

①

# 胆汁酸代謝を利用した 腸管内細菌発育評価法の研究

—ウルソデオキシコール酸のパラアミノ安息香酸抱合体について—

前田 頼 伸

# 胆汁酸代謝を利用した 腸管内細菌発育評価法の研究

— ウルソデオキシコール酸のパラアミノ安息香酸抱合体について —

前田 頼 伸

# 目 次

序 論	3
本 論	8
第一章 胆汁酸抱合体の合成	11
第一節 ウルソデオキシコール酸のパラアミノ安息香酸抱合体 (PABA-UDCA)の合成	11
第二節 ウルソデオキシコール酸のL-ロイシン抱合体の合成	14
第三節 ウルソデオキシコール酸のL-リジン抱合体の合成	14
第四節 各種胆汁酸抱合体の純度	15
小 括	15
第二章 胆汁酸抱合体の酵素水解	16
第一節 パンクレアチンの影響	18
第二節 カルボキシペプチダーゼAの影響	18
第三節 カルボキシペプチダーゼBの影響	20
第四節 トリプシンの影響	20
第五節 $\alpha$ -キモトリプシンの影響	20
第六節 血清中酵素の影響	20
第七節 肝ホモジネートの影響	21
第八節 小腸粘膜上皮ホモジネートの影響	21
第九節 細菌性コリルグリシンヒドロラーゼの影響	21
小 括	23
第三章 PABA-UDCAに対する腸管内細菌の脱抱合能	24
第一節 好気性菌の影響	24
第二節 嫌気性菌の影響	26
小 括	27

第四章	PABAとPABA-UDCAの吸収挙動	28
第一節	PABAの吸収	28
第二節	PABA-UDCAの吸収	30
小  括		31
第五章	PABA-UDCAの動物投与試験	34
第一節	PABAの投与試験	35
第二節	最小有効採尿時間	35
第三節	無処置群について	35
第四節	抗菌剤処置群について	37
第五節	腸管内停滞係蹄群について	39
第六節	糞便中の細菌数について	39
小  括		40
総  括		41
要  約		46
実験の部		48
文  献		57
謝  辞		61

## 序 論

ヒトの腸内には、生後まもなく多種多様の細菌が定着し、そののちは一生の間ひとときも腸内細菌なしで過ごすことはない。口から侵入した細菌のうち特に腸内に住むのに適したものだけが一定のバランスを保ちながら腸内細菌叢を構成することになる。ヒトが腸内にもっている細菌の種類は100種近くにもおよび、その数は100兆以上もある。腸内細菌を構成する細菌の種類や数は、消化管の部位によって異なり、健常人の場合、好気性菌と嫌気性菌に分類してみると Figure 1 のようになる。

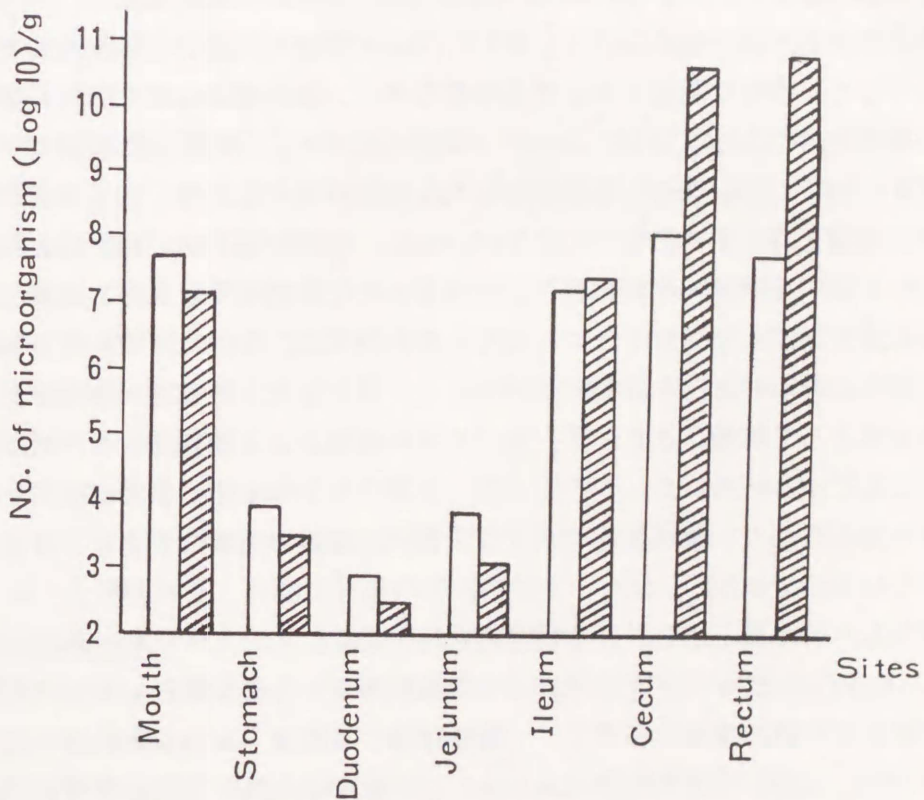


Fig.1 Bacterial flora of various sites of alimentary tract.

Open bar : aerobic bacteria,

Oblique line bar : anaerobic bacteria.

唾液では、総菌数  $10^7/g$  で、好気性菌と嫌気性菌はほぼ同程度の菌数から構成されている。胃では、胃酸のため菌数が少なく、空腹時では  $10^3/g$  以下である。食物摂取直後 pH が上昇し  $10^4-10^8/g$  になるが、食物に胃酸が混ざると再び菌数は減少する。十二指腸・空腸でも菌数は少なく  $10^1-10^4/g$  である。しかし、回腸では、総菌数が上昇し大腸への移行菌叢を示し、空腹時でも多数の菌 ( $10^5-10^9/g$ ) が検出される。更に、回盲弁を境として菌叢の著しい変化がおり、盲腸では、既に糞便類似の菌叢となり総菌数も  $10^{11}/g$  に達し、その 99-99.9% は嫌気性菌で占められるようになる<sup>1-7)</sup>。

腸内細菌は毎日食餌成分や身体から腸内に分泌または排泄されたものを栄養として生命活動を営んでいる。腸内細菌の物質代謝に於ける酵素の種類は、肝臓の酵素の種類より多いと言われており、しかもこれらの酵素は肝臓の様に身体に有用な物質だけでなく、有害な物質を産生する酵素も多く、腸内細菌は宿主に対し有用と有害の2面性を持つことになる<sup>1, 8-10)</sup>。有用な面では、腸内細菌が各種ビタミン類の合成を行なうこと、また、病原性を有する細菌が侵入した時、常在細菌がその定着或いは増殖を阻止することなどが挙げられる。有害な面では、潜在的に病原性をもっている腸内細菌が、身体の抵抗力が減退したとき病原性を発揮し臓器に入り込んで感染症を起こしたりすること、また、腸内細菌は、N-ニトロソ化合物などの生成を行ない身体に有害な影響を及ぼすこと、更にまた、ある種の毒物がグルクロン酸抱合体として解毒されたとき、腸内で腸内細菌による脱抱合により再び毒化されることなどが挙げられる。このように、正常なヒトでも腸内細菌は有用と有害の2面性を有しており、腸内細菌の異常な変動や、菌叢の急激な変化は、身体にとって好ましいものではない。

健康なヒトの小腸上部に於ける細菌の数は少なく、主として Lactobacillus sp.、Enterococcus sp. などのグラム陽性通性嫌気性菌がいるにすぎないが、胃切除、胃酸減少症などの胃の機能の異常<sup>11)</sup>、腸管狭窄、硬皮症 (scleroderma)、ろう孔 (fistula)、空腸多発性憩室症 (jejunal diverticulosis) などの盲管係蹄症候群 (blind loop syndrome)<sup>12)</sup> にみられる腸の規則的蠕動の障害や腸内容物の鬱滞をおこすような状態のときには、小腸内に細菌の異常増殖 (bacterial overgrowth syndrome) が起こる。この場合、普通は大腸部位にしかみられない細菌群、Enterococcus faecalis、Escherichia coli、Bacteroides sp.、Clostridium sp. など

が小腸内に異常増殖し、それらの細菌の産生する加水分解酵素の作用によって、グリシン及びタウリン抱合胆汁酸の脱抱合が亢進し、遊離型になった胆汁酸は回腸末端からの能動輸送だけでなく近位の空腸からも受動拡散によって吸収される。その結果、小腸の胆汁酸が減少するためにミセル (micelles) 形成能が低下し、脂肪が消化吸収されず脂肪便を呈したり<sup>13)</sup>、吸収されなかった脂肪酸は腸内細菌によってヒマシ油の成分であるヒドロキシ脂肪酸などに代謝され下痢を呈する<sup>14)</sup>。このような small intestinal bacterial overgrowth syndrome による下痢は、普通日常おこなわれる糞便の細菌検査を行なっても原因不明と診断され、原因菌のわからない慢性下痢の 70% ぐらいを占めている<sup>1, 4)</sup>。また、肝硬変<sup>15)</sup>、糖尿病<sup>12)</sup>などの患者でも small intestinal bacterial overgrowth が認められており、それらの疾病の一次的病因か、二次的病因かは不明であるが、このような病態を把握することが治療上必要となっている。

小腸内の細菌叢の検索には double-lumen tube を用いて腸内容物を採取・培養する方法<sup>5)</sup>や、カプセルを飲み込ませた後、外部から高周波発振器で信号を送って一定時間だけカプセルの蓋を開け、腸内容物を採取・培養する方法<sup>16)</sup>などがある。しかし、前者では、ゾンデを飲み込むことによる苦痛のため、後者では、排便までカプセルの回収を待たなければならない、その間にカプセル中で細菌が増殖してしまう事など信頼性に欠けるため<sup>1)</sup>、また、嫌気性培養には長時間を要するため<sup>7)</sup>、臨床応用に至っていない。

1971年、Fromm と Hofmann<sup>17)</sup> は  $[1-^{14}\text{C}]$  グリシンをコール酸とカップリングした  $[1-^{14}\text{C}]$  グリココール酸 (以下  $[1-^{14}\text{C}]$  GCA と略す) を用いた  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  呼気テストと呼ばれる、小腸内細菌の異常増殖する blind loop syndrome の様な病態の臨床診断法を開発した。Figure 2 に示す如く、 $[1-^{14}\text{C}]$  GCA の経口投与後、腸内細菌により脱抱合されて生じた  $[1-^{14}\text{C}]$  グリシンは最終的に  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  として呼気中に排泄される。正常人の場合には、 $[1-^{14}\text{C}]$  GCA の大部分は腸肝循環系に入り、その間に小腸の細菌叢により徐々に脱抱合され、また、一部が大腸に移行してから脱抱合されるので、呼気中の  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  量は徐々に増加してゆく。しかし、小腸内に細菌が異常増殖した、いわゆる bacterial overgrowth syndrome では、小腸内で抱合胆汁酸が速やかに脱抱合されること、及び、遊離したグリシンは腸内細菌によって代謝を受け  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  を生じ腸管から吸収されることにより、正常人に

比し、早期にしかも多量の $^{14}\text{CO}_2$ が呼気に排泄される。一方、胆汁酸を吸収する回腸が切除または障害を起こした、いわゆる ileal dysfunction syndrome にあつては、胆汁酸が回腸末端で吸収されず、大部分の胆汁酸は大腸に入り、大腸内細菌で脱抱合される結果、bacterial overgrowth syndrome の場合と同様に、呼気中に

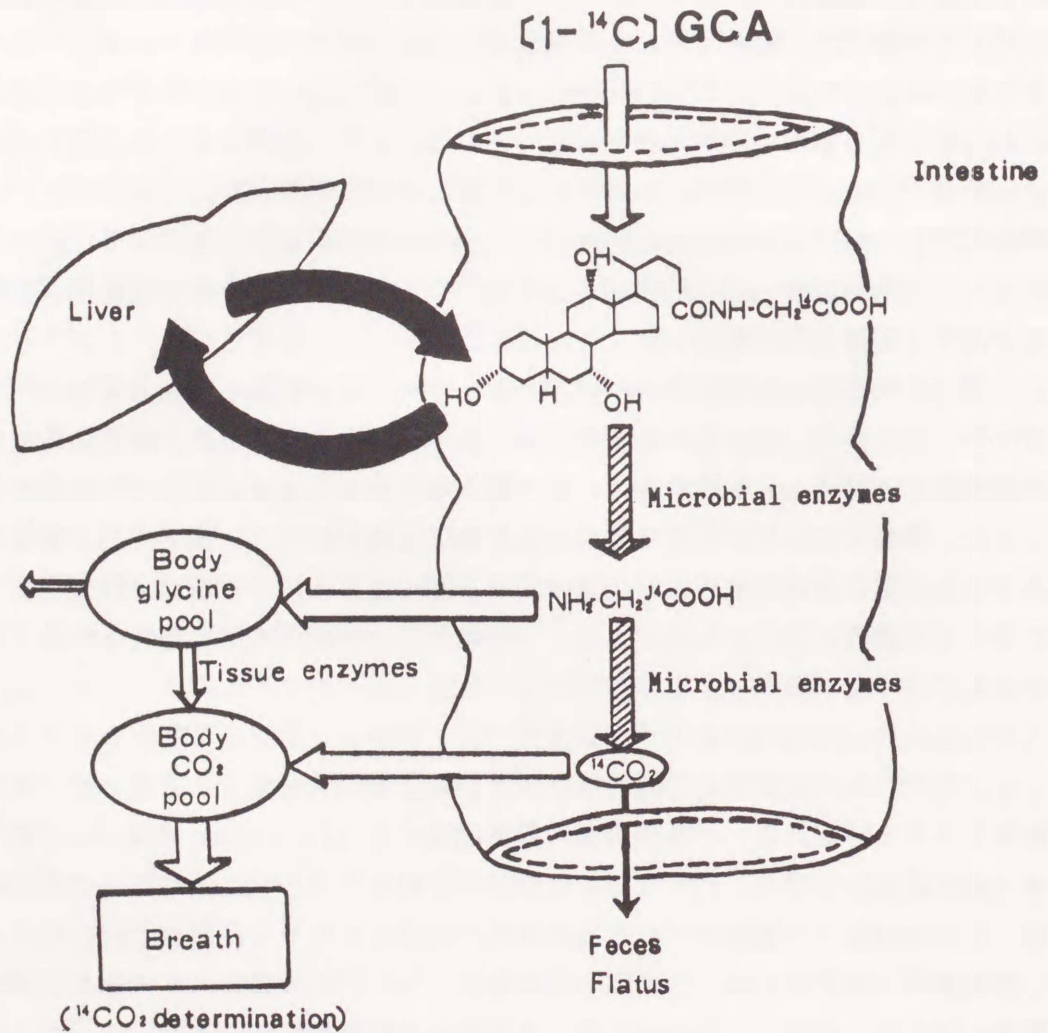


Fig.2 Principle of breath test with  $[1-^{14}\text{C}]$  glycocholic acid (GCA).  
 Closed arrows : enterohepatic circulation of bile acids.  
 Oblique line arrows : microbial hydrolysis and analysis.



早期に多量の $^{14}\text{C}\text{O}_2$ が排泄される。したがって、この呼気中の $^{14}\text{C}\text{O}_2$ を液体シンチレーションカウンターで連続計測することにより、これらの症候群を診断することができる<sup>18, 19)</sup>。

また、その他に $^{14}\text{C}$ でラベルしたキシロース投与による $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 呼気テストがあり、小腸内細菌の異常に増殖する様な病態の診断に有効であることが報告されている<sup>20, 21)</sup>。

しかし、これらの方法は、放射性同位元素使用による放射線被曝の危険性があること、測定が煩雑であること、特殊な装置を必要とすることなど幾つかの欠点を有し、少なくとも我が国での臨床応用には適さない。

従って、このトレーサーを何か別のものに代え、腸内細菌によってよく脱抱合され、定量が容易でしかも毒性のない物質を用いることができれば、我が国でも腸内細菌発育活性度の検査を行なうことができると考えられる。

そこで、現在臨床で汎用されている膵外分泌機能テスト (pancreatic function diagnostant test; PFDテスト)<sup>22)</sup>のトレーサーであるパラアミノ安息香酸 (以下PABAと略す)に着目し、 $^{14}\text{C}$ ラベルのグリシンの代わりにPABAを用い、ウルソデオキシコリル-パラアミノ安息香酸 (以下PABA-UDCAと略す)を用いた腸内細菌発育活性度の新評価法の開発を試みた。

## 本 論

1972年、Imondiら<sup>22)</sup>によりトレーサーとしてPABAを含有する合成ペプチド(ベンチロミド)の経口投与によるPFDテストの動物実験が報告された。彼等は、その過程でトレーサーとして $\alpha$ -アミノイソ酪酸、パラアミノ馬尿酸など多くの物質を用い検討した結果、腸管内のキモトリプシンで水解され、定量が容易でしかも毒性がないものとしてPABAを選択している<sup>23)</sup>。

PABAは、葉酸の構成成分である。また、第七改正日本薬局方<sup>24)</sup>に抗白毛剤その他に対する適用が記載されたことがある薬物で、そのLD<sub>50</sub>はマウスで2.85±0.4g/kgである。また、臨床例では30g/dayを用いた記録もあり、毒性の少ない物質としてよく知られている。特性として、経口投与されたPABAは腸管から容易に吸収され<sup>25, 26)</sup>、肝細胞内で抱合されたものは胆汁中へは排泄されず、大部分は血中へ逆流し<sup>27)</sup>、腎から速やかに排泄される<sup>28)</sup>。更にPABAのような芳香族第一アミンはジアゾカップリング反応で容易に定量でき<sup>29)</sup>、この点でもPABAはトレーサーとして優れた性質を有しているといえる。

PFDテストはFigure 3に示す如く、安息香酸、チロシン、PABAの縮合体であるベンチロミド(N-Benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid; Bz-Tyr-PABA)が、消化管内で膵液中の $\alpha$ -キモトリプシンにより酵素水解を受けて、PABAを遊離し、このPABAが消化管より吸収されたのち、肝で抱合を受け尿中に排泄されることにもとづいている。したがって、一定時間の尿中に排泄されたPABA量を測定することにより、膵臓から分泌された $\alpha$ -キモトリプシンの活性度、すなわち膵液の分泌の状態がわかるというものである。この動物実験に基づいて、1976年、Gyrら<sup>29)</sup>はこの化合物をヒトに投与し、ヒトでの膵外分泌機能テストとして有用であることを報告し、その価値が認識されるようになり、現在、臨床で広く用いられている。

さて、胆汁酸は肝臓においてコレステロールを原料として生成されることは既によく知られている。ヒトではこのコレステロールから一次胆汁酸であるコール酸とケノデオキシコール酸が肝で生合成され、この生成された胆汁酸は同じく肝内でグリシン或いはタウリンと抱合された後、抱合胆汁酸として胆汁中に分泌され最終的に腸管内に排泄されてゆく。こうして腸管内に排泄された抱合胆汁酸は腸内細菌の

産生する抱合胆汁酸水解酵素の作用により脱抱合を受ける。この脱抱合能を有する腸内細菌としては、Clostridium sp., Bacteroides sp., Bifidobacterium sp., Eubacterium sp., などの嫌気性菌と、Lactobacillus sp., Enterococcus faecalis, Staphylococcus epidermidis などの好気性菌が報告されている (Table 2 と Table 3 を参照) <sup>30-34)</sup>。

こうしたPABAの特性と胆汁酸代謝の特性に鑑み、ウルソデオキシコール酸 (以下UDCAと略す) のPABA抱合体 (PABA-UDCA) が腸内細菌の状態を簡便に評価する新しい方法を提供しうるものかどうかを検討したわけである。

尚、UDCAはコレステロール胆石患者に治療薬として既に広く投与され毒性のないことも証明されているため <sup>35)</sup>、本胆汁酸を多くの胆汁酸の中から選択した。

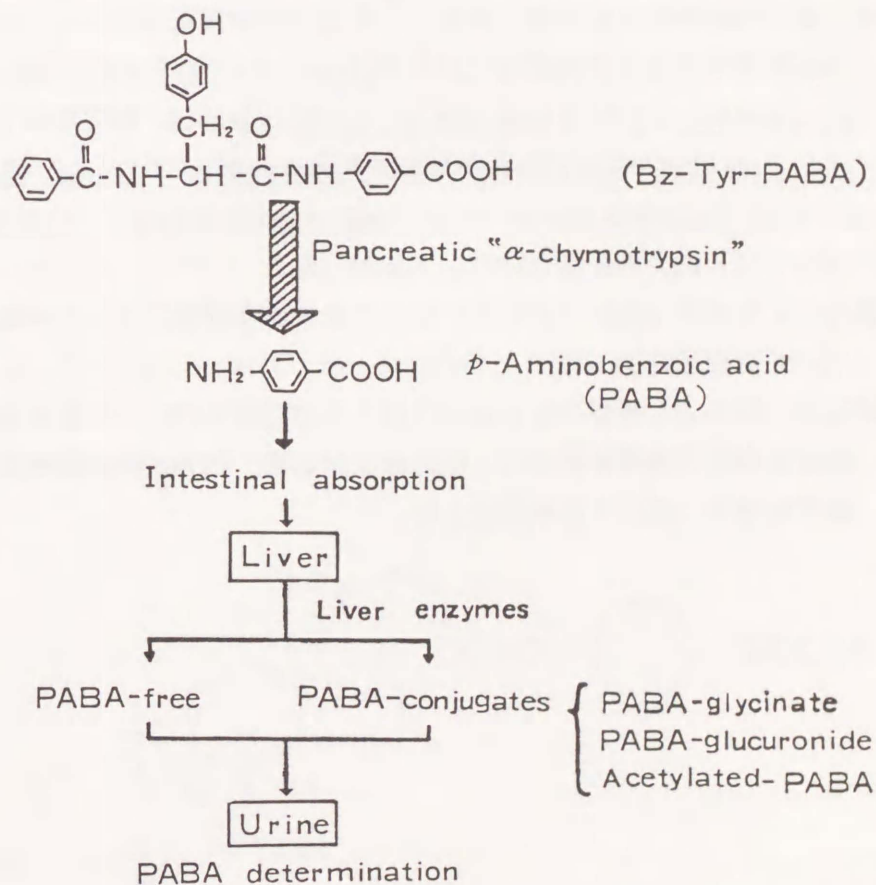


Fig.3 Principle of pancreatic function diagnostic test.

以下に本研究の結果を次の各章に別けて詳述する。

- (第一章) PABA-UDCAをグリシンまたはタウリン抱合胆汁酸合成法に準じて合成し、その赤外吸収スペクトル、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル、マススペクトル、元素分析で生成を確認した。
- (第二章) PABA-UDCAの加水分解酵素に対する挙動を明らかにするために、in vitroで、パンクレアチン、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB、トリプシン、 $\alpha$ -キモトリプシン、肝ホモジネート、小腸粘膜ホモジネート、血清、及び、細菌性酵素の Clostridium perfringens(welchii) から分離・精製されたコリルグリシンヒドロラーゼとのインキュベーションによる水解実験を行なった。
- (第三章) 内因性抱合胆汁酸であるGCAを対照物質として、PABA-UDCAの各種腸内細菌(好気性菌である Enterococcus faecalis、Lactobacillus acidophilus、Staphylococcus epidermidisなどと、嫌気性菌である Bacteroides fragilis、Bifidobacterium adolescentis、Bifidobacterium longum、Clostridium perfringens、Eubacterium aerofaciens、Fusobacterium varium など)による脱抱合について検討した。
- (第四章) PABA及びPABA-UDCAの吸収挙動をラットの摘出反転腸管を用いて検討した。
- (第五章) PABA及びPABA-UDCA経口投与時のPABA尿中排泄量を、無処置群、抗菌剤処置による腸内細菌制腐群、腸管内停滞係蹄による腸内細菌異常増殖群に於いて比較検討した。

# 第一章 胆汁酸抱合体の合成

## 第1節 ウルソデオキシコール酸のパラアミノ安息香酸抱合体 (PABA-UDCA) の合成

グリシンまたはタウリン抱合胆汁酸の合成については幾つかの方法<sup>36-39)</sup>が報告されている。その何れを用いてもPABA-UDCAの合成は可能であったが、Bergström と Norman の報告した方法<sup>36)</sup>により、収率 87%と最も高い収率で合成することができた。クロロホルム-メタノール(4:1,v/v)を使用したシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し精製し、PABA-UDCAの粗結晶を得、メタノール-酢酸エチルで再結晶後、目的とするPABA-UDCAの無色結晶を得た。

本化合物は、融点 294-296°C (分解)を示した。赤外吸収スペクトル (KBr)では、Figure 5 に示す如く、 $1520\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{NH}}$  アミド II)、 $1600\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=O}}$  アミド I)、 $1665\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=O}}$  カルボキシル基)による吸収帯を認めた。マススペクトルでは、 $m/z: 512 (M^+)$ を示した(Figure 6)。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta\text{ ppm}$ )では Figure 7 に示す如く、0.71 (s, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 0.96 (s, 3H, 19- $\text{CH}_3$ ), 1.00 (d, 3H,  $J=6.4\text{ Hz}$ , 21- $\text{CH}_3$ ), 3.48 (br m, 2H,  $3\beta\text{-H}$  and  $7\alpha\text{-H}$ ), 7.64 (d, 2H,  $J=8.8\text{ Hz}$ , aromatic H), 7.94 (d, 2H,  $J=8.8\text{ Hz}$ , aromatic H)を認めた。元素分析では Anal. Calcd. for  $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{NO}_5$  : C, 72.32; H, 8.76; N, 2.79. Found: C, 72.77; H, 8.86; N, 2.74を認めた。以上の結果は、Figure 4に示すPABA-UDCAの化学構造を支持していた。

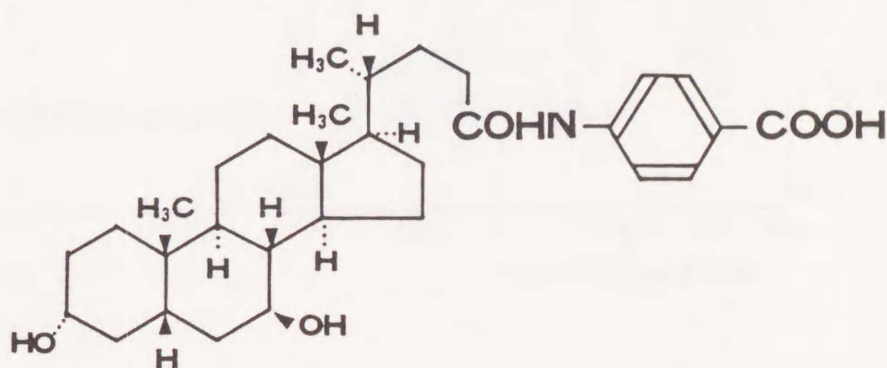


Fig.4 Chemical Structure of PABA-UDCA.

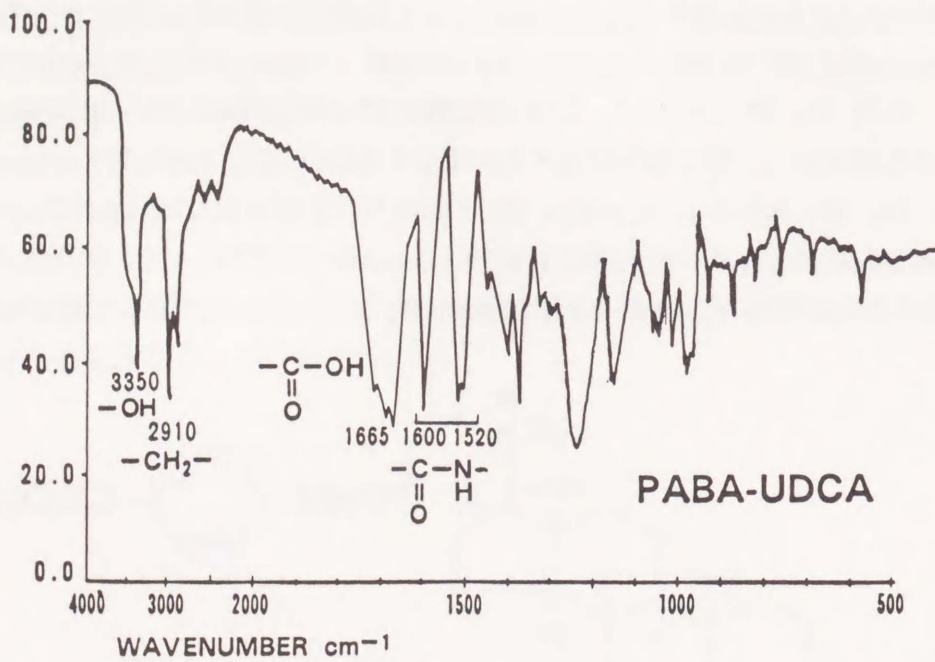
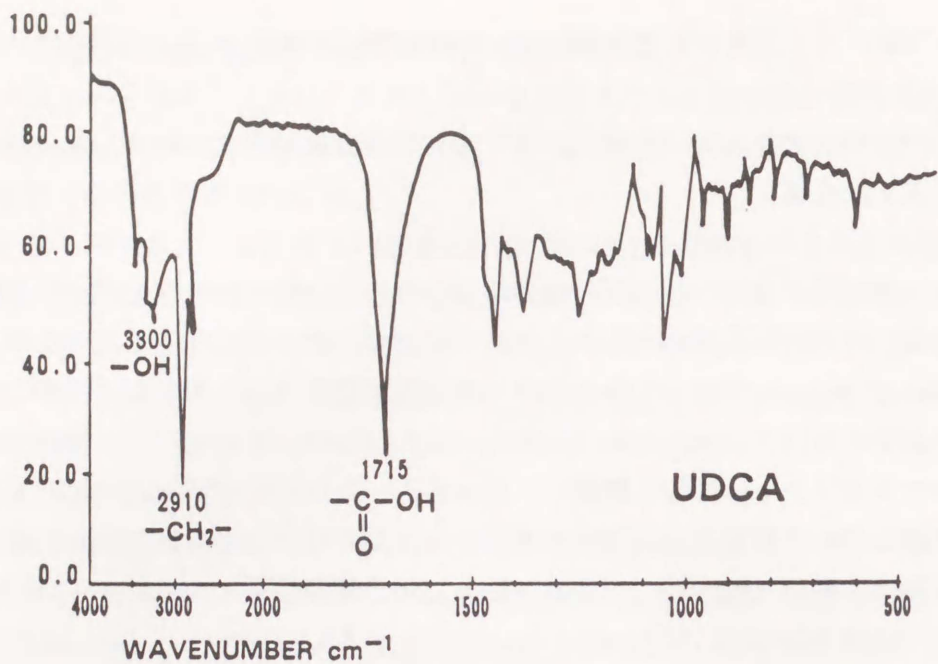


Fig.5 Infrared spectra of ursodeoxycholic acid(UDCA) and PABA-UDCA.

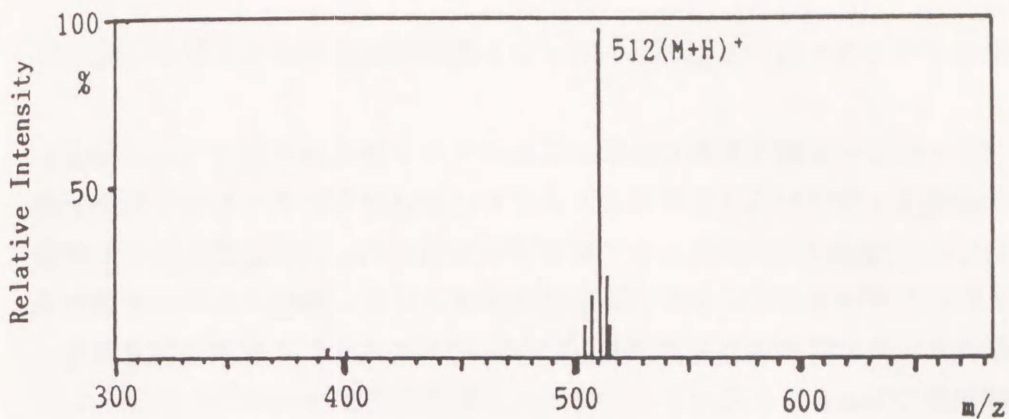
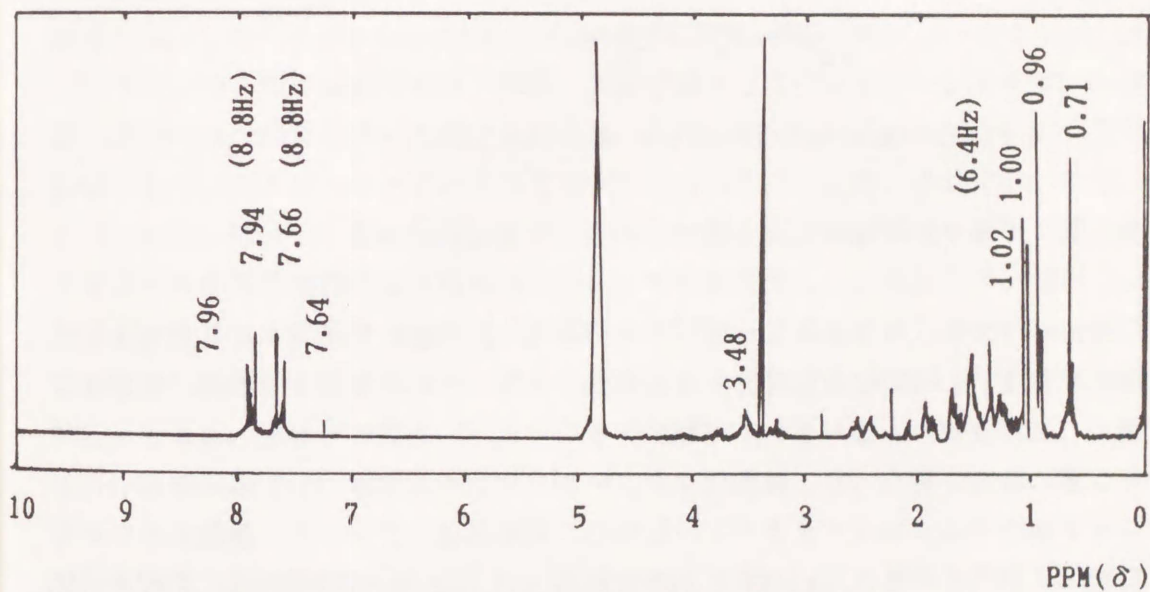


Fig.6 Mass Spectra of PABA-UDCA.



Figuer 7 <sup>1</sup>H-NMR Spectra of PABA-UDCA (in MeOH, 100MHz).

## 第二節 ウルソデオキシコール酸のL-ロイシン抱合体の合成

ウルソデオキシコール酸 (UDCA) のL-ロイシン抱合体 (以下 L-Leu-UDCA と略す) の合成は、UDCAとL-ロイシンより上記のPABA-UDCA合成法に準じて行ない、精製はクロロホルム-メタノール (9:1, v/v) を使用したシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、再結晶はメタノール-酢酸エチルにて行ない、目的とする L-Leu-UDCA の無色結晶 854.5mg (mp: 274-276°C) を収率 83% で得た。その化学構造を Figure 8 に示す。

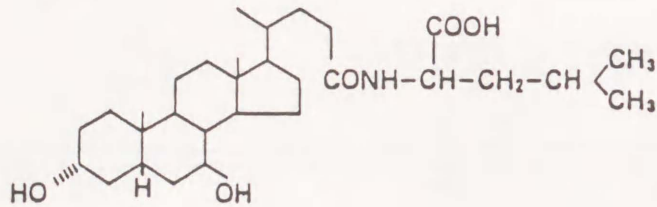


Fig.8 Chemical Structure of L-Leu-UDCA.

## 第三節 ウルソデオキシコール酸のL-リジン抱合体の合成

ウルソデオキシコリル-L-リジン (以下 L-Lys-UDCA と略す) の合成も上記に準じて行ない、UDCAとNε-カルボベンゾキシ-L-リジンを使用、反応終了後、10%パラジウムカーボンとギ酸アンモニウム<sup>40)</sup> を用いてNε-カルボベンゾキシ基の除去を行なった。精製はエタノール-アンモニア水 (9:1, v/v) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、再結晶はメタノール-酢酸エチルにて行ない、目的とする L-Lys-UDCA の無色結晶 614.8mg (mp: 258-260°C) を収率 58% で得た。その化学構造を Figure 9 に示す。

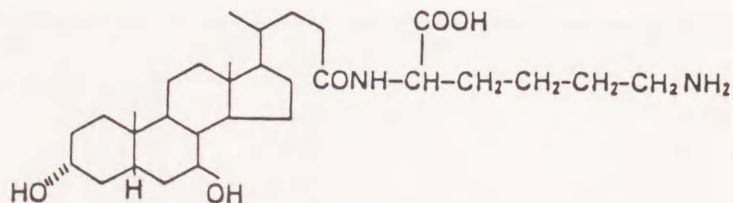


Fig.9 Chemical Structure of L-Lys-UDCA.



#### 第四節 各種胆汁酸抱合体の純度

合成したPABA-UDCAの純度を、島津二波長クロマトスキャナーによる高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLC)で検定した。HPTLC Kieselgel 60 F<sub>254</sub>薄層プレートを使用し、ベンゼン-ジオキサノン-酢酸(15:5:2,v/v/v)で展開後、PABAとPABA-UDCAは254nmの紫外線下にてスポットを検出定量した。一方、UDCAとPABA-UDCAは5%リンモリブデン酸エタノール溶液の噴霧により発色させ680nmで検出定量した。UDCA, PABA, PABA-UDCAのR<sub>f</sub>値は、それぞれ、0.68, 0.73, 0.49であった。合成PABA-UDCA 25μgをスポットしたところ単一スポットを与え、その純度は97%以上であると判明した。その他の胆汁酸抱合体、L-Leu-UDCAとL-Lys-UDCAもHPTLCで純度を測定した。UDCA, L-Leu-UDCA, L-Lys-UDCA, L-Lys(z)-UDCA, L-ロイシン、及びL-リジンのTLCにおけるR<sub>f</sub>値は、展開溶媒としてベンゼン-ジオキサノン-酢酸(15:5:2,v/v/v)を用いた時、それぞれ、0.68, 0.52, 0.10, 0.48, 0.00, 及び0.00であり。エタノール-アンモニア水(3:1,v/v)を用いた時、それぞれ、0.82, 0.78, 0.50, 0.68, 0.65, 及び、0.15であった。尚、胆汁酸は5%リンモリブデン酸エタノール溶液の噴霧により発色させ680nmで検出定量した。更にアミノ酸は0.2%ニンヒドリン-ブタノール溶液の噴霧により570nmで検出定量した。L-Leu-UDCAとL-Lys-UDCAは、それぞれ単一スポットを与え、その純度は95%以上であると判明した。

#### 小 括

胆汁酸抱合体の合成に於いて、HuijghebaertとHofmann<sup>37)</sup>の報告したEEDQ(N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline)を使用し、アミノ酸のカルボキシル基をメチルエステルとして反応を行ない、反応後エステル体を加水分解する方法、パラニトロフェニルエステルを用いるエステル交換法<sup>38)</sup>、塩化チオニルを用いる酸塩化物法<sup>39)</sup>、及びBergstromとNorman<sup>36)</sup>の報告した酸無水物法を比較検討した結果、酸無水物法が他法と比べ操作が簡単で反応は迅速に進行し、しかも高収率にPABA-UDCAを得ることが出来る最良法であると判明した。この方法で合成したPABA-UDCA、L-Leu-UDCA及びL-Lys-UDCAは遊離UDCA、遊離PABA、遊離アミノ酸を含まず純度の高いものと判明し第二章以降の各種実験に供した。

## 第二章 胆汁酸抱合体の酵素水解

一般に、膵液中にはカルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB、トリプシン、 $\alpha$ -キモトリプシンなど多く酵素が存在する。カルボキシペプチダーゼAはカルボキシル末端の中性L- $\alpha$ -アミノ酸のペプチド結合を切断し<sup>41)</sup>、カルボキシペプチダーゼBはカルボキシル末端の塩基性L- $\alpha$ -アミノ酸のペプチド結合を切断し<sup>42)</sup>、トリプシンはアルギニンやリジンのカルボキシル基を含有するペプチド結合を水解し<sup>43)</sup>、また、 $\alpha$ -キモトリプシンは芳香族アミノ酸のカルボキシル基を含有するペプチド結合を水解したり、芳香族アミノ酸の代わりに大きなアルキル基のアミド型でも水解することが知られている<sup>44)</sup>。

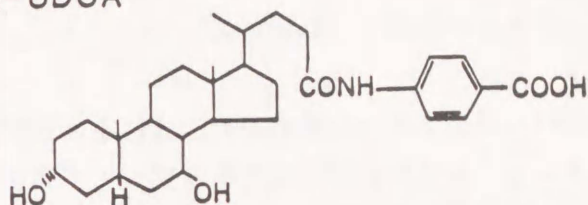
1986年、HuijghebaertとHofmann<sup>37)</sup>により、内因性抱合胆汁酸、即ち、グリシンまたはタウリン抱合胆汁酸は、膵酵素のカルボキシペプチダーゼに対し抵抗性があるが、中性-L-アミノ酸の胆汁酸抱合体 (cholyl-L-alanine, cholyl-L-valine, cholyl-L-leucine, and cholyl-L-tyrosine) はカルボキシペプチダーゼAにより水解され、塩基性-L-アミノ酸の胆汁酸抱合体 (cholyl-L-lysine and cholyl-L-arginine) はカルボキシペプチダーゼBにより水解を受けることが報告された。

ところで、PABA-UDCAは、膵外分泌機能テストのベンチロミドの原理に基づいているため、 $\alpha$ -キモトリプシンにより水解される可能性がある。また、膵液中には多くの酵素が存在しておりPABA-UDCAはそれらの作用によって水解される可能性もある。更に、PABA-UDCAは新規化合物のため、血清中酵素、肝薬物代謝酵素、小腸粘膜酵素などによって水解されるかどうかも判っていない。PABA-UDCAは腸管内細菌活性度を評価するための物質であり、腸内細菌の酵素のみによって水解されることを前提としている。仮に他の酵素によって水解されることがあれば、腸内細菌の評価物質として用いることはできない。

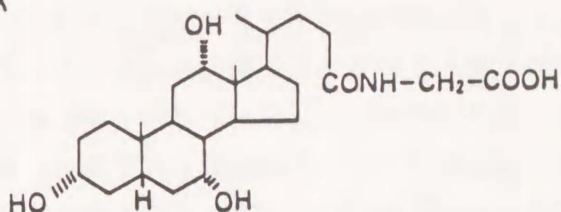
したがって、本章ではPABA-UDCAが腸内細菌のみによって水解されることを確認する為に、膵酵素混合物であるパンクレアチン、膵臓由来のカルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB、トリプシン、 $\alpha$ -キモトリプシン、及び、肝ホモジネート、小腸粘膜ホモジネート、血清、更に既に胆汁酸抱合体を水解することが知られている腸内細菌の酵素、コリルグリシンヒドロラーゼによる酵素水解実験を行なった結果について述べる。尚、対照として腸内細菌の酵素によって

水解されるが腸酵素には抵抗性がある内因性抱合胆汁酸のGCA<sup>37)</sup>、細菌性酵素以外に腸酵素のカルボキシペプチダーゼAで水解される中性L- $\alpha$ -アミノ酸抱合体<sup>37)</sup>のL-Leu-UDCA、及び、細菌性酵素以外に腸酵素のカルボキシペプチダーゼBで水解される塩基性L- $\alpha$ -アミノ酸抱合体<sup>37)</sup>のL-Lys-UDCAも同様に検討した。本章で用いた抱合胆汁酸の化学構造を Figure 10に示す。

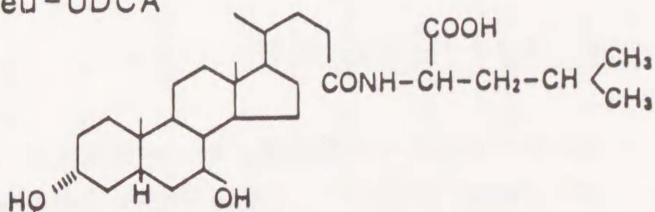
PABA- conjugate  
PABA-UDCA



Endogenous conjugate  
GCA



Neutral-L- $\alpha$ -amino acid conjugate  
L-Leu-UDCA



Basic-L- $\alpha$ -amino acid conjugate  
L-Lys-UDCA

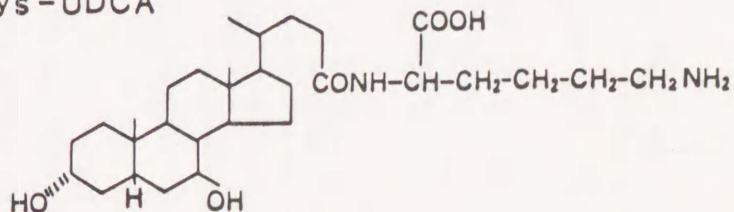


Fig.10 Chemical structure of bile acid conjugates.

また、標準基質として、カルボキシペプチダーゼAは、hippuryl-L-phenylalanine (Bz-Gly-L-Phe)<sup>41, 45, 46</sup>、カルボキシペプチダーゼBは、hippuryl-L-arginine (Bz-Gly-L-Arg)<sup>42, 47</sup>、トリプシンは、benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (Bz-L-Arg-PNA)<sup>43, 48</sup>、及び $\alpha$ -キモトリプシンは N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (Bz-Tyr-PABA)<sup>44</sup>を用い同様に検討した。以上の結果をTable 1 に示す。

#### 第一節 パンクレアチンの影響 (Table 1)

ブタ膵臓由来のパンクレアチンは膵液中に含まれる多種酵素の混合物で<sup>40</sup>、カルボキシペプチダーゼ、トリプシン、キモトリプシン、アミラーゼ、リパーゼなどを含んでいる。このパンクレアチンは、標準基質のBz-Gly-L-Phe, Bz-Gly-L-Arg, Bz-L-Arg-PNA, Bz-Tyr-PABA の全てに対し活性を示し、パンクレアチン中に、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB、トリプシン、 $\alpha$ -キモトリプシンなど諸種の膵酵素を含んでいることが明らかとなった。同一実験条件下で、胆汁酸抱合体を24時間インキュベーションしたところ、67%のL-Leu-UDCAと42%のL-Lys-UDCAが遊離胆汁酸と遊離アミノ酸に水解されており、膵酵素に抵抗性があると言われている内因性抱合胆汁酸のGCA<sup>37</sup>も11%が水解を受けたが、PABA-UDCAは全く水解されなかった。

#### 第二節 カルボキシペプチダーゼAの影響 (Table 1)

カルボキシペプチダーゼA(ウシ膵臓製)は、中性L- $\alpha$ -アミノ酸の胆汁酸抱合体を水解するという報告<sup>37</sup>どおり、L-Leu-UDCAを3時間後に100%水解した。また、GCAも24時間後に16%の水解を示したが、PABA-UDCAは本酵素でも水解を受けなかった。

Table 1 Susceptibility of bile acid conjugates and model substrates to enzymatic hydrolysis by pancreatin, carboxypeptidases A and B, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, plasma, liver homogenates, small intestine homogenates, and bacterial cholyglycine hydrolase

Bile Acid Conjugates	Extent of Hydrolysis (%)																						
	Pancreatin		CPA		CPB		Trypsin			$\alpha$ -Chymotrypsin			Serum		Liver		Intestine		CGH				
	3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h	1h	3h	12h	1h	3h	12h	1h	3h	6h	24h	
PABA conjugate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PABA-UDCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Endogenous conjugate	0	0	11	0	0	16	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GCA	0	0	11	0	0	16	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Neutral L- $\alpha$ -amino acid conjugate	10	24	67	100	100	100	0	5	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
L-Leu-UDCA	10	24	67	100	100	100	0	5	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Basic L- $\alpha$ -amino acid conjugate	8	17	42	0	0	0	30	60	63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
L-Lys-UDCA	8	17	42	0	0	0	30	60	63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Model Substrates	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Bz-Gly-L-Phe	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	22	100	100
Bz-Gly-L-Arg	100	100	100	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	6	14	25	0	0	10	66	83
Bz-L-Arg-PNA	100	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100	93	100	100	100	100	100	0	0	0	11	32
Bz-Tyr-PABA	32	58	100	0	0	0	0	0	0	9	17	32	100	100	100	0	0	0	0	0	10	14	

CPA, Carboxypeptidase A; CPB, Carboxypeptidase B; Serum, Serum after activation with trypsin and  $\text{CoCl}_2$ ; Liver, The 10000xg supernatant of liver; Intestine, Small intestine homogenates; CGH, Bacterial cholyglycine hydrolase; GCA, Glycocholic acid; PABA, p-Aminobenzoic acid; UDCA, Ursodeoxycholic acid; Bz-Gly-L-Phe, Hippuryl-L-phenylalanine; Bz-Gly-L-Arg, Hippuryl-L-arginine; Bz-L-Arg-PNA, Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide hydrochloride; Bz-Tyr-PABA, N-Benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid

### 第三節 カルボキシペプチダーゼBの影響 (Table 1)

カルボキシペプチダーゼBによる24時間インキュベーションの結果、GCAの8%、L-Leu-UDCAの17%、L-Lys-UDCAの63%が水解された。即ち、カルボキシペプチダーゼB(ブタ膵臓製)は、塩基性L- $\alpha$ -アミノ酸の胆汁酸抱合体を水解するという報告<sup>37)</sup>どおり、L-Lys-UDCAを水解した。また、Bz-Gly-L-PheとL-Leu-UDCAも水解され、本酵素中にカルボキシペプチダーゼAの混入があると推察された。しかしPABA-UDCAは水解を受けなかった。

### 第四節 トリプシンの影響 (Table 1)

トリプシンは、一般にアルギニンやリジンのカルボキシル基を含有するペプチド結合を水解<sup>43)</sup>するというものであるが、本酵素により水解される抱合胆汁酸は認められず、PABA-UDCAはトリプシンに安定であることが判った。

### 第五節 $\alpha$ -キモトリプシンの影響 (Table 1)

$\alpha$ -キモトリプシンは、膵外分泌機能テストのBz-Tyr-PABAを特異的に水解するために、PABA-UDCAを水解する可能性があったが、本酵素によって水解される抱合胆汁酸は認められず、PABA-UDCAは $\alpha$ -キモトリプシンによって水解されないことが判った。以上、第一節から第五節に述べた結果より、腸管内でPABA-UDCAは膵液の影響を受けないことが明らかとなった。

### 第六節 血清中酵素の影響 (Table 1)

血中に逸脱する胆汁酸はわずかであるが<sup>50, 51)</sup>、本節では血清を、トリプシン<sup>52)</sup>と塩化コバルト<sup>53)</sup>存在下に前もってインキュベーションし、カルボキシペプチダーゼを活性化したものを用いた結果、Bz-Gly-L-Argが水解されカルボキシペプチダーゼBの作用があると思われたが、L-Leu-UDCAは水解されなかった。その他の被検抱合胆汁酸も全く水解されず、PABA-UDCAは血清中酵素により水解されないことが判った。

## 第七節 肝ホモジネートの影響 (Table 1)

内因性抱合胆汁酸は肝臓で脱抱合を受けることはないが、PABA-UDCAは内因性抱合胆汁酸でないため肝臓の酵素によって水解される可能性がある。したがって、本節では、ラット肝ホモジネートの10000xg 上清とインキュベーションした結果、水解される抱合胆汁酸は認められず、PABA-UDCAは肝臓の酵素に対し安定であることが判った。

## 第八節 小腸粘膜ホモジネートの影響 (Table 1)

小腸粘膜には多種の酵素が含まれている<sup>54)</sup>。一方、Sterchiら<sup>55)</sup>は $\alpha$ -キモトリプシンの基質 Bz-Tyr-PABAがキモトリプシン以外に小腸粘膜のペプチダーゼで水解されることを報告している。したがって、小腸粘膜ホモジネートとインキュベーションした結果、膵液由来の酵素も多数認められたが、水解される抱合胆汁酸は認められず、PABA-UDCAは小腸の酵素に対し安定であることが判った。

## 第九節 細菌性コリルグリシンヒドロラーゼの影響

既に胆汁酸抱合体を水解することが知られている腸内細菌の *Clostridium perfringens* から分離・精製されたコリルグリシンヒドロラーゼ<sup>56)</sup>とインキュベーションした結果、Table 1 に示す如く、PABA-UDCAを含めて全ての抱合胆汁酸が水解された。

1967年、Nairら<sup>57)</sup>は *Clostridium perfringens* のもつコリルグリシンヒドロラーゼによる抱合胆汁酸の脱抱合態度を報告した。それによるとグリコケノデオキシコール酸、グリコデオキシコール酸、GCA、タウロケノデオキシコール酸、タウロデオキシコール酸、及びタウロコール酸のコリルグリシンヒドロラーゼに対する Michaelis 定数 ( $K_m$  値) は、それぞれ 14mM, 1.2mM, 3.6mM, 3.0mM, 3.5mM, 及び 3.7mM である。この  $K_m$  値が小さいほどコリルグリシンヒドロラーゼに対し基質親和性が高いということになる。ところで、PABA-UDCAは腸内細菌のもつコリ

ルグリシンヒドロラーゼによって水解されることが Table 1で確定されている。

更に、この細菌酵素によってどの程度の水解を受けるか知るために、PABA-UDCA濃度の異なる五つの溶液に、一定量のコリルグリシンヒドロラーゼを加え、37°Cでインキュベーションし経時的に加水分解により遊離するPABA量を検討した結果、Figure 11に示す如く、基質量に応じたPABAの遊離を認めた。Figure 11で得られたデータを Lineweaver-Burk plot すると、Michaelis 定数 ( $K_m$ 値) は3.74 mM を示した (Figure 12)。

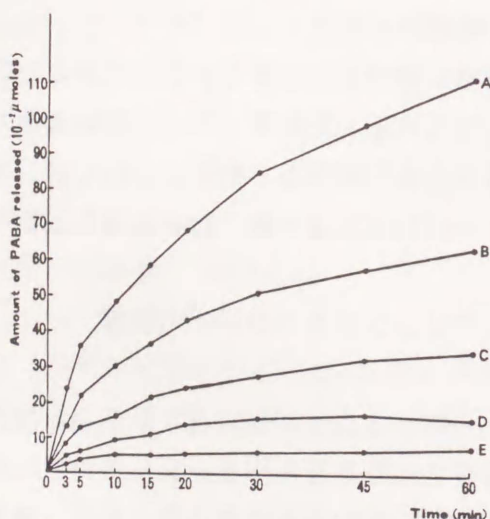


Fig. 11 Time course of enzymatic hydrolysis of PABA-UDCA by cholyglycine hydrolase in 0.025M acetate buffer (pH 5.6).

Incubation was carried out with five different concentrations:  
A, 1.96mM; B, 0.98mM; C, 0.49mM; D, 0.2mM; E, 0.098mM of PABA-UDCA.



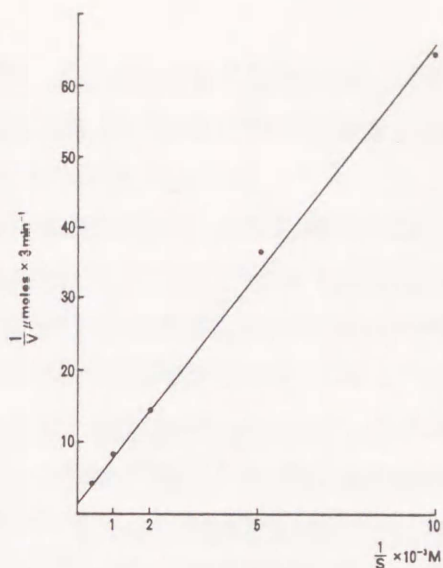


Fig.12 Lineweaver-Burk plot of the hydrolysis of PABA-UDCA by cholylglycine hydrolase.

The rate of released PABA was determined with five different concentrations, and the best-fit straight line through the points was obtained by linear regression analysis. The approximate  $K_m$  value thus calculated was 3.74 mM.

#### 小括

比較に用いたGCAは細菌性酵素以外、極一部が膵酵素で水解された。L-Leu-UDCAは細菌性酵素以外に膵酵素の、特にカルボキシペプチダーゼAで水解された。L-Lys-UDCAは細菌性酵素と膵酵素の、特にカルボキシペプチダーゼBにより水解された。しかし、PABA-UDCAは腸内細菌の酵素以外、全ての酵素に安定であり、腸内細菌の Clostridium perfringens から分離・精製されたコリルグリシンヒドロラーゼによってのみ水解されることが明らかとなった。

PABA-UDCAのコリルグリシンヒドロラーゼに対する  $K_m$  値は、3.74mMを示した。この値は、Nairら<sup>57)</sup>が同様の操作によって得たヒトの主要胆汁酸であるGCAの  $K_m$  値 3.6 mMと近似の値を示し、本物質がコリルグリシンヒドロラーゼの良い基質であることが判明した。

### 第三章 PABA-UDCA に対する 腸管内細菌の脱抱合能

腸内細菌叢と胆汁酸代謝に関する問題は多くの研究者の興味と関心を集め数多くの研究成果についての報告がなされている<sup>30-34)</sup>。in vitroにおける胆汁酸脱抱合能に関する研究は1955年、Normanと Grubb<sup>58)</sup>によって報告されて以来、抱合胆汁酸の水解酵素として使用されているコリルグリシンヒドロラーゼを産生する Clostridium perfringens 以外にも Bacteroides fragilis, Bifidobacterium bifidum, Fusobacterium sp., Eubacterium lentum, Veillonella sp. などの偏性嫌気性菌や Lactobacillus sp., Streptococcus faecalis などの通性嫌気性菌が脱抱合能を有していることが知られている<sup>30-34)</sup>。また、グリシン抱合型胆汁酸またはタウリン抱合型胆汁酸のいずれか一方のみを特異的に脱抱合する細菌が存在することも知られている。グリシン抱合型胆汁酸のみを脱抱合する細菌は Streptococcus faecalis, Staphylococcus epidermidis などで、タウリン抱合型胆汁酸のみを脱抱合する細菌としては、Clostridium difficile, Clostridium ramosum, Bacteroides preacutus, Bacteroides distasonis, Propionibacterium lymphophilum, Propionibacterium freundenreichii, Succinimonas amylolytica などがある<sup>31)</sup>。

ところで、PABA-UDCAは第二章で述べたように Clostridium perfringens により水解されることが明らかとなったが、本章では、Clostridium perfringens 以外の腸内細菌による脱抱合について検討した。尚、比較としてGCAについても同様の検討を行なった。

#### 第一節 好気性菌の影響

好気性菌によるPABA-UDCAとGCAの脱抱合は Table 2に示す如く、腸球菌の中で最も多く存在する Enterococcus faecalis では、GCAの場合、6株中6株(100%)に脱抱合能を認め、PABA-UDCAの場合6株中5株(83%)に脱抱合能を認めた。Lactobacillus acidophilus では、両者に対し100%の脱抱合能を有し、Staphylococcus epidermidisでも、GCAの場合、4株中4株(100%)に脱抱合能を認め、PABA-UDCAの場合3株中2株(67%)に脱抱合能を認めた。

これに対し、他の好気性菌 Citrobacter freundii 4株、Enterobacter aerogenes 4株、Escherichia coli 5株、Klebsiella pneumoniae 4株、Klebsiella oxytoca 4株、Morganella morganii 4株、Proteus mirabilis 4株、Proteus vulgaris 4株、Pseudomonas aeruginosa 4株、Salmonella schwarzengrund 4株、Serratia marcescens 4株、Staphylococcus aureus 4株、Vibrio parahaemolyticus 4株、Candida albicans 3株では、GCA、PABA-UDCAともに全株脱抱合能が認められなかった。

Table 2 Bile acid deconjugation by aerobic bacteria

Species	Incubation period (day)	No. of strains capable of deconjugation		Deconjugation ratio (%)	
		No. of strains tested		GCA	PABA-UDCA
		GCA	PABA-UDCA		
<i>Citrobacter freundii</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	6 / 6	5 / 6	100	83
<i>Escherichia coli</i>	3	0 / 5	0 / 5	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>K. oxytoca</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3	1 / 1	1 / 1	100	100
<i>Morganella morganii</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>P. vulgaris</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>Salmonella schwarzengrund</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>S. epidermidis</i>	3	4 / 4	2 / 3	100	67
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>Candida albicans</i>	3	0 / 3	0 / 3	0	0

## 第二節 嫌気性菌の影響

嫌気性菌によるPABA-UDCAとGCAの脱抱合は Table 3に示す如く、多くの細菌が脱抱合能を有している。ほとんどのヒトから検出され最も多い菌の *Bacteroides fragilis* では、GCAの場合6株中5株 (83%)、PABA-UDCAの場合6株中6株 (100%) に脱抱合能が認められ、*Bacteroides thetaiotaomicron* では、GCAの場合4株中1株 (25%)、PABA-UDCAの場合4株中1株 (25%) に脱抱合能が認められ、*Bacteroides vulgatus* では、GCAの場合4株中4株 (100%)、PABA-UDCAの場合4株中4株 (100%) に脱抱合能が認められた。

Table 3 Bile acid deconjugation by anaerobic bacteria

Species	Incubation period (day)	No. of strains capable of deconjugation		Deconjugation ratio (%)	
		No. of strains tested		GCA	PABA-UDCA
		GCA	PABA-UDCA		
<i>Bacteroides bivius</i>	7	0 / 3	0 / 3	0	0
<i>B. fragilis</i>	7	5 / 6	6 / 6	83	100
<i>B. melaninogenicus</i>	7	0 / 3	0 / 3	0	0
<i>B. thetaiotaomicron</i>	7	1 / 4	1 / 4	25	25
<i>B. vulgatus</i>	7	4 / 4	4 / 4	100	100
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	7	3 / 4	3 / 4	75	75
<i>B. longum</i>	7	3 / 3	3 / 3	100	100
<i>Clostridium difficile</i>	7	0 / 3	0 / 3	0	0
<i>C. perfringens</i>	7	7 / 7	7 / 7	100	100
<i>C. ramosum</i>	7	0 / 2	0 / 2	0	0
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	7	3 / 4	2 / 4	75	50
<i>E. lentum</i>	7	0 / 4	0 / 4	0	0
<i>Fusobacterium varium</i>	7	0 / 2	2 / 2	0	100
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	7	0 / 3	0 / 3	0	0
<i>P. micros</i>	7	0 / 3	0 / 3	0	0
<i>Streptococcus intermedius</i>	7	0 / 3	0 / 3	0	0
<i>Veillonella parvula</i>	7	0 / 3	0 / 3	0	0

また、Bifidobacterium adolescentisでは、G C Aの場合4株中3株(75%)、P A B A - U D C Aの場合4株中3株(75%)に脱抱合能が認められ、Bifidobacterium longumでは、G C Aの場合3株中3株(100%)、P A B A - U D C Aの場合3株中3株(100%)に脱抱合能が認められた。Clostridium perfringenでは、G C A、P A B A - U D C A共に7株中7株(100%)に脱抱合能が認められた。Eubacterium aerofaciensでは、G C Aの場合4株中3株(75%)、P A B A - U D C Aの場合4株中2株(50%)に脱抱合能が認められた。また、Fusobacterium variumでは、寧ろG C Aで水解は認められず、P A B A - U D C Aで2株中2株(100%)の脱抱合能を認めた。これに対し Bacteroides bivius 3株、Bacteroides melaninogenicus 3株、Clostridium difficile 3株、Clostridium ramosum 2株、Eubacterium lentum 4株、Peptostreptococcus anaerobius 3株、Peptostreptococcus micros 3株、Streptococcus intermedius 3株、Veillonella parvula 3株で、G C A、P A B A - U D C A共に全株脱抱合能が認められなかった。

#### 小括

P A B A - U D C Aの各種腸内細菌による脱抱合を検討した結果、 $[1-^{14}C]$ G C A呼気テストに用いる内因性抱合胆汁酸、G C Aとほぼ同じ菌種・同じ菌株で脱抱合されることが判明した。好気性菌・嫌気性菌いずれにも脱抱合能を有するものがあるが、両者を比較すると嫌気性菌の方が脱抱合能を有するものが多いことが明らかになった。

## 第四章 PABAとPABA-UDCA の吸収挙動

PABAの腸管吸収に関する報告は数多くある。例えば、受動拡散によって吸収されること、PABA濃度に比例した吸収量であること、空腸や回腸の部位の違いによる局所的な吸収を示さないこと、ナトリウム、グルコース、安息香酸、葉酸、ウアインなどの影響を受けないことなどである<sup>25, 26)</sup>。しかし、これらの報告は小腸を対照として行なわれたもので、結腸でのPABAの吸収に関する報告は見当たらない。よってPABA-UDCA投与試験のトレーサーであるPABAの吸収部位、吸収機構を更に追加研究した。

また、十二指腸に分泌された胆汁酸は、消化管のほぼ全域にみられる受動的吸収機構と、回腸末端に局在する量的に重要な能動的吸収機構により<sup>50)</sup>、その大部分が再吸収され、門脈を経て肝臓に戻り、再び胆汁中に分泌される。これが胆汁酸の腸肝循環と呼ばれるものである<sup>50)</sup>。そこでPABA-UDCAが内因性胆汁酸と同様に回腸末端からの能動輸送によって吸収されるか否かをKreb's Ringer-bicarbonate solutionを用いたラットの摘出反転腸管<sup>51, 52)</sup>で検討した。

### 第一節 PABAの吸収

PABAの能動的吸収機構はFigure 13 (A)に示す如く、粘膜側(mucosal side)と漿膜側(serosal side)に同濃度のPABAを入れインキュベーション後、粘膜側と漿膜側のPABAの濃度比を検討した結果、近位空腸から結腸まで初濃度と同じ1から動かず能動輸送は認められなかった。

PABAの受動的吸収機構はFigure 13 (B)に示す如く、PABAを粘膜側だけに入れインキュベーション後、PABAの粘膜側の濃度に対する漿膜側の濃度の%で検討した。その結果、小腸の空腸から回腸までは効果的に同じ比率で吸収され現在までの報告<sup>25, 26)</sup>に一致することが明らかとなった。また盲腸、結腸では小腸に比し吸収率は低いものの、PABAは確かに吸収されていることが認められた。

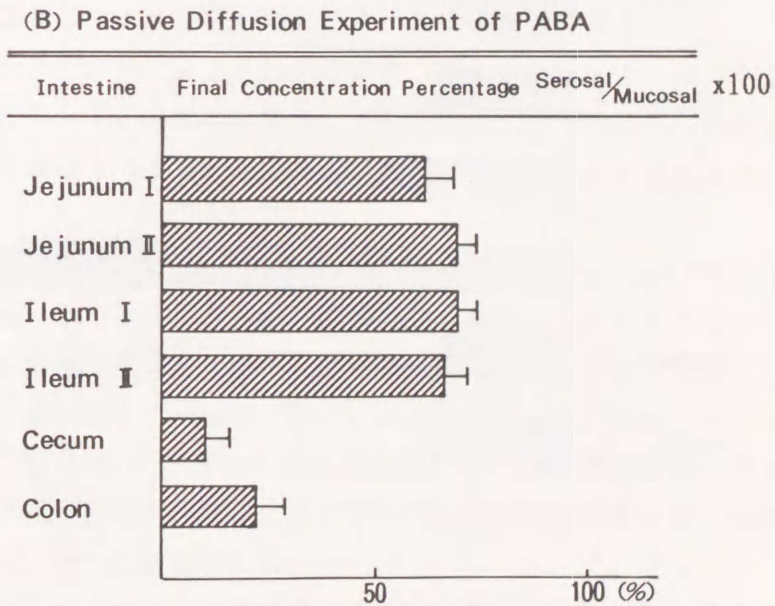
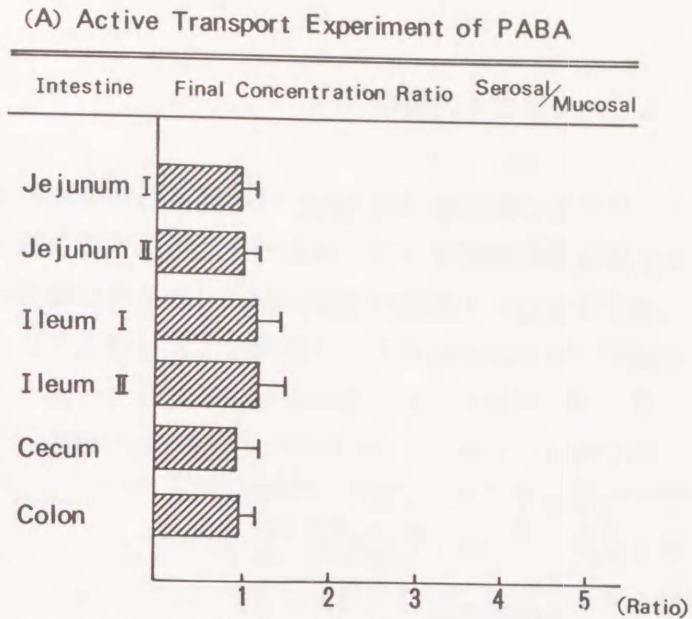


Fig.13 Transport of PABA by everted gut sacs prepared from various segments of the rat intestine.

(A) Initial concentration, 0.1mM of PABA in both the serosal and mucosal compartments.

(B) Initial concentration, buffer in the serosal compartment and 0.1mM of PABA in the mucosal compartment.

Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of three incubations.

## 第二節 PABA-UDCAの吸収

PABA-UDCAの能動吸収機構は、粘膜側と漿膜側に同濃度のPABA-UDCAを入れ検索したところ、Figure 14 に示す如く、回腸末端で濃度勾配に逆らったPABA-UDCAの著しい輸送が認められ、吸収機構におけるPABA-UDCAの挙動は内因性胆汁酸のそれと同一であると考えられた。

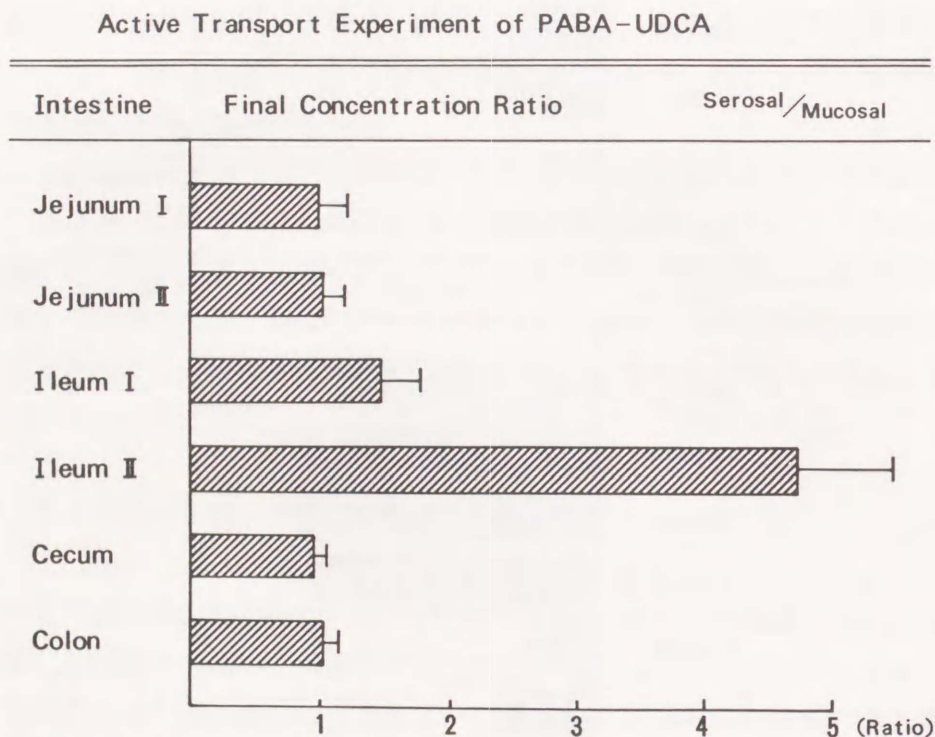


Fig.14 Transport of PABA-UDCA by everted gut sacs prepared from various segments of the rat intestine.

Initial concentration, 0.1mM of PABA-UDCA in both the serosal and mucosal compartments.

Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of three incubations.



## 小括

上述のように、PABAは全腸管から受動拡散によって吸収されること、また、PABA-UDCAは回腸末端から能動輸送によって吸収されることが明らかとなった。この結果から、経口投与されたPABA-UDCAは内因性胆汁酸と同様、主として回腸末端から能動輸送により吸収され、腸肝循環を営み、この間に腸内細菌により脱抱合されて生じたPABAが腸管全域から受動輸送により吸収され、尿中に排泄されることが推察された。

正常人の場合、Figure 15 (A)に示す如く、投与されたPABA-UDCAの大部分は腸肝循環系に入り、その間に小腸の細菌叢により徐々に脱抱合されて生じたPABAと、PABA-UDCAの一部が大腸に移行したのち大腸の細菌叢により脱抱合されて生じたPABAとが吸収され尿中に徐々に排泄される。

抗菌剤処置の場合、Figure 15 (B)に示す如く、投与されたPABA-UDCAは、腸内細菌が抑圧されているために脱抱合が抑制され、正常人に比しPABA-UDCAの腸肝循環量は上昇する。したがって尿中に排泄されるPABAは正常人に比し減少する。

小腸内に細菌が異常増殖した場合、Figure 15 (C)に示す如く、正常人に比し、より多くのPABA-UDCAが小腸内の細菌により脱抱合されるので、PABA-UDCAの腸肝循環量は減少し早期にしかも多量のPABAが尿中に排泄される。

一方、回腸機能不全の場合、Figure 15 (D)に示す如く、PABA-UDCAは回腸で吸収されず、速やかかつ多量に大腸に移行し、そこで大腸内細菌によって脱抱合される。したがって正常人に比しPABA-UDCAの腸肝循環量は減少し早期に多量のPABAが尿中に排泄される。

したがって、PABA-UDCA投与後の尿中のPABA量を、PFDテストの尿中PABA測定キットを使用し測定すれば、<sup>14</sup>CラベルのGCA呼気テストと同様に腸内細菌発育活性度を知ることが得、その変化の原因となった疾患の診断法となり得るものと思われた。

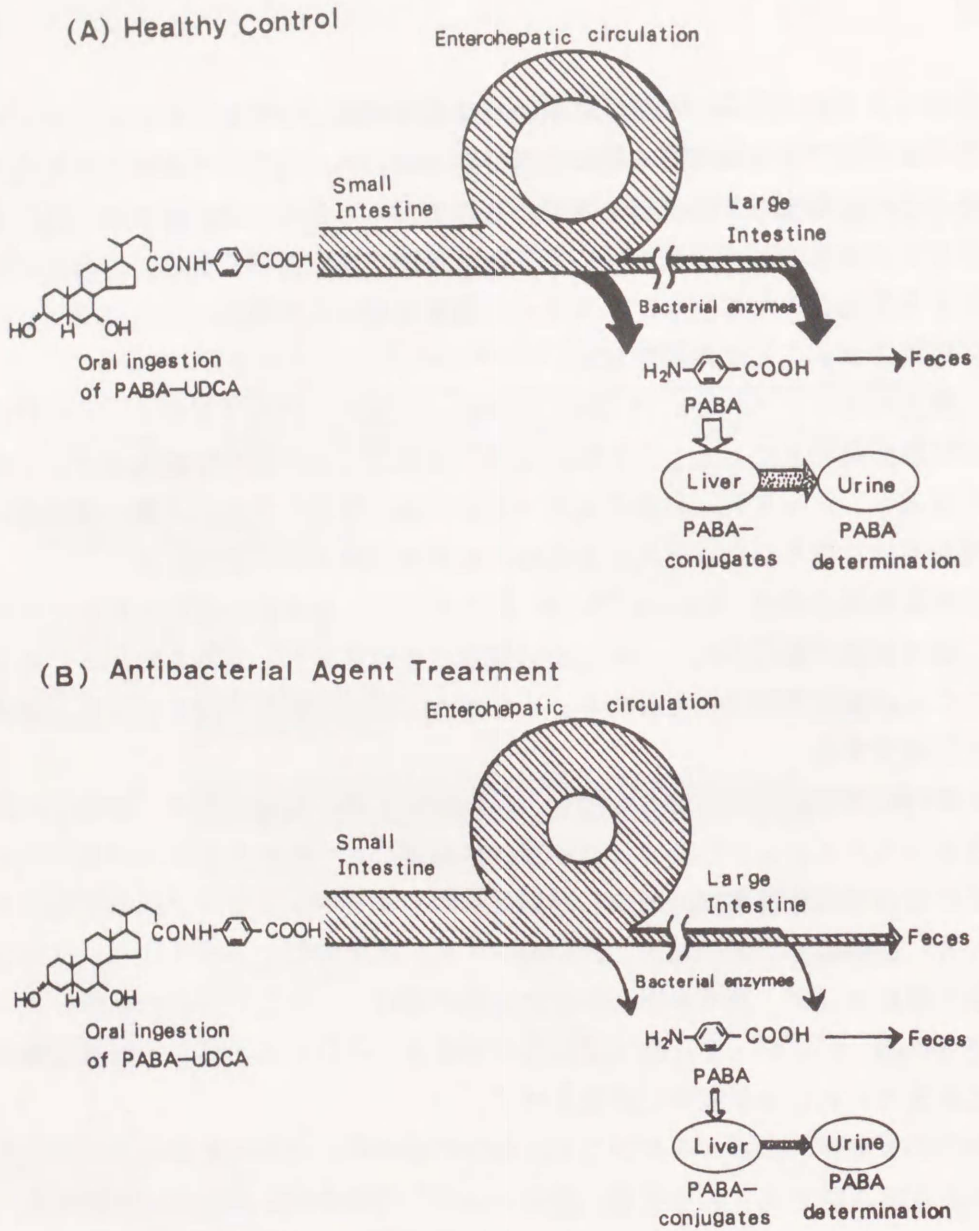


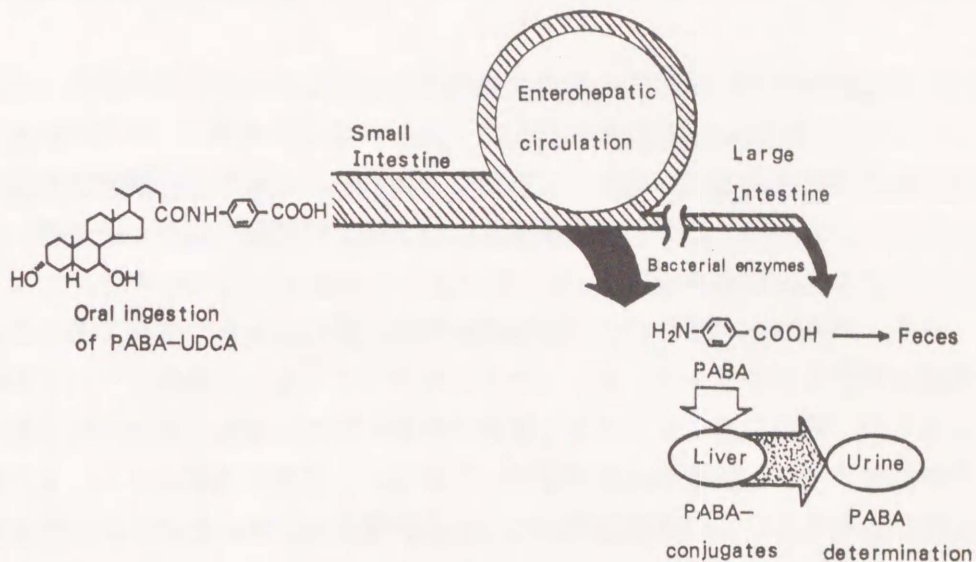
Fig. 15 (A)(B) Fate of PABA on PABA-UDCA test.

(A) Healthy control.

(B) Antibacterial Agent Treatment.

▨ : PABA-UDCA, ■ : PABA, ▩ : PABA-conjugates.

(C) Small Intestinal Bacterial Overgrowth



(D) Ileal Dysfunction

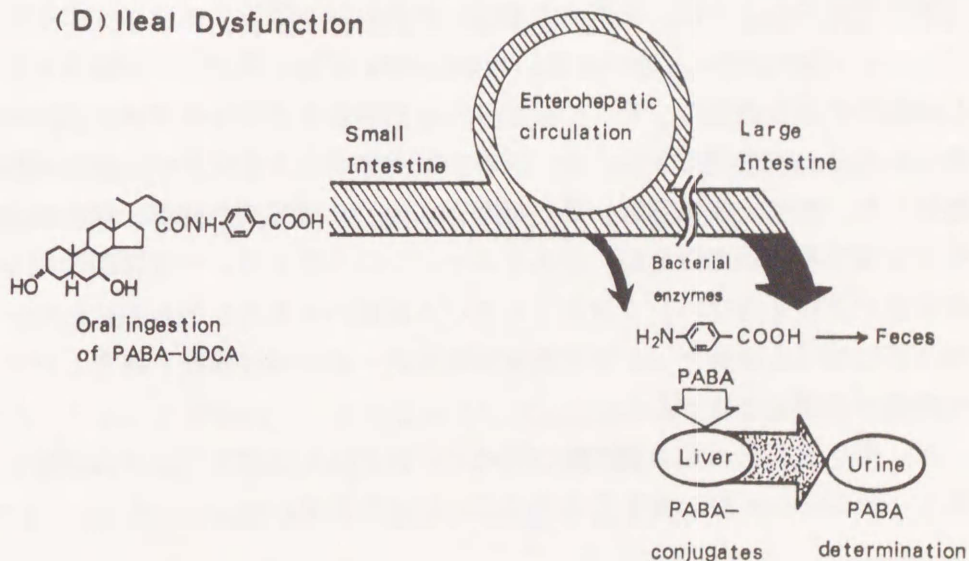


Fig.15 (C)(D) Fate of PABA on PABA-UDCA test.

(C) Small intestinal bacterial overgrowth

(D) Ileal dysfunction.

▨ : PABA-UDCA, ■ : PABA, ▨ : PABA-conjugates.

## 第五章 PABA-UDCAの動物投与

ヒトと動物とでは消化管の構造や生理が異なっており、食性も異なっている。ヒト、ラット、サルなどは雑食性で、イヌ、ネコは肉食性で、ウサギ、モルモットなどは草食性である。したがって動物の種類によって異なった腸内細菌叢のパターンを有しており<sup>1)</sup>、ヒトと腸内細菌叢のパターンが類似したラットを用いPABA-UDCA投与試験を行なうことにした。

まず、PABA-UDCAの動物投与試験に際し、トレーサーであるPABAの吸収に対するグルコース、ナトリウム、ウアバインなどの影響についての報告<sup>25)</sup>はあるが、腸内細菌による吸収と排泄の影響を報告したものは見当たらない。よって無処置ラットと抗菌剤の前処置ラットを用い、抗菌剤処置による、また腸内細菌の数によるPABAの吸収と排泄に与える影響を検討するとともに、トレーサーのPABAの吸収・排泄速度について検討した。

次に、PABA-UDCA投与試験に於いて、前章のPABA-UDCAの原理の推察で述べたように、正常人の場合、PABA-UDCAは徐々に脱抱合されるが、small intestinal bacterial overgrowth では、速やかに脱抱合される。しかし長時間の尿を採集し、そこに排泄される両者のPABA累積量を求めると同じ結果になることが予測できるため、両者の状態を最もよく反映する採尿時間について検討した。更に、無処置群、腸内細菌を抑制した抗菌剤処置群、腸内細菌を増殖させた腸管内停滞係蹄群を用いPABA-UDCA投与後、一定時間の尿中PABA排泄量の比較を行ないPABA-UDCA試験の有効性を明らかにした。また、この3群における新鮮便 1g 中の総好気性菌数・総嫌気性菌数を測定しPABA尿中排泄量との関係を検討した。

尚、尿中PABA量の測定は市販のPFDテスト用尿中PABA測定キットを使用し background PABA量を差し引くことにより計算した。

## 第一節 PABAの投与試験

PABA (2.677mg) 単独投与で腸内細菌発育活性度によるPABAの吸収と排泄に与える影響は、Figure 16(A)に示す如く、無処置群と抗菌剤処置群との間で尿中PABA排泄量に有意差は認められなかった。この結果から抗菌剤処置、いわゆる腸内細菌の数はPABAの吸収・排泄に影響を及ぼさないことが明らかになった。更に、PABA投与後3時間の尿中PABA排泄量は既に約78%であり、腸内細菌の抑圧時においても容易に吸収、速やかに排泄されることが明らかになった。

## 第二節 最小有効採尿時間について

第一節に用いたPABA (2.677mg) と当量のPABA-UDCA (10mg) を無処置群と抗菌剤処置群に投与し尿中PABA排泄量を検討した結果を Figure 16(B) に示す。無処置群に比し腸内細菌を抑圧した抗菌剤処置群で3時間から24時間に亘り有意に低下した。しかし、採尿時間を3時間とするとPABA-UDCAが腸内細菌と接触するまでの lag time の影響が考えられる。また、無処置群において、24時間の採尿では、ほぼ90%が脱抱合され排泄されているために、腸内細菌が増殖したものを診断することは不可能である。したがって、腸内細菌発育活性度の減少と増加が両方評価できる最小有効採尿時間として6時間を採用した。

## 第三節 無処置群について

PABA-UDCA試験前、一昼夜絶食とし自由に水を与え、10mgのPABA-UDCAを経口投与後、6時間の尿中PABA排泄量は  $338.5 \pm 13.8 \mu\text{g}$  (mean  $\pm$  S.E.) で12.6%の回収率であった (Figure 17)。

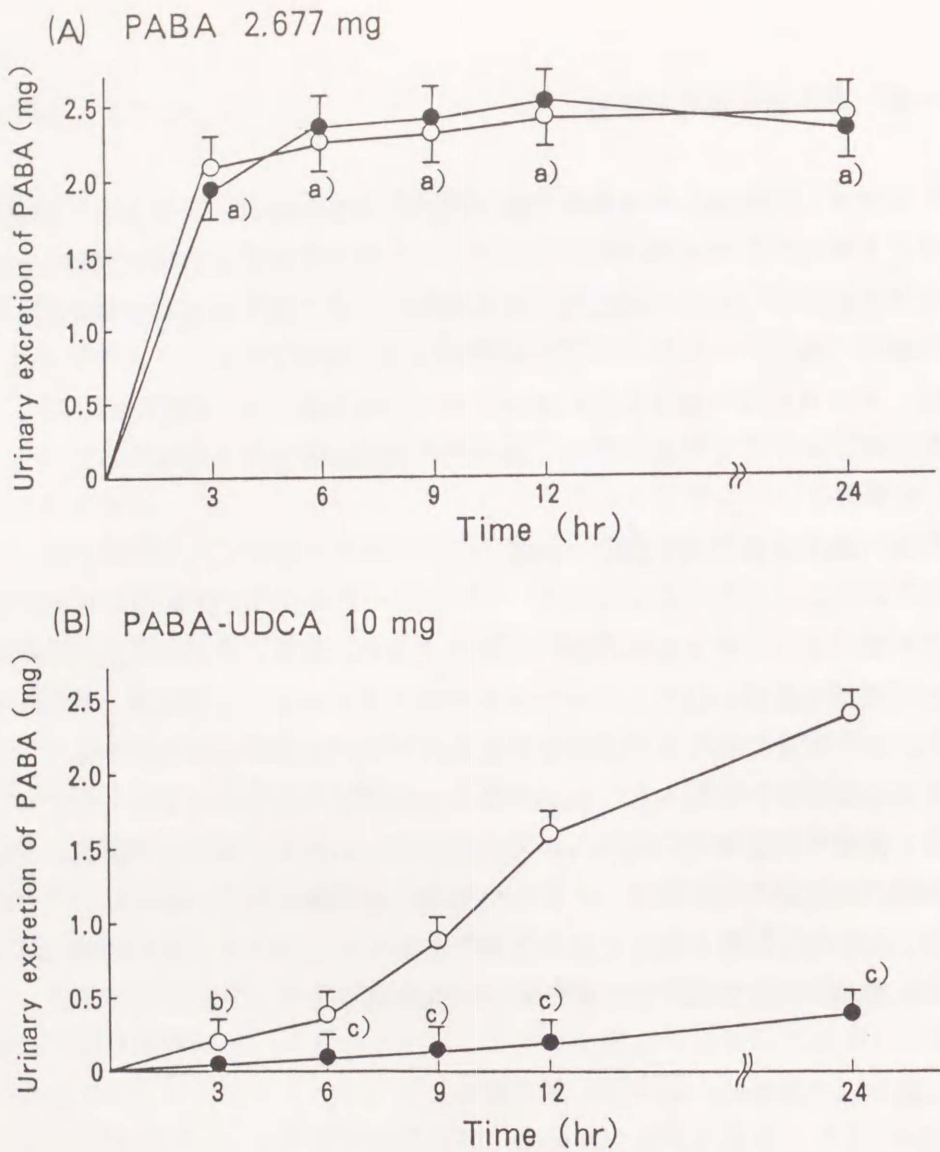


Fig.16 (A) Urinary excretion of PABA following administration of 2.677mg PABA.

(B) Urinary excretion of PABA following administration of 10mg PABA-UDCA.

Open circle: control, Closed circle: PL+TDZ-treated rats.

Each value represents mean  $\pm$  S.E. (n=5).

a) Not significance. b)  $p < 0.01$ . c)  $p < 0.001$ .

#### 第四節 抗菌剤処置群について

現在臨床で大腸手術前や骨髄移植時に、腸内細菌制腐剤として汎用されている抗菌剤<sup>63-70)</sup>を Table 4に示す。各々の1回投与量(Table 4)を1日2回3日間前処置し、10mgのPABA-UDCAを経口投与後、6時間の尿中PABA排泄量を検討した。その結果を Figure 17に示す。硫酸ポリミキシンB (PL)、チニダゾール (TDZ)、PL+TDZ、塩酸バンコマイシン (VCM)、硫酸パロモマイシン (PRM)、硫酸カナマイシン (KM)、及び塩酸クリンダマイシン (CLDM) 処置群で、それぞれ  $224.9 \pm 23.5 \mu\text{g}$ 、 $42.7 \pm 8.6 \mu\text{g}$ 、 $14.0 \pm 2.5 \mu\text{g}$ 、 $70.4 \pm 8.5 \mu\text{g}$ 、 $160.4 \pm 16.4 \mu\text{g}$ 、 $50.3 \pm 5.8 \mu\text{g}$  及び  $57.4 \pm 7.4 \mu\text{g}$  (mean  $\pm$  S.E.) のPABAが6時間の尿中に排泄された。無処置群と比較して、腸内細菌を制腐した抗菌剤処置群で全てに於いて低値 ( $p < 0.001$ ) を示した。その中でもPL、TDZ、及びPL+TDZ処置群の尿中PABA排泄量は、それぞれ、無処置群の2/3, 1/8, 及び1/25に著しく減少しており、PLが主として腸管内好気性菌に作用し<sup>69)</sup>、TDZが主として腸管内嫌気性菌に作用すること<sup>69)</sup>、並びに腸内細菌のほとんどが嫌気性菌で構成されている事実<sup>2)</sup>をよく反映し、PABA-UDCA投与試験の有用性を示す一例と思われた。

Table 4 Drugs and their amounts as a single dose

---

Polymyxin B sulfate (PL)	30,000 u
Tinidazole (TDZ)	20 mg
PL 30,000 u + TDZ	20 mg
Vancomycin hydrochloride (VCM)	20 mg
Paromomycin sulfate (PRM)	30 mg
Kanamycin sulfate (KM)	50 mg
Clindamycin hydrochloride (CLDM)	10 mg

---

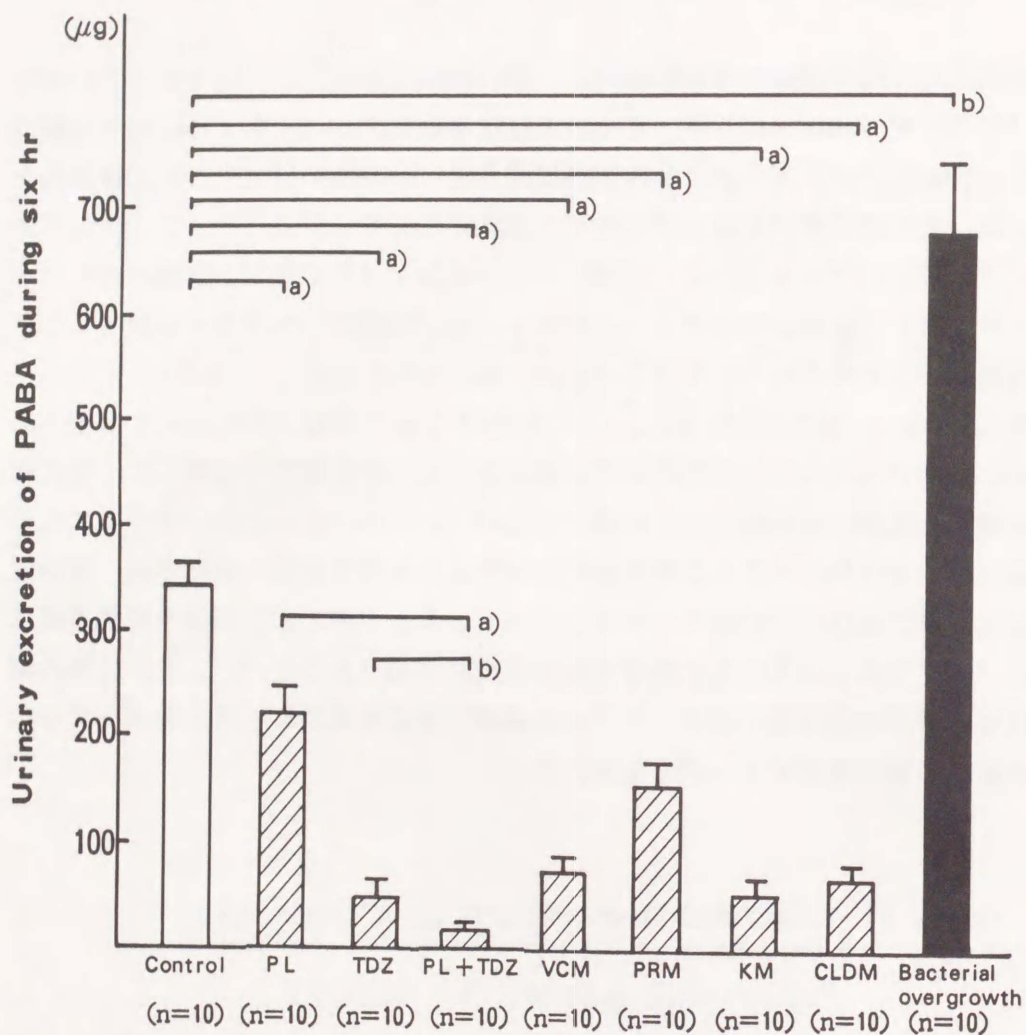


Fig. 17 Cumulative urinary excretion of PABA (mean±S.E.) during 6 h after oral administration of 10mg PABA-UDCA to nine different groups of rats.

Open bar: control, Oblique line bar: antibiotics treatment, Closed bar: small intestinal stagnant loop.

a)  $P < 0.001$ . b)  $p < 0.01$ .



## 第五節 腸管内停滞係蹄群について

腸内容物が停滞することを目的とした、いわゆる腸管内停滞係蹄 (intestinal stagnant loop) を、Figure 18 に示す如く、外科的に回腸に 12cm の袋を作製することにより小腸内細菌異常増殖状態 (small intestinal bacterial overgrowth) を人工的に生じせしめたもの<sup>71)</sup>における 10mg の PABA-UDCA 投与後、6 時間の尿中 PABA 排泄量は、 $673.6 \pm 70.2 \mu\text{g}$  (mean  $\pm$  S.E.) と無処置群に比し約 2 倍に有意に増加 ( $p < 0.01$ ) した (Figure 17)。

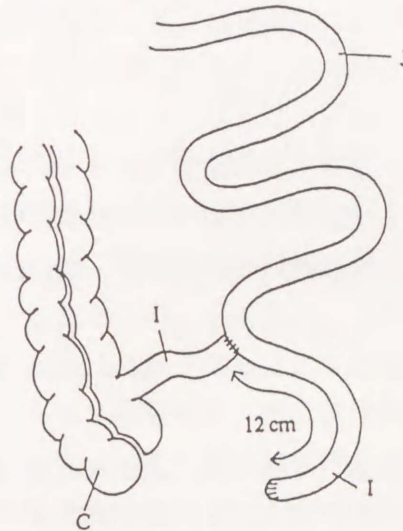


Fig. 18 Sketch of the surgical manipulation for making rats stagnant loop.  
C:cecum, I:ileum, J:jejunum.

## 第六節 糞便中の細菌数について

PABA-UDCA 投与試験におけるラットの新鮮便 1g 中の総好気性菌数・総嫌気性菌数を測定した結果を Table 5 に示す。PL+TDZ の併用で好気性菌・嫌気性菌いずれも低下し、PL 単独投与では好気性菌、TDZ 単独投与では嫌気性菌が低下していた。その他の抗生物質も同様に低下したが、腸管内停滞係蹄群では嫌気性菌が増加していた。このように糞便中の細菌数の測定は PABA-UDCA 試験をほぼ裏付けるものとなった。それは糞便中の細菌数が大腸の細菌を反映しているためと思われる。

Table 5 Bacterial counts in feces of rats on various conditions.

Animal model	Bacterial mean count per gram of wet feces <sup>a)</sup>	
	Aerobic bacteria	Anaerobic bacteria
Control	10 <sup>9.62 ± 0.07</sup>	10 <sup>10.16 ± 0.66</sup>
PL	10 <sup>8.31 ± 1.11</sup> c)	10 <sup>10.19 ± 0.94</sup> d)
TDZ	10 <sup>9.48 ± 0.15</sup> d)	10 <sup>8.14 ± 0.96</sup> c)
PL+TDZ	10 <sup>8.15 ± 0.86</sup> b)	10 <sup>7.90 ± 0.51</sup> c)
VCM	10 <sup>9.27 ± 0.92</sup> d)	10 <sup>7.84 ± 0.55</sup> c)
PRM	10 <sup>7.11 ± 0.73</sup> b)	10 <sup>10.84 ± 1.76</sup> d)
KM	10 <sup>6.85 ± 0.56</sup> b)	10 <sup>10.32 ± 0.81</sup> d)
CLDM	10 <sup>9.28 ± 0.09</sup> d)	10 <sup>9.49 ± 0.17</sup> c)
Bacterial overgrowth	10 <sup>9.49 ± 0.24</sup> d)	10 <sup>10.86 ± 0.27</sup> c)

a) mean ± S.E. (n = 5).

b) Significantly different from the control at P < 0.01.

c) Significantly different from the control at P < 0.05.

d) Not significantly different from the control.

#### 小括

PABA-UDCA投与試験において、トレーサーのPABAは腸内細菌の抑圧時でも容易に吸収され、速やかに排泄されており、本テストのトレーサーとして優れた性質を有していることが明らかとなった。また、本試験は、腸内細菌抑圧のため各種抗菌剤処置時に於いて、抗菌剤の作用機序と腸内細菌叢の状態をよく反映すると共に、小腸内細菌異常増殖状態の判定にも有効であることが明らかになった。

## 総 括

本研究に於いては、腸内細菌活性度の評価のため、PABA-UDCAを評価物質とする新しい方法の開発を試みた。

この場合、新評価物質、PABA-UDCAは以下に述べる諸条件を具備してなくてはならない。

先ず第一に、新評価物質は安価、容易に調製できるものであることが要求される。そうでないと折角新評価法を開発しても経済的理由から実際に臨床で使用してもらえないからである。著者は既報のグリシンまたはタウリン抱合胆汁酸合成法を準用して、PABA-UDCAを容易に高収率、高純度に調製することに成功した。

第二には、新評価物質、PABA-UDCAは腸内細菌の作用によってのみ加水分解されて標識化合物、PABAを遊離するもので、他の酵素、例えば、膵液中の酵素などの作用で加水分解されるものであってはならない。

先ず、後者を検証するため、膵酵素など腸肝循環系に存在する諸酵素系による抱合胆汁酸の水解をテストしたところ、PABA-UDCAと同じく非天然型抱合胆汁酸である L-Leu-UDCA 及び L-Lys-UDCA はカルボキシペプチダーゼA及びBによってそれぞれ高い高率をもって水解され、更には内因性胆汁酸であるGCAまでもがカルボキシペプチダーゼによって一部水解されたが、PABA-UDCAはテストした全ての酵素系に対して安定であることを明らかにすることができた。

次に、腸内細菌から単離・精製されグリシンまたはタウリン抱合胆汁酸の脱抱合に繁用されている加水分解酵素、コリルグリシンヒドロラーゼ (EC 3.5.1.24) に対する挙動を調べたが、PABA-UDCAはこの酵素により、GCAと全く同程度の容易さをもって水解されることが判明した。

更に、34菌種 128株の各種腸内細菌によるPABA-UDCAとGCAの脱抱合を調べて、PABA-UDCAはGCAとほぼ同じ菌種、同じ菌株によって脱抱合されるものであることを確定した。

以上の結果より、PABA-UDCAは生体内に於いて腸内細菌の作用によってのみ脱抱合されることが確認され、とりあえずこのことに限って言えば、カルボキシペプチダーゼAによって水解されることのあるGCAよりも、PABA-UDCAの方が優れた腸内細菌活性度評価物質であることが判明した。

第三に、新評価物質、PABA-UDCA自身は、体内に於いて内因性胆汁酸と同じ挙動をとることが望まれる。このことは評価物質として絶対的に必要な条件ではない。しかし、もしPABA-UDCAが内因性胆汁酸と異なる生体内挙動をとるものであるならば、また別に評価物質たり得るための幾つかの条件について、それを満足するかどうか検定せねばならない。既に、 $[1-^{14}\text{C}]$  GCA呼気テストに於いて、GCAが評価物質となり得ることは確立されているから、PABA-UDCAがそのGCAと同じ挙動をとることが検証されるならば、それだけで生体内挙動に関しては評価物質として用いることが確定できる訳である。

そこでPABA-UDCAの腸管からの吸収について検討したところ、PABA-UDCAは回腸末端から能動輸送によって効率よく吸収されるものであることが判明した。このことは経口投与されたPABA-UDCAが内因性胆汁酸と同様に腸肝循環を営むものであることを示しており、上述の腸内細菌による脱抱合の研究結果と併せ考えると、PABA-UDCAはその腸肝循環の間に腸内細菌による脱抱合を受け、 $[1-^{14}\text{C}]$  GCA呼気テストに於ける $[1-^{14}\text{C}]$  グリシンの遊離と同様にその標識化合物であるPABAを遊離してくるものと推察できる。

第四には、新評価物質中に用いた標識部分、即ちPABAに関する問題点がある。PABAはPFDテストに於いても標識化合物として用いられており、ベンチロミドから膵液酵素の作用で生じたPABAが小腸から容易に吸収され尿中に速やかに排泄されること、並びに尿中PABAは容易にしかも正確に定量し得ることは既に明らかにされている。しかし、本研究ではPABAを標識とした胆汁酸を用いて腸内細菌活性度の評価を行なおうとするものであり、その場合、膵液分泌機能の評価法であるPFDテストの場合には問題とならなかった次のことを確認しておかねばならない。その一つは、PABA-UDCAの腸内細菌による脱抱合が通常時には主として大腸で行なわれるということであり、従って大腸内で遊離されたPABAが小腸からと同様に容易に吸収されなければならないということであり、このことが満足されねばPABA-UDCAテストは小腸内細菌の過剰繁殖しか評価できないということになる。もう一つの問題点は、腸内細菌数の多寡によってPABAの吸収量に変化があってはならないということである。例えば、過剰繁殖した腸内細菌によってPABAがその分析法で定量できないような代謝物に変換されるならば、この方法は腸内細菌活性度評価法とはなり得ないのである。

そこで、著者は、反転腸管を用いた実験よりPABAが、盲腸、結腸でも確かに吸収されること、また、抗菌剤処置ラットを用いた実験より腸内細菌数の多寡は、PABAの吸収、排泄に影響を与えないことを明らかにし、PABAが腸内細菌活性度評価法に於いて〔1-<sup>14</sup>C〕グリシンに代わる標識として用いることを確定することができた。

ここで、〔1-<sup>14</sup>C〕GCAテストとPABA-UDCAテストとを比較してみると、後者はTable 6 にまとめたような多くの長所をもっている。

Table 6 Comparison of <sup>14</sup>C-GCA test and PABA-UDCA test.

	<sup>14</sup> C-GCA Test	PABA-UDCA Test
安全性	低（放射性同位元素）	高（治療薬+診断薬）
代謝	<sup>14</sup> C-GCA → <sup>14</sup> C-Gly → <sup>14</sup> CO <sub>2</sub>	PABA-UDCA → PABA
検体	呼気（マウスピース）	尿
測定機器	液体シンチレーションカウンター	吸光度計
測定感度	低	高
影響因子	tissue enzymes	吸収・肝・腎障害（補正可能）
患者拘束	重（ベッド上）	軽（自由）
価格	高	低

先にも述べたように<sup>14</sup>C-GCAテストは放射性同位元素を使用するもので放射線被爆の危険性があり、實際上、我が国では使用できない診断法である。これに対し、PABA-UDCAは、葉酸の成分であり、診断薬、ベンチロミドの構成成分であるPABAと、胆石溶解剤として長期間大量投与されるUDCAより構成されている。加えてこの両者の縮合体、PABA-UDCAは内因性胆汁酸と同一の生体内挙動をとるものであることを本研究は明らかにしている。即ち、放射性化合物を使用しないだけでなく、このように無害な物質を単回投与するだけのPABA-UDCAテストは極めて安全性の高い診断法であると断言することができる。

<sup>14</sup>C-GCAテストに於いては、〔1-<sup>14</sup>C〕GCA自体が高価であること、放射能の測定に通常の病院には設置されておらず、しかも高価な液体シンチレーションカウンターを用いること、更には後述するように呼気CO<sub>2</sub>補集のための特殊なマウスピースを必要とすることなど診断法全体の価格が高額なものとなることは避け

られない。これに対しPABA-UDCAテストでは評価物質は調製が容易なこともあって安価に供給し得る筈であり、加えてその測定には安価でしかもどこの病院の検査室にも常備されている吸光度計があれば事足りる。

$^{14}\text{C}$ -GCAテストの場合、呼気中 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ を測定することになるので、〔1- $^{14}\text{C}$ 〕GCA投与を受けた患者の呼気を特殊なマウスピースを用いて補集しなければならず、このため患者を補集装置のある場所に長時間拘束しなければならない。これに対しPABA-UDCAテストでは評価物質投与後、6時間までの尿を採取するだけで、患者拘束度は $^{14}\text{C}$ -GCAテストよりも格段に軽い。しかも、 $^{14}\text{C}$ -GCAテストでは患者を重度に拘束しているにもかかわらず、標識化合物の回収率は極めて低いのである。進藤<sup>15)</sup>は健常人の場合、 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の0-6時間呼出率 $0.69 \pm 0.03\%$  (mean  $\pm$  SD)で、bacterial overgrowth syndromeと回腸機能不全の場合、0-6時間呼出率 $17.25 \pm 10.46\%$  (mean  $\pm$  SD)と報告している。また、FrommとHofmann<sup>17)</sup>は健常人の場合、 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の0-4時間呼出率 $0.52 \pm 0.09\%$  (mean  $\pm$  SE)で、bacterial overgrowth syndromeの場合、0-4時間呼出率 $5.56 \pm 1.55\%$  (mean  $\pm$  SE)と報告している。いずれも、健常人の場合、 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の呼出ピークが見られず平坦で低値を示し、腸内細菌が異常増殖した状態のみを対象としている<sup>15, 17-19)</sup>。この低値を示す原因としては脱抱合された〔1- $^{14}\text{C}$ 〕グリシンが微生物による代謝を受けて $^{14}\text{C}\text{O}_2$ になること<sup>72)</sup>、また脱抱合された〔1- $^{14}\text{C}$ 〕グリシンが吸収され肝臓などの酵素によりいくつもの代謝過程を経て最終的に $^{14}\text{C}\text{O}_2$ になること<sup>73, 74)</sup>などが考えられる。これに対しPABA-UDCAテストでは腸管内でPABAが遊離されてからのちは極めて短時間内に高い効率で吸収され、尿中に回収される。この間にPABAは腸内細菌による代謝を受けることはなく、吸収後、肝、腎などでの抱合反応を受けるものの尿中PABAの定量の際、脱抱合操作をしているので非抱合型、抱合型の別なく定量されている。このようにPABA-UDCAテストでは標識化合物、即ちPABAの回収率が高く、従って、 $^{14}\text{C}$ の回収率の低い $^{14}\text{C}$ -GCAテストよりも高い感度で腸内細菌活性度の測定を行なうことができるのである。

今述べたように、 $^{14}\text{C}$ -GCAテストでは投与した〔1- $^{14}\text{C}$ 〕GCAから生成した〔1- $^{14}\text{C}$ 〕グリシンが更に数段階の代謝過程を経て $^{14}\text{C}\text{O}_2$ に変換される。従って、グリシン代謝に異常のある疾患患者<sup>74)</sup>に於いては $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 生成量が変動し、

そのような患者には、この試験法は用いることができない。PABA-UDCAテストはグリシンがどのように代謝されようが関係はなく、従って、この試験法がグリシン代謝異常症患者にも使用可能なことは言うまでもない。しかし、PABA-UDCAテストは、PABAの腸管からの吸収、肝での抱合、腎からの排泄によって影響を受けると思われ、従って、このテストを吸収障害、肝障害、腎障害の患者に実施するときには充分注意を払う必要があるが、PFDテストではこれらの障害を補正するために、まず、Bz-Tyr-PABAと当量のPABAを経口投与し6時間の尿中回収率を測定し、次に、Bz-Tyr-PABAを経口投与し6時間の尿中回収率を測定し、前者に対する後者の比で比較することにより補正できることが報告されている<sup>75)</sup>。PABA-UDCAテストに於いて、この方法、即ち、PABA投与によるブランクテストを併用することにより、これらの障害が補正可能となり信頼性は更に向上するものと考えられる。

尚、PFDテストの場合、投与90分後の血漿中PABA濃度の測定<sup>76)</sup>或るいは最高血漿中PABA濃度の測定<sup>77)</sup>により測定時間の短縮を謀り有効であることが報告されている。PABA-UDCAテストに於いても、同一操作により測定時間の短縮は可能であるものと思われる。

以上、PABA-UDCAテストが<sup>14</sup>C-GCAテストよりも優れていることは明らかとなったが、最後に、PABA-UDCAテストの有用性について動物試験を行ない最小有効採尿時間を6時間と定めることにより腸内細菌数の減少と増加の両方を評価することを可能にした。この結果、PABA-UDCAテストは小腸内に細菌が異常増殖する blind loop syndrome、クローン病<sup>78)</sup>、肝硬変<sup>15)</sup>など各種疾病と腸内細菌とのかかわりを追求する上で有力な診断法となることに加えて、更に、術後感染症の対策や骨髄移植時の無菌療法として抗菌剤投与による消化管内殺菌が行なわれているが、その抗菌剤の選択にあたっては本試験が効果判定に有効であることが示唆された。即ち、本研究の開発したPABA-UDCAテストは、[1-<sup>14</sup>C]GCA呼気テストに優る、我が国でもおおいに使用できる簡便で安全な信頼性の高い腸内細菌発育状態の評価法であると考えられる。

## 要 約

従来、腸管内細菌活性度を評価する方法として<sup>14</sup>Cでラベルしたグリココール酸(GCA)投与による呼気テストや、<sup>14</sup>Cでラベルしたキシロース投与による呼気テストがあり、腸内細菌の異常に増殖する blind loop syndrome の様な病態の診断に有効であることが報告されている。しかし、これらの方法は放射性同位元素を使用すること、測定が煩雑であることなど幾つかの欠点を有し少なくとも我が国での臨床には適さない。そこでこれらの欠点を解消すべく新たにウルソデオキシコール酸(UDCA)のパラアミノ安息香酸(PABA)抱合体、ウルソデオキシコリル-パラアミノ安息香酸(PABA-UDCA)を合成し、本物質経口投与後の尿中PABA排泄量の測定による腸管内細菌発育の新評価法の開発を試みた。

(1) PABA-UDCAは、PABAとUDCAを出発物質とし、グリシンまたはタウリン抱合胆汁酸合成法と同一手法により縮合させることによって収率よく合成できた。

(2) PABA-UDCAは、膵酵素混合物であるパンクレアチン、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB、トリプシン、 $\alpha$ -キモトリプシン、肝ホモジネート、小腸粘膜ホモジネート、及び、血清によっては水解されず、腸内細菌の *Clostridium perfringens* から分離、精製されたコリルグリシンヒドロラーゼによってよく脱抱合され、Lineweaver-Burk 式よる Michaelis 定数(K<sub>m</sub>値) 3.74mMを示した。この値は、同様の操作によって得られたヒトの主要胆汁酸であるGCAのK<sub>m</sub>値3.6 mMと近似しており、本物質がGCAと同様に腸内細菌に由来する水解酵素の良い基質であることが判明した。

(3) PABA-UDCAの各種腸内細菌による脱抱合を検討した結果、この非天然型抱合胆汁酸は、内因性胆汁酸のGCAと同様に好気性菌である *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus epidermidis* 及び嫌気性菌である *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Clostridium perfringens*, *Eubacterium aerofaciens* 及び *Fusobacterium varium* により脱抱合されることが判明した。

(4) PABAは小腸からだけでなく大腸からも受動輸送によって吸収されること、並びに、PABA-UDCAは回腸末端から能動輸送により吸収され、従って、内因性胆汁酸と同様に腸肝循環を営むことが判明した。



(5) PABAの吸収と排泄は、腸内細菌数により影響を受けないこと、また、PABA投与3時間後には、既に78%が尿中に排泄されていることを明らかにした。これはPABAが腸内細菌発育活性度評価のトレーサーとして優れた性質を有していることを示している。

(6) PABA-UDCA経口投与による6時間尿中PABA排泄量を検討したところ、腸管内を制腐した抗菌剤処置群では、無処置群に比し、2/3から1/25に有意に低下した。また、外科的に小腸の腸管内停滞係蹄を作製することにより、腸管内細菌異常増殖状態を人工的に生じせしめたものでは無処置群の約2倍と有意に高い値を示した。これらの糞便中の細菌数は尿中PABA排泄量の結果を裏付けるものであり、PABA-UDCA投与後の尿中PABA量の測定によって腸内細菌発育状態が評価できることを確立した。

以上、PABA-UDCAは経口投与後、内因性胆汁酸と同様に腸肝循環を営み、その間に腸内細菌により脱抱合されて生じたPABAは腸から吸収され、尿中に排泄される。したがって本物質投与後、6時間の尿中PABA排泄量の測定は、PABA-UDCAの脱抱合の程度、即ち、腸内細菌の発育状態を反映することが明らかとなり、PABA-UDCAテストは、<sup>14</sup>CラベルのGCA呼気テストに優る、我が国でも使用できる、簡便で安全な信頼性の高い腸内細菌発育状態の新評価法であると考えられる。

## 実験の部

### Materials

ウルソデオキシコール酸は東京田辺製薬株式会社より提供を受けた。パラアミノ安息香酸 (PABA)、塩化コバルト (Ⅱ) 6水塩、 $\alpha$ -キモトリプシン (ウシ膵臓)、パンクレアチン (ブタ膵臓)、トライトン-X、及び、ニコチンアミドは和光純薬株式会社より購入した。N $\epsilon$ -カルボベンゾキシー-L-リジン [Lys(Z)]、ベンゾイル-L-アルギニン-パラニトロアニリド (L-BAPA)、及びヒプリル-L-アルギニン (Bz-Gly-L-Arg) はペプチド研究所より購入、D-グルコース-6-リン酸 2ナトリウム塩 (G-6-P) とニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADP) はオリエンタル酵母工業株式会社より購入、N-ベンゾイル-L-チロシル-パラアミノ安息香酸 (Bz-Tyr-PABA) はエーザイ株式会社製を使用、ヒプリル-L-フェニルアラニン (Bz-Gly-L-Phe)、カルボキシペプチダーゼ A (1型, ウシ膵臓)、カルボキシペプチダーゼ B (1型, ブタ膵臓)、トリプシン (1型, ウシ膵臓)、コリルグリシンヒドロラーゼ (*Clostridium perfringens*)、及び、グリココール酸 (GCA) はシグマ社より購入した。抗菌剤としては塩酸バンコマイシン (VCM, 塩野義製薬)、塩酸クリンダマイシン (CLDM, 日本アップジョン)、硫酸カナマイシン (KM, 明治製薬)、硫酸パロモマイシン (PRM, 協和醗酵)、硫酸ポリミキシン B (PL, ファイザー)、チニダゾール (TDZ, ファイザー) を使用した。腸管内細菌株はファイザー株式会社より提供を受けた。その他の試薬は和光純薬より特級品を購入した。

### Methods

#### 融点 (mp)

柳本微量融点測定器で測定し、未補正である。

#### 赤外吸収スペクトル (IR)

日立分光 model IRA-1, Shimadzu model IR-408 spectrophotometer を用いて、KBr 錠剤法で測定した。

### <sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトル

JEOL model JNM-GX 400 を使用し、100MHzで測定し溶媒は重メタノールを用い、内部標準として tetramethylsilaneを用い、chemical shiftは $\delta$ 値 (ppm)で示した。また、多重度は s: singlet, d: doublet, m: multiplet で表した。

### 二次イオンマススペクトル

日立製作所製 model M-80 mass spectrometerを用い、二次イオンマススペクトル (正イオン) を次の条件で測定した。一次イオン種として  $Xe^+$ を用い、加速電圧 7 KeVで、マトリックスとしてグリセロールを用いて行なった。

### 元素分析

Yanaco CHN corder MT-5を用いて測定した。

### 高性能薄層クロマトグラフィー

HPTLC-alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> plates (Merk) を使用し、島津2波長クロマトスキャナー CS-930 型を用いて胆汁酸濃度、PABA濃度、或いはアミノ酸濃度を次の条件で測定した。測定モード: 反射吸収測定, クロマトグラム測定, 2波長法, ジグザグ走査。各々のサンプル波長 ( $\lambda_1$ ) とリファレンス波長 ( $\lambda_2$ ) を次に示す。胆汁酸: 680nm ( $\lambda_1$ ), 400nm ( $\lambda_2$ )、アミノ酸: 570nm ( $\lambda_1$ ), 400nm ( $\lambda_2$ )、PABA: 254nm ( $\lambda_1$ ), 370nm ( $\lambda_2$ ) で測定した。

### 薄層クロマトグラフィー

Kieselgel 60 F<sub>254</sub> plates (0.25mm, Merk) を用い展開後、5% リンモリブデン酸-エタノール溶液または 0.2% ニンヒドリン-ブタノール溶液を噴霧加熱にて行なった。

### カラムクロマトグラフィー

充填剤として silica gel 60 (Merk, 70-230mesh) をガラスカラムに充填し使用した。

### 吸光度

Jasco uvidec-40 UV/Visible digital spectrophotometerを用い測定した。

## 第一章の実験

PABA-UDCAの合成は 1.473g(3.752mmole) のUDCAを0.89mlのトリ-  
n-ブチラミンを含有するジオキサン 6 mlに溶解して10°Cに保ち、クロルギ酸エチ  
ル 0.375mlを加え、15分後に 1N NaOH 3.75ml で溶解したPABA510mg を加え激  
しく攪拌した。15分間の反応時間の後に60mlの蒸留水を加え、塩酸で pH 1 とした  
後60mlの酢酸エチルで3回抽出、その抽出液を蒸留水で3回水洗し、無水硫酸ナト  
リウムで乾燥後溶媒を留去。残留物をクロロホルム-メタノール (4:1,v/v)を使用  
したシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付しPABA-UDCAの粗結晶を得、  
メタノール-酢酸エチルで再結晶後、目的とするPABA-UDCAの無色結晶  
1.67g (87%)を得た。

ウルソデオキシコリル-L-ロイシン (L-Leu-UDCA) の合成は、UDCA 800mg  
(2.038mmol) とL-ロイシン268mg(2.038mmol)を出発物質として上記の合成法に準  
じて行ない L-Leu-UDCA の無色結晶 854.5mg (83%)を得た。

ウルソデオキシコリル-L-リジン ( L-Lys-UDCA ) の合成は、UDCA 800mg  
(2.038mmol) とNε-カルボベンゾキシー-L-リジン571mg (2.038mmol) を出発と  
して上記に準じて行ない、反応終了後、10% クエン酸で pH 2とした後、酢酸エチ  
ルで3回抽出、その抽出液を蒸留水で3回水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後溶  
媒を留去。残留物をメタノール5 mlに溶解し、10% パラジウムカーボン 500 mg と  
ギ酸アンモニウム 240 mg を加え 10 分間攪拌後、濾過し、濾液を減圧濃縮後ブタ  
ノール抽出し飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮し残渣を  
精製し L-Lys-UDCA の無色結晶 614.8mg (58%)を得た。

PABA-UDCAの他の合成法として、①UDCA 300mgをジオキサン3 mlに  
溶解したものに、Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 270mg とパラニトロフェノ  
ール130mg を酢酸エチル 7mlで溶解したものを加え室温で 12 時間攪拌、濾過後減圧  
濃縮し残渣を酢酸エチル：ヘキサン (3:1)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラ  
フィーに付しウルソデオキシコリル-パラニトロフェノールエステルを合成。この  
200mg をピリジン 5mlに溶解したものに、蒸留水 0.5mlに溶解したPABA110 mg  
を加え室温で 12 時間攪拌し行なった(エステル交換法)。②UDCA 400mgをピ  
リジン 3mlに溶かし無水酢酸 1 mlを加え60°Cで 3時間攪拌し、塩酸で pH1 とし  
て酢酸エチルに抽出し減圧濃縮後、UDCA 3,7-ジアセテートを得、この 300mgに

ベンゼン 10ml と塩化チオニル 0.5mlを加え、2 時間加熱還流した。反応液を減圧濃縮乾固し、この残留物のジオキサン溶液 2mlを、1N NaOH 1ml で溶解したP A B A 86mg の溶液に氷冷攪拌下に滴下後1 時間反応させた後、メタノール 3mlと 20% NaOH溶液 3mlを加え12時間放置しアセチル基を水解した(酸塩化物法)。③UDC A 400mg、EEDQ (N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline)250mg、トリエチルアミン0.11ml、パラアミノ安息香酸メチル 155mgを無水酢酸エチル 20ml に加え、2 時間加熱還流し反応液を減圧濃縮乾固し、10%  $K_2CO_3$  の  $H_2O:EtOH(1:9)$  溶液でメチルエステルを水解した(EEDQ法)。

## 第二章の実験

### (1) 膵酵素による水解実験:

①パンクレアチン: 最終濃度 1mMの抱合胆汁酸(或いは被検基質)を0.05M 3-メルホリノプロパン硫酸緩衝液(pH7.0) 5ml に溶解し、パンクレアチン 5.0mgを加え37°Cで3, 6, 24時間インキュベーションした。

②カルボキシペプチダーゼAはBz-Gly-L-Phe を基質として評価し、最終濃度 1mM の抱合胆汁酸(或いは被検基質)を 0.5M NaClを含有する0.025Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)4.5mlに溶解し、227U/ml のカルボキシペプチダーゼA0.5ml を加え37°Cで3, 6, 24時間インキュベーションした。

③カルボキシペプチダーゼBは Bz-Gly-L-Arg を基質として評価し、最終濃度 1mM の抱合胆汁酸(或いは被検基質)を 0.1M NaClを含有する0.025Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.0) 4.95mlに溶解し、2066.7U/mlのカルボキシペプチダーゼB0.05mlを加え37°Cで3, 6, 24時間インキュベーションした。

④トリプシンはBz-L-Arg-PNAを基質として評価し、トリプシンは最終濃度 5000U/ml となる様に 1mM塩酸で溶解した。最終濃度1mM の抱合胆汁酸(或いは被検基質)を11.5 mM  $CaCl_2$  を含有する0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 8.1) 4.7ml に溶解し、トリプシン溶液 0.3mlを加え37°Cで3, 6, 24時間とインキュベーションした。

⑤ $\alpha$ -キモトリプシンは Bz-Tyr-PABAを基質として評価し、最終濃度1mM の抱合胆汁酸(或いは被検基質)を1mM  $CaCl_2$  を含有する0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.8) 4.5mlに溶解し、5000U/mlの $\alpha$ -キモトリプシン0.5ml を加え37°Cで3, 6, 24時間とインキュベーションした。

(2) 血清中酵素による水解実験：

体重約 250g 雄性 Sprague-Dawley ラットから得た血清 1ml 当たり、トリプシン 2mg と 0.1mM  $\text{CoCl}_2$  の存在下に 37°C で予めインキュベーションしカルボキシペプチダーゼを活性化した血清の 1.25 ml と、最終濃度 1mM 抱合胆汁酸（或いは被検基質）を 0.5M NaCl 含有の 0.025M トリス緩衝液（pH 7.6）3.75ml に溶解したものを加え 37°C で 1, 3, 12 時間インキュベーションした。

(3) 肝ホモジネートによる水解実験：

実験前 24 時間絶食した約 250g の雄性 Sprague-Dawley ラットの肝動脈から氷冷 1.15% KCl 溶液を灌流した後、肝臓を摘出した。肝重量の 3 倍量の 1.15% KCl 含有の 0.01M リン酸緩衝液（pH 7.4）を加えホモジナイザー（PCU Drehzahlregler, Kinema GmbH Kriens-Luzern）を用いホネジネートした後、4°C 10000 x g で 20 分間遠心分離した。その上清分画を Lowly ら<sup>79)</sup> の方法に準じ蛋白定量を行い、0.1M リン酸緩衝液（pH 7.4）で 8 mg/ml の蛋白質濃度に調製し肝ホモジネートを得た。

反応は、reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) generating system (6.25mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.25mM NADP, 6.25mM G-6-P, 7.75mM ニコチンアミド) 混液 1.0ml と最終濃度 1mM 抱合胆汁酸（或いは被検基質）を 0.1M リン酸緩衝液（pH 7.4）2.75ml に溶解し、肝ホモジネート 1.25ml を加え 37°C で 1, 3, 12 時間インキュベーションした。

(4) 小腸粘膜上皮ホモジネートによる水解実験：

体重約 250g 雄性 Sprague-Dawley ラットをエーテル麻酔し、小腸を取り出してその内容物を滅菌生理食塩水で除去し洗浄。小腸重量の 3 倍量の氷冷 1.15% KCl 含有の 0.01M リン酸緩衝液（pH 7.4）を加えホモジナイザー（PCU Drehzahlregler, Kinema GmbH Kriens-Luzern）を用い 20 秒間ホモジネートした後、3000 x g で 10 分間遠心分離した。上清分画を Lowly ら<sup>79)</sup> の方法に準じ蛋白定量を行い、0.1M リン酸緩衝液（pH 7.4）で 8 mg/ml の蛋白濃度に調製し小腸粘膜上皮ホモジネートを得た。反応は、最終濃度 1mM 抱合胆汁酸（或いは被検基質）を 2mg/ml 牛血清アルブミン含有の 0.01M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）3.75ml に溶解し、小腸粘膜上皮ホモジネート溶液 1.25ml を加え 1, 3, 12 時間 37°C でインキュベーションした。

(5) 細菌性コリルグリシンヒドロラーゼによる水解実験：

1mM 抱合胆汁酸、或いは被検基質、5mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.6）、1mM E

D T A、10mM 2-メルカプトエタノール、60 U/ml コリルグリシンヒドロラーゼ (EC 3.5.1.24) の混液 5mlを37°Cで3, 6, 24時間とインキュベーションした。

(6) 抱合胆汁酸の水解率測定：

各種酵素とのインキュベーション後、各々の検体の加水分解率は、検体 1mlを Sep-pak C<sub>18</sub> (Waters Associates)に通導し水洗後、胆汁酸をメタノールで溶出し減圧濃縮の後、残渣をメタノール 0.1mlに溶解しその10 $\mu$ lを薄層プレートにスポットし展開後、第一章の純度測定と同じ操作によるデンストメーターを用いて胆汁酸濃度を測定し、抱合胆汁酸濃度に対する遊離胆汁酸濃度の出現により算出した。

(7) 標準基質の水解率測定：

Bz-Gly-L-PheとBz-Gly-L-Argの場合、各種酵素とインキュベーション後、反応液 10 $\mu$ lをHPTLCにスポットし、エタノール：アンモニア水(3:1,v/v)で展開後、デンストメーターを用いて安息香酸、馬尿酸、Bz-Gly-L-Phe、或いは、Bz-Gly-L-Argのスポットのピーク面積を254nmで計測し、安息香酸と馬尿酸の出現から水解率を計算した。

Bz-L-Arg-PNAの場合、各種酵素とインキュベーション後、分光光度計を用いて、410nmに於けるパラニトロアニリンの吸光度を測定し水解率を計算した。

Bz-Tyr-PABAの場合、各種酵素とインキュベーション後、PFDテスト用尿中PABA測定キット(エーザイ株式会社)を使用した。反応は各々の検体1mlに1.5N塩酸2mlを加えて反応を停止した後、その溶液0.1mlを0.1%パラジメチルアミノシナムアルデヒド3mlとクエン酸緩衝液(pH 2)3mlの混液に加え、10分後550nmの吸光度を計測することによって行なった。

(8) PABA-UDCAの基質親和性実験：

2.0mlの0.75% 2-メルカプトエタノール、2.0mlの1.86% エチレンジアミン四酢酸(EDTA)溶液、5, 2.5, 1.25, 0.50, 0.25mgのPABA-UDCAを含有する0.025M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.6)の5ml、1.0mlの2mg/mlコリルグリシンヒドロラーゼ溶液の混液を37°Cで3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60分とインキュベーションし、各々の検体中の遊離PABA量をPFDテスト用尿中PABA測定キットを用い上記の方法で測定した。その値からミカエリス定数(K<sub>m</sub>値)を算出した。

### 第三章の実験

PABA-UDCAと生体内主要胆汁酸であるGCAの各種腸内細菌による脱抱合を瀬戸口と香月<sup>30)</sup>の報告した方法に準じ検索した。反応培地としてGAMブロス(日水製薬株式会社)を使用、GAMブロス11.8gを70°C蒸留水で十分に溶解、更に蒸留水を加えて200mlに希釈しスクリーキャップ付試験管に6mlずつ分注した。これを123°C・15分間滅菌後、PABA-UDCA30.4mg或いはGCA22.7mgを、0.5mlジメチルホルムアミドと9.5mlの1/30Mリン酸緩衝液(pH7.6)の混液に溶解し、0.3mlずつをブロス溶液に加え攪拌した。これに34菌種128株の腸内細菌浮遊液(菌数 $1.5 \times 10^8$ /ml)の0.1mlを接種した。尚、PABA-UDCA、或いはGCAの最終濃度は283nmol/mlであった。偏性嫌気性菌は嫌気ジャーを用い、37°Cで7日間培養、通性嫌気性菌と好気性菌は好気下で37°Cで3日間培養した。反応終了後、反応培地4mlを塩酸でpH1に調製し、8mlのブタノールで3回抽出し水洗後、減圧濃縮し残渣を2mlのメタノールに溶解し10 $\mu$ lをKieselgel 60 F<sub>254</sub>プレートにスポットし、ベンゼン-ジオキサノール-酢酸(15:5:2,v/v/v)で展開した。胆汁酸の確認は5%リンモリブデン酸エタノール溶液の噴霧による発色化で同定した。判定は抱合胆汁酸の消失、コール酸、デオキシコール酸、UDCA、リトコール酸などの遊離胆汁酸の出現により脱抱合の有無を確認した<sup>30-34)</sup>。

### 第四章の実験

Sprague-Dawley雄性ラット(体重250 $\pm$ 20g)を一晩絶食し頸動脈切除により脱血死させ開腹した。幽門部から結腸までの腸管を切り出し内腔を氷冷の生食で洗浄し、小腸4等分の各中央部10cm、盲腸、大腸を取り、通気(95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>)しながら0.3%グルコース含有のKreb's-Ringer炭酸緩衝液(pH7.4)[128mM NaCl, 1.2mM CaCl<sub>2</sub>, 0.7mM MgSO<sub>4</sub>, 5.1mM KCl, 1.3mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.6mM NaHCO<sub>3</sub>, and 9mM glucose]に入れた。この各セグメントをマイクロスパーテルを用いて反転させ、Wiseman<sup>61)</sup>により報告されている摘出反転腸管を作製した。

(1) PABAの能動輸送を調べるため、反転腸管内(漿膜側; serosal side)と反転腸管外(粘膜側; mucosal side)に、0.1mM PABA含有の同一緩衝液を入れ、37°Cで95%O<sub>2</sub>と5%CO<sub>2</sub>を含むガスを吹き込みながら60分インキュベーションした。

(2) PABAの受動拡散を調べるため、漿膜側に緩衝液を入れ、粘膜側に0.1



mPABA含有の同一緩衝液を入れ、37°Cで95% O<sub>2</sub>と5% CO<sub>2</sub>を含むガスを吹き込みながら60分インキュベーションした。

(3) PABA-UDCAの能動輸送を調べるため、漿膜側(serosal side)と粘膜側(mucosal side)に、0.1mM PABA-UDCA含有の同一緩衝液を入れ、37°Cで95% O<sub>2</sub>と5% CO<sub>2</sub>を含むガスを吹き込みながら60分インキュベーションした。

60分のインキュベーションの後、反転腸管を取り出し、切開いて内容液(漿膜側)を取り、また粘膜側の溶液をも採取した。この漿膜側と粘膜側の溶液中にあるPABA、或いはPABA-UDCAの濃度をBratton-Marshall<sup>21)</sup>のSmithら<sup>22)</sup>の変法によって測定した。即ち、PABAは検体1mlに濃塩酸0.1mlを加え、その溶液の0.5mlを取り蒸留水で5.0mlに希釈し、0.1% NaNO<sub>2</sub>溶液を0.5ml混和後、4分放置、0.5% Ammonium sulfamateを0.5ml加え攪拌後4分放置、更に0.1% N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride 0.5mlを加え10分後、550nmの吸光度を計測し行なった。またPABA-UDCAは濃塩酸を加え100°Cで60分加熱により加水分解して生じたPABAを同じ方法で測定した。

## 第五章の実験

100匹の雄性Sprague-Dawleyラット(体重200±20g)を下記の4群に類別した。

(1) コントロール群(n=10): 試験に付すラットは一昼夜絶食とし、自由に水を与えた。予め、これらのラットを代謝ケージに入れ、経時的に3時間毎の尿を採取した。これらの検体中に存在するPABAを測定しbackground PABAとした。その後ラットにPABA-UDCA 10mg/ml溶液の1mlを経口投与し経時的に3時間毎の尿を採取した。これらの尿中PABA量の測定はPFDテスト用尿中PABA測定キットを使用し、標準液としてパラアセトアミノ安息香酸を用いた。検体1mlを各々スクリーキャップ付試験管に入れ、1.5N塩酸2mlを加えて密栓し、15分間沸騰水浴中で加温後、水冷し、その溶液0.1mlを0.1%パラジメチルアミノシンナムアルデヒド(DACA)3mlとクエン酸緩衝液(pH 2)3mlの混液に加え攪拌する。10分後550nmの吸光度を計測することによって行なった。尚、3, 6, 9, 12, 24時間で排泄された尿中PABA累積量はbackground PABAを差し引くことにより求めた。

(2) 抗菌剤処置群(n=70): この群は大量の抗菌剤を経口投与する事により腸管内を制腐した群である。ラットは無作為に7群に分け(a<sub>1</sub>-a<sub>7</sub>; n=10)、各々の抗菌

剤1回投与量は Table 4に示す如く、1日2回3日間前もって経口投与した。抗菌剤処置中にコントロール群と同様に尿を採取し background PABAとした。抗菌剤の最終投与4時間後に、10mg PABA-UDCAを経口投与しコントロール群と同様、尿中PABA排泄量を測定した。

(3) 腸管内停滞係蹄群 (n=10): この群は腸管内細菌異常増殖 (intestinal bacterial overgrowth) を目的とし、外科的に腸管内停滞係蹄 (intestinal stagnant loop) を作製したものである。ラットは手術前一昼夜絶食としエーテル麻酔下で開腹後、盲腸より約1.5cm 口側の回腸を切断、その口側端は盲端とし、肛門側断端の回腸を回腸切断部より約12cm口側の小腸と端側吻合した (Figure 18)。術後3日間は水だけを与え術後3日目から食餌を与えた。1週間後に、まず6時間尿を採取しPABAの background を求めた。その後、10mgのPABA-UDCAを経口投与し6時間累積尿中PABA排泄量を測定した。

(4) PABA経口投与群 (n=10): コントロール群 (n=5)とPL+TDZ処置群 (n=5)でトレーサーであるPABAを投与し、その吸収と排泄を調べた。投与量は10mgのPABA-UDCAと当量の2.677mg を含む水溶液 1mlを経口投与した。尿中PABAの定量は上記と同様に行なった。

(5) 糞便中の細菌数の測定: 前記PABA-UDCA動物投与試験に於ける各群より、5匹を無作為に取り出し、糞便1g当たりの細菌数を測定した。各々の新鮮便を滅菌生理食塩水で $10^1$ - $10^8$  倍に希釈し、好気性菌はヒツジ血液寒天培地 (日水製薬) を用い、 $37^{\circ}\text{C}$  24 時間好気下で培養、嫌気性菌はGAM寒天培地 (日水製薬) を用いて、 $37^{\circ}\text{C}$  48 時間嫌気ジャーにて行ない、糞便1g当たりの総好気性菌数と総嫌気性菌数を算出した。

## 文 献

- 1) 光岡知足, 腸内細菌の話, 岩波書店, 東京 (1978).
- 2) 光岡知足, 消化器癌と細菌, 消化器臨床生理研究会編, 医事出版社, 東京, (1980).
- 3) 光岡知足, 医学のあゆみ, 147, 363 (1988).
- 4) 小沢 敦, *Medical Practice*, 6, 2001 (1989).
- 5) 島田 馨, 代謝, 10, 37 (1973).
- 6) S. M. Finegold, and L. G. Miller, *Bact. Proc.*, 93 (1968).
- 7) 光岡知足, 感染症誌, 45, 406 (1971).
- 8) S. L. Gorbach, *Gastroenterology*, 60, 1110 (1971).
- 9) 光岡知足, 腸内細菌の世界, 叢文社, 東京 (1980).
- 10) 光岡知足, 医学のあゆみ, 150, 529 (1989).
- 11) 天野和代, 日消会誌, 84, 1591 (1987).
- 12) 大菅俊明, *Tokyo Tanabe Quarterly*, 31, 191 (1980).
- 13) R. E. Schneider, and F. E. Viteri, *Amer. J. Clin. Nutr.*, 27, 788 (1974).
- 14) C. E. King, and P. P. Toskes, *Gastroenterology*, 76, 1035 (1979).
- 15) 進藤邦彦, 最新医学, 38, 2372 (1983).
- 16) 安積和代, 田村和民, 下山 孝, 消化と吸収, 3, 78 (1980).
- 17) H. F. Fromm, and A. F. Hofmann, *Lancet*, 18, 621 (1971).
- 18) M. D. Hepner, Gershon, *Gastroenterology*, 67, 1250 (1974).
- 19) A. Newman, *Gut*, 15, 308 (1974).
- 20) C. E. King, P. P. Toskes, J. C. Spivey, E. Lorenz, and S. Welkos, *Gastroenterology*, 77, 75 (1979).
- 21) C. E. King, and P. P. Toskes, *Gastroenterology*, 91, 1147 (1986).
- 22) A. R. Imondi, R. P. Stradley, and R. L. Wohlgemuth, *Gut*, 13, 726 (1972).
- 23) 久保保彦, 桑原靖道, 谷川久一, 日本臨床, 38, 45 (1980).
- 24) 第七改正日本薬局方, C-1089, 日本公定書協会編, 広川書店, 東京 (1961).

- 25) A. Arancibia, G. Borie, E. Cornwell, and C. Medrano, *Il Farmaco-Ed. Pr.*, 36, 257 (1981).
- 26) C. Arvanitakis, M. P. Longnecker, and J. Folscroft, *J. Lab. Clin. Med.*, 91, 467 (1978).
- 27) P. C. Hirom, *Xenobiotica*, 6, 55 (1976).
- 28) H. W. Smith, N. Finkelstein, L. Aliminosa, B. Crawford, and M. Graber, *J. Clin. Invest.*, 24, 388 (1945).
- 29) K. Gyr, G. A. Stalder, and I. Schiffmann, *Gut*, 17, 27 (1976).
- 30) M. J. Hill, *Cancer*, 36, 2387 (1975).
- 31) 小沢 敦, 田爪正氣, *最新医学*, 38, 2410 (1983).
- 32) R. Lewis, and S. Gorbach, *Arch. Intern. Med.*, 130, 545 (1972).
- 33) K. Shindo, and K. Fukushima, *Gastroenterol. Jap.*, 11, 167 (1976).
- 34) S. Hayakawa, *Adv. Lipid Res.*, 11, 143 (1973).
- 35) 菅田文夫, *Tokyo Tanabe Quarterly*, 31, 168 (1980).
- 36) S. Bergström, and A. Norman, *Acta Chem. Scand.*, 7, 1126 (1953).
- 37) S. M. Huijghebaert, and A. F. Hofmann, *Gastroenterology*, 90, 306 (1986).
- 38) J. Goto, H. Kato, F. Hasegawa, and T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 1402 (1979).
- 39) F. Cortese, and L. Baumann, *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 1393 (1935).
- 40) M. K. Anwer, and A. F. Spatola, *Tetrahedron Lett.*, 22, 4369 (1981).
- 41) J. A. Hartsuek, and W. N. Lipscomb, *Carboxypeptidase A*, "The Enzymes", Vol.3, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, Inc., New York (1971) pp.1
- 42) J. E. Folk, *Carboxypeptidase B*, "The Enzymes", Vol.3, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, Inc., New York (1971) pp.57.
- 43) B. Keil, *Trypsin*, "The Enzymes", Vol.3, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, Inc., New York (1971) pp.250.
- 44) 今村憲市, 藤岡 謙, 宮沢 正, 阿部泰久, 中村光男, 武部和夫, *臨床と研究*, 57, 341 (1980).

- 45) J. E. Folk, and E. W. Schirmer, *J. Biol. Chem.*, 238, 3884 (1963).
- 46) P. H. Petra, *Methods Enzymol.*, 19, 460 (1970).
- 47) J. E. Folk, K. A. Piez, W. R. Carroll, and J. A. Gladner, *J. Biol. Chem.*, 235, 2272 (1960).
- 48) K. A. Walsh, *Methods Enzymol.*, 19, 41 (1970).
- 49) 第十一改正日本薬局方, D-757, 日本公定書協会編, 東京 (1986).
- 50) 田中直見, 肝胆膵, 9, 29 (1984).
- 51) 大菅俊明, 日本臨床, 42, 1496 (1984).
- 52) L. M. Peterson, and B. Holmquist, *Biochemistry*, 22, 3077 (1983).
- 53) E. G. Erdos, E. M. Sloane, and I. M. Wohler, *Biochem. Pharmacol.*, 13, 893 (1964).
- 54) S. Auricchio, L. Greco, B. de Vizia, and V. Buonocore, *Gastroenterology*, 75, 1073 (1978).
- 55) E. E. Sterchi, J. R. Green, and M. J. Lentze, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2, 539 (1983).
- 56) P. P. Nair, *Bile Salt Metabolism*, ed. by L. Schiff, T. B. Carey, J. R. Dietschy, and J. M. Dietschy, CC Thomas, Springfield, III, USA (1969) pp.172.
- 57) P. P. Nair, M. Gorden, and J. Reback, *J. Biol. Chem.*, 242, 7 (1967).
- 58) A. Norman, and R. Grubb, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 36, 537 (1955).
- 59) J. M. Dietschy, *J. Lipid Res.*, 9, 297 (1968).
- 60) A. F. Hofmann, *Tokyo Tanabe Quarterly*, 31, 115 (1980).
- 61) G. Wiseman, *Methods Med. Res.*, 9, 287 (1961).
- 62) S. Walker, A. Stiehl, R. Raedsch, P. Kloters, and B. Kommerell, *Digestion*, 33, 184 (1986).
- 63) R. E. Condon, *World J. Surg.*, 6, 182 (1982).
- 64) I. J. Cohn, and N. L. Orleans, *South. Med. J.*, 75, 1534 (1982).
- 65) J. O. L. King, *Laboratory Animals*, 15, 205 (1981).
- 66) 高木一光, 日大医誌, 45, 1081 (1986).

- 67) E. J. Poth, *World J. Surg.*, 6, 153 (1982).
- 68) I. J. Cohn, and G. H. Bornside, *World J. Surg.*, 6, 166 (1982).
- 69) 平山 隆, 正宗良知, 斎藤俊博, 国井康男, 菅野久義, 菊地金男,  
日消外会誌, 15, 826 (1982).
- 70) 丸山 洋, 日消外会誌, 17, 1566 (1984).
- 71) D. E. Polter, J. D. Boyle, L. G. Miller, and S. M. Finegold,  
*Gastroenterology*, 54, 1148 (1968).
- 72) S. M. Klein, and R. D. Sagers, *J. Biol. Chem.*, 241, 197 (1966).
- 73) D. A. Richert, R. Amberg, and M. Wilson, *J. Biol. Chem.*, 237, 99  
(1962).
- 74) K. Tada, K. Narisawa, T. Yoshida, T. Konno, Y. Yokoyama,  
H. Nakagawa, K. Tanno, and K. Mochizuki, *Tohoku J. exp. Med.*,  
98, 289 (1969).
- 75) C. J. Mitchell, C. S. Humphrey, A. W. Bullen, J. Kelleher, and  
M. S. Losowsky, *Scand. J. Gastroenterol.*, 14, 737 (1979).
- 76) Z. Weizman, G. G. Forstner, K. J. Gaskin, H. Kopelman, S. Wong,  
and P. R. Durie, *Gastroenterology*, 89, 596 (1985).
- 77) J. C. Delchier, and J. C. Soule, *Gut*, 24, 318 (1983).
- 78) 岡田光男, 八尾恒良, 日本臨床, 46, 298 (1988).
- 79) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall,  
*J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 80) 瀬戸口敏明, 香月武人, 日本臨床, 42, 1515 (1984).
- 81) A. C. Bratton, and E. K. Marshall, *J. Biol. Chem.*, 128, 537 (1939).

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤な御指導、御校閲を賜りました、広島大学医学部総合薬学科教授 穂下 剛彦 先生に心より謹んで感謝の意を表します。

また、本研究に際し、終始いろいろ細かい御指導、御鞭撻をいただいた中国労災病院外科部長 高橋 信 先生に心より深謝致します。

御指導、御助言を賜りました、広島大学医学部総合薬学科教授 辰巳 淳 先生、広島大学医学部総合薬学科教授 中村 昭四郎 先生、広島大学医学部総合薬学科教授 矢田 登 先生、広島大学医学部内科学教授 梶山 梧朗 先生に深甚なる謝意を捧げます。

赤外吸収スペクトル測定、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定に御協力を賜りました広島大学医学部総合薬学科助教授 木平 健治 先生に心より深謝致します。

御指導、御協力、御援助を載しました、広島大学医学部総合薬学科助教授 倉本 戴寿 先生、並びに穂下研究室の皆様は厚く御礼申し上げます。

また、格別の御助力をいただいた、広島大学医学部 松野 清 先生、中国労災病院外科 田代 裕尊 先生、中国労災病院検査科 赤沢 富士夫 氏に謹んで感謝の意を表します。

更に、御協力、励ましを載しました、中国労災病院薬剤部長 突合 皐月 博士、及び、中国労災病院薬剤部の皆様は重ねて厚く御礼申し上げます。