

博士（栄養学）学位論文

冷え症の客観的判定と儉約型遺伝子の判定への影響

Objective Diagnosis of Cold Constitution: the Effects of  
Thrifty Genes on Diagnosis.

2016 年

指導教員 香 川 靖 雄 教授

荒 川 恭 子

ARAKAWA, Kyoko

女子栄養大学

## 目 次

### 1.はじめに

- 1.1 冷え症体質と自律神経機能障害 1
- 1.2 冷え症の遺伝的背景と熱産生に關与する対立遺伝子の進化 2-5

### 2.方法

- 2.1 被検者 6
- 2.2 冷えの自覚症状の調査 6
- 2.3 被検者の条件 6
- 2.4 実験手順 7
- 2.5 エネルギー代謝の評価 8
- 2.6 自律神経活動の評価（心拍変動解析） 8
- 2.7 遺伝子多型の解析 9
- 2.8 統計解析 9
- 2.9 解析対象からの除外条件 9-10

### 3.結果

- 3.1 本研究における冷え症の定義 11
- 3.2 Hunting Test 中の浸水部皮膚温度の変化 11
  - 3.2.1 Hunting Test の季節変動 11-12
  - 3.2.2 冷え症の特徴は夏季・摂食前の Hunting Test の温度の低下である 12
- 3.3 遺伝子タイプと冷え症 12
  - 3.3.1  $\beta$ 3AR 遺伝子タイプと Hunting Test 12
- 3.4 遺伝子タイプ別の体格因子と代謝 12-13
- 3.5  $\beta$ 3AR 遺伝子タイプによる自律神経活動の評価 13
  - 3.5.1 摂食前と後の自律神経バランスの変化 13

3.5.2	Hunting Test 中の PNS index と SNS index の変化	13-14
4.	考察	
4.1	俟約型対立遺伝子を有する被験者の肥満の欠如	15-16
4.2	Hunting Test による冷え症と非冷え症の明確な相違（夏季、食事 前）	16
4.3	俟約型対立遺伝子の遺伝子発現は環境に応じて変化する	16-17
4.4	冷え症と自律神経機能障害の診断基準	17
4.5	俟約型対立遺伝子およびエネルギー消費型対立遺伝子の人類学	17-18
4.6	冷え症の自律神経機能	18-20
4.7	冷え症と代謝の低下	20-21
4.8	本研究の限界と $\beta$ 3AR の心臓血管系における機能	21-23
5.	結論	24
	謝辞	25
	参考文献	26-32
	Table 1-5	33-37
	Fig 1-8	38-45
	資料 1-6	46-51

➤略語集

ANG	アンギオテンシノーゲン
AVA	動静脈吻合
$\beta$ 2AR	$\beta$ 2 アドレナリン受容体
$\beta$ 3AR	$\beta$ 3 アドレナリン受容体
CIVD	寒冷血管拡張反応(cold-induced vasodilation)
HF	高周波心拍変動 (high frequency)
HRV	心拍変動 (heart rate variability)
Hunting Test	冷水負荷試験 [右手第2指中節部まで 0°C氷水中に 20 分間浸水]

【Hunting Test の測定点一覧】

BT	浸水部皮膚温度の初期最低値(bottom temperature)
dT	浸水中の皮膚温度上昇(WT-BT)
DT	浸水直後の最大皮膚温度低下(DT:ST-BT)
ST	浸水直前温度(start temperature)
WT	皮膚温上昇時の最高温度(warm temperature)
LBM	除脂肪体重 (lean body mass)
LF	低周波心拍変動 (low frequency)
mutant 群	儉約型多型 [ $\beta$ 3-AR が T/A・A/A 型]
PEE	食後の代謝 (postprandial energy expenditure)
PNS index	副交感神経の活動係数 (parasympathetic nervous system)
REE	安静時代謝 (resting energy expenditure)
SNS index	交感神経の活動係数(sympathetic nervous system)
SSNA	皮膚交感神経活動(skin sympathetic nerve activity)

TOTAL	HF+LF 合計値
UCP-1	脱共役蛋白質 1
wild 群	熱産生型多型 [ $\beta$ 3-AR が TT 型]

## 1.はじめに

### 1.1 冷え症体質と自律神経機能障害

冷え症は「身体の特定の部位のみを特に冷たく感じる場合をいう」と定義され<sup>1)</sup>、日本人では女性の約 50%に冷えの症状があるといわれている<sup>1) -3)</sup>。冷えの病態は代謝の低下や局所の血流障害などが考えられるが、冷え症の多くは冷えの原因となる基礎疾患を持たない健常者であり、体質的な傾向が強い。日本の公式医学用語では「冷え症」の疾患名は無く、重症の冷え症では疲労感や頭痛の症状を伴い、しばしば自律神経失調症と診断される<sup>4)</sup>。冷えの症状は年齢別では自律神経失調を伴いやすい更年期に多く見られるが、最近では思春期から 20 歳代の若い女性において冷えの症状を訴えるものが多い事が報告されている<sup>5) -7)</sup>。女子学生 528 人の調査によれば、冷え症体質者では自律神経機能の低下に起因する症状を訴えるものも多く、また冷え症の発症には遺伝的要因があるとの見解が示されている<sup>8)</sup>。

手や足の冷えのメカニズムは、皮膚血管の収縮による皮膚温の低下が原因であることを著者らも主観的に冷え症を訴える対象者に限り、客観的にサーモグラフィーで手の皮膚温度並びに冷水負荷による低温度であることを確かめている<sup>9) -11)</sup> (Fig 1)。皮膚血管は皮膚交感神経の支配を受けている。冷水負荷により、神経終末の温度感受性 TRP (Transient Receptor Potential) チャンネルが開かれ、Ca<sup>++</sup>と Na<sup>+</sup>が神経内に流入して生じた活動電位は感覚神経を介して脊髄後角から体温調節中枢である視索前野に伝えられる<sup>12)</sup>。それに応じて皮膚交感神経活動 (skin sympathetic nerve activity : SSNA) が亢進すると皮膚血管は収縮して皮膚温は低下する。一方、温水負荷により SSNA が低下すると皮膚血管は拡張して皮膚温は上昇する。本研究では SSNA を直接測定していないた

め、心拍変動（heart rate variability : HRV）<sup>13)</sup> を用いた方法で心臓交感神経の活動を測定して SSNA の活動を評価した（Fig2）。温度刺激のような日常遭遇する自然刺激では交感神経系は全身的に同一方向に消長するのではなく、神経支配域により異なり、拮抗的応答がみられる。この反応は交感神経系地域性反応（regional differentiation of sympathetic efferents）と呼ばれ<sup>14) 15)</sup>、血流の再配分を円滑に行うための人体の生理反応として知られている。すなわち寒冷刺激で SSNA が亢進すると同時に内臓交感神経活動は減少し、反対に温熱刺激で SSNA が低下すると同時に、内臓交感神経活動は亢進する。

## 1.2 冷え症の遺伝的背景と熱産生に関与する対立遺伝子の進化

冷え症体質の大きな個人差や、ヨーロッパ人に稀でアジア人に多いという民族差は、熱産生型と儉約型の2つの遺伝子多型に基づく可能性がある<sup>16) 17)</sup>。このエネルギー代謝関連の対立遺伝子の熱産生型多型と儉約型多型の区別は、安静時代謝の測定によって判定されている。ヒトは長期間の寒冷環境において、局所的な寒冷暴露を反復させても末梢の循環動態が変化しないために<sup>17)</sup>、凍傷のリスクを負う<sup>18)</sup>。これらは冷え症が環境に順応するのではなくて遺伝子に影響されることを示している。エネルギー代謝に関する遺伝子には多型があり、その対立遺伝子多型はエネルギーを熱として放出する量が多い熱産生型対立遺伝子とその放出量の少ない儉約型の2通りに分類することができる<sup>19) -22)</sup>。脱共役蛋白質1(UCP-1)、 $\beta 2$  又は  $\beta 3$  アドレナリン受容体 ( $\beta 2AR$ 、 $\beta 3AR$ ) の対立遺伝子多型の儉約型は、エネルギー消費量を儉約して熱産生を下げると同時に、肥満を起しやすいため<sup>19) -22)</sup>。非ヒト霊長類は熱帯に住み、飢餓に抵抗するために  $\beta 2AR$  および  $\beta 3AR$  の対立遺伝子多型の頻度は100%の

儉約型である。一方、アジア人では儉約型は夫々92%と31%であり、ヨーロッパ人は寒冷地に住むため夫々60%と8%と儉約型の頻度はアジア人より低い<sup>23)</sup>。 $\beta$ 2AR と  $\beta$ 3AR の熱産生型対立遺伝子の利点は、厳寒の氷河期に体温を高めるためのものであり、ヨーロッパ人では儉約型対立遺伝子よりも熱産生対立遺伝子の出現率が日本人より高いことを説明できる<sup>23)</sup>。

UCP-1 遺伝子の野生型 (wild) の5'末端から3,926番目の塩基AがGに変異した一塩基多型 (mutant) は儉約型であり、安静時代謝が野生型に較べて1日当たり約100kcal低下していて、食事療法による減量効果が低い<sup>24)</sup>。 $\beta$ 2AR 遺伝子の産物である $\beta$ 2ARのN末端から16番目のアミノ酸であるアルギニン (Arg) がグリシン (Gly) に変異した多型は熱産生型であり、脂肪分解能が亢進し、野生型に較べて安静時代謝が100~300kcal亢進している<sup>25)</sup>。 $\beta$ 3AR 遺伝子の産物である $\beta$ 3ARのN末端から64番目のアミノ酸であるトリプトファン (Trp) がアルギニン (Arg) に変異した儉約型多型では、野生型に比べて、安静時代謝が約200kcal低下していて、減量が困難であると報告されている<sup>21)</sup>。また $\beta$ 3ARは脂肪組織における交感神経刺激で神経末端から分泌されるノルアドレナリンの受容体として重要であり、寒冷刺激や摂食により交感神経活動が上昇する状態では、褐色脂肪組織では熱産生が増加し、白色脂肪組織では脂肪分解が促進される<sup>19) 20) 26)</sup>。

本研究と関連性が高いヒトの $\beta$ 3ARについてはいくつかの重要な報告がある。まず $\beta$ 3ARは第8染色体に座位を持ち、脂肪組織以外にも血管内皮細胞、血管平滑筋、心筋の3箇所では蛋白質が発現していることがWestern blotを用いて実証され、その3組織において特異的作動薬によって活性を現すという総説<sup>27)</sup> [資料1]がある。また $\beta$ 3AR特異的な



アドレナリン作動薬で実際に動脈が弛緩すること<sup>28)</sup> [資料 2]、血管内膜の  $\beta$  3AR を介して一酸化窒素 (NO) と内膜由来過分極因子 (EDHF) が産生され、血管平滑筋に伝えられる一方、血管平滑筋にも  $\beta$  3AR が存在して cAMP を介して弛緩を起こす機序も明らかになっている<sup>29)</sup> [資料 3]。一方、心筋では酸素消費の減少、拡張機能の向上により心機能を向上させる<sup>27)</sup>が、ヒトを対象とした本研究の  $\beta$  3AR の儉約型変異を持つ者は熱発生型変異を持つものに比して高血圧を起こし易く ( $P<0.01$ )、心拍数も多い ( $P<0.05$ )<sup>27) 30)</sup>ことが明らかになっている。さらに直接心電図の RR 間隔からパワースペクトルを求め解析した心臓の自律神経活動は  $\beta$  3AR 儉約型変異によって低下することも解明されている<sup>31) 32)</sup>。

アンギオテンシノーゲン (ANG) [遺伝子にアミノ酸は無い] には 235 番目のアミノ酸であるメチオニン (Met) がトレオニン (Thr) に変異した多型が存在する。この Met235Thr 遺伝子多型は、Met/Met のホモ接合体を有するものに比べてヒト本態性高血圧と内臓肥満の発症リスクが高い<sup>33) 34)</sup>。食塩節約型対立遺伝子である ANG 遺伝子の Thr/Thr のホモ接合型は、ナトリウムが欠乏しやすい熱帯雨林に住むチンパンジーの 100% でみられ、アンギオテンシン II による末梢血管収縮とアルドステロン合成による食塩保持で血圧を維持する<sup>34) 35)</sup>。

本研究の目的は、健康な若年女性に冷水負荷を行い、冷え症の客観的判断法としてサーモグラフィーと寒冷血管拡張反応の有効性を検証することである。そして冷え症の要因として発熱量の少ない儉約型の遺伝子多型が関わっているか否かを明らかにし、さらに冷えの発症機序について、関連遺伝子による熱放散の制御の点から、また受容体機構で血行動態に直接関連している自律神経機能との関連性から解明することである。検討は次の 2 点から行った。まず冷え症体質者とそうでない者で、エネルギー

ギー代謝や高血圧の関連遺伝子の変異の出現頻度に差があるか否か検討した。次に、自律神経機能と関係の深い  $\beta$  3AR 遺伝子に焦点を当て、wild 群（熱産生型多型）と mutant 群（儉約型多型）の 2 群に分けて、冷水負荷を実施した時の自律神経活動の変化を比較検討した。

## 2. 方法

### 2.1 被検者

被検者は医療技術系短期大学に在籍する健康な女子学生（19～24 歳）27 人である。2.2 で記載した調査から循環器の疾患およびレイノー現象が無いことを確認し、書面による研究参加の同意を得られたものを実験対象者とした。また本研究は埼玉県立大学倫理委員会の承認（1402: 2002 年 12 月 16 日、26114:2015 年 3 月 6 日）を受け、実験は安全面と匿名性に十分配慮して行った。

### 2.2 冷えの自覚症状の調査

実験に先立って自記式質問紙(調査票 1.2.3)を用いた調査を行った。

調査票 1：冷える部位、しびれや痛みの有無、症状の起きる季節・1 日のうちの時間帯、冷水に対する反応、しもやけの有無、レイノー現象の有無

調査票 2：冷えによる日常生活への支障の有無、冷えに対する対処の仕方、遺伝素因、好む食べ物、不定愁訴の有無

調査票 3：8 項目から成る冷えの自覚症状の程度と冷えを緩和するための対処法についての質問。これらを重要項目 3 項目と参考項目 5 項目に分け、重要項目 2 項目以上、重要項目 1 項目に参考項目 2 項目以上、参考項目 4 項目以上のものを冷え症と判定した<sup>36)</sup> [資料 4]。

### 2.3 被検者の条件

実験前日は静かに生活し、睡眠時間は 7 時間以上を確保するように指示した。性周期の判定は 2 か月以上基礎体温を測定し、測定できない者は前月の生理終了日から起算して低温期と高温期を判定した。実験当日

の性周期は低温期 19 人、高温期 4 人、不明 4 人である。

## 2.4 実験手順

実験当日、被験者は朝食抜きで朝 9 時に実験室に来室し、薄手のパジャマに着替え、トイレを済ませてからインピーダンス式体組成計(タニタ DC-320)で体重と体脂肪率を測定した。その後被験者はベッド上に仰臥位で、30 分以上安静状態を保ち、心拍数が安定したのを確認してから実験を開始した。まずダグラスバックに呼気ガスを採取したが、最初の 1 分間は廃棄しその後 10 分間採取した呼気ガスを検体とした。採取後すぐに呼気ガス量(V)、呼気酸素濃度( $F_{E_{O_2}}$ )、呼気二酸化炭酸濃度( $F_{E_{CO_2}}$ )を測定し、計算式から安静時代謝を求めた。呼気ガス量は 13.50 ベネディクト・ロス呼吸計を用い、 $F_{E_{O_2}}$  と  $F_{E_{CO_2}}$  はガス分析装置(アンリティカルインスツルメント RAS-31,41)を用いて測定した。その後心電図と熱電対の各センサーを装着し、30 分間安静を保った後、右手第 2 指中節部まで 0°C 氷水中に 20 分間浸水させる冷水負荷試験(以降 **Hunting test**)<sup>17) 37)</sup>を実施し、負荷後 10 分まで経過を追った。皮膚温は右手第 2 指先端に熱電対を貼り付け、パソコンと接続した多点温度測定器(KEITHLEY 2000 MULTIMETER)で 10 秒間隔に温度を記録した。**Hunting test**の間、1 分間 15 回の速さで呼吸を調節しながら、CM5 誘導で心電図を記録した。血圧はデジタル自動血圧計で右上腕にカフを巻き、体温は耳式体温計を使用して、安静時と **Hunting Test** 中に、また負荷後 10 分間は 2 分間隔に血圧と体温を測定した。

以上の実験は午前中に行った。同じ日の午後、とりそぼろ 3 色弁当(514kcal、PFC バランス 14 : 16 : 66)を摂取し、食事開始 1 時間後から午前と同様の実験を行った。

実験は室温 25℃、湿度 60%に保った隔離された静かな部屋で行い、27 人のうち 13 人は夏季（8 月から 9 月）に実施した。14 人は夏季と冬季（12 月から 1 月）に同様の実験を行った。

## 2.5 エネルギー代謝の評価

エネルギー代謝は、朝食抜きで午前に測定したデータは安静時代謝（resting energy expenditure : REE）、食事摂取後に測定したデータは食後の代謝（postprandial energy expenditure : PEE）とし、除脂肪体重（lean body mass : LBM）で除した値を用いた。

## 2.6 自律神経活動の評価（心拍変動解析）

自律神経活動の評価は、HRV の周波数成分をパワースペクトル解析する方法を用いた<sup>13) 38)</sup>。HRV を周波数 0.04~0.15Hz 低周波心拍変動 (low frequency : LF) と 0.15~0.4Hz 高周波心拍変動 (high frequency : HF) に分けると、前者は交感神経と心臓迷走神経の両方の活動を反映し、後者は心臓迷走神経の活動のみを反映している。HRV のスペクトル解析は、生体情報解析プログラム BIMTAS II (KISSEI COMTEC, 日本)を用いて行った。CM5 誘導で記録した波形を 512Hz でサンプリングし、連続した 300 秒の記録をハミング窓関数で処理しフーリエ解析を行った。HF+LF 合計値 (TOTAL) は自律神経全体の活動、HF/TOTAL (parasympathetic nervous system : PNS index) は副交感神経の活動、LF/HF (sympathetic nervous system : SNS index) は交感神経の活動を表す。解析時間は連続した 5 分間の記録を 1 区分とし、10 分間の値は 2 区分の平均値を求めた。

## 2.7 遺伝子多型の解析

本論文中の遺伝子多型の分析の詳細は既報のとおり女子栄養大学医化学教室の香川靖雄、石井由香によって行われた<sup>19)-21)</sup>。DNAは唾液または末梢血から抽出し、唾液はDNA採取キット(Oragene)を使用し、末梢血はQIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)を使用した。分離したDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で変異を検出するべきDNA断片を増幅させた後に、制限酵素断片長分析法(restriction fragment length analysis)で判定した。すなわち各多型の検出に適した制限酵素を用いてDNAを切断してポリアクリルアミドゲル電気泳動で各wildとmutantの既知DNA断片試料と共に分析し判定した。使用した制限酵素名はUCP1ではBcl I、 $\beta$  2ARではNco I、 $\beta$  3ARではMva I、ANGではBstVIである。

## 2.8 統計解析

統計解析はパソコン用統計ソフトSPSS ver19.0を用いた。冷え症と非冷え症の2群の独立性の検定はPearsonのカイ2乗検定を行った。wildとmutantの異なる2群の平均値の差の検定はt検定を行った。Hunting testによるSNS indexとPNS indexの変化の傾向解析は分散分析(反復測定)を行った。以上は $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。Hunting testの温度測定点の2群の平均値の差の検定はt検定を行い、 $P < 0.05$ あるいは $P < 0.10$ を有意差ありと判定した。Fig 7.8のグラフのエラーバーは95%信頼区間を示す。

## 2.9 解析対象からの除外条件

SNS indexが午後と比較して午前の方が明らかに亢進していて、その

原因が明らかな 2 名は自律神経活動の評価対象から除外した。除外した 1 名は非冷え症であり (UCP-1-G/G、 $\beta$  2-Arg/Gly、 $\beta$  3-Trp/Arg、ANG-Thr/Thr)、もう 1 名は冷え症 (UCP-1-A/G、 $\beta$  2-Gly/Gly、 $\beta$  3-Trp/Arg、ANG-Thr/Thr) と判定された。

### 3.結果

#### 3.1 本研究における冷え症の定義

本研究における冷え症を次のように定義した。

- ・体の一部に冷えがあることを自覚している。(自覚症状)
- ・冷えの自覚は1年間の半分以上の季節にわたり、少なくとも過去1年以上その状態が続いている。(継続性)
- ・冷えによる不快感を持ち、冷えを緩和するための対処をしている。(緩和行動)

これら3つの要件を満たすものを冷え症とし、調査票3を基にして、調査票2(と3)を参考にしながら非冷え症と冷え症のグループ分けを行った。

その結果から、本研究対象27人を非冷え症10人、冷え症17人とした。対象者の基本情報をTable 1にまとめた。非冷え症群と冷え症群のBMIはそれぞれ $20.5 \pm 1.6$ 、 $20.3 \pm 2.9$ であった。実験は27人全員に実施したが、除外条件に該当する2名は自律神経活動およびHunting testの解析から除いた。除外した2名のうち1名は睡眠不足、1名は自律神経失調による不定愁訴を有するものである。

#### 3.2 Hunting Test 中の浸水部皮膚温度の変化

Hunting test の測定点をFig3に示した。浸水直前温度(start temperature: ST)、浸水部皮膚温の初期最低値(bottom temperature: BT)、皮膚温上昇時の最高温度(warm temperature: WT)、浸水中の皮膚温度上昇(dT: WT-BT)、浸水直後の最大皮膚温度低下(DT:ST-BT)<sup>33)</sup>とした。

##### 3.2.1 Hunting Test の季節変動



対象者 14 人の夏季(8-9 月)と冬季(12-1 月)の摂食前と後の Hunting Test の変化を Fig4 に示した。青色は冷え症、赤色は非冷え症の変化である。夏季実験の摂食前の測定において、冷え症の WT と dT は非冷え症より低下し有意差が見られた。冬季実験の測定温度は冷え症と非冷え症の有意差はみられない。

### 3.2.2 冷え症の特徴は夏季・摂食前の Hunting Test の温度の低下である

冷え症 17 人と非冷え症 10 人のそれぞれの Hunting test 中の浸水部皮膚温度の変化を Fig5 に示した。ST、BT、WT、dT は非冷え症群に比べ冷え症群は低下し、WT と dT で有意な低下が認められた (Table 2、 $P=0.007, P=0.006$ )。

## 3.3 遺伝子タイプと冷え症

非冷え症群と冷え症群の 2 群と UCP-1、 $\beta$  2AR、 $\beta$  3AR、ANG の各遺伝子タイプと  $\chi^2$  検定をしたところ、遺伝子タイプと 2 群間に統計的な有意差は認められなかった (Table 3)。しかし  $\beta$  3AR 遺伝子の変異の出現率は、非冷え症群 2 例 (20%) に対して冷え症群 8 例 (47%) であり、非冷え症群に比べ冷え症群で高い出現傾向が認められた ( $\chi^2$ 、 $P=0.160$ )。

### 3.3.1 $\beta$ 3AR 遺伝子タイプと Hunting Test

冷え症者の夏季摂食前と後の変化を  $\beta$  3AR 遺伝子タイプ別に示す (Fig 6)。Mutant では摂食前と後の ST に有意差が認められた。Wild では ST、WT、dT、DT のすべてにおいて有意差が認められた。

## 3.4 遺伝子タイプ別の体格因子と代謝

UCP-1、 $\beta$  2AR、 $\beta$  3AR の各遺伝子を wild と mutant の 2 群に分け

て体格因子を比較した。BMI、体脂肪率 (Fat%)、LBM はいずれも統計的な有意差は認められなかった (Table 4)。各遺伝子を wild と mutant の 2 群に分けてエネルギー代謝を比較したところ、REE と PEE はいずれも有意差は認められなかった (Table 4)。

### 3.5 $\beta$ 3AR 遺伝子タイプによる自律神経活動の評価(夏季実験)

$\beta$  3AR の遺伝子タイプを wild 群 (T/T : T 型はトリプトファンであり W 型とも表示) 17 人と mutant 群 (T/A,A/A : A 型はアルギニンであり R 型とも表示) 8 人の 2 群に分けて、自律神経活動について検討した。

#### 3.5.1 摂食前と後の自律神経バランスの変化

Table 5 と Fig 7 に摂食前と後の HRV の解析値の変化を示す。摂食前の TOTAL と LF のパワー値は、wild 群と比較して mutant 群で有意に低値を示した ( $P=0.050, P=0.018$ )。摂食により LF のパワー値は上昇し、その上昇率は mutant 群で大きく、摂食後は 2 群間の有意差は見られなくなった (Fig 7.B)。摂食前と後の HF のパワー値は、wild 群と比較して mutant 群で低い傾向を示した (Table 5, 中央)。摂食前の PNS index は mutant 群で高く、SNS index は mutant 群で低い傾向であった。摂食により PNS index は抑制され SNS index は亢進し、その変化率は mutant 群で大きく、摂食後は 2 群の差が小さくなった (Table 5、Fig 7.C,D)。

#### 3.5.2 Hunting Test 中の SNS index と PNS index の変化

摂食前と後の Hunting test 中の SNS index と PNS index の変化を Fig 8 に示した。SNS index は Hunting Test 開始から 10 分目まで低下、それ以降は上昇に転じた (Fig 8-A.C)。PNS index は Hunting test 開始

から 10 分目まで上昇、それ以降は低下に転じた(Fig 8-B.D)。2 群の比較では、mutant 群は wild 群と比較して SNS index の値が小さく、摂食前の Hunting test 10 分から 20 分、負荷後、また摂食後の Hunting test 開始から 10 分、Hunting test 10 分から 20 分、負荷後にそれぞれ有意差が見られた (Fig 8-A.C、 $P < 0.01 \sim 0.05$ )。また mutant 群は wild 群と比較して PNS index の値が大きく、摂食前の Hunting test 10 分から 20 分、負荷後、また摂食後の Hunting test 開始から 10 分、Hunting test 10 分から 20 分、負荷後にそれぞれ有意差が見られた (Fig 8-B.D、 $P < 0.01 \sim 0.05$ )。傾向解析の結果から、wild 群では摂食前の SNS index と PNS index で有意な変化が認められた (Fig 8-A.B、 $P = 0.042$ 、 $P = 0.006$ )。

## 4. 考察

本研究は、冷え症の原因を遺伝型適応から検討することが目的である。そのため冷え症を「自覚症状」、「継続性」、「緩和行動」の3点を併せ持つ者と定義し、季節順応や生活習慣による一過性の冷えと思われる者は冷え症から除いた。基礎検討として14人に対し、夏季と冬季に温度と湿度が同じ実験環境下で、それぞれ食事摂取前と後に Hunting Test を実施した。その結果 Fig4 に示したように、夏季の食事前に冷え症の症状が明らかであることが確認できた。

### 4.1 儉約型対立遺伝子を有する被験者の肥満の欠如

対象は基礎疾患を持たない健康な20歳前後の女子学生とした。日本人の食事摂取基準 2015<sup>39)</sup>で示されている20歳代女子の基準値と比較すると、身長は158.0cmに対して、157.7cm とほぼ同じであり、体重も50.6kgに対して50.6kgと同様である。Table 1 に示したように非冷え症と冷え症のBMI、体脂肪率 (body fat)、安静時代謝(REE)に有意差は無い。体重あたりの基礎代謝量は食事摂取基準で示された22.1kcal/kg/日に対して、本対象は23.0 kcal/kg/日とやや高めであった。これは、本研究では厳密な条件下での基礎代謝は測定できなかったため、基礎代謝に準ずるものとして安静時エネルギー代謝 (resting energy expenditure : REE) を用いたためと考えられる。本対象の体型と代謝量は、日本人女子のほぼ標準的な値と考えられる。

本対象では、各遺伝子多型のBMIと体脂肪率に統計的な有意差は見られなかった。また、各遺伝子多型のREEとPEEに統計的な有意差は見られなかった。 $\beta$ 3AR 遺伝子変異があると安静時代謝量が200kcal低下していること<sup>21)</sup>が広く知られている。本学上西一弘教授の文部科学

省ハイテクリサーチ研究報告書(1999-2003年)の図 B3 によれば平均 50 歳の日本人女性では REE が儉約型で有意に低いのに対し ( $P<0.01$ )、同様に行われた女子大学生 175 人のデータによれば、 $\beta$  3AR 遺伝子変異の有無と REE に差が無いことが確認されている。儉約型多型を有してはいるが若年女性に肥満傾向が無い一因として、日本の若い女性の間で食事制限が行われていることが挙げられる。国民栄養健康調査 (平成 20 年) によれば、年齢 20-29 歳の若い女性の BMI 実測値は 20.7 であるにも関わらず、BMI 19.0 を理想としている<sup>40)</sup> [資料 5]。さらに、平成 25 年度国民健康栄養調査によれば、女性 20-29 歳のエネルギー摂取量は僅か 1,628kcal/day、であり、痩せ (BMI<18.5) は 21.5%であるのに対して肥満 (BMI>25) は僅か 10.7%と  $\beta$  3AR の儉約型多型頻度 31%を大きく下回っている。多くの 20 歳代女性は体重計を用いて体重を調節し、その結果低体重は代謝量低下も伴う。そのため冷え症の儉約型遺伝子多型の効果は肥満や REE 変化をともなっていない。

#### 4.2 Hunting Test による非冷え症と冷え症の明確な相違(夏季、食事前)

Fig 5 は冷え症 (16 人) と比較して、非冷え症 (9 人) の被験者は明らかに皮膚温度の回復が迅速かつ大きいことを示している。浸水による皮膚温上昇時の最高温度 (WT) と浸水中の皮膚温度上昇 (dT) は非冷え症群に比べ冷え症群は低下し、WT と dT で有意な低下が認められた (Table2、 $P=0.007$ ,  $P=0.006$ )。このように、冷え症の本質的な知見は、BMI に因らない、寒冷皮膚試験によって検出される (Table1)。

#### 4.3 儉約型対立遺伝子の遺伝子発現は環境に応じて変化する

BMI や肥満は多くの遺伝要因により影響され、その一つの要因として

$\beta$  3AR 変異がある可能性をメタ解析は示している<sup>41)</sup>。しかしその差は BMI で  $0.2\text{kg/m}^2$  程度であり、 $\beta$  3AR 変異が BMI に影響を及ぼすとしても、その影響は大きくないことも示唆している。

任意の遺伝子型は、個人の生涯を通じて不変である。しかし mRNA の転写によって示されるように、表現型の遺伝子発現は環境に適応する柔軟性がある<sup>42)</sup>。肥満患者の脂肪組織における熱産生遺伝子 ( $\beta$  3AR 遺伝子) の発現の減少は  $\beta$  3AR 蛋白質そのものが減少するため、ホルモンやアドレナリンの刺激の両方への反応が低下して多型に関係なく熱産生を活性化する能力は低下する。本研究で対象とした女子学生は、瘦身願望による食習慣の偏りをもった集団であり、この事が本集団における遺伝子タイプの特徴を見出すことができなかつた原因の一つと考えられる。

#### 4.4 冷え症と自律神経機能障害の診断基準

公式医学用語には「冷え症」がないので、重症例の診断は自律神経機能障害としている。冷え症の診断基準は寺澤の基準を基にして<sup>36)</sup>、冷えの症状が冬季だけではなく夏季にも及んでいること、冷えの症状が一時的なものではなく 1 年以上の長期間継続していること、冷えを緩和するための行動をしていることを条件とした。これにより、冬季のみ冷えの症状を生じる季節順応によると思われる者は除外した。Hunting test 中の浸水部皮膚温は、非冷え症群に比べ冷え症群は低下していることが著者らの実験でも確かめられ (Fig 5)、寒冷刺激に対して皮膚血管の収縮性が亢進している者を冷え症群として抽出することができた。

#### 4.5 儉約型対立遺伝子およびエネルギー消費型対立遺伝子の人類学

UCP-1、 $\beta$  2AR、 $\beta$  3AR、ANG のすべての遺伝子多型は単独では冷え

症の出現頻度に有意差は認められなかった。しかし  $\beta 3AR$  の変異の割合は非冷え症群は 20%に対し、冷え症群では 47%と高い出現率を示した (Table3)。これは冷え症の要因として  $\beta 3AR$  遺伝子が関与している可能性を示すものである。64番目が Arg に変異した  $\beta 3AR$  の儉約対立遺伝子は、熱帯の哺乳動物が飢餓を生き抜くために、エネルギーを儉約して脂肪として蓄える有利な遺伝子、すなわち飢餓耐性の遺伝子として進化したものと考えられている<sup>19) 42)</sup>。

Table 3 の  $\beta 2 \cdot \beta 3AR$  の儉約型対立遺伝子は、ヒト以外の霊長類の 100%で発見されている<sup>23)</sup>。これは、温帯と飢餓への適応反応という点で、冷え症体質者が持つ特性と一致している。動物実験では、慢性的な寒冷暴露で褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞の  $\beta 3AR$  が増加すること<sup>43) 44)</sup>、 $\beta 3$  アゴニストを投与すると皮膚血流<sup>45)</sup>や腓ランゲルハンス島の血流が増加すること<sup>46)</sup>が確認されている。 $\beta 3AR$  が末梢血管に実在し、弛緩反応を起こす事<sup>27)–30)</sup>、特に寒冷刺激により、交感神経がノルアドレナリンを分泌して皮膚等の微小循環に変化を与えることを示している。

ANG 遺伝子の変異があると塩分が少ない環境下では塩分を体内にため込むと同時に脂肪蓄積に有利な働きをするが、塩分を過剰に摂取すると高血圧になりやすい<sup>19) 34)</sup>。Table 3 下部に示したほぼ有意な結果は ( $P=0.055$ )、肥満を含むいくつかのメカニズムによって、冷え症の発症に ANG 遺伝子の変異が関係していることを示唆している<sup>33)</sup>。

#### 4.6 冷え症の自律神経機能

次に冷えの発症機序を解明するために、 $\beta 3AR$  の遺伝子多型から wild (熱発生型) 群と mutant (儉約型) 群の 2 群に分けて、自律神経活動について検討した。自律神経活動は摂食により変動し、食後 90 分では

心臓交感神経活動は有意に亢進している<sup>47)</sup>。本研究では摂食の影響をみるために摂食前と後の自律神経活動を測定した (Table 5、Fig 5)。摂食前の TOTAL と LF 値は、wild 群と比較して mutant 群は有意に低い値であった (Fig 5 A.B)。摂食後はこのような違いは明確ではなくなった。健康な男子 21 人の結果では、安静時の TOTAL パワーは mutant 群で有意に低下しており、姿勢変化後 (仰臥→立位) は 2 群の差が見られなくなったと報告されている<sup>31)38)47)</sup>。これは変異群における生理的变化に対する低い自律神経活動に起因していると考えられる。本研究結果で、摂食後より摂食前に 2 群の違いが現れたことは、 $\beta$ 3AR の儉約型遺伝子多型があると空腹状態でより大きく自律神経活動が抑制されることを示すものであり、 $\beta$ 3AR の儉約型多型は飢餓に対する適応遺伝子であるとの推測を裏付けるものと考えられる。また冷え症体質者でみられる自律神経症状は、疲労感、頭重感、肩こりなどの副交感神経性の症状が多い事が特徴であるが<sup>3)4)13)</sup>、今回の結果から mutant 群で PNS index が高い傾向を示したことはこれを裏付けるものと考えられる。

本研究で実施した Hunting test は寒冷血管拡張反応(cold-induced vasodilation:CIVD)を誘発する<sup>48)</sup>【資料 6】。皮膚血流は寒冷刺激により減少するが、極端な低温のときは例外的に寒冷血管拡張反応を生じて皮膚血流は上昇する。この反応は血流が途絶えたことによる組織の壊死を防ぐための生理的役割とされている。微小神経電図法による検討から、寒冷刺激により皮膚温が低下する最初の時期は SSNA が増加し、皮膚温が上昇する時期には SSNA は減少していることが明らかにされている<sup>49)</sup>。本研究では SSNA を直接測定していないため、心拍変動を用いた方法で心臓交感神経の活動を測定することで間接的に SSNA を評価した。日本人男女 25 名 (19-32 歳) の足趾の氷水侵漬時の寒冷血管反応の検討



から、冷え症では寒冷血管反応が低下しており、その背景として皮膚交感神経が亢進状態にあることが示唆されている<sup>50)</sup>。本研究では、 $\beta 3AR$  変異保有者では心臓交感神経活動(=SNS index)が低いことに注目し、冷え症者における寒冷血管拡張反応の低下と  $\beta 3AR$  の変異を関連付けて検討した。その結果、mutant 群では wild 群と比較して冷水負荷により抑制された心臓交感神経活動の回復が遅延し、2 群に有意差が認められた (Fig 6-A.C)。すなわち皮膚交感神経の緊張が冷水負荷解除後も持続することが寒冷血管拡張反応の低下と関連していることが示唆された。

#### 4.7 冷え症と代謝の低下

本対象者は夏季と比較して冬季に体脂肪量が増加することを考慮して、LBM 当たりの代謝量で比較した。その結果、冷え症と代謝の低下との関係は証明されなかった。しかしデータを精査してみると、非冷え症群に対して冷え症群は REE (  $31.35 \pm 2.96$  v.s.  $30.45 \pm 4.62$  Kcal/day/LBM ) と PEE (  $36.71 \pm 2.91$  v.s.  $34.02 \pm 5.28$  Kcal/day/LBM ) はわずかに低下していることから、冷え症の要因として代謝の低下を否定することはできない。

また Fig 6 に示したように、冷え症者の食事摂取前と後の Hunting Test の変化は  $\beta 3AR$  の変異保有の有無で異なっている。mutant 群は食事摂取の影響を受けないが、wild 群は食後の Hunting Test の温度が有意に高くなり CIVD が亢進している。これは冷えの原因が mutant 群は  $\beta 3AR$  遺伝子変異がもたらす交感神経の影響であるのに対して、wild 群は代謝の低下が影響していることを示しているかもしれない。

冷えの原因は複合的であり、遺伝的要因や生活習慣、加齢による生理的変化など多くの要因の影響を受ける。また寒冷刺激に対する人体の感受

性はその人が持つ熱容量や皮膚血流量の絶対値にも影響され、室温、季節、食事、性周期などによっても変動する。本実験はこれらの変動要因を可能な限り除いた条件下で行った。冷え症体質と遺伝子タイプに統計的な有意差が見いだせなかったことは、冷えの原因は単一ではなく、 $\beta$ 3AR の遺伝子タイプで説明できるのは冷えの原因の一部であることを示していると考えられる。

冷え症者では特定の部位を冷たいと感じ、実際その部位の温度が低下している。今回の結果から Hunting test 中の乱調反応時（皮膚温度の変動が繰り返される現象）の浸水部皮膚温は、冷え症体質者では非冷え症体質者より低い温度で推移している（Fig 5）。冷え症では寒冷血管拡張反応 CIVD が抑制され、これは  $\beta$ 3AR 遺伝子変異が引き起こす交感神経の反応性の低下に起因すると推定した。すなわち冷え症体質の本態は、人類が寒冷・飢餓状態を生き抜くために、血液の再配分により体幹部への血流を増やし、体表面からの放熱を防ぐために備わった寒冷耐性機能の作用の結果であると考えられる。

#### 4.8 本研究の限界と $\beta$ 3AR の心臓血管系における機能

Fig 5 に長いエラーバーで示したように若い女性の心拍は分散が大きく、 $\beta$ 3AR と ANG 遺伝子の多型が合併している頻度は、冷えのないものの 20%（2/10 被験者）に対して冷えを持つもの 47%（8/17 被験者）であり、ほとんど有意水準に達していない。これは対象者の数が少ないためと考えられる。心拍変動のパワースペクトル解析を使用して心臓の自律神経系の活動を推定することは、まだ決定的ではない<sup>38)</sup>。したがって筆者らの結果は、新しい実験事実と今後の研究で明らかにされるべきである。我々の結果から、変異群の PNS index の増加はほぼ有意水準で

あるため、冷え症の被験者が自律神経機能障害を持っていたことを支持することができる (Table 5)。本研究は、しばしば診療所で発見される重度冷え症のように、冷え症と  $\beta$  3AR 儉約型多型保持者は低い心臓交感神経活動(=SNS index、 $P=0.069$ , Table 5 下部)を持っている可能性があるという事実を注目した。事実、心電図の RR 間隔からパワースペクトルを求め解析した心臓の自律神経活動は  $\beta$  3AR 儉約型変異によって低下することも解明されている<sup>31)32)</sup>。交感神経制御の減少による局所的な現象は、疲労、不眠、頭痛、皮膚の微小循環の血管拡張とは無関係の多くの他の徴候を伴う全身の冷えに影響を及ぼす可能性がある。冷え症の被験者は明らかに非冷え症のものと比較して血管拡張の減少を示した (Table 2)。寒冷血管拡張反応のメカニズムは<sup>15)17)</sup>まだ議論の余地がある。

本研究の最大の問題点は脂肪細胞に固有と考えられてきた  $\beta$  3AR とその遺伝子多型がなぜ、血管の反応や心電図に影響を与えたのかという点である。しかし、最近になって、 $\beta$  3AR が心筋と血管平滑筋でも発現し、機能していることが明らかになった<sup>27)-30)</sup>点である。すなわち、血管内皮細胞、血管平滑筋、心筋の3箇所では  $\beta$  3AR の蛋白質が証明され、特異的作動薬によって活性を現すのである。その分子機構の解明は本研究の限界を超えるが、血管内膜の  $\beta$  3AR を介して一酸化窒素 (NO) と内膜由来過分極因子 (EDHF) が産生され、血管平滑筋に伝えられる一方、血管平滑筋にも  $\beta$  3AR 存在がして cAMP を介して弛緩を起こす<sup>29)</sup>。さらに本論文で扱った  $\beta$  3AR の儉約型遺伝子多型 (mutant) は非肥満日本人の循環器に影響し熱発生型多型 (wild) に加えて有意に高血圧を起こし易く ( $P<0.01$ ) 心拍数も多い ( $P<0.05$ )<sup>30)</sup>。手の皮膚の微小循環の動静脈吻合 (AVA) は、体温調節の血流の重要な決定因子である。吻合

は筋層を含む複雑な構造をしていることから本研究の  $\beta 3AR$  の関与は排除できないものの、吻合の支配的な受容体は  $\alpha 2AR$  である<sup>51)</sup>。  $\beta 3AR$  がアドレナリン作動薬で動脈拡張を起こすという事実<sup>27) 28)</sup>はあり、心電図パワースペクトル解析による心臓の自律神経活動は  $\beta 3AR$  儉約型変異によって低下することも解明されているが<sup>31) 32)</sup>、これらの心臓血管系における  $\beta 3AR$  の変異の影響と本研究の冷え症による **Hunting test** の寒冷血管拡張反応変化との関連は今後の課題として残された。

## 5.結論

健康な若年女性を対象とし、冷え症と非冷え症の2群に分け、肥満関連遺伝子と高血圧関連遺伝子の変異の出現頻度と、冷水負荷時の浸水部皮膚温の変化を検討した。その結果、冷え症体質者では $\beta 3AR$ 遺伝子の儉約遺伝子多型の出現率が高く、冷水負荷に対して寒冷血管拡張反応が抑制されていることがわかった。また、 $\beta 3AR$ 遺伝子の儉約遺伝子多型群では冷水負荷により抑制された心臓交感神経活動の回復が遅いこと、すなわち皮膚交感神経の緊張が冷水負荷解除後も持続することが寒冷血管拡張反応の低下と関連していることが示唆された。 $\beta 3AR$ 遺伝子は脂肪細胞だけでなく、血管、心臓でも発現されており、その多型は血圧、心拍等に影響する。心電図のパワースペクトル解析から心臓の自律神経活動は $\beta 3AR$ 儉約型変異によって低下することは既知である。以上から、冷え症は $\beta 3AR$ 遺伝子儉約遺伝子多型が引き起こす交感神経の反応性の低下に起因する可能性が示唆された。

## 謝辞

実験協力者として実験に参加し、貴重なデータを提供してくださいました埼玉県立大学短期大学部衛生技術学科の元学生のみなさまに深く感謝申し上げます。

冷え症体質の検討を始めて以来、この間ずっと背中を押し続けていただきました女子栄養大学保健センター所長の荒木英爾先生に深く感謝申し上げます。

遺伝子の解析で多大なるご協力をいただきました、女子栄養大学医化学研究室 大学院修了生の石井由香氏に感謝申し上げます。

何倍もの時間がかかってしまいましたが、最初から変わることなく、教育者として研究者として最高の指導をしていただきました女子栄養大学副学長・医化学研究室の香川靖雄先生に心からの感謝を申し上げます。

最後になりますが、女子栄養大学で学ぶ機会に恵まれ、たくさんの方に温かく受け入れていただき、学ぶ場所を提供していただきましたことを感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) 九嶋勝司：冷え性．治療, 44, 2035-2040 (1962)
- 2) 柴原直利, 伊藤隆：冷え症と末梢循環障害．漢方と最新治療, 8, 317-323 (1999)
- 3) 三浦友美, 効野好子, 住本和博, 金山尚裕：青年期女子の「冷え」の自覚とその要因に関する研究．母性衛生, 42, 784-789 (2001)
- 4) KINOSHITA, T., ABE, R.T., HIMENO, A., TSUNEKAWA, K, NAKANE, S., IKEDA, S. Peripheral sympathetic nerve dysfunction in adolescent Japanese girls following immunization with the human papillomavirus vaccine. Intern Med. 53(19):2185-2200 (2014)
- 5) 近藤正彦, 岡村靖：冷え症の病態に関する統計学的考察．日本産科婦人科学会雑誌, 39, 2000-2004 (1987)
- 6) 高山紗代, 河合晴奈, 今井美和：石川県北部における女子中学生の冷えの自覚の実態調査．石川看護雑誌, 7, 71-79 (2010)
- 7) 定方美恵子, 佐藤悦, 村山ヒサエ：女性の冷え症の実態と冷房使用・食生活の関係 一年代的特徴を中心に－．新大医短紀要, 6(1), 47-58 (1996)
- 8) 大和孝子, 青峰正裕：女子大学性における冷え症と身体状況および生活環境との関連．総合健診, 29, 878-884 (2002)
- 9) 荒川恭子, 荒木英爾：サーモグラフィによる冷水負荷試験の検討－若年女子の冷え症体質者を対象として－．埼玉県立衛生短大紀要, 21,15-19 (1996)
- 10) 荒川恭子, 荒木英爾：サーモグラフィによる若年女子冷え症体質者の生理学的検討－片側上下肢冷水負荷試験による末梢皮膚温の変動－．埼玉県立大学短期大学部紀要, 1, 23-28 (1999)

- 11)高取明正, 奥田博之, 関場香, 谷崎勝朗: サーモグラフィによる冷え症の病態生理学的検討. 環境病体研報告, 61, 46-54 (1990)
- 12) 富永真琴: 侵害刺激受容に関わる transient receptor potential vanilloid 1(TRPV1) 及び transient receptor potential ankyrin 1(PRTA1)の活性化、制御メカニズム. 薬学雑誌.130 (3), 289-294 (2010)
- 13) MILLIS, R.M., AUSTIN RE, HATCHER M.D., BOND, V., FARQUE, M.U., GORING, K.L., HICKEY, B.M., DeMEERSMAN, R.E. : Association of body fat percentage and heart rate variability measures of sympathovagal balance. Life Sci. 86:153-157. (2010)
- 14) WALTHER, O-E.,IRIKI, M. and SIMON,E.:Antagonistic changes of blood flow and sympathetic activity in different vascular beds following central thermal stimulation.  
II.Cutaneous and visceral sympathetic activity during spinal cats. Pflugers Arch. 319:162-184 (1970)
- 15) CHARKOUDIAN, N. : Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans. J. Appl. Physiol. 109(4):1221-1228. (2010)
- 16) HIRAI, K., HORVATH, S.M., WEINSTEIN, V.: Differences in the vascular Hunting reaction between Caucasians and Japanese. Angiology. 21(8):502-510 (1970)
- 17) DAANEN H.A.: Finger cold-induced vasodilation: a review. Eur. J. Appl. Physiol. 89(5):411-426 (2003)
- 18) CHEUNG, S. S., DAANEN, H. A.: Dynamic adaptation of the peripheral circulation to cold exposure. Microcirculation. 19(1):65-77 (2012)



- 19) KAGAWA, Y., YANAGISAWA, Y., HASEGAWA, K., SUZUKI, H., YASUDA, K., KUDO, H., ABE, M., MATSUDA, S., ISHIKAWA, Y., TSUCHIYA, N., SATO, A., UMETSU, K., KAGAWA, Y.: Single nucleotide polymorphism of thrifty genes for energy metabolism: evolutionary origins and prospects for intervention to prevent obesity-related diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 207-222 (2002)
- 20) KAGAWA, Y., YANAGISAWA, Y., SAIGUSA, A., FUKUSHIMA, A., SAKUMA, K., HIRAOKA, M., HIRAI, C., SONE, H., KAMACHI, K. and KUDO, H.: Human nutrigenomics of membrane transporters and receptors to control metabolic syndrome. *Curr. Top. Bioscience Res.*, 9: 1-28 (2007)
- 21) YOSHIDA, T., SAKANE, N., UMEKAWA, T., SAKAI, M., TAKAHASHI, T. and KONDO, M. : Mutation  $\beta$ 3-adrenergic receptor gene and response to treatment of obesity. *Lancet*, 346:1433-1434 (1995)
- 22) SAKANE, N., YOSHIDA, T., UMEKAWA T., KOGURE, A., KONDO, M.: Beta2-adrenoceptor gene polymorphism and obesity. *Lancet*. 353(9168):1976 (1999)
- 23) TAKENAKA, A., NAKAMURA, S., MITUNAGA, F., INOUE-MURAYAMA, M., UDONO, T., SURYOBROTO, B.: Human-specific SNP in obesity genes, adrenergic receptor beta2 (ADRB2), Beta3 (ADRB3), and PPAR  $\gamma$ 2 (PPARG), during primate evolution. *PLoS One*. 7(8):e43461 (2012)
- 24) DANIEL, R. and FREDERIC, B.: Mitochondrial uncoupling

proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J. Physiol.*, 529:3-10 (2000)

25) JOHN, J.L., HUA, F., LAURIE, D., JIANWEI, W., JAMES, E.S., NIRANJAN, K. and HARDESH, G.: Association analysis of AR polymorphisms with obesity and metabolic alterations. *Metabolism*, 56:757-765 (2007)

26) ARCH, J.R., AINSWORTH, A.T., CAWTHORNE, M.A., PIERCY, V., SENNITT, M.V.,

THODY, V.E., WILSON, C. and WILSON, S.: Atypical beta-adrenoreceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*, 309: 163-165 (1984)

27) Gauthier C1, Rozec B, Manoury B, Balligand JL : Beta-3 adrenoceptors as new therapeutic targets for cardiovascular pathologies. *Curr Heart Fail Rep.* 8(3):184-92.(2011)

28) Gauthier C1, Langin D, Balligand JL : Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci.* .21(11):426-31.(2000)

29) Rozec B, Gauthier C..*Pharmacol Ther* :  $\beta$  3-Adrenoceptors in the cardiovascular system. Putative roles in human pathologies. *Pharmacology & Therapeutics.* 111(3):652-73 (2006)

30) MASUO, K., KATSUYA, T., FU, Y., RAKUGI, H., OGIHARA, T., TUCK, M. L. (2005). Beta2- and beta3-adrenergic receptor polymorphisms are related to the onset of weight gain and blood pressure elevation over 5 years. *Circulation* 111 (25), 3429–3434 (2005).

31) SHIHARA, N., YASUDA, K., MORITANI, T., UE, H., ADACHI, T.,

- TANAKA ,H., TSUDA, K. and SEINO, Y.: The association between Trp64Arg polymorphism of the beta3-AR and autonomic nervous system activity. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 84:1623-1627 (1999)
- 32) SHIHARA, N., YASUDA, K., MORITANI, T., UE, H., UNO, M., ADACHI, T., NUNOI, K., SEINO, Y., YAMADA, Y. and TSUDA, K.: Synergistic effect of polymorphisms of uncoupling protein 1 and  $\beta$ 3-adrenergic genes on autonomic nervous system activity. *Int. J. Obes.* 25: 761-766 (2001)
- 33) TAKAKURA, Y., YOSHIDA, T., YOSHIOKA, K., UMEKAWA, T., KOGURE, A., TODA, H., KAGAWA, K., FUYUKI, S., YOSHIKAWA, T.: Angiotensinogen gene polymorphism (Met235Thr) influences visceral obesity and insulin resistance in obese Japanese women. *Metabolism.* 55(6):819-824 (2006)
- 34) JENUEMAITRE, X., SOUBRIER, F., KOTELEVTSSEV, Y.V., LIFTON, R.P., WILLIAMS, C.S., CHARRU, A., HUNT, S.C., HOPKINS, P.N., WILLIAMS, R.R., LALOUEL, J.M. and CORVOL, P.: Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell.*, 71:169-180 (1992)
- 35) DUFOUR, C., CASANE, D., DENTON, D., WICKINGS, J., CORVOL, P., JEUNEMAITRE, X.: Human-chimpanzee DNA sequence variation in the four major genes of the renin angiotensin system. *Genomics.* 69 (1):14-26 (2000)
- 36) 寺澤捷年：東洋医学における「冷え症」の認識とその治療．生薬学雑誌， 41, 85-96 (1987)
- 37) SAKAKIBARA, H., LUO, J., ZHU, S.K., HIRATA, M., ABE,

- M. :Autonomic nervous activity during hand immersion in cold water in patients with vibration-induced white finger. *Indust. Health.* 40(3):254-259 (2002)
- 38) PERINI, R., VEICSTEINAS, A.: Heart rate variability and autonomic activity at rest and during exercise in various physiological conditions. *Eur. J. Appl. Physiol.* 90(3-4):317-325. (2003)
- 39) MINISTRY OF HEALTH, LABOUR and WELFARE (2015): Dietary reference intakes for Japanese, 2015. Daiichi Shuppan, Tokyo, pp.64-66. (in Japanese with English comments)
- 40) 国民健康・栄養の現状 平成 20 年厚生労働省国民健康・栄養調査報告より.第一出版、P52,53 (2008)
- 41) Kurokawa N, Young EH, Oka Y, Satoh H, Wareham NJ, Sandhu MS, Loos RJ.: The ADRB3 Trp64Arg variant and BMI: a meta-analysis of 44 833 individuals. *Int J Obes (Lond).* 32(8):1240-9 (2008).
- 42) KURYLOWICZ, A., JONAS, M., LISIK, W., JONAS, M., WICIK, Z.A., WIERZBICKI, Z., CHMURA, A., PUZIANOWSKA-KUZNICKA, M.: Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-related genes in adipose tissues. *J. Transl. Med.* 13: 31 (2015)
- 43) 坂根直樹：肥満の分子遺伝学的研究と治療効果. *日本栄養・食科学会誌*, 54, 101-109 (2001)
- 44) 坂根直樹,吉田俊秀, 梅川常和, 近藤元治：寒冷暴露は $\beta 3$  アドレナリン受容体を増加させる. *日本臨床代謝学会記録*, 32, 158-159

(1995)

45) BERLAN, M., GALITZKY, J., BOUSQUET-MELOU, A., LAFONTAN, M. and MONTASTRUC, J.L.: Beta-3 adrenoceptor-mediated increase in cutaneous blood flow in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 268:1444-1451 (1994)

46) ATEF, N., LAFONTAN, M., DOUBLE, A., HELARY, C., KTORZA, A. and PENICAUD, L.: A specific beta 3-adrenoceptor agonist induces increased pancreatic islet blood flow and insulin secretion in rats. *Eur .J. Pharmacol.* 298:287-292 (1996)

47) HAYANO, J., SAKAKIBARA, Y., YAMADA, M., KAMIYA, T., FUJINAMI, T., YOKOYAMA, K., WATANABE, Y. and TAKATA, K.: Diurnal variations in vagal and sympathetic cardiac control. *Am .J. Physiol.*, 258: H642-H646 (1990)

48) LEWIS, T.: Observations upon the reactions of the vessels of the human skin to cold. *Heart*, 15:177-208 (1930)

49) 國本雅也 : 指尖部冷水負荷時の浸水部皮膚温低下による皮膚交感神経機能の評価. *臨床神経学*, 29, 1004-1008 (1989)

50) 松本 勅, 寺沢宗典, 田和宗徳, 山川緑, 山田伸之 : 自覚的冷え感の有無による足指寒冷血管反応の差異. *自律神経*, 27, 86-92 (1990)

51) POLLOCK, D.C., LI, Z., KOMAN, L.A., GORDON, E.S., SMITH, T.L.: Control of arteriovenous anastomoses in rabbit ear model of digital perfusion. *Am J Physiol.* 271(5 Pt 2):H2007-h2013 (1996)

Table 1. Physical characteristics of subject groups( before a meal in summer)

Variables	Total	Without cold	With cold	<i>P</i> value
Number of subject	27	10	17	
BMI	20.4±2.5	20.5±1.6	20.3±2.9	<i>0.818</i>
Fat(%)	24.9±5.0	25.0±2.8	24.9±6.1	<i>0.943</i>
REE(Kcal/day/LBM)	30.78±4.04	31.35±2.96	30.45±4.62	<i>0.585</i>
R-Rinterval(msec)	1.00±0.19	0.94±0.11	1.03±0.22	<i>0.237</i>
Number of subject	22	9	13	
SBP(mmHg)	99.6±9.5	103.7±8.1	96.7±9.7	<i>0.090</i>
DBP(mmHg)	59.8±8.1	62.3±9.5	58.1±6.8	<i>0.233</i>
Body temperature(°C)	36.3±0.4	36.4±0.4	36.3±0.4	<i>0.442</i>

REE: resting energy expenditure, SBP:systolic blood pressure,

DBP: diastolic blood pressure, Body temperature:tempereture of the eardrum

Analysis the number of SBP, DBP and Body tempereture is 22 cases.

Table 2. Changes in immersed skin temperature during the Hunting test  
( before a meal in summer)

Temperature(°C)	without cold (n=9)	with cold (n=16)	<i>P</i> value
ST	34.37±1.51	33.57±1.62	<i>0.237</i>
BT	1.49±1.95	1.24±2.26	<i>0.789</i>
WT	15.52±6.27	8.06±1.74	<i>0.007</i>
dT	14.03±5.21	7.68±1.83	<i>0.006</i>
DT	32.89±2.22	33.20±1.72	<i>0.700</i>

ST: start temperature, BT: bottom temperature, WT: warm temperature  
dT:WT-BT, DT:ST-BT (Measuring point is shown in Fig.2)

Table 3. Frequencies of polymorphisms of UCP-1,  $\beta$  2-AR,  $\beta$  3-AR, and ANG genes in female students with or without cold constitution.

	Genotypes			<i>P</i> value( $\chi^2$ test)
	A/A	A/G	G/G	
A3926G, Uncoupling protein gene				
without cold constitution (n=10)	1(10)	6(60)	3(30)	<i>0.241</i>
with cold constitution (n=17)	5(29)	9(53)	3(18)	
Arg16Gly, $\beta$ 2-adrenergic receptor gene				
without cold constitution (n=10)	1(10)	7(70)	2(20)	<i>0.382</i>
with cold constitution (n=17)	4(24)	6(35)	7(41)	
Trp64Arg, $\beta$ 3-adrenergic receptor gene				
without cold constitution (n=10)	8(80)	2(20)	0(0)	<i>0.160</i>
with cold constitution (n=17)	9(53)	6(35)	2(12)	
Met235Thr, The angiotensinogen gene				
without cold constitution (n=10)	2(20)	2(20)	6(60)	<i>0.055</i>
with cold constitution (n=17)	0(0)	4(24)	13(76)	



Table 4. Physical characteristics in wild and mutant types of UCP-1,β2-AR, and β3-AR polymorphisms.

Variables	Total	Genotype								
		UCP-1			β 2-AR			β 3-AR		
		wild	mutant	<i>P</i> value	wild	mutant	<i>P</i> value	wild	mutant	<i>P</i> value
Number of subject	27	6	21		5	22		17	10	
Height (cm)	157.7±5.1	156.0±6.5	158.2±4.7	<i>0.338</i>	158.9±3.7	157.5±5.4	<i>0.592</i>	157.6±5.0	158.0±5.4	<i>0.815</i>
Weight (kg)	50.6±6.4	53.6±7.1	49.81±6.2	<i>0.213</i>	47.4±8.0	51.4±6.0	<i>0.212</i>	50.7±6.6	50.6±6.6	<i>0.988</i>
BMI	20.4±2.5	22.0±2.7	19.9±2.2	<i>0.057</i>	18.8±3.7	20.7±2.1	<i>0.126</i>	20.4±2.2	20.3±3.0	<i>0.963</i>
Fat (%)	24.9±5.0	27.8±5.0	24.1±4.9	<i>0.119</i>	21.4±6.4	25.7±4.5	<i>0.088</i>	25.2±4.4	24.5±6.2	<i>0.748</i>
LBM (Kg)	37.8±3.2	38.5±3.5	37.6±3.2	<i>0.550</i>	36.8±3.2	38.0±3.2	<i>0.458</i>	37.7±3.2	37.9±3.3	<i>0.858</i>
REE (Kcal/day/LBM)	30.78±4.04	28.76±6.23	31.36±3.16	<i>0.169</i>	26.64±6.99	31.72±2.44	<i>0.180</i>	30.91±2.72	30.56±5.83	<i>0.833</i>
PEE (Kcal/day/LBM)	35.01±4.67	32.75±7.39	35.66±3.57	<i>0.182</i>	29.74±7.93	36.21±2.64	<i>0.142</i>	35.72±2.81	33.81±6.82	<i>0.416</i>

LBM: lean body mass, REE: resting energy expenditure, PEE: postprandial energy expenditure

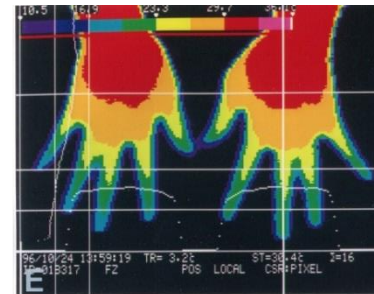
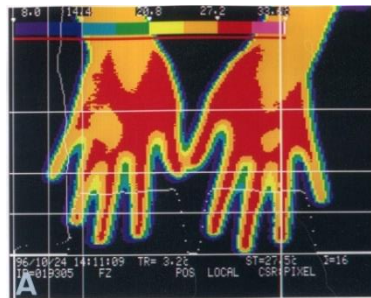
Table5. ECG R-R interval power spectral analytical results in wild and mutant types of  $\beta$ 3-AR polymorphisms before and after meal.

Parameters	Before a meal			After a meal		
	Wild	Mutant	<i>P</i> value	Wild	Mutant	<i>P</i> value
Number of subject	17	8		17	8	
TOTAL(ms <sup>2</sup> )	389.7±660.9	49.1±21.3	<i>0.050</i>	310.3±466.3	155.9±200.5	<i>0.382</i>
LF (ms <sup>2</sup> )	144.6±194.0	20.2±10.3	<i>0.018</i>	162.0±262.0	99.8±164.4	<i>0.546</i>
HF (ms <sup>2</sup> )	245.1±480.3	28.9±17.1	<i>0.082</i>	148.3±244.3	56.1±39.8	<i>0.148</i>
PNS index	0.495±0.145	0.602±0.117	<i>0.082</i>	0.452±0.060	0.502±0.201	<i>0.511</i>
SNS index	1.275±0.702	0.757±0.440	<i>0.069</i>	1.631±1.064	1.427±1.122	<i>0.665</i>

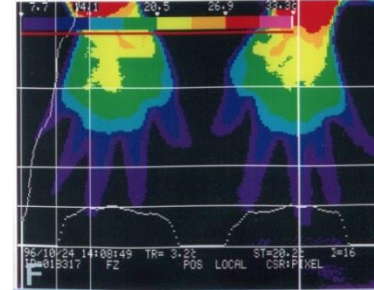
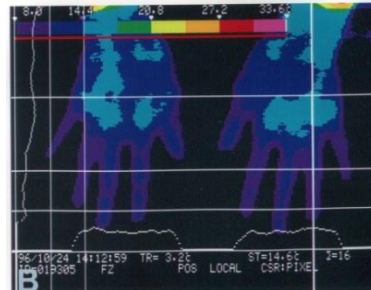
LF : 0.04-0.15Hz, HF : 0.15-0.4Hz, TOTAL : LF+HF, PNS index : HF/TOTAL, SNS index : LF/HF

**Fig.1. Thermography of hands of subjects with and without cold constitution immersed in cold water and the recovery.**

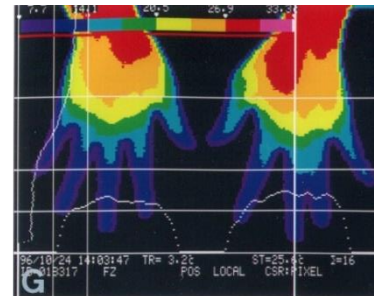
The hands were immersed in 5 °C cold water for one minute, and thermograph was taken before the immersion, immediately after, 3 minutes after and 5 minutes after. Left A.B.C.D are hands without cold constitution, right E.F.G.H is those with cold constitution. Red represents 27°C to 33°C, dark blue represents the 8°C to 16°C. The fingertip portion of subjects with cold constitution was 20°C even before the immersion, and also in the recovery process after the load. In total, temperature recovery of hands of subjects with cold constitution was much slower than that without cold constitution.



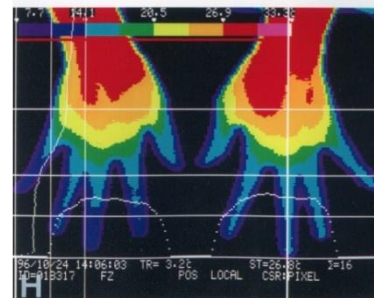
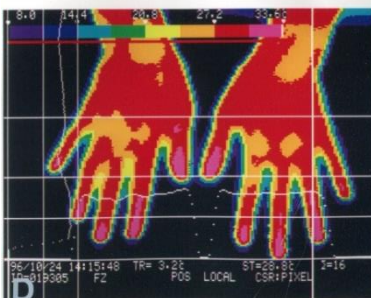
before



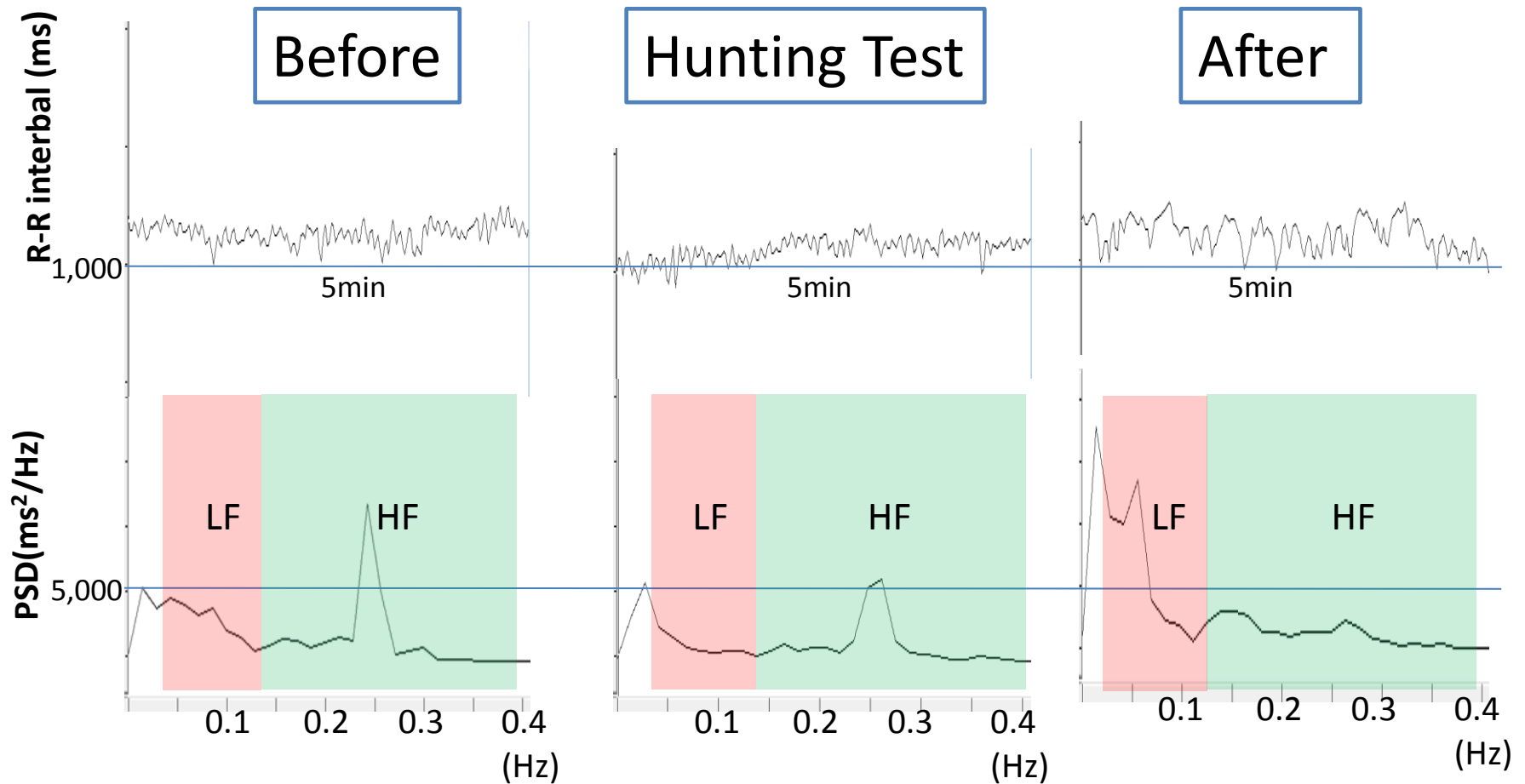
Immediately



after 3 min

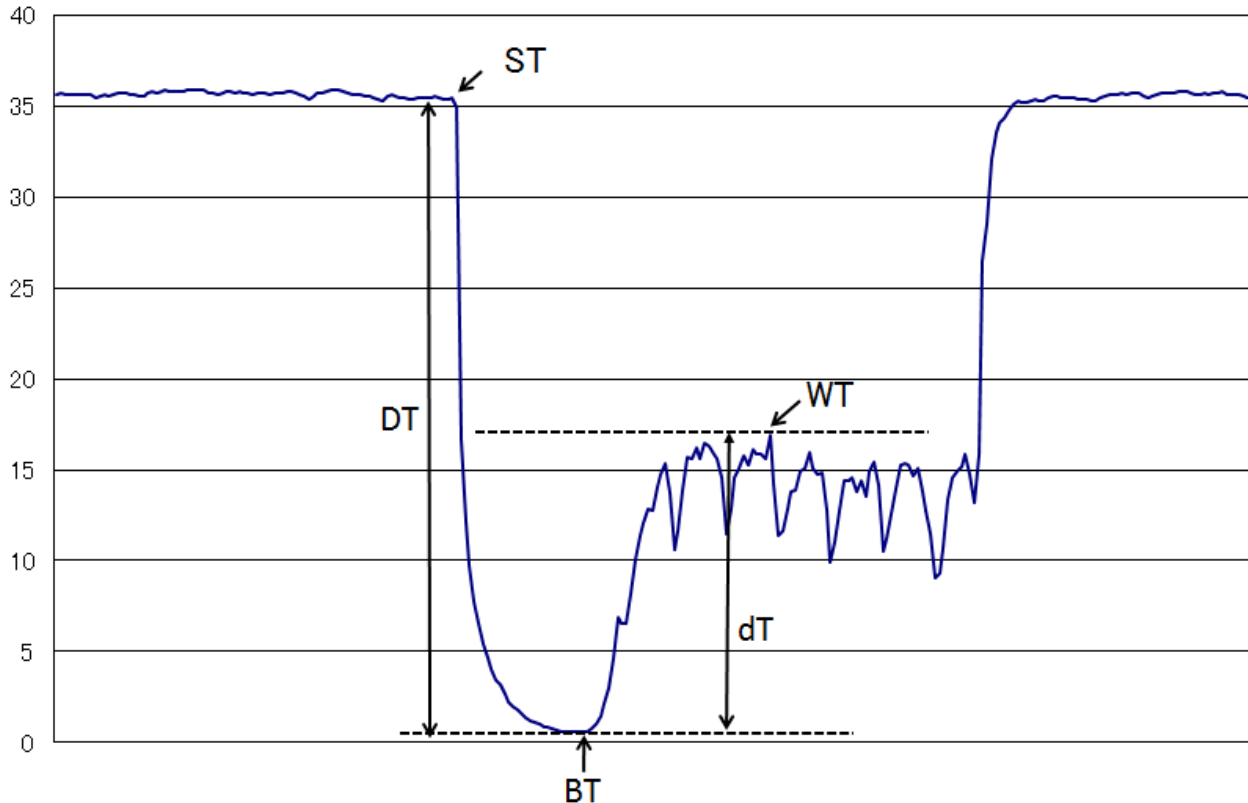


after 5 min



**Fig.2. Effect of Hunting test on the heart rate variability (HRV).**

The electrocardiography was analyzed every 5 minutes. HRV were (in parenthesis) before (LF:319, HF:426, SNS index:0.691), during (117,369,0.317), and after the Hunting test (511,320,1.597). Since this subject was without cold constitution with  $\beta$ 3-AR wild type, the reactivity of the autonomic nervous was high. (PSD: power spectral density)

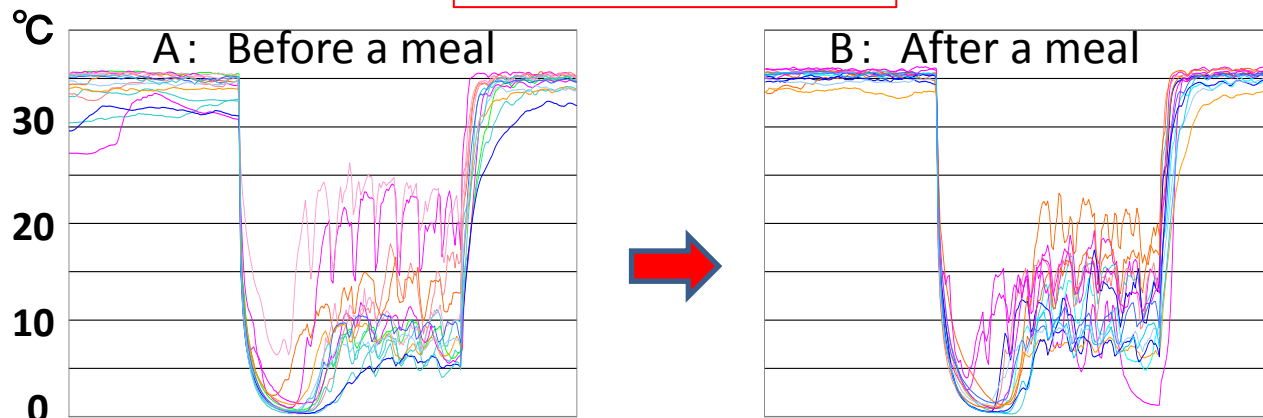


**Fig.3. Hunting test and its measuring point**

The temperature measuring points used for the analysis of the Hunting test are as follows:

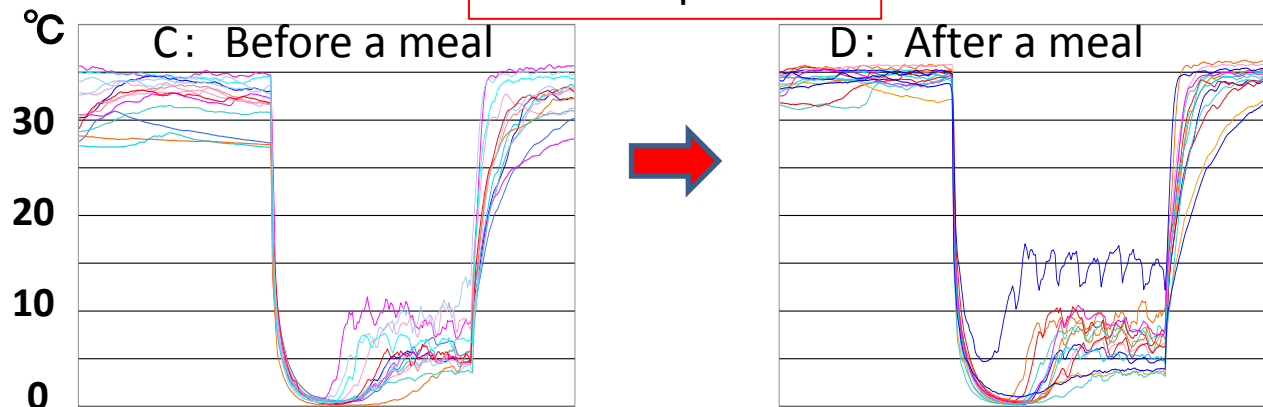
**ST: start temperature, BT: bottom temperature, WT: warm temperature  
dT: WT-BT, DT:ST-BT**

## Summer experiment



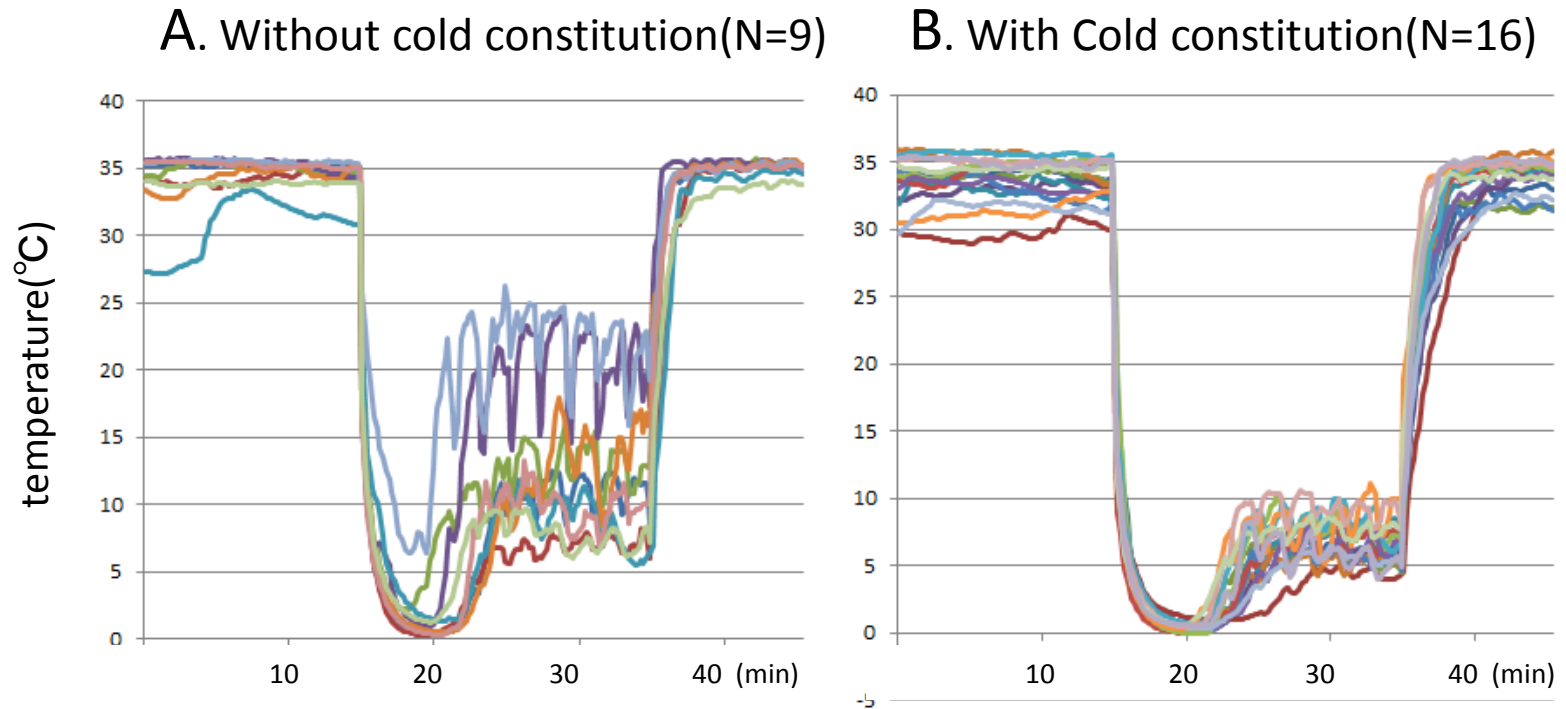
(°C)	Before a meal			After a meal		
	without cold	with cold	<i>P</i> value	without cold	with cold	<i>P</i> value
ST	34.3	33.7	0.567	35.2	35.2	0.865
WT	17	8.9	0.014	16.6	12.7	0.087
dT	15.2	8.5	0.015	15	12	0.192
DT	32.5	33.3	0.454	33.7	34.5	0.109

## Winter experiment



**Fig. 4. Seasonal changes of Hunting Test in healthy female students 14 people**

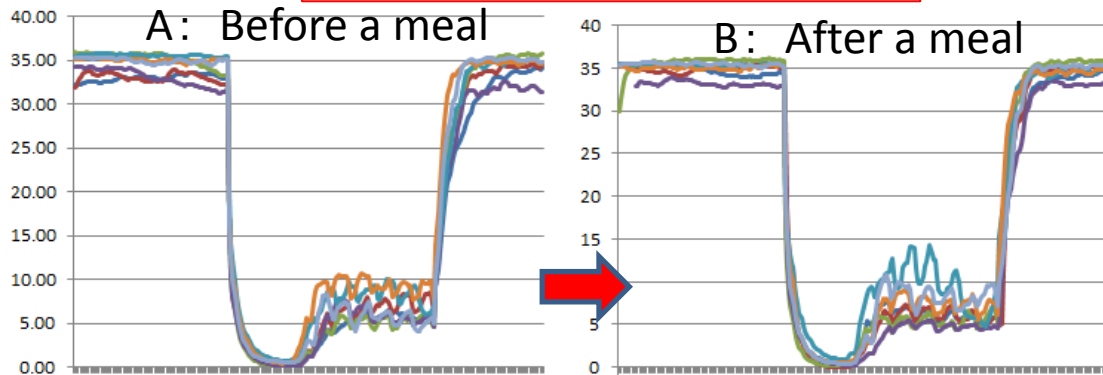
A and B are summer experiment, C and D is a winter experiment. Blue and green curves represent subjects with cold constitution, red and orange curves represent those without cold constitution. The results of the measured temperature in two groups of summer experiment are shown in Table. WT and dT measured before a meal of summer experiment is significantly lower in subjects with cold constitution. However after a meal the difference became insignificant. Significant difference in the winter experiment was not observed.



**Fig.5. Skin temperatures during the Hunting test in female students with or without cold constitution**

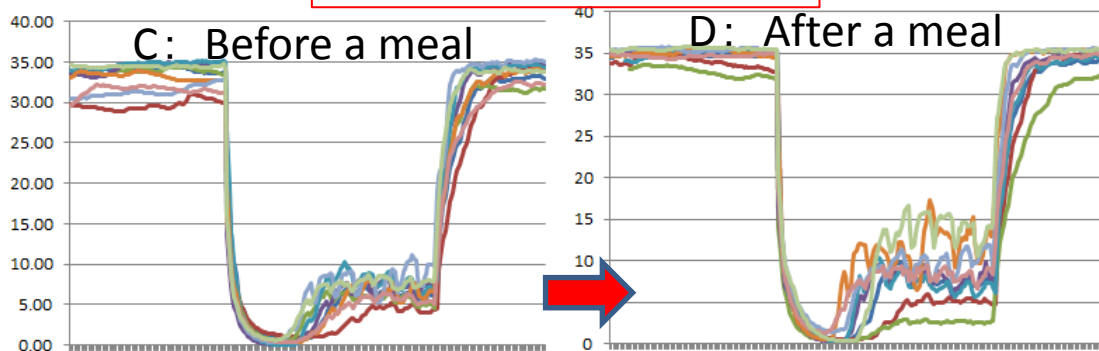
Y axis shows skin temperature of the second finger during the cold water immersion. Classifies the healthy young women into two groups of with cold constitution (9 people) and the without cold constitution (16 people), it shows the change in each of the Hunting test. The experiment was carried out during the summer, before a meal.

# β3-AR(mutant)



	N	before °C	after °C	Pvalue
st	7	34.3	34.9	0.081 *
wt	7	8.2	8.8	0.536
dT	7	7.8	8.5	0.500
DT	7	33.9	34.6	0.127

# β3-AR(wild)



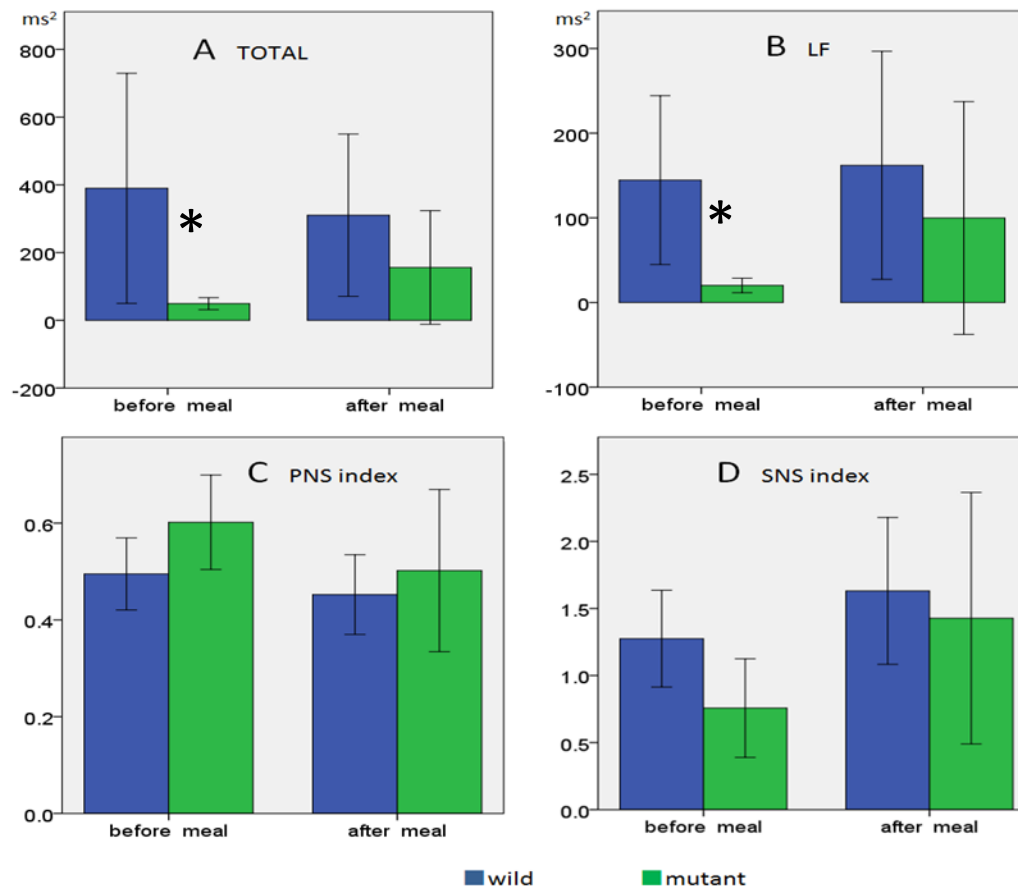
**\*\* P<0.05, \* P<0.1**

	N	before °C	after °C	Pvalue
st	9	33.0	34.5	0.034 * *
wt	9	7.9	10.5	0.077 *
dT	9	7.6	9.9	0.095 *
DT	9	32.6	33.9	0.057 *

**Fig. 6. Changes in the Hunting test of 16 subjects with cold constitution before and after a meal were different between wild and mutant types of β3-AR polymorphisms.**

Seven cases of A and B were mutant type β3-AR gene, C and D were 9 cases of wild type β3-AR gene. The measured temperature and the test results are shown in Table. No significant difference was observed before and after a meal in the mutant group, after a meal feeding in the wild group temperature rises, significant differences in the ST, WT, dT, DT were observed. (\*\* P<0.05, \* P<0.1).



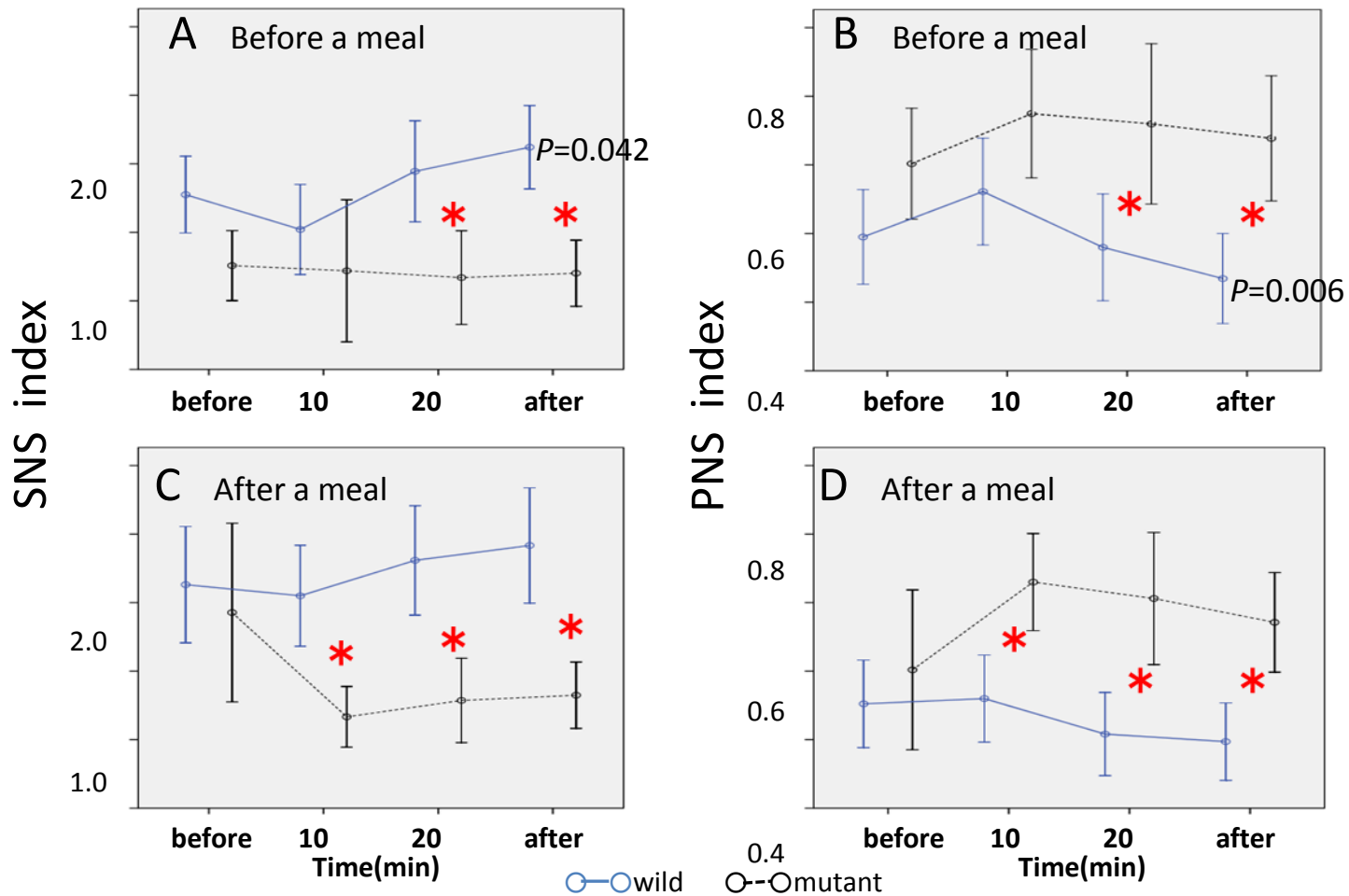


**Fig.7. Comparison of the ECG R-R interval power spectral analytical results between wild and mutant types of  $\beta$ 3-AR polymorphisms before and after a meal**

The changes in the HRV analysis results before and after a meal are shown . Total and LF power both before the meal was significantly lower in the mutant group than in the wild type group ( $P=0.050$ ,  $P=0.018$ ). There were no significant differences between the two groups after a meal. Before the meal, the PNS index had a tendency to be greater in the mutant group, and the SNS index had a tendency to be lower in the mutant group. With meal consumption, the PNS index was suppressed, and the SNS index was enhanced, and the rate of such changes was greater in the mutant group.

LF:0.04-0.15Hz, HF:0.15-0.4Hz, TOTAL:LF+HF, PNS index: HF/TOTAL, SNS index: LF/HF

\* , $P<0.05$ ,wild vs. Mutant



**Fig.8. PNS and SNS index levels following the Hunting test in wild and mutant types of  $\beta 3$ -AR polymorphisms before and after a meal.**

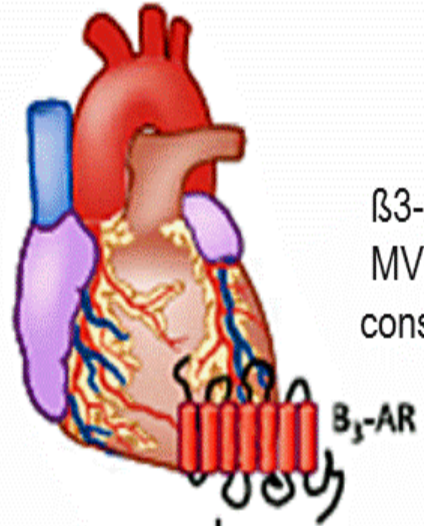
Illustrates the changes in the SNS and PNS indices during the Hunting test that was conducted both before and after a meal. The SNS index decreased in the first 10 minutes of the Hunting test and increased thereafter. The PNS index increased in the first 10 minutes and decreased thereafter. Mutant group has a small SNS index compared with the wild group, is large PNS index. Significant difference between the two groups of mutant and wild was denoted by the \* ( $P < 0.05$ ).

P-values, analysis of variance (repeated measures) result indicates those of  $P < 0.05$ .

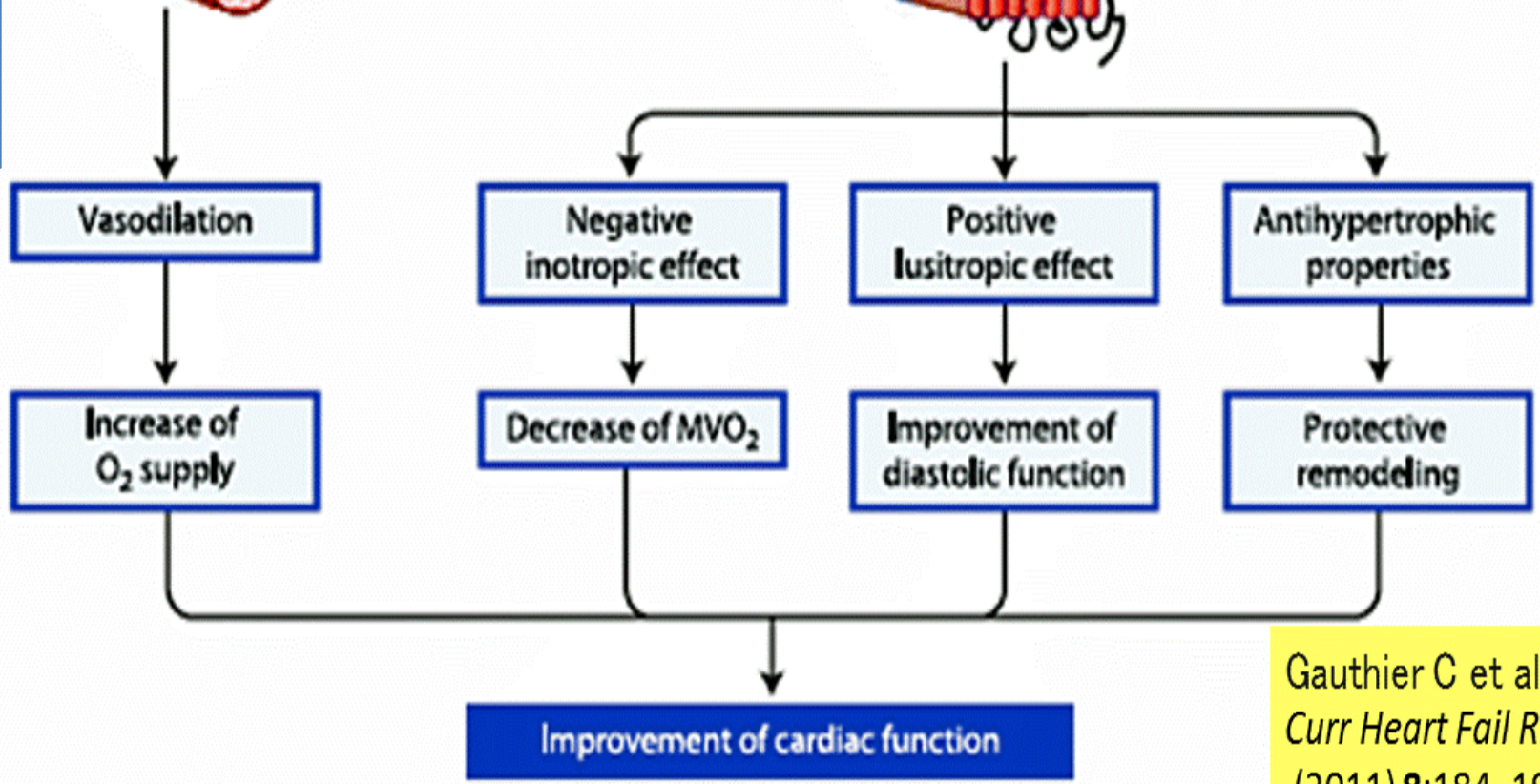
PNS index: HF/TOTAL, SNS index: LF/HF

資料 1

血管と心筋における $\beta_3$ アドレナリン受容体の作用



$\beta_3$ -AR:  $\beta_3$ -adrenoceptor;  
MVO<sub>2</sub>—myocardial oxygen consumption; O<sub>2</sub>—oxygen

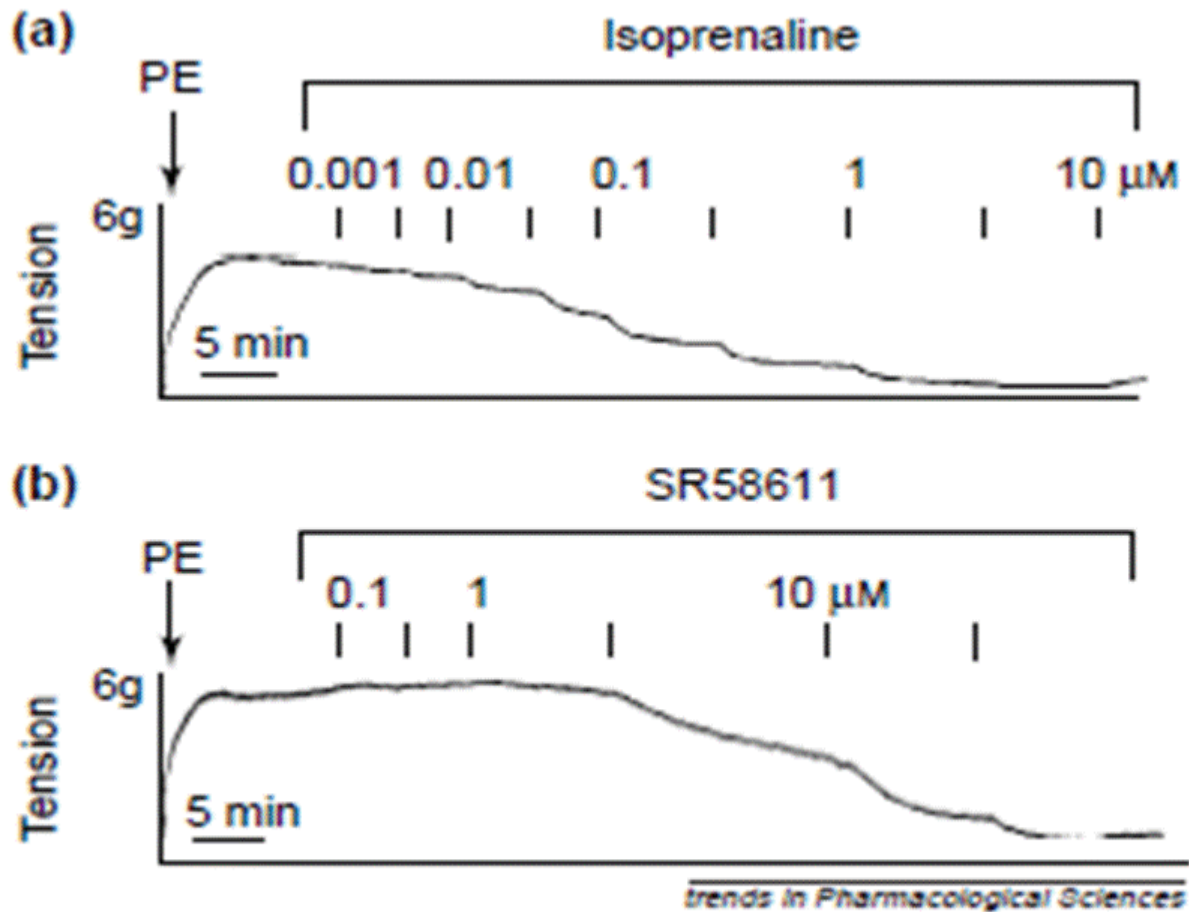


Gauthier C et al. :  
*Curr Heart Fail Rep*  
(2011) 8:184–192.

動脈の $\beta_3$ アドレナリン受容体はその特異的な作動薬投与で動脈を弛緩させる。

資料 2

動脈の張力(グラム)



Phenylephrine (PE, 0.3  $\mu\text{M}$ ) で収縮させた動脈は(a) Isoprenaline の0.001 から 1  $\mu\text{M}$  で4分間で完全に弛緩. (b)  $\beta_3$ アドレナリン受容体に特異的な作動薬SR58611により 10-12分間で弛緩.

Gauthier C, et al.  $\beta_3$ -Adrenoceptors in the cardiovascular System, *TiPS* 2000; 21: 428

# 動脈の $\beta_3$ アドレナリン受容体 ( $\beta_3$ -AR) の動脈弛緩機序

動脈  $\beta_3$ -AR:  $\beta_3$  アドレナリン受容体

AC: アデニルシクラーゼ

ATP: アデノシン三リン酸

[Ca<sup>2+</sup>]: 細胞内カルシウム濃度

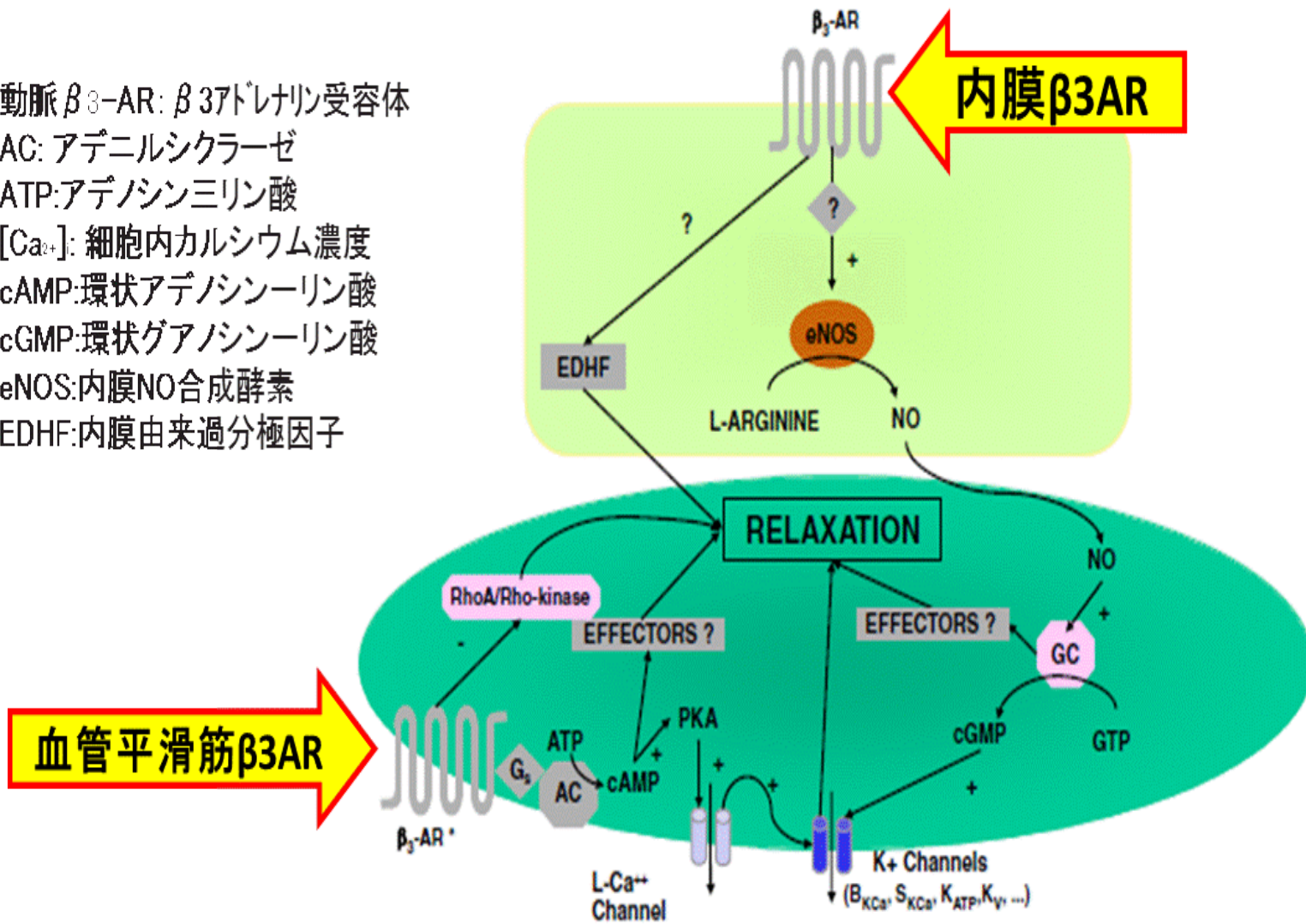
cAMP: 環状アデノシン一リン酸

cGMP: 環状グアノシン一リン酸

eNOS: 内皮NO合成酵素

EDHF: 内皮由来過分極因子

資料  
3



Rozec B, et al.:  $\beta_3$ -Adrenoceptors in the cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics* 111 (2006) 652–673.



## 調査票3

### 「冷え症の診断基準」

# 資料 4

#### 重要項目

1. 他の多くの人に比べて“寒がり”の性分だと思う。
2. 腰や手足、あるいは身体の一部に冷えがあつてつらい。
3. 冬になると冷えるので電気毛布や電気敷布、あるいはカイロなどをいつも用いるようにしている。

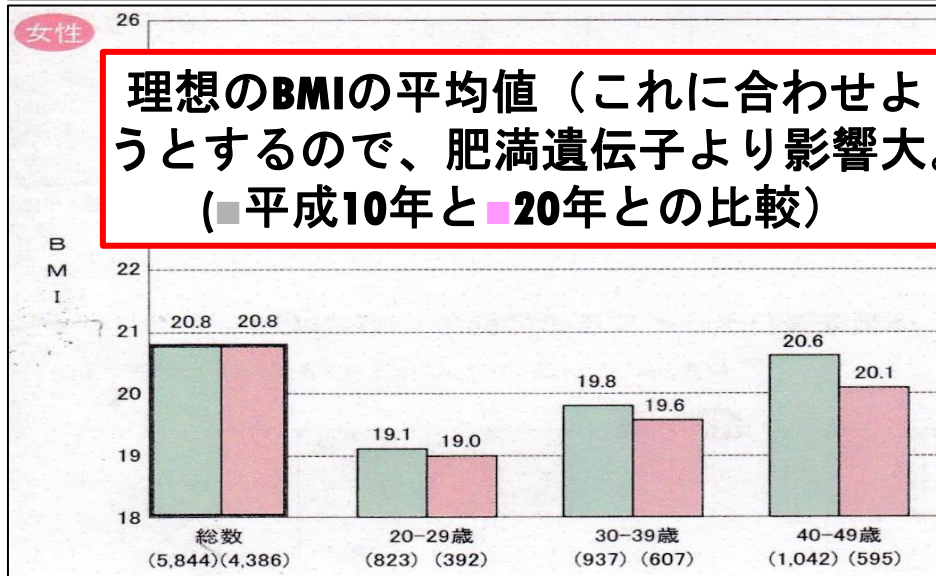
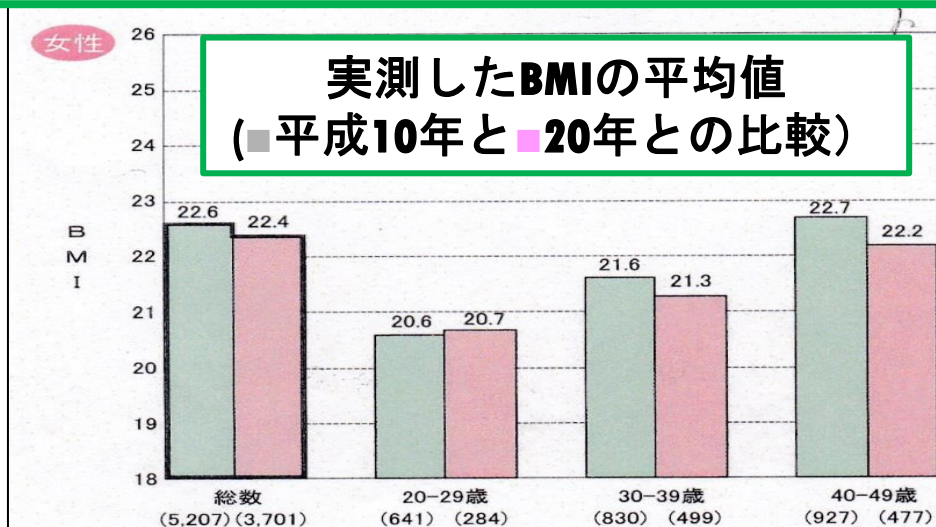
#### 参考項目

1. 身体全体が冷えてつらいことがある。
2. 足が冷えるので夏でも厚いクツ下をはくようにしている。
3. 冷房のきいているところは身体が冷えてつらい。
4. 他の多くの人にくらべてかなり厚着する方だと思う。
5. 手足が他の多くの人より冷たい方だと思う。

各症状は6か月以上にわたっていることを前提とし、重要項目2項目以上、重要項目1項目に参考項目2項目以上、あるいは参考項目4項目以上を満たす者を冷え症とする。

本人のBMIよりも合わせようとする理想のBMIが女性では小さい

資料  
5



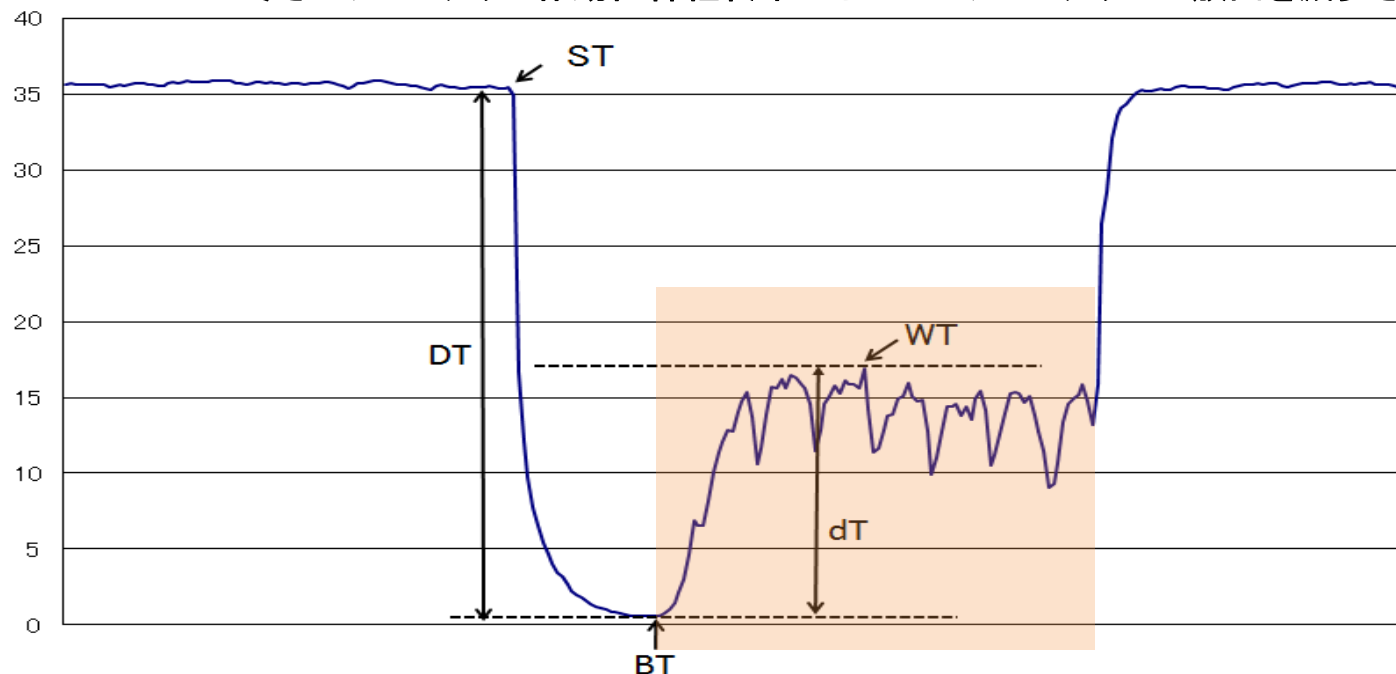
国民健康・栄養の現状 平成20年厚生労働省国民健康・栄養調査報告より、  
第一出版, p.52, 53. 2008.

# 冷え症の自律神経機能をHunting Testで検査

## 寒冷血管拡張反応 (CIVD; cold-induced vasodilation)

指の冷刺激により生じる。皮膚血管の収縮・拡張による皮膚温の変動が繰り返される現象。  
メカニズム-寒さがアドレナリン作動性神経終末からのノルアドレナリンの放出を減少させる。

資料  
6



温度測定点 ST:start temperature, BT:bottom temperature,  
WT:warm temperature dT:WT-BT, DT:ST-BT

DAANEN H.A: Eur. J. Appl. Physiol. 89(5):411-426 (2003)