モルモットのサイクラミン酸ナトリウム代謝 における細菌の関与

(昭和 47 年 1 月 20 日受理)

朝 比 奈 正 人*

Participation of Bacteria in the Metabolism of Sodium Cyclamate in Guinea Pig

Masato ASAHINA

(National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

Previous reports suggest that intestinal bacteria play an important role in the metabolism of sodium cyclamate in animal bodies. Furthermore, the bacteria capable of assimilating sodium cyclamate have been separated from the feces of guinea pigs, and some of their characteristics have been examined, including some enzymatic experiments with cell-free extracts of the bacteria.

In this report, it was elucidated that the bacteria, reported previously, were able to metabolize sodium cyclamate to cyclohexylamine even in the presence of a large amount of other nutrients or cecal contents of guinea pigs.

Additionally, when living cells of the bacteria were orally administered to guinea pigs, together with 1% sodium cyclamate solution as drinking water, cyclohexylamine was excreted in the urine earlier than in the control.

Absorption of cyclohexylamine through the membrane of the intestine and excretion in the urine were demonstrated in another experiment by direct injection of cyclohexylamine into the cecum of guinea pigs.

These observations are further evidences to support the actual participation of intestinal bacteria in the metabolism of sodium cyclamate.

(Received January 20, 1972)

サイクラミン酸ナトリウム (CHS-Na) をモルモットに連続経口投与すると、シクロヘキシルアミン (CHA) が尿中に排泄されるが、このアミンが体内のどこで生成されるかについて、前報において腸管内細菌の関与を予想させる結果を得¹⁾、またそのふんから CHS-Na を資化能力のある 15 株の細菌を分離し、その性状および cell-free 抽出液による CHS-Na の分解について報告した²⁾。本報告においては、これらの菌が実際に腸内で CHS-Na から CHA の生成に関与している可能性を 2, 3 の実験で確かめたので報告する。

実験方法

1) 菌株 前報²⁾で分離した K 株菌 (*Pseudomonas*) および CHS-Na 資化菌数株を含む混合菌を用いた。菌の保存には、20 ml の培地 A²⁾ を含む 100 ml の三角フラスコ中で 30° で静置培養し、7~10 日目ごとにその 5

~7ml を遠心分離して集菌し、それを新しい培地にうえかえた。

2) CHS-Na-無機塩-ビタミン培地 (培地 A) 前報²⁾に記載した無機塩、ビタミンおよび 0.25% CHS-Na を含む液体培地。

3) 肉じゅうブイヨン-CHS-Na 培地 日水製薬製「乾燥ブイヨン」および 0.25% CHS-Na を含む液体培地。

4) 盲腸内容物-CHS-Na 培地 モルモットの盲腸内容物 25 g に水を加えて 100 ml とし、0.25% CHS-Na を含むように調製後、その 20 ml を試験管に分注し、1 kg/cm² 15 分間加圧滅菌した。

5) 培養条件

a) 好氣的培養 培地 A に培養した菌を遠心分離して集め、生理食塩水で 3 回洗浄後、少量の同じ培地にけん濁する。これを 500 ml のルービンに入れた 100 ml の肉じゅうブイヨン-CHS-Na 培地に移し (その濁度は

* 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1 丁目

Table 1. Accumulation of CHA in the Culture Medium Containing Nutrients with CHS-Na (Strain-K)

Condition	Growth (A*) and CHA accumulated ($\mu\text{g}/10\text{ ml}$)	Incubation time (days)					
		0	1	3	5	7	14
Aerobic	{ Growth CHA	0.041 0	1.41 1.6	1.80 0	2.00 0	— 0	2.00 12.1
Semi-anaerobic**	{ Growth CHA	0.075 0	— —	0.55 7.5	— —	0.84 59.7	1.1 1070
Anaerobic	{ Growth CHA	0.249 0	— —	— —	— —	0.203 0	0.218 112

* Absorbance was measured with the culture medium diluted twice.

** Deep-liquid culture (liquid depth: 78 mm, diameter: 19 mm).

波長 650 m μ , 液層 10 mm の吸光度として約 0.01), 30° で静置培養を行なった。

b) 高層培養 (液状培地) 空気と接触の少ない嫌氣的に近い条件をつくるため a) と同様にして得た菌のけん濁液を, 20 ml の肉じゅう-CHS-Na 培地または盲腸内容物-CHS-Na 培地を入れた試験管に移し (直径 19 mm, 液層 78 mm), 30° で静置培養を行なった。

c) 嫌氣的培養 a) と同様にして得た菌のけん濁液を, 10 ml の肉じゅうブイオン-CHS-Na 培地を入れた試験管に移し, 嫌気ジャー (N₂ 気流) 中で静置培養を行なった。

6) CHAの定量 前報³⁾の条件でガスクロマトグラフ法で定量した。

7) モルモットへの生菌投与 体重 250~300 g の雄性モルモット 4 匹を独立に代謝ケージに入れ, 1% CHS-Na 液および粉末飼料 (オリエンタル-RC) を無制限に与えた。普通 1 匹あたり 1 日 20~30 ml の 1% CHS-Na 液を摂取した。その 2 匹には K 株菌の生理食塩水けん濁液 1 ml (菌数約 1×10^{10}) を胃ゾンデを用いて, 毎日 1 回, 5 日間連続して投与した。他の 2 匹には対照として生理食塩水 1 ml を投与した。これらのモルモットの 24 時間尿を 7 日間にわたって集め, 排泄された CHA を定量した。

8) モルモットの盲腸内への CHA の注入

体重 250~300 g の雄性モルモットをエーテル麻酔して腹部を切開し, 盲腸内に 0.04% CHA 水溶液 (塩酸で中和) 0.25 ml (CHA 100 μg) を注射器で注入したのち, 切開部を縫合し, 代謝ケージに入れ, 尿とふんを採取し, その中に含まれる CHA を定量した。

実験結果

1) 肉じゅうブイオン-CHS-Na培地でのCHAの蓄積 前報²⁾においてモルモットのふんから分離した CHS-Na 資化菌は, CHS-Naを唯一の炭素源および窒素源とする培地 A 中で増殖し, 培地中に CHA およびクロヘキサノン (CH none) を蓄積することが明らかにされたので, 肉じゅうブイオンのような栄養源の存在下でも CHS-Na

を分解し CHA を蓄積するかどうか調べた。K 株菌 (*Pseudomonas*) の場合, Table 1 に示すように高層培養 (semi-anaerobic condition) では 14 日間培養すると CHA が 1070 μg (培地に加えた CHS-Na の 8.5%) 蓄積した。嫌氣的条件では菌の増殖はほとんどなく CHA は 112 μg , 好氣的条件では菌はもっともよく増殖したが CHA の量は 12 μg に過ぎなかった。

また数株の混合菌の場合には, Table 2 に示すように CHA の蓄積は著しく, 高層培養では 14 日間で 5450 μg (培地に加えた CHS-Na の 43%) で, 嫌氣的条件では菌はほとんど増殖しないのに 2880 μg (培地に加えた CHS-Na の 23%) であった。CHS-Na からの CHA の蓄積が好氣的条件で少ないことは, 前報で指摘したように酸素の存在下では生成した CHA が CH none またはさらに酸化の進んだ代謝物に変化してしまうからであると思われる。

2) 盲腸内容物-CHS-Na 培地での CHA の蓄積

モルモットの実際の腸内の条件に近づけるため, 盲腸の内容物をとり出し CHS-Na を添加後加圧滅菌し, 試験管に入れ液層を厚くして空気との接触面積を少なくし

Table 2. Accumulation of CHA in the Culture Medium Containing Nutrients with CHS-Na (Mixture of Several Strains*)

Condition	Growth (A**) and CHA accumulated ($\mu\text{g}/10\text{ ml}$)	Incubation time (days)	
		0	14
Semi-anaerobic***	{ Growth CHA	0.096 0	0.52 5450
Anaerobic	{ Growth CHA	0.198 0	0.182 2880

* The mixture of several strains was separated from the feces-D²⁾ of guinea pigs.

** Absorbance was measured with the culture medium diluted twice.

*** The condition was the same as Table 1.

Fig. 1. Accumulation of CHA in the culture medium containing cecal contents with CHS-Na.

た状態（高層培養）で K 株菌を接種し、30° に静置したときの CHA の蓄積を調べた。Fig. 1 に示すように CHA の蓄積量は培養日数とともにほぼ直線的に増加した。

3) 生菌の経口投与

前報¹⁾で述べたように、CHS-Na 液を飲料水として毎日与えた場合、CHA はすぐに尿中に現われず、CHS-Na

Fig. 2. Urinary excretion of CHA in guinea pigs administered with the living cells and CHS-Na.

○—○ and ×—×, Guinea pigs administered with the living cells and CHS-Na; △---△ and □---□, Guinea pigs administered with CHS-Na only.

Table 3. Recovery of CHA* Injected to the Cecum of a Guinea Pig from the Urine and the Feces

	CHA recovered (μg)		
	0~24 hr	24~48 hr	Total
Urine	49.8	7.5	57.3
Feces	13.0	8.0	21.0

* 100 μg of CHA was injected.

投与後数日から2週間くらいの間に徐々に増加し、その後増減をくり返すという傾向が一般に観察された。そこで CHS-Na を資化能力のある菌を経口投与すれば、その一部が腸内で CHS-Na を代謝し、対照に比べて早い時期に CHA を尿中に排泄するようになるのではないかと予想されたので、CHS-Na 液を飲料水として飲ませながら、K 株菌を毎日1回、5日間連続して投与し、その24時間尿中の CHA を定量し、対照の場合と比較した。その結果は Fig. 2 に示すように、生菌を投与したものは2~4日目くらいに CHA 排泄のピークがみられたのに対し、対照では1匹は6日にピークがあり、他の1匹は7日目まで CHA の排泄はほとんどなかった。この実験だけでは投与した生菌が腸内に常住したかどうか明らかでないが、外部から強制的に投与された CHS-Na 資化菌によって腸内で CHS-Na が CHA に変化し、それが体内に吸収されたのち尿中に排泄されたことがうかがえる。

4) CHA の盲腸内への注入

CHS-Na が腸管内細菌によって CHA に代謝された場合、それが吸収され尿中に排泄されるかどうか確かめるため、100 μg の CHA を盲腸内に注入し、尿およびふんから CHA を回収する実験を行なった。その代表的な例は Table 3 に示すように24時間尿から約50%の CHA が回収され、腸管内細菌が多いと思われる盲腸あるいは大腸部分から CHA が十分吸収されることがわかった。

考 察

CHS-Na は従来毒性も低く体内で変化を受けず、安全性が高い人工甘味料として評価されていたが⁴⁾、1966年小島および一番ヶ瀬⁵⁾によって、ヒトおよびイヌでは体内で一部 CHA に分解され尿中に排泄されることが報告されて以来、CHS-Na の安全性に対する再検討が各方面でなされるようになった。1969年にアメリカの FDA により CHS-Na の長期投与による膀胱がんの発生が報告されるに及んで、各国でその使用を禁止する動きがみられ、わが国においても同年11月その全面的な使用禁止という措置がとられた。

当時、われわれは CHS-Na を経口投与したヒトおよび使用禁止前正常な食生活をしているヒトの尿中への

CHS-Na および CHA の排泄量を調べた結果、多くのヒトにこれらの排泄が確認され、また CHA の排泄量およびその排泄パターンに著しい個体差のあることを認めた⁹⁾。さらに、モルモットに一定期間 CHS-Na を連続経口投与し、尿中に十分な量の CHA を排泄するようになってから、そのふんや盲腸内容物と CHS-Na をインキュベートすると多量の CHA が蓄積することを認めた。しかし肝臓などの組織のホモジネートとインキュベートしても何ら変化が認められなかった。また抗生物質の同投与とあるいは CHS-Na の腹腔内投与では、CHA の尿中排泄は著しく抑制されたので、CHS-Na の代謝には腸内微生物の関与が推定された。

そこでモルモットのふんおよび動物舎の空気から、CHS-Na を唯一の炭素源、窒素源とする選択培地を用い、CHS-Na を資化する 15 株の細菌を分離した。またその中で資化能力の強い K 株菌 (*Pseudomonas*) を用い、その cell-free 系で CHS-Na を CHA に分解する sulfamidase と、CHA を CH none に酸化する amine oxidase の存在を証明した²⁾。

本報ではこのようにして分離した菌が、CHS-Na を唯一の炭素源、窒素源とするような異常な環境だけでなく、より実際の腸内に近い条件下でも CHS-Na を分解して CHA を生成するかどうか検討を行なった。肉じゅうブイオン-CHS-Na 培地で K 株菌を培養しても、嫌気的条件下に近い高層培養あるいは嫌氣的培養ではかなりの CHA の蓄積が認められた。しかし好氣的培養ではあまり蓄積しなかった (Table 1)。これは生成した CHA が酸素の存在下で CH none に酸化されたり、またはこれがさらに代謝を受けるためと思われる。このことはこの菌の cell-free 抽出液を用いた前報²⁾の実験によっても明らかにされている。Table 2 に示したように混合菌の場合の方が単一の菌より CHA の蓄積が大きいが、いくつかの菌の協同作用でその効果が高まるのかも知れない。さらに盲腸内容物-CHS-Na 培地を用いた高層培養でも CHA が蓄積することは (Fig. 1)、実際の腸内に近い状態でも CHS-Na を分解する性状が保たれていることを示している。ただこれらの分離菌はすべてその分離、保存の過程で、普通ブイオンのような培地に継代培養すると、CHS-Na の資化能力を喪失するのでこの資化能力は不安定なものと思われる。

このようにして腸内で生じた CHA は酸素が不十分のためさらに酸化を受けることなく、そのまま比較的迅速に体内に吸収され尿中に現われることは、盲腸へ直接 CHA を注入した実験 (Table 3) から明らかである。ま

た Fig. 2 に示した K 株菌をモルモットに経口投与することにより CHA の尿中排泄が早くなるという結果は、この菌が *in vitro* の培養実験と同様 *in vivo* においても CHS-Na からの CHA の生成に関与していることを示している。

最近、Drasar ら¹⁰⁾はラット、ウサギ、ヒトのふんから CHS-Na 資化菌の分離を試み、*clostridia* (ラット)、*enterobacteria* (ウサギ)、*enterococci* (ヒト) を報告している。われわれの場合はモルモットのふんから、好氣的条件下で CHS-Na を含む選択培地により、*Pseudomonas*, *Corynebacterium* などに属するいくつかの菌株を分離したが、嫌気性菌については検討していない。

このように薬物の代謝に対する腸管内細菌の関与を研究する場合、動物種による菌叢の違い、同じ動物でも何種類かの細菌の関与、動物組織での代謝との関連などを考えると、実際におけるその役割についてはなお十分の検討が必要であろう。

総 括

1) モルモットのふんから分離した CHS-Na 資化菌は栄養物または盲腸内容物の存在下でも CHS-Na を代謝し空気と接触の少ない高層培養あるいは嫌氣的条件下で CHA を蓄積する。

2) モルモットに CHS-Na と同時に生菌を経口投与すると、尿中への CHA の排泄が早くなる。

3) CHA をモルモットの盲腸内に注入すると、比較的速度やかに尿中に排泄される。

文 献

- 1) Asahina, M., Yamaha, T., Sarrazin, G., Watanabe, K.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 20, 102 (1972).
- 2) Asahina, M., Niimura, T., Yamaha, T., Takahashi, T.: Agr. Biol. Chem., in press.
- 3) Asahina, M., Yamaha, T., Watanabe, K., Sarrazin, G.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 19, 628 (1971).
- 4) Taylor, J. D., Richards, R. K., Davin, J. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78, 530 (1951); Schoenberger, J. A., Rix, D. M., Sakamoto, A., Taylor, J. D., Kark, R. M.: Am. J. Med. Sci. 225, 551 (1953).
- 5) Kojima, S., Ichibagase, H.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 14, 971 (1966).
- 6) Drasar, B. S., Rewick, A. G., Williams, R. T.: Biochem. J. 123, 26 p. (1971).