腸内細菌及び緑膿菌によるニトロソアミンの分解

(昭和 61 年 7 月 15 日受理)

中 浜 隆 之* 浦久保五郎*

Degradation of *N*-Nitrosamines by Enteric Bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*

Takayuki NAKAHAMA and Goro URAKUBO

(School of Pharmaceutical Science, Toho University: 2-1
Miyama 2, Funabashi-shi, Chiba Prefecture, Japan)

Degradation of diphenylnitrosamine (DPN), diethylnitrosamine (DEN), and *t*-butylethylnitrosamine (*t*-BEN) by several kinds of enteric bacteria was investigated and the following results were obtained.

1) The degradation rates of DPN and DEN by 5 kinds of enteric bacteria during a 24-hour incubation were 66~90% (control, 15%) and 4~16% (control, 2%), respectively.

2) In experiments with *Pseudomonas aeruginosa* under the same conditions, 85% (control, not degraded) of DPN and 18% (control, 8%) of DEN were degraded, but *t*-BEN was practically not degraded.

3) It was found that 84% (control, 8%) of DPN and 31% (control, 11%) of DEN were degraded by bacteria extracted from the cecal content of guinea pig, but *t*-BEN was not degraded under the same conditions.

(Received July 15, 1986)

Key words: ニトロソアミン nitrosamine; 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*; 腸内細菌 enteric bacteria; ジフェニルニトロソアミン diphenylnitrosamine; ジエチルニトロソアミン diethylnitrosamine; *t*-ブチルエチルニトロソアミン *t*-butylethylnitrosamine

まえがき

ニトロソアミン (NA) がほ乳動物の体内で第二アミンから生成されることは知られているが、第二アミンと亜硝酸を加えた培地中で *E. coli*, *P. vulgaris* など数種の微生物により生成を触媒されるという報告¹⁾もある。また逆に *in vitro* 実験でジフェニルニトロソアミン、*N*-ニトロソピロリジン、ジメチルニトロソアミンが *E. coli*, *Lactobacillus* などの腸内細菌により分解されるという報告²⁾もみられる。

本報では、異なった置換基をもつ NA としてフェニル基をもつジフェニルニトロソアミン (DPN), 直鎖置換基のジエチルニトロソアミン (DEN), 及び分枝置換基の *t*-ブチルエチルニトロソアミン (*t*-BEN) を選び、諸種の腸内細菌菌株が増殖する過程で NA が分解する程度を調べた。また、ある種の緑膿菌は、常在の腸内細菌では分解されにくい化合物でも分解する場合があることから、特に緑膿菌について詳しく調べ、更に混合菌の相乗作用の例として盲腸内細菌を選び NA が時間とともにどのように分解するかを調べた結果を報告する。

* 東邦大学薬学部: 千葉県船橋市三山 2-2-1

実験方法

1. 試薬及び装置

スルファニルアミド: 特級 (小宗化学薬品)
N-1-ナフチルエチレンジアミン (二塩酸塩): 特級 (小宗化学薬品)
 スルファミン酸: 特級 (小宗化学薬品)
 酢酸: 特級 (小宗化学薬品)
 塩酸: 特級 (小宗化学薬品)
 硫酸ナトリウム (無水): 1 級 (小宗化学薬品)
 塩化ナトリウム: 特級 (小宗化学薬品)
 ジクロロメタン: 特級 (小宗化学薬品)
n-ブタノール: 特級 (小宗化学薬品)
 アンモニア水: 1 級 (小宗化学薬品)
 ジフェニルニトロソアミン: (東京化成工業)
 ジエチルニトロソアミン: (東京化成工業)
t-ブチルエチルニトロソアミン: (東京化成工業)
 普通ブイヨン: (栄研化学)
 振とう機: Recipro Shaker SR-II (大洋科学)
 分光光度計: Spectronic 20 A (島津製作所)
 遠心分離機: M-160 型 (佐久間)

2. 培養液中の NA の定量法

1) 定量法

NA の定量は、伊藤ら³⁾の報告した食品中の第二アミンと NA の総量の定量方法すなわち第二アミンを NA に変え、NA の総量を再び分解して生成する亜硝酸を常法により比色定量する方法を培地中の NA だけを定量するように簡略化して行った。

50 ml ネスラー管に酢酸 2 ml, 0.2 mM スルファミン酸溶液 10 ml, 精製水 1 ml を取り、アンモニア水 1 滴

を加えて pH を 2 とした液の中に NA を含む試料溶液 1 ml を加え、亜硝酸が窒素として十分に放出除去されるように開栓したまま室温で 30 分間放置した。次に氷冷下 30% 水酸化ナトリウム 13 ml と塩化ナトリウム 2 g を加えて溶解し、蒸留により精製したジクロロメタン 30 ml を加えて分液漏斗中で 10 分間機械振とうして抽出を行った。抽出混液を 2,000 rpm 5 分間遠心分離して、ジクロロメタン層を分取した。得られたジクロロメタン層に硫酸ナトリウムを加えて脱水し、上清を 50 ml 共栓メスシリンダに傾斜して移し、ジクロロメタンを加えて正確に 40 ml とした。混和後 20 ml を分取し、遠沈管に移し、*n*-ブタノール 5 ml, 1% スルファニルアミドの 30% 酢酸-エタノール溶液 1 ml, 0.18% *N*-1-ナフチルエチレンジアミンの 30% 酢酸-ブタノール溶液 1 ml, 塩酸-ブタノール (1:2) 混液 3 ml を加えて、 57° の恒温槽中で 30 分間加熱した。その後 100° の沸騰水浴中に浸し、DPN と *t*-BEN の場合は 5 分間、DEN の場合は 15 分間加熱して呈色させた。放冷した後、濃縮された混液に *n*-ブタノールを加えて 10 ml とした溶液について 552 nm における吸光度を測定した。なお対照には試料 1 ml の代りに合成培地を用いて同様の操作を施したものをを用いた。定量法の概略を Scheme 1 に示す。

2) 振とう時間の検討

定量法 (Scheme 1, Step 2) において NA のジクロロメタン抽出を機械振とうにより行ったが、振とう時間による抽出量への影響について DPN を用いて実験した。他の条件はすべて同様にし、振とう時間を 3, 5, 10, 15, 20 分間と変えて吸光度を比較した。

3) 加熱時間の検討

定量法の最終操作 (Scheme 1, Step 3) のカップリングによる呈色を比色測定する際の検液の吸光度は、加熱時間により影響を受けることが見られた。それぞれの最大値を知るため、100°での加熱時間を5, 10, 15, 20, 25分間と変えて吸光度を比較した。

4) 検量線

DPN, DEN, *t*-BEN のそれぞれ 1 mmol (DPN 198 mg, DEN 102 mg, *t*-BEN 130 mg) に DMSO を加えて溶かし、200 ml とした。この液に後記の合成培地を加えて 1 μ mol/ml に薄めたものを原液とした。原液を段階的に薄めた液 1 ml をとり、NA の定量法に従って操作を行った。

3. 諸種菌株による NA の分解

菌株には一般的な腸内細菌を主として次に示す5種の株を用いた。*Escherichia coli* ATCC 8739 (*E. coli*), *Proteus vulgaris* sp. (*Prot. vul.*), *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (*Cit. freu.*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (*Pseud. aer.*), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8329 (*Kleb. pneu.*)。斜面培養からコロニー1白金耳ずつを取り、普通ブイヨン 15 ml を入れた試験管中に植え継ぎ、37°, 24 時間培養した。各菌の培養液 10 ml ずつを取り、普通ブイヨン 300 ml を入れた三角フラスコ内へ植え継ぎ、37°, 24 時間振とう培養した。各培養液 300 ml を 3,800 $\times$ g, 10分間遠心分離し、沈降した菌体を生理食塩水で2回懸濁洗浄を行い、生理食塩水を加えて一定量とし菌数を測定したものを各々の菌原液とした。なお菌数の測定には、この菌原液を生理食塩水で一定量に希釈して 420 nm の吸光度を測定し、常法により吸光度と生菌数との関係から菌数を算定した。

分解実験には次の組成の合成培地を用いた。リン酸水素二カリウム 70 g, リン酸二水素カリウム 30 g, クエン酸ナトリウム (二水塩) 5 g, 硫酸マグネシウム (七水塩) 1 g, 硫酸アンモニウム 10 g, カサミノ酸 10 g, ブドウ糖 2 g, 硫酸第一鉄 (七水塩) 0.25 mg, 硫酸亜鉛 (七水塩) 0.25 mg, 硫酸マンガン (三水塩) 0.25 mg, 塩化カルシウム 10 mg を精製水に溶かして 1 L とし、pH 7.1 に調整した。

DPN と DEN の DMSO 溶液をそれぞれ 0.25 mM となるように添加した合成培地 200 ml を 300 ml の三角フラスコにとり、あらかじめ調製した5種の菌原液の希釈懸濁液を総菌数約 10^8 個を含むように加えた。ただちに 37°で振とう培養を行い、0, 12, 24 時間後の培養液 5 ml ずつ採取し、2°, 3,800 $\times$ g, 10 分間遠心分離を行った。上清 1 ml を試料溶液として用いて以下 Scheme 1 に従って NA の定量を行った。なお、DPN と DEN を含む菌を加えず振とうした培地を対照として用いた。

4. 緑膿菌による NA の分解

DPN, DEN, *t*-BEN を用い、それぞれの DMSO 溶液

を最終濃度 50 mg/L となるように合成培地中に添加し、次に約 10^8 個の *Pseud. aer.* を含むように菌懸濁液を添加した。ただちに 37°で振とう培養を行い、0, 3, 6, 12, 18, 24時間後に培養液 5 ml を採取し、2°, 3,800 $\times$ g, 10 分間遠心分離を行った。その上清 1 ml を試料溶液として用いて、以下 Scheme 1 に従って NA の定量を行った。なお、NA を含む菌を加えずに振とうした培地を対照として用いた。

5. モルモット盲腸内細菌による NA の分解

Hartley 系雄モルモット (体重 300~400 g) 1 匹から盲腸内容物 2 g を取り生理食塩水 100 ml に加え10分間機械振とうした。その懸濁液を綿ろ過し、ろ液を 1,000 rpm で5分間遠心分離した。上清 20 ml を取り、普通ブイヨン 200 ml に加え、37°, 24時間静置培養を行い、3,800 $\times$ g, 10 分間遠心分離し、沈降した菌体を生理食塩水で懸濁洗浄を行い菌原液を得た。以降の分解実験には DPN, DEN, *t*-BEN を用い、前記の緑膿菌の場合と同じ操作を行った。

実験結果

1. 培養液中の NA の定量法

1) 振とう時間の検討

振とう時間による抽出量への影響についての実験結果を Fig. 1 に示す。10分から15分の間にピークがあり、この間に変化が見られなかったので、抽出のための振と

Fig. 1. Relationship between optical density of final reaction mixture and shaking time for extraction with dichloromethane

The reaction mixture described in step 1 of Scheme 1 was extracted with 30 ml of dichloromethane by shaking for 5, 10, 15, or 20 min. Diphenylnitrosamine (0.5 mM) were used as a sample solution.

Fig. 2. Relationship between optical density of final reaction mixture and heating time at 100°C

The reaction mixture described in step 3 of Scheme 1 was heated at 57°C for 30 min and then at 100°C for 5, 10, 15, 20, or 25 min. Nitrosamines (0.5 mM) were used as sample solutions.

Fig. 3. Calibration curves of nitrosamines, obtained in determination of DPN, DEN and *t*-BEN by procedure shown in Scheme 1

う時間は10分間とした。

2) 加熱時間の検討

加熱時間の吸光度への影響についての実験結果を Fig. 2 に示す。以後の定量には、呈色の最大値をとって DPN と *t*-BEN の加熱時間は5分間、DEN は15分間とした。

Fig. 4. Degradation of DPN by 5 strains of enteric bacteria after incubation of the media containing these strains and 0.25 mM DPN

Fig. 5. Degradation of DEN by 5 strains of enteric bacteria after incubation of the media containing these strains and 0.25 mM DEN

3) 検量線

各濃度の NA を Scheme 1 の試料の代りに用い定量操作を行い得られた検量線を Fig. 3 に示す。

2. 5 種の菌株の比較について

5 種の菌株による DPN 及び DEN の分解結果をそれぞれ Fig. 4, Fig. 5 に示す。

各菌株による DPN の24時間後の分解率は、対照実験で 15%, 菌を加えたとき *Prot. vul.* 90%, *E. coli* 87%, *Cit. freu.* 81%, *Pseud. aer.* 66%, *Kleb. Pneu.* 66% の分解を示し、菌株による大きな差は見られなかった。また DEN の24時間後の分解率は、対照実験で 2%, 菌を加えたとき *Cit. freu.* 16%, *Prot. vul.* 12%,

Fig. 6. Degradation of nitrosamines by *Pseud. aer.* after each interval during incubation of the media containing 50 mg/L DPN, DEN and *t*-BEN

—●—: DPN; ---○---: DPN control
—▲—: DEN; ---△---: DEN control
—■—: *t*-BEN; ---□---: *t*-BEN control

Fig. 7. Degradation of nitrosamines by bacteria in cecal content after each interval during incubation of media containing 50 mg/L DPN, DEN and *t*-BEN

—●—: DPN; ---○---: DPN control
—▲—: DEN; ---△---: DEN control
—■—: *t*-BEN; ---□---: *t*-BEN control

Pseud. aer. 9%, *E. coli* 7%, *Kleb. pneu.* 4% であり, *Cit. freu.* では他の菌株に較べて分解率が高かったが, 一般に DPN に較べて分解率は著明に低かった.

3. 緑膿菌について

Pseud. aer. を用いて, 培養24時間まで6回測定した

NA の分解結果を Fig. 6 に示す. DPN については, 対照実験で分解しなかったが, 菌体を加えたときは培養時間の経過によりほとんど直線状に分解が進み24時間で85%が分解された. DEN の分解率については24時間で対照は8%, 菌体を加えたとき18%であった. また *t*-BEN の分解率は対照で8%, 菌体を加えたとき5%で, 菌による分解が認められなかった.

4. 盲腸内細菌について

モルモット盲腸内細菌による NA の分解結果を Fig. 7 に示す. DPN の24時間後の分解率は対照実験で8%, 菌体を加えたとき84%であった. DEN の24時間後の分解率は対照で11%, 菌体を加えたとき31%であったが, *t*-BEN は分解が認められなかった.

考 察

5種の菌株による NA の分解実験では, いずれの菌株の場合にも DPN は DEN より大きな分解率を示した. それぞれの NA の分解率は菌株の種類によって大きな差はなく, いくらか見られる差異は菌の種類による増殖の相違に基づくものと考えられる. *Pseud. aer.* 及び盲腸内細菌による分解実験の結果では, DPN がよく分解され, DEN の分解よりも著明な差がみられた. Rowland ら²⁾は, NA の本実験濃度の1/5すなわち0.05 mM以下の希薄な濃度で, 腸内細菌により DPN が *N*-ニトロソピロリジン及びジメチルニトロソアミンよりもはるかに速く分解されることを報告しているが, 本実験の結果も一致している. しかし, 盲腸内細菌による分解実験では, DPN の分解では *Pseud. aer.* の場合よりも分解率が低いにもかかわらず, DEN では, より高い分解率を示した. これは, 盲腸内細菌のうちに DEN をよりよく分解する菌株が含まれていたものと思われ, 菌の種類により分解されやすい NA が異なるというような特性があることが示唆される.

本実験では, 異なった置換基をもつ NA として DPN, DEN 及び *t*-BEN の3種を用いた結果として, DPN は菌により著しく分解し, DEN も多少の分解が見られたが, *t*-BEN では分解が認められなかった. 細菌による化合物の分解作用は通常加水分解または還元によるものであることがよく知られており⁴⁾, 一方本実験の定量法では >N-N= 結合の開裂をみているが, 定量法の加熱時間の検討 (Fig. 2) では NA の分解により生じた亜硝酸による吸光度が最大を示す時間は, DPN と *t*-BEN では5分間, DEN は15分間で, 3者のうちでは比較的熱に安定な化合物であると考えられる. 従って, DPN は熱にも生物的にも分解されやすく, DEN と *t*-BEN を比較すると, DEN は *t*-BEN よりも化学的には安定であるが, 生物的には分解されやすいといえる.

以上のように置換基の相違により, >N-N= 結合の細菌に対する抵抗性に相違がみられ, *t*-BEN が DEN よりも細菌により分解されにくいのは置換基が分枝してい

るためであろうと推察されるが、詳しくは今後の検討を要する。

なお本実験は好氣的条件のみで行ったため、実際のほ乳動物の腸内では、嫌氣的条件が大きな割合を占めると思われ、NA の分解は今回の実験結果と同様の傾向を示すかどうかは疑問であり、今後の検討を要する。しかし、DPN などの分解されやすい NA がもし体内に導入されると、消化管で分解されてから吸収されることが多く、比較的分解されにくい NA はそのままの形で吸収されるものと考えられる。従って、腸内に存在する細菌の種類と量の違いにより、体内に導入された NA の作用が影響を受けると思われる。

結 語

本報告では、3 種のニトロソアミンを用いて、数種の腸内細菌による分解の程度を調べた。

1) 5 種の菌株による DPN の分解率は、24時間の培養で対照実験 15%、菌体を加えたとき 66~90% であり、DEN は対照で 2%、菌体を加えたとき 4~16% で

あった。

2) *Pseud. aer.* による同条件の DPN の分解率は対照実験では分解せず、菌体を加えたとき 85% であり、DEN は対照で 8%、菌体を加えたとき 18% であったが、*t*-BEN は分解されなかった。

3) モルモットの盲腸内細菌による同条件の DPN の分解率は対照で 8%、菌体を加えたとき 84% であり、DEN は対照で 11%、菌体を加えたとき 31% であったが、*t*-BEN は分解されなかった。

文 献

- 1) Hashimoto, S., Kawai, Y., Mutai, M.: *Infection & Immunity*, **11**, 1405~1406 (1975).
- 2) Rowland, I. R., Grasso, P.: *Applied Microbiology*, **29**, 7~12 (1975).
- 3) 伊藤誉志男, 谷村顕雄: 食衛誌, **12**, 177~184 (1971).
- 4) 高島英伍, 吉村英敏編: “衛生化学新論” p. 86~87 (1980) 南山堂.