

モルモットにおける cycasin の影響に関する実験的研究

河野猪三郎・武原栄造・清水 孜・安田宣絵

小林 昭*・田寺謙次郎*・八木史郎*

(家畜病理学研究室・*生物化学及び栄養化学研究室)

昭和59年8月8日 受理

Experimental Studies on Effects of Cycasin on Guinea Pigs

Isaburo KONO, Eizo TAKEHARA, Tsutomu SHIMIZU, Nobuhiro YASUDA,
Akira KOBAYASHI, *Kenjiro TADERA* and Fumio YAGI*

(*Laboratory of Veterinary Pathology, *Laboratory
of Biochemistry and Nutritional Chemistry*)

緒 論

1975年頃から沖縄県下の離島の放牧牛にソテツ葉摂取による中毒性疾患が多発し、臨床的に後軸運動障害、後軸麻痺、さらに脱角等もみられ、病理学的に特徴的な病変として、脊髄白質部における神経維維の変性、断裂が認められ、臨床症状の後軸運動障害と関連があることが判明し、かつて中米、オーストラリアで報告されたソテツ中毒牛とほとんど類似の疾患であることを報告した^{7,8,18}。さらに、実験的に牛にソテツ葉を摂取させ、野外例と全く同様の症状と脊髄病変が発現した¹⁷。これにより本疾患はソテツ葉摂取による中毒性疾患であることが明確になった。しかし、本疾患を惹起するソテツ葉成分中の神経毒性原因物質、あるいは、すでにソテツ有毒配糖体として分離されているcycasinとの因果関係などについては未解決である。Cycasinについては実験動物における発癌性に関する研究が多く、その他、新生ラット、マウスにおける小脳障害、および妊娠ラット、マウスにcycasinを投与すると新生児に小脳症がみられるとの報告がある^{4,5,15}。Cycasinのモルモットの神経系に対する影響についての報告は少なく、西田ら¹⁰がモルモットにcycasinを投与すると、直後に運動障害や麻痺がみられたと報告しているにすぎない。今回cycasinの神経系に対する影響について、cycasinをモルモットに反復投与し、臨床的、血液学的、血液生化学的検査ならびに病理学的検査を行ったところ、若干の興味ある知見が得られたので報告する。

材 料 と 方 法

実験にはHartley系の雌モルモット、2~3カ月齢、体重450~780g(平均598g)のもの25頭を使用

した。モルモットはワイヤーメッシュの底のついたプラスチックケージに、それぞれ2頭ずつ収容した。飼料はモルモット用の固形飼料を、飲水は水道水を使用した。

Cycasinは結晶を蒸留水に0.1または1.0mg/ml(w/v)の割合で溶かし、群により1mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 15mg/kgを投与した。投与は3日間に1回で経口的に行った。モルモットはA, B1, B2, B3, B6, C1, C2, C3, Dの9群に分け、各群2~3頭とし、対照として生理食塩水10ml/kg投与したもの2頭、無処置のモルモット2頭を用いた。1回投与量、投与回数、投与期間、投与総量はTable 1に示したとおりである。

実験期間終了後、モルモットはクロロホルム麻酔下に開胸し、右心室より全採血を行い、放血死後剖検した。衰弱顯著で死亡の予想されるモルモットについても同様の方法で、また、実験期間中死亡したモルモットは死後直ちに剖検した。屍体は肉眼的観察を行った後、各臓器の重量を測定し、10%ホルマリン水に固定した。脊髄および坐骨神経は筋、骨を除去して露出せしめ、同様に固定した。組織はパラフィン包埋後、法に従い、H-E, azan, sudan III, PAS, prussian blue, luxol fast blueの各染色を施した。

血液学的検査としては、赤血球数、ヘマトクリット値、屈折蛋白計による血清総タンパク(T.P.)の測定を行った。血液生化学的検査として、中外製薬ユニキットを使用して、GOT, GPT, γ -GTP, LDH, Al-p, cholesterol, bilirubin, BUN, glucose, ChE, CPKを測定した。セルローズアセテート膜法による電気泳動にて、T.P., 血清タンパク分画の測定を行った。血清電解質については常光社アライザーより測定した。

Table 1. Experimental schedule and grouping of the animal

Group	Animal No.	Dose (mg/kg/day)	Duration of exp. (days)	No. of dosing	Total dose (mg)
A	1	1.0	180	60	33.21
	2	1.0	180	60	39.16
	3	1.0	180	60	43.08
B1	1	5.0	30	10	29.35
	2	5.0	30	10	33.50
B2	1	5.0	60	20	52.35
	2	5.0	60	20	57.80
B3	1	5.0	90	30	94.10
	2	5.0	90	30	91.80
B6	1	5.0	180	60	202.60
	2	5.0	180	60	175.90
	3	5.0	180	60	189.55
C1	1	10.0	30	10	59.20
	2	10.0	30	10	65.10
C2	1	10.0	60	20	144.60
	2	10.0	60	20	104.60
C3	1	10.0	90	30	185.50
	2	10.0	90	30	159.70
D	1	15.0	63	21	201.45
	2	15.0	64	21	171.90
	3	15.0	72	25	238.50
Control	1	10.0 (ml/kg, saline)	180	60	—
	2	10.0 (ml/kg, saline)	138	46	—
Untreated	1	—	180	—	—
	2	—	180	—	—

Female guinea pigs of Hartley strain, weighing 450-780g (average 598g) in the age of 2-3 months, were subdivided into 4 experimental groups of 3-9 animals each, and given repeated oral administrations of cycasin dissolved in distilled water, 0.1 or 1.0 mg/ml (w/v), using a rubber catheter for human use, with a fixed dose of 1, 5, 10 or 15 mg/kg/day at intervals of 3 days. The experimental animals were sacrificed regularly at 1st, 2nd, 3rd or 4th months of experiment, excepting cases in emergency. Two control animals were given 10 ml/kg of physiological saline at intervals of 3 days. Two untreated guinea pigs were adopted as control, being sacrificed at the termination of the experiment.

結 果

1. 臨床所見

体重の変化は Fig. 1 に示した。図には、投与期間の最も長い A 群、B6 群、投与量の最も多い C3 群、D 群の平均体重を示した。なお群中いずれかが欠けた時点、すなわち D 群は投与開始後 63 日目、control 群は 138 日までのものを示した。C3 群、D 群でみられた体重の減少は、1 回投与量の多い D 群でより著明であった。B6 群の平均体重は投与開始 2 ヶ月後では A 群のそれを下回り、その後も軽度ながら減少する傾向がみられた。A 群の体重減少の傾向はなかった。臨床的には、D 群は投与開始 50 日頃より削瘦が顕著になり、No. 1 は 63 日後に衰弱し、死亡した。No. 2 および No. 3 も削瘦、衰弱が顕著となり、死亡が予想され

たため、それぞれ 64 日後、72 日後に放血殺を行った。試験期間中軽度の脱毛が、B2 群 No. 2, B3 群 No. 2, B6 群の全頭、C2 群 No. 1, D 群 No. 3 でみられた。いずれの投与群にも運動障害などの神経症状はみられなかった。

2. 血液学的および血液生化学的所見

血液学的検査の結果を Table 2 に示した。C 群で、投与量の増加、投与期間に応じて赤血球数、ヘマトクリット値の増加、T. P. の減少傾向がみられた。とくに D 群はかなりの変化が認められた。T. P., 電気泳動による血清タンパクの分画の測定の結果および A/G 比を Table 3 に示した。B6 群、C2 群、C3 群、D 群で対照群に比較して、アルブミン値が低く、 γ -グロブリン値が高く、A/G 比の低い例がみられた。Cycasin 投与群では一般に γ -グロブリン値の上昇の傾向がみ

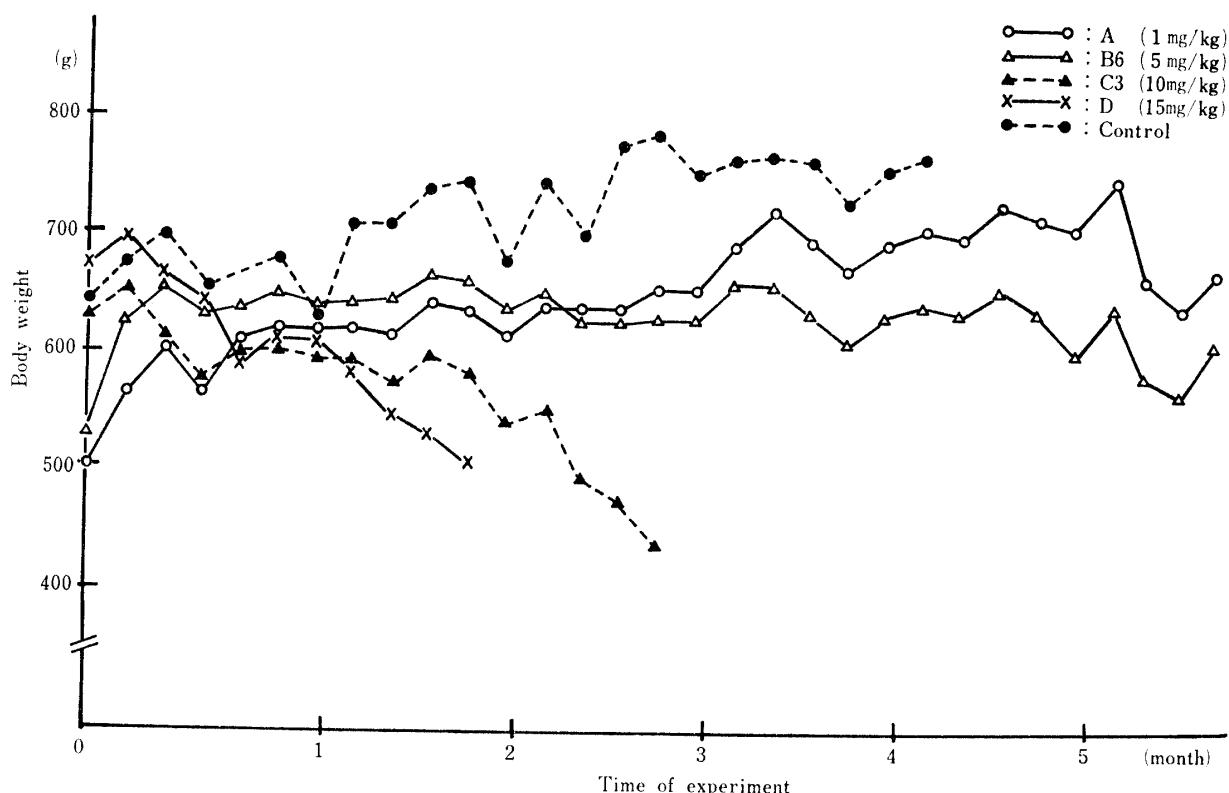


Fig. 1. Effect of cycasin gavage on body weight.

られたが、投与量とは無関係であった。

血液生化学的検査の結果を Table 4 に示した。C3 群と D 群では GOT, GPT, LDH, Al-p, BUN の上昇と glucose の低下がみられた。D 群においては肝機能に関する酵素活性が高くなっていることを示した。ChE は一般に投与量の増加に従い、上昇の傾向がみられた。電解質についてはとくに異常は認められなかった。

3. 病理解剖学的所見

肉眼的病変として C2 群 No. 2, C3 群 No. 1, No. 2 で肝臓表面および剖面に針頭大～粟粒大の白斑がみられた。その他には著変はなかった。臓器重量および臓器重量と体重の割合は肝臓を除いて、変化はみられなかった。肝臓の重量および体重との重量比は Table 5 に示したように、投与量の増加に従い、肝臓重量減少の傾向がみられた。

4. 病理組織学的所見

Cycasin の影響は主として肝臓にみられたが、その他の臓器にもみられた。その程度については Table 6 に示した。肝臓における病変は肝細胞の腫大、核の腫大、核小体の腫大のいずれかが 1 つ以上みられたものに対して、Zedek らが使用した megalocytosis の表現を用いた。以下病変について詳細に述べる。

A 群：軽度の小葉中心性の肝細胞索の乱れが No. 1, No. 3, に、肝細胞の脂肪化が No. 1, No. 2 にみられた。No. 1 では中等度、No. 2 では軽度であった。

B1 群：No. 1, No. 2, ともに小葉中心性の肝細胞索の乱れ、顆粒変性、空胞化、壊死がみられた。これらの変化は No. 2 の方が No. 1 より明瞭であった。また、軽度の megalocytosis, すなわち小葉中心性の軽度の肝細胞の腫大、および強拡大で認められる程度の核の大小不同が認められた。

B2 群：No. 1, No. 2, とも B1 群と同様の変化がみられたのに加え、小葉中心部における類洞の拡張が認められた。B1 群と同様の変化のうち、肝細胞索の乱れ、変性、壊死は B1 群 No. 2 と同程度であった。Megalocytosis は肝細胞および核の腫大で、小葉中心性にみられ、B1 群よりやや明瞭であった。また、変性した肝細胞に壞死も散見された。

B3 群：No. 1, No. 2, ともに B2 群でみられた病変に加え、No. 1 では小葉間帯に中程度の脂肪化が、No. 2 では小葉中心部のクッパー細胞中にヘモジデリンの沈着が軽度にみられた。小葉中心部における類洞の拡張と megalocytosis は B2 群に比較し、頗著で肝細胞の変性、壊死が多く認められた。

B6 群：肝細胞の乱れ、類洞の拡張、肝細胞の変性、

Table 2. Hematologic values

Group	No.	RBC ($\times 10^4$)	Ht (%)	Total protein (g/dl)
A	1	503	47	5.2
	2	546	41	5.2
	3	540	42	5.1
B1	1	401	36	4.6
	2	454	39	5.2
B2	1	584	49	5.0
	2	490	44	4.6
B3	1	473	42	4.4
	2	524	47	4.8
B6	1	610	55	5.2
	2	554	47	3.8
	3	532	45	4.4
C1	1	441	43	6.0
	2	429	38	4.6
C2	1	487	45	4.6
	2	506	52	4.6
C3	1	629	58	2.8
	2	596	57	4.0
D	2	681	58	3.0
	3	662	57	3.6
	1	553	46	5.0
Control	2	504	43	5.1
	1	470	40	4.4
Untreated	2	460	39	3.6

Blood was taken from the right ventricle of heart at the opened chest under chloroform-anesthesia in the vacuum syringe containing EDTA as anticoagulant, VT-052DK, Terumo Co. Ltd., Tokyo. Total protein values were estimated by a refractometer.

壊死、胆管の増生が3例ともみられ、軽度の脂肪化がNo.1に、クッパー細胞によるヘモジデリンの貪食がNo.1, No.2にみられた。No.3の類洞の拡張はB3群と同程度であったが、No.1, No.2はB3群より不明瞭であった。肝細胞の変性、壊死はNo.3では小葉中心性で軽度であったが、No.1, No.2ではほぼ小葉全体にわたってみられた。MegalocytosisはNo.3ではB3群と同様小葉中心性であったが、No.1, No.2ではほぼ小葉全体におよんでおり、その程度はB3群より著しかった。胆管の増生は、No.3では軽度の小胆管の増生であったが、No.2では巢状性に胆管上皮の増生している部が散在してみられた。とくに小葉間部では結合織を伴って顕著に増生していた。増生した胆管上皮は腺腔を形成するもののに、腺腔形成はみられず、肝細胞と胆管上皮細胞の中間の形態を呈し、円形、橢円形のクロマチンの少ない、いわゆるoval cellと思われるものが散見された。No.1では小葉間結合織に腺腫様の増生がみられ、腺腔内にはPAS陽性物質

Table 3. Fractionation of plasma protein electrophoresis

Group	No.	T.P. (g/dl)	Alb. (%)	α (%)	β (%)	γ (%)	A/G
A	1	5.9	61.4	21.9	8.6	8.1	1.59
	2	6.7	62.9	18.0	9.8	9.3	1.70
	3	5.7	63.6	16.3	11.0	9.1	1.75
B1	1	4.6	59.1	22.1	9.4	9.4	1.45
	2	4.5	65.4	17.1	9.6	7.9	1.57
B2	1	6.7	56.7	18.6	11.3	13.4	1.31
	2	6.0	56.4	23.2	10.5	9.9	1.29
B3	1	—	—	—	—	—	—
	2	3.0	58.6	18.5	10.0	12.6	1.41
B6	1	5.3	53.4	19.5	9.8	17.2	1.15
	2	4.5	56.8	20.8	7.1	15.3	1.32
	3	4.7	61.4	16.4	12.9	9.4	1.59
C1	1	—	—	—	—	—	—
	2	4.0	60.0	25.2	7.4	7.4	1.50
C2	1	6.8	55.2	23.7	11.3	9.8	1.23
	2	5.0	47.4	25.3	10.5	16.8	0.90
C3	1	4.2	57.6	19.2	6.4	16.8	1.36
	2	4.2	49.7	23.5	12.4	14.5	0.99
D	2	3.2	41.0	20.0	5.7	33.3	0.69
	3	3.8	49.5	24.8	13.3	12.4	0.98
	1	6.3	54.5	25.0	12.7	7.7	1.20
Control	2	6.7	59.7	23.6	10.5	6.3	1.48
	1	4.6	64.8	21.2	7.9	6.1	1.84
Untreated	2	5.6	62.6	25.6	4.1	8.1	1.98

Electrophoresis was made, using cellulose acetate membrane method.

が認められた。またNo.1ではび漫性に軽度の脂肪化もみられた。

C1群：小葉中心性の肝細胞の乱れ、肝細胞の変性、壊死、軽度のmegalocytosisがみられた。その程度はNo.1が中等度でNo.2が軽度で、全般的にB2群に類似した病変であった。

C2群：C1群でみられた変化がより明瞭に認められた他に、小葉中心部におけるクッパー細胞のヘモジデリン貪食が2例に、胆管の増生がNo.2にみられた。MegalocytosisはNo.1では小葉中心性に肝細胞の腫大、核の腫大および比較的少數であるが、腫大した核小体がみられた。No.2では腫大した核および核小体がNo.1より多く認められた。胆管の増生が巢状性に散在してみられ、B6群でみられたと同様の腺腔形成の認められないoval cellの増生がみられた。全般みて、No.1はB3群に、No.2はB6群に類似した病変である。

C3群：肝臓では2例いずれもC2群No.2でみられた変化に加えて、び漫性に軽度の脂肪化がみられ、

Table 4. Enzyme activities and concentration of various substances in the serum

Group	No.	GOT (K.U.)	GPT (K.U.)	γ -GTP (I.U.)	LDH (I.U.)	Al-P (K.A.U.)	cholesterol (mg/dl)	bilirubin (mg/dl)	BUN (mg/dl)	glucose (mg/dl)	ChE (I.U.)	CPK (I.U.)	Na (mEq/dl)	K (mEq/dl)	Ca (mg/dl)	Mg (mg/dl)
A	1	101.70	26.43	8.67	626.1	3.13	60.16	0.30	16.06	213.4	3007	253.7	142.5	6.26	5.83	3.31
	2	69.05	23.01	4.00	289.6	1.43	30.78	0.13	13.00	277.1	1751	122.1	154.7	9.21	7.04	2.94
	3	56.09	28.11	6.09	243.7	3.62	16.16	0.40	13.66	218.9	1881	67.5	140.1	7.14	6.36	2.11
B1	1	136.0	28.44	0.31	476.4	2.79	28.29	0.04	17.21	77.7	2586	508.2	113.1	5.07	4.80	2.36
	2	43.29	24.13	3.06	172.8	2.22	34.05	0.27	14.67	142.9	2561	37.4	143.5	8.69	5.83	2.47
B2	1	58.49	27.37	14.5	215.1	2.84	19.05	0.10	10.88	418.7	2648	118.7	149.0	11.64	7.63	4.38
	2	52.76	24.13	8.61	132.4	3.19	17.69	0.01	11.97	284.1	2090	96.2	152.4	11.01	7.47	4.17
B3	1	166.00	30.07	13.05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	145.70	31.49	6.44	454.3	3.72	32.25	0.14	12.17	144.1	2102	161.0	109.2	6.21	4.25	2.53
B6	1	161.10	28.94	12.88	378.4	4.03	50.21	0.55	12.17	247.7	2666	192.2	133.0	9.96	6.44	4.18
	2	85.59	28.00	7.64	214.6	3.55	38.55	0.20	12.07	117.0	3069	148.5	142.9	5.42	5.57	3.07
C1	3	66.93	23.79	5.91	231.9	3.51	32.88	0.16	18.16	235.4	3466	66.2	135.7	8.52	5.99	3.37
	1	192.80	29.70	3.48	614.0	2.39	—	0.03	20.29	—	2819	—	—	—	—	—
C2	2	82.57	35.44	5.91	417.6	2.77	26.86	0.04	19.68	92.2	2735	89.3	126.8	5.37	5.36	6.55
	1	78.04	26.44	0.07	243.9	2.98	31.35	1.04	13.51	147.6	3003	131.9	160.0	9.11	7.59	2.20
C3	2	125.90	25.78	19.60	407.8	3.16	45.27	1.45	10.59	111.0	2890	33.6	135.2	7.37	5.88	4.63
	1	127.70	22.07	10.80	376.2	2.64	72.92	0.31	10.17	71.6	3487	10.4	147.3	5.83	5.84	4.40
D	2	318.10	26.99	11.72	757.9	2.51	72.73	1.09	15.62	106.5	6024	440.5	—	—	—	—
	2	338.40	43.52	12.40	1021.0	5.57	5.93	0.52	68.76	6.7	3497	4.6	122.9	5.91	3.67	5.34
Control	3	550.50	52.17	9.63	1485.0	11.11	114.9	4.14	39.47	32.3	4547	19.3	148.1	5.12	4.73	3.06
	1	45.32	18.67	0.42	293.4	1.55	20.91	0.12	12.10	193.4	1500	150.7	154.9	8.50	6.79	4.87
Untreated	2	50.10	20.44	9.54	147.6	3.10	20.01	0.32	14.55	470.1	2387	34.9	148.1	15.15	8.22	3.70
	1	87.11	32.88	3.65	313.3	2.42	40.85	0.45	17.07	266.3	1403	80.9	135.3	7.56	6.07	4.06
Untreated	2	102.40	23.43	1.79	197.4	1.58	64.55	0.10	13.53	185.9	608	291.9	162.5	7.82	7.06	3.46

Blood was taken from the right ventricle of heart at the opened chest under chloroform anesthesia, using 10 ml syringe and 18Gx1/2 needle, Terumo Co. Ltd., Tokyo. Serum was obtained by centrifugation of the clot at 3,000 rpm. For analyses of GOT, GPT, γ -GTP, LDH, Al-P, cholesterol, bilirubin, BUN, glucose, ChE, and CPK reagents of Unikit (Chugai Seiyaku Co. Ltd., Tokyo) and for those of electrolytes, Na-K analyser and Ca-Mg analyser, Jōkō Co. Ltd., Tokyo, were used.

Table 5. Body weight, liver weight, and the ratio

Group	No.	Body weight (g)	Liver weight (g)	Liver weight /body weight
A	1	510	15.70	3.08 (%)
	2	660	17.65	2.67
	3	840	22.20	2.64
B1	1	580	19.96	3.44
	2	660	22.76	3.37
B2	1	610	22.10	3.62
	2	630	19.38	3.01
B3	1	600	16.30	2.72
	2	640	16.10	2.51
B6	1	650	13.85	2.13
	2	470	7.35	1.56
	3	725	19.00	2.62
C1	1	590	18.31	3.10
	2	570	21.20	3.72
C2	1	700	16.26	2.32
	2	480	12.69	2.64
C3	1	460	10.08	2.23
	2	420	7.56	1.82
D	2	450	12.12	2.69
	3	540	14.49	2.68
	1	870	25.70	3.06
Control	2	680	25.10	3.69
	1	595	20.40	3.43
Untreated	2	510	18.10	3.55

胆管の増生は No. 1 では主に小胆管の増生で、一部小葉間胆管上皮が著明に重層化しているのが認められた。No. 2 では C2 群の No. 2 と同様で巢状に広範囲にわたって増生がみられた。腎臓では 2 例ともに、皮質近位尿細管上皮細胞の腫大およびそれに伴う管腔の狭窄あるいは閉塞が認められた。脾臓では 2 例ともに脾臓房内脂肪化がみられた。

D 群：肝臓では C3 群と類似した変状がみられたが、*megalocytosis* はより顕著になり、核の腫大、核小体の腫大、核の空胞化が明瞭になった。胆管の増生が小葉間結合織内に認められた。脾臓では C3 群同様にび漫性に脂肪化がみられたが、C3 群より軽度であった。脾臓は 1 例ではあるが脾洞の顕著な拡張がみられ中にマクロファージが少数認められた。

脳、脊髄および神経節、坐骨神経はいずれの群の例にも異常は認められなかった。これを要するに *cycasin* は主として肝毒性として影響を与え、神経系には影響しないことが示された。

考 察

Cycasin の神経系に対する影響として、Hirano ら⁴⁾ は新生児マウス、新生児ハムスターへの皮下注射によ

って小脳外顆粒層に広範囲に壞死がおこり、後脚麻痺を特徴とする神経症状がみられるなどを報告した。Jones ら⁵⁾ も新生児マウスへの皮下注射により、小脳容積の減少、小脳の葉の複合化、小脳外層の未分化細胞の壞死がおこり、それは物理化学的あるいは感染性の因子によっておこる *granuloprival cerebellar hypoplasia* に類似すると報告している。Haddad ら²⁾ や Spatz ら¹⁵⁾ は新生児ラット、ウサギ、フェレット、イヌ、ネコでも *cycasin* のアグリコン MAM の合成品 MAM-acetate の投与により同様のことがおこったと報告している。Spatz ら¹⁶⁾ は出生前に *cycasin* を投与することによって、ラットに小脳症がおこることを、さらに Haddad ら²⁾ も同様に MAM-acetate を投与することによって、ラット、ハムスター、フェレットに小脳症が発現したと報告している。本実験では成熟モルモットの関係から小脳外顆粒層の壞死あるいは小脳症は認められなかった。*Cycasin* の発癌性はつとにしられているが、発癌性の実験における *cycasin* の投与回数は数回以内で、かつ 1 年以上の長期観察が必要である。本実験ではモルモットに *cycasin* を反復的に 10 回以上、多くて 60 回経口投与する方法をとり、観察したが、神経症状はみられず、病理組織学的にも脳脊髄に病変は認められなかった。

本実験で臨床的にみられた体重の減少、衰弱は、*cycasin* による肝障害によるものであろう。脱毛は対照群にもみられ、投与量に関係なく散発していることから *cycasin* とは無関係である。*Cycasin* 投与による血液学的、血液生化学的検査に関する報告はなく、本実験で赤血球数の増加、T.P. の低下は投与量、投与期間と相関する傾向があり、*cycasin* の影響と思われる。血液生化学的検査で、肝臓に関する諸検査で、変化のみられたことは *cycasin* の肝臓への影響の結果と考えられる。ChE についてはソテツ中毒牛のそれと異なり上昇していることは興味深い。

病理学的には主として肝臓に、その他腎臓、脾臓、脾臓に病変がみられた。とくに肝臓は顕著で特徴的病変を示した。即ち、肝細胞索の乱れ、類洞の拡張、肝細胞の変性、壞死および *megalocytosis*、クッパー細胞のヘモジデリン貪食、胆管の増生等は投与量、投与回数、投与期間に応じて、これらの病変がより広範囲あるいは重度になる傾向がみられた。Zedeck¹⁹⁾ は発癌物質の MAM-acetate 投与ラットの肝臓に *megalocytosis* を検出し、肝細胞核の異常な mitosis も認め、これは肝臓の DNA 合成と関係があるようだと述べている。Jubb ら⁶⁾ はアルカロイドを含む有毒植物

Table 6. Grading of microscopic lesions in various organs

を摂取した馬の肝臓に megalocytosis の出現を認め、同時に門脈域の線維増殖と胆管の増生がみられたと述べている。いずれにしても megalocytosis の出現は有毒性因子が肝臓に作用したときおこるものと思われる。脂肪化については実験期間 3 カ月以上のもの 11 例中 7 例にみられたが程度および分布は不規則であり、肝脂肪化と cycasin の影響については不明である。今回みられた肝臓病変は Fukunishi¹⁾、林³⁾、佐藤ら¹²⁾がラットに cycasin、あるいは cycasin を含む cycad meal を持続的に投与した実験の結果とほぼ一致しており、モルモットとラットでは cycasin に対する反応種差はないようである。モルモットを使った実験では、Spatz¹⁴⁾が cycad meal を 5 日間投与し、その後慢性的に経過したものに、胆管の増生、類洞の拡張、肝硬変、nodular hyperplasia、胆管癌、肝細胞癌がみられたと報告している。本実験では胆管の増生、類洞の拡張だけは一致してみられたが、本実験で顕著にみられた megalocytosis については述べていない。投与量と実験期間の相違かもしれない。Zedeck ら¹⁹⁾はラットに MAM-acetate を 1 回投与した後に megalocytosis を認めている。Nodular hyperplasia および肝硬変について Laqueur ら⁹⁾が cycad meal を持続的に投与したラットで、Sieber ら¹³⁾が cycasin およびそのアグリコン MAM を持続的に投与したサルでも報告しているが、本実験では本病変はみられなかった。発癌性については実験期間が短く、明確なことは判らないが、投与量のやや多く、長期間観察した B6 群、C2 群に腺腫様増生、oval cell がみられたが、これらの病変が前癌状態かいなかは今回の実験では不明である。

腎臓では近位尿細管の腫大がみられたが、これは林³⁾、佐藤ら¹¹⁾のラットにおける実験結果と一致している。これらの報告にあるように、cycasin の腎臓に対する影響は肝臓に比べたら軽度のものと思われる。

脾臓については Spatz ら¹⁴⁾、Laqueur ら⁹⁾が cycasin、cycad meal 投与による急性中毒の場合、水腫がおこることを報告しているが、本実験では 1 回投与量が 10 mg/kg、15 mg/kg と多く、かつ投与総量の多いものにみられたことから、cycasin によるものとも考えられるが、今後例数をふやして検討する必要がある。

脾臓における脾洞の拡張と洞内のマクロファージの出現は cycasin による変化かどうかは例数が少なく、脾臓と同様今後検討の必要があろうと思われる。本実験の目的であるモルモットにおける cycasin の神経

系に対する影響は本実験の結果から、ないものと考えられる。

要 約

モルモットに cycasin を 2 日間隔で反復的に経口投与し、臨床的観察、血液学的、血液生化学的検査および病理学的検査を行った。モルモット 25 頭、9 群に分け、投与量 1 回当たり 1~15 mg/kg、投与期間 1~6 カ月、投与総量 29~238 mg とした。結果は次のとおりであった。

1. 臨床的に投与量の多い群で投与期間に応じて体重の減少がみられた。15 mg/kg 投与群で衰弱、死亡するモルモットもみられたが、神経症状は認められなかった。

2. 血液学的検査では 1 回の投与量の多い群で投与期間に応じて赤血球数の増加、Ht 値の上昇、T.P. の減少の傾向がみられた。血液生化学的には血清タンパク分画で、γ-グロブリンの上昇がみられ、肝機能障害を疑わせる酵素活性の上昇があり、投与期間に応じて glucose の低下、ChE の上昇の傾向がみられた。

3. 病理学的検査では肝臓重量および体重との割合が投与量に応じて減少する傾向がみられた。病変は肝臓、腎臓、脾臓、肺臓に認められたが、とくに肝臓に顕著で、投与量、投与期間に応じて、小葉中心性の肝細胞の乱れ、肝細胞の変性、壊死、megalocytosis すなわち肝細胞の腫大および核の腫大が認められた。投与期間が長期化し、投与総量が増大するにつれて、これらの病変がより広範囲、より重度になり、さらに胆管の増生、クッパー細胞のヘモジデリン貪食もみられた。腎臓では近位尿細管の腫大が、脾臓では脂肪化が、脾臓では脾洞の拡張がそれぞれ少數例みられたが、肝臓病変に比較して軽度であった。大脳、小脳、脊髄には病変の発現は認められなかった。

文 献

- 1) Fukunishi, R.: Acute hepatic lesion induced by cycasin. *Acta Path. Jap.*, 23, 639-646 (1973)
- 2) Haddad, R.K., Rabe, A. and Dumas, R.: Comparison of effect of methylazoxymethanol acetate on brain development in different species. *Fed. Proc.*, 31, 1520-1523 (1972)
- 3) 林 敏雄: ソテツ毒の発癌性に関する研究. ソテツ粗毒 cycasin の aglycone acetate の発癌性および発癌過程の電子顕微鏡的観察. 鹿児島医学誌, 22, 406-456 (1970)
- 4) Hirono, I., Shibuya, C. and Hayashi, K.: Induction of a cerebellar disorder with cycasin

- in newborn mice and hamsters. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **131**, 593-599 (1967)
- 5) Jones, M., Yang, M. and Mickelsen, O.: Effects of methylazoxymethanol glucoside and methylazoxymethanol acetate on the cerebellum of the postnatal Swiss albino mouse. *Fed. Proc.*, **31**, 1508-1511 (1972)
- 6) Jubb, K.V.F. and Kennedy, P.C.: *Pathology of domestic animals*, 2nd Ed. p. 216-219, Academic Press Inc., New York (1970)
- 7) Kobayashi, A., Tadera, K., Yagi, F., Kono, I. and Yasuda, N.: Cattle poisoning due to ingestion of cycad leaves, neurotoxic effects causing paralysis in hindquarters. *Toxicon*, **3**, 229-232 (1983)
- 8) 小林 昭・田寺謙次郎・八木史郎・河野猪三郎・坂本 司・安田宣紘: 放牧牛のソテツ中毒に関する研究. 沖縄県における発生状況, 生物化学および病理学的検索. 鹿大農学部報告, **34**, 119-129 (1984)
- 9) Laqueur, G. L., Mickelsen, O., Whiting, M. G. and Kurland, L. T.: Carcinogenic properties of nuts from *Cycas circinalis* L. indigenous to Guam. *J. Nat. Cancer Inst.*, **31**, 919-951 (1963)
- 10) 西田孝太郎・小林 昭・永沢伴紀・小島喜久男・山根 実: 日本産ソテツの一新有毒配糖体 cycasin に関する研究, (第4報) cycasin の薬理. 生化学, **28**, 218-223 (1956)
- 11) 佐藤八郎・林 敏雄・柚木一雄: ソテツ配糖体 cycasin の発癌機構に関する研究, (第3報) cycad meal 投与発癌過程のラット及び腎の超微細構造について. 鹿児島癌研究会年報, **2**, 66-76 (1970)
- 12) 佐藤八郎・柚木一雄・林敏雄・福西亮: Cycasin の発癌機構に関する研究, (第1報) 奄美大島産ソテツ *Cycas revoluta* 種子の発癌性について. 医学のあゆみ, **65**, 525-531 (1968)
- 13) Sieber, S. M., Correa, P., Dalgard, D. W., McIntire, K. R. and Adamson, R. H.: Carcinogenicity and hepatotoxicity of cycasin and its aglycone methylazoxymethanol acetate in nonhuman primates. *J. Nat. Cancer Inst.*, **65**, 177-189 (1980)
- 14) Spatz, M.: Carcinogenic effect of cycad meal in guinea pig. *Fed. Proc.*, **23**, 1884-1885 (1964)
- 15) Spatz, M.: Hydrolysis of cycasin by β -D-glucosidase in skin of newborn rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **128**, 1005-1008 (1968)
- 16) Spatz, M. and Laqueur, G. L.: Transplacental chemical induction of microencephaly in two strains of rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **129**, 705-710 (1968)
- 17) 安田宣紘・河野猪三郎・清水 孜: 牛の実験的ソテツ中毒に関する病理学的研究. 鹿大農学部報告, **35**, 171-178 (1985)
- 18) 安田宣紘・河野猪三郎・清水 孜・小林 昭・田寺謙次郎・八木史郎: 放牧牛のソテツ中毒に関する病理学的研究. 脊髄における病変とその分布について. 鹿大農学部報告, **34**, 131-137 (1984)
- 19) Zedeck, M. S. and Sternberg, S. S.: Megalocytosis and other abnormalities expressed during proliferation in regenerating liver of rats treated with methylazoxymethanol acetate prior to partial hepatectomy. *Cancer Res.*, **35**, 2117-2122 (1975)

Summary

Acute toxicity and carcinogenicity of cycasin as an alkylating agent have generally been established in experimental animals. As for neurotoxicity observable in cycad poisoning in cattle, the presence of another unknown toxin has been postulated. However, data on the guinea pig living solely on vegetable food are still too insufficient to confirm the hypothesis. Accordingly, we undertook an experiment by giving guinea pigs repeated oral administrations of purified cycasin at intervals of 3 days with varied doses (1, 5, 10 or 15 mg/day). The animals were sacrificed in 1-6 experimental months, pathological examinations as well as studies of hematology and blood chemistry being conducted.

Proportionate to the length of the experimental period, weight loss became more evident in groups in which higher doses were given. Even in the lethal cases no neurological symptoms were observed. A tendency of increasing in RBC and Ht values as well as that of decreasing in serum total protein levels was noticed in the groups of higher doses with longer administration-time. In the serum, cycasin treatment elevated γ -globulin fraction and lowered albumin fraction. Marked increases in enzyme activities of GOT, GPT and Al-P were recognized in the groups treated with higher doses for longer periods, suggesting a functional disturbance in the liver. Rising of cholinesterase

activity and falling in the serum glucose level were noted as two distinct tendencies in these groups.

Weight of the liver and its ratio to body weight showed an inclination to decrease dose-dependently. Some pathological changes were found in the liver, kidney, pancreas and spleen, above all in the liver. In the earlier stage of intoxication, centrilobular derangement of hepatic cell cords, degeneration and necrosis of hepatocytes and megalocytosis were noticed evidently, and in the later stage these alterations became more widespread and severe with the addition of bile duct proliferation and hemosiderosis in Kupffer cells. Lesions in the other organs were slight or moderate, and no pathological changes were detected in the brain and the spinal cord.

These results indicate that toxicity of cycasin in guinea pigs is very similar to those reported in other experimental animals.

Explanation of figures

- Fig. 2. Liver section from the guinea pig given cycasin (5mg/kg/day at interval of 3 days for 3 months), showing irregularity of the hepatic cords, fatty degeneration and necrosis of hepatocytes.
- Fig. 3. Higher magnification of Fig. 2. Marked nuclear irregularities are to be observed (megalocytosis).
- Fig. 4. Liver section from the guinea pig given cycasin (5mg/kg/day at interval of 3 days for 6 months), oval cell proliferation is to be seen.
- Fig. 5. Liver section from the guinea pig given cycasin (5mg/kg/day at interval of 3 days for 6 months), bile duct proliferation is to be seen.
- Fig. 6. Liver section from the guinea pig given cycasin (10mg/kg/day at interval of 3 days for 1 months), dilated sinusoids and degeneration of hepatocytes are to be seen.
- Fig. 7. Liver section from the guinea pig given cycasin (10mg/kg/day at interval of 3 days for 2 months), megalocytosis and adenoma-like proliferation are to be seen.
- Fig. 8. Liver section from the guinea pig given cycasin (15mg/kg/day at interval of 3 days for 63 days), megalocytosis and vacuolation of hepatocytes are evident.
- Fig. 9. Spleen section from the guinea pig given cycasin (15mg/kg/day at interval of 3 days for 63 days). Note numerus monocytes in the dilated sinusoids.

