

## 消化管運動に対するメリロートエキスの作用

水口 隆夫 宮本 篤 大鹿 英世

札幌医科大学薬理学講座 (主任 大鹿英世 教授)

### Effect of *Melilotus* Extract on Mammalian Gastrointestinal Motility

Takao MIZUGUCHI, Atsushi MIYAMOTO and Hideyo OHSHIKA

Department of Pharmacology, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. H. Ohshika)

Effect of the plant extract (Mel-ext) derived from *Melilotus officinalis* on mammalian gastrointestinal motility was investigated.

Gastrointestinal transit of charcoal meal in mice was facilitated by the pretreatment with Mel-ext or coumarin (a dose which is comparable to its content in the extract), which were given orally 90 min before the charcoal meal. In rabbits, venous administration of Mel-ext repeatedly resulted in a transitory inhibition of the motility and a decrease of muscle tone in the gastrointestinal tract (stomach, ileum and colon).

The spontaneous contraction of the isolated rabbit ileum was inhibited by Mel-ext and coumarin. Dose-response curve for acetylcholine in isolated guinea pig ileum shifted to the right in the presence of Mel-ext, but the curve for histamine was not affected by the extract. The contraction of the isolated guinea pig ileum induced by transmural electrical stimulation was inhibited by Mel-ext and coumarin and these inhibitory effects were slightly antagonized by naloxone.

From the above results, it seems likely that the transitory and repetitive inhibition of motility and the decrease of gastrointestinal muscle tone induced by Mel-ext or coumarin may greatly contribute to facilitate the gastrointestinal transit of contents. Effects of the extract may be brought about by coumarin. Also the present results suggest a possibility that the site of action of Mel-ext and coumarin may be located at the nerve plexus of the gastrointestinal wall and/or gastrointestinal smooth muscle.

(Received December 23, 1985 and accepted January 27, 1986)

**Key words:** Melilotus-extract, Coumarin, Gastrointestinal tract

#### 1 緒 言

メリロートエキスは、北欧及び中央アジアの野生植物 *Melilotus officinalis* の花及び葉より抽出されたもので、coumarin, o-coumaric acid, melilotic acid等を含有する植物抽出製剤である。このメリロートエキスの薬理作用については、末梢血管の血流改善<sup>1)</sup>、リンパ流量の増加<sup>2)</sup>、さらに浮腫の改善<sup>3)</sup>等が報告されており、臨床的にはこのエキスを含有する製剤は、外傷、手術後の軟部腫脹並びに炎症の緩解、更に内・外痔核に有効であることが報告されている<sup>4)</sup>。

他方、メリロートエキス含有物質中では coumarin が大部分(約98%)を占めている事<sup>5)</sup>が知られており、従ってこのエキスが経口もしくは静脈内投与された場合、coumarin による薬理作用は無視出来ない<sup>6)</sup>と考えられる。加えて、メリロートエキスが内服薬として使われているにもかかわらず、このエキス及び coumarin の消化管運動に対する作用を検討した報告は、今日までなされていない。

そこで著者らは、消化管運動に対するメリロートエキス及びそのエキス中に含有される coumarin の作用を検討する目的で本研究を行なった。

## 2 実験方法

### 2.1 実験材料

実験動物には、雄性 ICR 系マウス（日本 Charles-River 社, 20-25 g), 雄性 Hartley 系モルモット(北海道実験動物センター, 300-400 g), 雄性日本白色種ウサギ(北海道実験動物センター, 2.0-3.0 kg)を使用した。

使用した薬物は、0.2% coumarin を含有するメリロートエキス原液(以下 Mel-ext とする)(Schaper & Brümmer, 西ドイツ), coumarin (片山化学), morphine HCl(武田薬品工業)及び naloxone HCl(三共)である。これらの薬物は、実験直前に生理食塩水で溶解もしくは稀釈して使用した。その他の試薬については、特級もしくはそれに準ずる純度のものを使用した。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 マウス消化管における炭末輸送

24時間絶食したマウスに、5%炭末懸濁液(5%アラビヤゴム溶液中)0.2 ml をゾンデを用いて胃内に投与し、30分後に開腹して小腸を摘出し、小腸全長(A)と炭末移動距離(B)を測定して炭末輸送能(B/A)を求めた。Mel-ext 及び coumarin は、炭末を投与する30分あるいは90分前に種々の経路で投与し(腹腔内・静脈内・経口投与、それぞれ i. p., i. v., p. o. と略す)、得られた B/A 値を対照群(生理食塩水投与)の B/A 値と比較した。

#### 2.2.2 ウサギ消化管運動

24時間絶食したウサギを pentobarbital Na(30 mg/kg, i. p.) で麻酔し背位に固定した後、腹部を切開し、胃体側面、回腸及び結腸にそれぞれ収縮力ピックアップ(日本光電, TH-612 T)を口側から肛門側に向けて装着した後、腹壁を閉じ消化管運動を transducer(日本光電, RP-3)を介して記録した。

#### 2.2.3 ウサギ及びモルモット摘出回腸標本

24時間絶食したウサギから回腸を摘出し、附属組織を除いた後、約2-3 cmの回腸片の一端を容量10 mlのマグナス槽内(32°C)に糸で固定し、他端は糸を介してFDピックアップ(日本光電, SB-1 T)につなぎ、薬物添加後の回腸の自動運動を等尺性に記録した。また一部の実験ではウサギ及びモルモット摘出回腸の収縮をヘーベルを介してキモグラフィオン上で等張性に記録した。

用いた Tyrode 液(組成は g/l: NaCl 8.0, KCl 0.2, MgCl<sub>2</sub> 0.1, CaCl<sub>2</sub> 0.2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05, NaHCO<sub>3</sub>

1.0, glucose 1.0)を pH 7.4 に調整し、実験は混合ガス(95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>)の通気下で行った。

#### 2.2.4 モルモット摘出回腸標本の経壁電気刺激

24時間絶食したモルモットを放血致死させた後回腸を摘出した。経壁電気刺激(electrical transmural stimulation)は、Patonの方法<sup>7)</sup>に従って coaxial electrodes を用いて行なった。すなわち、マグナス槽内(10 ml, 32°C)に、回腸片を懸垂し2本の白金電極を腸壁を挟んで並置し経壁刺激(6 Hz, 5 msec, 30 v)した。その他の実験方法は2.2.3に準じた。

## 3 成績

### 3.1 消化管炭末輸送に対する Mel-ext 及び coumarin の作用

マウスに Mel-ext を 0.01, 0.05, 0.1 ml/10 g(i. v., i. p., p. o.)投与し、30分間の消化管内炭末輸送能を検討した。Mel-ext 投与群は、何れの用量及び投与経路によっても、対照群との間に炭末輸送能で有意な差を示さなかった(Fig. 1)。次に Mel-ext を p. o. 投与し、90分後に同様の検討を行なったところ、Mel-ext 0.05 及び 0.1 ml/10 g 投与群では、対照群に比して有意な炭末輸送能の増大(p<0.05)が認められた(Fig. 2)。しかし Mel-ext 0.01 ml/10 g 投与群では、対照群との間に有意な差は認められなかった。

本実験に使用した Mel-ext には coumarin が 0.2% 含有されているので、経口投与した Mel-ext (0.01, 0.05, 0.1 ml)中に含有される coumarin の相当量についてその作用を検討した。coumarin 0.1 及び 0.2 mg/10 g 投与群で炭末輸送能の増大(p<0.01, p<0.05)

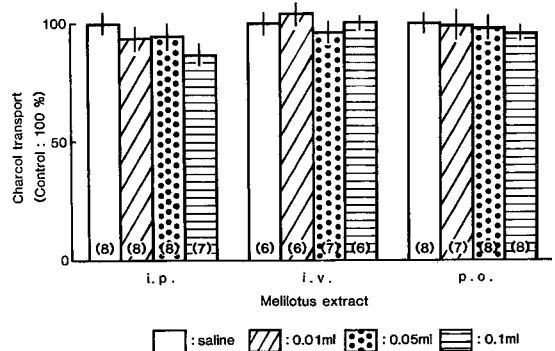


Fig. 1 Intestinal transit of charcoal in mice: Charcoal meal was given at 30 min after the administration using three different doses of Mel-ext or saline via various routes for each group of mice. Number of experiments is shown in parentheses. The columns show the mean  $\pm$  S. E. of experiments.

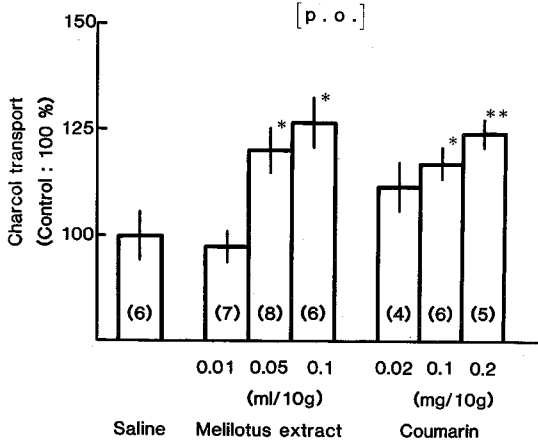


Fig. 2 Effects of Mel-ext and coumarin on the intestinal transit of charcoal: Charcoal meal was given at 90 min after the oral administration of Mel-ext or coumarin. The columns show the mean  $\pm$  S. E. of experiments. Significantly different from the saline-treated mice, \* $p < 0.05$ .

が認められたが、0.02 mg/10 g 投与群では、対照群との間に有意な差が認められなかった (Fig. 2).

### 3・2 生体内消化管運動に対する Mel-ext 及び coumarin の作用

ウサギの消化管運動に対する Mel-ext 及び coumarin の作用を、胃体前側壁・回腸・結腸それぞれについて検討した。

比較的安定した回腸運動を示すウサギに Mel-ext (1.0 ml/kg, i. v.) を投与すると、その直後に回腸運動の抑制を示すところの、振幅の消失が現われ、同時に著しい筋緊張の低下も一過性に発現した (Fig. 3)。更に投与 10 分後より、回腸運動の抑制が反復して認められた。Mel-ext の投与により、胃 (Fig. 3) 及び結腸

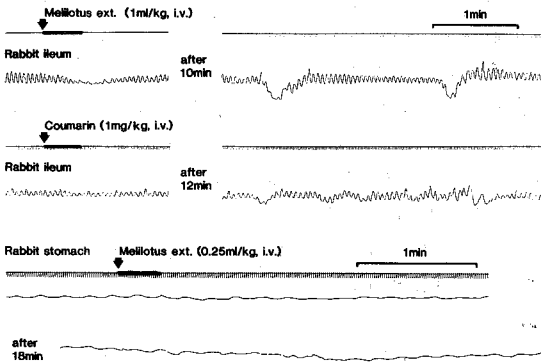


Fig. 3 Effects of Mel-ext and coumarin on motility of gastrointestinal tract *in situ*: Drugs were injected into the femoral vein of the pentobarbital-anesthetized rabbits.

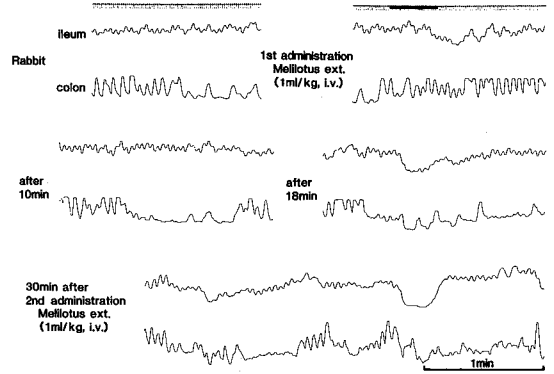


Fig. 4 Effect of Mel-ext on rabbit intestinal motilities *in situ*: Both motilities of ileum and colon in rabbits were recorded simultaneously. In a pair of records the upper trace shows motility of the ileum and the lower one shows that of the colon.

(Fig. 4) でも回腸同様の筋緊張の低下と運動の抑制とが認められたが、各部位の運動の抑制には同時性は認められなかった (Fig. 4).

Mel-ext を追加投与した例では腸管運動の抑制の増強を認めた (Fig. 4)。また、coumarin (1.0 mg/kg, i. v.) の投与も、Mel-ext と同様の作用を現した (Fig. 3)。

### 3・3 摘出回腸標本における Mel-ext 及び coumarin の作用

ウサギ摘出回腸にみられる規則的な収縮は、3 分毎に bath (10 ml) 中へ添加された Mel-ext (0.1 ml) により濃度依存性に抑制された。また、同様の効果は、coumarin ( $10^{-2}$  M 溶液) を 3 分毎に 0.1 ml ずつ bath 中に添加した場合にも認められた (Fig. 5)。ウサギ摘出回腸における自動収縮の 1 分間当りの収縮回数及びその振幅は、上述した Mel-ext 及び coumarin により共に有意に減少 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) した (Table 1)。ウサギ摘出回腸の自動運動は、Mel-ext や coumarin に

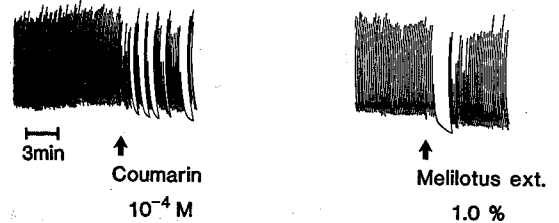


Fig. 5 Dose-related inhibition of spontaneous contraction of isolated rabbit ileum by Mel-ext and coumarin: Drugs were added every three min 0.1 ml into 10 ml bath medium. Arrows show the time the drugs were given.

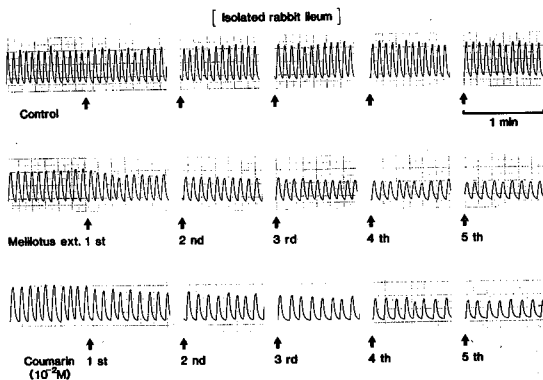
**Table 1** Dose-related inhibition of spontaneous contraction of isolated rabbit ileum by Mel-ext and coumarin.

	Contraction (number/min)					
	Before	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th
Control	12.0±0.7	11.8±1.0	11.8±1.0	11.5±1.2	11.5±1.2	11.5±1.2
Melilotus ext. (0.1 ml)	11.0±0.5	11.0±0.5	11.0±0.5	10.5±0.5	9.5±0.7**	9.0±0.6**
Coumarin (10 <sup>-2</sup> M sol. 0.1 ml)	11.0±1.2	11.0±0.9	10.0±1.0	9.3±0.9*	9.0±1.0*	9.3±1.0*
	Amplitude (mm)					
	Before	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th
Control	23.0±1.2	23.0±1.3	22.6±1.4	22.7±2.1	21.9±2.4	22.0±2.3
Melilotus ext. (0.1 ml)	23.8±1.4	20.1±0.7**	17.5±1.0**	13.1±0.7**	13.3±0.9**	11.3±0.8**
Coumarin (10 <sup>-2</sup> M sol. 0.1 ml)	19.3±2.1	16.8±2.2	15.2±2.0	14.3±1.4	11.9±1.5*	11.4±1.8*

Contractions were isotonicly recorded. Values represent the mean±S. E. (n=5). Significantly different from the respective values in the absence of drugs, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

より間欠的に抑制されることが5例中3例で認められた (Fig. 6).

モルモット摘出回腸標本を用いて acetylcholine 並びに histamine の用量-反応曲線に対する Mel-ext 添加の影響をみた。Fig. 7 に示した如く acetylcholine の用量-反応曲線は 0.1% Mel-ext により右方に移動したが、histamine のそれは殆ど影響を受けなかった。



**Fig. 6** Effects of Mel-ext and coumarin on spontaneous contraction of isolated rabbit ileum: The spontaneous contraction of isolated ileum was isotonicly recorded with a Kymographion. Drug concentrations were expressed as the final concentration.

### 3.4 モルモット摘出回腸標本の経壁電気刺激による収縮に対する Mel-ext 及び coumarin の作用

経壁電気刺激によるモルモット摘出回腸の収縮は、1.0% Mel-ext 並びにこの中の含量に相当する coumarin (10<sup>-4</sup>M) によって抑制されて、Fig. 8 に示したごとく振幅を減じた。一方、morphine (10<sup>-7</sup>M) の収縮抑制作用に充分に拮抗する naloxone (10<sup>-8</sup>M) の前処置により、Mel-ext (1.0%) 及び coumarin (10<sup>-4</sup>M) の収縮抑制作用は微弱ながらも阻止された (Fig. 8).

## 4 考 察

本研究において、Mel-ext にマウスの消化管内容輸送能を高める作用のあることが見出された (Fig. 2)。薬物によって引き起こされる消化管運動の亢進については、通常 screening test としてマウスの消化管内容移動速度が目安とされている<sup>8)</sup>。しかしながら、この炭末を用いた検査成績のみで薬物の腸管運動への働きを判断することは充分でなく、摘出腸管平滑筋に対する作用、更には *in situ* での運動状態の把握が必要である。その点では収縮ピックアップ装着により、薬物投与後の胃・小腸・結腸の生体内運動を同時に記録することは、薬物効果を知る上で極めて有効な手段と考えられる。

Fig. 3, 4 に示した如く、ウサギに Mel-ext 静注後、胃・回腸・結腸いずれにおいても一過性の筋緊張の低下と運動の抑制が認められ、かつ筋緊張の低下は反復して生ずることが認められた。このことは、Fig. 2 に示

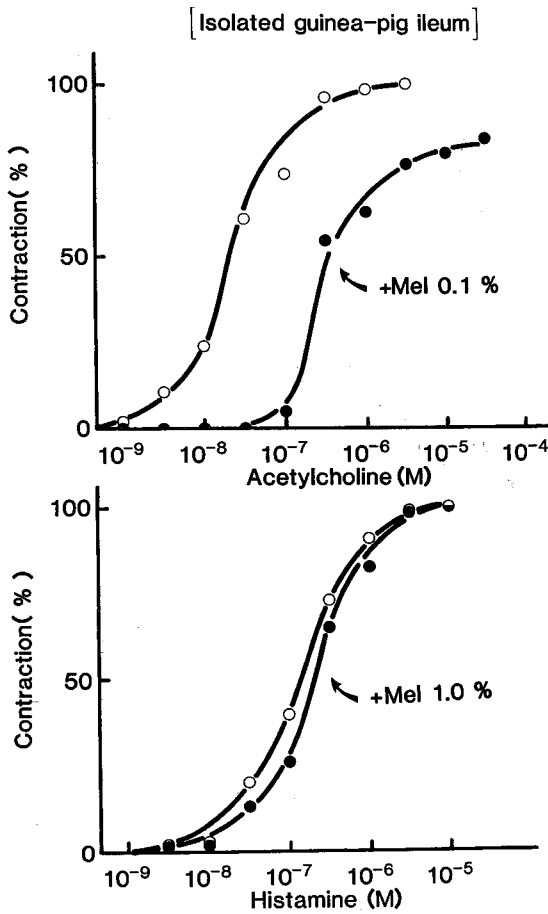


Fig. 7 Dose-response curve for acetylcholine and histamine: Acetylcholine- or histamine-induced contraction of isolated ileum (n=4) was investigated in the absence (—○—) and in the presence (—●—) of Mel-ext (final concentrations; 0.1 and 1.0%).

した Mel-ext によるマウス腸管内容の移動促進が、腸管運動の増大からもたらされたのではなく、むしろ反復した短時間の腸管の緊張低下がこの促進に貢献していると考えの方が妥当のようである。事実、先に大鹿ら<sup>9)</sup>、大鹿・水口<sup>10)</sup>が瀉下剤として広く認められている phenolphthalein<sup>11)</sup>の作用機序を検討した際にも、消化管運動を増大させるような積極的な証拠は得られていないどころか、逆に腸管平滑筋の緊張を低下させることが見出されている。Mel-ext による腸管緊張低下が、腸管内容の移動に貢献していることは、弛緩のあとに反動的ともみられる、弱いが確実な、緊張と運動の増大を伴っていることによっても裏付けられる (Fig. 3, 4)。

このような Mel-ext の腸管の緊張の低下作用は、静注した場合ほぼ消化管全域にわたって、反復して認め

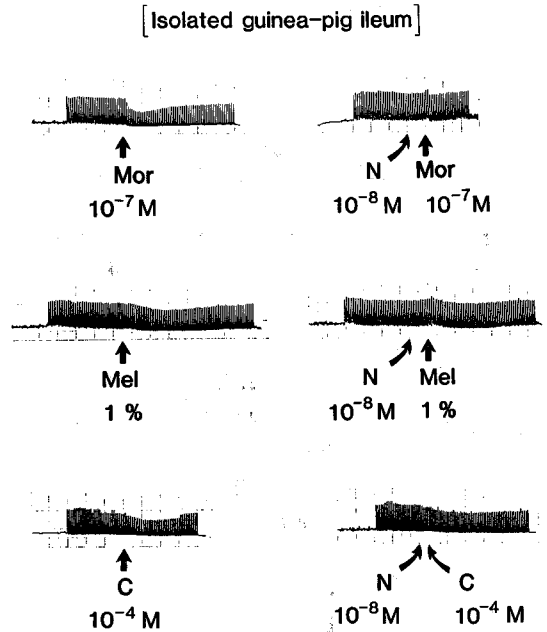


Fig. 8 Effects of Mel-ext, coumarin and morphine on contraction of isolated guinea pig ileum by transmural electrical stimulation: Abbreviation: Mel; Mel-ext, C; coumarin, Mor; morphine, N; naloxone. Drug concentrations were expressed as the final concentration.

られるところから、中枢からの抑制的影響の可能性も考えられる。しかし Fig. 6 でみられる如く、摘出ウサギ回腸標本の自動運動についても、同様の反復性弛緩が認められることから、この Mel-ext の作用点は恐らく末梢性のものと考えざるを得ない。

他方、Mel-ext の平滑筋そのものへの作用という点から考えると、モルモット摘出回腸での acetylcholine 及び histamine の用量-反応曲線を、Mel-ext は、acetylcholine に対しては右に平行移動させたが、histamine に対しては変化させなかった。この点から、Mel-ext は平滑筋の acetylcholine の作用点に対して何らかの遮断作用を有するものと考えられた。また経壁電気刺激によるモルモット回腸標本の収縮も Mel-ext は抑制するところから、腸管筋層内神経叢に対しても抑制的に働いている可能性がある。摘出ウサギ回腸標本の自動運動を Mel-ext や coumarin が、用量に応じて抑制した結果 (Table 1) も、この可能性を裏付けているとみなすことが出来よう。しかし作用点は少なくとも morphine のそれと異にしていると思われる。

以上の Mel-ext の作用は、いずれも coumarin によっても再現された<sup>12,13)</sup> (Fig. 2, 3, 5, 6, 8)。Comarin は

Mel-ext の中には多量に含まれており, coumarin の含量をもって Mel-ext の量の目安としている. したがって恐らく本研究で示された消化管への Mel-ext の作用は, その中に含まれる coumarin によって生ずる可能性が高いと考えられるが, coumarin そのものによるのか, あるいはその metabolites によるものかは定かでない. Shilling *et al.*<sup>14)</sup>によれば, ヒトに投与された coumarin の約 80% は生体内変化をうけて 7-hydroxycoumarin になり, 尿中に排泄されるという. このことから考えると, coumarin は prodrug であり, 7-hydroxycoumarin が薬理的活性を担っている可能性も充分考えられる. Coumarin は p. o. のあと消化管から完全に吸収され, 尿中排泄も速やかであり, このことを考え合わせると, マウス腸管内容移動に対する促進効果の発現が, coumarin 経口投与後の時間に依存していることが理解される (Fig. 1, 2). Phenolphthalein などの瀉下作用の機序の一つとして prostaglandin E<sub>1</sub> の合成及び放出の促進<sup>15,16)</sup>が考えられている. しかし coumarin 及びその major metabolite である 7-hydroxycoumarin は, arachidonic acid から prostaglandin products が生合成されるのを抑制すると報告<sup>17)</sup>されているところから, phenolphthalein に代表される diphenol 系瀉下薬とはその作用機序を異にするものと考えられる.

モルモット摘出回腸を経壁電気刺激し, その収縮を観察すると, Mel-ext も coumarin も共に抑制作用を示した. したがって, これら薬物は, 腸管平滑筋層に存在している神経叢にその作用点をもつことが推測される. しかし, これらの収縮抑制作用が naloxone によって特異的に消失させられなかったことから, 恐らく morphine の作用点とは異なるものと考えられる.

## 5 結 論

哺乳動物の消化管運動に対する Mel-ext の作用を検討し次の結果を得た.

- 1) Mel-ext 0.05 及び 0.01 ml/10 g の経口投与 90 分後におけるマウスの消化管内炭末移動は, 対照群に比し約 25% 促進した.
- 2) Mel-ext i. v. 後, 胃・回腸・結腸より記録したウサギ消化管の生体内運動は, いずれにおいても反復して短期間抑制され, 同時に筋緊張の低下も生じた.
- 3) ウサギ摘出回腸にみられる自動運動も, Mel-ext により抑制された.
- 4) 経壁電気刺激によるモルモット摘出回腸の収縮は Mel-ext により抑制されたが, この抑制は naloxone

によりほとんど拮抗されなかった.

5) 以上の 1), 2), 3), 4) の Mel-ext の作用は, この抽出物中に含有される coumarin の相当量で, 再現することが出来た.

6) モルモット摘出回腸を用いて得られた acetylcholine の収縮作用に関する用量-反応曲線は, Mel-ext 存在下で右方に移動した. しかし histamine に関する用量-反応曲線は Mel-ext により変化しなかった.

以上の結果から, Mel-ext の短時間の反復した腸管運動の抑制が, 消化管内容輸送の促進に貢献しているものと考えられた. また, Mel-ext の消化管に対する作用は, この抽出物に含まれる coumarin の作用と類似しており, 共に腸管神経叢もしくは, 腸管平滑筋にその作用点をもつものと推測された.

## 文 献

1. Shimamoto, K. and Takaori, S.: Pharmakologische Untersuchungen mit einem *Melilotus*-Extrakt. *Arzneimittelforsch.* **15**, 897-899 (1965).
2. Földi, M. and Zoltán, Ö. T.: Über den Wirkungsmechanismus eines *Melilotus*-Präparates. *Arzneimittelforsch.* **15**, 899-901 (1965).
3. Hopf, G., Kaeßmann, H. J., Pekker, I., Schäfer, E. -A. and Weber, H. G.: Experimentelle Untersuchungen der Beeinflussung des postoperativen Extremitätenödems am Hunde mit einem Cumarinpräparat. *Arzneimittelforsch.* **21**, 854-855 (1971).
4. 日本医薬情報センター: 医療薬・日本医薬品集 第 9 版, 126, 薬業時報社, 東京 (1985).
5. 船井順平: 私信
6. Földi-Böröcsök, E., Bedall, F. K. and Rahlfs, V. W.: Die antiphlogistische und ödemhemmende Wirkung von Cumarin aus *Melilotus officinalis*. *Arzneimittelforsch.* **21**, 2025-2030 (1971).
7. Paton, W. D. M.: The response of the guinea-pig ileum to electrical stimulation by coaxial electrodes. *J. Physiol.* **127**, 40 p-41 p (1955).
8. 高木敬次郎, 福田英臣: 鎮咳薬に関する研究 (第 2 報). 阿片アルカロイドおよびその N-オキシドについて. *薬学雑誌* **80**, 1501-1506 (1960).
9. 大鹿英世, 水口隆夫, 田中 護: 齧歯類における phenolphthalein の瀉下作用について. *札幌医誌* **47**, 302-308 (1978).
10. 大鹿英世, 水口隆夫: 摘出腸管の収縮に対する phenolphthalein の抑制作用. *札幌医誌* **52**, 577-584 (1983).
11. Brunton, L. L.: Laxatives, In: Gilman, A. G., Goodman, L. S., Rall, T. W. and Murad, F.:

- Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 7th edition, 994-1003, MacMillan, New York (1985).
12. Casley-Smith, J. R., Földi-Börcsök, E. and Földi, M.: Fine structural aspects of lymphoedema in various tissues and the effects of treatment with coumarin and troxerutin. *Br. J. Exp. Pathol.* **55**, 88-93 (1974).
  13. Bolton, T. and Casley-Smith, J. R.: An *in vitro* demonstration of proteolysis by macrophages and its increase with coumarin. *Experientia* **31**, 271-273 (1975).
  14. Shilling, W. H., Crampton, R. F. and Longland, R. C.: Metabolism of coumarin in man. *Nature* **221**, 664-665 (1969).
  15. Beubler, E. and Juan, H.: PGE-mediated laxative effect of diphenolic laxatives. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **305**, 241-246 (1978).
  16. Radmanovič, B. Z.: Effect of prostaglandin E<sub>1</sub> on the peristaltic activity of the guinea-pig isolated ileum. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **200**, 396-404 (1972).
  17. Lee, R. E., Bykadi, G. and Ritschel, W. A.: Inhibition of prostaglandin biosynthesis by coumarin, 4-hydroxycoumarin, and 7-droxy coumarin. *Arzneimittelforsch.* **31**, 640-642 (1981).
- 
- 別刷請求先  
(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目  
札幌医科大学薬理学講座 大鹿英世