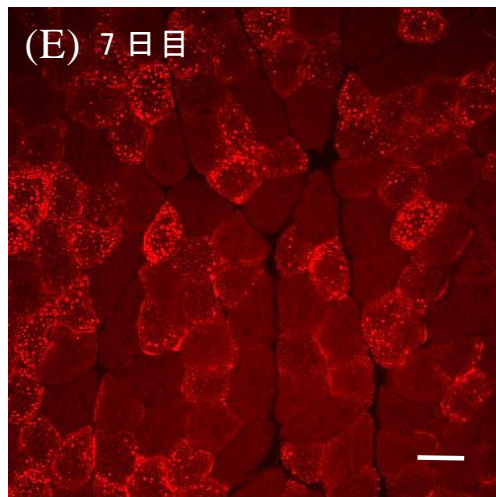
(B) 1日目  
疲労困憊運動後



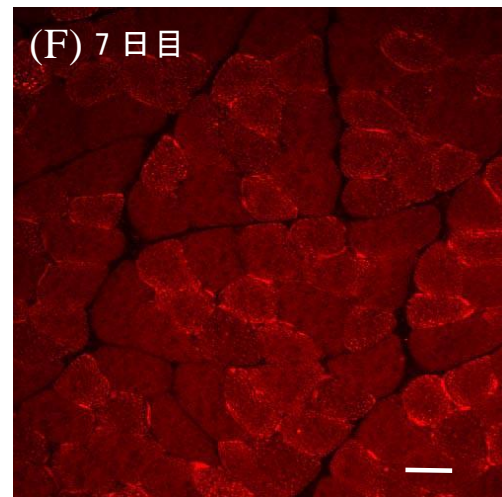
(C) 4日目  
高脂肪食—高炭水化物食群



(D) 4日目  
高炭水化物食—高炭水化物食群



(E) 7日目  
高脂肪食—高炭水化物食群



(F) 7日目  
高炭水化物食—高炭水化物食群

図 14 尺側手根伸筋の脂肪滴染色写真(Oil red O 染色)

(A) 疲労困憊運動前 (B) 疲労困憊運動後 (C) 高脂肪食摂取後 4 日目  
(D) 高炭水化物食摂取後 4 日目 (E) 高炭水化物食摂取後 7 日目 (F) 高炭水化物食摂取後 7 日目



#### 3.3.4. 骨格筋細胞内脂肪滴含量

図 15 は、図 14 の染色写真に示した骨格筋線維に占める細胞内の脂肪滴面積の割合を示したものである。この骨格筋線維に占める細胞内の脂肪滴面積の割合は、骨格筋細胞内の脂肪含量を反映していることから、ここでは、骨格筋線維に占める細胞内の脂肪滴面積の割合を骨格筋細胞内脂肪含量とした。

図 15 を見ると、1 日目の疲労困憊運動前 ( $5.0 \pm 1.2$ ) に比べて疲労困憊運動直後 ( $3.5 \pm 0.7$ ) には 30% 減少 ( $p < 0.05$ ) した。その後、高脂肪食－高炭水化物食群では 4 日目 ( $7.4 \pm 1.6$ ) に疲労困憊運動前 ( $5.0 \pm 1.2$ ) の値と比べて 48% 増加 ( $p < 0.01$ ) し、4 日目から 7 日目にかけてはわずかに減少したが有意な差はみられなかった。高炭水化物食－高炭水化物食群では骨格筋細胞内脂肪含量は 1 日目から 7 日目 ( $3.4 \pm 1.0$ ) にかけて疲労困憊運動前 ( $5.0 \pm 1.2$ ) と有意な差はなく、一定のレベルを維持したといえる。4 日目には高脂肪食－高炭水化物食群 ( $7.4 \pm 1.5$ ) は高炭水化物食－高炭水化物食群 ( $5.2 \pm 1.0$ ) に比べ 30% 高く ( $p < 0.05$ )、7 日目には高脂肪食－高炭水化物食群 ( $5.7 \pm 0.8$ ) は高炭水化物食－高炭水化物食群 ( $3.4 \pm 1.0$ ) に比べ、32% 高かった ( $p < 0.01$ )。結果、骨格筋細胞内脂肪含量は高脂肪食－高炭水化物食群で 7 日間を通じて高レベルを維持していた。

表 7 尺側手根伸筋に占める脂肪滴面積の割合

|                 | 疲労困憊運動前 | 疲労困憊運動後 | 4日目     | 7日目     |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|
| 高脂肪食－高炭水化物食群    | 5.0±1.2 | 3.5±0.7 | 7.4±1.6 | 5.7±0.8 |
| 高炭水化物食群－高炭水化物食群 |         |         | 5.2±1.0 | 3.4±1.0 |

(%)

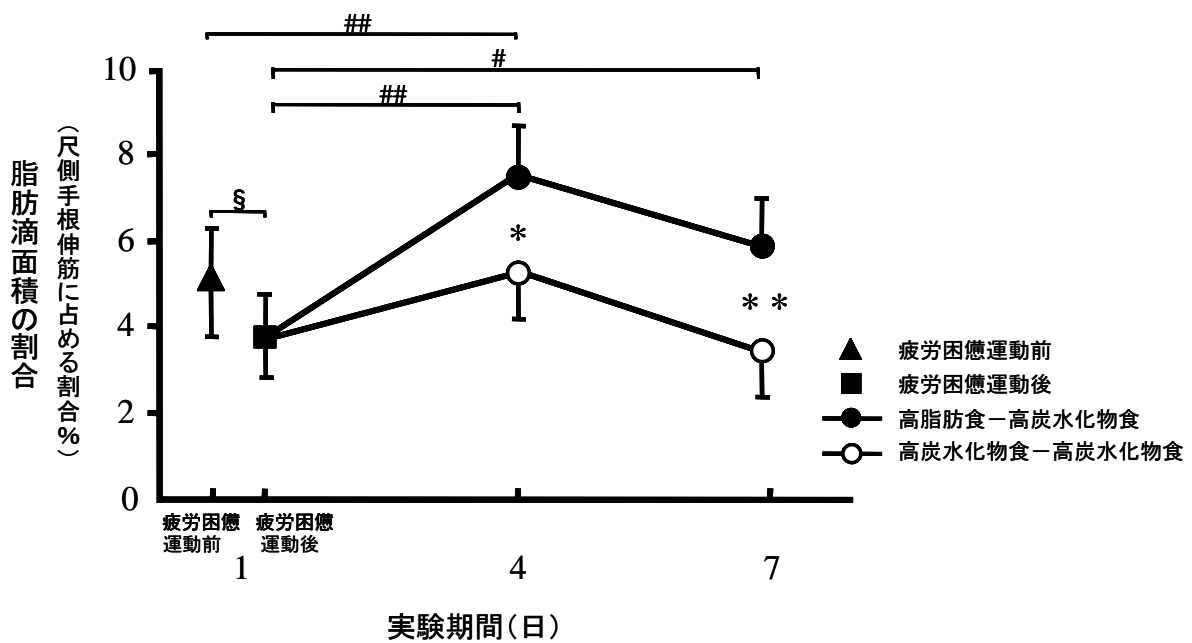


図 15 尺側手根伸筋に占める脂肪滴面積の割合

平均値±標準偏差 (n=6)。 疲労困憊運動前 vs. 疲労困憊運動後, § : p < 0.05 ;

疲労困憊運動前 vs. 疲労困憊運動後 vs. 4日目高脂肪食－高炭水化物食 vs.

7日目高脂肪食－高炭水化物食, ## : p < 0.01 ; # : p < 0.05 ;

4日目高脂肪食－高炭水化物食 vs. 4日目高炭水化物食－高炭水化物食, \* : p < 0.05 ;

7日目高脂肪食－高炭水化物食 vs. 7日目高炭水化物食－高炭水化物食, \*\* : p < 0.01 ;

## 第4節 考察

第2章で成人男性について、高脂肪食－高炭水化物食を摂取した古典的1週間グリコーゲンローディング処方において、運動中、骨格筋細胞内脂肪が高率で利用される可能性が示唆され、糖質代謝と共に脂質代謝も積極的に行われていたことが明らかになった。

この結果をもとに、第3章ではラットの上肢前腕部分にある尺側手根伸筋を試料として、古典的1週間グリコーゲンローディング処方の骨格筋細胞内のグリコーゲン蓄積作用と脂肪蓄積作用を組織化学的分析方法により、定性的かつ定量的に検討した。

本章の実験で上肢前腕伸筋部である尺側手根伸筋を選択した理由は、ラットの遊泳運動では前腕が優位に使われ、特に前腕の伸筋部である尺側手根伸筋は手首の使用する筋肉として貢献しているのではないかと考えたためである。

### 3.4.1. 骨格筋細胞内グリコーゲン顆粒と脂肪滴の含量と分布特性

ここでは、尺側手根伸筋線維を組織化学的に分析した顕微鏡の染色写真から、骨格筋細胞内のグリコーゲン顆粒および脂肪滴の含量と貯蔵分布を観察して得られた知見を考察する。

#### (1) 疲労困憊運動前と後4日目のグリコーゲン顆粒および脂肪滴

図13は、尺側手根伸筋線維に占めるグリコーゲン顆粒濃度を示したものであるが、このグリコーゲン顆粒濃度の値が高いほど骨格筋細胞内のグリコーゲン含量が多いと解釈できる<sup>(67)</sup>。

図15は尺側手根伸筋線維に占める脂肪滴面積の割合を示したものであるが、

この値が高いほど骨格筋細胞内に脂肪滴が多く貯蔵されていると解釈できる<sup>(8)</sup>。

尺側手根伸筋線維細胞内のグリコーゲン含量および脂肪含量について、1日目の疲労困憊運動前後の値は減少した。この結果は、古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方<sup>(64)</sup>の先行研究<sup>(64)</sup> および運動時に骨格筋細胞内脂肪含量の減少を示唆した先行研究<sup>(70,71)</sup>と一致していた。

経日的変動をみると、尺側手根伸筋線維細胞内のグリコーゲン含量は両群の4日目に差はあるものの、7日目には両群とも近い値を示した。一方、尺側手根伸筋線維細胞内の脂肪含量について、高炭水化物食—高炭水化物食群は疲労困憊運動前—4日目—7日目の経日的な変動は少なく推移しているが、高脂肪食—高炭水化物食群では高炭水化物食—高炭水化物食群に比べ4日目と7日目で有意であり、4日目—7日目の減少率は近い値を示したが4日目—7日目に有意な差はなかった。

グリコーゲン含量について、疲労困憊運動後—4日目で高炭水化物食—高炭水化物食群が運動前のレベルを上回る回復を示したことは、1—3日目に高炭水化物を摂取したことによるものと考えられる。これに対し、高脂肪食—高炭水化物食群が疲労困憊運動前のレベルを回復していたことは、1—3日目に高脂肪食を中心とした食事でも、炭水化物が5%程度でも含まれていれば疲労困憊運動前のレベルを回復することを示したものと考えられる。

脂肪滴の含量について、疲労困憊運動後—4日目で高脂肪食—高炭水化物食群の脂肪の貯蓄が顕著に増加したことは、1—3日目に高脂肪食を摂取したことによるものと考えられる<sup>(64)</sup>。これに対し、高炭水化物食—高炭水化物食群では炭水化物食に含まれる脂肪が5%程度でも疲労困憊運動前のレベルを回復していた。

これらのことは、両摂取方法ともグリコーゲンおよび脂肪の含量が疲労困憊

運動前レベルもしくはそれ以上に回復し、古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方がファットローディング効果を併せもつことを示唆するものである。しかしながら、単位が異なるので比較は相対的なものに留まり、絶対的な比較には限界があるため、細胞内に取り込んだエネルギー量の比較はできないため、今後はエネルギー量を絶対的に評価し検討する必要があるであろう。

## (2) 4 日目－7 日目のグリコーゲン顆粒

4 日目－7 日目で、高炭水化物食－高炭水化物食群は高炭水化物食摂取にもかかわらずグリコーゲン含量は維持されていた。1－3 日目に続く 4－6 日目の高炭水化物食摂取によりグリコーゲン含量は増加しそうなものであるが、4 日目－7 日目で維持されるに留まったことは、高炭水化物食を摂取しても 4 日目以上の蓄積が見込めないことを意味するものとも考えられる。この点は、先行研究<sup>(3, 26)</sup>がグリコーゲンの超回復に要する期間を約 3 日としていることとも関連し、この方法の超回復に要する期間は 3 日前後であると考えられる。本研究では 4 日目のグリコーゲン含量は疲労困憊前の含量と比べ 1.24 倍の増加であった。先行研究<sup>(3, 26)</sup>では、1.5～2.0 倍の増加があったことを報告しているが、この点で本研究結果は先行研究と異なっていた。このことは超回復作用と関連して考えるならば、グリコーゲンを枯渇させる目的で行った疲労困憊運動の負荷が不足し枯渇にまでは至らず、超回復効果が少なかったためと考えられる。しかしながら、運動負荷によるグリコーゲン量の枯渇は、運動強度および遊泳時間による影響が大きく<sup>(65)</sup>、技術的にも難しいと考えられる。また、4 日目と 7 日目を図 12 の (D) と (F) でみると、細胞毎の含量に違いがあるもののすべての細胞に蓄積されており、この傾向は (F) において顕著であった。このことは、貯蔵されたグリコーゲンを優先的に利用した筋線維とそうでない筋線維が存在す

ることを示しているとも考えられる。この点、細胞内のグリコーゲン貯蔵を生化学的に分析した先行研究によると、グリコーゲンは筋細胞内のミトコンドリアとミトコンドリアの間にでんぷん顆粒として貯蔵されているとの報告もあることから、筋線維の違いなどによりミトコンドリアの数に違いがあるとすると、優先的にグリコーゲンを利用した筋線維とそうでない筋線維があると考えられる。

これに対し、4日目－7日目における高脂肪食－高炭水化物食群のグリコーゲン含量が増加していたことは、4－6日の高炭水化物食摂取によるものと考えられる。そして、7日目の高脂肪食－高炭水化物食群は高炭水化物食－高炭水化物食群と近い値を示したことは、蓄積の限界を意味するか否かを考えると、両群のピーク値に対応した図12の(D)と(E)をみると細胞毎の含量に違いがあるもののすべての細胞に蓄積されており蓄積傾向は形式的に類似している。しかしながら、高脂肪食－高炭水化物食群では高脂肪食を高炭水化物食の前に摂取していることから、骨格筋のインスリン感受性が高進し、更なるグリコーゲンの蓄積が見込まれると考えることもできる。

今後は、グリコーゲンおよび脂肪の蓄積について、構造的かつ機能的側面から詳細な検討が必要であろう。

### (3) 疲労困憊運動前および後－4日目－7日目の脂肪滴

図14に示した尺側手根伸筋の脂肪滴染色写真をみると、脂肪滴は細胞膜を内側から縁取るように接して貯蔵され、脂肪滴含量がさらに増加すると細胞の中心付近に貯蔵されるようである。脂肪滴の貯蔵についての先行研究によれば、脂肪滴は筋線維内のミトコンドリア近くに貯蔵されているとの報告がある。本研究の結果と先行研究を合わせて考えると、細胞中心付近に貯蔵された脂肪滴

はミトコンドリア近くに貯蔵されるが、ミトコンドリア近くに貯蔵される前段階の脂肪は、細胞の外から細胞膜を通して取り込まれ、取り込まれた脂肪は脂肪滴として細胞膜に内接して貯蔵されると考えられる。

また、脂肪滴が多く確認できる骨格筋細胞とそうでない骨格筋細胞があった。このことは、Koopman et al. (2006) や Stellingwerff et al. (2007) の行った骨格筋切片に Oil red O 染色を行い蛍光顕微鏡により確認した研究での、骨格筋細胞間での脂肪滴蓄積に蓄積量の相違があるという研究結果<sup>(40,72)</sup>と一致している。さらに、他の先行研究によれば、遅筋線維と速筋線維における骨格筋細胞内脂肪量は、遅筋線維の方が 3.2 倍多いとの報告もある<sup>(68-72)</sup>。これら先行研究の結果に基づくと、本研究における骨格筋細胞内脂肪滴の貯蔵量の相違は筋線維タイプの違いにより生じたと考えられることもできる。

一方、短期間の高脂肪食摂取では、遅筋線維に比べ速筋線維に貯蔵される割合が高いという報告もある<sup>(73)</sup>。本研究では、3 日間という短期間に高脂肪食を摂取していることから、速筋線維が多い尺側手根伸筋では遅筋線維だけでなく速筋線維細胞にも多く貯蔵されたとも考えられる。

次に、脂肪含量をみてみると、高炭水化物食—高炭水化物食群で 1 日目—3 日目の高炭水化物食に含まれる脂肪 5% 摂取で 4 日目には運動前レベルを回復した。しかしながら、4—6 日には 1—3 日と同じ高炭水化物食に含まれる脂肪 5% 摂取で高脂肪食—高炭水化物食群より減少し、7 日目に有意な差が生じた。1—3 日の摂取量と 4—6 日の摂取量が同じにもかかわらず、4 日目と 7 日目に減少し、疲労困憊運動後に比べ 4 日目に増加であったことは、疲労困憊運動による超回復作用があったとも考えられる。このことを踏まえ、高脂肪食—高炭水化物食群が 1—3 日の高脂肪食摂取により 4 日目に顕著に増加したことは、高脂肪食に

よる骨格筋細胞内脂肪の増加だけでなく、疲労困憊運動による超回復効果があったと考えられる。

また、高脂肪食－高炭水化物食群の疲労困憊運動後と4日目および7日目との比較では有意に増加していた。しかしながら、疲労困憊運動前との比較では4日目との間のみ有意な増加がみられ、7日目との間に有意な増加がみられなかった。このことは、疲労困憊運動による超回復効果が維持できなかったとも考えられるが、それ以上に4-6日の脂肪の摂取量が足りなかったと考える。

さらに、4日目－7日目において、4日目と7日目には両群とも減少傾向にあるものの有意な差がなかったが、両群間の脂肪含量に有意な差があり高脂肪食－高炭水化物食群の脂肪含量の減少率が少なかった。このことは、高炭水化物食を摂取する前に高脂肪食を摂る食べ方が高炭水化物食を摂るよりも骨格筋のインスリン感受性を高進し、脂肪の取り込みに有効であったと考えられる。

#### (4) グリコーゲン含量と脂肪含量

高脂肪食－高炭水化物食群は、1日目の疲労困憊運動後、3日間高脂肪食を摂取したにもかかわらず、骨格筋細胞内グリコーゲン含量は運動前のレベル(4日目)もしくはそれ以上のレベル(7日目)を回復し、骨格筋細胞内脂肪含量は高炭水化物食－高炭水化物食群に比べ上回りながら疲労困憊運動前のレベルを維持した。一方、高炭水化物食－高炭水化物食群の骨格筋細胞内グリコーゲン含量は高脂肪食－高炭水化物食群に比べ4日目に高い値を示したが、7日目には4日目と同じレベルに留まり、高脂肪食－高炭水化物食群とほぼ同じ値になり、骨格筋細胞内脂肪含量は疲労困憊運動前を維持した。

これらのことは、両群ともグリコーゲンローディング効果だけでなくファットローディング効果を併せもつことを示していると考えられるが、その効果は、高



脂肪食－高炭水化物食群において顕著であった。このことは、運動と高脂肪食による筋肉のインスリン感受性の高進作用がグリコーゲンだけでなく脂肪も併せて細胞内に取り込む効果を促したと考えられる。

また、アスリートパラドックスとの関連では、アスリートパラドックスが起こるためにはトレーニングが必要と言われているが、本研究では、トレーニングを行わなかったにもかかわらず、アスリートパラドックス的な作用がみられた。

今後、食事の配合や運動負荷を改善できると、更なる効果が見込めよう。

#### 3.4.2. 第3章のまとめ

以上、得られた知見をまとめると次のようになる。

- ① グリコーゲン顆粒は染色濃度に相違はあるがすべての骨格筋細胞が染色されていた。一方、脂肪滴は骨格筋細胞内に脂肪滴が蓄積されている細胞と蓄積されていない細胞がみられた。蓄積された脂肪滴の分布については、多くが骨格筋細胞膜に隣接し、細胞を縁取るように貯蔵されていた。
- ② 高脂肪食－高炭水化物食群は、1日目の疲労困憊運動後、3日間高脂肪食を摂取したにもかかわらず、骨格筋細胞内グリコーゲン含量は運動前のレベル（4日目）もしくはそれ以上のレベル（7日目）を回復しつつ、骨格筋細胞内脂肪含量は高炭水化物食－高炭水化物食群に比べ有意（ $p < 0.01$ ）に上回りながら疲労困憊運動前（1日目）のレベルを維持した。一方、高炭水化物食－高炭水化物食群の骨格筋細胞内グリコーゲン含量は高脂肪食－高炭水化物食群に比べ4日目に高い値（ $p < 0.01$ ）を示したが、7日目には4日

目と同じレベルに留まり、高脂肪食－高炭水化物食群とほぼ同じ値になり、骨格筋細胞内脂肪含量は疲労困憊運動前を維持した。

- ③ 以上のことから、古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方は、尺側手根伸筋に対してグリコーゲンローディング効果だけでなく、ファットローディング効果を併せ持つことが示唆された。

## 第4章 ラットのヒラメ筋による古典的1週間グリコーゲン ローディング処方脂肪ローディング効果の解明

## 第1節 目的

第3章でラットの尺側手根伸筋について、高脂肪食－高炭水化物食群でグリコーゲンローディング処方はグリコーゲンローディング効果だけでなくファットローディング効果が示唆された。

そこで、下肢においてもグリコーゲンローディング処方のファットローディング効果を確認するために、ラットのヒラメ筋を用いて組織化学的に検討する。

## 第2節 実験方法

### 4.2.1. 実験対象、実験群、実験食、および実験スケジュール

実験対象、実験群、実験食、飲水条件、実験スケジュール、予備飼育期間の食餌および予備飼育期間の運動条件は第3章 3.2.1.と同様である。

しかしながら、第3章と異なる点は以下のとおりである。本章では本実験開始日（1日目）に第3章より負荷を軽減した遊泳運動を行なった。また、実験期間中の食餌を9:00－10:00 および20:00－21:00 の時間内で自由摂取とした。

### 4.2.2. 運動負荷法

予備飼育時の運動、および実験第2、3、5、および6日目の運動は方法、負荷、時間ともに第3章 3.2.2.と同様である。第3章と異なる点は、実験開始日（1日目）の運動が、第3章の実験より負荷を軽減したことである。本章では体重あたり1～2%の錘を胴体に着けて、流水はせず、12－19時に3時間遊泳させた。

### 4.2.3. 組織化学的手法

第3章 3.2.3.と同様に、本章も組織学的手法を用いて骨格筋グリコーゲンと骨格筋細胞内脂肪滴を解析した。第3章と異なる点は、本章ではラットからヒラメ筋を摘出し試料としたことである。ラットをエタノール吸気法で麻酔し、本章ではヒラメ筋を摂取した。凍結したヒラメ筋の中間部よりクリオスタットで10 $\mu$ mの凍結切片を作成し、脂肪をOil red O法で<sup>(8)</sup>、グリコーゲンをPeriodic acid-Schiff (PAS)法でそれぞれ染色した<sup>(67)</sup>。

#### 4.2.4. 統計分析

第3章 3.2.4.と同様の方法で統計分析を行った。

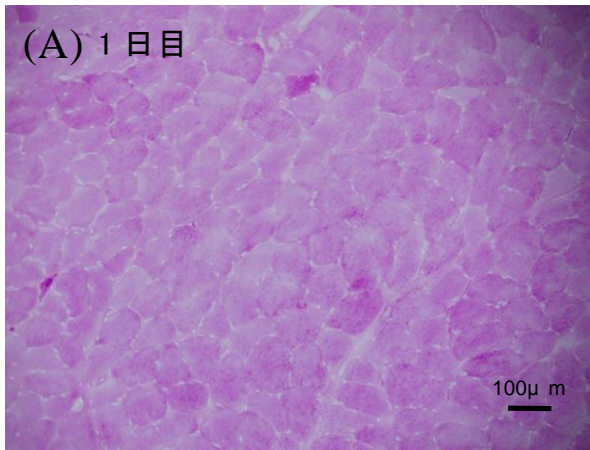
## 第3節 結果

### 4.3.1. 骨格筋細胞内グリコーゲン顆粒濃度

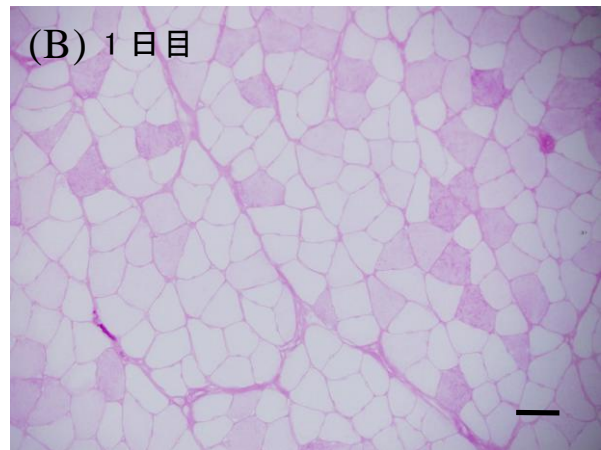
図 16 は、高脂肪食－高炭水化物食群と高炭水化物食－高炭水化物食群のヒラメ筋からスライスして得られた切片のグリコーゲンを染色したグリコーゲン顆粒濃度の写真である。

ここで示した写真の分類は、第3章 3.3.1.と同様である。

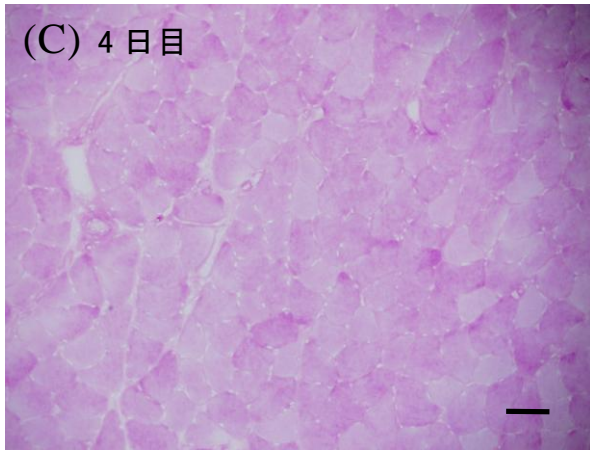
図 16 から得られる所見は、写真の染色の経日変化について第3章 3.3.1.と同様の傾向であった。



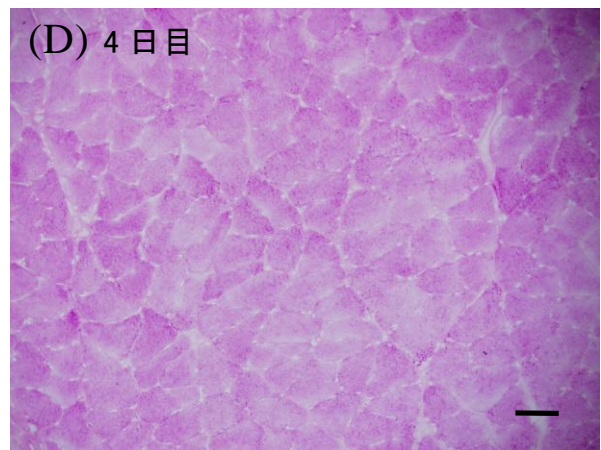
運動前



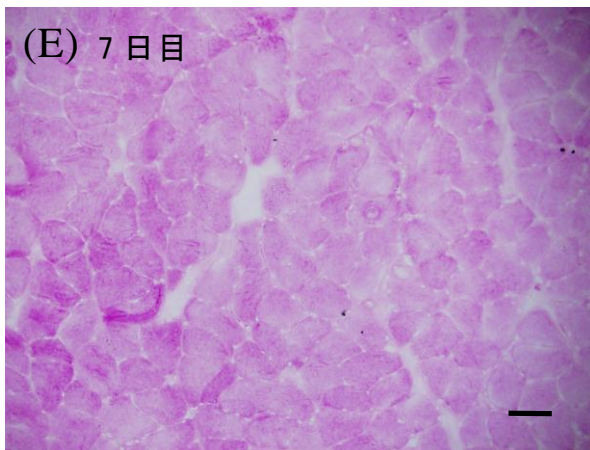
運動後



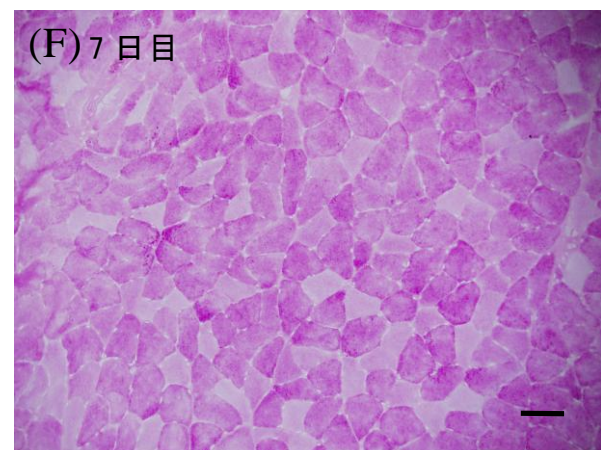
高脂肪食－高炭水化物食群



高炭水化物食－高炭水化物食群



高脂肪食－高炭水化物食群



高炭水化物食－高炭水化物食群

図 16 ヒラメ筋のグリコーゲン染色写真(PAS 染色)

(A) 1 日目運動前 (B) 1 日目運動後 (C) 高脂肪食摂取後 4 日目  
(D) 高炭水化物食摂取後 4 日目 (E) 高炭水化物食摂取後 7 日目 (F) 高炭水化物食摂取後 7 日目

#### 4.3.2. 骨格筋細胞内グリコーゲン含量

図 17 は、図 16 の染色写真に占めるグリコーゲンの顆粒の濃度を分析し、グリコーゲン顆粒濃度として示したものである。ここでは、第 3 章 3.3.2.と同様の理由から、グリコーゲン顆粒濃度を骨格筋細胞内のグリコーゲン含量とした。

そして、図 17 から得られる所見については、第 3 章との比較においてグリコーゲン含量は相違があったが、位相の変動パターンは同様であった。すなわち、グリコーゲン含量は 1 日目の運動前 ( $117.4 \pm 9.0$ ) から運動直後 ( $102.3 \pm 6.9$ ) に 13% 減少 ( $p < 0.01$ ) した。その後、高炭水化物食—高炭水化物食群では 1—3 日の高炭水化物食期後である 4 日目の骨格筋細胞内のグリコーゲン含量 ( $131.5 \pm 11.4$ ) は、運動前 ( $117.4 \pm 9.0$ ) から比べて 11% 増加した。また、4—6 日の高炭水化物食期後である 7 日目の骨格筋細胞内のグリコーゲン含量 ( $123.9 \pm 8.7$ ) は運動前 ( $117.4 \pm 9.0$ ) と比べると 5% 減少していたが、4 日目の高炭水化物摂取後 ( $131.5 \pm 11.4$ ) と比べると有意な差が認められなかった。

4 日目の高脂肪食—高炭水化物食群 ( $111.6 \pm 6.1$ ) と高炭水化物食—高炭水化物食群 ( $131.5 \pm 11.4$ ) には有意な差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。一方、高脂肪食—高炭水化物食群では 1—3 日の高脂肪食期後である 4 日目の骨格筋細胞内のグリコーゲン含量 ( $111.6 \pm 6.1$ ) は運動前 ( $117.4 \pm 9.0$ ) と有意な差が認められなかったが、運動前のレベルに回復した。また、4—6 日の高炭水化物食期後の 7 日目 ( $125.0 \pm 9.7$ ) には運動前 ( $117.4 \pm 9.0$ ) に比べ 6% 増量した。さらに、1—3 日の高脂肪食期後の 4 日目 ( $111.6 \pm 6.1$ ) と 4—6 日の高炭水化物食期後の 7 日目 ( $125.0 \pm 9.7$ ) の骨格筋細胞内のグリコーゲン含量は 10% 増加していた。7 日目における骨格筋細胞内のグリコーゲン含量は高炭水化物食—高炭水化物食群 ( $123.9 \pm 8.7$ ) に比べて高脂肪食—高炭水化物食群 ( $125.0 \pm 9.7$ ) では高値は示したものの、有意な差は認められなかった。



表 8 ヒラメ筋繊維に占めるグリコーゲン顆粒濃度

|                 | 運動前       | 運動後       | 4日目        | 7日目       |
|-----------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| 高脂肪食-高炭水化物食群    | 117.4±9.0 | 102.3±6.9 | 111.6±6.1  | 125.0±9.7 |
| 高炭水化物食群-高炭水化物食群 |           |           | 131.5±11.4 | 123.9±8.7 |

(AU)

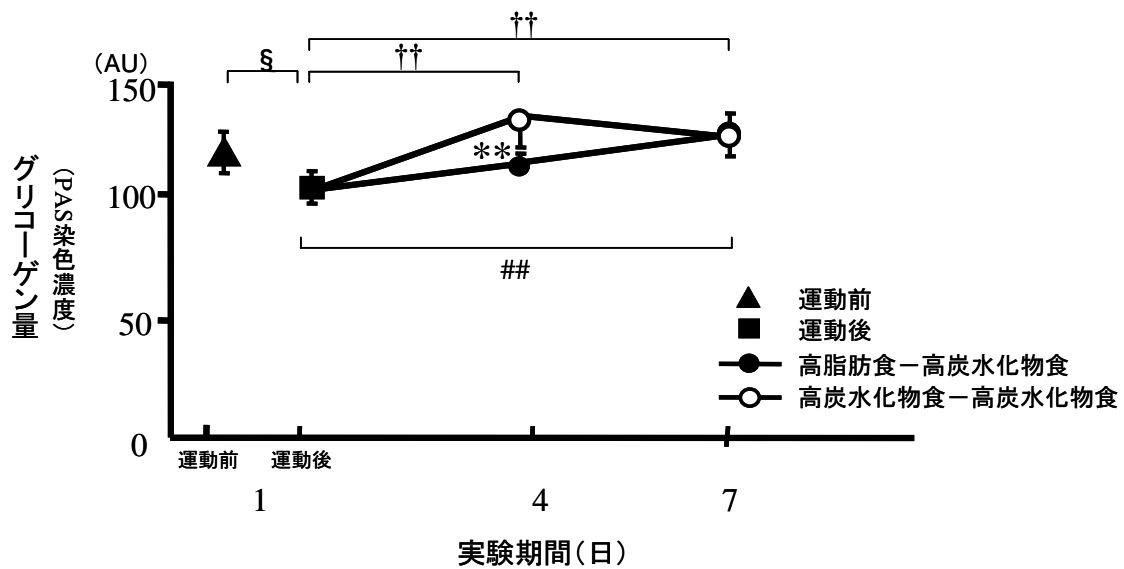


図 17 ヒラメ筋繊維に占めるグリコーゲン顆粒濃度

平均値±標準偏差 (n=6)。 疲労困憊運動前 vs.疲労困憊運動後, § § : p < 0.01 ;  
 疲労困憊運動前 vs. 疲労困憊運動後 vs. 4日目高脂肪食-高炭水化物食 vs.  
 7日目高脂肪食-高炭水化物食, ## : p < 0.01 ; # : p < 0.05 ;  
 疲労困憊運動前 vs. 疲労困憊運動後 vs. 4日目高炭水化物食-高炭水化物食 vs.  
 7日目高炭水化物食-高炭水化物食, †† : p < 0.01 ; † : p < 0.05 ;  
 4日目高脂肪食-高炭水化物食 vs. 4日目高炭水化物食-高炭水化物食, \* : p < 0.01 ;

#### 4.3.3. 骨格筋細胞内脂肪滴

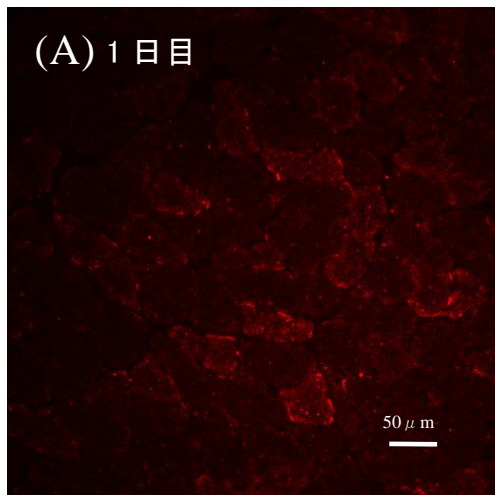
図 18 は、両群のヒラメ筋からスライスして得られた切片の脂肪滴を染色した写真である。本研究では、試料として用いた筋をスライスして得られた切片からランダムに 5 枚抽出して分析を行ったが、ここで示した染色写真は、その 5 枚の中の 1 枚である。

脂肪滴測定は第 3 章 3.3.3.と同様である。全体的に画像が暗い点は、画像保存時の影響であり、染色過程によるものではない。よって測定への影響はない。

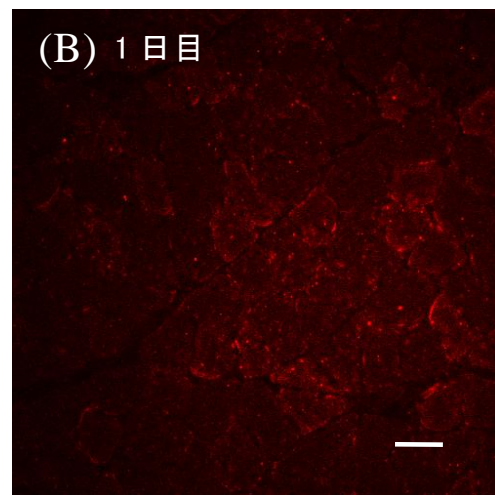
ここで示した写真の分類も第 3 章 3.3.3.と同様である。

図 16 から得られる脂肪滴の貯蔵状況における経日変化の状況についての所見も第 3 章 3.3.3.と同様であった。

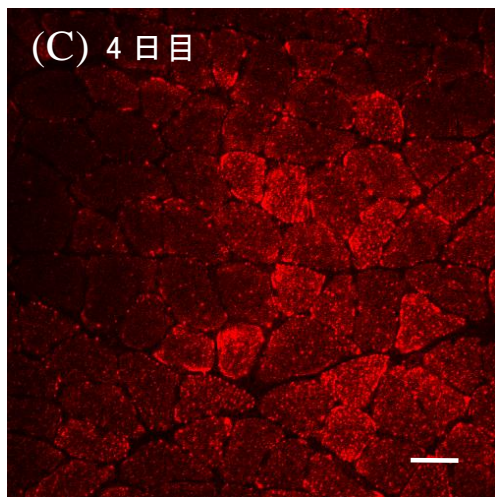
4 日目の画像 (C) は、3 日間高脂肪食摂取後の画像であり、第 3 章の図 14 の尺側手根伸筋の画像と同様に、6 枚の画像において最も脂肪滴が蓄積されている。しかしながら、画像 (C) で第 3 章と異なる点は、脂肪滴が蓄積されている細胞とそうでない細胞がある中で、蓄積されている細胞が第 3 章より多かった。また、ヒラメ筋では、細胞膜に隣接し縁取るように貯蔵されていただけでなく、第 3 章の尺側手根伸筋に比べ、細胞の内側中央付近にも多く蓄積されていた。



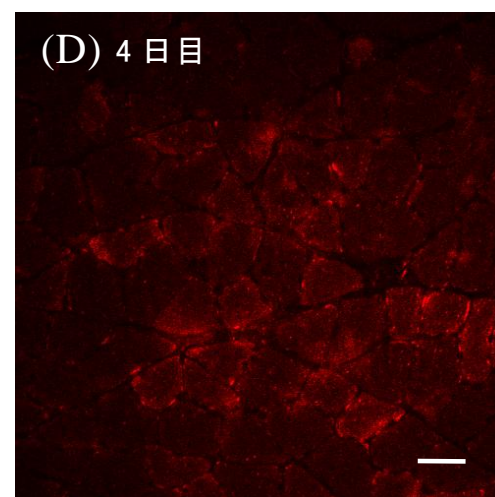
運動前



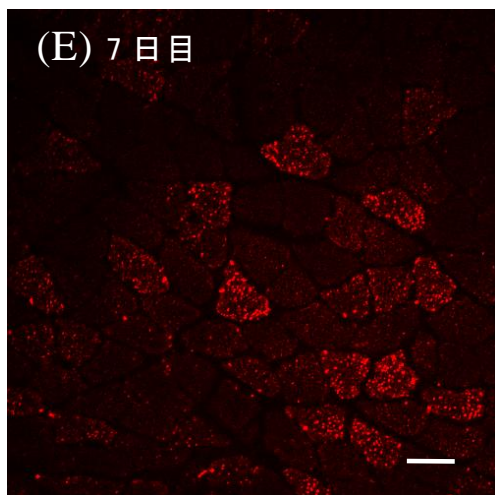
運動後



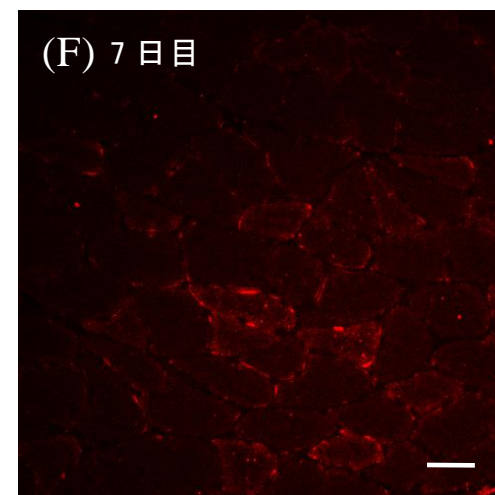
高脂肪食—高炭水化物食群



高炭水化物食—高炭水化物食



高脂肪食—高炭水化物食群



高炭水化物食—高炭水化物食群

図 18 ヒラメ筋の脂肪滴染色写真(Oil red O 染色)

(A) 1日目運動前 (B) 1日目運動後 (C) 高脂肪食摂取後4日目  
(D) 高炭水化物食摂取後4日目 (E) 高炭水化物食摂取後7日目 (F) 高炭水化物食摂取後7日目

#### 4.3.4. 骨格筋細胞内脂肪含量

図 19 は図 18 の染色写真に示した骨格筋線維に占める細胞内の脂肪滴面積の割合を示したものである。ここでも、第 3 章 3.3.4.と同様の理由から、骨格筋線維に占める細胞内の脂肪滴面積の割合を骨格筋細胞内脂肪含量とした。

図 19 から得られる所見は、第 3 章との比較において、含量は相違があるものの、位相パターンは同様であった。すなわち、1 日目の運動前( $7.7 \pm 1.6$ )に比べて運動直後( $3.2 \pm 2.3$ )には 59%減少 ( $p < 0.05$ )し、有意な差が認められた。その後、高脂肪食—高炭水化物食群では 4 日目 ( $35.2 \pm 22.8$ )に運動前 ( $7.7 \pm 1.6$ )の値と比べて 78%増加 ( $p < 0.01$ )し、4 日目 ( $35.2 \pm 22.8$ )から 7 日目 ( $10.5 \pm 4.8$ )にかけては 70%減少 ( $p < 0.01$ )した。高炭水化物食—高炭水化物食群では骨格筋細胞内脂肪含量は運動前 ( $7.7 \pm 1.6$ )から 7 日目 ( $4.7 \pm 2.1$ )にかけて運動前と有意な差はなく、一定のレベルを維持したといえる。4 日目には高脂肪食—高炭水化物食群 ( $35.2 \pm 22.8$ )は高炭水化物食—高炭水化物食群 ( $5.7 \pm 4.1$ )に比べ 83%高く ( $p < 0.01$ )、7 日目には高脂肪食—高炭水化物食群 ( $10.5 \pm 4.8$ )は高炭水化物食—高炭水化物食群 ( $4.7 \pm 2.1$ )に比べ 56%高く ( $p < 0.05$ )、有意な差が認められた。結果、骨格筋細胞内脂肪含量は高脂肪食—高炭水化物食群で 7 日間を通じて運動前以上のレベルを維持していた。

表 9 ヒラメ筋に占める脂肪滴面積の割合

|                 | 運動前     | 運動後     | 4日目       | 7日目      |
|-----------------|---------|---------|-----------|----------|
| 高脂肪食－高炭水化物食群    | 7.7±2.3 | 3.2±1.6 | 35.2±22.8 | 10.5±4.8 |
| 高炭水化物食群－高炭水化物食群 |         |         | 5.7±4.1   | 4.7±2.1  |

(%)

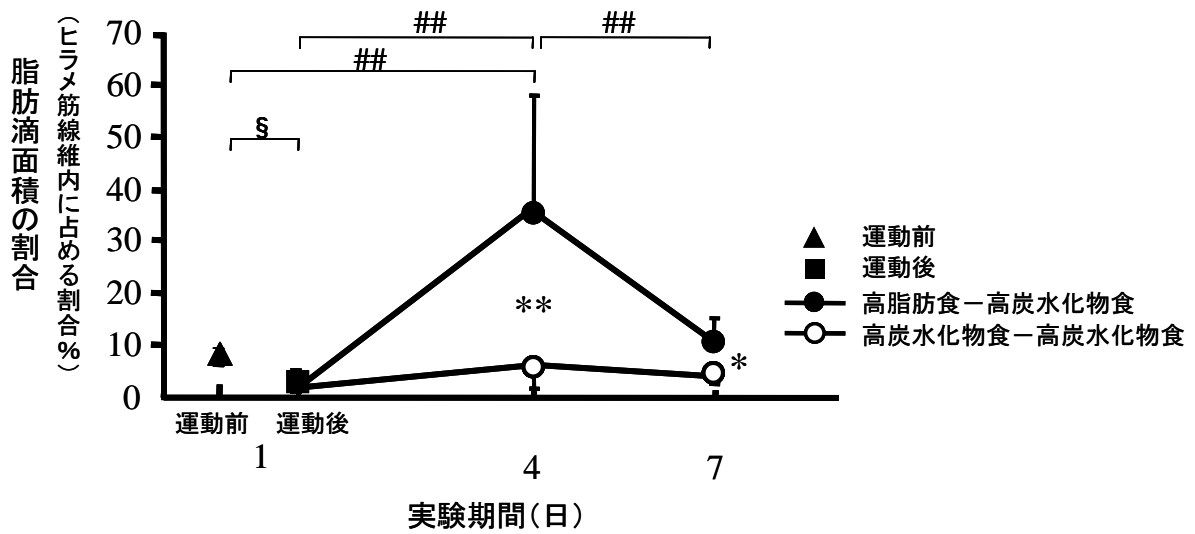


図 19 ヒラメ筋に占める脂肪滴面積の割合

平均値±標準偏差 (n=6)。 疲労困憊運動前 vs.疲労困憊運動後, § : p < 0.05 ;

疲労困憊運動前 vs. 疲労困憊運動後 vs. 4日目高脂肪食－高炭水化物食 vs.

7日目高脂肪食－高炭水化物食, ## : p < 0.01 ; # : p < 0.05 ;

4日目高脂肪食－高炭水化物食 vs. 4日目高炭水化物食－高炭水化物食, \*\* : p < 0.01 ;

7日目高脂肪食－高炭水化物食 vs. 7日目高炭水化物食－高炭水化物食, \* : p < 0.05 ;

## 第4節 考察

第3章において、ラットの尺側手根伸筋に対し、高脂肪食－高炭水化物食を用いた古典的1週間グリコーゲンローディング処方がファットローディング効果も併せもつことが示唆された。

この結果を踏まえ、本章では、ラットの下肢にあるヒラメ筋を用い、高脂肪食－高炭水化物食のグリコーゲンローディング処方がファットローディング効果も併せもつかどうか組織化学的に検討した。

第3章の実験では疲労困憊運動を行なったが、運動前後に減少はあったものの、骨格筋細胞内グリコーゲン含量は枯渇と言えるまで減少しなかった。しかしながら、第3章の結果ではファットローディング効果がみられた。骨格筋細胞内グリコーゲン含量が枯渇まで減少していないにもかかわらずファットローディング効果がみられた結果を基に、第4章では負荷を軽減しても古典的1週間グリコーゲンローディング処方がグリコーゲンローディング効果のみならず、ファットローディング効果を併せもつかの可能性を検討した。負荷の軽減については、負荷として考えられる運動強度および時間を軽減し、1日目の遊泳運動では流水をなくし、遊泳時間も疲労困憊までではなく、最長3時間までとした。

試料にはヒラメ筋を用いた。理由は、ヒラメ筋は遊泳運動に対する貢献度が低いこと、遅筋線維が優位なこと、酸化酵素活性が高いこと、筋に含まれるエネルギー源の中で中性脂肪を多く含んでいるといわれていることから<sup>(64,66)</sup>、運動による負荷を軽減した状況での脂質代謝を検討する骨格筋として適しているのではないかと考えたためである。

### 4.4.1. 骨格筋細胞内グリコーゲン顆粒および脂肪滴の含量と分布特性

ここでは、ヒラメ筋線維を組織化学的に分析した顕微鏡の染色写真から骨格筋細胞内のグリコーゲン顆粒および脂肪滴の含量と貯蔵分布を観察して得られた知見を考察する。

ヒラメ筋線維細胞内のグリコーゲン含量および脂肪滴は、第3章の図15との比較において相違（特に4日目では5倍）があるものの、位相変動パターンは同様であった。

そして、ヒラメ筋線維細胞内のグリコーゲン含量および脂肪滴について、1日目の運動前後の値は、第3章に比べ運動強度および時間を軽減しても両者とも減少した。この結果は、古典的グリコーゲンローディング処方<sup>(64)</sup>および運動時に骨格筋細胞内脂肪含量の減少を示唆した先行研究<sup>(70,71)</sup>と一致していた。

両群の経日的変動をみると、ヒラメ筋線維細胞内のグリコーゲン含量は両群の4日目に差はあるものの、両群とも運動前-4日目-7日目の経日的な変動は少なく推移しており、7日目には両群とも近い値を示した。

運動後-4日目で、高炭水化物食-高炭水化物食群が運動前のレベルを上回る回復を示したのは高炭水化物を摂取したことによるものであるが、高脂肪食を摂取した高脂肪食-高炭水化物食群でも運動前のレベルを回復していた。このことは、高脂肪食を中心とした食事でも5%程度の炭水化物が含まれていれば運動前のレベルを回復すること示したものと考えられる。今後はより良い回復を促すために食事の配分を検討する必要がある。

次に、ヒラメ筋線維細胞内の脂肪滴について、高炭水化物食-高炭水化物食群は運動前-4日目-7日目の経日的な変動は少なく推移しているが、高脂肪食-高炭水化物食群では、高炭水化物食-高炭水化物食群に比べ顕著な増加を示

した。顕著な増加を示したことは、高脂肪食を摂取したことによるものと考えられるものの、4日目の標準偏差が大きいことから個体差も影響していると考えられる。

この個体差は、ヒラメ筋が脂肪蓄積傾向にある遅筋線維であること<sup>(65,68-72,73)</sup>が反映した個体差とも考えられる。ヒラメ筋では、第3章 3.3.3.尺側手根伸筋と同様、脂肪滴が多く確認できる骨格筋細胞とそうでない骨格筋細胞があり<sup>(10,72)</sup>、高脂肪食摂取後の骨格筋細胞では脂肪滴が蓄積している細胞が第3章 3.3.3.の尺側手根伸筋より多かった。このことを骨格筋細胞内脂肪滴の分布についてみると、骨格筋細胞膜に内側から隣接し、細胞を縁取るように貯蔵されていることは第3章 3.3.3.と同様であったが、ヒラメ筋においては細胞の内側中央付近にも多く蓄積されていた。これは、骨格筋細胞外から骨格筋細胞膜を介して取り込まれた脂肪が脂肪滴として骨格筋細胞膜に細胞の内側から接して貯蔵されていたものが、細胞の中央付近に移動させられたものとも考えられる。しかしながら、この現象は、本研究の手法の限界とも関連することから、今後より詳細な検討が必要であろう。

最後に、骨格筋細胞内のグリコーゲンと脂肪を合わせて考えると、高脂肪食－高炭水化物食群では4日目の骨格筋細胞内脂肪量が顕著に増加しつつも骨格筋細胞内グリコーゲン含量が運動前の値を回復し、さらに7日目での骨格筋細胞内グリコーゲン含量が高炭水化物食－高炭水化物食群に近い値を示しつつ骨格筋細胞内脂肪で上回っていたことは、高脂肪食－高炭水化物食群は、骨格筋細胞内にグリコーゲンを取り込みつつ脂肪も取り込むファットローディング効果を併せもつと考えられる。

また、グリコーゲンが枯渇されない程度の運動でも、運動と脂肪の摂取を組み合わせることで、炭水化物だけでなく脂質も有効にエネルギーとして取り込



み、利用される可能性がある。

#### 4.4.2. 第4章のまとめ

以上、得られた知見をまとめると次のようになる。

- ① グリコーゲン顆粒の染色濃度および脂肪滴の貯蔵分布は第3章のまとめと同様であったが、ヒラメ筋について骨格筋細胞内脂肪滴の貯蔵分布は、第3章で使用した尺側手根伸筋に比べ多かった。
- ② ヒラメ筋の骨格筋細胞内の含量について、高脂肪食－高炭水化物食群の4日目は尺側手根筋の4日目に比べ5倍の値を示したが、位相変動パターンは第3章と同様であった。
- ③ 以上のことから、古典的1週間グリコーゲンローディング処方は、ヒラメ筋に対してグリコーゲンローディング効果だけでなく、ファットローディング効果を併せ持つことが示唆された。

## 第5章 総合考察

## 第1節 総合考察

### 5.1.1 ファットローディングの意義と鈴木説

鈴木（2006）は、ファットローディングについて、ファットローディング法の食べ方は確立されていないが、基本的には高脂肪食をとること、血中脂肪酸を高めること、そして骨格筋への脂肪と脂肪酸の取り込みを促すことが必要であると述べた上で、以下のように言っている<sup>(2)</sup>。

理論的には、①骨格筋内での脂肪合成を活性化する。②骨格筋細胞膜のリポタンパクリパーゼを活性化して、血中脂肪を脂肪酸に分解しながら筋肉中に取り込み、 $\alpha$ -グリセロリン酸に結合させて脂肪にする。③血中脂肪酸量を増大させて、それを筋肉細胞に取り込ませ脂肪に合成して貯蔵する、など主として3つのやり方が考えられる。

①の脂肪合成促進法は、高炭水化物食や糖分を摂取して血中グルコースとインスリンを高める方法になるが、これは脂肪組織の脂肪構成と蓄積を促進することを伴うので、体脂肪も増やしてしまい、スポーツ選手には望ましくない方法である。②のリポタンパクリパーゼ活性化法は、脂肪組織のリポタンパクリパーゼを活性化せずに、骨格筋のリポタンパクリパーゼを活性化しなければならないという難しい条件を持ち併せているため、インスリンの分泌を高めるような条件では、リポタンパクリパーゼは脂肪組織で活性化され、骨格筋では逆に活性低下につながるので望ましくない。リポタンパクリパーゼを骨格筋で活性化して脂肪組織では抑制するには、交感神経系を刺激する作用を持つ成分を摂取する必要があるが、カフェインやテオフィリンなどは、その目的に合った物質である。③の血中脂肪酸上昇は、上記のカフェインやテオフィリンが脂肪組織の脂肪動員を促すので有効である。また、絶食も有効である。さらに、高脂

肪・低炭水化物食も血中脂肪酸を上昇させる。動物実験では、薬剤のヘパリンを静脈に注入してやり、全身のリポタンパクリパーゼを組織から血中に遊離させて、血中脂肪を徹底的に脂肪酸に分解させる方法が有効である。

初め 3 日間に超低炭水化物食・高脂肪・高たんぱく質食を食べ、最後の 3 日間に高炭水化物・低脂肪食に切り替えるグリコーゲンローディング法の食べ方には、ファットローディングの効果も潜んでいる可能性があり、初め 3 日間の超低炭水化物・高脂肪食期に、骨格筋中に脂肪が蓄積され、その後の高炭水化物食期にグリコーゲンが蓄積され、結果的に脂肪とグリコーゲンの両方が貯蔵されてレース中のスタミナ発揮に貢献する可能性を秘めている。

そして、もし骨格筋に脂肪を自在に蓄積できる方法がわかれば、それはしゃぶしゃぶ肉自由自在の技術にもなり、畜産業界は大恩恵を受けることにもなり、今後のファットローディング研究が期待される。と締めくくっている。

今回、「古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方は、グリコーゲンローディング効果だけでなく、ファットローディング効果も併せもつ」という仮説の下、高脂肪食を中心とした食事を処方し、骨格筋細胞内のグリコーゲンおよび脂肪の貯蔵を、生理学的、組織化学的手法を用いて各研究課題を究明した。

本研究の結果は、鈴木の提唱していた「グリコーゲンローディング法はファットローディング効果も併せもつ」との理論を支持し、従来、“古典的”と言われてきたグリコーゲンローディング処方に、ファットローディング効果が潜んでいたことが明らかになった。

### 5.1.2 研究の限界

本研究には、以下に列挙する方法および結果の解釈に関する限界、得られた知見の一般化かつ普遍化に関する限界があろう。

(1) 方法および結果の解釈に関する限界

- ① 実験食について、高炭水化物食に含まれる炭水化物および高脂肪食に含まれる脂質のエネルギー量の割合はそれぞれ約 70%であった。したがって、本研究で得られた知見は、炭水化物および脂肪のエネルギー量の割合が約 70%における知見である。
- ② ファットローディング様式から得られた画像は、グリコーゲン様式から得られたそれと異なることから、相対的な比較はできるが絶対的な比較はできない。
- ③ グリコーゲン含量や脂肪滴の算出方法として蛍光顕微鏡を使用した組織化学的手法は古典的な手法として確立はされているが、グリコーゲン新生や脂肪滴産生に関する定量的評価法としては、遺伝学的なより鋭敏な手法の併用が必要であろう。しかしながら、本研究では、筋線維内のグリコーゲンおよび脂肪の貯蔵状態を把握しつつ定量化して、鳥瞰的視点から基礎的知見を得る必要があったため、目的を究明するための本質的な誤りはないと考える。

(2) 得られた知見の一般化かつ普遍化に関する限界

- ① 古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方に限られた実験であるため、処方様式が異なった場合は得られた知見をそのまま適用できない可能性がある。
- ② グリコーゲンおよび脂肪の蓄積は筋や筋線維のタイプによる差異が大きく、比較的短期間にその貯蔵量が増減するということが推測されるため、その効果の時間的かつ量的適用範囲には限界があろう。しかしながら、本

研究では、グリコーゲンおよび脂肪の蓄積の位相変動パターンに相違がなかったことから、時間的かつ量的適用範囲に限界があったとしても、位相の変動パターン内での適用には問題がないであろう。

- ③ 骨格筋細胞内グリコーゲンおよび脂肪は、短期間にその貯蔵量が増減することが考えられるため、効果の期間に限界があると考えられる。

### 5.1.3 本研究の有用性および今後の課題

#### (1) 本研究の有用性

これまでの研究では、それぞれのエネルギー貯蔵の重要性について言われながらも、その関係性について検討したものは皆無である。よって、本研究によって明らかになった知見は、今後、それぞれの関係を究明する際の基礎的知見として極めて重要であろう。

#### (2) 今後の課題

本研究では、骨格筋細胞内のグリコーゲンおよび脂肪の蓄積に関する基礎的知見を得た。

しかしながら、食事に含まれる糖質や脂質の成分および量により体内への取り込みが異なり、また、筋線維の差異により、処方による効果や貯蔵量の変動もあることから、今後はそれらについても詳細な検討が必要であろう。さらに、糖新生や脂肪滴産生を定量的に評価し、骨格筋細胞内のより詳細な貯蔵状態を明らかにするためには、分子生物学的手法を用いる必要がある。

これらの代謝メカニズムは多彩であり、この現象の発生機序は不明である。骨格筋細胞内脂肪がミトコンドリアに近接して存在し、その取り込み過程におい

て利用される酵素の重要性も指摘されている。今後これらの酵素の影響も検討できれば、より高率なファットローディングのメカニズムが解明されると期待する。

## 第 6 章 結 論



## 第 1 節 結論

### 5.1.1 目的

本研究では、エネルギー源として重要な骨格筋細胞内グリコーゲンおよび脂肪に着目をし、食事と運動を工夫して組み合わせることで、古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方が、骨格筋細胞内にグリコーゲンローディング効果だけでなく脂肪の蓄積であるファットローディング効果を併せもつかを組織化学的分析方法により定性的かつ定量的に明らかにすることを目的とした。

本研究の目的を達成するために、研究課題を設定し、以下の知見を得られた。

#### <研究課題 1>

成人男性の被験者に古典的 1 週間グリコーゲンローディング法を処方し、骨格筋細胞内脂肪が運動中に骨格筋細胞内脂肪が高率で利用される可能性について生理学的に検討した。

その結果、血清グルコース濃度、および血清遊離脂肪酸濃度で古典的 1 週間グリコーゲンローディング処方を施した高脂肪食（3 日間） - 高炭水化物食（3 日間）群と 6 日間高炭水化物食を摂取させる高炭水化物食 - 高炭水化物食群間に差が見られなかった。また、呼吸交換比率が高脂肪食 - 高炭水化物食群は脂質代謝に近い結果を得られた。このことは、脂肪をエネルギー源として利用する比率が高くなっていることを意味すると考えられることから、骨格筋細胞内脂肪が高率で利用された可能性が示唆された。

#### <研究課題 2>

疲労困憊に至る運動を負荷したあと、ラットをグリコーゲンローディング処方する高脂肪食（3 日間） - 高炭水化物食（3 日間）群と 6 日間高炭水化物食を

食餌させる高炭水化物食—高炭水化物食群に分け、尺側手根伸筋細胞内のグリコーゲン含量と脂肪含量を組織化学的手法により定性的かつ定量的解析し、経日変動を比較・検討した。

その結果、グリコーゲン顆粒は染色濃度に相違はあるがすべての骨格筋細胞が染色されていた。一方、脂肪滴は骨格筋細胞内に脂肪滴が蓄積されている細胞と蓄積されていない細胞がみられた。蓄積された脂肪滴については、多くが骨格筋細胞膜に隣接し、細胞を縁取るように貯蔵されていた。また、骨格筋細胞内の含量について、高脂肪食—高炭水化物食群は、1日目の疲労困憊運動負荷後、3日間高脂肪食を摂取したにもかかわらず、骨格筋細胞内グリコーゲン含量が運動前のレベル(4日目)もしくはそれ以上のレベル(7日目)に回復しつつ、骨格筋細胞内脂肪含量は疲労困憊運動負荷前(1日目)のレベルを維持し、さらに高脂肪食—高炭水化物食群が高炭水化物食—高炭水化物食群に比べ有意( $p < 0.01$ )に上回っていた。一方、高炭水化物食—高炭水化物食群では、骨格筋細胞内グリコーゲン含量こそ高脂肪食—高炭水化物食群に比べ4日目に高い値( $p < 0.01$ )を示したが、7日目には4日目と同じレベルに留まった。

### <研究課題3>

疲労困憊運動の負荷を軽減した条件設定のもと、ラットをグリコーゲンローディング処方する高脂肪食(3日間)—高炭水化物食(3日間)群と6日間高炭水化物食を食餌させる高炭水化物食—高炭水化物食群に分け、ヒラメ筋のグリコーゲン含量と脂肪含量を組織化学的により定性的かつ定量的に解析し、経日変動を比較・検討した。

その結果、グリコーゲン顆粒は染色濃度に相違はあるがすべての骨格筋細胞が染色されていた。一方、脂肪滴は骨格筋細胞内に脂肪滴が蓄積されている細胞と蓄積されていない細胞がみられた。蓄積された脂肪滴については、多くが骨格筋細胞膜に隣接し、細胞を縁取るように貯蔵されていた。

また、骨格筋細胞内の含量について、高脂肪食—高炭水化物食群は、1日目の

運動負荷後、3日間高脂肪食を摂取したにもかかわらず、骨格筋細胞内グリコーゲン含量が運動前のレベル（4日目）もしくはそれ以上のレベル（7日目）に回復しつつ、骨格筋細胞内脂肪含量は運動負荷前（1日目）のレベルを維持し、さらに高脂肪食－高炭水化物食群が高炭水化物食－高炭水化物食群に比べ有意（ $p < 0.01$ ）に上回っていた。一方、高炭水化物食－高炭水化物食群では、骨格筋細胞内グリコーゲン含量こそ高脂肪食－高炭水化物食群に比べ4日目に高い値（ $p < 0.01$ ）を示したが、7日目には4日目と同じレベルに留まった。

### 5.1.2 結論

以上の研究課題を究明した結果、以下の知見を得られた。

骨格筋細胞内グリコーゲンの消費もしくは枯渇を目的とした運動の後、骨格筋細胞内のグリコーゲン顆粒だけでなく脂肪滴も減少した。そして、運動後の高脂肪食を中心とした食餌により、脂肪滴が多量に蓄積されただけでなく、骨格筋細胞内のグリコーゲン顆粒も増加し、運動前レベルもしくはそれ以上に回復した。

また、この現象は、研究課題2および研究課題3で用いた尺側手根伸筋とヒラメ筋において、含量の変動レベルに相違はあるものの、その増加減少の位相パターンは同じ傾向を示した。

このことは、古典的1週間グリコーゲンローディング処方は、従来言われていたような骨格筋細胞内のグリコーゲンを増加させるグリコーゲンローディング効果だけでなく、骨格筋細胞内の脂肪も増加させるファットローディング効果も併せもつことが示唆された。

## 謝辞

ご多忙のなか快く主査をお引き受けくださり、本論文を作成するにあたりご指導を賜りました、本学スポーツ科学学院の福林徹教授に心から感謝申し上げます。

ならびに、本学スポーツ科学学院の樋口満教授、本学人間科学学院の鈴木秀次教授におかれましては、ご多忙のなか本論文の副査をお引き受けくださり、また本論文作成にあたりご指導を賜り、厚く御礼申し上げます。

また、本論文の研究に協力してくださいました鶴見大学歯学部物理学教室の山根明教授、物理学教室の皆様、そして本学スポーツ栄養学研究室の皆様から心から感謝申し上げます。

そしてこれまで長い間、私の研究を温かく見守り、本論文を完成させるまで支えてくれた夫と子供達、そして両親に心から感謝致します。

最後に、本研究に際して様々なご指導を頂きました、故鈴木正成先生に心から感謝申し上げます。本研究は故鈴木正成先生のアイデアを基に進めてまいりました。故鈴木正成先生が亡くなられる前にこの博士論文をまとめることが出来なかったことが残念でありませんが、福林徹教授、樋口満教授、鈴木秀次教授にご指導いただいたのをはじめ、多くの方々に支えていただき本論文をまとめることができました。皆様に厚く御礼申し上げます。

故鈴木正成先生のご冥福を心からお祈り申し上げます。

## 参考文献

- (1) スポーツ栄養学 小林修平監訳 南江堂 1996
- (2) 実践的スポーツ栄養学 鈴木正成 文光堂 2006
- (3) Bergström J, and Hultman E. Muscle glycogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man. *Nature*. **210**:309-310, 1966.
- (4) Bergström J, Hermansen L, Hultman E, and Saltin B. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol Scand*. **71**:140-150, 1967.
- (5) Karlsson J, and Saltin B. Diet, muscle glycogen, and endurance performance. *J Appl Physiol*. **31**: 203-206, 1971
- (6) Bosch AN, Dennis SC, and Noakes TD. Influence of carbohydrate loading on fuel substrate turnover and oxidation during prolonged exercise. *J Appl Physiol*. **74**:1921-1927, 1993.
- (7) O'Brien MJ, Viguie CA, Mazzeo RS, and Brooks GA. Carbohydrate dependence during marathon running. *Med Sci Sports Exerc*. **25**:1009-1017, 1993.
- (8) Koopman R, Schaart G, and Hesselink MK. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol*. **116**:63-68, 2001.
- (9) Burke LM, and Hawley JA. Effects of short-term fat adaptation on metabolism and performance of prolonged exercise. *Med Sci Sports Exerc*. **34**:1492-1498, 2002.

- (10) Stellingwerff T, Boon H, Gijsen AP, Stegen JH, Kuipers H, and van Loon LJ. Carbohydrate supplementation during prolonged cycling exercise spares muscle glycogen but does not affect intramyocellular lipid use. *Pflugers Arch.* **454**:635-647, 2007.
- (11) van Loon LJ. Use of intramuscular triacylglycerol as a substrate source during exercise in humans. *J Appl Physiol.* **97**:1170-1187, 2004.
- (12) Hoppeler H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med.* **7**(4):187-204, 1986.
- (13) Brouns F., Saris W. H. M., Beckers E. Adllecrcultz H., van der Vusse GJ, Keizer HA, Kuipers H, Menheere P, Weqenmakers AJ, and ten Hoor F. Metabolic changes induced by sustained exhaustive cycling and diet manipulation. *Int J Sports Med.* **10**(suppl 1):S68-S75, 1989.
- (14) Havemann L, West SJ, Goedecke JH, Macdonald IA, St Clair Gibson A, Noakes TD, and Lambert EV. Fat adaptation followed by carbohydrate loading compromises high-intensity sprint performance. *J Appl Physiol.* **100**:194-202, 2006.
- (15) Roepstorff C, Donsmark M, Thiele M, Vistisen B, Stewart G, Vissing K, Schjerling P, Hardie DG, Galbo H, and Kiens B. Sex differences in hormone-sensitive lipase expression, activity, and phosphorylation in skeletal muscle at rest and during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **291**: E1106-1114, 2006.
- (16) Jansson E, and Kaijser L. Effect of diet on the utilization of blood-borne and intramuscular substrates during exercise in man. *Acta Physiol Scand.* **115**(1):19-30, 1982.

- (17) Starling RD, Trappe TA, Parcell AC, Kerr CG, Fink WJ, and Costill DL. Effects of diet on muscle triglyceride and endurance performance. *J Appl Physiol.* **82**:1185-1189, 1997.
- (18) Kiens B, Essen-Gustavsson B, Gad P, and Lithell H. Lipoprotein lipase activity and intramuscular triglyceride stores after long-term high-fat and high-carbohydrate diets in physically trained men. *Clin Physiol.* **7**(1):1-9, 1987.
- (19) Bachmann OP, Dahl DB, Brechtel K, Machann J, Haap M, Maier T, Loviscach M, Stumvoll M, Claussen CD, Schick F, Häring HU, and Jacob S. Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes.* **50**(11):2579-84, 2001.
- (20) Goodpaster BH, He J, Watkins S, and Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab.* **86**(12):5755-61, 2001.
- (21) Thamer C, Machann J, Bachmann O, Haap M, Dahl D, Wietek B, Tschritter O, Niess A, Brechtel K, Fritsche A, Claussen C, Jacob S, Schick F, Häring HU, and Stumvoll M. Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**(4):1785-91, 2003.
- (22) Fushiki T, Wells JA, Tapscott EB, and Dohm GL. Changes in glucose transporters in muscle in response to exercise. *Am J Physiol.* **256**(5 Pt 1):E580-7, 1989.

- (23) Christensen EH, and Hansen O. III. Arbeitsfähigkeit und Ernährung. *Skand. Arch. Physiol.* **81**:160-171, 1939.
- (24) Ahlborg B, Bergstrom J, Ekelund LG, and Hultman E. Muscle glycogen and Muscle Electrolytes during Prolonged Physical Exercise. *Acta Physiol Scand.* **70**:129-142, 1967.
- (25) Hultman E, and Bergstrom J. Muscle glycogen synthesis in relation to diet studied in normal subjects. *Acta Med Scand.* **182**:109-117, 1967.
- (26) Åstrand PO. Diet and athletic performance. *Fed Proc.* **26**: 1772-1777, 1967.
- (27) Bergström J, Hultman E, and Roch-Norlund AE. Muscle glycogen synthetase in normal subjects. Basal values, effect of glycogen depletion by exercise and of a carbohydrate-rich diet following exercise. *Scand J Clin Lab Invest.* **29**:231-236, 1972.
- (28) Hermansen L, Hultman E, and Saltin B. Muscle glycogen during prolonged severe exercise. *Acta Physiol Scand.* **71**:129-139, 1967.
- (29) 競技力向上のスポーツ栄養学 トレーニング科学研究会 編 朝倉書店  
2001
- (30) Sherman WM, Costill DL, Fink WJ, and Miller JM. Effect of exercise-diet manipulation on muscle glycogen and its subsequent utilization during performance. *Int J Sports Med.* **2**:114-118, 1981.
- (31) Nakagawa Y, Hattori M, Harada K, Shirase R, Bando M, and Okano G. Intramuscular Lipid Content in Female endurance-Trained Elderly Persons by in Vivo <sup>1</sup>H-MR Spectroscopy. *Jpn J Phys Fitness Sports Med.* **55**:S59-S64, 2006.



- (32) Jeukendrup AE, Saris WH, and Wagenmakers AJ. Fat metabolism during exercise: a review. Part I: fatty acid mobilization and muscle metabolism. *Int J Sports Med.* **19**:231-244, 1998.
- (33) Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, and Wolfe RR. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol.* **265**: E380-391, 1993.
- (34) Watt MJ, Heigenhauser GJ, and Spriet LL. Intramuscular triacylglycerol utilization in human skeletal muscle during exercise: is there a controversy? *J Appl Physiol.* **93**:1185-1195, 2002a.
- (35) Watt MJ, Heigenhauser GJ, Dyck DJ, and Spriet LL. Intramuscular triacylglycerol, glycogen and acetyl group metabolism during 4 h of moderate exercise in man. *J Physiol.* **541**:969-978, 2002b.
- (36) van Loon LJ, and Goodpaster BH. Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch.* **451**:606-616, 2006.
- (37) Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Rosenblatt J, and Wolfe RR. Substrate metabolism during different exercise intensities in endurance-trained women. *J Appl Physiol.* **88**:1707-1714, 2000.
- (38) Kiens B. Diet and training in the week before competition. *Can J Appl Physiol.* **26 Suppl**:S56-63, 2001.
- (39) Hattori M, Nakagawa Y, Harada K, Banndo M, and Okano G. Characteristics of Intramyocellular Lipid Content in Skeletal Muscles of Overweight Men and Endurance-Trained Athletes. *Jpn J Phys Fitness Sports Med.* **55**:S43-S48, 2006

- (40) Stellingwerff T, Boon H, Jonkers RA, Senden JM, Spriet LL, Koopman R, and van Loon LJ. Significant intramyocellular lipid use during prolonged cycling in endurance-trained males as assessed by three different methodologies. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **292**:E1715-1723, 2007.
- (41) Gollnick PD and Saltin B. Fuel for muscular exercise: role of fat. In : Exercise, Nutrition and Energy Metabolism, edited by Horton ES and TerJung RL. New York : MacMillan, p72-88, 1988.
- (42) Hurley BF, Nemeth PM, Martin WH 3rd, Hagberg JM, Dalsky GP, and Holloszy JO. Muscle triglyceride utilization during exercise: effect of training. *J Appl Physiol.* **60**(2):562-7, 1986.
- (43) Martin WH 3rd, Dalsky GP, Hurley BF, Matthews DE, Bier DM, Hagberg JM, Rogers MA, King DS, and Holloszy JO. Effect of endurance training on plasma free fatty acid turnover and oxidation during exercise. *Am J Physiol.* **265**(5 Pt 1):E708-14, 1993.
- (44) Phillips SM, Green HJ, Tarnopolsky MA, Heigenhauser GF, Hill RE, and Grant SM. Effects of training duration on substrate turnover and oxidation during exercise. *J Appl Physiol.* **81**(5):2182-91, 1996.
- (45) Bergman BC, Butterfield GE, Wolfel EE, Casazza GA, Lopaschuk GD, and Brooks GA. Evaluation of exercise and training on muscle lipid metabolism. *Am. J. Physiol.* **276** (*Endocrinol. Metab.* 39):E106–E117, 1999.
- (46) Guo Z, Burguera B, and Jensen MD. Kinetics of intramuscular triglyceride fatty acids in exercising humans. *J Appl Physiol.* **89**:2057–2064, 2000.

- (47) Kiens B, Essen-Gustavsson B, Christensen NJ, and Saltin B. Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *J Physiol.* **469**:459-78, 1993.
- (48) Kiens B, and Richter EA. Utilization of skeletal muscle triacylglycerol during postexercise recovery in humans. *Am. J. Physiol.* **275** (*Endocrinol. Metab.* 38): E332–E337, 1998.
- (49) Steffensen CH, Roepstorff C, Madsen M, and Kiens B. Myocellular triacylglycerol breakdown in females but not in males during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **282**(3):E634-42, 2002..
- (50) Roepstorff C, Steffensen CH, Madsen M, Stallknecht B, Kanstrup IL, Richter EA, and Kiens B. Gender differences in substrate utilization during submaximal exercise in endurance- trained subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **282**:E435–E447, 2002.
- (51) Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, Dobbins RL, Garg A, Burns DK, McGarry JD, and Stein DT. Measurement of intracellular triglyceride stores by <sup>1</sup>H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol.* **276** (*Endocrinol. Metab.* 39):E977–E989, 1999.
- (52) Horowitz JF, and Klein S. Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr.* **72**(suppl):58S–63S, 2000.
- (53) Burke LM, Angus DJ, Cox GR, Cummings NK, Febbraio MA, Gawthorn K, Hawley JA, Minehan M, Martin DT, and Hargreaves M. Effect of fat adaptation and carbohydrate restoration on metabolism and performance during prolonged cycling. *J Appl Physiol.* **89**:2413-2421, 2000.

- (54) Helge JW. Long-term fat diet adaptation effects on performance, training capacity, and fat utilization. *Med Sci Sports Exerc.* **34**:1499-1504, 2002.
- (55) Carey AL, Staudacher HM, Cummings NK, Stepto NK, Nikolopoulos V, Burke LM, and Hawley JA. Effects of fat adaptation and carbohydrate restoration on prolonged endurance exercise. *J Appl Physiol.* **91**(1):115-122, 2001.
- (56) van Loon LJ, Thomason-Hughes M, Constantin-Teodosiu D, Koopman R, Greenhaff PL, Hardie DG, Keizer HA, Saris WH, and Wagenmakers AJ. Inhibition of adipose tissue lipolysis increases intramuscular lipid and glycogen use in vivo in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **289**(3):E482-93, 2005.
- (57) Coyle EF, Jeukendrup AE, Oseto MC, Hodgkinson BJ, and Zderic TW. Low-fat diet alters intramuscular substrates and reduces lipolysis and fat oxidation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **280**:E391-398, 2001.
- (58) Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, and Storlien LH. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes.* **46**:983-988, 1997.
- (59) Krssak M, Petersen KF, Bergeron R, Price T, Laurent D, Rothman DL, Roden M, and Shulman GI. Intramuscular glycogen and intramyocellular lipid utilization during prolonged exercise and recovery in man: a <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *J Clin Endocrinol Metab.* **85**(2):748-54, 2000.

- (60) Schrauwen-Hinderling VB, Hesselink MK, Schrauwen P, and Kooi ME. Intramyocellular lipid content in human skeletal muscle. *Obesity*. **14**(3):357-67, 2006.
- (61) Larson-Meyer DE, Borkhsenius ON, Gullett JC, Russell RR, Devries MC, Smith SR, and Ravussin E. Effect of dietary fat on serum and intramyocellular lipids and running performance. *Med Sci Sports Exerc*. **40**:892-902, 2008.
- (62) 栄養と運動 伏木亨、跡見順子、大野秀樹編著 杏林書院 1999
- (63) 運動生理学 20 講 勝田茂編著 朝倉書店 1994
- (64) Ochiai M, and Matsuo T. Effects of Short-Term Dietary Change from High-Carbohydrate Diet to High-Fat Diet on Storage, Utilization, and Fatty Acid Composition of Rat Muscle Triglyceride during Swimming Exercise. *J Clin Biochem Nutr*. **44**:168-177, 2009.
- (65) Saitoh S, Shimomura Y, Tasaki Y, and Suzuki M. Effect of short-term exercise training on muscle glycogen in resting conditions in rats fed a high fat diet. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. **64**:62-67, 1992.
- (66) Spriet LL, Peters SJ, Heigenhauser GJ, and Jones NL. Rat skeletal muscle triacylglycerol utilization during exhaustive swimming. *Can J Physiol Pharmacol*. **63**:614-618, 1985.
- (67) Schaart G, Hesselink RP, Keizer HA, van Kranenburg G, Drost MR, and Hesselink MK. A modified PAS stain combined with immunofluorescence for quantitative analyses of glycogen in muscle sections. *Histochem Cell Biol*. **122**:161-169, 2004.

- (68) Essén B, Jansson E, Henriksson J, Taylor AW, and Saltin B. Metabolic characteristics of fibre types in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* **95**(2):153-65, 1975.
- (69) Howald H, Hoppeler H, Claassen H, Mathieu O, and Staub R. Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch.* **403**: 369-376, 1985.
- (70) van Loon LJ, Koopman R, Stegen JH, Wagenmakers AJ, Keizer HA, and Saris WH. Intramyocellular lipids form an important substrate source during moderate intensity exercise in endurance-trained males in a fasted state. *J Physiol.* **553**(2):611-625, 2003a.
- (71) van Loon LJ, Schrauwen-Hinderling VB, Koopman R, Wagenmakers AJ, Hesselink MK, Schaart G, Kooi ME, and Saris WH. Influence of prolonged endurance cycling and recovery diet on intramuscular triglyceride content in trained males. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **285**(4):E804-11, 2003b.
- (72) Koopman R, Manders RJ, Jonkers RA, Hul GB, Kuipers H, and van Loon LJ. Intramyocellular lipid and glycogen content are reduced following resistance exercise in untrained healthy males. *Eur J Appl Physiol.* **96**:525-534, 2006.
- (73) Kaneko S, Iida RH, Suga T, Fukui T, Morito M, and Yamane A. Changes in triacylglycerol-accumulated fiber type, fiber type composition, and biogenesis in the mitochondria of the soleus muscle in obese rats. *Anat Rec.* **294**(11):1904-12, 2011.