

# Cycasin に関する生化学的研究

第3報 Aglycone, Methylazoxymethanol の単離とその生物学的・化学的性質<sup>1</sup>

小林 昭・Hiromu MATSUMOTO<sup>2</sup>

## Biochemical Studies on Cycasin

### III. Isolation of the Aglycone, Methylazoxymethanol, and Its Biological and Chemical Properties

Akira KOBAYASHI and Hiromu MATSUMOTO<sup>2</sup>

(Laboratory of Biochemistry)

## 緒 言

*Cycas circinalis* はグァム島などに分布するソテツの一種であるが、その種子がネズミに肝臓癌を生ぜしめることを、LAQUEURら<sup>1)</sup>が報告している。この種子の有毒成分は既に報告されているとおり、

配糖体 cycasin すなわち methylazoxymethyl  $\beta$ -D-glucoside,  $C_6H_{11}O_5-O-CH_2-N=N-\overset{\text{O}}{\underset{\uparrow}{N}}-CH_3$  である<sup>2-4)</sup>。この cycasin は生理試験において<sup>5)</sup>、ハツカネズミに対し非経口的に投与した際には毒性を示さず、経口的に与えた場合にのみ、12時間ないしそれ以上の潜伏期間ののち毒性を発現する。したがってこの配糖体が、おらそく腸内微生物酵素によつて分解され、その aglycone ないしは代謝産物が、毒性の本体をなすであろうと考えられる。aglycone 即ち methylazoxymethanol (以下 MAM

と略記する)  $HOCH_2-\overset{\text{O}}{\underset{\uparrow}{N}}=N-CH_3$  は不安定で、cycasin の酸加水分解に際しては分解してとり出しえない<sup>2)</sup>。しかしながら cycasin の酵素による加水分解液中に、これが遊離の状態が存在しうるとは、著者の一人小林が前報<sup>6)</sup>において報告したところであり、他の MATSUMOTO もまたその単離の可能なことを明らかにした<sup>4)</sup>。かくて *C. circinalis* の毒性成分の本体が cycasin そのものではなく、その aglycone であるという考え方を試験することが可能となり、ここに示す実験的根拠は、MAM が実際に実験動物に中毒をおこさせることを明らかにしている。

本報においては、MAM およびその3種の誘導体の調製、ならびにそれらの性質の詳細について報告する。

## 実験材料および方法

Cycasin cycasin はグァム島から供給された *C. circinalis* の種子から、西田ら<sup>2)</sup>の方法により調製した。cycasin の純品はまた National Institutes of Health, U. S. A. からも供与を受けた。

MAM および MAM-Acetate 調製の詳細は実験結果の部に記述した。

Cycasin の加水分解に用いた酵素 *C. circinalis* 種子からの酵素の調製は、第1報<sup>7)</sup>の方法に準じ

1. 本研究は小林がハワイ大学に出向中おこなつたもので、この要旨は第3回国際天然物化学会議(1964年4月京都)において講演し、また *Federation Proc.* **23** 1354 (1964) ならびに *Arch. Biochem. Biophys.* **110** 373 (1965) に発表した。
2. Department of Agricultural Biochemistry, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, U. S. A.

ておこなった. almond emulsin の市販品 (Sigma Chemical) もまた, cycasin の加水分解に用いて同様に満足すべき結果を与えた.

**MAMの分析** cycasin の酵素的加水分解によって生成した MAM の量は, 215  $m\mu$  における紫外線吸収の変化を, Beckman DK-2 型記録式分光光度計で測定することによって求めた. cycasin と MAM はともに 215  $m\mu$  に吸収極大のある, ほぼ同一の特異的な吸収スペクトルを示すからである. 反応混液から一定量の試料 1 組を経時的に採取する. 試料の一方は直ちに 1,000 ないし 2,000 倍に水で稀釈し, 他は沸とう水浴中で 10 分間加熱後同様に稀釈したのち, 両者の紫外線吸収を測定する. MAM は加熱によって分解されるので, 両試料の吸収の差が求むべき MAM の量に相当する.

**実験動物** 実験に使用したシロネズミ (albino rat) は, 1951 年 10 月以来 Department of Agricultural Biochemistry, University of Hawaii において保持してきた集団からの一系である. 本系統はもと, Navy Medical Research Institute, National Navy Medical Center, Bethesda, Maryland, U. S. A. において, dental carries に使われたものの子孫である.

**ネズミ尿中の Cycasin の定量** cycasin の迅速簡便な定量法として, その酸分解に際して生成する formaldehyde を, chromotropic acid-硫酸で発色比色する方法<sup>4)</sup>をとった. ただしこの際尿中に共存し, 呈色する妨害物質の影響を避けるため, 次のような活性炭の小カラムによる分別法を設定した. Darco G-60 と Celite 545 の等量 (w/w) 混合物を, 予め ethanol および ether で洗浄後乾燥したもの 3 gm を, 15×200 mm のクロマトグラフ管に充填した. このカラムに, 10 mg 以下の cycasin を含む一定量の尿試料を注ぎ, 弱く吸引しつつ通過せしめる. カラムを約 100 ml の水で洗滌したのち, 活性炭に吸着された cycasin を 20% ethanol で溶出せしめ, 溶離液を 25 ml とする. その一定量につき chromotropic acid 法による比色定量をおこない, cycasin の量を求めた. cycasin の標品によって求めた検量線は, 別に cyanide 法<sup>5)</sup>で容量分析した formaldehyde 溶液について求めたものと, 比較検定した.

**Cycasin の同定** ネズミ排泄物中の cycasin は, ペーパークロマトグラフィによって検索した. 尿については, cycasin の定量分析に用いた ethanol 溶離液の残部を減圧下濃縮した. 糞試料は少量の温水で処理したのち, ethanol を加えてその濃度を 70% 以上にならしめて濾過, 濾液を減圧下濃縮した. これらの濃縮試料を cycasin および glucose 標品とともに, Whatman No. 1 濾紙上に *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:1, v/v/v) または *n*-butanol-pyridine-water (6:4:3, v/v/v) にて, 多重<sup>9)</sup>下降法で展開した. 発色は resorcinol-hydrochloric acid 試薬<sup>2)</sup> および 硝酸銀試薬<sup>10)</sup>でおこない, cycasin と糖を検出した.

## 実 験 結 果

**ソテツ酵素による Cycasin の加水分解** *C. circinalis* の種子 5 コ (523 gm) を第 1 報<sup>7)</sup>に記述した如く処理して, 透析済み酵素液 125 ml をえた. cycasin 9.1 gm (36.1  $m$  moles) を 75 ml の 0.03 M リン酸塩緩衝液 (pH 5.2) と 175 ml の水との混液に溶解し, これを酵素液と合一して 30°C に 20 時間反応せしめた. 反応の経過を上述の方法で追跡したところ, 5 時間後 12.5  $m$  moles の cycasin が加水分解され, 遊離された aglycone のうち 9.4  $m$  moles が反応混液中に残存することを知った. 実験時間の終了時においては, 28.6  $m$  moles の cycasin が水解されたが, MAM は 19.5  $m$  moles 存在するのみであった.

反応混液中の酵素を硫酸アンモニアで塩析し, Celite 層を用いて吸引濾過した. 濾液を連続液体抽出器に移し, ether にて 10 時間毎に溶媒を更新して抽出した. ether 抽出液を合し, 無水硫酸ソー

ダで脱水後、減圧下溶媒を溜去した。粗収量は 17.1 *m* moles (理論量の 47.3%) であった。

**Almond Emulsin による Cycasin の加水分解** 入手しうる市販の  $\beta$ -glucosidase として, almond emulsin (Sigma Chemical) は cycasin の加水分解用に, ソテツ酵素より 便利であることを知りえた。MAM を最も収率よく得る最適の条件を定めるために, cycasin の加水分解速度に対する cycasin および酵素量の影響を検討した。それぞれ 10, 5.0, 2.5% の cycasin と, 各 0.1% の酵素を含む反応混液 2 *ml* を 35°C に保ち, 既述の如く cycasin および MAM を経時的に定量した。cycasin の

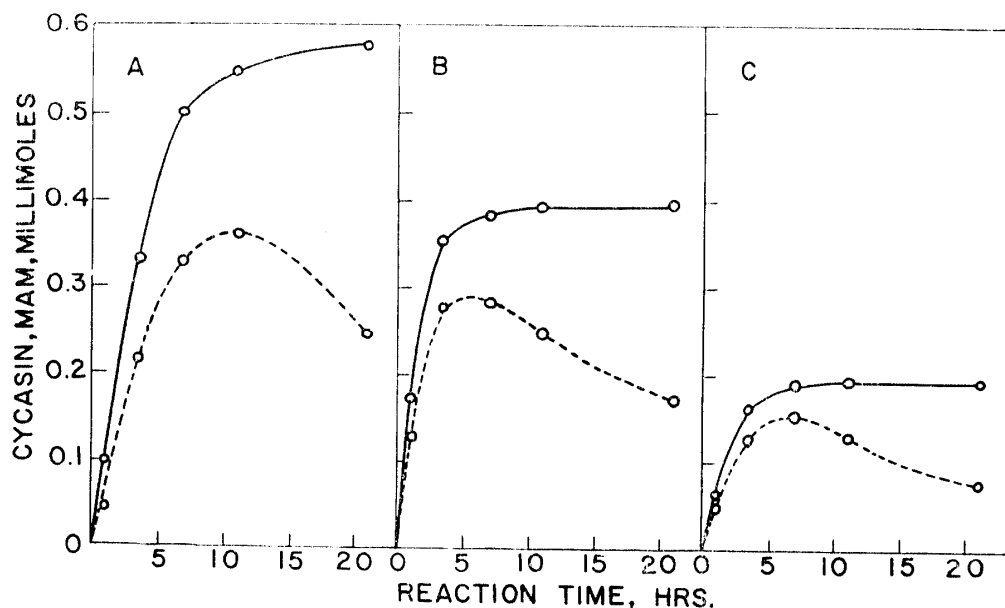


Fig. 1. The effect of concentration of cycasin on the quantity of methylazoxymethanol (MAM) produced by action of 0.1% almond emulsin in 0.03 *M* phosphate buffer, *pH* 5.2, at 35°C. Concentration of cycasin in A, 10%; B, 5%; C, 2.5%. The solid curve represents the quantity of cycasin hydrolyzed, and the broken curve, the quantity of MAM present in the reaction mixture, 2 *ml*; thus, the area between the two curves represents the quantity of MAM decomposed.

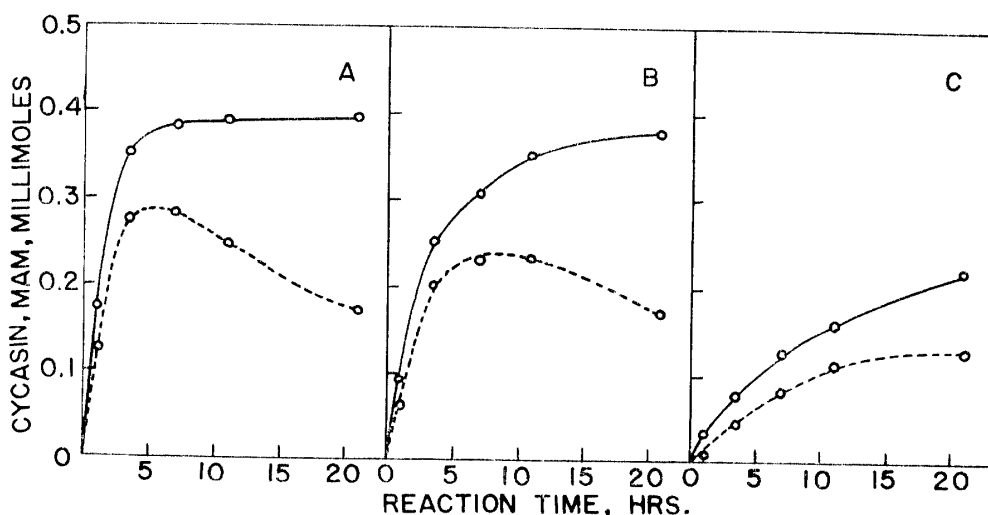


Fig. 2. The effect of almond emulsin concentration on the rate of hydrolysis of a 5% cycasin solution, *pH* 5.2, at 35°C. Concentration of enzyme in A, 0.1%; B, 0.05%; C, 0.01%. The solid curve represents the quantity of cycasin hydrolyzed, and the broken curve, the quantity of MAM present in the reaction mixture, 2 *ml*. The other data are same as in Fig. 1.

加水分解は、5.0, 2.5%濃度区では約5時間後に最高値に達したが、10%区ではその後もなお増加しつづけた。これらの様相は Fig. 1 に示すとおりである。酵素濃度の影響は、cycasin 濃度を5%とし、酵素量 0.1, 0.05, 0.01%の3区について検討した。その結果 Fig. 2 に示す如く、cycasin の加水分解速度は酵素濃度に比例して増加した。

これらの結果より、大量の cycasin を処理するためには、0.03 M リン酸塩緩衝液 pH 5.2 中 cycasin 5%, 酵素 0.1%とし、35°C にて5時間反応せしめるものが最適と考えられた。

この反応系で MAM の量的な調製を繰り返さない、生成した MAM を上記の如く ether で抽出した結果、MAM の収率は5回の実験において、理論量の 26.2ないし 55.4%であった。総計 130 gm (516 m moles) の cycasin から、19.5 gm (216.7 m moles) の粗 MAM を得て、平均収率は 42.0%であった。

**MAM の精製** ether を溜去してえた粗 MAM の真空分別蒸溜を反復して精製をおこない、その純度は紫外線吸収と formaldehyde の分析によって検定した。得たる純 MAM は、無色液体でアミン様臭気を有し、次の如き物理性を示した。b. p. 51°C (0.6mmHg), 室温で分解する, acetone-dry

ice 混合物で冷却すれば無色長針状結晶となり, m. p. 1~3°C,  $\eta^{26}=1.4688$ ,  $d^{24}=1.208$ , 水, alcohol と完全に混ざりうる, chloroform に可溶, ether にはやや溶けにくい。紫外線吸収は次のとおり。 $\lambda_{max}$ ; 215  $m\mu$  ( $\log \epsilon=3.94$ ),  $\lambda_{inflex}$ ; 275  $m\mu$  ( $\log \epsilon=1.67$ )。スペクトルは Fig. 3 に示した。赤外線吸収スペクトルは, Fig. 4 に示すとおり, azoxy 基にもとづく特性的な吸収<sup>11)</sup>を 1,330 および 1,515  $cm^{-1}$  に, また水酸基の吸収を 3,400  $cm^{-1}$  に示す。

この物質は加熱すれば分解して formaldehyde を与えるが, これを chromotropic acid との反応で定性定量し, その量は MAM 1 mole 当り 0.98 mole であった。アルカリ分解に際して cyanide を生成することは, benzidine acetate-cupric acetate 試験紙を青変せしめること, また硫化アンモンと反応せしめて生成する ferric thiocyanate の検出によって証明できた。MAM は室温においても不安定で分解し, ガスの発生がみとめられた。MAM 試料を1組のガラス管にとり, 一つは熔封し, 他はヘリウムガスで満たし密栓した。室温(約 30°C)に5日間放置したのち紫外線吸収分析をおこなったところ, それぞれもとの 11.0 および 12.5%が分解しておった。この物質は水溶液中でも不安定で 10<sup>-4</sup>M 水溶液は 35°C にて2½時間後 7.8%, 5⅓時間後 21.3%の減少を示した。10<sup>-3</sup>M 水溶液は, 75°C に 30 分間または 100°C に 10 分間加熱すれば, 完全に分解された。

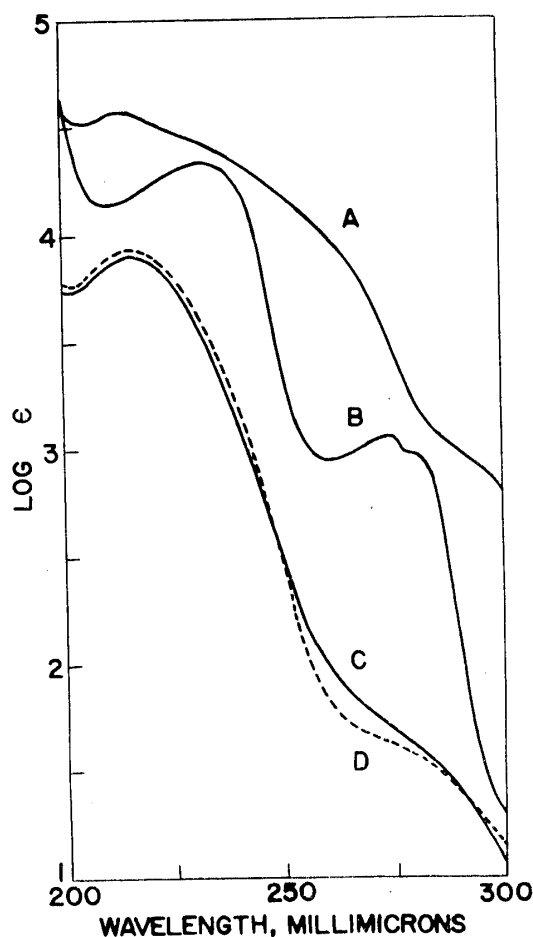


Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of methylazoxymethanol (MAM) and derivatives. A, MAM-3, 5-dinitrobenzoate; B, MAM-benzoate; C, MAM; D, MAM-acetate. A and B in aqueous ethanol; C and D in water.

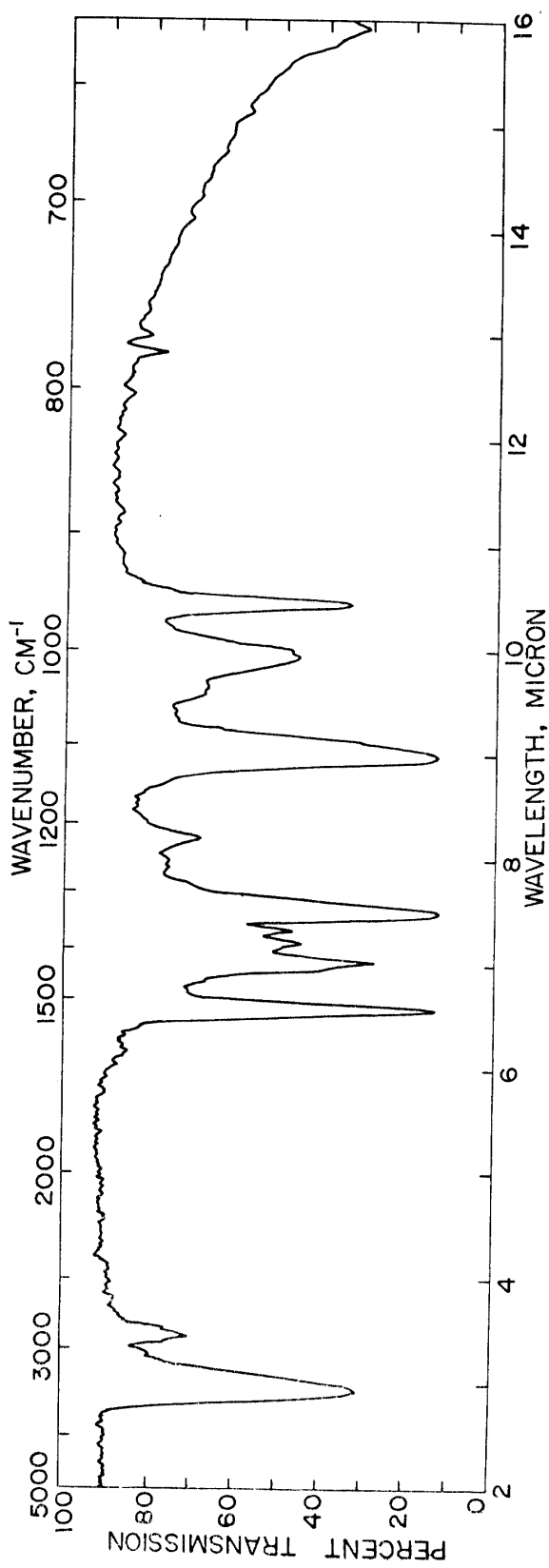


Fig. 4. Infrared absorption spectrum of MAM.

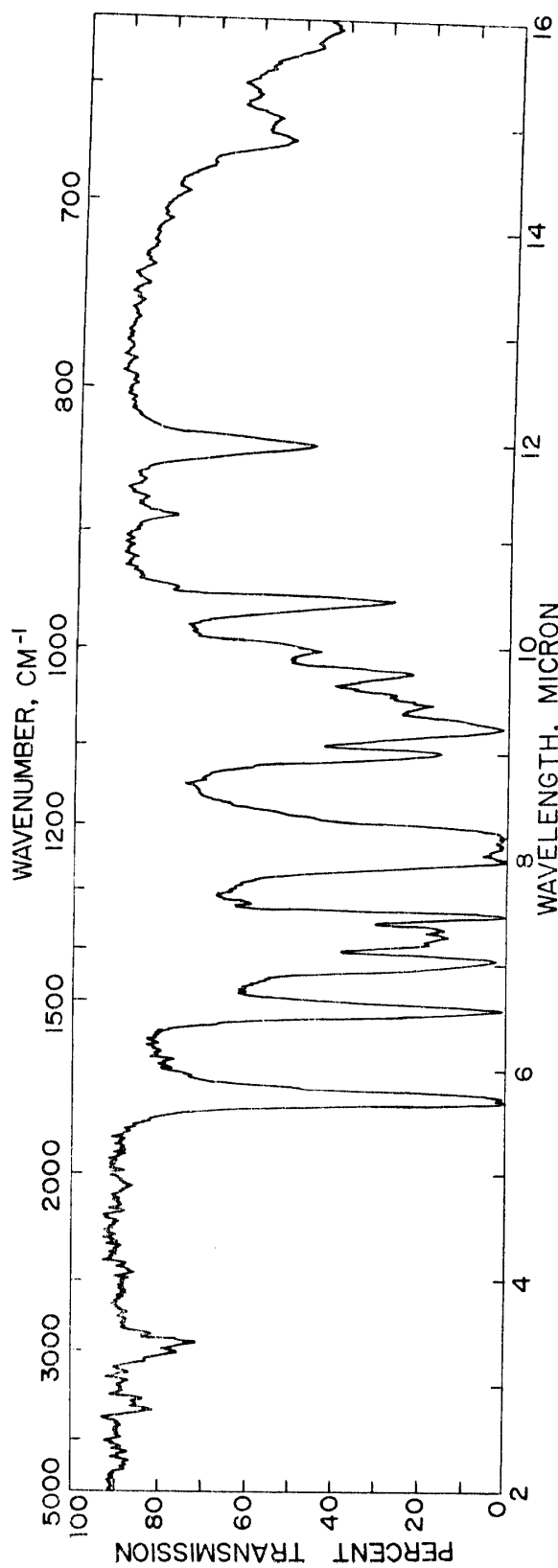


Fig. 5. Infrared absorption spectrum of MAM-acetate.

**MAM-Acetate** この ester は、粗ならびに純 MAM いずれからも調製した。調製の一例は次のとおりである。MAM 1,311 mg (14.6 m moles) を 20 ml の pyridine に溶解、氷浴中で冷却し、20 ml の acetic anhydride を徐々に加えたのち、室温に 21 時間放置した。反応混液を氷水中に注ぎ、chloroform で抽出し、抽出液を希塩酸、重炭酸ソーダ溶液、水で順次洗浄後、無水硫酸ソーダで脱水、溶媒を減圧下溜去した。残った液体を真空蒸溜し、932 mg (71 m moles) の透明液体を得た。収率は 48.5 %であった。

粗 MAM-acetate は真空分別蒸溜を繰り返しておこなって精製した。このものの特性は次のとおりであった。無色液体、*b. p.* 191°C (760 mmHg, ミクロ法<sup>12)</sup>), 45°C (0.45 mmHg),  $\eta^{26}=1.4469$ ,  $d^{24}=1.172$ . chloroform と完全に混ざりうる、水、ether に難溶。紫外線吸収スペクトルは、MAM のそれに類似し (Fig. 3),  $\lambda_{\max}$ ; 215  $m\mu$  ( $\log \epsilon=3.929$ ),  $\lambda_{\text{inflex}}$ ; 270  $m\mu$  ( $\log \epsilon=1.65$ ) である。赤外線吸収スペクトルにおける azoxy 基の吸収帯は、1,340 および 1,522  $cm^{-1}$  に観察された (Fig. 5)。

元素分析  $C_4H_8O_3N_2$  の計算値: C, 36.36; H, 6.10; N, 21.20. 実測値: C, 35.67; H, 6.00; N, 21.55.

本物質は比較的安定である。10<sup>-4</sup>M 水溶液を 75°C に 30 分間加熱しても変化なく、100°C では 4.6 %が分解した。酸で分解した際の formaldehyde 生成量として、1 mole につき 0.96 mole の値をえた。

**MAM-Benzoate** 粗 MAM (3.84 m moles) を benzene 5 ml に溶解して氷冷、pyridine 10 ml, benzoylchloride 2 ml を加えて室温に一夜放置した。生成物を ether で抽出し、抽出液は acetate 調製の際と同様に処理したのち ether を溜去した。残渣を methanol で処理し、白色結晶 258 mg をえた。収率 70.5 %。

methanol からは白色葉状、希 methanol からは針状結晶となる。*m. p.* 66°C. 酸加水分解により 1 mole の formaldehyde を与えた。紫外線吸収スペクトルは Fig. 3 に示すとおりであり、赤外線吸収スペクトルでは、azoxy 基の吸収帯は 1,517  $cm^{-1}$  にみられた。

元素分析  $C_9H_{10}O_3N_2$  の計算値: C, 55.66; H, 5.19; N, 14.43. 実測値: C, 55.75; H, 5.28; N, 14.19.

**MAM-3,5-Dinitrobenzoate** 粗 MAM (4.9 m moles) を各 5 ml の benzene, pyridine 混液に溶解し、0.5 gm の酢酸ソーダ<sup>13)</sup>, 2 gm の無水硫酸ソーダを加えた。混液を氷冷、3,5-dinitrobenzoyl chloride 1 gm の benzene 5 ml 中溶液を加え、室温に一夜放置した。反応混液を benzoate と同様に処理し、粗生成物 313 mg (理論量の 22.7 %) を得た。

Skellysolve B-benzene (8:2, v/v) から再結晶して、淡黄色の細かい針状結晶を得た。*m. p.* 106.5°C. 酸分解により 1 mole の formaldehyde を与えた。紫外線吸収スペクトルは Fig. 3 に示したとおりである。azoxy 基による赤外線の吸収帯は、nitro 基のため不明でない。

元素分析  $C_9H_8O_7N_4$  の計算値: C, 38.04; H, 2.84; N, 19.72. 実測値: C, 38.18; H, 2.94; N, 19.27.

**Cycasin の腹腔内投与** cycasin をネズミに与えた際、代謝され、あるいは保留される cycasin の量を知るため、一定量を経口的に、あるいは腹腔内注射によって投与し、尿ならびに糞中に排泄された cycasin を定量した。

3頭の雄ネズミのおのおのに対し、cycasin 138.7 mg を含む水溶液を腹腔内に注射した。なお1頭を別に対照としておいた。ネズミは別別に代謝測定かごに入れ、尿および糞を 12 時間間隔で 72 時間にわたり集めた。尿中の cycasin 量を既述の方法で分析し、またこの配糖体が未変化のまま排泄さ

れていることは、ペーパークロマトグラフィで確認した。注射した cycasin 量の殆んど全てが最初の 12 時間に排泄され、少量が次の 12 時間に、そしてその後の 24 時間には痕跡量のみが見出された。糞中には cycasin は全く見出されなかった。試験動物は何れも中毒の症状を何ら示さず、体重は正常に増加した。1 週間後同じ試験動物に対し、同量の cycasin を、さらに 1 週間後第 3 回として各 150 mg の cycasin を注射した。毎回投与後の尿中に回収された cycasin の量は、Table I に示すとおりであった。

TABLE I. RECOVERY OF INTRAPERITONEALLY INJECTED CYCASIN FROM THE URINE OF RATS

Experiment	Rat No.	1	2	3	4
I	Bodyweight (gm)	320	325	220	220
	Cycasin injected (mg)	138.7	138.7	— <sup>a</sup>	138.7
	Cycasin recovered (%)				
	1st 12 hours	92.5	92.2	—	103.2
	2nd 12 hours	1.9	2.7	—	2.2
	Total	94.4	94.9		105.4
II	Bodyweight (gm)	343	335	243	240
	Cycasin injected (mg)	138.7	138.7	138.7	— <sup>a</sup>
	Cycasin recovered (%)				
	1st 12 hours	95.1	99.9	86.3	—
	2nd 12 hours	1.9	1.9	3.7	—
	Total	97.0	101.8	90.0	
III	Bodyweight (gm)	355	346	277	275
	Cycasin injected (mg)	150	150	150	150
	Cycasin recovered (%)				
	1st 12 hours	96.1	94.8	95.8	96.1
	2nd 12 hours	1.9	1.3	2.0	1.9
	3rd and 4th 12 hours	0.6	0.5	0.6	0.7
	Total	98.6	96.6	98.4	98.7

a Animal not injected and used as control.

回収試験終了後、試験動物のうち 2 頭を組織病理学的試験<sup>3</sup>に供したが、中毒の組織学的徴候は何れも認められなかった。他の 2 頭については、その後 180 日間基本飼料で飼育したのち、同じく試験に供したが、これらについても何れも病変の徴候は認められなかった。

**Cycasin の経口投与** 体重 340~360 gm の雄ネズミ 4 頭に、おのおの cycasin 150 mg の水溶液を胃管で強制的に投与し、代謝測定かごに別別に入れた。これらの試験動物はすべて 24 時間以内に斃死した。

3 頭の雄ネズミに各 45 mg の cycasin を、8 頭の雄に各 50 mg を投与し、尿を集めて分析に供した。腹腔内注射による投与の際と比べて、排泄された cycasin の量は少なかったが、その様相はほぼ同様な傾向を示した。すなわち大半は最初の 12 時間に、一部が次の 12 時間に、そして痕跡量がその後排泄された。投与 cycasin に対する回収率は、ネズミにより 30~63% の変動を示した。試験動物は明らかに cycasin の影響を受けたことを示し、体重の減少を来した。一般に最初の 2, 3 日間不活潑であったがその後回復した。さらに cycasin の累積的な影響をしらべるため、同一の試験動物に再び cycasin を投与した。すなわち最初の 3 頭には 4 日後 45 mg を、他の 8 頭には 1 週間後 50 mg を与えた。個体差はあったが、試験動物はすべて、第 2 回の投与後著しくおかされた。あるも

3. ネズミの組織病理学的試験は、Dr. G. L. LAQUEUR, Chief, Laboratory of Experimental Pathology, National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U. S. A. によりおこなわれた。

のは濃黄色尿ないし血尿を排泄したが、これはソテツ種子を、長期間にわたって与えた試験動物にみられた病徴と同様である。1頭は3日後に、他の2頭は10日および13日後斃死した。第2回の試験において排泄された *cycasin* は、投与量の12~76%の差を示した。尿中に未分解の *cycasin* が存在することは、両回とも再びペーパークロマトグラフィにより確認した。糞中には *cycasin* は検出されなかった。各試験における *cycasin* の尿中回収率は、Table II に示すとおりである。

TABLE II. RECOVERY OF ORALLY ADMINISTERED CYCASIN FROM THE URINE OF RATS

Experiment	Rat No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
I	Bodyweight (gm)	236	227	269	258	288	252	253	290	281	269	271
	Cycasin fed (mg)	45	45	45	50	50	50	50	50	50	50	50
	Cycasin recovered (%)											
	1st 12 hours	53.3	55.3	55.3	40.2	62.8	53.2	36.6	44.4	53.2	28.6	58.6
Two day total	58.0	63.1	60.6	49.6	64.4	53.2	36.6	52.4	56.4	30.2	65.8	
II	Bodyweight (gm)	214	202	251	240	261	231 <sup>a</sup>	239	274	238	224 <sup>b</sup>	255 <sup>c</sup>
	Cycasin fed (mg)	45	45	45	50	50	50	50	50	50	50	50
	Cycasin recovered (%)											
	1st 12 hours	56.7	47.1	75.5	70.4	59.2	53.6	45.0	52.6	41.2	3.0	29.2
Two day total	59.8	48.1	76.3	71.4	60.0	54.2	45.8	58.2	47.6	12.2	38.4	

a, Animal died after 10 days ; b, died after 3 days ; c, died after 13 days.

**MAM の毒性** MAM の毒性は、MAM の0.9%食塩水溶液をネズミに腹腔内注射で投与して検討した。11頭の雌動物(体重205~367 gm)に対し、それぞれ体重 kg 当り 11, 23, 40, 40, 44, 45, 45, 50, 51, 89, 143 mg の MAM を投与した。全試験動物が影響を受けたことは、約5時間以内に外観的にも観察され、不活潑となった。最小投与量を受けた1頭は3日後回復し、その後次第に体重を増加した。23 mg 投与したものは、第3日から第7日まで下痢を呈したが回復した。44 mg 投与のものは、非常におかされたが25日間生存しえた。剖見に際してこのものの血液は、著しく淡色となっており、肝臓は黄色に変化し赤色斑を示していることが注目された。他の試験動物は、MAM の投与1ないし3日後すべて斃死した。MAM の最低致死量は、体重 kg 当り約 35 mg (0.39m moles) であろうと考えられた。

**MAM-Acetate の毒性** 毒性試験に供しうる MAM-acetate の量が充分でなかったため、試験動物は3頭に限らざるをえなかった。体重 kg 当り MAM-acetate 31 mg の0.9%食塩水溶液を注射した雌ネズミは、3日間不活潑であったが回復した。体重 kg 当り 60 および 86 mg の MAM-acetate を投与した他の2頭は、何れも黄色の血尿を排泄し、第2日に斃死した。

## 考 察

*cycasin* を腹腔内注射で投与したネズミにおいて、この配糖体はその尿中に殆んど定量的に回収されたことは、ネズミの組織が *cycasin* を代謝もしくは保持しないことを示している。回収しえなかった少量の *cycasin* については、代謝されたとするよりも、尿試料の蒐集ないしは取扱い中に失われたとする方が、妥当であろう。一方 *cycasin* が経口的に投与された場合発現される毒性は、この配糖体が、おそらく腸内微生物の  $\beta$ -glucosidase によって、加水分解されたことに帰因すべきものと考えられる。一般に試験動物の中毒の症状は、それが尿中に排泄した未分解の *cycasin* の量に反比例している。斃死した3頭のうち、2頭が排泄した *cycasin* のレベルは、他の9頭に比べて相当に低いものであった。もし尿中に回収されなかった量の *cycasin* が加水分解されて、放たれた aglycone すなわち MAM として吸収されたものとするれば、斃死した試験動物は何れも、40 mg/kg



体重以上の、すなわち MAM の最低致死量と推定された、35 mg/kg 体重をはるかに超える量の、MAM を吸収したことになる。

cycasin を注射によって、または経口的に投与した二つの場合に発現される毒性の相違と、MAM ならびに MAM-acetate の極めて著しい毒性とは、いずれも cycasin の aglycone が、動物における中毒の本因であるとする結論を支持するものである。注射した cycasin が毒性を示さないことは、動物組織が  $\beta$ -glucoside 結合を加水分解しえないことによるものである。LAQUEUR<sup>14)</sup>は最近の研究において、全く無菌の (germ-free<sup>4)</sup> ネズミでは、cycasin による中毒が全然みられないことを明らかにしているが、このこともまた上の結論を支持するものと考えられる。

MAM が *C. circinalis* 種子から単離されうること示した以前の研究<sup>4)</sup>において、磨砕した種子を autolyze せしめ、しかるのち MAM を抽出すれば、これを迅速簡単に単離しうるのであらうと述べた。しかしながらこのような方法は不適當であることがわかった。MAM を生化学的研究に用いるために十分に大量調製するには、cycasin と市販の almond emulsin との反応混液を応用することが、最も満足すべき結果を与える。

さらにこの化学的にも興味ある物質 MAM が、はじめてその誘導体とともに単離確認されたことは、これらを化学的に合成して<sup>5)</sup>、生物学的研究に資する可能性をも示唆するものである。

附記 cycasin の供与を受けた Dr. G. L. LAQUEUR, National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U. S. A. に深謝する。また大量の *C. circinalis* 種子を、グァム島から輸送するについて、種種配慮を蒙った Dr. L. T. KURLAND および Dr. M. G. WHITING, National Institute of Neurological Diseases and Blindness, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U. S. A. にも厚く謝辞を述べる。元素分析は京都大学農学部三井哲夫教授にお願いした。記して深く感謝する。

## 要 約

配糖体 cycasin の aglycone すなわち, methylazoxymethanol (MAM) を、その3種の誘導体とともに はじめて単離し、また cycasin による中毒の際の有毒性本体が、配糖体それ自身ではなく、その aglycone, MAM であることを立証した。

1. ソテツ酵素により cycasin を加水分解して、MAM を分離調製した。
2. almond emulsin を用いての、MAM 調製の詳細を記述した。
3. 純 MAM は、*b. p.* 51°C (0.6 mmHg), 無色長針状結晶 *m. p.* 1~3°C で、cycasin と酷似した紫外線吸収スペクトルを示し、215  $\mu$  に吸収極大をもつ。室温でも不安定で、加熱により分解して formaldehyde を、またアルカリ分解で cycasin を与える。
4. MAM-acetate は *b. p.* 191°C の無色液体で、MAM と同様な紫外線吸収スペクトルを示す。
5. MAM-benzoate は、白色針状晶 *m. p.* 66°C。
6. MAM-3, 5-dinitrobenzoate は淡黄色針状晶で、*m. p.* 106.5°C。
7. 腹腔内注射でネズミに投与した cycasin は、24 時間以内に殆んど定量的に未変化のまま尿中に回収され、ネズミは何ら中毒の症状を示さなかった。

4. 無菌室内で外科手術して仔を得るなどにより、全く無菌の状態で飼育せるもので、腸内細菌その他の微生物を全くもたない。
5. MAM-acetate の合成が最近 MATSUMOTO らにより報告されている。<sup>15)</sup>

8. 経口投与に際しては、尿中への cycasin の排泄は少なく、著しい中毒の症状がみられた。
9. MAM のネズミに対する毒性は非常に高く、最低致死量は、約35 mg/kg 体重と推定された。
10. MAM-acetate もまた、著しく毒性であることを示した。(昭和40年6月30日受理)

## 文 献

- 1) LAQUEUR, G. L., MICKELSEN, O., WHITING, M. G., and KURLAND, L. T., *J. Natl. Cancer Inst.* **31**, 919 (1963)
- 2) 西田孝太郎, 小林 昭, 永浜伴紀, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* **19**, 77 (1955)
- 3) RIGGS, N. V., *Chem. Ind.* **1956**, 926
- 4) MATSUMOTO, H. and STRONG, F.M., *Arch. Biochem. Biophys.* **101**, 299 (1963)
- 5) 西田孝太郎, 小林 昭, 永浜伴紀, 小島喜久男, 山根 実, *生化学*, **28**, 218 (1956)
- 6) 小林 昭, *Agr. Biol. Chem.* **26**, 208 (1962)
- 7) 小林 昭, *Agr. Biol. Chem.* **26**, 203 (1962)
- 8) ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, "Official Methods of Analysis" p. 43 (1960)
- 9) JEANES, A., WISE, C. S., and DIMLER, R. T., *Anal. Chem.* **23**, 415 (1951)
- 10) TREVELYAN, W. E., PROCTOR, D. D., and HARRISON, J. S., *Nature* **166**, 444 (1950)
- 11) LANGLEY, B. W., LYTHGOE, B., and RAYNER, L. S., *J. Chem. Soc.* **1952**, 4191
- 12) SIWOLOFF, A., *Ber.*, **19**, 795 (1886)
- 13) LIPSCOMB, W. N. and BAKER, R. H., *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 179 (1942)
- 14) LAQUEUR, G. L., *Federation Proc.* **23**, 1386 (1964)
- 15) Matsumoto, H., NAGAHAMA, T., and LARSON, H. O., *Biochem. J.* **95**, 13c (1965)

## Résumé

The glucoside cycasin administered intraperitoneally to rats is almost quantitatively excreted unchanged in the urine with no apparent toxicity. Oral administration results in severe toxicity and greatly reduced urinary excretion of cycasin. Methylazoxymethanol (MAM), the aglycone of cycasin prepared by enzymatic hydrolysis of cycasin proved to be toxic when injected. Thus it was demonstrated that the toxic component is the aglycone and not cycasin *per se*.

Experimental details for the preparation of MAM by enzymatic hydrolysis of cycasin and the properties of three derivatives of MAM are described.