

Cycasin を大量に調製する試みについて

小林 昭・室園 利 明

A Trial for Large-Scale Preparation of Cycasin

Akira KOBAYASHI and Toshiaki MUROZONO

(Laboratory of Biochemistry and Nutritional Chemistry)

緒 言

Cycasin は当研究室において¹⁾ 日本産 ソテツ *Cycas revoluta* THUNB. の種子から、はじめて単離証明した有毒配糖体である。このものは methylazoxymethyl- β -D-glucoside なる構造を有し、化学的に極めて興味ある対象であるが、その生理作用もまた特異的である²⁾。その後 Laqueur らが、ソテツ種子を与えたラットの肝・腎に腫瘍の発生すること³⁾、さらに cycasin そのものが発癌性を示すこと⁴⁾を報告するにおよび、にわかに多くの注目を集めるに至った⁵⁾。

これらの研究に際して、大量の cycasin を投与する動物試験を企画し、あるいは cycasin の作用本態であるアグリコン、ないしはその誘導体⁶⁾を調製するためには、極めて多量の cycasin が必要である。しかしながら現状では、調製の困難さ、需要の量あるいは継続性の不安定さの故に、業者による供給は期待できず、研究者自らがこれに当らざるをえない。

著者の一人小林は、最初の単離¹⁾以来、調製方法の簡易化・改良にも検討を重ねて来たのであるが、今回大量の cycasin を必要としたので従来法にさらに再検討を加え、比較的容易な一連の過程を設定しえたのでここに報告する。これは同時に、ソテツ種子に含まれる特殊なアミノ酸・糖類の分離検索をも目的としたものであった。

実験材料および方法

ソテツ種子

昭和44年秋、奄美大島において収穫された *Cycas revoluta* THUNB. の完熟種子を用いた。

Cycasin の検出 (シアン反応)

cycasin をアルカリで分解して生成するシアン¹⁾を、ベンチジン青で検出した⁷⁾。すなわち試料溶液少

量を試験管にとり、稀酸性ソーダ溶液を加えてアルカリ性となし、沸とうするまで少時加熱した。これを稀硫酸で酸性とし、直ちに酢酸銅-酢酸ベンチジン試薬*を付した小濾紙片で管口をおおい、要すれば加熱してシアン化水素の蒸散を促せば、ベンチジン青の発色によって、cycasin の存在を特異的に知ることができた。neocycasin 類⁸⁾もこの反応で検出することができる。

ガスクロマトグラフィーによる検索

cycasin および糖組成の定性的な検索には、ガスクロマトグラフィーが迅速簡便であった**。試料溶液に内部標準としてアンドロステロン⁹⁾を加え、蒸発乾涸したのちピリジン溶液となし、N, O-ビストリメチルシリルアセトアミドおよびトリメチルクロロシランを加えて、トリメチルシリル化した。装置は柳本製 G 8 型水素炎検出器付で、SE-52 (3%) -クロモソルブ W を充填した 3 mm ϕ ×150 cm のステンレス製ジュアルカラムを用いた。その他の条件は Fig. 1 に示した。

実験結果および考察

調製過程の全般は Table 1 に示したとおりである。

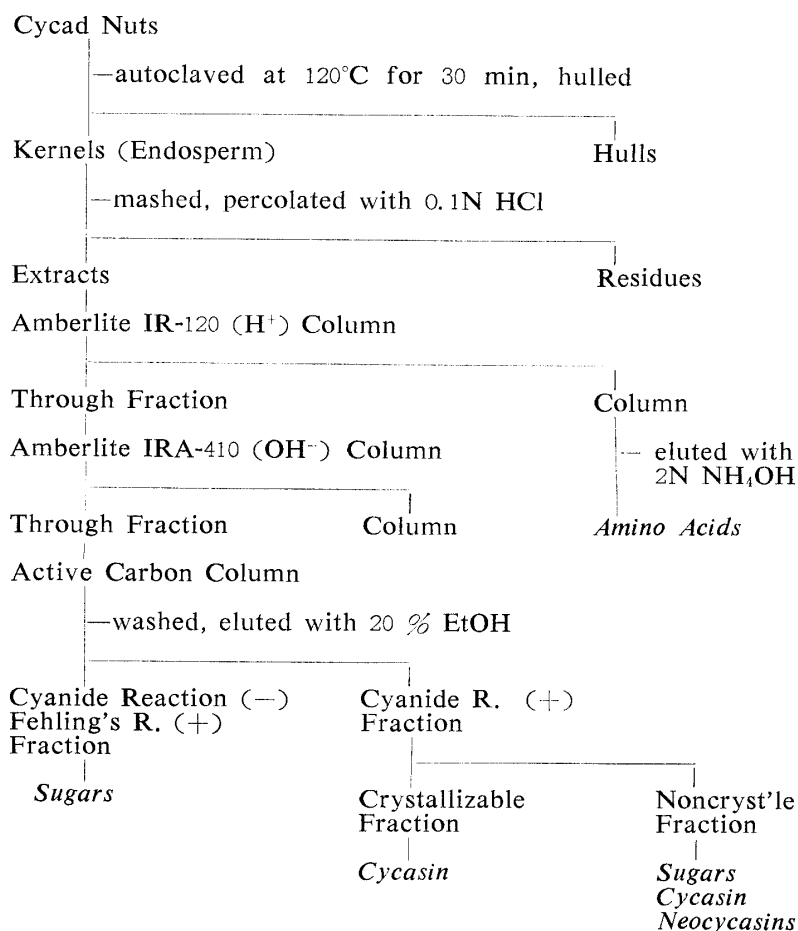
酵素の不活性化

ソテツ種子には cycasin を加水分解する β -グルコシダーゼが存在するので、抽出に先立ってこれを不活性化しておかなければ、脱殻と同時に始まる酵素反応のために遊離したアグリコンは、不安定で容易に分解し¹⁾、cycasin は全く収得できなくなる。失活化させるため従来は、仁(胚乳部)を傷つけないよう注意深く脱殻し、直ちに沸とう水あるいはアルコール中に投入する、あるいは磨砕して直ちに稀硫酸中に投入する¹⁰⁾などの手段をとった。しかしながら、ソテツの

* 酢酸銅 0.3% 水溶液および酢酸ベンチジンの半飽和水溶液を、使用直前等量混合した。

** 詳細については別に報告する予定である。

Table 1. Preparation of Cycasin



β -グルコシダーゼは非常に強力で、その失活化が進行する以前に、かなりの cycasin が加水分解されるものようであった。

これらに対し、種子をそのままオートクレーブ中で、 120°C 30 分間加熱することは極めて効果的であり、脱殻作業に特別の注意をほらう必要もなくなるので、最良の方法であった。この加熱処理に際し、cycasin は安定で、分解されることはなかった。一方でんぶん・たんぱく質などの高分子物質は変性凝固し、次の抽出過程において溶出されることがほとんどなくなるので、従来必要とした除たんぱく操作なども省略することができた。

抽出

仁の磨砕には動力肉ひき機を使用した。糊化したでんぶんのため粘結するので、一挙に細粉とすることはできなかったが、一旦荒びきして風乾すれば、二度びきは容易で、抽出に適当な細粉状態（水分含量約 40 %）となしえた。

抽出溶剤として従来用いた含水メタノールは、抽出能率の他に、抽出液の防霉、たんぱく質など高分子物

質の不溶化を意図したものであった。しかしアルコール類は活性炭クロマトグラフィーの前に、完全に除去しておかなければならない。大量の抽出液からアルコールを蒸散させるには、好能率の濃縮装置¹¹⁾を用いてもなお長時間を要し、好ましくない操作であった。

今回はこれを避け、0.1 N 塩酸による抽出を試みて、極めて有利に使用しうることを明らかにしえた。のちに述べるように、抽出操作が室温で長時間にわたるので、微生物の繁殖を防ぐ手段として、取扱いの最も簡便な塩酸を使用したのである。cycasin はこの酸度では、加熱しない限り安定である¹²⁾。一方シュクロースはかなり転化した。この糖は活性炭カラムにおいて、cycasin とほぼ同様の挙動を示し、その結晶化を最も妨げるものであるから、これが分解して減少し、cycasin との分別が容易な転化糖となることは、好都合であった。

抽出液の搾汁にはハンドプレスを用いていたが、最も労力を要し煩雑な過程であった。その改良として、パーコレーター方式を採用し多大の成果をえた。市販 60 l 容量のポリエチレン製バールの底部に小孔を穿

ち¹³⁾, コック付きのゴム栓をはめた. 同じく蓋で作った篩板を底におきガーゼを敷いた. 磨砕した仁の粉末に 0.1 N 塩酸を混和し, かゆ状となしたものをこれに充填し, 上から新鮮稀塩酸を補給しつつ徐々に流出せしめ, シアン反応およびフェーリング反応で抽出状況をしらべた. 仁の粉末約 40 kg を 1 回に充填しえたが, 流出速度 1~2 l/hr に調節し, 浸出液量 60~80 l で反応は完全に陰性となり抽出が完了した. 仁の示す緩衝能のため, 浸出液は当初 pH 3~4 で黄色混濁しているが, 次第に淡色透明となり pH も 1 まで低下した. これらを濾紙パルプで濾過し, 次の処理に供した.

脱イオン処理

抽出に用いた塩酸を除去するため, イオン交換樹脂で処理した. この操作は同時に, ソテツ種子に含まれる遊離アミノ酸の分離をも目的としたものであった. しかしながら, イオン性の低分子物質を完全に除去したことは, 次の活性炭カラムの負担を著しく軽減し,

その能率を向上せしめえたものと考えられる.

まずアンバーライト IR-120 (H⁺) のカラム 11φ×41 cm に注入した. 通過液のニンヒドリン反応を検し, 陽性に転じた貫流点でカラムを水洗した後, 2 N アンモニアで溶出した. アンモニア溶出液は別に濃縮して, アミノ酸の分離, 検索に供することとした.

カラム通過液は強酸性となるので, できるだけ早く次のアニオン交換カラムで中和したが, cycasin は殆んど悪影響を蒙らず, 他方シュクロースは転化作用を受け, 上述の抽出溶剤として用いた稀塩酸の作用と共に, かえって好都合であった. このことはガスクロマトグラフィーで確認された. ソテツ種子中の intact な糖組成を知るため, 別に 50 % エタノールで抽出した際のガスクロマトグラムを, Fig. 1 に示した. 稀塩酸で抽出し, カチオンならびにアニオンを除去する過程をへたものの組成は, Fig. 2 に示した如くであって, cycasin の保全とシュクロースの転化が明らかであった.

アニオンの除去には, アンバーライト IRA-410

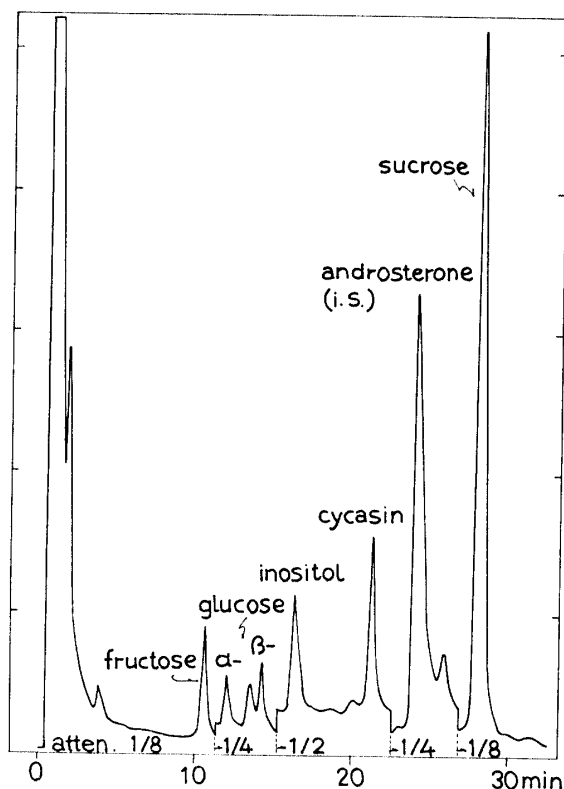


Fig. 1. Gas Chromatogram of Trimethylsilylated Sugar Components of Cycad Nuts

Autoclaved kernels were extracted with aqueous ethanol, and the extracts were trimethylsilylated. Column; SE 52. 3 %, 3 mmφ×150 cm, 130°~240°C, program 4°C/min. N₂; 7.5 ml/min.

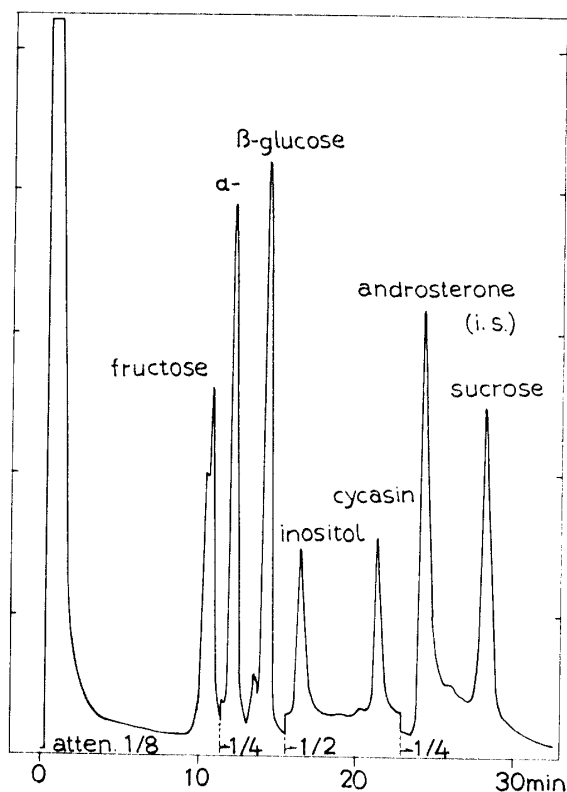


Fig. 2. Components of the Deionized Extracts

Kernels were percolated with 0.1N HCl, and the extracts were treated with ion-exchange resins. Gas chromatography was the same as Fig. 1.

(OH⁻)のカラム, 16φ×15 cm を用いた. 通過液は pH 8~9 となることがあって, これは cycasin の分解を来すおそれがあるので, 注意して pH 7 以下に調節する必要があった. イオン交換樹脂は, いずれも上記の量では不足であり, 繰返し再生して使用した.

活性炭カラムによる分別

cycasin を糖類から分別するには, 活性炭を用いる以外に適確な手段は見当らない. ただ cycasin の活性炭への被吸着性はかなり高く, cycasin の単離だけを主目的とする場合には, クロマトグラフィーをかなり簡略化することができた.

活性炭は武田製精製白鷺が液の通過もよく好適で, これをセライト 545 と 2 : 1 の比に混合し, 19φ×25, 26φ×25, 27φ×25, 30φ×45 cm の 4 本のカラムに充填して用いた. 脱イオンした抽出液をカラムに注入し, 溶離液をフェーリング反応, シアン反応, ガスクロマトグラフィーで随時試験し, 糖, cycasin の溶出・吸着状況を観察した.

溶離液は最初フェーリング反応陽性, シアン反応陰性で, グルコース・フラクトースなどの単糖類を主た

る成分とし, cycasin はカラムにとどまった. 若干の分画では, ガスクロマトグラムに, 特異な未同定のピークを顕著に示したので, 別に濃縮してその検索に供することとした. その一例を Fig. 3 に示した. これら以外の溶離液は全部廃棄した. 浸出および脱イオン処理において液量は尨大となるが, これを濃縮する必要は全くなく, その大部分をここで処分することができた. ただ液の通過に長時間を要し, カラム内部でも微生物が繁殖するので防菌にとくに注意した. トルエン, クロラミン-T, クロルカルキ浸出液が有効であった.

カラムが吸着 cycasin で飽和し, 溶離液のシアン反応が陽性に転じたのちは, 水洗後 20%エタノール 20~30 l で溶出した. シアン反応がさらに顕著となれば, 1~2 l ずつ分画し, その少量を湯浴上で蒸発乾燥して結晶化の可否を検した. cycasin を主成分とする分画は, その特有の美しい放射状針晶を析出するので, これを「可晶区」としてプールした.

可晶区が溶出し終ったのちは, 40, 95%エタノールを約 5 l ずつ注入し, さらに水洗して溶出を完了し

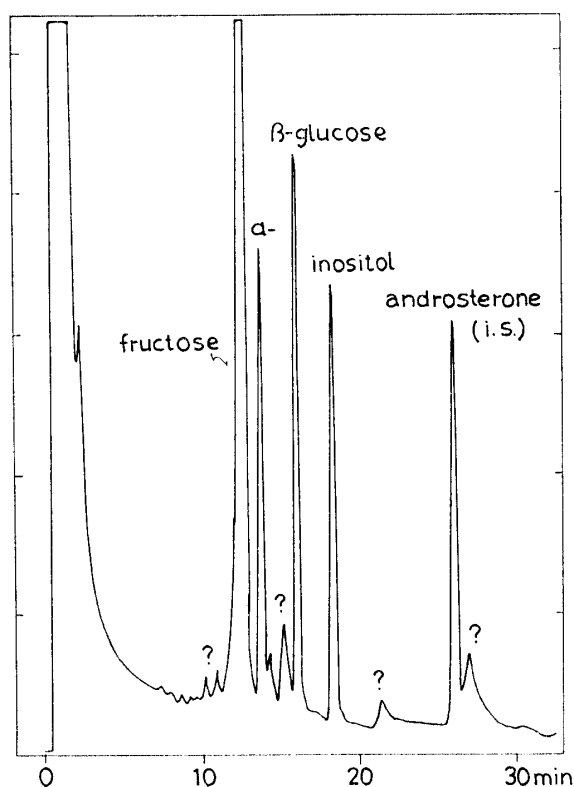


Fig. 3. Composition of the Carbon Column-Through Fraction

Typical through-fraction from the carbon column was analyzed similarly as in Fig. 1.

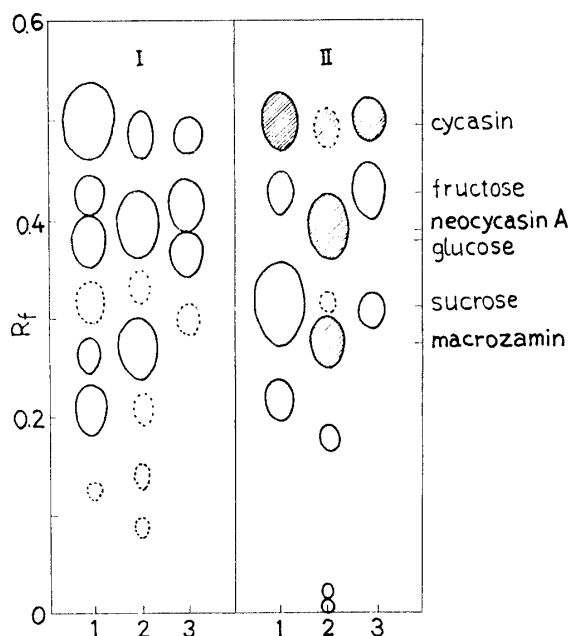


Fig. 4. Paper Chromatogram of Two Representative Noncrystallizable Fractions

Sample: 1. Fraction preceding the crystallizable one. 2. Succeeding one. 3. Specimens.

Solvent: n-butanol-pyridine-water (6:4:3)
Reagent: I. AgNO₃-alkali. II. Resorcinol-HCl, by which hatched spots were rendered yellow and others, red.

た。可晶区の 前と後の 溶離液は、シアン反応陽性であるが、水飴状となって結晶化しない「非晶区」となる。これらは糖、とくにシュクロース、あるいは neocycasin 類が混在するためであり、濃縮してエタノールを蒸発させたのち、別のカラムに投入して cycasin の回収をはかった。最終的には非晶区もプールして、特殊成分の検索に供することとした。その組成の一例を、ペーパークロマトグラムで Fig. 4 に示した。

Cycasin

可晶区を合一して濃縮し、粗 cycasin をえた。これはかなり不純であり、熱エタノールからの再結晶を繰返しおこない、ペーパークロマトグラムでも単一のスポットを与える、純 cycasin とした。

ソテツ種子 330 kg より仁 170 kg を得、その抽出液を上述のごとく処理して、粗 cycasin 350 g をえた。純 cycasin は 285 g で、仁の新鮮重に対する収率は 0.17 % であった。

本研究の一部は「がん特別研究」文部省科学研究費の援助を受けた。鹿児島大学医学部川路清高教授には、ソテツ種子の供与ならびに種々のご便宜を頂いた。同第一病理学教室の渡辺研之氏その他の方々、また当研究室の専攻学生諸君には、終始多大のご協力を頂いた。記して深謝の意を表する。

要 約

cycasin をソテツ種子から大量に調製するため、従来の方法を簡略化し能率の向上をはかった。その要点は次のとおりである。

1. ソテツ種子中の酵素の不活性化に、オートクレーブで加熱する方法を採った。

2. 抽出には大容量のパーコレーションを工夫し、磨砕した仁（胚乳部）を 0.1 N 塩酸で連続浸出した。この酸度は cycasin には害はなく、これと最も分別し難いシュクロースの転化を促進した。転化糖は活性炭カラムにおいて容易に分別できるので、このことは極めて有利であった。

3. イオン交換樹脂で、塩酸ならびにイオン性低分子物質を浸出液から除去し、活性炭カラムの負担を軽減した。この操作は同時に、ソテツ種子中のアミノ酸の分離・検索をも目的としたものであった。

4. 大量の抽出液は濃縮する必要はなく、活性炭カラムに cycasin を吸着せしめ、これを含まない通過液として廃棄することによって、処理することができた。カラムは主として 20 % エタノールで溶出し、乾涸して cycasin を結晶化しうる溶離液を集めた。

5. cycasin 特有のシアン反応、結晶化の可否、またガスクロマトグラフィーによる検索は、調製全過程の追跡に極めて有用であった。

ソテツ種子 330 kg の仁（胚乳部）170 kg から cycasin 285 g（仁新鮮重の 0.17 %）を得た。

文 献

- 1) NISHIDA, K., KOBAYASHI, A. and NAGAHAMA, T.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*. **19**, 77 (1955).
- 2) 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).
- 3) LAQUEUR, G. L., MICKELSEN, O., WHITING, M. G. and KURLAND, L. T.: *J. Nat. Cancer Inst.* **31**, 919 (1963).
- 4) LAQUEUR, G. L.: *Fed. Proc.* **23**, 1386 (1964).
- 5) 永田幸雄：化学と生物。 **7**, 723 (1969).
- 6) 小林昭・MATSUMOTO, H.: 鹿大農学術報告。 **16**, 1 (1966).
- 7) 内藤多喜夫：有機試薬に依る分析法。広川書店 (1944), p. 296.
- 8) 永浜伴紀：鹿大農学術報告。 **14**, 1 (1964).
- 9) WELLS, W. W., YANG, M. G. and MICKELSEN, O.: *Anal. Bioch.* **25**, 325 (1968).
- 10) NISHIDA, K., KOBAYASHI, A., NAGAHAMA, T. and NUMATA, T.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*. **23**, 460 (1959).
- 11) 西田孝太郎：化学の領域。 **14**, 63 (1960).
- 12) NISHIDA, K., KOBAYASHI, A., NAGAHAMA, T. and NAWATA, J.: *Mem. Fac. Agr. Kagoshima University*. **3**, 6 (1957).
- 13) 奥山典生：実験室におけるポリエチレン細工，化学同人 (1968), p. 136.

Summary

For a purpose of preparing large amount of cycasin, the previous procedures of preparation were modified to be made simpler and more efficient.

1. The cycasin destroying enzyme in the cycad nuts was inactivated by autoclaving the unhulled native nuts.

2. A large-scale, continuous percolation with 0.1 N hydrochloric acid was devised for

extracting the mashed kernels (parts of endosperm). This acidity gave no harmful effect upon cycasin, but did accerelate the inversion of sucrose which was most difficult to be separated from cycasin. It was a great advantage since inverted sugar could be separated easily on the carbon column.

3. Hydrochloric acid and ionic compounds in the extracts were removed by treatments with ion-exchange resins. These treatments were effective to increase the capacity of the carbon column available for cycasin. Another purpose was to obtain free amino acids in the cycad nuts.

4. The processed extracts amounted to a large quantity, but there was no need to concentrate them prior to application to the carbon column. The passed through fractions left cycasin adsorbed on carbon, and were all discarded. The column was eluted mainly with 20 % ethanol, and the effluents those gave crystallizable cycasin were pooled.

5. The characteristic cyanide reaction of cycasin, test for the possibility of crystallization, and gas chromatography were found to be very valuable to follow the preparing procedures.

Cycad nuts, 330 kg, or 170 kg of the kernels, were treated in this way, and 285 g of cycasin (0.17 % of fresh kernels) was obtained.