腸管内微生物による食品添加物の代謝に関する研究* (第3報)

嫌気条件下におけるサイクラミン酸ナトリウム
資化様菌の最適培地の検討

(昭和 50 年 7 月 16 日受理)

松 井 道 子^{*1} 林 長 男^{*1}
谷 村 顕 雄^{*1} 倉 田 浩^{*1}

Studies on Metabolism of Food Additives by Microorganisms Inhabiting Gastrointestinal Tract (III)

Suitable Medium for the Production of Cyclohexylamine from Sodium
Cyclamate by Sodium Cyclamate Assimilating Bacteria
under Anaerobic Culture Condition

Michiko MATSUI, Nagao HAYASHI, Akio TANIMURA and Hiroshi KURATA

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

To determine suitable medium for the detection of sodium cyclamate (CHS-Na) assimilating bacteria from faeces and caecal contents of animals excreting cyclohexylamine (CHA) in the urine, highly conversion of CHS-Na to CHA was examined chemically with BC liquid medium, VF bouillon, TGC, Trypticase-soy broth and nutrient broth using a new devised anaerobic culture apparatus. These media containing various concentrations of CHS-Na were inoculated with the faeces obtained from a CHS-Na pretreated monkey and shake-cultured at 37°C for 14 days. Optimal concentration of CHS-Na for the production of CHA and pH level were also investigated.

It is concluded that the modified BC medium containing 0.25% of CHS-Na adjusted pH 8.0 showed the most highest production of CHA from CHS-Na under the anaerobic condition. The constitution of this medium is as follows:

Trypticase (B.B.L.)	10.0 gm
Yeast extract (Difco)	5.0 gm
Proteose peptone No. 3 (Difco)	5.0 gm
Glucose	5.0 gm
Tris buffer	3.0 gm
*Hemin solution	10.0 ml
**Cystine solution	10.0 ml
Placenter powder (N.B.C.)	2.0 gm
Sodium cyclamate	2.5 gm
Distilled water	1000.0 ml

*Hemin, 100 mg of hemin+99 ml H₂O+1 ml 5N-NaOH

**Cystine, 4 g of cystine+99 ml H₂O+8 ml 5N-NaOH

Thus the medium seems to be the best appreciable medium for the isolation of CHS-Na assimilating bacteria from gastrointestinal microflora.

(Received July 16, 1975)

* 本研究の関連報告としては、先に「サイクラミン酸ナトリウムの代謝に関する研究」との題名で第1報、第2報を発表した。衛生試験. 91, 11(1973); 同, 90, 43 (1972)

^{*1} 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

まえがき

サイクラミン酸塩は砂糖に代わる甘味料として、食品、医薬品などに広く利用されていたが、1969年、ラットの慢性毒性試験で、ぼうこうガンの発生の可能性が示唆されたため、我が国では昭和44年11月以来使用が禁止されている¹⁾。この物質は体内では、ほとんど代謝されず、そのまま速やかに排せつされると考えられていたが^{2),3)}、その後の研究で、これが経口的に動物に与えられた場合、シクロヘキシルアミン (CHA) に代謝され、これが発ガン性を示すと推定されている⁴⁾。このCHAへの転換を初めて実証したのは児島および一番ヶ瀬で、ヒト、イヌなどにサイクラミン酸ナトリウム (CHS·Na) を連続投与すると尿中にCHAが排せつされることをつきとめた⁵⁾。その後、多くの研究者によって、この代謝に関する研究が進められ、ヒト^{6)~12)}、ラット^{13)~16)}、ウサギ^{14),16)}、モルモット^{17),18)}およびサル²⁰⁾などの諸動物についても同様の転換が証明されている。¹⁴Cでラベルしたサイクラミン酸塩を用いたこれらの代謝実験では尿中 (0.1~38%) に最も多く排せつされるが、糞便中にも排せつが認められ、肝では全く代謝されないか、また代謝されても全投与量のわずか0.3%しか認められないことなどが指摘されている^{22)~24)}。この事実は、我が国でも朝比奈¹⁸⁾、および林²⁰⁾によってラット、モルモット、ウサギ、サルなどによる実験でも確認されている。このように肝にて代謝されにくいことから、1969年頃から、この転換は腸管内微生物の活性によるものと考えに向けられ始め^{21),26)}、これを裏付ける研究成果がDalderup²⁷⁾、一番ヶ瀬²⁸⁾、Drasarら²⁹⁾、朝比奈^{18),25)}、林¹⁹⁾によって次々と報告されている。特に末永³⁰⁾の抗生物質の投与がCHAの排せつを著しく低減するとの実験結果はCHS·Na資化様菌の存在を示唆する有力な手掛りとなった。

著者らは、この資化様菌が培地、すなわち、*in vitro*の培養条件下でもCHAを生成するかどうかを検討しつつ、一方では実験動物の腸管内マイクロフローラにおける資化様菌の動態ならびにその活性を究明するため本研究を企図した。すでに前2報では、サル、ウサギ、モルモット、ラットの腸管内微生物の関与を示唆する研究結果の一部を報告した。

今回は、これら資化様菌の検索をめざす培地とその培養条件の検討を*in vitro*で行ったところ、適切な条件が得られたので、ここに報告する。

実験材料ならびに方法

供試培地

CHS·Na資化様菌の検索用培地として、従来、用いられている次の5種の液体培地に0.5%のCHS·Naを添加した培地について検討した。

1) BC液体培地: Schaedlerら³¹⁾のBacteroides-Clostridia検出用培地からネオマイシンならびに寒天を

除いた培地

トリプチケース (BBL)	10 g
イーストエキストラクト (Difco)	5 "
プロテオゼペプトン No. 3 (Difco)	5 "
ブドウ糖	5 "
トリスバッファー7~9	3 "
ブラセンダーパウダー (N.B.C.)	2 "
*ヘミン溶液	10 ml
**シスチン溶液	10 "
蒸留水	1,000 "
pH	7.2

2) VF ブイヨン

3) 無菌試験用チオグリコール酸ナトリウム培地 TGC (Daigo-Eiyo)

4) トリプチケース・ソイ・ブロス (BBL)

5) 普通ブイヨン

培養方法

1) 嫌気培養

著者らは Fig. 1 (I) に示すような嫌気培養法を考案した。

すり合わせ活栓付培養管 A (600 ml, 前田製作所) の5本に、それぞれ上記の培地 300 ml を取り、CHS·Naを投与し、尿中にCHA排せつ中のサルの新鮮糞便 0.1 g (1 ml) を接種し、活栓にシリコングリースを塗抹して密栓した後、直ちに洗気びん B の矢印の所を真空ポンプに接続、約60分吸引 (水銀柱 15 mg 以下) の後、炭酸ガス10%、窒素ガス90%の混合ガスを培養管内がわずかに陽圧になるように心掛けて充てんした。ガスの充てんが終わってから矢印の部分ピンチコックで止め、洗気びん B に接続、ピンチコックをはずして洗気びん B の黒い部分の空気を混合ガスで置換し、モノシン (大洋科学

Fig. 1. Apparatus for the anaerobic cultivation

* ヘミン 100 mg + H₂O 99 ml + 5N·NaOH 1 ml.
** シスチン 4 g + H₂O 99 ml + 5N·NaOH 8 ml.

工業)にて37°, 14日間振とう培養を行った。なお酸性硫酸銅水溶液で処理した Steel wool と Riemsdijk の指示薬を入れた洗気びん A は脱酸素ならびに培養管内が陰圧になったとき、洗気びん B 中の 0.5 N-塩酸の逆流を防ぐため、また洗気びん B 中の 0.5 N-塩酸は培養管がガス発生により陽圧になったとき、ガス化した CHA を捕集し、かつ培養管の培地を空気からシャ断する目的に使用した。また Fig. 1 (II) の L 字型培養管 A' (150 ml 前田製作所) も (I) と全く同じ目的で操作を行った。

2) 好気培養

ガス捕集用のガラス管と通気用キャピラリーを取り付けたゴムせんをほどこした滅菌坂口フラスコに上述の培地 300 ml をとり、消泡剤としてシリコンオイルを1~2滴添加し、エアポンプにより通気しながら37°, 14日間振とう培養を行った。なおこの場合も発生するガスを0.5 N-塩酸の入った洗気びんを通してガス化した CHA の捕集につとめた。

CHS·Na 至適濃度

CHS·Na を BC 液体培地に0.1, 0.25, 0.5, 1.0%の割合に添加し、Fig. 1 (II) の培養装置を用いて嫌気培養を行った。

BC 液体培地の至適 pH ならびに培養日数

CHS·Na 0.25%添加 BC 液体培地の pH をベックマン (ZEROMATIC SS-3) の pH メータを用いて、6.5, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0に修正。Fig. 1 (II) を用いて21日間嫌気培養を行った。

CHA 排せつサル糞便採取時期

4 kg のサルに 20% CHS·Na 水溶液 5 ml (250 mg/kg) をゴムゾンデにより、5~7日胃内径口投与し、採尿ケージを用いて尿を採取、ガスクロマトグラフにより尿中 CHA を定量し、1日尿中 CHA 量として 100 mg 前後を排せつする時期の糞便を試料とした。

糞便試料の調整

新鮮糞便 (いわゆるキバリ便) を滅菌共せん遠沈管 (20 ml) に採取、秤量、0.05%寒天加トリプチケース・ソイ・ブロスを加えて、10倍に希釈し、滅菌ピペットで軽く碎挫してから、KM 式万能シェーカー ((株)イワキ) にて、2分間振とうし、滅菌脱脂綿でろ過、このろ液 1 ml (0.1 g) を各培地に接種した。

CHA の抽出ならびに定量方法

1) 尿

尿中 CHA の抽出ならびに定量は朝比奈らの方法¹²⁾に準じた。すなわち尿 30 ml を 6 N-水酸化ナトリウム溶液により pH 13 に修正し、分液漏斗に移し、クロロホルム (特級) 30 ml を加えて、KM 式万能シェーカーで5分間振とう後、しばらく放置して、クロロホルム層が分離したものはクロロホルム層のみを、分離しないものは試料全部を共せん遠沈管に移し、3,700×g, 30分間遠

沈し、分離したクロロホルム層 20 ml を共せん遠沈管にとり、0.5 N-塩酸 1 ml を加えて再び5分振とう後、クロロホルム層を捨て、塩酸層 0.5 ml を共せん小遠沈管にとり、6 N-水酸化ナトリウム溶液で pH 13 とし、内部標準物質として1% *n*-トリデカン含有クロロホルム液 0.2 ml を加えてさらに5分間振とう、このクロロホルム層をガスクロマトグラフィの試料液とした。

2) 培地

所定日に採取した BC 液体培地の 30 ml、または 15 ml に、トリクロール酢酸を1/10量を加え、1夜放置後、遠沈 (3,000×g 30分) し、上澄み液を試料とした。以後の抽出は尿と同様な方法で行った。

測定機械ならびに条件

ガスクロマトグラフィは下記の条件で行った。

Apparatus

YANAGIMOTO Gas Chromatograph GCG-550F

Column

Glass i.d. 3 mm length 150 cm

20% carbowax 20M 3% KOH/chromosorb G

AW-DMCS 80/100 mesh

Column condition

Temp., 94°C; carrier gas, N₂ 22.5 ml/min.

Detector condition

Detector, FID; temp., 210°C; H₂, 25 ml/min; Air, 0.85 L/min; sensitivity, 10⁹; attenuator, 1/4.

Injection temp., 200°C.

検量線

1) 尿

CHS·Na 未投与のサル尿 30 ml に CHA をそれぞれ 1, 2, 3, 4, 6, 12 mg を添加し、上述の方法で操作した (Fig. 2-I)

2) 培地

BC 培地 80 ml に CHS·Na 未投与のサルの糞便を 0.1 g 接種して14日間嫌気培養した後培養液 30 ml にトリクロール酢酸を10%に加え、1夜放置後、遠沈 (3,000×g, 30分) し、その上澄みに尿と同様に CHA を添加して操作した (Fig. 2-II)

実験成績

1) 培地ならびに培養条件

5種の供試培地それぞれに CHS·Na を0.5%に添加し、嫌気培養 (Fig. 1-II) と好気培養 (坂口フラスコ) を行い、培地中の CHA 産生量を比較した成績を Fig. 3 に示す。

まず培養条件をみると、培地の種類の別なく、全般に嫌気培養の方が CHA の産生が良好に認められた。その中でも特に BC 液体培地が最も優れ、14日間培養では 21.35 mg (CHA/培地 30 ml) と最高値を示している。これに対し、好気培養では、普通ブイヨンが14日目に 3.35 mg (CHA/培地 30 ml) を産生したのみで、ほかは

Fig. 2. I: Calibration curve of cyclohexylamine obtained from 30 ml of monkey urine

II: Calibration curve of cyclohexylamine obtained from 30 ml of BC medium

Peak height ratio was calculated from the height of cyclohexylamine and of internal standard (*n*-tridecane)

Fig. 3. Relationship between medium and cyclohexylamine production

2 mg 以下あるいはこん跡程度であった。また培養中に発生するガス中の CHA を捕集する目的で行った 0.5 N-塩酸からの抽出は、嫌気培養では検出できなかったのに対して、好気培養では、そのほとんどがこん跡程度の検出が確認された。

2) CHS·Na 至適濃度

前回の実験で BC 液体培地が転換に最も適した培地と認められたので、次に CHA 転換に最も高効率と思われる培地中の CHS·Na の濃度を検討するため BC 液体培地に CHS·Na を 0.1~1.0% の 5 段階に添加して、37°, 14 日間培養した結果を Fig. 4 に示す。

Fig. 4. Effect of concentration of sodium cyclamate on production of cyclohexylamine

CHS·Na: ●, 0.10%; ○, 0.25%; ▲, 0.50%; △, 1.00%.

Fig. 5. Effect of pH of BC medium on production of cyclohexylamine

pH: ○, 6.5; ●, 7.0; △, 7.5; ▲, 8.0; □, 8.5; ■, 9.0

0.25%添加が最も良好で、14日目に 18.4 mg (培地 30 ml) の CHA 産生が認められた。

3) BC 液体培地の至適 pH ならびに培養日数

至適 pH と培養日数の検討は、pH 6.5~9.0 に調整した 0.25% CHS·Na 添加 BC 液体培地に糞便を接種、37°, 21日間培養して CHA の定量を行った。その結果を Fig. 5 に示す。

pH 8.0 の14日間培養が最も良好で、19.2 mg (培地 30 ml) の CHA 産生を示した。

考 察

CHS·Na 投与動物の糞便中より CHA 転換菌検出用の至適培地と培養条件を検討する目的で、CHA 尿中排せつ中のサル糞便を用い、CHS·Na 添加の5種の液体培地を著者が考案した振とう式の嫌気性菌培養装置 (Fig. 1) によって培養を試みたところ、0.25% CHS·Na 添加の BC 液体培地 (Bacteroides—Clostridia 検出用培地からネオマイシンならびに寒天を除去) pH 8.0, 37°, 14日間の嫌気培養法が最も高い CHS·Na の分解活性を示す菌群の存在を示唆した。したがって本培地ならびに培養の諸条件にて、腸管内容物または糞便などから CHS·Na 資化様菌を的確に、かつ能率よく検出できるものと考えられる。

この著者らの CHA 転換菌の究明に関する研究に関連する報告としては、朝比奈ら^{18), 26)} も同様の検討を行っているが、モルモットの盲腸内容物よりの検索では CHS·Na—ビタミン添加無機塩培地 (CHS·Na—Inorganic Salts—Vitamins Medium) が良好な結果を示し、Drasar ら²⁹⁾の研究では [¹⁴C] CHS·Ca 投与ラット、ウサギなどの糞便や盲腸内容物中の CHS·Na 分解菌の活性について、Todd—Hewitt broth が基本培地として最適の結果を得ている。これらの培地と著者らの BC 液体培地と詳細な比較実験は行っていないが、文献上で培地の組成を比べてみると、前者は主として *Pseudomonas*, また後者は *Streptococci* を目的とした培地であり、腸管内に生息する偏性嫌気性菌群も含めた検出培地ではないように思われる。従来用いられている偏性嫌気性菌群検出用培地は血液、臓器の抽出液、卵黄などの種々の有機物が添加されたものが多く用いられているために CHA の抽出時の妨害となることがあり、これを避けるためにも、また培地作製に当たっての煩雑などを考慮に入ると、我々の本 BC 液体培地は実験結果の示すとおり、以上の欠点を補った良好な培地と考えられた。

動物体中における CHS·Na の CHA への代謝が腸管内微生物の活性によるという事実は、先に述べた研究者によってすでに指摘されているが、まだこの CHA 排せつの挙動が動物の種や個体によって著しく異なる点などを gut flora の構成の特徴や転換菌の定着性の有無などから詳細に追究してみた成績は見当たらない。こ

れらの諸点を解明するために、現在この培地の検討で得られた *in vitro* の培養手技を適用しながら進めつつあるが、これらの結果は数報に分けて次に報告することにしたい。

結 語

in vitro における CHA 産生を指標に置いて、CHA 尿中排せつサル糞便から CHS·Na 資化様菌の検索に必要な培地ならびに培養の諸条件について検討した結果、pH 8.0 に修正した CHS·Na 0.25%添加 BC 液体培地の14日間の嫌気性振とうが最適の条件であることを確認した。

文 献

- 1) 厚生省食品衛生課: 食品衛生研究, **20**, 120 (1970).
- 2) Taylor, J. D., Richards, R. K., Davin, J. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **78**, 530 (1951).
- 3) Schoenberger, J. A., Rix, E. M., Sakamoto, A., Taylor, J. D.: Am. J. Med. Sci., **225**, 551 (1953).
- 4) Price, J. M., Biava, C. G., Oser, B. L., Vogin, E. E., Steinfeld, J., Ley, H. L.: Science, **167**, 1131 (1970).
- 5) Kojima, S., Ichibagase, H.: Chem. Pharm. Bull., **14**, 971 (1966).
- 6) Leahy, J. S., Wakefield, M., Taylor, T.: Fd. Cosmet. Toxicol., **5**, 447 (1967).
- 7) Sonders, R. C., Wiegand, R. G.: Toxicol. Appl. Pharmacol., **12**, 291 (1968).
- 8) Davis, T. R. A., Adler, N., Opsahl, J. C.: *ibid.*, **15**, 106 (1969).
- 9) Kojima, S., Ichibagase, H.: Chem. Pharm. Bull., **17**, 2620 (1969).
- 10) Wills, J. H., Jamson, E., Stoewsand, G., Coulston, F.: Toxicol. Appl. Pharmacol., **12**, 292 (1969).
- 11) Litchfield, M. H., Swan, A. A. B.; *ibid.*, **18**, 535 (1971).
- 12) Asahina, M., Yamaha, T., Watanabe, K., Sarrazin, G.: Chem. Pharm. Bull., **19**, 628 (1971).
- 13) Elliott, T. H., Lee-Yoong, N. Y., Yao, R. C. C.: J. Biochem., **109**, 11 (1968).
- 14) Oser, B. L., Carson, S., Vogin, E. E., Sonders, R. C.: Nature, **220**, 178 (1968).
- 15) Sonders, R. C., Netwal, J. C., Wiegand, R. G.: Pharmacologist, **11**, 241 (1969).
- 16) Kojima, S., Ichibagase, H.: Chem. Pharm. Bull., **16**, 1851 (1968).
- 17) Asahina, M., Yamaha, T., Sarrazin, G., Watanabe, K.: *ibid.*, **20**, 102 (1972).

- 18) Asahina, M., Niimura, T., Yamaha, T., Takahashi, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 711 (1971).
- 19) 林 長男, 岩原繁雄, 谷村顕雄, 降矢 強, 川俣一也, 金子豊蔵: *衛生試報*, **91**, 11 (1973).
- 20) 林 長男, 岩原繁雄, 谷村顕雄, 降矢 強, 川俣一也, 金子豊蔵: *同上*, **90**, 14 (1972).
- 21) Golberg, L., Parekh, C., Patti, A., Soike, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **14**, 654 (1969).
- 22) Wallace, W. C., Lethco, E. J., Brouwer, E. A.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **175**, 235 (1970).
- 23) Prosky, L., O'Dell, G. O.: *J. Pharmaceutical Sciences*, **60**, 1341 (1971).
- 24) Renwick, A. G., Williams, R. T.: *Biochem. J.*, **129**, 869 (1972).
- 25) 朝比奈正人: *食衛誌*, **13**, 133 (1972).
- 26) Renwick, A. G., Williams, R. T.: *Biochem. J.*, **114**, 78 (1969).
- 27) Dalderup, L. M., Keller, G. H. M., Schouten, F.: *Lancet*, **1**, 845 (1970).
- 28) Ichibagase, H., Kojima, S., Suenaga, A.: *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1093 (1972).
- 29) Drasar, B. S., Renwick, A. G., Williams, R. T.: *Biochem. J.*, **129**, 881 (1972).
- 30) Suenaga, A., Kojima, S., Ichibagase, H.: *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1357 (1972).
- 31) Schaedler, R. W., Dubos, R., Costello, R.: *J. Exp. Med.*, **122**, 59 (1965).