日平滑筋誌 (Jap. J. Smooth Muscle Res.), 2, 99-104, 1966.

平滑筋機能に関する研究 (第1報)

胆汁排出促進薬の生物学的検定法

富山大学薬学部 薬品作用学教室

木村正康・加賀美 壮一

BIOASSAY FOR THE CHOLEKINETICS IN DOMESTIC PIG

Masayasu KIMURA and Sōichi KAGAMI

Department of Chemical Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical
Sciences, University of Toyama, Toyama

Bioassay for the cholekinetics was established with the domestic pigs, separating into the effects of the contraction of the gallbladder and of the relaxation of the sphincter of Oddi.

The contraction of the gallbladder was estimated with Magnus method. The potency of the relaxation of the sphincter of Oddi was estimated by the relaxation of the common bile-duct and by the number of drops through the sphincter before and after the administration of drug.

According to this method of assay described above, it was demonstrated that $MgSO_4$, pilocarpine, peptone, papaverine and desoxycholate gave rise to the relaxation of the sphincter of Oddi, but atropine had almost no response.

緒

利胆薬は胆汁分泌促進薬と胆汁排出促進薬とに作用機序によって区別されているが、これまで、主として胆汁分泌性利胆薬が研究対象になり、従って利胆薬の代表になって来た。一方、胆汁排出性利胆薬は胆石症の直接的治療の目的や所謂胆汁の腸肝循環における生理学的意義が極めて高い¹⁾にも拘らず、特異的な薬物は殆んどなく研究が等閑視されていた。一般薬物としては、胆汁排出作用機序に従って、(1)胆嚢内圧の亢進による胆道内圧の上昇を来すもの(Pilocarpine)、(2)胆嚢内圧の亢進と、十二指腸やOddi括約筋の緊張・収縮を低下させるもの(ペプトン類)、(3)十二指腸の緊張・収縮の低下とOddi括約筋の開口によるもの(硫酸マグネシウム)に分類されているにすぎない。特異的な胆汁排出促進薬の探索研究がおこなわれている理由は、その作用効力の定量的測定法が確立されていないためと考え、本研究では排出性利胆薬のbioassayを目的として、着手した。

最近、電気生理学的方法でMashima³⁾が胆嚢収縮作

言

用を、田中⁴⁾が総胆管末端部流出作用を検討している事実から明らかなように、現在、胆汁排出作用の生理は決定的な結論を得るに至っていない。特にOddi括約筋の存在も確認されていない、収縮作用に関して十二指腸との関連も、更には胆嚢収縮との協調関係も、諸研究者の一致した結論を得ていない。しかし、胆嚢収縮作用についてはIvy⁵⁻⁷⁾らの詳しい研究があり、Oddi括約筋弛緩作用についてもWewalka⁸⁾、Crema^{9,10)}らの研究があるので、胆汁排出促進作用を胆嚢収縮作用と括約筋弛緩作用とに大別して、それぞれのbioassayを検討した。

Bioassayに用いる動物は、胆嚢はモルモットを用いたが、Oddi括約筋では総胆管が比較的大きい標本であることが実験上有利になる。Crema⁹⁾らは仔牛を用いているが、著者らは略々均一標本が入手できる可能性を考え、屠殺場で処理された食用の豚の総胆管を用いて、充分実験材料になりうることを明らかにした。

実 験 方 法

1. 胆嚢収縮の測定

モルモット(雄、約450g 雑系)の胆嚢をラセン状に切

り取った切片を用いて、Magnus法(10ml, 30°C)に準じた。栄養液はTyrode液を使用した。

測定には、約 40 分間隔で一定濃度の薬物を投与し、反応性、感受性を一定にした標本を用いた。一定標本になるには、胆嚢切片を反応槽内につるした後、8~9 時間を必要とする。

II. Oddi 括約筋弛緩の測定

屠殺場で電激ショックにより処理されたヨークシャー・ランドレース交配雑種、一部ヨークシャー種のブタ(雄、約 90 kg) の総胆管を十二指腸壁内部分まで含めて、約 3 cm の長さに摘出し、周囲の脂肪を剝離し、更に胆管内の粘液性物質もほぼ完全に除去したものを標本

図 1. 総胆管の収縮・弛緩状態の描記(上段), と, Oddi 括約筋開口による流出量の drop 数の頻度(中段)を同時に描記できる装置(下段は時刻).

実 験 結 果

I. 胆嚢収縮反応の定量化

モルモット胆嚢の収縮反応を定量化する目的で、平滑筋収縮性薬物である Acetylcholine (ACh), Histamine (His), 塩化バリウム (BaCl_2) についてその反応性を検討した。各薬物の反応性を示すキモグラフの一例を図 2 に示す。

図 2. モルモット胆嚢切片の反応性. マグヌス法におけるアセチルコリン(ACh), ヒスタミン(His), 塩化バリウム(BaCl_2)の感受性の比較.

次いで、これら薬物の用量反応曲線を求めるため、それぞれ対数用量に対応させて、得られる収縮高を、各々の

にする。

測定法は Crema⁹⁾ らの定性的方法に準じ、35 ml の反応槽に標本をつるし、37°C に保って、Tyrode 液を用いた。装置は図 1 に示すように、胆管の弛緩と流出流量変化とを同時に記録した。流出圧を一定にするため、Tyrode 液貯蔵瓶と反応槽との水面高差は 6~8 cm の範囲内にし、適切な flow 量(drop 数)を得るように、その標本に適した高さに調節し、Tyrode 液貯蔵瓶と electric drop counter に落ちる水滴の落ち口との差は 2 cm に保った。

定量法は総胆管を反応槽中につるし、flow 数が安定した後(60~90 分)、約 40 分毎に標準薬液(Theophylline 5×10^{-5} g/ml)を投与して、こゝで指標にした F 値が大体恒常性を示すように筋をならす。F 値とは薬液投与前後、それぞれキモグラフ上に 5 分間記録したうちの後半の 3 分間の flow 数を F_B , F_A とし、両 flow 数の差 $F = F_A - F_B$ をいう。総胆管が自動運動して、flow 数に大きく影響をおよぼす時は(例えば、図 6 の B), 投与前 5 分間のうち最大数を示す 1 分間 flow 数を 3 倍して、3 分間 flow 数に対応させて補正する。但し、同一標本においては、補正したものと、補正しないものとを併用することは避けた。

drop 数と ml 数とを対応させると、30 drops が 3.0 ml であったので、1 drop は 0.1 ml に相当している。

最大収縮反応 ($\text{ACh}: 10^{-4}$ g/ml, $\text{His}: 2 \times 10^{-5}$ g/ml, $\text{BaCl}_2: 8 \times 10^{-3}$ g/ml) の高さの百分率で表わし、それを logit 変換¹¹⁾して得られるグラフを図 3 に示す。

各用量反応曲線はいずれも推計学的有意差検定により、5% 危険率の信頼度で直線性が認められ、His, ACh, BaCl_2 の順に反応性が低くなることが認められ

図 3. モルモット胆嚢切片を用いた各薬物の用量一反応曲線.

横軸は g/ml 単位の対数、縦軸は Logit 変換値. 各直線の直線性が推計学的に認められた。

た。この結果、これらの収縮性薬物を標準とし、胆嚢の収縮性作用物質の効果を相対的に測定することができる結論を得る。

II. ブタ胆管の Oddi 括約筋に対する薬物の反応性

一般に胆汁排出促進薬である硫酸マグネシウム, Pilocarpine, Pepton や、更に平滑筋弛緩作用をもつ鎮痙薬の Atropine, Papaverine, および胆汁主成分の Desoxycholate などの薬物を用いて、豚総胆管の Oddi 括約筋に対する反応性を検討した結果が図 4, 5 である。

これらによると、硫酸マグネシウムは 10^{-2} g/ml で総胆管、括約筋共に弛緩させ、Pilocarpine は 10^{-6} g/ml

で、総胆管、括約筋を著明に収縮させ、漸次 tonus を減じ、flow 数は回復の方向に進む。Pepton は 10^{-4} g/ml で総胆管、括約筋に僅かな一過性の収縮を起させ、 10^{-3} g/ml では共に顕著に収縮を来とし、やがて漸次 tonus を減少する。Papaverine (6×10^{-6} g/ml), Desoxycholate (1.2×10^{-4} g/ml) では共に典型的な総胆管、Oddi 括約筋両者の弛緩を示し、flow 数を増加する。一方、Atropine は 10^{-4} g/ml で、総胆管を弛緩させる傾向を見せるが、Oddi 括約筋には殆んど反応を示さない。

以上の結果、硫酸マグネシウムは Oddi 括約筋の弛緩性胆汁排出作用を、Pilocarpine, Pepton は胆嚢の方

図 4. ブタ総胆管の反応性と Oddi 括約筋に対する各種薬物の作用態度。

図 5. ブタ総胆管の反応性と Oddi 括約筋に対する Papaverine, Desoxycholate, Atropine の作用態度

総胆管の薬物に対する反応性がヒトの総胆管の場合と同一結果となり, 反応性の一般性が保証された. また, 鎮痙薬では papaverine が奏効し, 抗 ACh 作用薬の Atropine は直接作用がないと結論しうる. 更に, 胆汁主成分の Desoxycholate の存在意義は Oddi 括約筋を弛緩せしめて開口するにあると考えることができる.

III. ブタ総胆管の Oddi 括約筋弛緩反応の定量化

Oddi 括約筋を機械的に弛緩させる効力の比較的強力な薬物として, Theophylline を選び, その量の増加にともない, 総胆管の弛緩性と Oddi 括約筋の弛緩性的変化を検討したキモグラフの一例が図6である.

これらの数例のデータから算出して, flow の増加数を求めた結果が表1である.

これらの値から, Theophylline の 10^{-4} g/ml による flow 数の増加に対する各用量の flow 増加を百分率で表わし, それらの平均値をグラフにした用量反応曲線が図7(左側)の一部である.

図7. 各種薬物の用量とブタ総胆管からの flow 増加数との関係.

左図は, Theophylline の用量反応曲線, 右図は Theophylline の 50% 反应用量を基準にした Papaverine と Desoxycholate との効力比曲線, 横軸は g/ml の対数用量, 縦軸は flow 増加数の百分率.

図6. ブタ胆管と Oddi 括約筋に対する Theophylline 各濃度による作用度態.

表1. Theophylline による摘出総胆管の Oddi 括約筋部における flow の増加数

No.	1x10 ⁻⁴			5x10 ⁻⁵			2.5x10 ⁻⁵			1.25x10 ⁻⁵		
	F _A	F _B	F	F _A	F _B	F	F _A	F _B	F	F _A	F _B	F
1	63	23	36	55	33	22	47	39	18	58	45	13
2	411	92	319	256	37	219	181	81	100	285	187	98
3	232	0	232	147	26	121	70	12	58	34	8	26
4	169	37	132	159	48	111	79	49	30	67	38	29
5	92	18	74	127	66	61	75	42	33	71	63	8
6	99	6	93	87	21	66	100	63	37	24	21	3

図7から, 30% 反応以上では直線性が認められるので, この用量範囲を用いれば Theophylline を定量化でき, これを標準薬物とすることにより, 一般薬物の効力比を測定し得る. すなわち, Theophylline 10^{-4} g/ml に対する 50% 反応を起させる薬物用量を EDT_{50} とし

考

現在まで, 胆嚢と Oddi 括約筋に関する完全な bioassay は殆んどない. 胆嚢については, Cholecystokinin 様物質の unit 決定のための略々定量的な Ivy らの方法¹²⁾, Gershbein の単純な方法¹³⁾ があり, 一方 Oddi 括約筋については, Crema による *in vivo* の方法^{14,15)} が最近に発表されているにすぎない. 殊に, *in vitro* で Oddi 括約筋弛緩作用に関する bioassay はまだ確立されていないので, 本研究の意義がこの点にもある.

摘出胆嚢切片の実験上の難点は薬物感受性を一定するのに長時間必要なことと, 時々 spontaneous tonic contraction を起すことにある. 前者の理由は operation trauma に基づく麻痺が原因¹⁶⁾, 特に *in vitro* では生体内の Cholecystokinin の促進効果^{3,13,17)} が関与し得ないためと解釈できる. 後者の現象は Ivy¹⁸⁾ も認めているが, その理由は明らかではない.

次に, Oddi 括約筋の弛緩効果による flow 数の算出法については, Crema らは $|FA-FB|/FB \times 100$ の式を用いているが, *in vivo* の場合はともかく, *in vitro* の場合は, 最初の FB 値は栄養液瓶の高さを調節することにより一定条件内におさめることができるが, 同一標本についての2回目以後は困難である. 実際には初回の FB 値をすべてに利用しているが誤差が大きい. その他, FA/FB の式についても, その適合性を検討した

結

利胆薬研究のうち, 従来あまり研究対象になっていない胆汁排出作用促進薬の薬理学的研究を目標に, 胆嚢収縮性作用と Oddi 括約筋弛緩性作用とに区分し, プタの総胆管を用いた bioassay を確立した.

1. 胆嚢収縮作用の測定にモルモット摘出胆嚢切片を用いマグヌス法で定量化しうることを証明した.
2. Oddi 括約筋弛緩作用については, プタ総胆管を用い, 硫酸マグネシウムの弛緩効果, pilocarpine, pepton の収縮効果を認め, 胆汁排出作用の検討にプタ総胆管の

文

- 1) 浦城二郎: 胆汁酸の代謝およびその生理, 医学のあゆみ, **54**, 1, 1965.
- 2) 田北周平・西島早見: 医学シンポジウム第13輯(胆嚢・胆道疾患), 87頁, 診断と治療社, 東京, 1958.

て, これを各種の Oddi 括約筋弛緩性薬物の比較基準にした. この測定法の例として, Papaverine と Desoxycholate との効力比を求めた結果が図7(右側)の一部である. これより, Papaverine の方が強力であることが確認し得て, 効力比を算出できる可能性が証明された.

察

が, 表1が示すように, FB 値のバラツキから不適当であることを確かめ得た. 著者らの採用した $F=FA-FB$ の式では, F 値に普遍的意味をもたし得ないが, 標準薬物との同一標本における比較によって検定し得るので, 十分, 実用度が高いと考える.

各種薬物のプタ総胆管の Oddi 括約筋に対する作用態度では, 硫酸マグネシウムが Oddi 括約筋を弛緩するという定説に一致し, Pilocarpine も収縮するという報告^{8,19,20)} と一致した. この点, プタ胆管の実験材料の適性を認めることができる. Pepton についての実験例はないが, *in vivo* では胆嚢を収縮するという¹⁸⁾. 本実験の Oddi 括約筋標本は十二指腸を分離してあるので, その点の機作は論ずることができないが, 硫酸マグネシウムは弛緩性胆汁排出薬, Pilocarpine, Pepton は収縮性胆汁排出薬と大別し得る.

Atropine では, *in vivo* で Oddi 括約筋を弛緩するという報告^{8,19,21)} に反して, *in vitro* では何ら作用を示さなかった. これも Atropine による十二指腸の tonus 減少が関与しているかいないかの差によると考えられる. Desoxycholate が弛緩を示したのは, Desoxycholate に Atropine 様作用と Papaverine 様作用とがある²²⁾ ので, その中の Papaverine 様作用に基づいていると結論し得る.

論

実験材料としての可能性を認めた.

3. Oddi 括約筋弛緩作用の測定には, 総胆管の弛緩と Oddi 括約筋部における flow 数の増加を指標にし, $F=FA-FB$ なる式に従えば, 定量的に弛緩作用を測定しうることを証明した.

4. Oddi 括約筋に対して, Atropine は顕著に奏効せず, 平滑筋直接作用の Papaverine は典型的に弛緩に奏効した. Desoxycholate も Papaverine より弱い, 同様な弛緩作用を示した.

献

- 3) Mashima, H. & Yoshida, T.: Effect of cholecystokinin on the contraction of gallbladder. *Electro-physiology*, **23**, 48, 1961.
- 4) 田中丈二: 胆汁排出機序に関する研究, 日平滑

筋誌, **1**, 50, 1965.

5) Ivy, A. C. & Oldberg, E.: A hormone mechanism for gall-bladder contraction and evacuation. *Am. J. Physiol.*, **86**, 599, 1928.

6) Ivy, A. C., Kloster, G., Leuth, H. C. & Drewyer, G. E.: On the preparation of "cholecystokinin". *Am. J. Physiol.*, **91**, 336, 1930.

7) Doubilet, H. & Ivy, A. C.: The response of the smooth muscle of the gall-bladder at various intravesical pressures to cholecystokinin. *Am. J. Physiol.*, **124**, 379, 1938.

8) Granser, G., Hertting, G., Rissel, E. & We-walka, F.: Untersuchungen über die Beeinflussbarkeit des Sphinkter Oddi. *Arch. int. pharmacodyn.*, **105**, 389, 1956.

9) Crema, A., Benzi, G. & Berté, F.: The action of some natural substances on the terminal portion of the common bile duct isolated in toto. *Arch. int. pharmacodyn.*, **137**, 307, 1962.

10) Crema, A. & Berté, F.: Action of sympathomimetic drugs on the isolated junction of the bile duct and duodenum. *Brit. J. Pharmacol.*, **20**, 221, 1963.

11) 木村正康: 推計学の化学及び生物学への応用, 化学の領域増刊, **36**, 37頁, 南江堂, 東京, 1959.

12) Gershbein, L. L., Wang, C. C. & Ivy, A. C.: Assay of secretion and cholecystokinin concentrates. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **70**, 516, 1949.

13) Gershbein, L. L., Denton, R. W. & Hubbard, H.: In vitro assay of cholecystokinin con-

centrates. *J. Appl. physiol.*, **5**, 712, 1953.

14) Benzi, G., Berté, F., Crema, A. & Frigo, G. M.: Action of sympathomimetic drugs on the smooth muscle at the junction of the bile duct and duodenum studied in situ. *Brit. J. Pharmacol.*, **23**, 101, 1964.

15) Crema, A., Benzi, G., Frigo, G. M. & Berté, F.: The responses of the terminal bile duct to morphine and morphine-like drugs. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **149**, 373, 1965.

16) Hultman, E. H.: A method for the standardization of cholecystokinin in vitro. *Acta. Physiol. Scand.*, **33**, 291, 1955.

17) Svatos, A., Bartos, V. & Brzek, V.: The concentration of cholecystokinin in human lymph and serum. *Arch. int. pharmacodyn.*, **149**, 515, 1964.

18) Ivy, A. C.: The physiology of the gall-bladder. *Physiol. Rev.*, **14**, 1, 1934.

19) Erdmann, W. P. & Henne, H. F.: Über spasmolytische Wirkungen am Sphinkter Oddi. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, **218**, 462, 1953.

20) 江田昭英, 簡 裁, 後藤玄吉: 胆汁排出に及ぼす諸種薬物の影響: 岐阜医科大学紀要, **6**, 662, 1958.

21) Juhasz, B. & Mester, Z.: Pharmakologische Wirkungen auf die Funktion des Sphinkter Oddi. *Acta. Vet. Acad. Sci. Hung.*, **7**, 49, 1957.

22) 木村正康ら: 漢薬牛黄の産地別各種および抽出分画の鎮痙作用について. 薬学雑誌, **86**, 366, 1966.

(1966年7月27日受付)