

平成22年 5月25日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700522

研究課題名 (和文) アルブミン合成遺伝子の一塩基多型と持久性トレーニング効果の個体差

研究課題名 (英文) Effects of polymorphism in genes relating Albumin synthesis on responses to endurance training

研究代表者

岡崎 和伸 (OKAZAKI KAZUNOBU)

大阪市立大学・都市健康・スポーツ研究センター・講師

研究者番号：70447754

研究成果の概要 (和文)： アルブミン合成遺伝子に存在する3つの一塩基多型 (SNPs) の違いによって、トレーニング前の血漿量、血漿総蛋白濃度、血漿総蛋白量が有意に異なること、また、血漿蛋白濃度のトレーニングによる変化量が異なる傾向にあることを明らかにした。さらに、運動負荷に対する血漿量および血漿アルブミン量の増加反応性を検討し、それらに認められる大きな個人差にはアルブミン合成遺伝子 SNPs が影響すると考えられることを示唆した。

研究成果の概要 (英文)： We analyzed 3 polymorphism in genes relating Albumin synthesis and found that PV was significantly different and change with training on plasma protein concentration was somewhat different between groups have different SNPs. In addition, we assessed the responses of PV and Alb<sub>cont</sub> to a bout of exercise and protein-CHO ingestion and found that there was huge inter-individual variations in those variables which may be associated with albumin SNPs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：運動生理学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：運動、遺伝子、血漿量、アルブミン合成、体温調節能

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者らは、高齢者において5ヶ月間の持久性トレーニングを実施し、血漿量の増加した被験者ほど一定の体温上昇に対する胸部発汗量および前腕皮膚血管拡張の感受性がより亢進すること、血漿量の増加は

血漿アルブミン量の増加に比例すること、を明らかにした。さらに、持久性トレーニング期間を通して、被験者に蛋白質サプリメントを運動直後に摂取させる介入実験を行った結果、血漿蛋白質量、血漿量、最大酸素摂取量、および体温調節能の増加が、偽薬を摂取

した被験者に比べて亢進することを明らかにした。また、その際、血漿量の増加とともに1回心拍出量が増加することを明らかにした。これらの結果は、持久性トレーニングによる体温調節能および好氣的運動能の増加は、血漿量の増加による1回心拍出量の増加に起因すること、さらに、この血漿量の増加は、血漿蛋白質、特にアルブミン合成反応の活性化に依存することを示唆している。しかし、これらのトレーニング反応性には、著しい個体差が存在するが、そのメカニズムは不明であった。

(2) 血漿アルブミンは肝臓のみで合成される蛋白であり、ヒトのアルブミン合成の遺伝子 (ALB) には 91 個の SNPs が報告され、転写調節 (プロモーターやエンハンサー) 領域には 6 つの SNPs が存在することが既に報告されている。

(3) そこで、持久性トレーニングに対するアルブミン合成の反応性における個体差は、アルブミン合成遺伝子の転写調節領域の SNPs の違いに起因するのではないか、という仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、「持久性トレーニングに伴う血漿蛋白質 (アルブミン) の増加量の個体差は、アルブミン合成遺伝子の転写調節領域の一塩基多型 (SNPs) の違いに起因する」という実験仮説を検証することである。

(2) 2008 年度の研究目的は、運動トレーニング反応性に及ぼす候補アルブミン合成遺伝子 SNPs を特定することとした。

(3) 2008 年の研究成果を踏まえ、2009 年度の研究目的は、①新しい手法 (一酸化炭素再呼吸法) による血漿量の測定手技を確立すること、②アルブミン合成遺伝子の SNPs が運動負荷に対する血漿アルブミンの増加反応に影響するメカニズムを明らかにすることとした。

## 3. 研究の方法

(1) 2008 年度および 2009 年度に、それぞれ、以下の (2)、(3) の方法で研究を実施した。

(2) 2008 年度の研究手法

- ①若年男性 18 名を対象とし、実験の内容および意義を文書および口頭で十分に説明し、実験参加の同意を得た。
- ②被検者に連続 5 日間の持久性トレーニング (自転車エルゴメータ、最大酸素摂取量 ( $VO_{2max}$ ) の 70% 強度、30 分/日、気温 30℃、

相対湿度 50%) を行わせた。

③トレーニングの前後に、血漿量 (エバンスブルー色素希釈法)、血漿総蛋白質およびアルブミン濃度 (ビューレット法および BCG 法) を測定し、血漿総蛋白質およびアルブミン量を算出 (血漿量×血漿総蛋白質およびアルブミン濃度) した。

④トレーニング後に採取した血液 (EDTA-2Na 処置) から得られた遺伝子サンプルを用いて、アルブミン合成遺伝子の転写調節領域における 3 つの SNPs (dbSNP rs#, rs3756066, rs3756067, rs7688274) を解析 (TaqMan プローブ法) した。得られた遺伝子情報は、信州大学医学部医療情報部において匿名化で管理した。

⑤各測定項目のトレーニング前後の変化量 (トレーニング反応性) と各 SNPs 型との関係を共分散分析法および Tukey-Kramer の多重比較検定法を用いて解析した。

(3) 2009 年度の研究手法

①研究機関の変更に伴い、血漿量の測定方法をエバンスブルー色素希釈法から一酸化炭素再呼吸法に変更する必要があるため、一酸化炭素再呼吸法による血漿量の測定方法を確立し、両手技による血漿量の測定値の関係を検討した。

②若年者 5 名 (男性 3 名、女性 2 名) を対象とし、実験の内容および意義を文書および口頭で十分に説明し、実験参加の同意を得た。

③全ての被験者において、エバンスブルー色素希釈法および一酸化炭素再呼吸法を用いて血漿量の測定を行い、両手技による値の関係をピアソンの積率相関係数を用いて解析した。

④次に、血漿アルブミンの増加反応メカニズムを明らかにするため、血漿蛋白質合成を評価する方法を検討した。

⑤別の若年男性 2 名を対象とし、実験の内容および意義を文書および口頭で十分に説明し、実験参加の同意を得た。

⑥ $VO_{2max}$  (同上) の測定に加え、人工気象室 (環境温 28℃、相対湿度 40%) 内での座位安静時に、運動前、運動負荷 (72 分間、80% $VO_{2max}$ , 4 分間+20% $VO_{2max}$ , 5 分間×8 回) 終了直後、1、2、3、4、5、および、23 時間後に採血を行い、血漿量、血漿総蛋白質およびアルブミン濃度 (同上) を測定し、血漿総蛋白

質およびアルブミン量を算出(同上)した。運動前から運動後における血漿量の変化量は、ヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度から算出した。

⑦蛋白質および糖質(熱量: 3.2 kcal/kg、蛋白質量: 0.18 g/kg)を運動直後あるいは2時間後に摂取する2試行を実施し、2試行間の血漿総蛋白質量の差から血漿蛋白質合成を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 2008年度の研究成果

①候補 SNPs の出現頻度: 測定した3つの SNPs の出現頻度は、rs7688274 (C:T=0.5:0.5)、rs3756066 (A/A:A/T:T/T=0.222:0.500:0.278)、rs3756067 (A/A:A/G:G/G=0.111:0.611:0.278)であり、JSNP データベースに登録されている日本人集団での出現頻度 rs7688274 (C:T=0.610:0.390)、rs3756066 (A/A:A/T:T/T=0.289:0.533:0.178)、rs3756067 (A/A:A/G:G/G=0.295:0.523:0.182) とほぼ一致した。

②rs7688274 と rs3756066 において、TT と TT、CC と AA の発現は同期していた。そこで、以下の解析は rs3756066 と rs3756067 のみに実施した。

③rs3756066 と rs3756067 の SNPs とトレーニング前後の測定値の関係を表1および2に示す。

表1. rs3756066 の SNPs とトレーニング前後の測定値の関係

	rs3756066			
	A/A n=4	A/T n=9	T/T n=6	P 値
身長, cm	170 ±2	175 ±1	172 ±3	0. 18
体重, kg	65.0 ±1.8	68. 6±1.5	62.0 ±4.1	0. 20
VO <sub>2max</sub> , ml/kg/min	51.5 ±2.7	50.8 ±2.1	53.5 ±2.3	0. 68
血漿量 (前), ml/kg	41.0 ±1.9	46.3 ±1.6	48.2 ±1.6	0. 05
血漿量 (後), ml/kg	44.6 ±1.4	50.3 ±1.8	52.6 ±2.3	0. 07
血漿量 (Δ), ml/kg	3.58 ±0.77	3.98 ±0.68	4.46 ±1.36	0. 85
TP(前), g/dl	6.6 ±0.1	6.6 ±0.1	7.0 ±0.1	0. 02
TP(後), g/dl	6.7 ±1.6	6.6 ±0.1	6.9 ±0.1	0. 19
TP(Δ), g/dl	0.08 ±0.13	-0.07 ±0.03	-0.16 ±0.08	0. 15
TP <sub>cont</sub>	2.72	2.71	3.38	0.

(前), g/kg	±0.14	±0.35	±0.12	25
TP <sub>cont</sub>	2.99	2.89	3.61	0.
(後), g/kg	±0.16	±0.38	±0.19	28
TP <sub>cont</sub>	0.27	0.18	0.24	0.
(Δ), g/kg	±0.06	±0.05	±0.09	67

トレーニング前の身長、体重、VO<sub>2max</sub> に群間に差はなかった。トレーニング前の血漿量、および血漿総蛋白質濃度 (TP) は、A/A<A/T<T/T と上昇し、SNPs に有意な効果が認められた。また、トレーニング前の血漿総蛋白質量 (TP<sub>cont</sub>) も A/A<A/T<T/T と上昇する傾向が認められた。トレーニング後は、血漿量および血漿総蛋白質量ともに全群で増加したが、TP の変化量は図1にも示すように、A/A>A/T>T/T と減少する傾向が認められた。しかしながら、TP<sub>cont</sub> の変化量には群間に差は認められなかった。

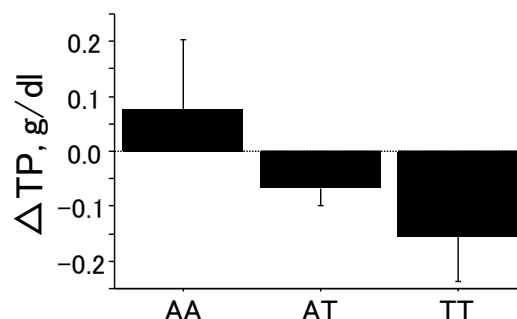


図1. トレーニングによる血漿総蛋白質濃度 (TP) の反応性と SNPs (rs3756066) の関係

表2. rs3756067 の SNPs とトレーニング前後の測定値の関係

	rs3756067			
	A/A n=4	A/G n=10	G/G n=5	P 値
身長, cm	175 ±4	173 ±2	173 ±3	0. 87
体重, kg	65.8 ±4.8	65.5 ±2.4	66.5 ±2.0	0. 97
VO <sub>2max</sub> , ml/kg/min	51.0 ±1.8	52.6 ±2.2	50.7 ±2.2	0. 81
血漿量 (前), ml/kg	46.6 ±1.8	47.3 ±1.6	42.2 ±1.9	0. 15
血漿量 (後), ml/kg	51.4 ±3.4	51.2 ±1.7	46.0 ±1.7	0. 21
血漿量 (Δ), ml/kg	4.8 ±2.1	3.9 ±0.6	3.8 ±0.6	0. 78
TP(前), g/dl	7.0 ±0.1	6.7 ±0.1	6.6 ±0.1	0. 16
TP(後), g/dl	6.8 ±0.1	6.6 ±0.1	6.7 ±0.1	0. 48
TP(Δ), g/dl	-0.18 ±0.10	-0.09 ±0.04	0.07 ±0.10	0. 12
TP <sub>cont</sub> (前), g/kg	3.27 ±0.16	2.84 ±0.34	2.80 ±0.14	0. 63

TP <sub>cont</sub> (後), g/kg	3.52			
TP <sub>cont</sub> (△), g/kg	s	s	s	

トレーニング前の身長、体重、VO<sub>2max</sub>に群間に差はなかった。トレーニング前の血漿量、および血漿総蛋白濃度 (TP) は、A/A>A/G>G/Gと低下する傾向が認められた。トレーニング後は、血漿量および血漿総蛋白量ともに全群で増加したが、TPの変化量は図2にも示すように、A/A>A/T>T/Tと減少する傾向が認められた。しかしながら、TP<sub>cont</sub>の変化量には群間に差は認められなかった。

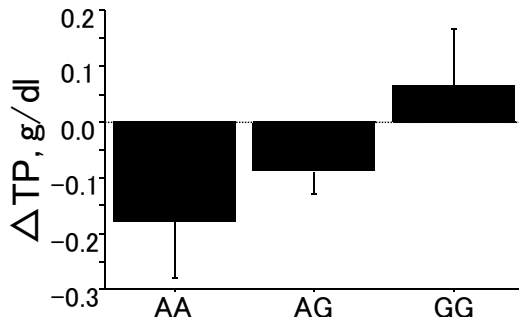


図2. トレーニングによる血漿総蛋白濃度 (TP) の反応性と SNPs (UV) の関係

年度の研究成果

①一酸化炭素再呼吸法による血漿量測定方を確立した。エバンスブルー色素希釈法および一酸化炭素再呼吸法による血液量 (BV) および血漿量 (PV) の関係を図3におよび図4に示した。両者には非常に高い正の相関関係が認められ、一酸化炭素再呼吸法によって、血漿量が正確に測定できることを確認した。

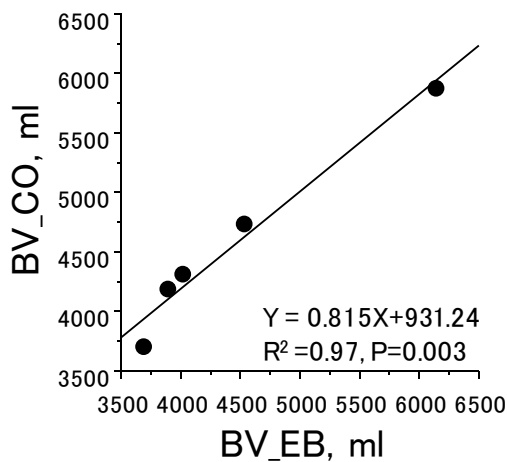


図3. エバンスブルー色素希釈法 (BV\_EB) および一酸化炭素再呼吸法 (BV\_CO) による血液量の関係

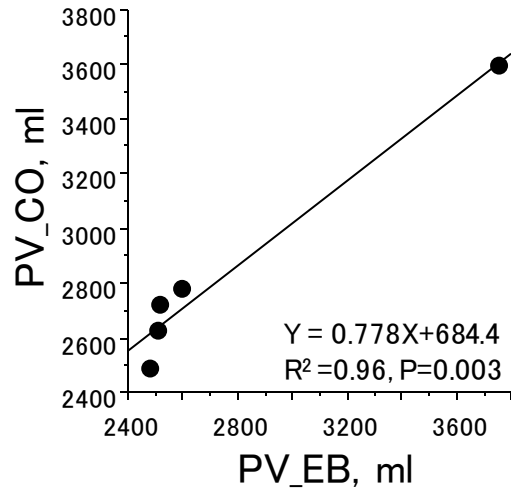


図4. エバンスブルー色素希釈法 (PV\_EB) および一酸化炭素再呼吸法 (PV\_CO) による血液量の関係

②図5に示すように、運動負荷および蛋白質および糖質を運動直後あるいは2時間後に摂取する場合血漿量および血漿アルブミン量の反応は、被験者Aと被験者Bで大きく異なった。特に、蛋白質および糖質を運動直後に摂取する場合に、2時間後に摂取する場合よりも増加する血漿アルブミン量の増加反応性は、肝アルブミン合成の指標となると考えられ、これらの個人差はアルブミン合成遺伝子のSNPsによることが推察された。

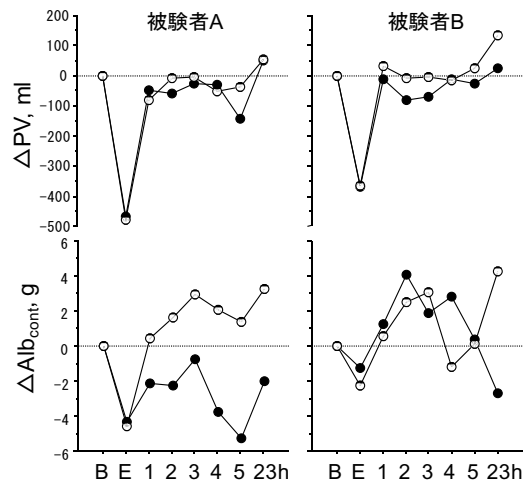


図5. 運動前 (B) に対する運動直後 (E)、~5時間、および23時間後の血漿量 (PV) および血漿アルブミン量 (Alb<sub>cont</sub>) の変化量。白：運動直後に蛋白質および糖質を摂取する場合、黒：運動2時間後に摂取する場合。

③全ての測定を行った被験者が2名であったことから、匿名化の問題により、SNPsの解析およびSNPsが血漿蛋白質量の増加反応性におよぼす影響に関する検討は行わなかった。

(3)2008年度および2009年度の研究成果から、一定の運動負荷に対する血漿蛋白質質量および血漿蛋白質合成速度の増加反応性に大きな個人差の認められること、その反応性には、アルブミン合成遺伝子のSNPsが関与している可能性があることが明らかになった。これらの成果は、体力向上のための効果的な運動指導方法確立のために重要な基礎データとなる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件)

- ①Lalande S, Okazaki K, Yamazaki T, Nose H, Warren BA, Olsen KD, Joyner MJ, Johnson BD, Effects of a 3-month high-intensity interval walking training on physical fitness and cardiovascular risk factors in middle-aged individuals. *Journal of Primary Care & Community Health*, 査読有, 印刷中.
- ②Morikawa M, Okazaki K, Masuki S, Kamiyo YI, Yamazaki T, Gen-No H, Nose H, Physical fitness and indices of lifestyle-related diseases before and after interval walking training in middle-aged and older males and females. *Br J Sports Med*, 査読有, 印刷中.
- ③Okazaki K, Goto M, Nose H, Protein and carbohydrate supplementation increases aerobic and thermo-regulatory capacities, *J Physiol*, 査読有, 587, 2009, 5585-5590.
- ④Nose H, Morikawa M, Yamazaki T, Nemoto KI, Okazaki K, Masuki S, Kamiyo YI, Gen-No H, Beyond epidemiology: Field studies and the physiology laboratory as the whole world, *J Physiol*, 査読有, 2009, 587, 5569-5575.
- ⑤Yamazaki T, Gen-no H, Kamiyo Y, Okazaki K, Masuki S, Nose H, A new devise to estimate V02 during incline walking by accelerometry and barometry, *Med Sci Sports Exerc*, 査読有, 2009, 41, 2213-2219.
- ⑥Okazaki K, Ichinose T, Mitono H, Chen M, Masuki S, Endoh H, Hayase H, Doi T, Nose H, Impact of protein and carbohydrate supplementation on plasma volume expansion and thermoregulatory adaptation by aerobic training in older men, *J Appl Physiol*, 査読有, 2009, 107, 725-733.
- ⑦Okazaki K, Hayase H, Ichinose T, Mitono

H, Doi T, Nose H, Protein and carbohydrate supplementation after exercise increases plasma volume and albumin content in older and young men, *J Appl Physiol*, 査読有, 2009, 107, 770-779.

- ⑧Fu Q, Okazaki K, Shibata S, Shook RP, Vangunday TB, Galbreath MM, Reelick MF, Levine BD, Menstrual cycle effects on sympathetic neural responses to upright tilt, *J Physiol*, 査読有, 2009, 587, 2019-2031.
- ⑨田邊愛子, 岡崎和伸, 山崎敏明, 森川真悠子, 宮川 健, 源野広和, 根本賢一, 能勢博, 3年間のインターバル速歩トレーニングによる中高年の体力および生活習慣病指標への影響, 長野体育学研究, 査読有, 2009, 16, 13-21.
- ⑩岡崎和伸, 能勢 博, 体液・体温調節のための機能性食品, *Functional Food*, 査読無, 2008, 2, 275-281.

[学会発表] (計13件)

- ①宮澤太機, 河端隆志, 岡崎和伸, 鈴木崇士, 今井大喜, 濱本 健, 進藤麻帆, 鈴木明菜, 松村新也, 宮側敏明, GABAが暑熱下安静時の温度感覚に及ぼす影響. 第64回日本体力医学会大会, 2009.9.20, 新潟.
- ②Okazaki K, Nose H, Goto M, Protein and CHO supplementation increases aerobic and thermo-regulatory capacities. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, July 31, 2009, Kyoto.
- ③Ikegawa S, Kamiyo YI, Okazaki K, Masuki S, Okada Y, Nose H: Enhanced skin blood flow response to hyperthermia after endurance training is mainly caused by plasma volume expansion in humans. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, July 29, 2009, Kyoto.
- ④Kamiyo YI, Okazaki K, Ikegawa S, Okada Y, Nose H: Rapid plasma volume restoration enhances skin vasodilation but not sweat rate in hypovolemic and passively warmed men. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, July 29, 2009, Kyoto.
- ⑤Okazaki K, Kamiyo YI, Masuki S, Ikegawa S, Okada Y, Yazawa D, Hata T, Shiba Y, Takahashi M, Ikeda U, Nose H, Sympathetic vasoconstrictor responsiveness is reduced by 5-day endurance training with enhanced baroreflex sensitivity in men. The 36th

Congress of the International Union of Physiological Sciences, July 29, 2009, Kyoto.

- ⑥Okazaki K, Yazawa D, Goto M, Kamiyo YI, Gon-no H, Hamada K, Nose H, Post-exercise protein and carbohydrate supplementation enhances training adaptations on skeletal muscle and cardiovascular function by interval walking training in the elderly. Exercise, Gene, Preventive Medicine Meeting, August 3, 2009, Karuizawa.
- ⑦森川真悠子、岡崎和伸、山崎敏明、源野広和、能勢 博、中高年・インターバル速歩トレーニング効果の初期身体特性と速歩量の差違、第 63 回日本体力医学会大会、2008. 9. 19, 別府.
- ⑧田邊愛子、岡崎和伸、山崎敏明、源野広和、能勢 博、中高年における 3 年間のインターバル速歩トレーニング効果、第 63 回日本体力医学会大会、2008. 9. 19, 別府.
- ⑨森川真悠子、岡崎和伸、山崎敏明、源野広和、能勢 博、中高年における 4 ヶ月間のインターバル速歩トレーニングによる初期属性別効果の違い. 第 31 回日本基礎老化学会大会、2008. 6. 13, 松本.

[図書] (計 2 件)

- ①岡崎和伸、能勢 博、浸透圧・容量調節系関連と高齢者の特徴：Section 13 トレーニングと体液、身体トレーニング、真興交易医書出版部、東京、2009、380-387.
- ②岡崎和伸、能勢 博、加齢と体温調節、からだと温度の事典、朝倉書店、東京、2009、62-65.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：血漿量増加促進剤

発明者：岡崎和伸、早瀬秀樹、土居達也、能勢 博

権利者：国立大学法人信州大学、大塚製薬株式会社

種類：特許

番号：特許第 4147404 号

取得年月日：20 年 7 月 4 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡崎 和伸 (OKAZAKI KAZUNOBU)

大阪市立大学・都市健康・スポーツ研究センター・講師

研究者番号：70447754