

平成28年度 学位論文

性差、性周期が消化器系、とくに
胃機能に与える影響についての研究

東京家政大学大学院
人間生活学総合研究科
人間生活学専攻

貝原 奈緒子

指導教員 宮坂 京子 教授

平成28年度 大学院(博士)学位論文概要

性差、性周期が消化器系、とくに 胃機能に与える影響についての研究

人間生活学総合研究科 人間生活学専攻

貝原 奈緒子

食前酒や食中酒は、ストレスを軽減させ、会話を楽しみ、食欲を亢進させると思われている。しかし、実際には、アルコール飲料の摂取は、胃排出速度を抑制していることが報告されている。さらにこの抑制効果は、男性では、はっきり認められるが、女性では、はっきりしないことがわかった。

1993年、安定同位体である carbon thirteen (^{13}C)を用いた呼気テストが確立した。この呼気テストを用いて、アルコールの胃排出速度に及ぼす影響が男女で異なっていることの原因を、検討することを計画した。

本研究は第I章から第IV章までの構成となっている。第I章では、性周期と胃排出速度との関係について卵胞期、黄体期において、水、またはウォッカを飲用した際の胃排出速度の実験結果を示した。第II章ではプロゲステロンの野生型マウスにおける胃排出抑制効果の実験結果を示した。第III章ではコレシストキニン(CCK)、CCK-1受容体(R)ノックアウト(KO)マウスについて説明し、第IV章ではプロゲステロンによる胃排出抑制効果の機序について、CCK-1RKOマウスを用

いた実験結果を踏まえて検討した。

第 I 章では ^{13}C 呼気テストを用いて、卵胞期および黄体期中におけるウォッカと水の胃内貯留時間を比較した。

先行研究において、アルコールは胃排出速度を遅延させていること、さらに、この抑制効果は男性でははっきりと認められるが、女性でははっきりとしないこと、が報告されている。女性には性周期があり、先行研究では性周期を考慮せずに実験を行っている。しかし、成熟女性において、卵胞期と黄体期では体内で分泌されるホルモンが異なる。そこで、卵胞期、黄体期それぞれ時期の、水とウォッカを飲用した際の胃排出速度を測定した。その結果、黄体期には飲料の種類に関わらず、全体的な胃排出抑制が生じていることが考えられた。

第 II 章では、プロゲステロンが胃排出速度に与える影響について、野生型マウスを用いて検討した。第 I 章の実験で、黄体期において胃排出抑制が生じた結果を受け、黄体期に特異的に分泌されるプロゲステロンが影響しているという仮説を立て、マウスにプロゲステロンを腹腔内注射し、vehicle(水)とアルコールの胃排出速度の検討を行った。その結果、プロゲステロンは野生型雄マウスにおいて用量依存的に vehicle の胃排出速度を抑制した。野生型雄マウスにアルコールの胃内投与を行うと胃排出速度が遅延するが、本実験ではアルコール投与時においても、プロゲステロンはさらに有意に胃排

出速度を遅延させた。野生型雌マウスにおいても水、アルコールともに抑制効果が見られた。これらの結果からプロゲステロンは野生型マウスにおいて、vehicle 投与時も、アルコール投与時も胃排出を抑制することが明らかになった。

第Ⅲ章では研究に使用する実験動物である、CCK-1RKO マウスについて記述した。

CCK は古典的な消化管ホルモンの一つである。神経系にも豊富に存在し、神経ペプチドとしての働きも持つ。消化管ホルモンとしての CCK は、上部小腸粘膜に散在する I 細胞で合成され、脂肪酸などの刺激に応じて血中に分泌され、胆嚢収縮、膵外分泌を促す。CCK の受容体(R)には 1 と 2 の 2 種類が存在する。マウスでは CCK-1R は膵臓や胆嚢等に存在し、CCK-2R は胃や脳に存在する。本研究で使用する CCK-1RKO マウスは CCK-1R の遺伝子配列の一部を LacZ という遺伝子配列に置き替えている。そのためこのマウスには CCK-1R が存在せず、CCK の働きがあらわれなため胆嚢収縮不全や胆石が発現しやすいという特徴がある。

第Ⅳ章では、Ⅲ章で述べた CCK-1RKO を用いてプロゲステロンの胃排出抑制効果について検討を行った。

アルコールの消化管内投与は CCK を放出する、CCK-1R を欠損するラットでは、アルコール投与によって膵外分泌が増加しないという報告があり、また、CCK による情報は、CCK-1R から迷走神経を介してアセチルコリン放出を制御し、胃の

平滑筋運動を抑制していると考えられている。よって CCK-1RKO マウスではアルコール投与によって胃排出速度が遅延しない。プロゲステロンの作用機序が CCK、CCK-1R とは全く別個の機序を介して生じているのであれば、CCK-1RKO マウスにおいても、アルコールの胃排出速度を抑制できるはずであるという仮説を立て、CCK-1RKO にプロゲステロンを腹腔内注射し、アルコールの胃排出速度を測定した。その結果プロゲステロンは CCK-1RKO 雄マウスにおいて、強い胃排出抑制効果を示した。同様に、CCK-1RKO 雌マウスにおいても、プロゲステロンはアルコールの胃排出速度を有意に遅延させた。従って、プロゲステロンは CCK, CCK-1R とは別個に独立して胃排出抑制作用を出現させていることが証明された。

本研究により、アルコールの胃排出速度は男女で差があり、女性では性周期によって差が見られること、プロゲステロンは女性の性周期以外に、特に胃内容物排出の速度に影響を与えていることが明らかになった。

The effects of the sex difference and the menstrual cycle on the gastrointestinal function, especially on the gastric emptying

There have been reported that ingestion of 60 mL of red wine or vodka prior to the ingestion of a pancake, significantly inhibited the gastric emptying of the pancake in male subjects, but not in female subjects, and that the retention times of wine and vodka were significantly longer than those of the congener of red wine and mineral water in male subjects, whereas in female subjects the retention times of these four drinks did not differ significantly from one another.

In a present study, we planned to examine the mechanism of the sex difference in the gastric emptying rate of alcohol beverages. The present report consists of four chapters.

In chapter I, we hypothesized that the menstrual cycle might influence the gastric emptying rate of alcohol beverages. Here, we determined and compared the retention times of vodka and water in the stomach during the luteal phase and the follicular phase using the breath test, which was established in 1993. Ten female healthy volunteers were employed. They recorded their basal body temperatures every day, and participated in the following experiments: each volunteer drank mineral water or vodka containing 14% alcohol during the low-temperature (follicular) phase as well as during the high-temperature (luteal) phase. After the participant collected a first breath sample, she ingested either 60 mL of vodka or 60 mL of mineral water, containing 100 mg of carbonyl-¹³C-acetic acid. Breath samples were collected at 5-min intervals for 2 h, and then at

15-min intervals for an additional 1 h. The value of T_{max} (the time point of the maximum concentration of ¹³C in the sampled breath) was estimated from the results shown in Figures 7 and 8. The values of T_{1/2} (the emptying time for 50% of labeled drinks), and of T_{lag} (the emptying time for 5% of labeled drinks), were estimated by the use of analysis software (Microsoft Office Excel 2003; Microsoft Japan, Tokyo) from a calculated ¹³C breath excretion curve. The retention time of vodka was significantly longer than that of mineral water during the follicular phase, but no significant differences between the retention times of the two drinks were observed during the luteal phase.

According to the results of human study shown in Chapter I, we supposed that progesterone might influence the gastric emptying rate, because the plasma concentration of progesterone is known to be high during the luteal phase.

In Chapter II, the effect of intraperitoneal injection of progesterone (25 and 50 mg/mouse) on the gastric emptying rate of alcohol (ethanol) and/or water was determined in wild-type mice. Ethanol (50%) prepared with phenol red (1 mg/mL) was administered via an orogastric tube (0.15 mL/mouse). Ten and 30 min after the ingestion, the rest of phenol red in the stomach was determined and the gastric emptying rate was estimated. The gastric emptying of intragastric administration of ethanol is delayed compared with that of intragastric administration of water. Progesterone inhibited the gastric emptying rate of ethanol as well as water, dose-dependently. That is, progesterone further inhibited the gastric emptying rate even when ethanol was administered.

Previously, we found that intragastric administration of ethanol did not inhibit the gastric emptying in cholecystokinin (CCK)-1 receptor (R) knockout (KO) mice, because ethanol released CCK and CCK inhibited the gastric emptying via CCK-1R. To distinguish the inhibitory mechanism of progesterone on the gastric emptying from CCK (and CCK-1R), we planned to conduct the similar experiments as shown in Chapter II using CCK-1RKO mice.

In Chapter III, we presented the characteristics of CCK, CCK-1R, and CCK-1RKO mice. CCK is a classical gastrointestinal hormone and is also a neurotransmitter peptide in the brain. Two types of CCK-Rs (CCK-1R, CCK-2R) have been identified. CCK is secreted from I cells of the small intestine and promotes enzyme secretion from the pancreas, and induces gallbladder contraction and satiety via CCK-1R. In mice, CCK-1R is distributed in the pancreas and gallbladder, and CCK-2R is distributed primarily in the stomach and brain. For example, gallbladder contraction is not induced by the administration of CCK in CCK-1RKO mice, and the frequency of sludge and gallstone formation is higher in CCK-1RKO mice than in wild-type mice.

In Chapter IV, the effect of progesterone on the gastric emptying of ethanol was examined in CCK-1RKO mice. The protocol of the experiment is the same as that shown in Chapter II. The gastric emptying is not delayed by the intragastric administration of ethanol in CCK-1RKO mice. Intraperitoneal injection of progesterone significantly inhibited the gastric emptying of ethanol in CCK-1RKO mice. The inhibitory effect of progesterone was observed both male and female CCK-1RKO mice. Thus, the mechanism of progesterone to inhibit the gastric emptying is independent from

CCK and CCK-1R.

In conclusion, the menstrual cycle influences the gastric emptying of alcohol. Progesterone, increased during the luteal phase, may be involved in the inhibition of gastric emptying of alcohol.

目次

序章	1
1.アルコール飲料と食欲、および胃排出速度	1
2.胃排出速度の測定方法について	1
3.アルコールの胃排出速度に及ぼす影響と性差との関係	3
4.アルコールの吸収と代謝について	5
5.アルコール代謝における性差について	6
6.研究の背景と目的	7
第I章 性周期と胃排出速度との関係	11
1.はじめに	11
(1)月経周期と消化器系の機能	11
(2)アルコール飲料の種類と胃内貯留時間の性差	11
2.実験方法	12
(1)被験者	12
(2)試験飲料	13
(3)実験方法	13
(4)呼気中 ^{13}C の測定方法	14
(5) ^{13}C 測定結果の解析	14
(6)統計学的解析	15
3.結果	15
(1)卵胞期(低温相 : Follicular phase)での結果	16
(2)黄体期(高温相 : Luteal phase)での結果	17

4. 考察	18
5. 結論	19
第II章 プロゲステロンが胃排出速度に与える影響	20
1. はじめに	20
(1) プロゲステロンについて	20
(2) プロゲステロンの効果	21
2. 実験	21
(1) 実験動物	21
(2) 飼育方法	21
(3) 試薬	22
(4) 実験方法	22
3. 結果	25
(1) 野生型雄マウスにおけるプロゲステロンの vehicle の胃排出速度に与える効果	25
(2) 野生型雄マウスにおけるプロゲステロンのアルコール の胃排出速度に与える効果	26
(3) 野生型雌マウスにおけるプロゲステロンの胃排出抑 制効果	27
4. 考察	28
5. 結論	30
第III章 コレシストキニン(CCK)、コレシストキニン受容体 (R)、コレシストキニン 1 受容体ノックアウト(KO)マウス	31

1.はじめに	31
2.CCK、CCK-R について	31
(1) CCK について	31
(2) CCK-R について	33
(3) CCK-1R の細胞内情報伝達	34
(4) CCK の摂食抑制作用	36
(5) CCK-1RKO マウスについて	37
第IV章 プロゲステロンの作用機序-CCK-1RKO マウスにお	
いてプロゲステロンが胃排出速度に与える影響-	39
1.はじめに	39
2.実験方法	40
(1)実験動物	40
(2)飼育方法	40
(3)実験方法	40
(4)実験群	41
(5)試薬類	41
(6)血中プロゲステロン濃度測定	41
3.結果	42
(1) CCK-1RKO 雄マウスにおけるプロゲステロンの	
vehicle の胃排出速度に与える効果	42
(2) CCK-1RKO 雄マウスにおけるプロゲステロンのアル	
コールの胃排出速度に与える効果	43
(3) CCK-1RKO 雌マウスにおけるプロゲステロンのアル	
コールの胃排出速度に与える効果	44

(4)プロゲステロンの血中濃度	45
4. 考察	45
5. 結論	48
総括	49
引用文献	52
謝辞	60

序章

1. アルコール飲料と食欲、および胃排出速度

食前酒や食中酒は、ストレスを軽減させ、会話を楽しみ、食事に彩りをそえるものとされている。従って、一般的に食前や食中に酒を供されると、食欲が亢進すると思われる。食欲調節には、味覚¹⁾、嗅覚、視覚など、複数の要素が関与する。調節を仲介する物質として各種のホルモン・ペプチド類が想定されており、これらは、自律神経と相互に干渉しあっている²⁾。

脂肪分の多い『腹持ちのよい』食事のあとは、空腹感が生じるまでの時間が延長することは、日常的に実感できる現象である。すなわち胃内容物がなかなか小腸へ移動していかない(胃排出速度が遅い)と、空腹感を感じにくく、食欲がわからない。上記のような食前酒、食中酒の効果を考慮すると、アルコール飲料は胃排出速度を速め、食欲を増進するのでは、という仮説が生まれる。しかし、実際には、アルコール飲料の摂取は、胃排出速度を抑制していることが報告されている^{3) 4) 5) 6) 7)}。さらにこの抑制効果は、男性では、はっきり認められるが、女性では、はっきりしないことがわかった^{5) 8)}。

2. 胃排出速度の測定方法について

胃排出速度の測定方法は、放射性物質を体内に投与し、その物質から発生する放射能を測定する胃シンチグラフィ法が主流であった。放射性物質を使用するため専門装置や専門

技師が必要であり、少量とはいえ被爆する事がネックとなっていた。

1993年 Ghoos らによって安定同位体である carbon thirteen (^{13}C)を用いた呼気テストで、胃内容物の通過時間を測定することができること、得られた結果は、シンチグラフィーで得られた結果とよく相関することが報告された⁹⁾。 ^{13}C は炭素(^{12}C)の安定同位体であり、人体内の安定同位元素の中で最も多く(体重 50kg あたり 137g)、また自然界での存在比率が約 1.1%と少ない¹⁰⁾。この特徴を利用した試験法が ^{13}C を用いた呼気テストである。

^{13}C を用いた呼気テストは ^{13}C でラベルされた酢酸を飲料または食糧に混ぜ込み、摂取する。摂取された飲食物は胃から小腸に移動し、小腸で吸収され、門脈を経て、肝臓で代謝される。代謝の結果生じた ^{13}C は、肝静脈から心臓、右心房から右心室を経て、肺にたどりつくと二酸化炭素として呼気中に排出される(図1)。

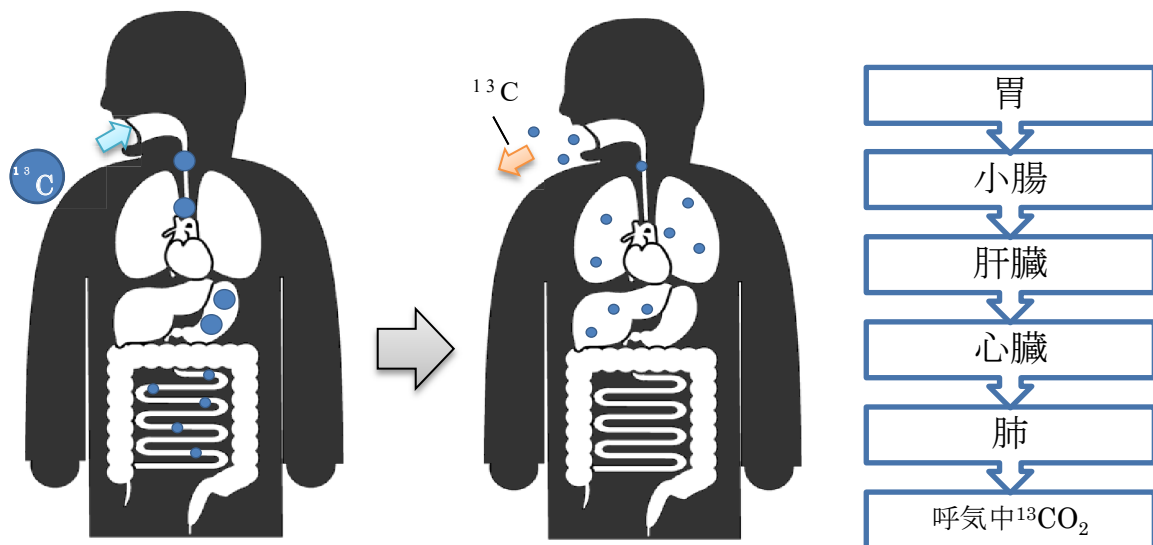
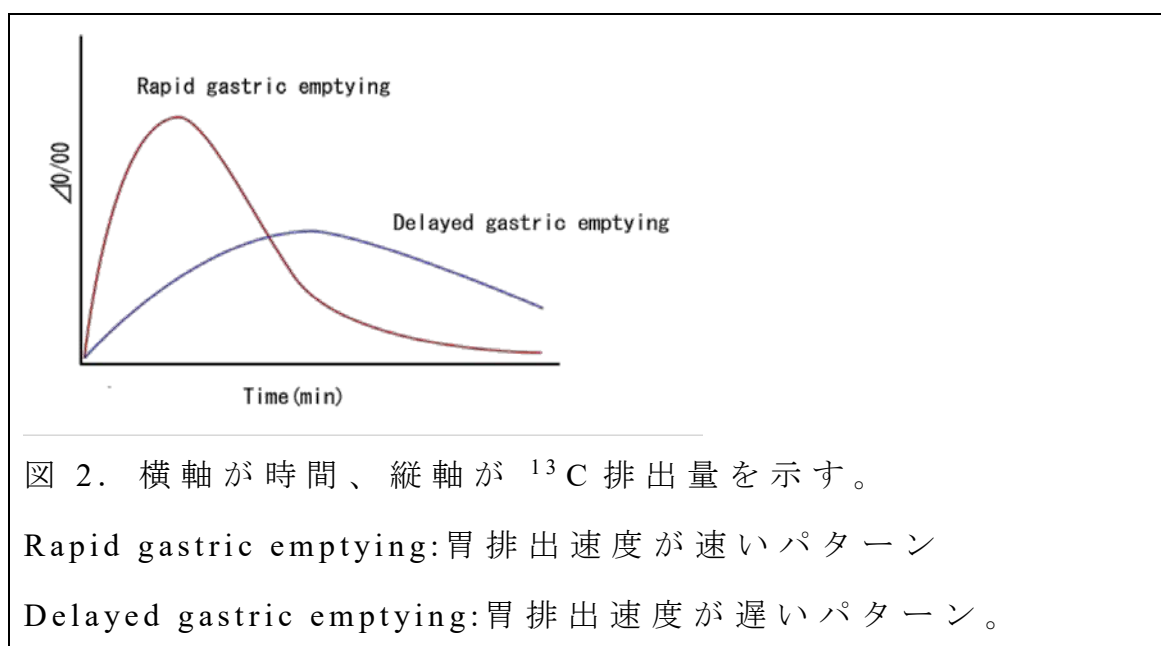


図 1. ^{13}C の呼気中への排出経路

呼気テストは、この呼気中の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比が増加することを利用した測定法で、胃から小腸への排出速度を算出することができる。摂取された ^{13}C は、胃からの排出が早ければ早いほど小腸からの吸収がすみやかになるので、呼気中の ^{13}C 濃度は、急激に上昇し、下降していく。一方、胃排出速度が遅ければ呼気中の ^{13}C 濃度は時間をかけて上昇し、下降する。典型的なパターンを図 2 に示した。



3. アルコールの胃排出速度に及ぼす影響と性差との関係

この呼気テストを用いて、Inamori³⁾らは健康な男性では、50mlの梅酒の飲用が、流動食の胃排出速度を遅延させる、ということを報告している。同様に、秋本ら⁵⁾は、男性被験者では、60 mLの赤ワインまたは60 mLのウォッカが、パンケーキの胃排出速度を遅延させたが、女性ではその差がはっきりとしなかった、と報告している。すなわち、ともに男性対象者においてアルコールが胃排出速度を遅延させている、と

いう点で共通している。一方で、Sekime⁸⁾らはアルコールの胃内貯留時間における男女差について、男性では14%アルコール濃度のウオッカの胃内貯留時間は水よりも有意に延長するが、女性では、その効果が非常に弱いこと報告している。図3に文献8から引用した男性の結果、図4に女性の結果を示した。

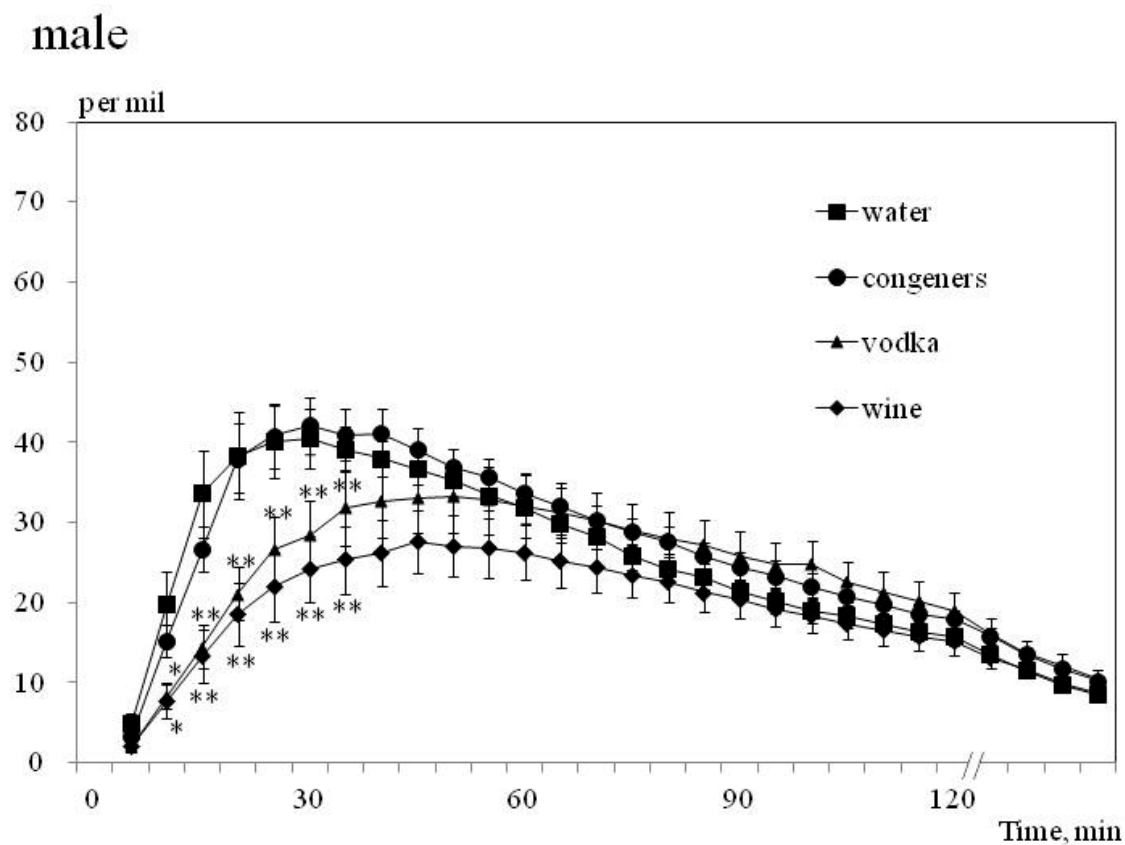


図 3. 男性の例。

60mL のウオッカと赤ワインは、同量の水または赤ワインのコンジェナー（赤ワインの中の非アルコール成分）よりも有意に胃内貯留時間が長い。

female

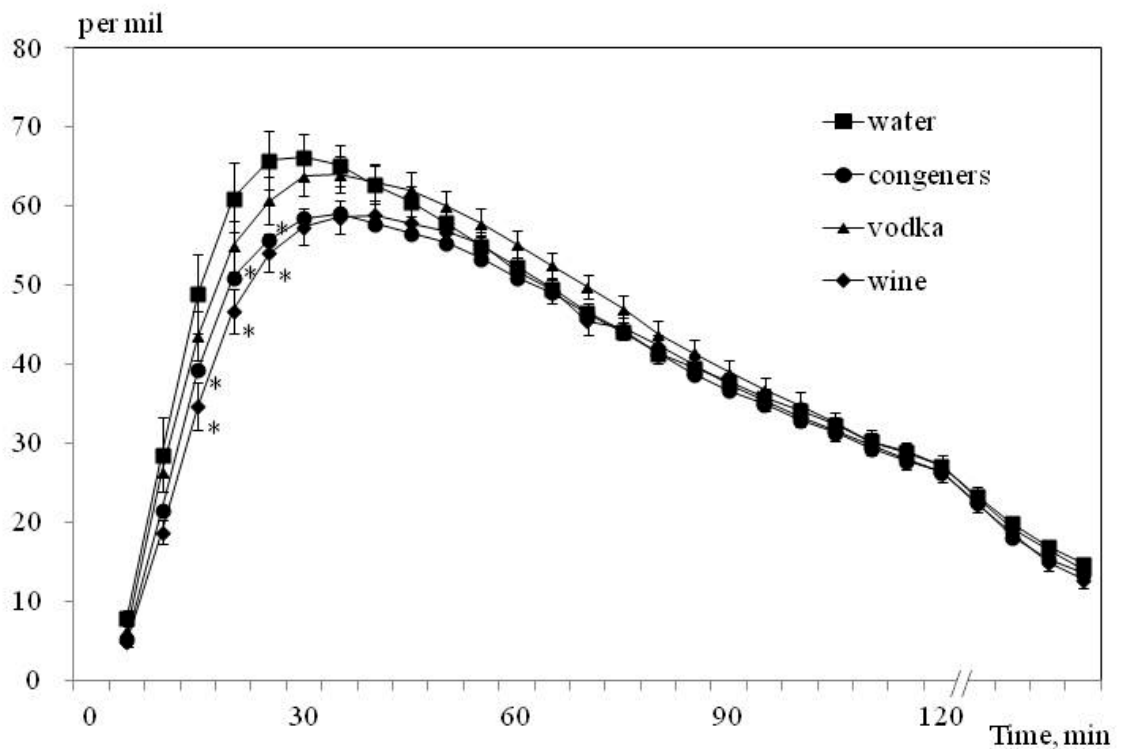


図 4. 女性の例。

* : 赤ワインの胃内貯留時間のみ、水より有意に長い。

4. アルコールの吸収と代謝について

経口摂取されたアルコールは消化を受けることなく、約25%は胃壁から、残りは小腸から吸収される¹¹⁾。吸収速度は常に一定ではなく、胃内容物の有無や組成、消化管運動、アルコール飲料の種類やアルコール濃度など様々な要因が影響する。胃や小腸から吸収されたアルコールは門脈を経て肝臓から全身の臓器に流れこむ。アルコールは非常に親水性が高く、単純拡散によって生体膜を通過し全身にいきわたる。一方、脂肪にはあまり解けないので、脂肪組織にはゆっくりと

拡散していく。

アルコールは主に肝臓で代謝、分解される。肝臓においてアルコールはアルコール脱水素酵素(ADH)、ミクロソームエタノール酸化系(Microsomal Ethanol Oxidizing System : MEOS)、カタラーゼなど複数の酵素によってアセトアルデヒドに酸化される。アセトアルデヒドは1型アルデヒド脱水素酵素(ALDH1)と2型脱水素酵素(ALDH2)の酵素によって酢酸に分解される。酢酸は血液によって筋肉や心臓に運ばれ、炭酸ガスと水、さらに1グラム当たり7キロカロリーの熱エネルギーを生じる。

5.アルコール代謝における性差について

同量のアルコールを飲用したとき、女性は、男性と比較して血中アルコール濃度が高くなることが知られており¹²⁾、女性がアルコール性肝障害や心筋障害を起こしやすい原因の一つとして考えられている。この原因として、以前は、女性は男性よりもアルコール代謝速度が遅く、体重当たり同等のアルコールを飲用しても血中アルコール濃度が高くなるためであると考えられていたが、Liらは、女性は男性と比較して除脂肪体重当たりの肝臓重量が大きいので、単位体重当たりのアルコール分解速度は男性よりも速い¹³⁾、と報告している。しかし、女性は男性と比較して体脂肪が多く、水分が少ない。アルコールは脂肪組織には溶けにくいいため、体重当たり同量のアルコールが摂取されると、女性の方が、血中濃度が上昇しやすいとも考えられる。また、胃壁を介して吸収されたア

ルコールの分解速度が、女性のほうが遅い¹⁴⁾、という報告もあり、血中濃度や分解速度には非常に多くの因子が影響していると考えられる。

6.研究の背景と目的

従来、生殖器系疾患以外の医学研究は、治験も含め、臨床実験や動物実験も多くがオスを対象に行われ、得られた結果が男女の区別なく用いられてきた。その理由として、男女共通の臓器に性差があるとは考えられなかったこと、雄性の方が、実験が月経周期に影響されないため、一定の結果が得やすく、費用や実験期間が節約できるという利点があったことが考えられる。しかし、様々な研究が進むにつれて、生殖器系以外の疾患や薬物の臨床効果についても性差がある¹⁵⁾ことがわかってきた。疾患以外にも、Sekimeらは肥満やメタボリックシンドロームの発現における「生物学的な性差」について検討し、食餌誘導性の肥満・脂質異常症・胆嚢所見の発現には性差がみられる¹⁶⁾ことを報告している。これらのことを受けて、アルコールの胃排出速度に及ぼす影響が男女で異なっていることの理由を検討することを計画した。

本研究の第一の目的は女性におけるアルコールの胃排出速度に性周期が関与しているかどうかを検討することである。Sekime⁸⁾らが行った実験では性周期を考慮せずに実験を行っている。そこで、卵胞期、黄体期それぞれ時期において測定する。また男性においても、ワインのコンジェナーの効果は水と同様であり、アルコール飲料中の「アルコール」が重要

であると考えられたことから、水またはウォッカ(蒸留酒)の胃排出速度を測定し比較することとした。

成熟女性において、卵胞期と黄体期では体内で分泌されるホルモンが異なる。卵胞期には視床下部から「性腺刺激ホルモン放出ホルモン(Gn-RH)」が、下垂体から「卵胞刺激ホルモン(FSH)」が分泌される。これらのホルモンに刺激を受けた卵巣では、数個の原始卵胞が発育し、この過程で卵胞から「卵胞ホルモン(エストロゲン)」が分泌される。この卵胞ホルモンの働きによって子宮内膜が増殖し、受精卵を受け止める準備が整う。排卵後、黄体期には、卵胞は「黄体」と呼ばれる組織に変化し、「黄体ホルモン(プロゲステロン)」を放出する(図

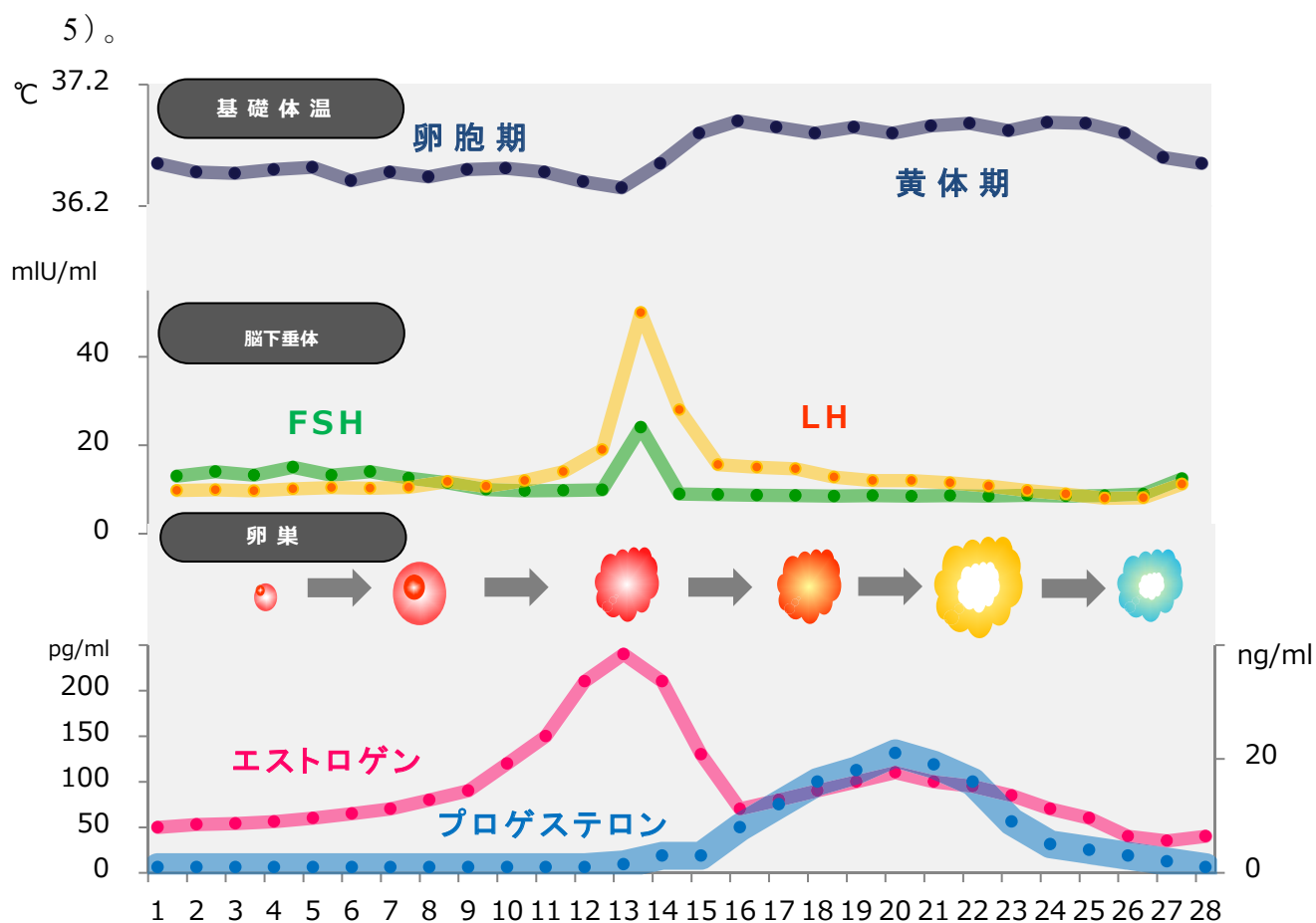


図 5. 性周期とホルモン変化

エストロゲンは性周期全体を通して一定分泌されている一方で、プロゲステロンは黄体期に特異的に分泌されるという特徴がある。プロゲステロンは、モルモットの胆嚢収縮を抑制する¹⁷⁾、黄体期には腸管の働きが低下する¹⁸⁾など、平滑筋の収縮を抑制する作用を持つ。そこで、マウスを用いて、プロゲステロンが胃排出速度に影響を与えているのかどうかを見極めることを第二の目的とした。

胃排出速度は自律神経や消化管ホルモン、生理活性ペプチドなどによって調節されている¹⁹⁾。中でも、コレシストキニン(CCK)は迷走神経求心路末端にあるCCK-1受容体(R)を介して胃排出速度を遅延させ、満腹感を感じさせる効果を発揮することが知られている²⁰⁾(図6)。

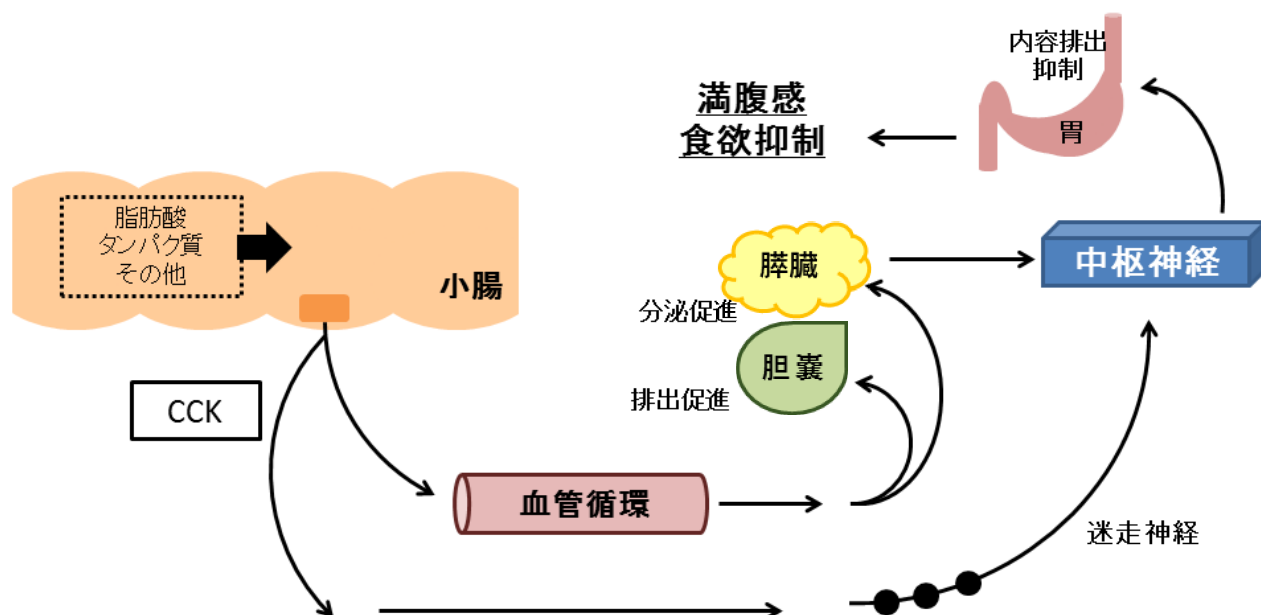


図 6. CCK による満腹感を感じさせる機序

(<http://astamuse.com/ja/published/JP/No/2014534873> より改変)

ラットにアルコールを経口投与すると CCK が放出される²¹⁾。CCK-1R 遺伝子を欠損した Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットでは、CCK を投与しても摂食抑制がかからない²⁰⁾。従って、アルコールの胃排出抑制効果には、CCK と CCK-1R が関与していると考えられる。そこで、プロゲステロンと、CCK および CCK-1R の胃排出速度遅延に及ぼす相互関係を、CCK-1R 遺伝子ノックアウトマウス (KO) を用いて調べることを第三の目的とした。

第I章では、性周期と胃排出速度との関係について卵胞期、黄体期それぞれ時期の、水またはウォッカを飲用した際の胃排出速度の実験結果を示した。第II章ではプロゲステロンの野生型マウスにおける胃排出抑制効果の実験結果を示した。第III章では CCK、CCK-1RKO マウスについて説明し、第IV章ではプロゲステロンによる胃排出抑制効果の機序について、CCK-1RKO マウスを用いた実験結果を踏まえて検討した。

第I章 性周期と胃排出速度との関係

1.はじめに

(1)月経周期と消化器系の機能

月経周期が胃内容物排出速度に与える影響を評価した研究はすでにいくつか報告されている^{22) 23) 24) 25)}。胃排出速度は性周期に影響をうけないとする報告^{22) 23) 25)}、一方で固形食は黄体期の方が卵胞期より遅延しているという報告²⁴⁾があり結論にはいたっていない。小腸～大腸の通過時間についても、性周期の影響を受けないという報告²⁶⁾、黄体期の方が卵胞期より長いという報告²⁷⁾があり結論はでていない。また、これらの報告ではアルコール飲料の影響については評価されていない。

(2)アルコール飲料の種類と胃内貯留時間の性差

アルコールは大別して蒸留酒と醸造酒に分けられる。醸造酒は発酵液を濾過したもので、アルコール分は比較的高くない。エキス分の多い酒であり、葡萄酒、林檎酒、ビール、清酒、黄酒などが醸造酒に分類される。蒸留酒は、醸造酒を蒸留し、アルコール濃度を上げたもので、エキス分が少ない。ウイスキー、ブランデー、ウオッカ、焼酎などが蒸留酒に分類される。

また、コンジェナーとは醸造酒のアルコール以外の成分を総称したもので、Sekime⁸⁾らの実験では赤ワインを煮沸してアルコール分をとばし、蒸留水で置換して作成した。

表 1 酒造法による酒類の分類

酒類	醸造酒	単発酵法	葡萄酒、林檎酒など
		複発酵法	単行複発酵法
	平行複発酵法		清酒、黄酒
	蒸留酒	ウイスキー、ブランデー、焼酎、ウオッカなど	
混合酒	リキュール、みりん、梅酒など		

すでに Sekime ら⁸⁾は、ワインとウオッカの胃内貯留時間は、男性被験者におけるコンジェナーとミネラルウォーターよりも有意に長かったが、女性被験者においては男性ほどはつきりしなかったこと、アルコール飲料中の「アルコールそのもの」が、胃排出速度に影響し、非アルコール成分であるコンジェナーは、胃排出速度に影響を与えていないことを報告している。そこで、本研究では、黄体期および卵胞期中におけるウオッカと水の胃内貯留時間を比較することとした。

2. 実験方法

本実験は、東京家政大学の倫理委員会において承認を受け、実施した。参加者についてはすべて、紙面にて同意を得た。

(1) 被験者

健康な女性 10 名が実験に参加した。被験者は 20～21 歳で、平均 BMI は 18～22 (20.3 ± 0.46 , mean \pm SE)であった。また、参加者のなかで胃腸や肺などの疾患に罹患している者はおらず、実験中に薬を服用した者もいなかった。詳細は表 2 に示した。

表 2 被験者の体格

	身長 (cm)	体重 (kg)	BMI
被験者 A	170	59	20.4
被験者 B	154	50	21.1
被験者 C	162	57	21.7
被験者 D	155	46	19.1
被験者 E	153	51	21.8
被験者 F	162	58	22.1
被験者 G	162	47	17.9
被験者 H	159	50	19.8
被験者 I	153	47	20.1
被験者 J	160	47	18.4
平均	159	51.2	20.3

(2) 試験飲料

試験飲料は以下の 2 種類である

- ・ 14% ウォッカ：スミノフウォッカ 21ml + 水 39ml = 60mL
- ・ ミネラルウォーター：60mL

安定同位体である ^{13}C でラベルした酢酸 100mg をそれぞれの飲料に添加し、摂取した

(3) 実験方法

被験者は毎日基礎体温を記録し、以下の 4 種類の実験を行った。

- ① 卵胞期に水を飲んで、呼気テストを行う
- ② 卵胞期にウォッカを飲んで、呼気テストを行う
- ③ 黄体期に水を飲んで、呼気テストを行う
- ④ 黄体期にウォッカを飲んで、呼気テストを行う

呼気テストを行う際は、前夜 21 時以降の食事を禁止（飲水は可）、当日は朝食抜き（飲水は可）とした。当日はまず、測定前の呼気を回収し、 ^{13}C ラベル酢酸 100mg を、ウォッカまたは水に混入、攪拌し、摂取した。2 時間までは 5 分ごとに呼気を採取、それ以降は 15 分ごとに 3 時間まで呼気を採取した。

(4) 呼気中 ^{13}C の測定方法

UBiT-IR300 POCone（大塚製薬製）を用いて測定した。

(5) ^{13}C 測定結果の解析

Ghoos らの報告に従い⁹⁾、 $T1/2$ （摂取された飲料の 50% が胃から排出するのに要する時間）、および $Tlag$ （摂取された飲料の 5% が胃から排出するのに要する時間）の値を日本マイクロソフト;東京（Microsoft Office Excel 2003 解析ソフトウェア）を使用し、算出した。また、呼気中 ^{13}C の値が最高値を示すまでの時間を $Tmax$ として、図 7,8 より読み取った。 $T1/2$ 、 $Tlag$ 、 $Tmax$ の値は大きければ大きいほど、胃内容物の貯留時間が長いということを示す。また $Tmax$ は $Tlag$ と近い値をとるはずである。

(6)統計学的解析

結果はすべて $\text{mean} \pm \text{SE}$ で示し、一元配置分散分析または多元配置分散分析を行い、有意と判定された場合のみ、Fisher の多重比較を行った。 $P < 0.05$ を有意とした。

3.結果

今回の結果は文献 28 にて報告した。図 7 には卵胞期の結果を、図 8 には黄体期の結果を、表 3 にはそれぞれの解析結果を文献 28 より引用した。

(1)卵胞期(低温相 : Follicular phase)での結果

卵胞期における呼気サンプル中の ^{13}C の変化を図 7 に示した。水とウォッカに対する呼気中の ^{13}C の値は有意差は示さなかった [$F(1,27)= 0.013$ 、 $p=0.9$]ものの、時間に対する変化には有意な差がみられ [$F(1,27) = 56.75$ 、 $p=0.000$]、飲料の種類と時間の相互作用も有意であった [$F(1,27)=4.78$ 、 $p=0.000$]。またウォッカは水に比べてピーク値(Tmax)に達するまで長い時間を要した(表 3)。

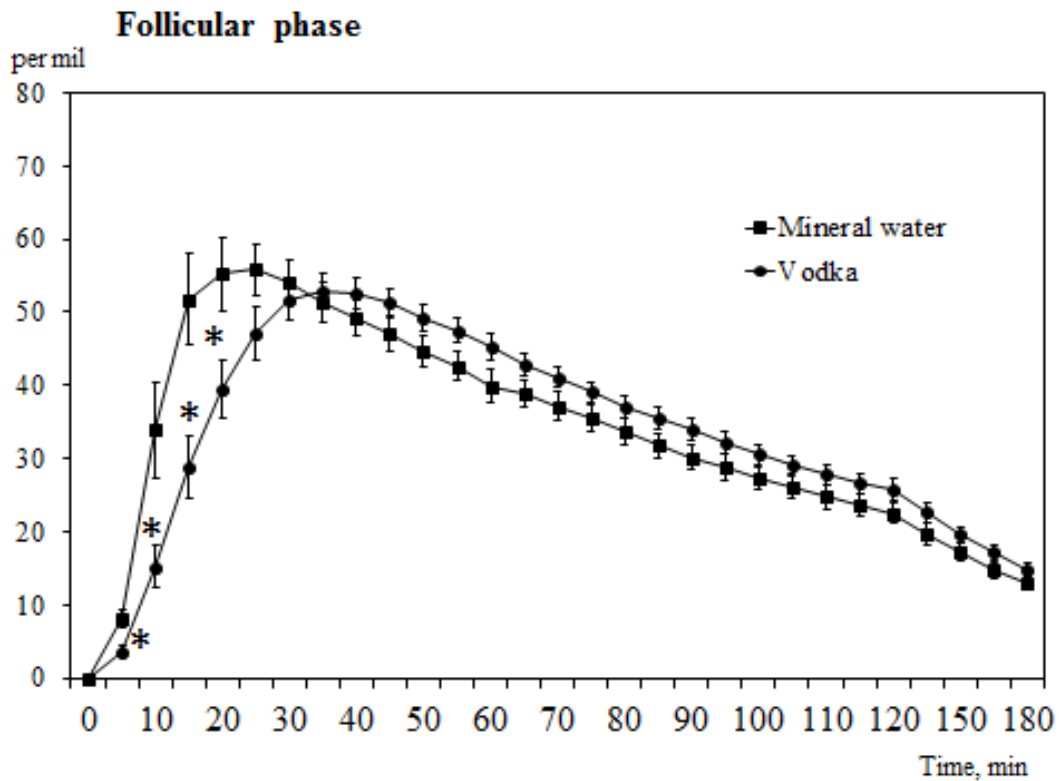


図 7. 卵胞期における呼気中の ^{13}C の変化(文献 28 より引用)

(2)黄体期(高温相 : Luteal phase)での結果

黄体期では、水とウオッカを飲んだあとの呼気中 ^{13}C 排出の変化はほとんど差がみられなかった(図 8)。

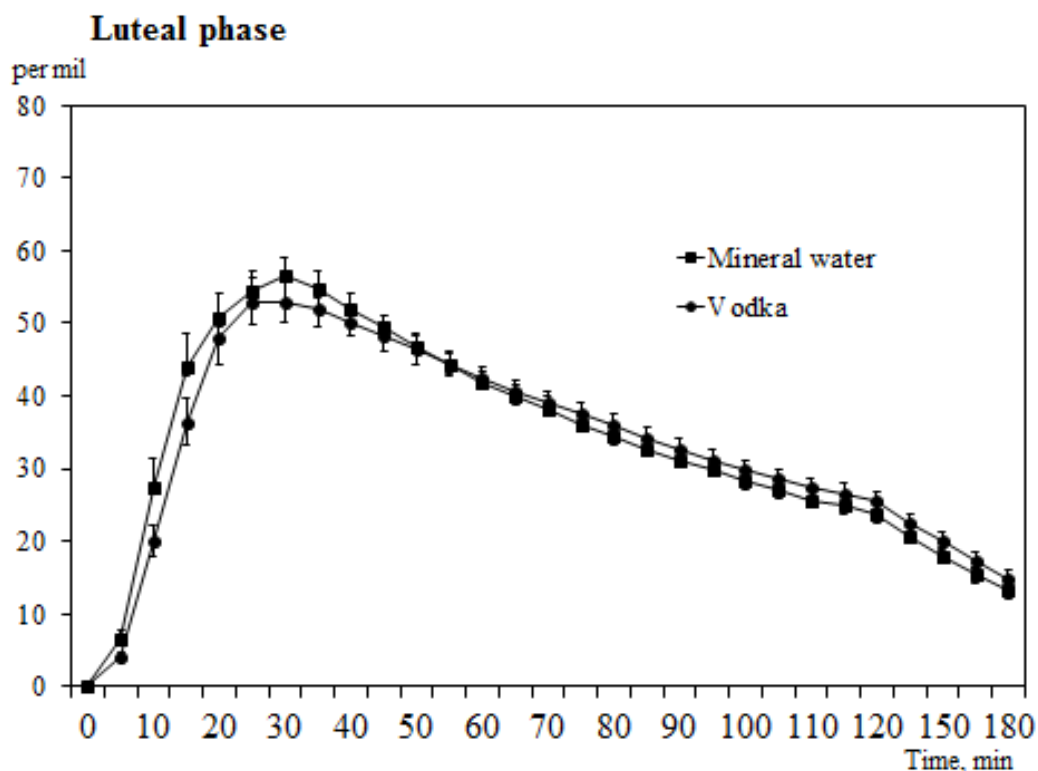


図 8. 黄体期における呼気中の ^{13}C の変化(文献 28 より引用)

(3)卵胞期、黄体期における Tmax、Tlag、T1/2 の値の比較(表 3)

卵胞期では、Tmax、Tlag、T1/2 いずれの値もウオッカの方が水より有意に高い、すなわち、ウオッカの方が水より胃内貯留時間が長いことを示していた。一方、黄体期では水とウオッカの間には全く差がみられなかった。

水を飲んだときの Tmax、Tlag、T1/2 の平均値を卵胞期と

黄体期で比較してみると、有意差には至らないが、黄体期の方が、すべてにおいて高い値を示している。しかし、ウオッカの値は、Tmaxなどは、むしろ、卵胞期の方が高い値であった。

表 3(文献 28 より引用)

Phase	Follicular		Luteal	
	water	vodka	water	vodka
Tmax	21.7 ± 1.70	* 5.5 ± 2.41	26.0 ± 2.21	28.5 ± 2.24
Tlag	31.1 ± 3.00	* 44.7 ± 2.16	* 38.5 ± 3.00	39.3 ± 2.04 (9)
T1/2	73.6 ± 3.12	* 82.1 ± 1.50	75.5 ± 3.24	* 83.3 ± 2.64 (9)

Tmax : F(3,36)=6.91, p=0.0009
 Tlag : F(3,35)=5.60, p=0.003
 T1/2 : F(3,35)=3.13, p=0.038

一元配置分散分析を実施

4. 考察

本実験の結果、卵胞期では、男性と同様に、ウオッカの胃排出速度は水よりも遅延していたが、黄体期では水とウオッカの間に差はみられなかった。表 3 に示したように、水の排出速度は、卵胞期より黄体期の方が遅くなる傾向がみられる一方で、ウオッカの排出速度は、必ずしもそうではない。

すなわち卵胞期において、ウォッカは水よりも胃排出速度が有意に遅延したこと、黄体期においてその差が見られなかったこと、黄体期には、水の胃排出速度が抑制される傾向がみられことから、黄体期ではウォッカの持つ胃排出抑制作用が隠されてしまったのではないかと考えた。

5. 結論

黄体期には全体的な胃排出抑制が生じており、その結果アルコールの胃排出遅延効果が表面化されなかったと考えられた。黄体期に特徴的なものとして、血中プロゲステロンの上昇があげられるので、II章ではプロゲステロンの作用について検討を行うこととした。

第II章 プロゲステロンが胃排出速度に与える影響

1.はじめに

(1)プロゲステロンについて

プロゲステロンは黄体から分泌される炭素数 21 のステロイドホルモンのうち、受精卵着床維持などの活性をもつものを指す(図 9)。精巣、副腎皮質、胎盤からも少量のプロゲステロンが血中に分泌されている。プロゲステロンは他のステロイドホルモンと同様に、細胞内に存在するプロゲステロン受容体タンパク質に結合して複合体を形成する。この複合体は核内の DNA の特定部分に結合し、その結果多くの遺伝子発現を変化させる。この機構によって、子宮内膜や子宮筋の働きの調整、乳腺の発達や体温上昇などに関する。血糖値の正常化、体脂肪の減少、利尿作用の他、他のホルモンバランスを調整する役目ももつ。

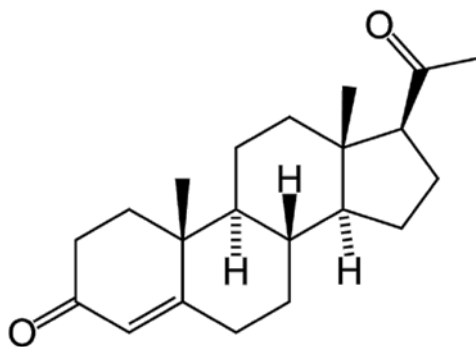


図 9. プロゲステロンの構造式

(2)プロゲステロンの効果

プロゲステロンは、ラットの胃平滑筋の収縮を抑制する²⁹⁾、モルモットの胆嚢の平滑筋の収縮を抑制する³⁰⁾、小腸の蠕動運動を抑制する³¹⁾、大腸の収縮を抑制する³²⁾などの消化器系の平滑筋の収縮を抑制するということがわかっている。そこで、(野生型)マウスにプロゲステロンを投与し、胃排出速度が抑制されるかどうかを検討した。

2.実験

本実験は、東京家政大学 動物実験委員会において承認された。

(1)実験動物

10～12ヵ月齢の雄雌の野生型マウス (C57BL-6)を使用した。日本 SLC より購入し、1週間の順化飼育を経てから実験に使用した。

(2)飼育方法

マウスは東京家政大学 5号館動物実験室にて飼育した。飼育環境は室温 $23\pm 10^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、8:00～20:00を明期とする12時間自動明暗サイクルとした。木製滅菌フレーク(ホワイトフレーク オリエンタル酵母社製)を敷いたプラスチックケージにて、1～4匹/ケージで飼育を行った。餌は CRF-1(オリエンタル酵母社製)を使用し、飲料水として水道水を使用した。餌、飲料水ともに自由摂食とした。

(3) 試薬

- ・ エタノール(99.5) (和光純薬、東京)
- ・ メチルセルロース (和光純薬、東京)
- ・ フェノールレッド (和光純薬、東京)
- ・ トリフルオロ酢酸 (和光純薬、東京)
- ・ 動物用ルテウム デポー(あすかアニマルヘルス、東京)

(4) 実験方法

1) 実験準備

既報³³⁾に準じ、実験前日より対象マウスを絶食させた。ただし、飲料水は自由摂取とした。

2) 試薬調整

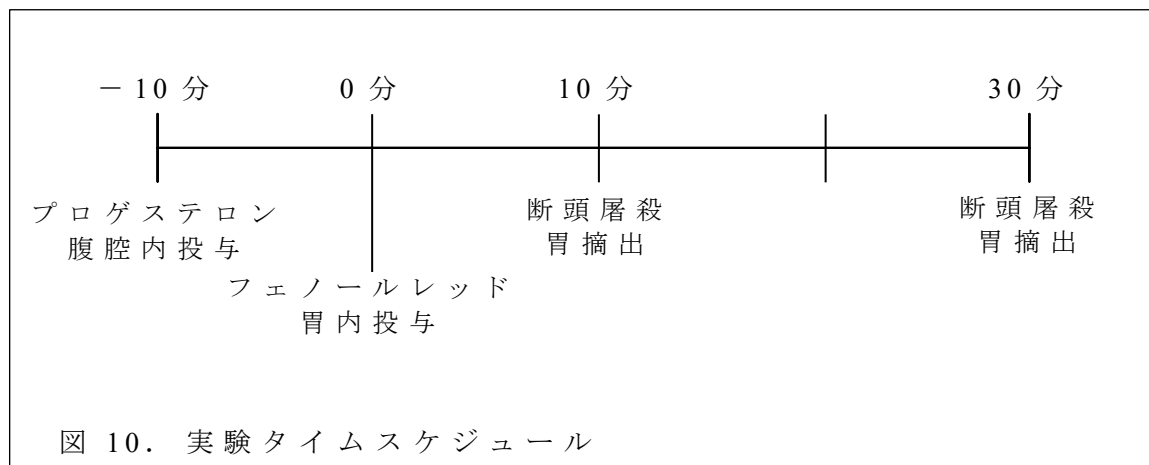
- ① 経口投与用対照(vehicle)フェノールレッド溶液：1.5%メチルセルロース液にフェノールレッド(1 mg/1ml)を溶解した。
- ② 経口投与用アルコール含有フェノールレッド溶液：エタノール 50%を含む 1.5%メチルセルロース液にフェノールレッド(1 mg/1ml)を溶解した。

3) 実験手順

- ① 東京家政大学 5号館動物実験室にて一晩絶食させたマウスの体重を測定した。
- ② マウスに、プロゲステロン 25、50 mg/kg B.W を腹腔内注射した。

③ 10 分後、マウスに上記の経口投与用調整溶液を、0.15ml 胃ゾンテを用いて投与した。

④ 投与直後(0 分)、10 分後、30 分後に断頭屠殺し、胃を取り出した(図 10)。



⑤ あらかじめ 0.1N NaOH 溶液 2.5ml を分注した 5ml チューブに胃を入れ、はさみで切断したのちホモジナイザーで 30 秒間粉碎した。

4)測定手順 (図 11)

① ホモジネートを 1 時間室温静置後、室温で 20 分間遠心分離 (2500rpm)を行った。

② 上清 100 μ L を別のチューブに取り、20%トリフルオロ酢酸 100 μ L を添加した。

③ 再度室温で 20 分間遠心分離(2500rpm)を行い、上清 100 μ L に 0.5N NaOH 1ml を添加した。

④ 1ml のサンプルに対し、ブランクを水とし、1ml のサンプル中に含まれるフェノールレッドの量を 500nm で吸光度を測定した。

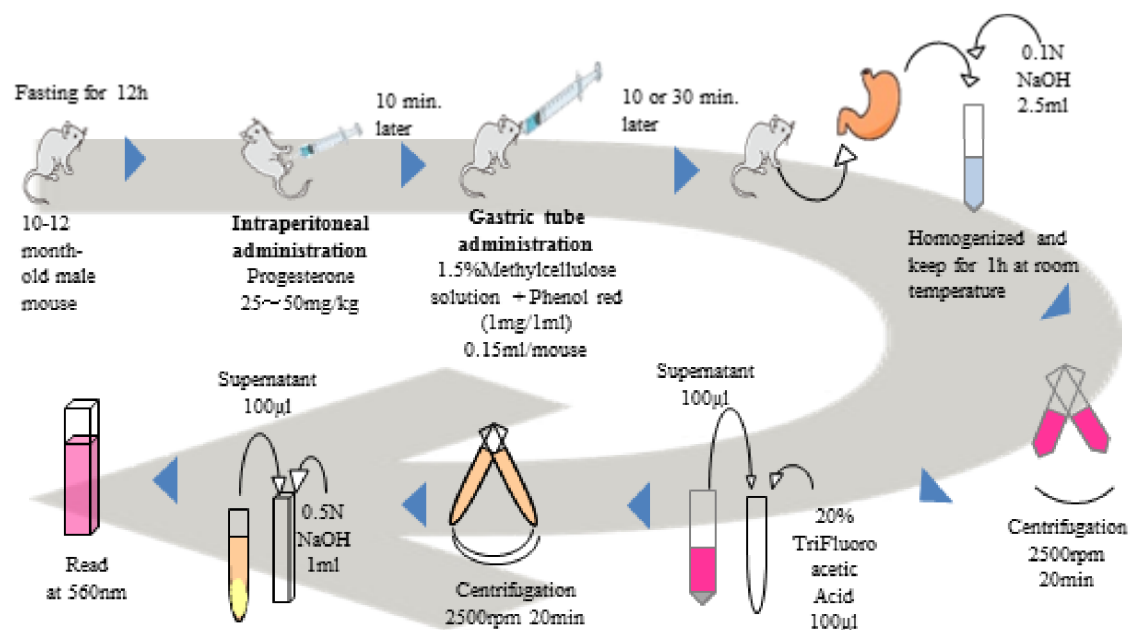


図 11. 実験プロトコル

5) 胃排出速度算出方法

胃排出速度：4)において測定した吸光度を以下の式に当てはめ、算出した。数字が大きいくほど、排出速度が速いことを示す。

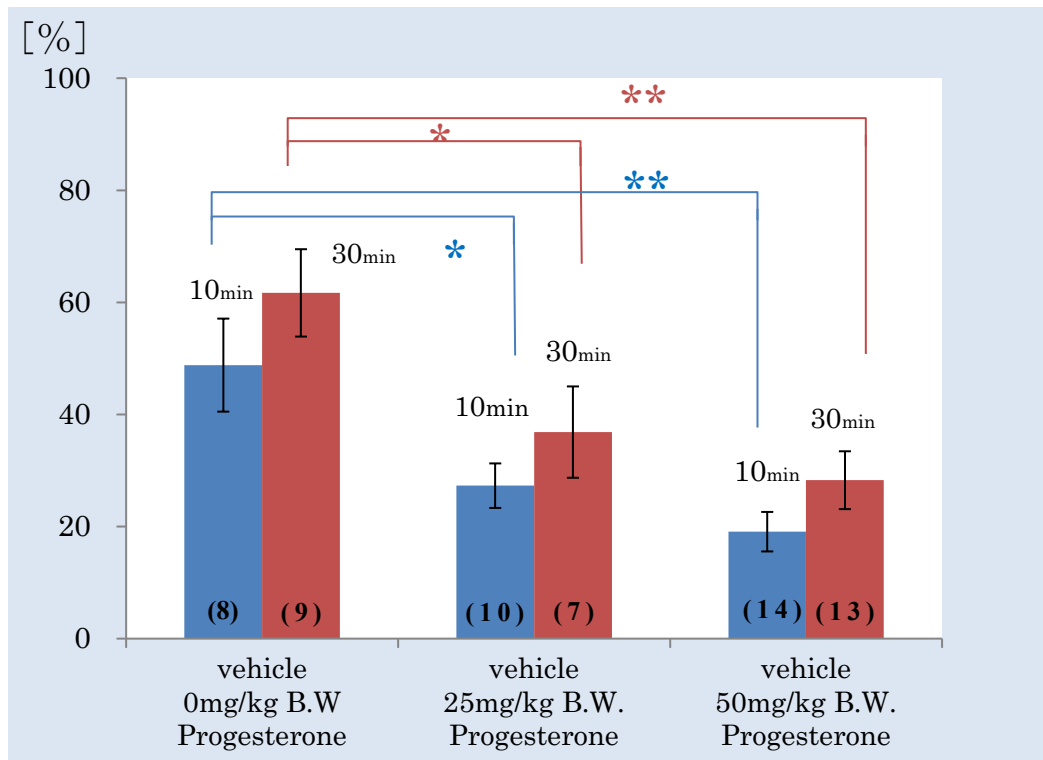
$$\text{Gastric Emptying} = 1 - \frac{\text{胃内のフェノールレッド回収量}}{\text{0分値の胃内のフェノールレッド回収量}} \times 100$$

3.結果

(1) 野生型雄マウスにおけるプロゲステロンの vehicle の胃排出速度に与える効果

実験に使用したマウスの平均体重 (mean±SE)は 27.4±0.2g (n=61)であり、群間に有意な差は見られなかった。

プロゲステロンは、10分値、30分値ともに、用量依存的に、vehicle の胃排出速度を抑制した (図 12)。



* : p<0.05、** : p<0.01

図 12. 野生型雄マウスの vehicle 投与時におけるプロゲステロンの効果

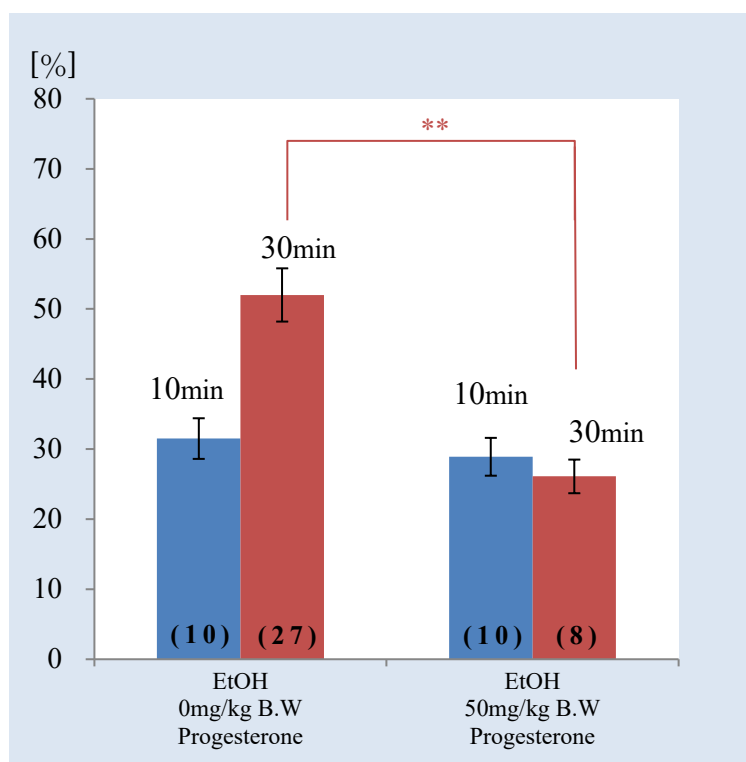
10min : [F(2,29) = 8.72, p = 0.001]

30min : [F(2,26) = 6.98, p = 0.004]

(2) 野生型雄マウスにおけるプロゲステロンのアルコールの胃排出速度に与える効果

実験に使用したマウスの平均体重 (mean±SE)は 30.1±0.8g (n=55)であり、群間に有意な差は見られなかった。

プロゲステロンは 50mg/kg B.W のみ検討した。アルコールの胃内投与は、vehicle の胃内投与より、値は低位(胃排出速度が遅延)を呈した(図 13)。プロゲステロンは、さらに胃排出速度を抑制し、30分値では著明に胃排出速度を抑制した。



** : p<0.01

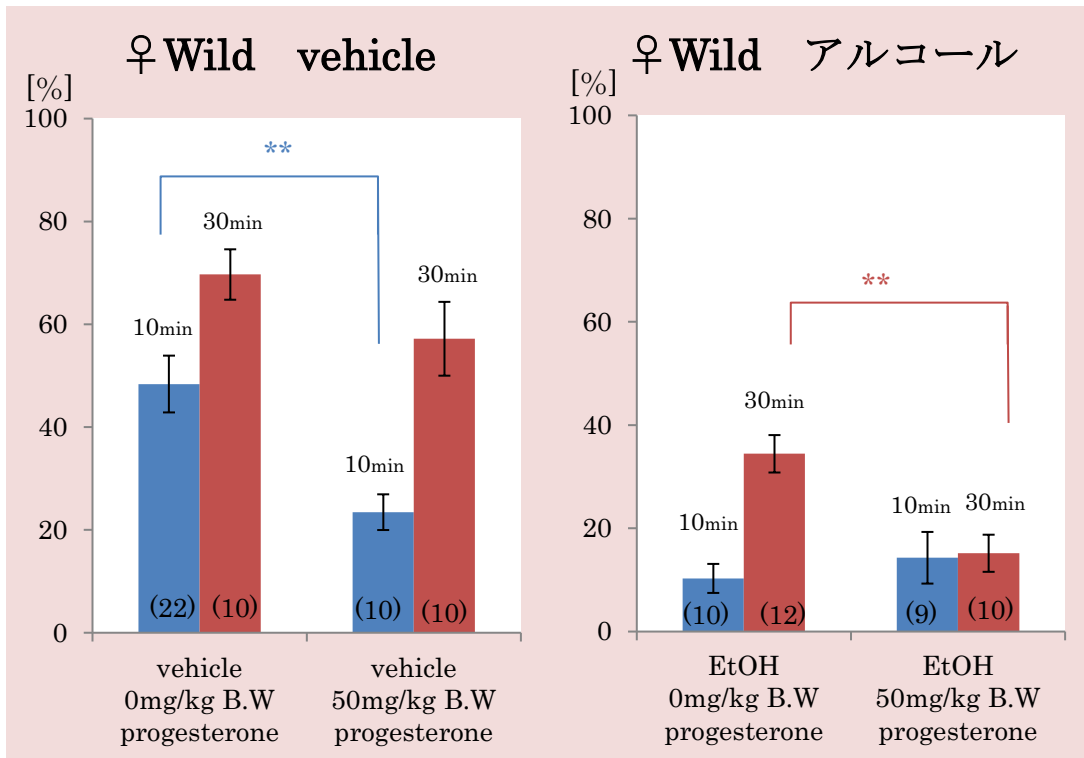
図 13. 野生型雄マウスのアルコール投与時におけるプロゲステロンの効果

30min: [F(1,34)= 13.04, p = 0.001],
(Progesterone 50mg/kg B.W : p = 0.001)

(3) 野生型雌マウスにおけるプロゲステロンの胃排出抑制効果

実験に使用したマウスの平均体重 (mean±SE) は vehicle :25.1±0.4g (n=52)、アルコール: 23.5±0.4g (n=41)であり、群間に有意な差は見られなかった。

プロゲステロンによる vehicle の胃排出速度は、10分値において有意な差がみられた [F(1,30)=8.441, p=0.007] (プロゲステロン 50mg/kg B.W : p= 0.007) (図 14)。一方、アルコールの胃排出速度は、10分値において有意な差は見られなかったものの、30分値において有意な差がみられた [F(1,20)=9.064, p = 0.007] (プロゲステロン 50mg/kg B.W : p= 0.007) (図 15)。



** : p<0.01

** : p<0.01

図 14.
野生型雌マウスの vehicle 投与時におけるプロゲステロンの効果

10min: [F(1,30)=8.441, p = 0.007] ,(Progesterone50mg/kg B.W : p = 0.007)

図 15.
野生型雌マウスのアルコール投与時におけるプロゲステロンの効果

30min: [F(1,20)=9.064, p =0.007] ,(Progesterone50mg/kg B.W : p = 0.007)

4. 考察

本実験の結果、野生型雄マウスにおいて、プロゲステロンは用量依存的に vehicle の胃排出速度を抑制した。このことから、プロゲステロンには、胃排出速度抑制効果があると考えることができた。

アルコールの胃内投与は、野生型雄マウスの胃排出速度を遅延させる³⁴⁾³⁵⁾。本実験では、アルコール投与時においても、プロゲステロンはさらに、アルコールの胃排出速度を有意に

遅延させた(図 13)。

雌マウスは、プロゲステロン投与によって vehicle の 10 分値、アルコールの 30 分値においてそれぞれ有意な胃排出抑制作用がみられた。

本実験では、経口投与するアルコールの濃度を雌雄とも 50% 統一して行ったが、雌マウスの方が雄マウスよりも、アルコールに対する抵抗性が低く¹⁶⁾、雄マウスと条件をそろえるためにはより低いアルコール濃度が適切であるという報告³⁵⁾もある。よって、雌マウスの結果に関しては今後の検討が必要ではあるが、雄マウスの結果と合わせて考えると、プロゲステロンには胃排出抑制効果があるといえる。

プロゲステロンの作用機序としては、以前から胆嚢平滑筋細胞膜に受容体があると考えられており³⁶⁾、また最近では、免疫組織染色により、膜型プロゲステロン受容体が正常なマウスには広く分布すること³⁷⁾、雌マウスの子宮、膀胱、十二指腸、空腸の平滑筋にプロゲステロン受容体が存在することも報告されている³⁸⁾。また魚類の生殖腺からプロゲステロンの膜受容体(G protein-coupled receptor : GPCR)が得られたという報告³⁹⁾⁴⁰⁾もある。この受容体は細胞膜上のプロゲステロン受容体(membrane progestin receptor; mPR)と名付けられ、卵成熟に関わるということが明らかになっている。

プロゲステロン受容体が、膜シグナル伝達分子である Src ファミリーチロシンキナーゼを活性化して、細胞内へシグナルを伝達するという報告⁴¹⁾があり、細胞膜でも作用するこ

とがわかってきた。また、プロゲステロンは GPCR の G タンパク (α) を低下させる⁴²⁾、カルシウムイオンの細胞内への流入を抑制するという報告⁴³⁾もある。プロゲステロンが CCK、CCK-1R の細胞内情報伝達を阻害した結果として、胃排出速度が抑制された可能性は、十分考えられる。

5. 結論

プロゲステロンは野生型マウスにおいて、vehicle 投与時も、アルコール投与時も胃排出を抑制した。

第III章 コレシストキニン(CCK)、コレシストキニン受容体(R)、コレシストキニン1受容体ノックアウト(KO)マウス

1. はじめに

アルコールの胃排出速度抑制効果は、CCK および CCK-1R を介して生じたと考えられるが、プロゲステロンは、アルコールの胃内投与によって抑制された胃排出速度を、さらに抑制したので、アルコールの作用機序とは別個の機序で生じたと考えられる。この点を確認するために、CCK-1RKO マウスを用いて検討することを計画した。

2. CCK、CCK-R について

(1) CCK について

CCK は消化管ホルモンであり、十二指腸や空腸の腸管内分泌細胞(EEC)である I 細胞から分泌される。同時に脳にも豊富に存在し、摂食抑制作用を呈する物質として最初に報告された神経ペプチドでもある。CCK の遺伝子構造は、ヒトでは 3 番染色体に存在し、115 アミノ酸のプレプロホルモンから 58、33、8 アミノ酸にプロセッシングされる。また、CCK と同様に古典的な消化管ホルモンであるガストリンと比較すると、C 末端の 5 つのアミノ酸が同一である、という特徴がある(図 16)。

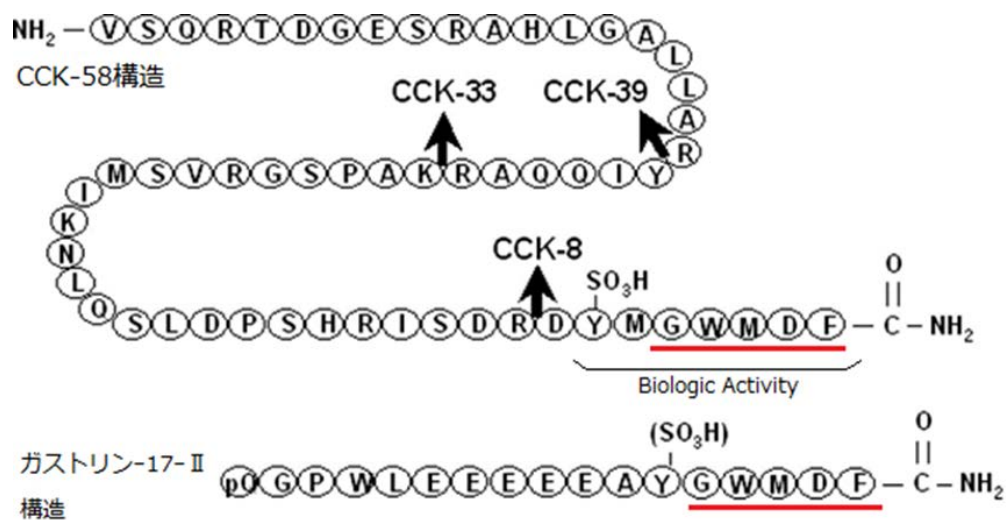


図 16. CCK とガストリンのアミノ酸配列

(文献 44 より引用)

消化管ホルモンとしての CCK は、胃からの脂肪酸流入などの刺激によって血中に分泌され、胆嚢収縮、膵外分泌を促す。げっ歯類では直接膵臓からの酵素分泌を促進するが、ヒトにおいては神経を介してアセチルコリンを分泌させ、膵臓からの酵素分泌を促している⁴⁴⁾。

神経ペプチドとしての CCK は、神経細胞で合成、放出される。脳全体に広く存在するが、特に大脳皮質、視床、海馬に豊富に存在している⁴⁵⁾。CCK は強力な摂食抑制作用を持つことが知られている。Gibbs らの報告によると、絶食させたラットに CCK を腹腔内投与した結果、短期間での摂食に対する阻害的役割を持つとされている⁴⁶⁾。その機序として、CCK は迷走神経を介して延髄へ情報を伝達し、大脳の摂食中枢へ作用を及ぼすことによって満腹感を感じることに関係していると考えられる⁴⁷⁾⁴⁸⁾。

(2) CCK-R について

CCK の受容体(R)には CCK-1R と CCK-2R の 2 種類が存在する。マウスでは CCK-1R は膵臓や胆嚢等に存在し、CCK-2R は主に胃や脳に存在する。また、CCK-2R はガストリン受容体と同一の遺伝子に由来する⁴⁹⁾。CCK-R は GPCR であり、CCK-1R はスルホン基を有する CCK に高い親和性を持つ(図 17)。ちなみに CCK-2R はスルホン基を持たない CCK に同等の親和性を持つ⁴⁴⁾。

CCK-1R の遺伝子配列はマウスでは 6 番染色体⁵⁰⁾、ラットでは 14 番染色体⁵¹⁾、ヒトでは 4 番染色体⁵²⁾に存在し、いずれも 5 つのエクソン、4 つのイントロンからなる(図 18)⁴⁴⁾⁵³⁾。

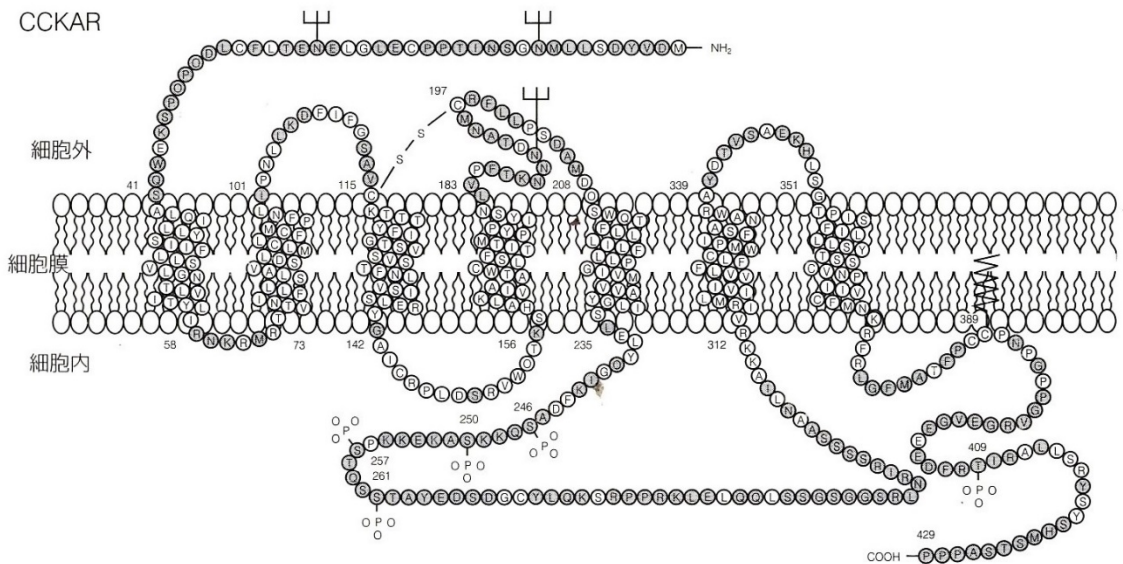


図 17. ヒト CCK-1R のアミノ酸構造(文献 [44]より引用)

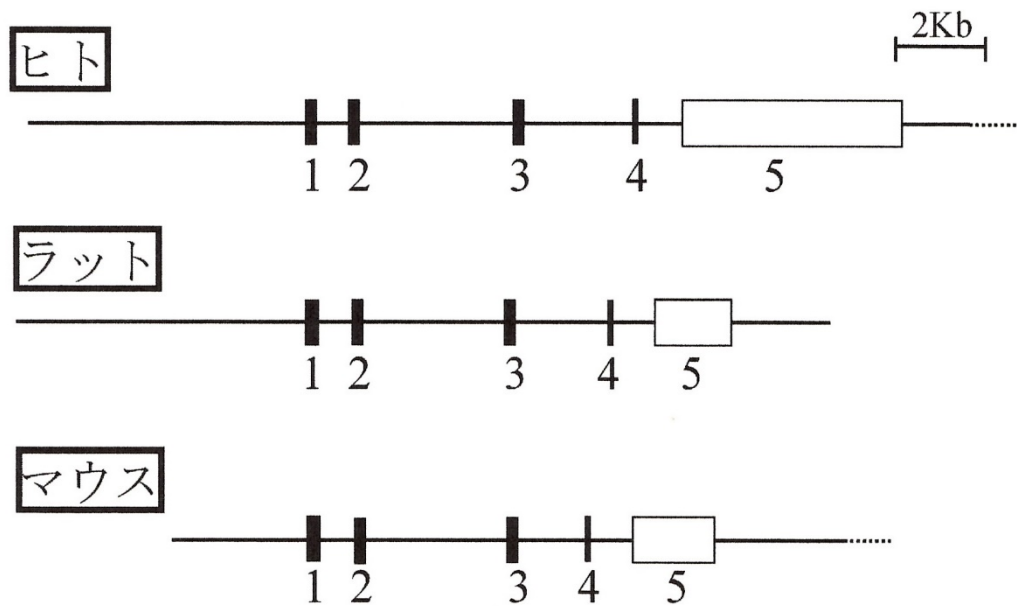


図 18. CCK-1R 遺伝子の構造比較(文献 53 より引用)

(3) CCK-1R の細胞内情報伝達

CCK-1R は 7 回膜貫通型 G タンパク連結型受容体 (G protein coupled receptor; GPCR) のひとつである。

GPCR の細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーとしては、カルシウムイオンと cAMP がある (図 19)。休止状態では G タンパクの α サブユニット ($G\alpha$) が GDP と結合し、 β , γ サブユニット ($G\beta\gamma$) とともに三量体を形成しているが、リガンドが結合することによって活性化すると α , β , γ からなるヘテロ三量体型 G タンパク質は GDP-GTP 交換反応によって GTP 結合型に変換される。 $G\alpha$ は GTP 結合し、 $G\beta\gamma$ は $G\alpha$ から切り出され、アデニル酸シクラーゼ (AC) やホスホリパーゼ C (PLC) を活性化する。

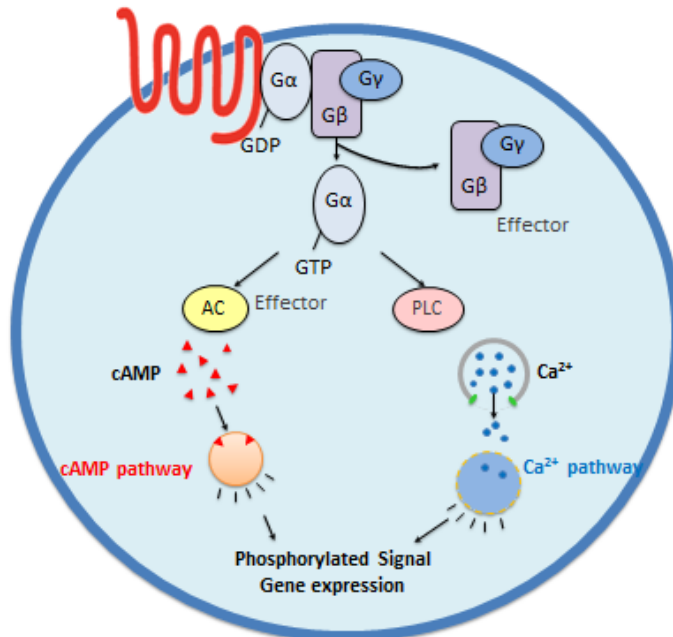


図 19. GPCR の細胞内情報伝達機序

CCK、CCK-1R の場合の情報伝達のセカンドメッセンジャーは、カルシウムイオンである。CCK が CCK-1R に結合すると、Gq(三量体 G タンパク)が活性化し、次いで PLC が活性化され、この酵素によってフォスフォイノシトール 2 リン酸(PIP_2)が分解されてイノシトール 3 リン酸(IP_3)とジアシルグリセロール(DAG)が生成される。 IP_3 はセカンドメッセンジャーである細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることで細胞の機能を発現する(図 20)。

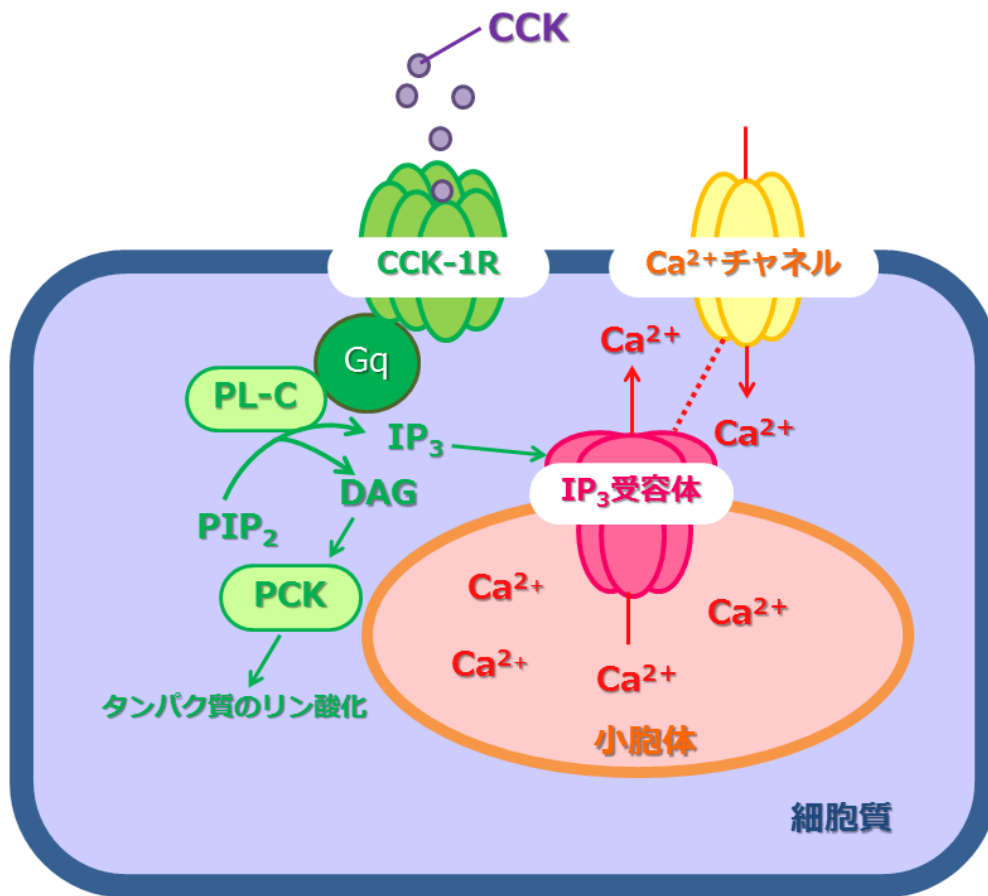


図 20. CCK-1R の細胞内情報伝達機序

(<http://bioupdate.jp:8080/pages/viewpage.action?pageId=14024799>

より一部改変)

(4) CCK の摂食抑制作用

胃排出速度と摂食は密接に関係しており、胃排出速度が速ければ摂食亢進、遅延すれば摂食抑制を起こす。胃内容物が小腸に流入すると脂肪酸などが刺激となって CCK が放出される⁵⁴⁾。一部は血中を循環し、胆嚢収縮などを生じさせるが、一部は胃や小腸に分布する迷走神経求心路末端の CCK-1R を介して迷走神経背側核を經由し胃排出速度を遅延させる。上

記のように、CCKはCCK-1Rを介して摂食を抑制する。実際、視床下部には食欲増進のグルコース感受性ニューロンおよびペプチド類(オレキシン、NPYなど)とは逆の、抑制効果をもたらすものとしてグルコース受容ニューロンおよびペプチド類の中にCCKも含まれている。これらの摂食調整因子が相互に作用し、摂食調整機構を形成していく(図21)。また動物の脳室内あるいは脳実質にCCKを投与すると、視床下部満腹中枢に対する直接作用により、摂食が抑制される⁴⁸⁾。

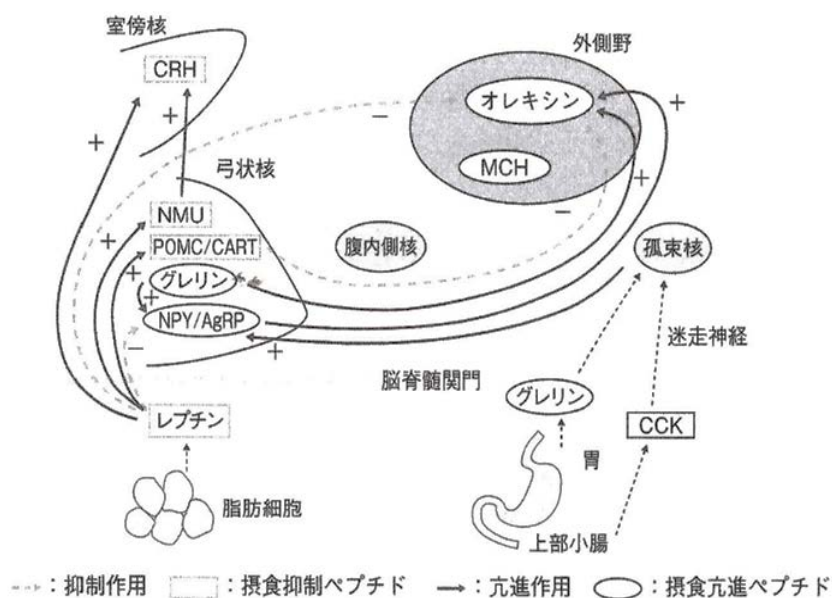


図 21. 神経ペプチドにおける摂食調節機構の概要
(文献 43 より引用)

(5) CCK-1RKO マウスについて

CCK-1RKO マウス(図 22)は、2002 年に C57BL/6J をバックグラウンドとして、作成された⁵⁵⁾。CCK-1R 遺伝子配列の一部を PCR 法により LacZ 遺伝子(大腸菌由来のガラクトシダーゼ遺伝子)に置き換え作成された。ストレス負荷後の過食、胆

石形成頻度の増加⁵⁶⁾などが認められてはいるが、通常の飼育では、外観、摂食量、体重変化、繁殖能力等は野生型マウスとかわらない¹⁶⁾。現在までに20代以上の継代交配の回数を重ね、CCK-1RKO マウス同士での繁殖ができるようになって



図 22. CCK-1RKO マウス

第IV章 プロゲステロンの作用機序-CCK-1RKO マウスにおいてプロゲステロンが胃排出速度に与える影響-

1.はじめに

第II章において、プロゲステロンは野生型マウスの胃排出速度を遅延させること、アルコールの経口投与によってすでに胃排出速度が遅延している場合でも、さらに胃排出速度を抑制することを示した。

アルコールの消化管内投与は CCK を放出する²¹⁾。また、CCK-1R を欠損するラットでは、アルコール投与によって膵外分泌が増加しない⁵⁷⁾。加えて、CCK による情報は、CCK-1R から迷走神経求心路を介して頸部神経節へと伝達され、延髄孤束核ニューロンを興奮させ、迷走神経遠心路を抑制し、アセチルコリン放出を制御することによって胃の平滑筋の運動を抑制している(図 23)と考えられている。従って CCK-1RKO マウスではアルコール投与によって胃排出速度が遅延しない³⁵⁾。プロゲステロンの作用機序が CCK、CCK-1R とは全く別個の機序を介して生じているのであれば、CCK-1RKO マウスにおいても、アルコールの胃排出速度を抑制できるはずである。

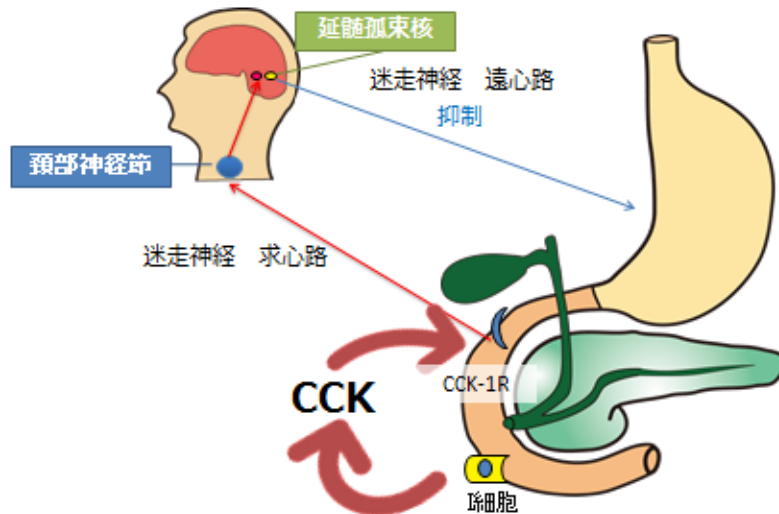


図 23. CCK による胃排出速度抑制の機序

2. 実験方法

本実験は、東京家政大学 DNA 委員会および動物実験委員会において承認された。

(1) 実験動物

第 III 章で示した CCK-1RKO マウス、10~12 ヶ月齢の個体を使用した。

(2) 飼育方法、(3) 実験方法は、第 II 章と同様である。

(4)実験群

胃内投与物と腹腔内注射の内容によって以下の4群に分け、それぞれの群で胃排出速度の10分値、30分値を算出した。

- ・胃内 vehicle 投与、プロゲステロン 0mg/kg B.W 群
- ・胃内 vehicle 投与、プロゲステロン 50mg/kg B.W 群
- ・胃内アルコール投与、プロゲステロン 0mg/kg B.W 群
- ・胃内アルコール投与、プロゲステロン 50mg/kg B.W 群

(5)試薬類は第II章と同様である。

(6)血中プロゲステロン濃度測定

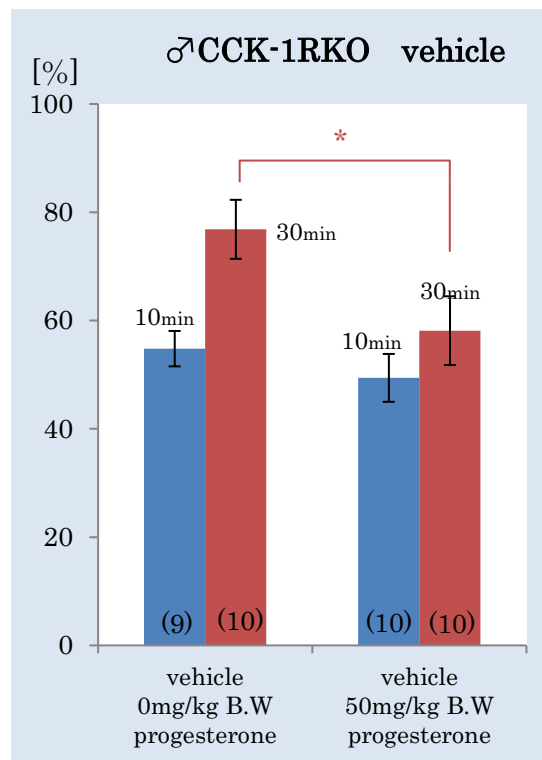
CCK-1RKO マウスにおいて、プロゲステロン 50mg/kg B.W を腹腔内注射 20 分後に断頭屠殺し、血液を EDTA 添加チューブに採取し、3000rpm、15 分遠心分離したのち、プロゲステロン濃度を測定した⁵⁸⁾。

3.結果

(1) CCK-1RKO 雄マウスにおけるプロゲステロンの vehicle の胃排出速度に与える効果

実験に使用したマウスの平均体重 (mean±SE)は 36.0±1.2g (n=39)であり、群間に有意な差は見られなかった。

CC-1RKO 雄マウスにおいて、プロゲステロンによる vehicle の胃排出速度は 30 分値において有意な差が見られ [F(1,18)=5.003, p = 0.038] 胃排出速度は有意に遅延した(プロゲステロン 50mg/kg B.W : p = 0.038) (図 24)。



* : p<0.05

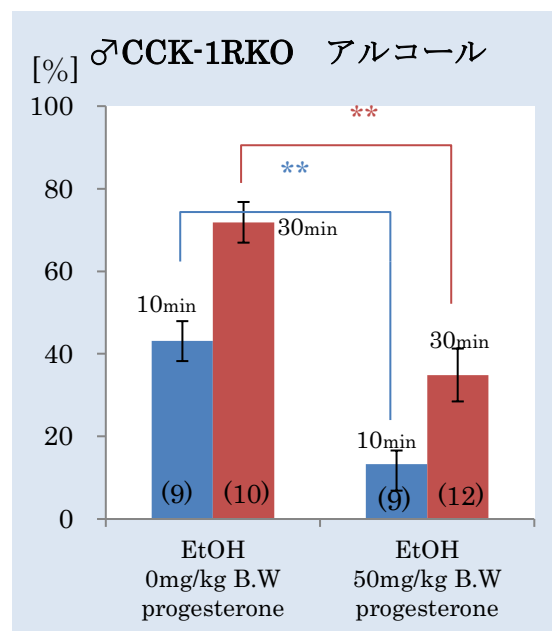
図 24. CCK-1RKO 雄マウスの vehicle 投与時におけるプロゲステロンの効果

30min : [F(1,18)=5.003, p = 0.038] ,
(Progesterone 50mg/kg B.W : p = 0.038)

(2) CCK-1RKO 雄マウスにおけるプロゲステロンのアルコールの胃排出速度に与える効果

実験に使用したマウスの平均体重 (mean±SE)は 35.0±1.1g (n=40)であり、群間に有意な差は見られなかった。

CCK-1RKO 雄マウスにおける、プロゲステロンによるアルコールの胃排出速度は 10 分値において有意な差がみられ [F(1,16)=26.65, p = 0.000]、胃排出速度は有意に遅延した(プロゲステロン 50mg/kg B.W : p=0.000)。30 分値においても同様の結果が得られ [F(1,20)= 19.64, p = 0.000] (プロゲステロン 50mg/kg B.W: p=0.000)、プロゲステロンは胃排出速度を抑制した (図 25)。



** : p<0.01

図 25. CCK-1RKO 雄マウスのアルコール投与時におけるプロゲステロンの効果

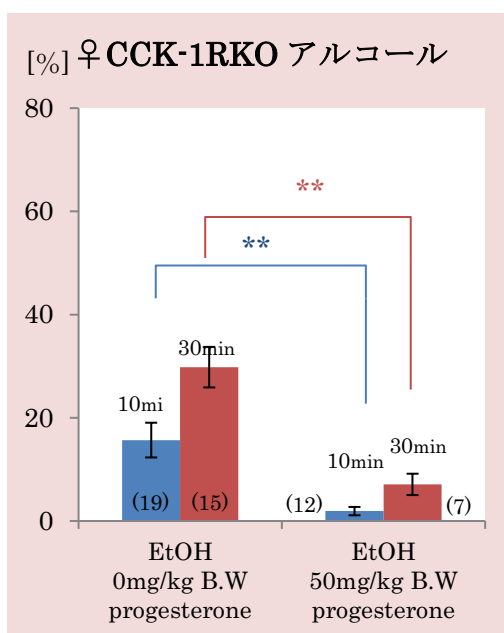
10min : [F(1,16)=26.65, p = 0.000] ,
(Progesterone 50mg/kg B.W : p = 0.000)

30min : [F(1,20)= 19.64, p = 0.000] ,
(Progesterone 50mg/kg B.W : p = 0.000)

(3) CCK-1RKO 雌マウスにおけるプロゲステロンのアルコールの胃排出速度に与える効果

実験に使用したマウスの平均体重 (mean±SE)は 26.9±0.6g (n=53)であり群間に有意な差はみられなかった。

CCK-1RKO 雌マウスにおいて、プロゲステロンによるアルコールの胃排出速度は 10 分値において有意な差がみられ [F(1,29)=10.19, p = 0.003]、胃排出速度は有意に遅延した(プロゲステロン 50mg/kg B.W : p=0.003)。30 分値においても同様の結果が得られ [F(1,20)= 14.40, p = 0.001] (プロゲステロン 50mg/kg B.W: p=0.001)、プロゲステロンは胃排出速度を抑制した(図 26)。



** : p<0.01

図 26. CCK-1RKO 雌マウスのアルコール投与時におけるプロゲステロンの効果

10min : [F(1,29)=10.19, p = 0.003] ,
(Progesterone 50mg/kg B.W: p=0.003)
30min : [F(1,20)= 14.40, p = 0.001] ,
(Progesterone 50mg/kg B.W: p=0.001)

(4) プロゲステロンの血中濃度

実験に使用した雄マウスの平均体重 (mean±SE) は 27.3±0.4g(n=11)であった。

血中濃度は 46.5±3.9ng/mL (n=11)であった。

4. 考察

CCK-1RKO 雄マウスではアルコール投与によって胃排出の遅延が認められない³⁵⁾が、本実験においても胃排出の遅延は認められなかった。そして、プロゲステロンはさらに強い胃排出抑制効果を示した。同様に、CCK-1RKO 雌マウスにおいても、プロゲステロンはアルコールの胃排出速度を有意に遅延させた。これらの結果より、プロゲステロンは CCK, CCK-1R とは別個に独立して胃排出抑制作用を出現させていることが証明された。

プロゲステロンをはじめとするステロイドホルモンは、標的遺伝子の発現調節を行うゲノミック作用を呈する反応の他、膜受容体を介し、遺伝子発現調節を伴わない、数分以内の速い作用が特徴のノンゲノミック作用も持っている。

ゲノミック作用は、細胞質内にある受容体がステロイドと結合し、複合体が核内に移動して遺伝子内にあるステロイドの特異的エレメントに接合し、遺伝情報の転写を促進して最終的にタンパク質合成を行う。その応答には数時間単位での時間が必要であるので、ゲノミック作用による平滑筋の収縮抑制は説明が非常に難しい。しかし、プロゲステロンによる胃排出抑制作用がノンゲノミック作用によるものだったと仮

定すると、以下の機序が考えられる。

ひとつは、プロゲステロン受容体 (Progesterone Receptor : PR) が Src ファミリーチロシンキナーゼ (SFK) を介して相互作用し、ノンゲノミック作用を引き起こした可能性である。SFK は膜シグナル伝達分子である非受容体型チロシンキナーゼ Src と構造的な類似性を示す一群のチロシンキナーゼであり、現在 9 種が同定されている。PR が SFK を活性化し、細胞内へシグナルを伝達するという報告⁴¹⁾があり、活性化の条件としてリガンドの存在が必須であると報告されている。プロゲステロンがリガンドとなり PR と SFK を活性化させた結果として、細胞内の情報伝達が阻害され、胃の平滑筋収縮を抑制した可能性がある。

もうひとつはプロゲステロンの膜受容体発現の可能性である (図 27)。

2002 年にプロゲステロンの膜受容体 (membrane progestin receptor : mPR) が魚類の卵巣から発見され⁴⁰⁾その後ヒトやその他の脊椎動物においても 3 種類の mPR (mPR α 、mPR β 、mPR γ) が同定された⁵⁹⁾。また mPR は新規 GPCR であること⁶⁰⁾、哺乳動物において脳や心臓、腎臓などでも発現している⁶¹⁾ことが報告されている。

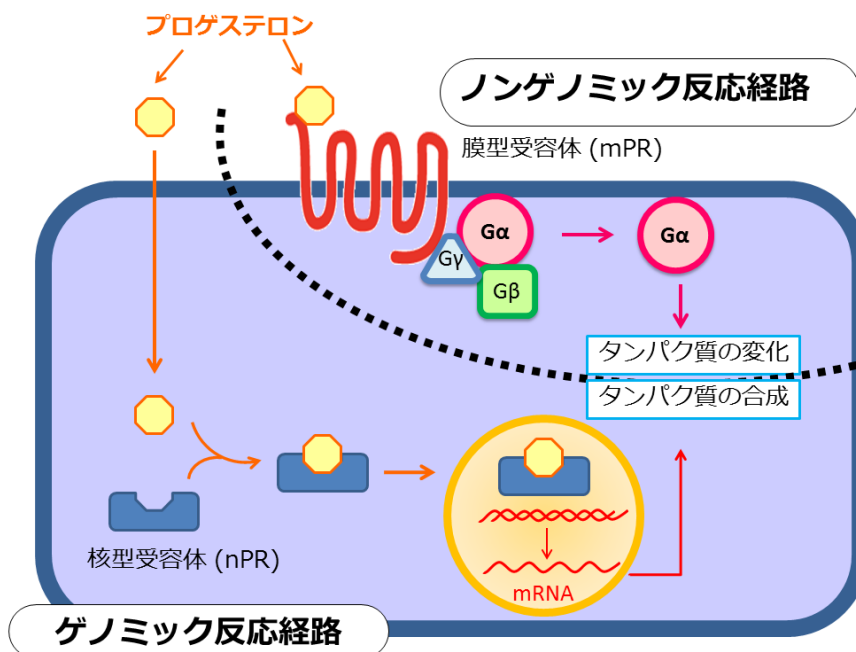


図 27. プロゲステロンの膜受容体によるノンゲノミック反応経路

これらの膜受容体によって、今まで説明が難しかったステロイドホルモン(プロゲステロン)による平滑筋の収縮抑制について、ノンゲノミック作用によって惹起されている可能性が考えられるようになった。

ヒト血中プロゲステロン濃度は、黄体期で 5.7~28.0ng/ml (<http://medical-checkup.info/article/42660226.html>) とされており、今回投与したプロゲステロン量としては、ヒト体内で起こり得る血中濃度の上昇をもたらしたと考えられる。

上記の機序については不明点も多く、今後これらの可能性を含めて、プロゲステロンの胃排出抑速度抑制効果には更なる検証が必要である。

5. 結論

プロゲステロンは CCK-1RKO 雄マウスにおいて、強い胃排出抑制効果を示した。同様に、CCK-1RKO 雌マウスにおいても、プロゲステロンはアルコールの胃排出速度を有意に遅延させた。従って、プロゲステロンは CCK, CCK-1R とは別個に独立して胃排出抑制作用を出現させていることが証明された。

総括

第I章～II章、第IV章の実験結果をまとめると次のようになる。

第I章では、成人女性を対象として、性周期(卵胞期、黄体期)と胃排出速度との関係を明らかにするため、水またはウオッカを飲用した際の胃排出速度を調べた。卵胞期では男性と同様、ウオッカの胃排出速度は水よりも遅延していた。しかし黄体期においては、ウオッカは胃排出速度を遅延させなかった。黄体期には何らかの影響により全体的な胃排出抑制が生じており、その結果アルコールの胃排出遅延が表面化されなかった可能性が考えられた。

黄体期に特異的なものとして、プロゲステロンの体内濃度の増加がある。そこで、第II章においてプロゲステロンの胃排出抑制効果の検討を計画した。

第II章では、プロゲステロンの胃排出抑制効果について明らかにするため、野生型マウスを用いて水、50%アルコールの胃排出速度の測定を行った。結果として野生型雄マウスにおいて、プロゲステロンは用量依存的に vehicle(水)の胃排出速度を抑制した。このことから、プロゲステロンには、胃排出速度抑制効果があると考えることができた。アルコールの投与は野生型雄マウスの胃排出速度を遅延させる。本実験のアルコール投与の結果においてもアルコールは水と比較して胃排出速度を遅延させ、プロゲステロンはアルコールの胃排出

速度をさらに遅延させた。

また、野生型雌マウスにおいては、プロゲステロン投与によって vehicle の 10 分値、アルコールの 30 分値においてそれぞれ有意な胃排出抑制作用が見られ、プロゲステロンには胃排出抑制効果があることが確認された。

第IV章では、プロゲステロンの持つ胃排出抑制効果の機序について明らかにするため、CCK-1RKO マウスを用いた実験を行った。CCK は CCK-1R を介して消化管ホルモンとして作用し、胃排出抑制効果を持つ。そこで、プロゲステロンによる胃排出抑制の機序が、CCK、CCK-1R と関係しているのか否かを確認することを目的に実験を行った。その結果 CCK-1RKO 雄マウスにおいて、プロゲステロンはアルコールの胃排出速度を有意に遅延させた。CCK-1RKO 雄マウスではアルコール投与によって胃排出の遅延が認められないが、プロゲステロンは、アルコールの胃排出速度を抑制した。CCK-1RKO 雌マウスにおいてもプロゲステロンはアルコールの胃排出速度を有意に抑制した。従って、プロゲステロンによる胃排出抑制効果は、CCK、CCK-1R とは無関係に、独立して胃排出速度を抑制していることが証明された。

本研究はマウスを対象としており、必ずしもヒトに当てはまるとは限らない。しかし、アルコールの胃排出速度は男女で差があり、女性では性周期によっても差が見られること、性ホルモンのひとつであり、食欲亢進に働くと報告されてい

るプロゲステロンは女性の性周期への作用以外に、特に胃内容物排出の速度を遅延させていることが本研究により明らかになった。このことは、今後ますます盛んになっていくであろう、性差の研究の一助となるのではないかと考えている。

引用文献

- 1) 駒井三千夫．味覚受容と食欲の生理学．消化と吸収 37(3):154-160, 2014.
- 2) 河村菜実子、勝浦五郎、乾明夫．食欲の神経内分泌性調節．消化と吸収 37(3):161-164, 2014.
- 3) **Inamori M, Iida H, Endo H, Hosono K, Akiyama T, Yoneda K, Fujita K, Iwasaki T, Takahashi H. Yoneda M, Goto A, Abe Y, Kobayashi N, Kubota K, Nakajima A.** Aperitif effects on gastric emptying, A crossover study using concontinuous real-time ¹³C breath test (Breath ID System). Dig Dis Sci 54:816-818, 2009.
- 4) **Franke A, Teyssen S, Harder H, Singer MV.** Effect of ethanol and some alcoholic beverages on gastric emptying in humans. Scan J Gastroenterol 39:638-644, 2004.
- 5) 秋本紗恵子、宮坂京子．内蔵脂肪症候群の形成に關与する社会的性差（飲酒習慣）と生物学的性差の重要度の比較検討．健康医科学 第 24 回健康医科学研究助成論文集:31-36, 2009.
- 6) **Franke A, Nakchbandi IA, Schneider A, Harder H, Singer MV.** The effect of ethanol and alcoholic beverages on gastric emptying of solid meals in humans. Alco Alco 40:187-193, 2005.
- 7) **Hainrich H, Goetze O, Menne D, Iten PX, Fruehauf H, Vavricka SR, Schwizer W, Fried M, Fox M.** Effect on gastric function and symptoms of drinking wine, black tea, or

- schnapps with a Swiss cheese fondue: randomized controlled crossover trial. *BMJ* 341:c6731, 2010.
- 8) **Sekime A, Horikoshi M, Funakoshi A, Miyasaka K.** Sex difference in the effects of alcohol on gastric emptying in healthy volunteers, A study using the ^{13}C breath test. *Biomed Res* 34:275–280, 2013.
 - 9) **Ghoos YF, Maes BD, Geypens BJ, Mys G, Hiele MI, Rutgeerts PJ, Vantrappen G.** Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. *Gastroenterology* 104:1640-1647, 1993.
 - 10) 中田浩二、川崎成朗、仲吉朋子、羽生信義、柏木秀幸、矢永勝彦. ^{13}C 呼気ガス診断の臨床応用-その現状と展望-. *RADIODOTOPES* 56:629-636, 2007.
 - 11) アルコール保健指導マニュアル研究会. 健康日本 21 推進のためのアルコール保健指導マニュアル. 社会保険研究所:11-12, 2003.
 - 12) アルコール保健指導マニュアル研究会. 健康日本 21 推進のためのアルコール保健指導マニュアル. 社会保険研究所:18-19, 2003.
 - 13) **Li TK, Beard JD, Orr WE, Kwo PY, Ramchandani VA.** Gender and ethnic differences in alcohol metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 22:771-772, 1998.
 - 14) アルコール保健指導マニュアル研究会. 健康日本 21 推進のためのアルコール保健指導マニュアル. 社会保険研究所:85-86, 2003.

- 15) 佐藤洋美、上野光一. 薬物代謝における性差. *ファルマシア* 47(3):218-222, 2011.
- 16) 関目綾子、堀越美祐紀、宮坂京子、滝口総一、船越顕博. 食事誘導性肥満に対する生物学的性差の影響. *消化と吸収* 34:472-476, 2011
- 17) **Kline L, Karpinski E.** A comparison of the effects of various sex steroids on cholecystokinin- and KCL-induced tension in female guinea pig gallbladder strips. *Gen Comp Endocrinol* 185:37-43, 2013.
- 18) **Wald A, Van Thiel DH, Hoechstetter L, Gavalier JS, Egler KM, Verm R, Scott L, Lester R.** Gastrointestinal transit: the effect of the menstrual cycle. *Gastroenterology* 80(6):1497-1500, 1981.
- 19) **Horowitz M, Dent J, Fraser R, Sun W, Hebbard G.** Role and integration of mechanisms controlling gastric emptying. *Dig Dis Sci* 39:S7-13, 1994.
- 20) **Miyasaka K, Kanai S, Ohta M, Kawanami T, Kono A, Funakoshi A.** Lack of satiety effect of cholecystokinin (CCK) in a new rat model not expressing the CCK-A receptor gene. *Neuroscience Letters* 180(2):143-146, 1994.
- 21) **Liddle RA, Goldfine ID, Williams JA.** Bioassay of plasma cholecystokinin in rats: effects of food, trypsin inhibitor, and alcohol. *Gastroenterology* 87:542-549, 1984.
- 22) **Caballero-Plasencia AM, Valenzuela-Barranco M, Martin-Rutz H, Herreias-Gutierrez JM, Esteban-**

- Carretero JM.** Are there changes in gastric emptying during the menstrual cycle? *Scand J Gastroenterol* 34:772-776, 1999.
- 23) **Degen LP, Phillips SF.** Variability of gastrointestinal transit in healthy women and men. *Gut* 39:299-305, 1996.
- 24) **Gill RC, Murphy PD, Hooper HR, Bowes KI, Kingma YJ.** Effects of the menstrual cycle on gastric emptying. *Digestion* 36:168-174, 1987.
- 25) **Horowitz M, Maddern GJ, Chatterton BE, Collins PJ, Petrucco OM, Seamark R, Shearman DJ.** The normal menstrual cycle has no effect on gastric emptying. *Br J Obstet Gynaecol* 92:743-746, 1991.
- 26) **Kamm MA, Farthing MJG, Lennard-Jones JE.** Bowel function and transit rate during the menstrual cycle. *Gut* 30:605-608, 1989.
- 27) **Jung HK, Kim DY, Moon I.H.** Effects of gender and menstrual cycle on colonic transit time in healthy subjects. *The Korean J Int Med* 18:181-186, 2003.
- 28) **Kaibara N, Kobori A, Sekime A, Miyasaka K.** The menstrual cycle influences the gastric emptying of alcohol. *Biom Res* 36:411-415, 2015.
- 29) **Wang F, Zheng TZ, Li W, Qu SY, He DY.** Action of progesterone on contractile activity of isolated gastric strips in rats. *World J gastroenterol* 9:775-778, 2003.
- 30) **Kline LW, Karpinski E.** Progesterone inhibits gallbladder

- motility through multiple signaling pathways. *Steroids* 70(9):673–679, 2005.
- 31) **Heinemann A, Pieber D, Holzer P.** Inhibition by female sex steroids of peristalsis in the guinea pig small intestine. *Digestion* 65:213-219, 2002.
- 32) **Cheng L, Biancani P, Behar J.** Progesterone receptor A mediates VIP inhibition of contraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298:G433-439, 2010.
- 33) **Miyasaka K, Ohta M, Kanai S, Yoshida Y, Sato N, Nagata A.** Enhanced gastric emptying of a liquid gastric load in mice lacking cholecystinin-B receptor: a study of CCK-A,B, and AB receptor gene knockout mice. *J Gastroenterol* 39(4):319-323, 2004.
- 34) 小堀 絢世、貝原奈緒子、船越 顕博、宮坂京子．雌マウスにおける胃排出速度抑制効果．*消化と吸収* 38:217-220,2016.
- 35) 小堀 絢世．胃排出速度の雌雄差．東京家政大学 学位論文, 2016.
- 36) **Daignault PG, Fazekas AG, Rosenthal L, Fried GM.** Relationship between gallbladder contraction and progesterone receptors in patients with gallstones. *Am J Surg* 155:147-151, 1988.
- 37) **You S, Zuo L, Varma V.** Broad tissue expression of membrane progesterone receptor. *J Mol Hist* 41:101–110, 2010.
- 38) **Uotinen N, Puustinen R, Pasanen S, Manninen T, Kivineva M, Syvala H, Tuochimaa P, Ylikomi T.** Distribution of

- progesterone receptor in femal mouse tissues. *Gen Comp Endocrinol* 115:429-441, 1999.
- 39) **Kovacs WJ , Ojeda SR.** Textbook of Endocrine Physiology Sixth edition. Oxford Univ. Press, 2011.
- 40) **Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P.** Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(5):2231–2236, 2003.
- 41) **Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP.** Progesterone Receptor Contains a Proline-Rich Motif that Directly Interacts with SH3 Domains and Activates c-Src Family Tyrosine Kinases. *Mol Cell* 8(2):269-280, 2001.
- 42) **Xiao ZL, Pricolo V, Biancani P, Behar J.** Role of Progesterone Signaling in the Regulation of G-Protein. *Gastroenterology* 128(3):667-675, 2005.
- 43) **Burger K, Fahrenholz F, Gimpl G.** Non-genomic effects of progesterone on the signaling function of G protein-coupled receptors. *FEBS Lett* 464:25-29, 1999.
- 44) 宮坂京子、船越顕博．消化管生理活性ペプチドの最新知見 CCK. *G.I. Research* 16(4):294-298, 2008.
- 45) 宮坂京子、船越顕博．栄養代謝制御におけるコレシストキニン(CCK)の役割—CCKの食欲作用とその機序、栄養代謝制御における生理的役割．*臨牀消化器内科* 28(6):713-

718, 2013.

- 46) **Gibbs J, Young. RC, Smith. GP** Cholecystokinin Decreases Food Intake in Rats. *Obesity Research* 5(3):284-290, 1997.
- 47) **Calissendorff J, Danielsson O, Brismar K, Röjdmarm S.** Alcohol ingestion does not affect serum levels of peptide YY but decreases both total and octanoylated ghrelin levels in healthy subjects. *Metabolism* 55(12):1625-1629, 2006.
- 48) **Kopin AS, Mathes WF, McBride EW, Nguyen M, Al-Haider W, Schmitz F, Bonner-Weir S, Kanarek R, Beinborn M.** The cholecystokinin-A receptor mediates inhibition of food intake yet is not essential for the maintenance of body weight. *J Clin Invest* 103(3):383–391, 1999.
- 49) **Williams JA.** Gastrin and CCK Share a Common Receptor. *New In Physiological Sciences* 8:101, 1993.
- 50) **Takata Y, Takiguchi S, Kataoka K, Funakoshi A, Miyasaka K, Kono A.** Mouse cholecystokinin type-A receptor gene and its structural analysis. *Gene* 187(2):267-271, 1997.
- 51) **Takiguchi S, Takata Y, Funakoshi A, Miyasaka K, Kataoka K, Fujimura Y, Goto T, Kono A.** Disrupted cholecystokinin type-A receptor (CCKAR) gene in OLETF rats. *Gene* 197(1-2):169-175, 1997.
- 52) **Funakoshi A, Miyasaka K, Matsumoto H, Yamamori S, Takiguchi S, Kataoka K, Takata Y, Matsusue K, Kono A, Shimokata H.** Gene structure of human cholecystokinin (CCK) type-A receptor: body fat content is related to CCK

- type-A receptor gene promoter polymorphism. *FEBS Lett* 28;466(2-3):264-266, 2000.
- 53) 宮坂 京子, 船越 顕博. 老化促進因子の発症機序の解明-
ことに肥満, 成人型糖尿病の発症と行動異常とコレシス
トキニン (CCK) -A-レセプター遺伝子異常の関連. *日本老
年医学会雑誌* 36(2):90-94, 1999.
- 54) **Beglinger C, Degen L.** Fat in the intestine as a regulator of
appetite-role of CCK. *Physiol Behav* 83(4):617-621, 2004.
- 55) **Takiguchi S, Suzuki S, Sato Y, Kanai S, Miyasaka K, Jimi
A, Shinozaki H, Takata Y, Funakoshi A, Kono A, Minowa
O, Kobayashi T, Noda T.** Role of CCK-A receptor for
pancreatic function in mice: a study in CCK-A receptor
knockout mice. *Pancreas* 24(3):276-283, 2002.
- 56) **Sato N, Miyasaka K, Suzuki S, Kanai S, Ohta M, Kawanami
T, Yoshida Y, Takiguchi S, Noda T, Takata Y, Funakoshi A.**
Lack of cholecystokinin-A receptor enhanced gallstone
formation: a study in CCK-A receptor gene knockout mice.
Dig Dis Sci 48(10):1944-1947, 2003.
- 57) **Miyasaka K, Kanai S, Ohta M, Hosoya H.** Stimulatory effect
of ethanol on pancreatic secretion in conscious rats requires
CCK-A-receptor. *Pancreas* 30:e22-28, 2005.
- 58) 石井善昭、沖田智、鳥飼真、尹順子. 液体クロマトグラフ
イー・タンデム質量分析法による環境水中のエストロゲン
の定量. *分析化学* 49:753-758, 2000.
- 59) **Zhu Y, Bond J, Thomas P.** Identification, classification, and

partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. Proc Natl Acad Sci USA 100(5):2237–2242, 2003.

60) **Tang YT, Hu T, Arterburn M, Boyle B, Bright JM, Emtage tage PC, Funk WD.** PAQR proteins : a novel membrane receptor family defined by an ancient 7 -trans membrane pass motif. J Mol Evol 61:3723-3780, 2005.

61) **Dressing GE, Goldberg JE, Charles NJ, Schwertfeger KL, Lange CA.** Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues; a review of regulation and physiological implications. Steroids 76(1-2):11-17, 2011.

謝辞

東京家政大学 生理学研究室 宮坂京子教授には研究の遂行と論文の取りまとめに際し、大変丁寧な御指導・御鞭撻を賜りました。心より感謝申し上げます。

研究に際し、様々な方面から補助をしてくださった、生理学研究室 小堀絢世さんに御礼申し上げます。