

1. ソテツ種子含有配糖体 (Cycasin) による実験的肝癌

小林 昭 (鹿児島大学農学部農芸化学科)

寺師慎一 (鹿児島大学南方海域研究センター)

ご紹介いただきました小林でございます。実験的肝癌については寺師先生がのちほど報告されますので、私はその実験の一部としましてソテツの毒、Cycasinの話をごく簡単に紹介いたします。

ソテツは、もう皆様方、よくご存知のと通りの植物ですが、その種子は日本では奄美大島や沖縄で古くは食用にしておりました。現在はほとんど食用にしていらないと思います。ただ一部の地方にまいますと味噌の原料として多少使っていると思いますけれど¹⁾、以前その地区は食糧飢饉、台風の常襲地帯でございますから、食糧難におちいりました時にはソテツに毒があるということを知っていましたから、その毒を除いて食用にするということが昔からおこなわれてきたわけです。

ところで、その毒成分はいったい何であるかということ、昔から農学部の前身の高等農林時代から研究をしておられましたのが吉村先生であり、また、それを引継がれたのが、私の恩師西田光太郎先生でございます。戦前は、その毒成分が何であるかということとはなかなかつかまえていく、西田光太郎先生は、配糖体であるということをおっしゃっていただきましたが、当時はその物質がとりだされていませんでした。しかも、戦時中はやむなくその研究を中断していたわけですが、戦後、ついこのあいだ奄美大島が復帰して30年という記念の行事もあったのですが、ちょうど復帰いたしました年に、この研究をもう一度やろうではないかということで、西田先生のご指示で私どもがこの研究に着手したわけです。そして1955年にその毒成分を初めて純粋な形でとりだすことができました、その構造を決定いたしました²⁾。もうずいぶん古いことでございます (Fig.1)。

CYCASIN

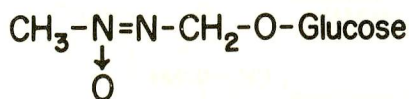


Fig. 1 Chemical structure of Cycasin.

その構造は比較的簡単で一方にglucoseがあって、これに $\text{CH}_3\text{N}=\text{NOH}$ が配糖体の形で出来ていることを見つけたわけでございます。

それで、これをソテツの学名Cycasに従いまして“Cycasin”と西田光太郎先生が命名されたわけです。

ソテツにはいくつかの種類がありますが、その現物をここへ持ってまいりました (Fig.2)。

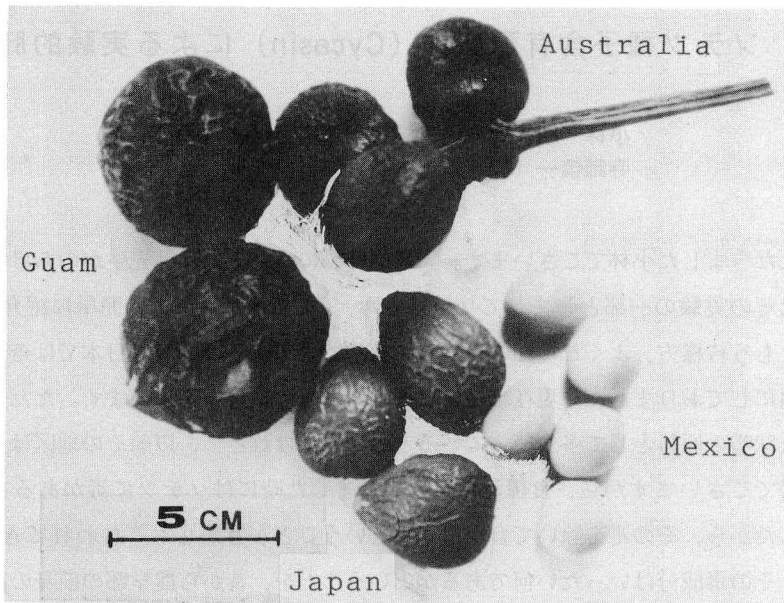


Fig. 2 Four kinds of cycad seeds.
Cycas circinalis (Guam), *Cycas revoluta* (Japan),
Bowenia (Australia) and *Dioon* (Mexico).

中くらいの大きさのが日本産（中央下）のソテツで、いちばん大きいのがグアム島のソテツでございませう。茎の付いているのがBowenia、いちばん小さいのはメキシコで採集されたDioonという別な種類のソテツでございませう。

Cycasinは配糖体結合ですので、酵素の β -glucosidaseで結合部が切れてこういうmethylazoxy-methanol (MAM) という形になります (Fig.3)。

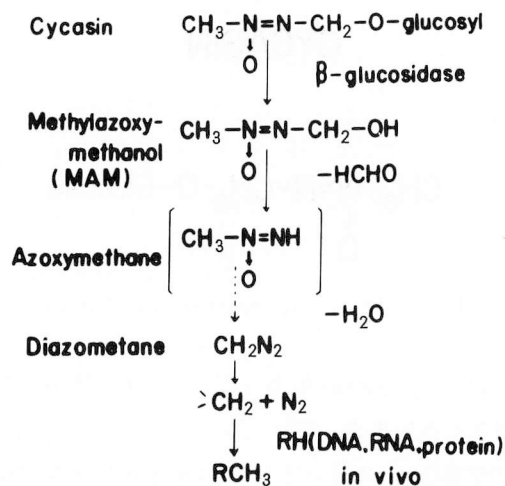


Fig. 3 Metabolism of Cycasin *in vivo*.

それで、glucoseの方はもちろん毒はございませうから、こちらの方が毒性の本体であるというこ

とになります。

普通はglucoseが切れますと、その結果としてこちら側はMAMとなり、そのあとさらにバラバラに壊れてしまいます。だからMAMは純粹の形では回収できないという、かなり不安定な物質でございます。

それで、はじめはこれがMAMの形ではとれないというふうに考えておりましたのですけれども、これは古い話ですが、1962年から私はハワイ大学に行く機会がございまして、むこうでこれを純粹にとりだすという仕事をする機会がございました。

本日の要旨にもありますが、1963年にアメリカのLaqueurさんたちが、そのソテツの毒とグアム島にみられる神経病に関係がありそうだということで実験をやっているうちに、そのソテツを食べさせるとネズミに発癌するということが見つかって、アメリカでかなり大きな話題をひきおこしました³⁾。ちょうど私がむこうにいた頃でございます。結局、ソテツで発癌するというのはCycasinが原因であろう。そうだとすればこの分解産物MAMに発癌性があるということになってきたわけでありませう。

ただしこれは容易にバラバラと壊れてしまうものですから、ほんとうに発癌の原因になるかどうかについては類推でもしかなかったのですが、結局は壊れたMAMが最後に核酸の核塩基をメチル化してそれが発癌の原因になるのであろうと結論されるに至りました。これは、この配糖体のこちら側を切りはなしたものをaglyconeと言っておりますが、このaglyconeであるmethylazoxymethanolが、発癌の原因であるということになるわけです。それで、これはいま申しましたように容易にバラバラに壊れてしまうものですから、このままの化合物では実験がやりにくいのです。

そこで何かくっつけて安定化してやれば、つまりソテツの中ではglucoseと結合して安定化しているのですから、この部分にアセチル基を導入してacetylerにしてみますと、安定したとり扱いやすいものになるわけでありませう。

これを、実験動物に使いますとesteraseの働きでここが切れてglucoseと毒性を発揮するMAMとなります。そういう分解のもとになるacetylerそのものについても、私がむこうで実験いたしましたこと⁴⁾⁵⁾。

1964年に私が帰国いたしまして、その後ちょうどアメリカでこのソテツで癌ができることが非常に大きな問題になりまして、多大な研究費がアメリカでは出たようでございます。一方、日本でもそれは大きな話題となりまして、鹿大の医学部の二内科の佐藤八郎先生、病理の川路清高先生、福西 亮先生さらには腫瘍研の柚木一雄先生、そしてこちらの寺師先生との共同でそのソテツ種子による、あるいはそのソテツの配糖体Cycasinによる発癌性の研究をしようということになったわけでございます。そのあとの詳しい話は寺師先生からあると思ひます。

これは、肝臓とはまったく関係のないことですが、私の発表要旨の始めに書いてあります牛のソテツ中毒という仕事に現在かかっております。これは今から4年から5年ほど前に、沖縄の離島で放牧している牛の後肢がダメになって歩くのにヨロヨロする、倒れる、重症のものは死んで

しまう、というぐあいに放牧の役にたたなくなるという大きな問題が起きてまいりました。これは結局、牛がソテツの葉を食べるためであるということで、そういう中毒症状はグアム島でもすでに以前から知られてましたが、日本でも放牧牛にもそういうものが出始めたということで、沖縄県では非常に大きな問題になってきたわけです。

それにつきまして、本日ここにおいでになっておられますが、私ども、本学農学部獣医学科の先生とご一緒に仕事をしようということで、その牛の後肢麻痺の仕事にかかっております。そしてこれは、どうも今のところソテツの配糖体とは直接の関係がなさそうで、葉っぱに何らか別の毒性物質があるのではないかということです。これはたいへん時間をかけて、しかも大きな動物で実験をしないと発症しません。モルモットやネズミで実験が出来るとたいへんやりやすいのですが、その実験系が使えなくてなかなかうまくいきません。そういうわけで、たいへんむずかしい問題があって手こずっておりますが、牛の場合には不思議なことに後肢が麻痺して、形態学的にも明らかな脊髄病変がみられるという、別な意味でおもしろい事実がみつかってきました⁶⁾⁷⁾。

というところで、たいへん簡単でございますけれども、私の報告はこれで終わらせていただきます。

司会 どうもありがとうございました。つづきまして寺師先生にお願いいたします。

南海研の寺師でございます。シンポジウム「熱帯と肝臓病」の演題にソテツの種子による実験的肝癌を選ばせていただきましたことについて、まえおきみたいなことを申しておきます。

癌とよばれる病気のうちで、肝臓の癌の原因に、あとで話がでてくると思いますが、B型などのウイルス性肝炎が、その主体であるということが判明してきています。そしてそのほかに熱帯ではAflatoxinといった、これもやはりあとからでてまいりますが、カビ毒の可能性も少なくないということが知られてきました。

実験的にはソテツの実に含まれる有毒配糖体つまりCycasinによって肝臓に癌が発生するということは多くの研究で証明されていますけれども、すくなくとも日本でソテツによる人での発癌の可能性は、まずないということをはっきり申しておかないと社会的に非常な混乱をおこすこととなります。というのは、小林先生のお話でありましたようにソテツを人が口にするときは十分な前処置がなされCycasinは容易に分解され、その発癌性はなくなっているという都合のいい点があり、ソテツは一般に発癌性のない安全な物質となっています。

その一方ここでシンポジウム「熱帯と肝臓病」で、これをとりあげたのはこのソテツの食品利用がどうも南方ではまだあるらしい、つまり熱帯の方ではまだソテツ種子が利用されているらしいということを文献的に見ることがあるからです⁸⁾。

ですから、その熱帯で充分にその前処置がなされているかどうかということが気にかかり、もうひとつは海外青年協力隊あるいは現地地調査に行かれた先生方が現地でその人たちと一緒に食事をする場合に、もしソテツ種子を調理するような機会に出合わされた時には、その食物に発癌性物

質が残っていないかどうかには注意していただきたいという意味でとりあげたわけです。

それでは本論に入ってゆきます。

小林先生のお話と一部重複しますが、これは鹿大の学報245号に教養部の新 敏夫教授がお写しになったソテツ自生の写真が表紙になっていまして、この北限がだいたい南九州、鹿児島県それから宮崎県ぐらいだと説明されています。

またソテツは鹿大の農学部の正門のところにもありこの様に園芸樹としてつかわれると同時に、これも研究材料としてかなり使われたらと思うます。

ソテツの実は今現在、ループ・タイなどのみやげ物に使われたりするという様な程度で食糧としての利用度は少ない様です。たゞ今年の1月24日の朝8時前のNHKテレビで、奄美大島地方の正月料理の紹介があり、地方語でこの豚の料理のことを「ワー料理」というのだそうですが、それにはこのソテツを素材とした味噌を使う。その味噌も三年間たった「ナリミソ」を使った郷土料理を食べないと、故郷で正月を迎えたという気分にならないそうです。ですから、ごく一部では、そういう郷愁的な意味でソテツが使われているようです。

Case						
Age (yrs)	48	12	16	8	19	49
Sex	F	M	M	M	M	M
Latent period (hrs)	10	14	14	17	26	23
Survival time after the appearance of clinical symptoms (hrs)	25	17	12	32	39	alive
Clinical symptoms	Headache	+	+	+	+	+
	Coma	+	+	+	-	-
	Cramp	+	+	+	+	+
	Abdominal pain	+	+	+	+	+
	Vomiting	+	+	+	+	+
	Jaundice	-	-	-	-	-
	Hepatomegaly	+	+	+	+	-
	Anuria	-	-	+	+	+

Table 1 Cycasin intoxication cases by eating cycad albumen in Okinawa Prefecture in Jpavn (December 13-16th, 1965. from Okinawa Times)⁹⁾.

人体でのソテツ中毒例は昭和31年、宮古島を襲った台風のため食料難となり、ソテツ種子を食料

とする処理が不十分なまま食べると生命にたいへん危険性があるということは重々わかっていたのですが、止むを得ず不十分な処置で食べた結果6名のうち5名もの死亡者が出ています(Table1)⁹⁾。症状は腹痛であるとか、嘔吐であるとかの消化管症状、それから意識不明については肝臓が、たいへん広範に障害されることからきた意識障害だと思えます。それから、肝腫大あるいは黄疸であるというのは、例数が少ないですがほとんどは死亡までの期間が短く、これらの症状を出す以前に死んでしまったためだと思えます。昔はCycasinというのはまず食糧として大切にされていただけにその処置の方法も十分にみな修得してたのですけども、緊急の場合に止むを得ない事故もあったという一例です。

このように、Cycasinの毒性は古くから知られていたのですが、発癌性は全く気づかれていなかった。しかし、さきほど小林先生の話しにもありましたように1968年 Laqueurによってそれが証明された。

しかもこの実験についてはLaqueurはまったく別な方面から、つまり神経疾患を、人間の場合には筋萎縮性側索硬化症がグアム島に多く、あそこのチャモロ族がそのソテツの実を食べているということと、さきほどの牛の話と、両方結びつけて、神経疾患のための実験をおこなったわけです。ところが砕いたソテツの実を食糧にまぜて投与したところが、肝臓癌ができる、それから腎臓癌ができる、大腸に癌ができるというふうに非常に広範な発癌性を示して来ました。それでソテツにはどんな成分があるのかいろいろ調べてみたところが、彼らの実験よりももっと以前の1955年に鹿児島大学の農学部ですでにソテツの種子から分離され、しかもその構造式まで決定され“Cycasin”と名前がつけられた物質が含まれていることを文献上知ったわけです。この様に発癌性はLaqueurが発見し、物質の単離と構造決定は鹿大の西田、小林および永濱先生によって解明されたという全く独自の研究が、その原因の追求に貢献したという例外的な好結果となったわけです。

Tumor induction with a single dose of cycasin given to newborn Fischer rats subcutaneously (Expt. 1) and to two groups of weanling Osborne-Mendel rats by stomach tube (Expts. 2 and 3)

Tumor Sites	Experiment number			Totals
	1(55)*	2(36)	3(31)	
Kidney	34	28	46	108
Liver	21	2	5	28
Small intestine	0	0	2	2
Large intestine	9	15	21	45
Lung	12	2	0	14
Brain & meninges	5	1	1	7
Miscellaneous	1	4	4	9
Total	82	52	79	213

* Number in () indicates effective number of rats.

Table 2 Tumors induced by Cycasin in LAQUEUR's report³⁾.

これは広野, Laqueurらの1968年の論文の引用です (Table 2)¹⁰⁾。

この実験では3群とも腎臓腫瘍の頻度が非常に高いですが, 肝臓の腫瘍は実験群で頻度は違います。それには実験1は皮下投与でFischerラット, 実験2と3では経口投与でOsborne-Mendel系統のラットによったという違いのなかで, 実験動物のほうに影響したと思います。実験動物の系統差についてたとえば, 同じ肝臓癌ができるという実験に, よくDAB系ラットを使います。それは, 肝細胞の持っている酵素の違いをうまく利用できるということがわかっています。ここでもそれと同じことが影響しているだろうとされています。ソテツ種子の実物はさきほど小林先生が持ってこられました, グァム島産のソテツと奄美大島産のソテツとでは形や大きさばかりでなくその含有成分の違いがあります (Table 3)。

	Cycas revoluta * (Amami Island in Japan)	Cycas circinalis * (Guam)
Moisture	41.71 %	48.43 %
Cycasin	0.381	1.270
Neocycasin A	0.053	0.021
Neocycasin B	0.009	0.073
Macrozamin	+	0.031

* Note: All of the cycad seeds were autoclaved before chemical analyses for inactivating naturally occurring β -glucosidase.

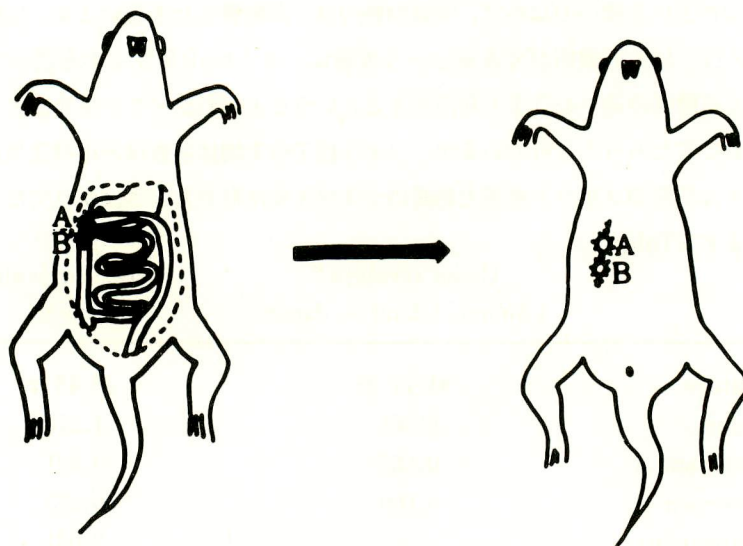
(analyzed by NAGAHAMA)¹¹⁾

Table 3 Composition of Azoxyglycosides in cycad seeds.

Cycasinの含有量では, グァム島産のものは大島産の約3倍位多いです¹¹⁾。我々の使用したものは奄美大島産のソテツから純粋に分離されたCycasinを使ったのですが, その含有量は約0.3%しかなく, しかも分離精製率は0.17%が限度でいかに小林先生にご迷惑をおかけしたかということもおわかりいただけると思います¹²⁾。そのCycasinが発癌性を示すためにはglucoseがはずれることが必要ですが, それには腸内細菌の持つ β -glucosidaseの働きがあります。ですから, Cycasinによる発癌実験は皮下注射, あるいは腹腔内注射みたいな形で投与しても腸内細菌の関与がなくて β -glucosidaseが働きません。したがってCycasinがそのままの形で尿や便にでてゆくだけで, 毒性も発癌性も全く示しません。しかし, Table 2にみられるようにnew bornのラットですとまだ筋肉中に β -glucosidaseを持っています。ですから, new bornの動物に皮下投与と実験をしますと, 明らかな毒性や発癌性を示してまいります。このように, Cycasinそのものが最終発癌物質ではなくて, 小林先生のお話のようにmethylazoxymethanol (MAM) がその発癌を示すわけです¹³⁾。

したがってこの化合物による発癌実験では, Cycasinそのものの抽出にたいへんな労力と時間をかけなくても, 化学合成によるMAMを使っても実験ができるわけで, MAMを安定化させたMAM-acetateによる実験もかなり行なわれております。

これはCycasinがその局所で直接作用するほかに、ひとつの代謝系統を通して発癌性を示すことの証明になった実験ですが、福西先生のアイディアを吉井および渡辺先生の行った仕事です (Fig.4)¹⁴⁾。



The external colostomy given to animals. The large intestine was divided into proximal, median and distal portions, each portion being of almost the same length, and cut at the midpoint between the proximal and median portions (left). The proximal end was opened as artificial anus (B) and another end was made as fistula (A) opening in the abdominal wall (right).

Fig. 4 Colostomic method in rats¹⁴⁾

これは大腸の上行結腸をその肛門側の末端で切断します。そして腹壁に、このBとAという2つの開口部をつくります。ですから、食べた食物は胃袋から小腸をとおって、上行結腸まであがってゆきますけれど、このBの開口部から体外に排せつされます。Aというのは、ここで開口してその一方は肛門につながっています。そしてこの横行結腸と下行結腸の部分にCycasinの抽出物を注入します。

その実験で大腸のmedianとdistal、つまり横行結腸と下行結腸の部分の粘膜はたしかにCycasinが直接ふれているわけですが、それがいったん吸収されて代謝されて後にほかの場所、つまり上行結腸では6例が、1例ながら小腸の部分にも癌ができています (Table 4)。

Cycasinそのものの接触する部では4例と意外に少いことがおわかりいただけると思います。

それから、これは三日ほど前、あのワラビ中の発癌物質 (プタキロサイド, Ptaquiloside) の分離に成功したとの発表をされた広野 巖先生 (東大 医科研) のなされた実験ですが、同じCycasin発癌も、動物の種類をかえて行くとそれぞれの頻度がちがうということを示しています¹⁵⁾。

Intestinal tumors of Sprague-Dawley rats induced by rectal infusion of cycad extract after colostomy.

Sex	Estimated intake of cycasin (mg/kg)	No. of effect. animals	No. of tumor animals	Duodenum Jejunum Ileum	Intestinal tumors			Total no. of tumors
					Proximal	Median	Distal	
f.	49.8×12	6	3	0	3	1	0	4
m.	49.8×12	12	4	1	3	3	0	7
Total		18	7	1	6	4	0	11

Table 4 Intestinal tumors in colostomic rats¹⁴⁾.

いずれもnew bornとadultの両方を使っています。ラットの場合はnew bornだと肝臓に非常によくできる。あとは腎臓、それから消化管です。ところがadultになりますと肝臓のほか大腸に非常によくできる。ただ若い方が肝臓にたくさんできます。それから、こんどはハムスターを使った場合には、これもマウスとわりと似て、肝臓によくできます。new bornの場合と、それからadultの場合、消化管にも多くでてくるという点がちょっとマウスとちがってくる。やはりそのそれぞれの臓器のもっている酵素や、その他の因子も影響してきます。

それで、ラットについての話にもどしますとOsborne-Mendel系あるいはその他の系統のネズミを実験に使うと発癌性が変わることがあります。

それからもう一つ大切なことは自然発生腫瘍との関係というのがあります。何も処置せずただ飼育しているだけで、実験動物に自然発生の腫瘍がでてきます。ですから発癌剤による投与実験をするときは、この自然発生腫瘍が当然ながらでてくるという可能性があります。

ここでスライドに示すように、からだ全体真黒のネズミ (ACI系) と、それから胸のあたりが黒いネズミ (Long-Evans系) と、からだ全体の真白いネズミの3種類は全く系統がちがいます。この3系統について自然発生腫瘍の話をしていしますと最後のSprague-Dawleyと呼ばれる白いネズミは乳癌ができる。一年間ただ飼育しているだけで、雌では約1.8%に乳癌が発生する¹⁶⁾。ところがこのACI系の黒いネズミは脳下垂体の自然発生腫瘍ができたり、雄の場合にはそのほかに睪丸のinterstitial cell tumor (Leidig cell tumor) ができる¹⁷⁾。白黒のだんだらのLong-Evansは自然発生乳癌の少ない系統です。今回の実験では、全身が真白の乳癌好発系のSprague-Dawley (SD) を選んで実験をしました。

次に肝臓腫瘍の発生のための基礎実験をお示します (Fig. 5)。

実験グループは3つに分かれています、いずれも生後50日の動物を使用しました。第1群は発癌物質を飲料水に混入しておこなった4 mg/kg体重連日投与の実験です (1リットルの水にCycasinを40mgと加してあり、ネズミは毎日だいたい自分の体重の10パーセントの水を飲む)。この実験は非常に長い期間かかり、一匹あたりの総摂取量を算出しますとCycasinは少ない動物で0.3g/kg体重、最高は2.8g/kg体重でした。ですから、たとえばラット1匹の体重500gですとCycasin総摂取量は1.4gというようなべらぼうな量になります。ソテツの種子にはCycasinがわずか0.3%しか

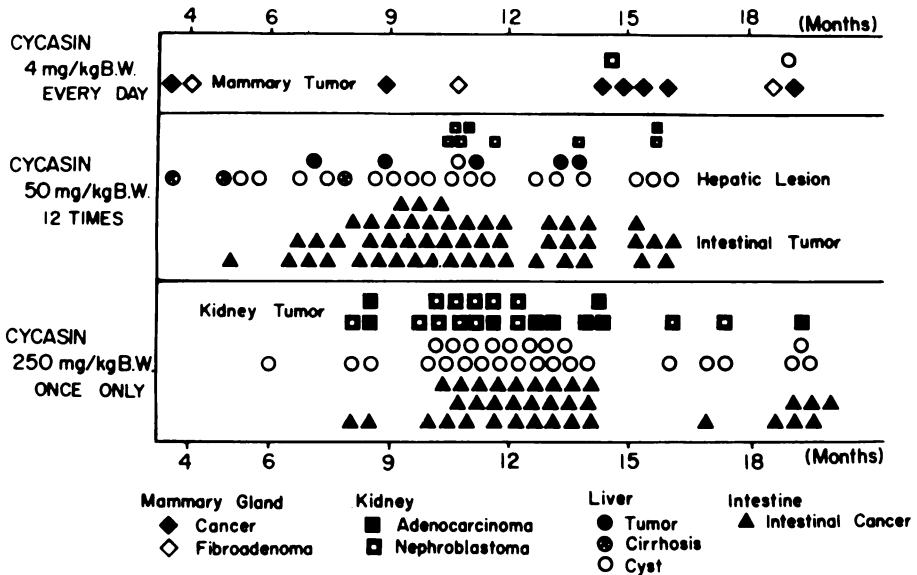


Fig. 5 Incidence of tumors after various dose administration of Cycasin.

含まれてなくて、実際の抽出量が0.17%でしかありません。その一方で、我々のやるような動物実験では10g単位で薬剤を使用しますし、mg単位で充分実験できる化学分野の小林先生には申し訳なかったと思っています。第2グループは50mg/kg体重を12回、これは二週間に一回投与で総量は600mg/kg体重になります。最後のグループは、250mg/kg体重を生後ただ一回だけ投与しました。これ等はすべて経口投与でおこなった実験です。

SD系のラットにCycasinを投与した場合に、4 mg/kg体重をやりますとFig. 5 に菱形で示したように、雌ではすべて癌とはいえませんが乳腺腫瘍が好発してきます。それに遅れて腎腫瘍や、肝臓の腫瘍がわずかながらでてきます。

つまり、少量の連続投与では自然発生腫瘍を促進させ、その頻度をあげてやるというのが、他の投与方法との相違であります。それから、50mg/kg体重では三角印で示した消化管腫瘍が高い頻度で発生してきます。またそれと、同時に丸印の肝臓腫瘍も多くなります。250mg/kg体重を一回投与しますと消化管腫瘍もでてきますが、50mg/kg体重に比べると、すこし少くないです。それからこの250mg/kg体重群の丸印は肝臓の腫瘍を現わしていますが、これは悪性のものとは違って、嚢胞状(cyst)の病変がたいへん高い頻度で出てきます。

つぎの実験ではCycasinの毒性を体重変化で見ましたが、4 mg/kg体重の時はあまり影響はありませんが、250mg/kg体重になりますとこれは量的にたいへん多く、LD50つまりある投与量に対して半分の動物が死んでしまう中毒量が281mg/kg体重ですから、この量を投与しますと、ネズミはかなりの打撃を受けます。肝細胞はずいぶん破壊されますが、それで生き残ったネズミに特別な腫瘍の発生がみられるというわけです。それから50mg/kg体重を12回投与でやるのとは病変に違い

がみられます。

これらの結果から、この2つの中間で実験を行なったらどうだと言うので、10mg/kg体重、つまり100mgを1リットルの飲料水にとかした連日投与という実験に移ったわけです。

実験動物としては生後21日、21日とといいますとこれは離乳直後を、50日ですとだいたい繁殖可能な時期に入ってきた成熟ネズミとなります。こういう年齢差を含めて10mg/kg体重の実験をおこないました (Table 5)。

AGE (DAYS)	SEX	EFFECTIVE NUMBER	HEPATOMA			LATENT PERIOD ^{a)} (RANGE), DAYS	METASTATIC LUNG CANCER	OTHER TUMORS
			NUMBER of RATS	%				
21	F	17	14	82.4	335.9 ± 86.5 (167-487)	5 ^{b)}	CHOLANGIOADENOMA 1 KIDNEY CANCER 3 NEPHROBLASTOMA 5 INTESTINAL TUMOR 1	
	M	16	14	87.5	310.1 ± 56.7 (203-438)	4 ^{b)}	CHOLANGIOADENOMA 1 KIDNEY CANCER 2 NEPHROBLASTOMA 3 INTESTINAL TUMOR 1 LUNG ADENOMA 1	
50	F	20	18	90.0	410.2 ± 78.5 (251-556)	6	CHOLANGIOADENOMA 2 KIDNEY CANCER 3 INTESTINAL TUMOR 1 MALIGNANT L.Y. ^{c)} 1 EAR DUCT CANCER 1	
	M	20	18	90.0	412.3 ± 82.0 (280-556)	7	CHOLANGIOADENOMA 1 NEPHROBLASTOMA 1	

^{a)} Mean ± Standard Deviation of the Mean

^{b)} Disseminated Abdominal Cancer with Lung Metastasis in One Case

^{c)} MALIGNANT LYMPHOMA OF THYMUS

Table 5 Hepatoma induced by Cycasin in different age of rats .

結果は、肝臓の腫瘍が非常に高率に発生しました。その肝臓腫瘍の組織分類の問題に関してですが、たとえば、肝細胞からでてくる肝細胞癌と、それから非上皮性の成分から発生する肉腫の系統があります。それらの鑑別には指標酵素による細胞の同定も必要となってきます。今回の肝腫瘍は肝細胞癌で一括されているStewart & Snellの分類に従いました¹⁸⁾。

実験の結果なのですが、生後21日群雌ですと17例中14例 (82.4%)、日数は167~487日のあいだに、その肝臓の癌が発生しました。そして平均値とStandard deviationが示してあります。雄の場合には16例中14例 (87.5%)、日数は203~438日間で、この21日群と50日群とで、平均腫瘍発生日数を比較してみますと、幼若群の方が少し早いようです。やはり、年をとった方がすこし時間的に遅れてくる傾向がありました。

それから肝細胞癌の、肺転移も多く雌、雄では21日群の5例と4例、50日群では6例と7例でした。この幼若群のうちの雄、雌の各1例については、これは腹腔内への播種性、ちょうど癌細胞が

腹腔内に種を撒いたような状態でバラ撒かれて転移しました。つまり肝臓からこぼれた癌細胞が腹腔の中で増えてくるというわけです。

それから、残りの腫瘍としては、腎臓であるとかあるいは消化管であるとか、というようなものがありますけれども、ただこの中で同じ腎臓の腫瘍でも、人間の場合は、小児に発生する腎臓の悪性腫瘍（Nephroblastoma）と大人になって出てくる腎臓の悪性腫瘍（Kidney cancer）の二つの系統があります。この場合には、もちろんどちらの腫瘍もでてきますが、むしろ幼若群で実験した方は人の小児にでてくる型の悪性腫瘍です。

これは、前の表を各個体ごとに腫瘍発生日数で現わしたものです（Fig. 6）。

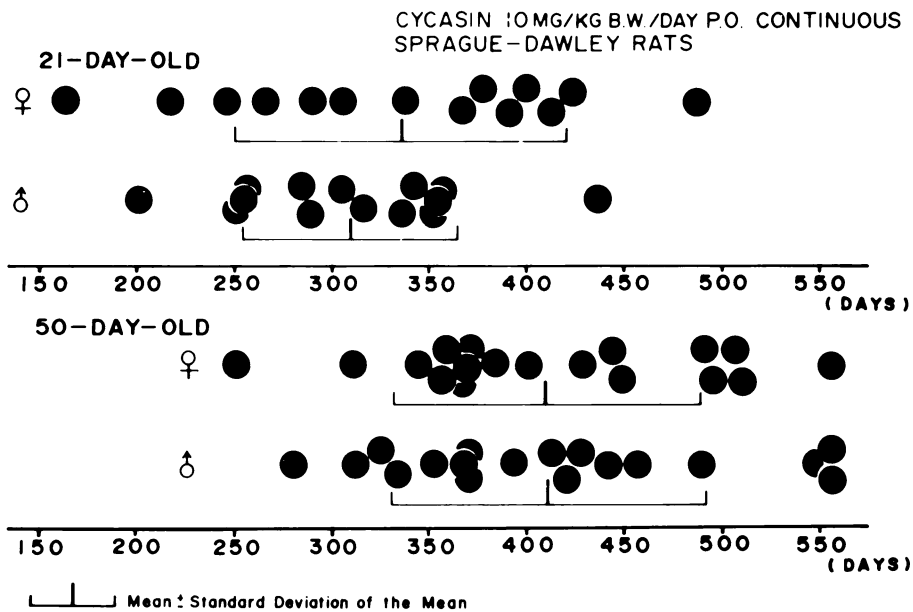


Fig. 6 Observed days of hepatoma induced by Cycasin.

ただここで、我々は癌が何日めにできたといいますが、これは決して正確な発生日があるわけではなくて、動物を殺した時点で見つかった、あるいは動物が死んだ時点で見つかったというのが、あくまでもその癌の発生した日数としてあります。

そして最後の実験日がきれいにそろっておりますけれども、これはすでに高頻度の実験目的も達せられたからということで、556日でこの実験は終了にしました。表の上と下を見ていただくとおわかりのように、若い群ではすこし早く腫瘍ができていますが、このように、腫瘍発生頻度で21日と50日群ではそれほど差がありませんでした。

それから、頻度が同じなら期間的に短かくて実験が済むということで、こちらの50日群は今後必要ないように思います。

これからあと、いくつかの症例をお見せしたいと思います。

このように多くの場合肝臓は出血病変を伴ない、結節状の癌ができています (Fig.7)。

その組織像は、だいたい正常な肝細胞索の並びかたに似た、わりと細胞質のあかるい索状型の肝細胞癌でした (Fig. 8)。強拡大では正常に近い類洞構造をよく残している像がみられます。

電子顕微鏡写真では、細胞質内にはmitochondriaも多く、核は円形でその近くにGoldgi装置が見られます (Fig. 9)。

別な症例の組織像で基本的に索状型の癌ながら、場所によっては乳頭状となり、ひじょうに細い血管と間質とがあり一見すると大人の腎臓にできる癌、腎臓の腺癌に似た像もありました (Fig. 10)。さらにPAS陽性の粘液をもったいわゆる腸上皮化生の場所もありました (Fig.11)。その電子顕微鏡像でも胞体内に粘液物質がみられ、腺腔側にmicrovilliと、細胞と細胞の間には腸上皮化生細胞でありながら細胆管構造の存在やdesmosome結合を持っています。ですから、そのあたりは肝細胞としての性格を残しています (Fig.12)。

そしてこれは腫瘍細胞の特長ではないと言われていますが、おなじ症例の肝細胞のなかに、このような滑面小胞体が渦巻状になった、concentric wholeという、いわゆる中毒にみられる形態的変化がありました (Fig.13)。

それから別な症例では、大型の細胞質に核は小さく、N/C比 (核/細胞比) が少なく、むしろ悪性腫瘍の特徴的な変化とは逆のパターンをとっています (Fig.14)。腫瘍の細胞質は明るくPAS染色は陽性です。電顕で滑面小胞体が嚢胞状に拡張したものがたくさん見られます。

次に肉腫様の組織所見を示す症例でも肝細胞からの移行と、細胞形態はやはり肝細胞癌の像を呈しています。一部には間質の結合組織が増え、それから細胞が細長くなっています (Fig.15)。

しかしこの部も渡銀染色をしますと、あまり銀線維は多くありませんが、細胞群を胞巣状にとり囲みいわゆる癌としての特徴を持っています。この例の電顕写真では胆管の部分的拡張やdesmosome結合がみられ、腫瘍の細胞質にはmitochondriaが非常にたくさんあり、そのほかperoxisomeあるいはmicrobodyと呼ばれる肝細胞を特徴づける構造物が見られます (Fig.16)。

この癌では細胞が索状にならぶ構造はなく、腫瘍細胞のsheet状配列、いわゆる低分化型にちかく、細胞分裂像もみられます (Fig.17)。

これは別な例なのですが、このように癌細胞がまったく孤立性になり、このように大小不同があり多形性の腫瘍細胞よりなる低分化癌です。多核巨細胞も散見されます (Fig.18)。

低分化型の肝細胞癌で、細胞自身の大小不同と細胞間に血液がたくさん入ってきますので、腫瘍細胞は圧迫による壊死がおっている例です (Fig.19)。

これで他の場所を見ますと、残った正常な肝細胞を取り囲むように腫瘍細胞が見られますので、いわゆる血管内皮腫、あるいはKupffer細胞腫のような印象を受けます (Fig.20)。

そのほか肺への転移と出血病巣、大網では播種性の転移を見ました。

実験203日でみられた一例ですが、肝臓の表面はでこぼこの凹凸不整があり結節状の形態を示し、人間の例から申しますと肝硬変症のように見えます (Fig.21)。これの組織像ではたしかに結節形

成はありますが、その周囲に線維組織の増生はありませんでした。結節の周囲は胆管の増生した cholangioadenoma の形をとっていました。

これはほかの例ですが、人間の肝硬変に比較的ちかく、間質の結合組織の増生があって偽小葉をつくっています。こういう組織形態にまでなれば、実験動物の肝硬変症と言って良いのだろうと思います (Fig.23)。

それから時々髓外造血、つまり肝臓で造血巣を見ることがあります。これは実験的肝癌でしばしばみられると言われています。

私の行ないました実験は、Cycasinによる肝臓癌の発生で、その投与方法であるとかあるいは投与期間それから投与量、そういうようなものの組み合わせによってたいへん高率に肝臓癌ができるという、これはあくまでも実験的なデータです。

ただ、人間でもけっしてその可能性がないとは言えません。ですから、Cycasinを食糧とする場合には充分にその処置をしてほしいということを、再度、結論に付け加えておきたいわけです。それから、この実験のためのCycasinの提供は小林先生の御好意によって受けたものでありますし、この実験はすべて私個人の仕事ではなく、現在愛媛大学医学部第一病理の福西教授、それから当時鹿大医学部第一病理におりました渡辺講師との共同実験でございます。



Fig. 7 Macroscopic figure of hepatoma.

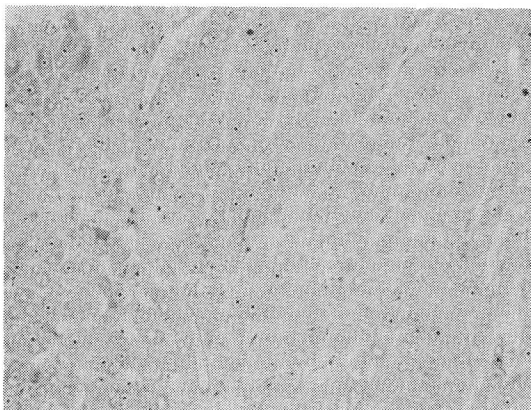


Fig. 8 Histology of well differentiated type of hepatoma (H&E x80).

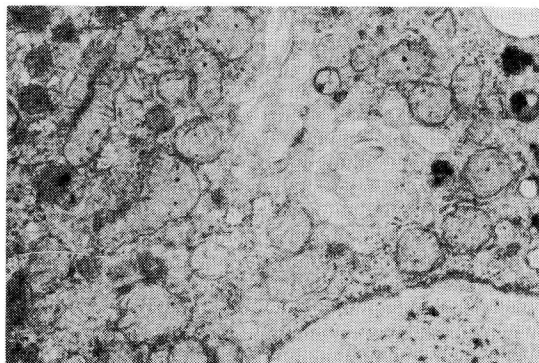


Fig. 9 Electronmicroscopic findings of well differentiated type of hepatoma. Abundant organelle including well developed Goldgi apparrates.

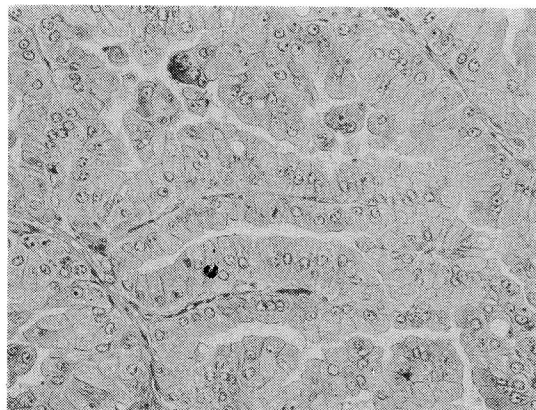


Fig. 10 Histology of adenomatous pattern of hepatoma (H&E x80).



Fig. 11 Intestinal metaplasia of hepatoma cell (H&E x80).

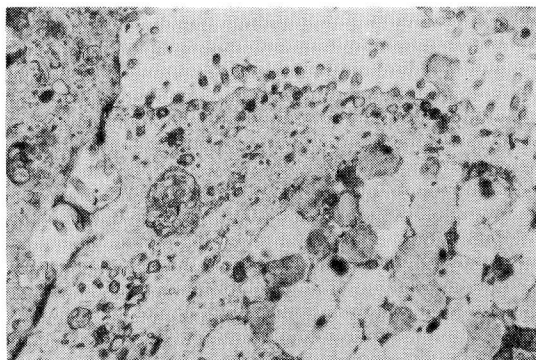


Fig. 12 Electronmicroscopic figure of intestinal metaplasia of hepatoma cell. Microvilli in the lumen, bile ductless with tight junction adjusted hepatoma cell and mucous production.

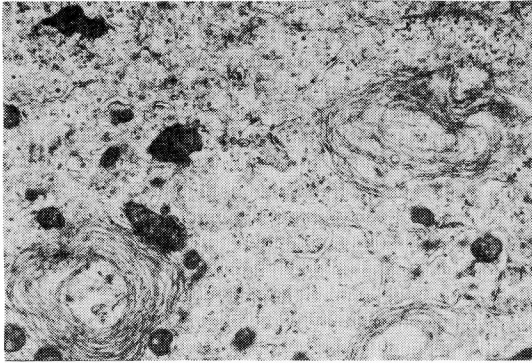


Fig. 13 Concentric whorl indicative toxic changes.

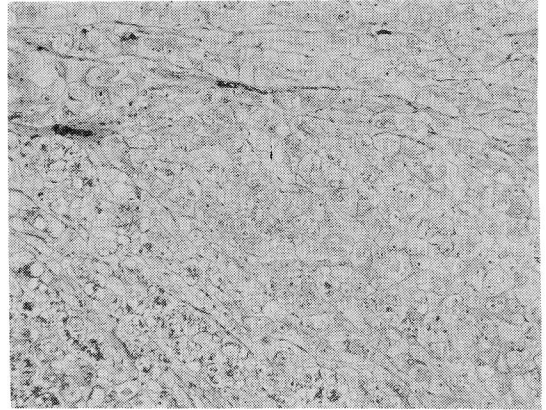


Fig. 14 Large tumor cell with clear cytoplasm and small nucleus containing PAS positive granules (H&E x100).

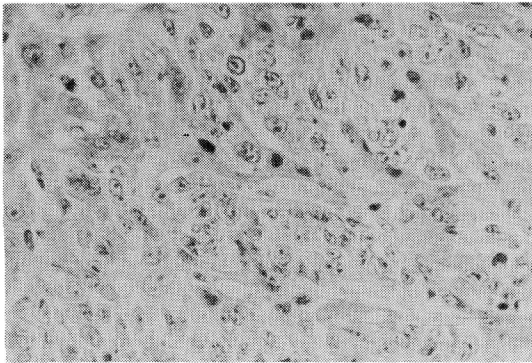


Fig. 15 Hepatocellular carcinoma with carcinomatous pattern (H&E x200).

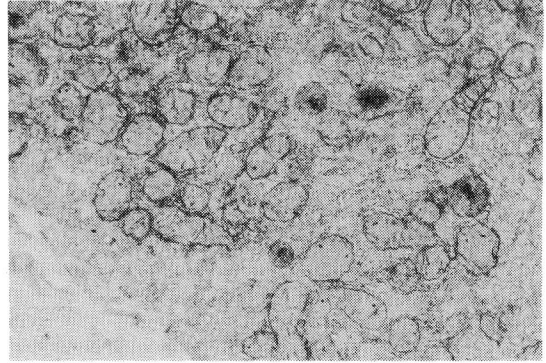


Fig. 16 Electronmicroscopic findings of sarcomatous cell with abundant mitochondria and peroxisomes.

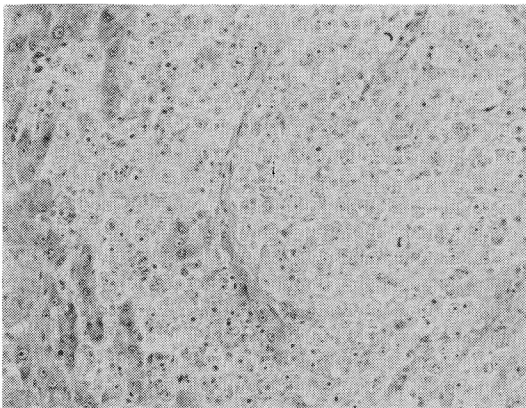


Fig. 17 Poorly differentiated type of hepatoma (H&E x80).

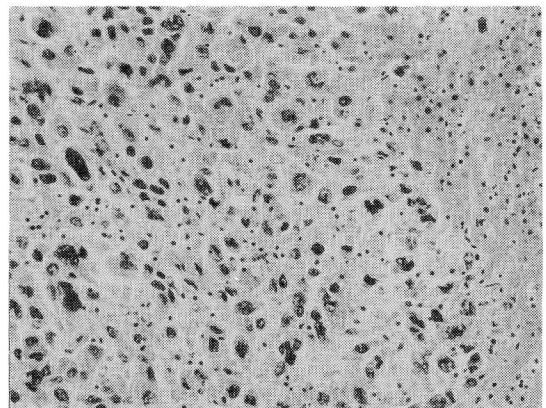


Fig. 18 Other case of poorly differentiated type of hepatoma. Multinucleic giant cell (H&E x200).

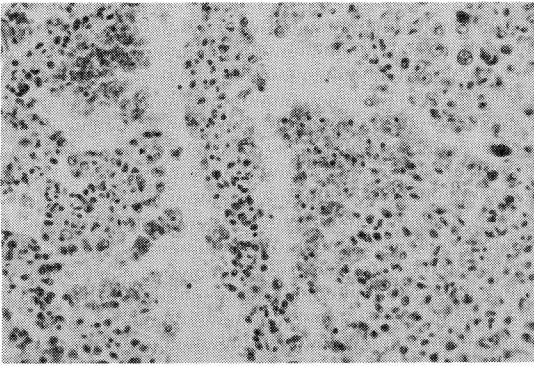


Fig. 19 Rare case of poorly differentiated type of hepatoma (H&E x100).

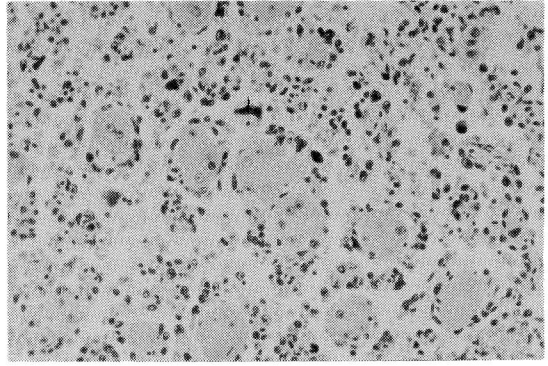


Fig. 20 Tumor cell nest and hemorrhage (H&E x100).

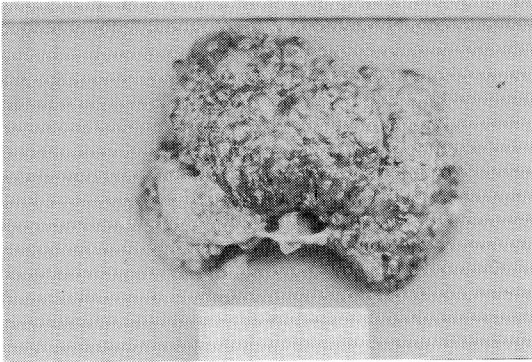


Fig. 21 Granularity of liver surface.

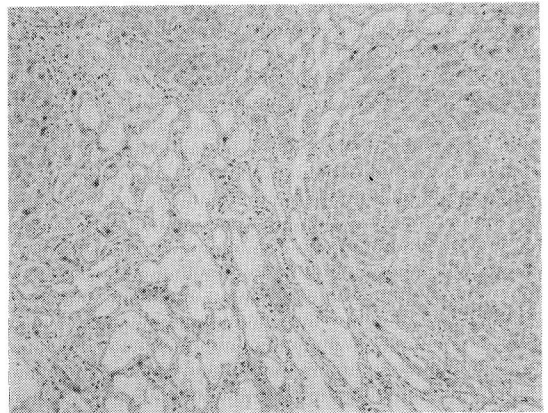


Fig. 22 Microscopic findings of the same case of Fig.21. Adenoma of bile duct and no liver cirrhotic changes (H&E x100).

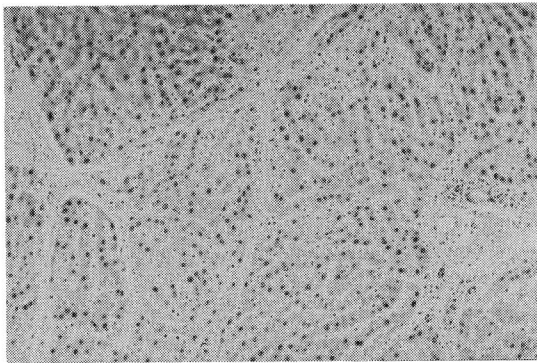


Fig. 23 Microscopical findings of liver cirrhosis. Only one case of fibrosis and pseudolobular formation in this experiment (H&E x100).

参 考 文 献

- 1) 小林 昭, 遠矢光孝, 福西 亮, 吉田愛知: ソテツ味噌の安全性について, 有毒成分の化学的検索と長期動物試験。栄養と食糧 27, 263-268, 1974.
- 2) Nishida, K., Kobayashi, A. and Nagahama, T.: Studies on Cycasin, a New Toxic Glucoside, of Cycas revoluta Thunb. I. Isolation and the Structure of Cycasin. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* 19, 77-84, 1955.
- 3) 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.
- 4) Kobayashi, A. and Matsumoto, H.: Chemistry of Cycads: Methylazoxymethanol, the Aglycone of Cycasin. *Fed. Proc.* 23, 1354, 1964.
- 5) Kobayashi, A. and Matsumoto, H.: Studies on Methylazoxymethanol, the Aglycone of Cycasin. Isolation, Biological, and Chemical Properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 110, 373-380, 1965.
- 6) 小林 昭 (研究代表者): 放牧牛のソテツ中毒に関する生物化学・病理学的研究。昭和56・57年度文部省科研費研究成果報告書 1-37, 1983.
- 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, Suppl.* 3, 229-232, 1983.
- 8) Powell, K. C. and McGovern, V.: Hepatoma in Papua New Guinea. *P. N. G. Med. J.* 15, 250, 1972.
- 9) 照屋寛善: 宮古のソテツ中毒。沖繩タイムス (夕刊) 12月13~16日, 1956.
- 10) Hirono, I., Laqueur, G. L. and Spatz, M.: Tumor Induction in Fischer and Osborne-Mendel Rats by a Single Administration of Cycasin. *J. Nat. Cancer Inst.* 40, 1003-1010, 1968.
- 11) 永浜伴紀: ソテツ新配糖体Neocycasin類に関する研究。鹿大農学術報告 14, 1-50, 1964.
- 12) 小林 昭, 室園利明: Cycasinを大量に調製する試みについて。鹿大農学術報告 21, 129-134, 1971.
- 13) Laqueur, G. L. and Matsumoto, H.: Neoplasms in Female Fischer Rats Following Intraperitoneal Injection of Methylazoxymethanol. *J. Nat. Cancer Inst.* 37, 217-232, 1966.
- 14) Yoshii, H. and Watanabe, K.: Intestinal Tumorigenesis in Rats by Rectal Infusion of Cycad Extract after External Colostomy. *Acta Medica Univ.*

Kagoshima. 17, 31-35, 1975.

- 15) 広野 巖: Cycasin単独1回投与による発癌標的臓器とその種族差。日本臨牀 30, 927-930, 1972.
- 16) Sydnor, K. L., Butenandt, F. P. and Huggins, C.: Race-Strain Factor Related to Hydrocarbon-Induced Mammary Cancer in Rats. *J. Nat. Cancer Inst.* 29, 805-814, 1962.
- 17) George, E. J.: *Methodology in Mammalian Genetics*. p.104, Holden-Day Inc. San Francisco, 1963.
- 18) Stewart, H. C. and Snell, K. D.: The Histopathology of Experimental Tumors of the Liver of the Rats. In: *Physicopathology of Cancer* (ed. by Homburger, F.), p.p. 85-126, Hoeber-Harper, New York, 1959.

質 疑 応 答

司会 どうもありがとうございました。

最後に総合討論をしていただくことになっておりますが、一題終るごとに簡単なおことば、ご質問あるいはご意見の追加がございましたらお願いいたします。それから小林先生が今日はご都合で早く退席されますので、ただいまの小林先生と寺師先生、特に小林先生のご講演に対するご質問ございませんでしょうか。

申しおくれましたけれども、シンポジウムのすべては録音にとっておりますので、ご発言やご質問、ご意見なりはお名前と所属をおっしゃってからお願いいたします。

それでは、小林先生に対するご質問あるいはご意見はございませんでしょうか。

司会 さきに、私からお伺いしますが、小林先生はさきほどCH₃のラジカルのことをちょっとおっしゃいましたね。あれはCycasinが分解する過程で、そういうのが出来るということは他の癌原性物質と同じように意味があるでしょうか。

小林 メチル化をおこすという、あのジアゾメタンが強力な発癌剤ですが、あれと同じようなメカニズムが考えられているということで紹介したわけですが、ラジカルな作用のみで癌ができるというのは、こちらの教養部の物理の河野先生との共同研究でもしております。

司会 会場で何か小林先生に対してご質問あるいはご意見ございませんでしょうか。

もう一つの質問ですが、さきほどおっしゃいました、あの牛の場合はソテツの葉そのものを食べて起こるのですか。

小林 え、あの牛の場合の摂取は葉っぱそのものです。

司会 ソテツの実に関してはいかがですか。

小林 実の方は、先ほど実物をおまわりましたが、外側が非常にかたいカラで囲まれていて簡単

には食べないようです。

司会 毒性分としては、いかがなものでしょうか。やはり、Cycasinのほかに何かあるでしょうか。

小林 え、葉っぱの中に何かございます。私どもの部屋で葉っぱの中に、この配糖体で塩基性の低分子のものが毒性を持っているというのを、いま少し見つけかかっているのですけれども、一方では逆にもっと高分子のものが、そういう神経症状をおこす原因であろうということのアフリカの人がやっております。我々の実験では、かなり可能性がありそうだとところまでいっています。

司会 いかがでしょうか。小林先生は、ご都合で早く退席なさいますが、何かご質問あるいはご意見ございませんか。

司会 小林先生、ありがとうございました。それでは、次に寺師先生のお話に対するご質問をお願いいたします。

吉田 医学部の第一病理の吉田でございます。寺師先生のCycasinが肝臓毒で長期投与によると、肝臓癌が発生するといったことを明瞭に示していただき、非常に興味深くうかがったわけですが、二つほど教えていただきたいと思います。一つは人の肝臓癌の場合には、肝硬変をとともなうことが非常に多いわけでCycasinの場合にも、投与の方法あるいは、投与された量をいろいろ変えることによって、人と同じような形の肝硬変症、それに続いて肝臓癌といったような形を発生せしめることができるのかどうか一つ。もう一つはCycasin以外の化学発癌物質で、肝臓癌を作る場合にhyperplasiaから次に腺腫、さらに癌といった各段階を通るような形で癌化がおこり、形態学的にこの時点までは可逆的な変化であるといったような事実が他の化学発癌物質では示されておりますけれども、Cycasinでは、やはりそういった同じような発癌過程をとれるかどうかの2点について、お教えいただきたいと思います。

寺師 いちばん最初の肝硬変症から癌が実験的にできるかどうかという点ですが、Cycasinの50mg/kgの12回投与したものでは、初期において肉眼的に肝硬変症に似たの像が確かに出てきます。しかし、ネズミの場合のその病理組織像は人間の場合と違って間質の結合組織そのものは、それほど増えきません。それから本日最後にお見せしたような肝硬変症は1例しかありませんでした。ですからCycasinによる実験では、ご質問のように初期病変に肝硬変症を示し、次いで肝臓癌となる例はないと思います。それから、実験的にネズミに肝硬変症を作る薬剤は非常に少ないようです。

それから2番目のhyperplasiaからneoplastic noduleになって、さらに癌が発生するという点についてですが、たしかにネズミによるCycasinの投与実験の結節像をみていると、そういうhyperplasia、あるいは腺腫性の病変による結節形成があります。しかし、組織学的にneoplastic noduleと診断された結節でも、また正常にもどる例があるという論文もありますし、最近の分類ではhyperplastic noduleという名前は、neoplastic noduleの中に含めて、扱うことになっているようです。ですから、このneoplastic noduleとよばれる病変でも、長い経過を追っていると一部

はまたもとにもどる。その中のどれかが、癌になるというようなことで、このneoplastic noduleがすべてそういう癌になるというような一連の流れは一既にはいえないということです。

吉田 どうもありがとうございました。

河野 農学部の家畜病理をやっている河野でございますけれども、さきほどお示めしになりました肝臓の腫瘍でございますけれども、いろんな形の細胞が見えておりますけれども、いわゆる肝細胞を主体とするもの、あるいはいわゆるoval cellと申しますか、そういう形で化生をとりながら、腺腔を形成するというようなものはありますでしょうか。それと、いろんな種類の組織像を示していますけれども、主体はどういう腫瘍の形が多いのでございましょうか。

寺師 やはり、一番多いのがあの索状形で、その次はsheet状のものです。ごく低分化型のものは非常にすくないです。腺癌の形をとったのはこの実験群では2例でした。しかも、あの腸上皮化生までなるようなものは、わずか1例でした。

次にoval cellの出現については、私たちの実験ではありませんでした。

司会 よろしゅうございますか。

他にご質問、ご意見ございませんでしょうか。

それでは時間の関係もありますので、またご質問がございましたら、最後の総合討論の時に、お願いすることにいたします。

ありがとうございました。

Hepatic Cancer of Rats Induced by Cycasin

Akira KOBAYASHI, Dr*

and

Shin-ichi TERASHI, M. D.**

* Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kagoshima University, Kagoshima 890.

* * Kagoshima University Research Center for the South Pacific,
Kagoshima University, Kagoshima 890.

Abstract

Although the seeds of cycad plants have been used as a food in southern areas in Japan, people have known that it was toxic without adequate removal of the toxin. The toxin in Japanese *Cycas revoluta* Thunb. was isolated and the structure of the toxin was elucidated as Cycasin, methylazoxymethyl- β -D-glucoside, by Nishida, Kobayashi and Nagahama in 1955²⁾.

Laqueur et al. (1963) found that the cycad seeds in Guam had carcinogenic actions in experimental animals through his studies about presumed relationship between ingestion of cycad seeds and neurogenic disorders in men and cattle.

The results of many studies indicated that the toxicity and the carcinogenicity of Cycasin were revealed after the enzymatic hydrolysis of Cycasin to the aglycon (Methylazoxymethanol) and that this conversion was brought about in vivo by the action of β -glucosidase, most likely of intestinal bacterial origin.

Studies about carcinogenic action of Cycasin and morphological studies on hepatic cancer were carried out in two age-groups of Sprague-Dawley strain rats induced given 10mg/kg body weight of Cycasin in drinking water through experimental periods.

Fourteen cases each of hepatic cancer were observed in both sexes (17 females and 16 males) in 21-day-old group of animals between 167 and 487 experimental days in female rats, and between 203 and 438 in male rats. In 50-day-old (20 rats each in both sexes), 18 each of hepatic cancer were observed between 251 and 556 in female rats, and between 280 and 556 in male rats.

Macroscopic findings of hepatic tumors were graysh-white nodules with focal hemorrhagic lesions. Macroscopically, most of hepatoma were composed of well differen-

tiated type of hepatocellular carcinoma with trabecular pattern of the tumor cells. And clear cell type of adenocarcinoma, intestinal metalasia type of cancer and pleomorphic cell carcinoma were also observed, but these types of cancer were rare cases. Some cases had sarcomatous pattern of tumor growth. Only one case had liver cirrhotic changes with well differentiated type of hepatoma.

Electronmicroscopic findings of tumor cell, such as peroxsomes, tight junctions and bile ductlesses between the tumor cells, suggested that most of the tumor were hepatic cell origin.