

ソテツを用いた食品等に残存する Cycasin の分析*

小林 昭・山内広世・室園利明

(生物化学及び栄養化学研究室)

(1973年8月31日受理)

Analysis of the Residual Cycasin in Food and Other Materials Using Cycad

Akira KOBAYASHI, Hirose YAMAUCHI, and Toshiaki MUROZONO

(Laboratory of Biochemistry and Nutritional Chemistry)

ソテツは、わが国では奄美諸島や沖縄地方に自生し、古来救荒食糧として、また味噌原料として利用されてきた²⁾。現在では食糧としての意義は殆んどなく、ソテツ味噌を自家製造することも少なくなっているが、地方ではなお慣習を守る家庭が残っている。一方ソテツが有毒成分を含み、食用に供するに先立ってこれを除去すべきことも、古くからよく知られている。注意深く調製されたソテツ味噌が無毒で安全であることは、既に1940年西田³⁾が、毒成分に由来するホルムアルデヒドの分析と、動物試験の結果とからこれを証明している。

ソテツの有毒成分については、1955年西田ら⁴⁾が当研究室ではじめてそれを単離証明し cycasin と命名した。その後の病理学的研究で、ソテツ種子⁵⁾ないし cycasin⁶⁾ がラットに発ガン性を示すことが明らかにされ、最近では奄美地方でもソテツの利用に不安感もたれている。このような事情にかんがみ、ソテツを用いた食品等について、cycasin をより鋭敏で特異的な方法によって分析し、その存否を再検討することが必要であると考えた。

cycasin は既に報告したとおり⁷⁾、ペーパークロマトグラフィのち比色によって、あるいはポーラログラフィによって定量できる。WELLS ら⁸⁾は、ガスクロマトグラフィによる cycasin の微量定量法を確立した。ここではポーラログラフィ及びガスクロマトグラフィを天然試料に応用するための手順を設定し、奄美大島において蒐集した味噌5点などのソテツ製品について、分析することを目的とした。

実験材料及び方法

試料

分析に供した試料は、主として1971年1月奄美大島に現地調査し蒐集したものである。

(1) ソテツ種子 わが国に自生するソテツは、*Cycas revoluta* THUNB. 一種のみであるが、笠利町で採集したその新鮮種子を試料とし、分析方法の標準化をはかった。

(2) 風乾ソテツ種子 種子を2つ割りにし、仁(胚乳部)を水洗風乾したもので、断面に多少カビを生じている。これを粉碎して味噌原料とするものである。名瀬市芦花部で入手した。

(3) ソテツ味噌 原料の配合割合と熟成期間を異にする5点の自家製味噌を入手した。その製造の概要は次のとおりであった。風乾ソテツ種子の粉末とコメまたはムギでコウジを製する。この際タネコウジは使用せず、蒸煮材料に自然にカビを生ぜしめている。これに煮熟ダイズ、場合によってはカンショをも加え、食塩を混じて仕込み熟成する。製品は外観風味とも良好である。原料の配合比率は家庭によって一定しないが、原料中に占めるソテツの割り合いは、大約1/4ないし1/3容量である。

供試試料の熟成期間と入手場所は次のとおりである。a) 20日間 瀬戸内町 b) 1ヵ月 笠利町 c) 2ヵ月 名瀬市芦花部 d) 1.5年 瀬戸内町 e) 不明 名瀬市内。なおこれらの他に比較対照用として、ソテツを原料に用いていない試料についてもあわせて分析した。すなわち試料 f) で、Y社製家庭用味噌の市販品を鹿児島市内にて購入した。

(4) ソテツでんぶん ソテツ茎幹から製し、丸い小餅状に固められたもので灰白色である。これを加えた

* 本報文の要旨は、第6回国際ソテツ会議(1971年4月ソカゴ)において講演した¹⁾。

コマがゆと共に、名瀬市内の民俗研究家から提供を受けた。

(5) 玩具 ソテツの新鮮種子、または煮沸した種子の仁を用いて作製した装飾品である。名瀬市内及び鹿児島市内で入手した。

分 析

新鮮試料は酵素による cycasin の加水分解を防ぐため、抽出に先立ち 120°C に 20 分間オートクレーブして、酵素を失活せしめた。試料は 50% エタノールと共にホモゲナイズし、遠心分離、ろ過し、抽出液を定容とした。抽出液の適当量についてそれぞれの方法で分析した。

ポーラログラフイは、既報⁷⁾ のとおり pH 1 及び 7 において行なった。

ガスクロマトグラフイのためには、抽出液を次のように処理して⁹⁾、トリメチルシリル誘導体を調製した。抽出液の一定量 1~2ml を減圧下に蒸発し、さらに脱水を確実にするため、メチレンクロリドを加え蒸発乾燥することをくりかえした。これに内部標準としてのアンドロステロン⁹⁾ 2.5mg の、ピリジン溶液 0.5ml を加えた。さらに 0.1ml の N,O-ビス(トリメチルシリル)-アセトアミド、0.025ml のトリメチルクロロシランを加え、強く振とうしたのち室温に 5 分間放置し、要すれば加温して溶解した。このようにして調製したトリメチルシリル誘導体の溶液 1~2 μl を、直接装置に注入した。装置は柳本製 G 8 型ガスクロマトグラフ水素炎検出器付で、3% SE-52 クロモソルブ W を充填した、3mm \times 150cm のステンレススチールカラムをジュールで用いた。カラム温度は $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で $130^{\circ}\sim 240^{\circ}\text{C}$ の昇温とし、検出器温度 280°C 、注入器温度 300°C とした。キャリアーガスは窒素を用い流速 8ml/min とした。特に記した以外はすべてこの条件でおこなった。

分析用の試薬は市販の最純品を用い、溶媒は必要に応じ再蒸溜して使用に供した。

実 験 結 果

標品及びソテツ種子

cycasin ならびに、ソテツ種子に見いだされる主要な遊離糖の標品につき、実験方法の部に示したガスクロマトグラフイの条件で、各成分のピークをよく分離することができた。定量のためにはクロマトグラム上のピークの面積を半値幅法で求めた。内部標準アンドロステロンに対する面積比と重量比との関係から、各標品の検量線を求めた結果、Fig. 1 に示したように良

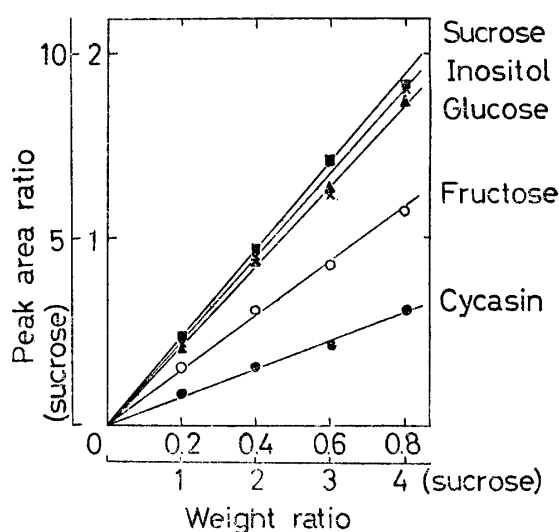


Fig. 1 Calibration curves for gas chromatography of cycasin and sugars.

The peak area ratio of the specimens to the inner standard, 2.5 mg of androsterone, was plotted against the weight ratio.

好な直線関係がえられた。シュクロースはソテツ種子中の含量が高いので、高濃度範囲すなわちアンドロステロン 2.5mg に対し 10.0mg まで、その他の糖及び cycasin については、2.0mg までの範囲で検討した。

ソテツ種子抽出液についてえたクロマトグラムの一

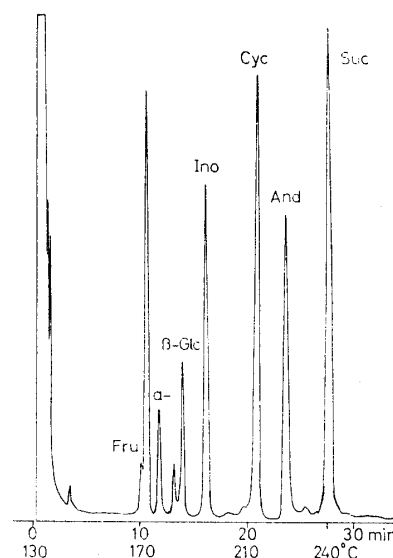


Fig. 2. Gas chromatogram of trimethylsilyl derivatives of the components found in cycad seeds.

Column: 3% SE-52 Chromosorb W, 3 \times 1500 mm stainless steel, dual. Column temp.: $130^{\circ}\sim 240^{\circ}\text{C}$, programmed by $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Injector: 300°C . Hydrogen flame detector: 280°C . Carrier gas: nitrogen, 8.0ml/min.

Table 1. Analysis of cycasin and sugars in the cycad seeds and recovery work

Component	Content*	Recovery**
Fructose	0.12%	101.5%
Glucose	0.12	94.7
Inositol	0.13	102.8
Cycasin	0.88	101.0
Sucrose	1.55	103.4

* Content is in fresh kernels of the seeds collected on Amami-Oshima, Jan. 1971.

** Known amount of each specimens was added to the extract of the kernels and analyzed again.

例を Fig. 2 に, またその定量値は, Table 1 に示した. さらにこの抽出液に既知量の各標品を加え回収試験を行なった結果, Table 1 に示す如く良い回収率を示した. ソテツ種子中の cycasin 含量の値として, ここでは既報⁷⁾のものよりかなり高い値をえた. これは分析方法の違いによるものではなく, 抽出に先立って行なった酵素の不活性化処理の差であり, 今回の方がより完全であったからであると考えられた.

ソテツ種子中には, cycasin と同一のアグリコンをもち, 糖成分を異にするアゾキシ配糖体群, すなわち macrozamin, neocycasin A~G¹⁰⁾の存在が知られている. cycasin のポーラログラムは, アグリコンのアゾキシ基にもとづくもので, macrozamin¹¹⁾及び neocycasin A のそれは, 半波電位, 限界電流値とも cycasin と極めてよく類似している. 従ってこれらが共存する場合には, ポーラログラムはひとつの波となり, その分析値は総アゾキシ配糖体量を示すものとなる. 一方ガスクロマトグラフィでは cycasin のみの値を分析するので, ソテツ種子について両者の方法による定量値が一致しなかったのはこのためであろう.

macrozamin 及び neocycasin A は, いずれもガスクロマトグラム上で, Fig. 3 に示したような, 数コの連続した小ピーク群を与え, その第1(主)ピークの保持時間はシュクロースのそれと一致した. しかもこれらのピークは試料調製後の時間と共に形が変わってくるので, これらのオリゴ糖配糖体の分析には直ちに適用し難く一層の検討が必要であった. しかしながら, ソテツ種子中のシュクロースの分析について考えるならば, これらの配糖体の影響は次の理由から実際上殆んどないであろう. すなわち上に示した主ピークの感度は低く, 同一重量で内部標準の1/8, シュクロ

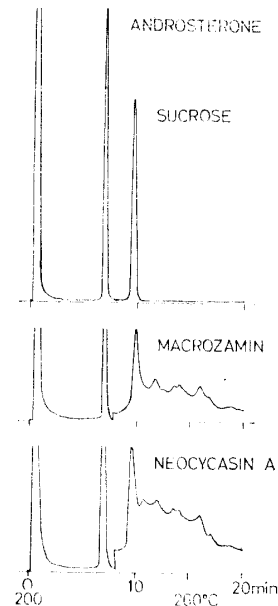


Fig. 3. Gas chromatograms of trimethylsilyl derivatives of sucrose, macrozamin, and neocycasin A.

The same amount of specimens were run for the analysis.

Attenuation: androsterone 1/8, sucrose 1/16, macrozamin 1/1, neocycasin A 1/1. Column temp.: 200°-260°C, programmed by 4°C/min.

ースの1/16程度である. また永浜の分析¹⁰⁾によれば, *Cycas revoluta* THUNB. では, macrozamin は殆んど見出しされない. neocycasin A もまた, その含量は低く cycasin に対して約1:0.07以下であり, 多量に存在するシュクロースに対しては1:0.01以下であるとみなされるのである. その他の neocycasin 類はさらに微量に存在するのみである.

ソテツ味噌

ペーパークロマトグラフィによる定性試験では, 試料の抽出液はいずれのものも, 硝酸銀による発色で cycasin の *R_f* に一致するスポットを示し, cycasin が残存するかのようにみえた. しかしながらこのスポットは, ソテツを用いていない対照試料 f) についても, 同様に検出されたのであり, またレゾルシン-塩酸による cycasin 特有の黄色の発色はみられなかったことから, cycasin のものであるとは考え難い.

ポーラログラフによる検索では, 試料 c) を除きいずれの抽出液もポーラログラム波を示さなかった. 試料 c) で観察されたものは, *pH* 1にて半波電位 -0.96 V で, cycasin よりはるかに陰電位側にあらわれ, cycasin のものではない. このことをさらに確認するため, 試料を希アルカリで処理しポーラログ

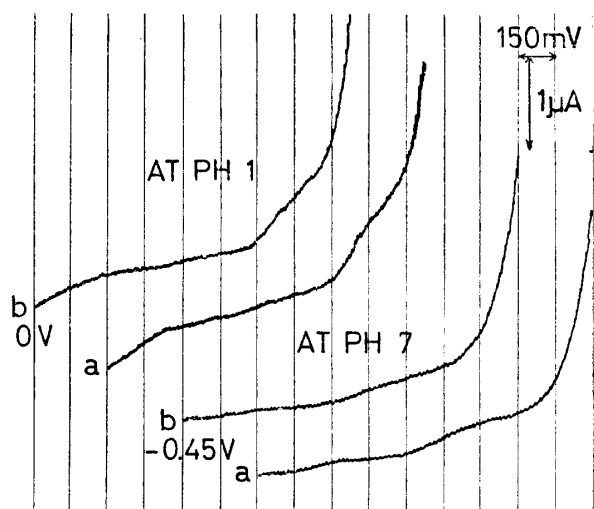


Fig. 4. Comparison of polarograms of bean paste c) before and after alkali-treatment.

b : before, a : after alkali-treatment

ラムが変化するか否かを検討した。cycasin はアルカリに不安定で室温でも容易に分解するので、アルカリ処理した cycasin のポーログラムは処理しないもののそれとは相違する。pH1で観察すれば、もとと比較して陰電位側に移動した小さい波高のものとなり、pH7では無視しうる程小となる。試料c)の抽出液は、アルカリ処理したのち pH1及び7のいずれにおいても、もとと全く同一のポーログラムを与えた。これは Fig.4に示したとおりである。

ガスクロマトグラフィでは、a)以外の試料すべてについて、cycasinによるものと同一の保持時間を示すピークが観察された。その一例を Fig.5に示した。このピークは対照試料f)についても見い出され、またアルカリ処理した試料抽出液の分析でも同様に検出されたことから、cycasinによるものではない。この未知物質によるピークと cycasin によるものとは、SE-52カラムでは分離できなかったが、OV-1カラムを用い190°C恒温での分析では、Fig.6に示す如く分離しえて両者が同一のものではないことを明らかにした。

試料b)については、新鮮ソテツ種子の仁を直ちに蒸煮し乾燥粉碎したものをを用いており、このような操作では材料中に cycasin が残存するものと懸念された。しかしながら製品の味噌にはいずれの方法でも cycasin は検出されなかった。製コウジの段階で分解されたものであろう。

風乾ソテツ種子

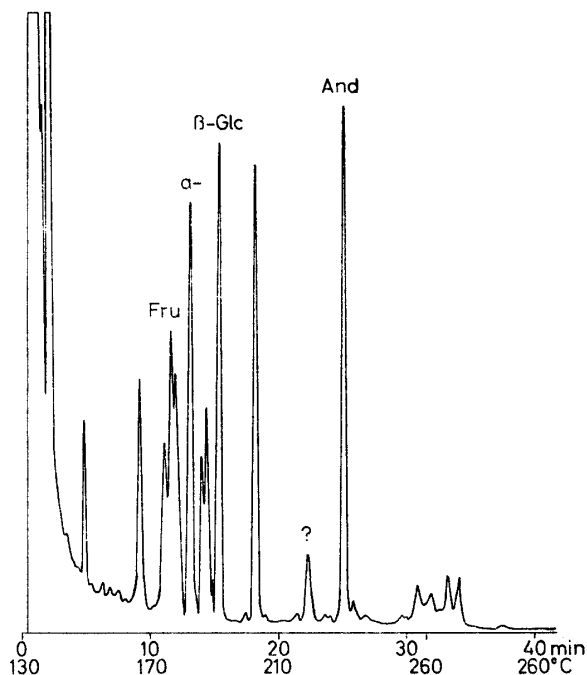


Fig. 5. Gas chromatogram of trimethylsilyl derivative of the components of bean paste d).

Question mark : peak of the same retention time as that corresponding to trimethylsilyl cycasin.

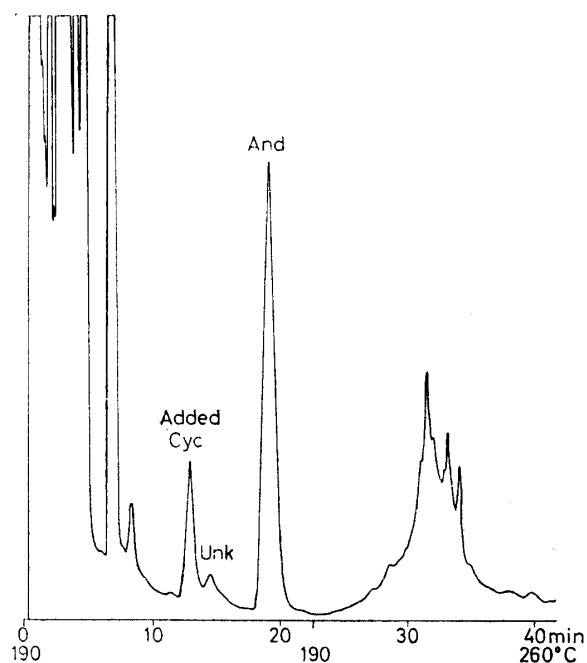


Fig. 6. Proof for the unidentified peak not due to cycasin.

The peak due to the added cycasin separated from that of unknown component. Column : 3 % OV-1 Chromosorb W. Column temp. : shown in the abscissa.

ガスクロマトグラムには、cycasin と紛らわしいピークは検出されなかった。ポーラログラフイでは顕著な波を示したが、その半波電位は $pH 1$ において $-0.80 V$ と高陰電位であり、また抽出液のアルカリ処理によっても cycasin の波とは異なるものであることを明らかにした。

ソテツでんぶん

でんぶん及びこれを加えたかゆには殆んど抽出物はなく、いずれの分析法によっても cycasin を全く含まないことを示した。

玩 具

ソテツ玩具はもちろん食品ではないが、ソテツの毒性を知らない者、とくに幼児がこれをもてあそぶことを考えねばならない。分析した3種類のものうち、ひとつは種子から仁をとり出し、熱湯中で加熱固化したのち加工したものである。当然 cycasin が残存し、ポーラログラフイで 0.37% 、ガスクロマトグラフイで 0.21% の値をえた。このものは幸い試作品にとどまり市販されてはいないが、このような加工法は危険であり行なわれるべきではない。他の2種類の市販品は新鮮種子を材料としており、製作直後のものでは種子と同程度の cycasin が検出された。これらの製品は加工の際多少とも切削穿孔して仁を傷つけるので、微生物が侵入する。またソテツ種子自身のもつ β -グルコシダーゼが賦活され、cycasin の加水分解が始まる。製作後日数を経たものは、内部にカビを生じ、cycasin 及び糖は完全に分解消費されていた。またソテツ味噌 c) と同様なポーラログラムを示した試料もあったが、これもアルカリ処理の併用によって cycasin によるものでないことを確認した。

考 察

ここで述べたガスクロマトグラフイ及びポーラログラフイにおいて、実用上取扱いに容易な cycasin の分析範囲は両者とも $1\sim 2mg$ である。前者でピークを検出しようするためには、最小限度 cycasin として $0.1 \mu g$ を装置に注入すればよいが、実際の試料はトリメチルシリル誘導体を調製するために、この100倍程度は必要である。この方法では cycasin 以外の共存糖類をも、同時に分析できるのが大きな利点である。後者の場合、cycasin のポーラログラフ波を検出できる下限濃度は、 $1 \times 10^{-5} M$ で、この濃度の電解液試料を $10ml$ 調製するとすれば、必要な cycasin 量は $25.2 \mu g$ である。この分析法では上記のような揮発性誘導体とする必要はなく、抽出液をそのまま分析に供しえ

て迅速簡便であるが、cycasin 同族体の分別あるいは共存糖類の分析はできない。

これらいずれの方法においても、あるいはペーパークロマトグラフイをも含めて、天然試料とくに微生物の関与したソテツ製品の分析に応用する場合には、cycasin と類似の挙動を示す未知物質が存在するので、結果の解析は注意深く行なわなければならない。ピークの保持時間値やスポットの Rf 値のみをもつて同定することはできない。このような場合、アルカリに不安定な cycasin の特異性を利用し、試料をアルカリ処理した前後の挙動を比較して確認することが有効な手段である。

ソテツを用いた食品の試料すべてについて、cycasin は残存していないことが明らかとなった。加工に際してソテツ種子中の cycasin は、水洗によって除去される。また種子自身あるいは微生物のもつ酵素によって加水分解され、遊離したアグリコンはさらに分解されるものと考えられる。

ソテツのでんぶんを日常の食料とすることは、現在ではないといってよい。ここで分析に供したでんぶんは、民俗資料として慣習を伝承している特例である。最近の実例として、1972年2月グアム島で救出された元日本兵はソテツを常食としたと報道された。その後の臨床経過と栄養学的考察に関して医学会での発表があり、ソテツについては、注意深く水に浸漬洗滌して除毒したものを、パンノキの実やイモのでんぶんと混じり少量ずつ摂取したもので、量的な関係は明らかでないということである¹²⁾。いずれも cycasin との関連を考慮する必要はないであろう。

ソテツ味噌の試料にはいずれも cycasin は検出されない。ただこれら自家製の味噌は自然のカビつけによって製コウジしており、最近注目されているカビ毒の如き別の見地から、その安全性を再検討することも必要である。衛生管理の完備した工場で生産された市販品を容易に入手しうるならば、ソテツを用いる自家製造はできるだけ廃止すべきであろう*。

ソテツの毒性について、奄美や沖縄地方ではよく言い伝えられているが、最近ではその利用度が減少して中毒例も殆んどない**ので、その毒性を軽視する傾

* 以前、名瀬市内でソテツ味噌を製造販売する業者があったが²⁾、現在は操業していない。島内での市販品は本土で製造、輸送されるもので、供給は充分なようである。

** 1956年11月宮古島において台風被害による食糧不足からソテツの茎幹を食し、一家の5名が中毒死し1名が重体となった。

向もないではない。しかしながらソテツの取扱いは慎重であるべきで、不注意や無知による事故があってはならない。ソテツを用いた玩具に cycasin を検出したものがあつたが、これらが旅行者によって、ソテツの毒性の知られていない他府県へ持ち帰られるものであるだけに、注意を要することである。

ソテツの研究に從來から多大の理解を示され、今回の現地調査に際してもご援助頂いた名瀬市の故窪田繁氏に、また各地で試料の提供や調査にご協力を頂いた方々に深く感謝する。

要 約

ソテツを用いた食品等に cycasin が残在するか否かを明らかにするため、奄美大島等で蒐集した試料を、ポーログラフイ及びガスクロマトグラフイで分析した。

1. cycasin 及びソテツ種子に見い出される遊離糖の標品について、トリメチルシリル誘導体に変換しガスクロマトグラフイで定性定量する条件を検討した。また天然試料の分析に応用するための手順を設定した。

2. ソテツを用いた食品、すなわち自家製のソテツ味噌5点、その原料とする風乾ソテツ種子、ならびにソテツでんぷんについて、いずれの試料にも cycasin は検出されなかった。

3. ソテツ種子を利用した玩具には、相当量の cycasin を検出したものがあつた。

4. 天然試料とくに微生物の関与したものでは、cycasin と類似の挙動を示すポーログラフ波、あるいはガスクロマトグラム上のピークがしばしば見られた。このような場合は、アルカリ処理によって cycasin を分解してこれを確認する方法が有効であつた。

文 献

- 1) KOBAYASHI, A. : *Fed. Proc.*, **31**, 1476 (1972).
- 2) 小林昭：南方産業科学研究所報告 **2**, 15 (1957).
- 3) 西田孝太郎：醸造学雑誌 **18**, 830 (1940).
- 4) NISHIDA, K., KOBAYASHI, A. and NAGAHAMA, T. : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 77 (1955).
- 5) LAQUEUR, G. L., MICKELSEN, O., WHITING, M. G. and KURLAND L. T. : *J. Nat. Cancer Inst.*, **31**, 919 (1963).
- 6) LAQUEUR, G. L. : *Fed. Proc.*, **23**, 1386 (1964).
- 7) NISHIDA, K., KOBAYASHI, A. and NAGAHAMA, T. : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 74, 122 (1956).
- 8) WELLS, W. W., YANG, M. G., BOLZER, W. and MICKELSEN, O. : *Anal. Biochem.*, **25**, 325 (1968).
- 9) 丸山実：最新医学 **23**, 1506 (1968).
- 10) 永浜伴紀：鹿大農学術報告 **14**, 1 (1964).
- 11) NISHIDA, K., KOBAYASHI, A., NAGAHAMA, T. and NAWATA, J. : *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **3**, 1 (1957).
- 12) 大蔵敏雄：国立病院・療養所総合医学会，1972年4月，名古屋（私信による）。

Summary

It was necessary to determine whether cycasin was still in existence or not in the food and other materials made from cycad. The samples secured on the island, Amami-Oshima, were examined for cycasin by means of polarography and gas chromatography.

1. Specimens of cycasin and sugars, such as found in the cycad seeds were converted into their trimethylsilyl derivatives for the qualitative and quantitative analyses by gas chromatography. A routine procedure to be applied to the natural materials was established.

2. The food materials examined were as follows ; five samples of home-prepared cycad bean paste "Sotetsu-Miso", air-dried cycad seeds used as the raw materials of bean paste, and crude starch obtained from the the trunks of cycad. All samples were demonstrated to be free from cycasin.

3. Some of the toy-dolls and ornaments made from cycad seeds showed occasionally a high content of cycasin.

4. In the case of natural materials, especially those in which microorganisms were involved, inconclusive polarograms or suspicious peaks on the gas chromatograms showing some behaviors resembling those of cycasin were observed frequently. It was effective, in these instances, to confirm the presence of cycasin by the treatment of the extracts of samples with alkali that destroys cycasin.