

一週間の予備飼育後、5週齢時より、3% MAM acetate 滅菌水溶液を、無菌マウス群では週1回、体重10g 当り0.3mg を計12回、通常マウス群では週1回、体重10g 当り0.3mg を計6回金属性胃ゾンデを用いて経口投与した。両群とも死亡時まで飼育し、死亡時に剖検を行い、大腸を10%ホルマリン液で環流固定した。

II. 実験2

実験動物は実中研より購入した30匹の4週齢 ICR 系雄性無菌マウスを1群10匹とし、無菌群、Lactobacillus arabinosus ATCC 8014 (以下 L. arabinosus と略す) を定着せしめた gnotobiotte A 群、マウス由来 E. coli (実中研分離株) を定着せしめた gnotobiotte B 群の計3群を設けた。gnotobiotte はチオグルコネートブイヨン培地で増菌させた L. arabinosus (1.3×10^9 /ml) とマウス由来 E. coli (1.8×10^8 /ml) をそれぞれ10匹ずつの4週齢 ICR 系雄性無菌マウスに単一定着させ作製した。無菌群、gnotobiotte A 群およびB群とも個々のビニールアイソレーター内で放射線滅菌飼料 CL-2 および滅菌水を自由摂取させた。5週齢時より2% MAM acetate 滅菌水溶液を各群とも週1回、体重10g 当り0.2mg を計12回金属性胃ゾンデを用いて経口投与した。動物は MAM acetate 投与開始後214日目に全例屠殺し、大腸を10%ホルマリン液で環流固定した。

病理学的検索は大腸を肉眼観察後、8ブロックに分け、パラフィン包埋し、4 μ m の厚さで連続切片を作製した。染色は一般染色として Hematoxyline-Eosine 染色、特殊染色として鍍銀染色、PAS 染色、アルシヤンブルー染色を施し、光学顕微鏡下で大腸腫瘍発生数および悪性度を観察した。

無菌試験は月に1回、糞便、床敷、ケージおよびアイソレーターにつき日本薬局方の無菌試験に順じて行った³⁾。また gnotobiotte の糞便の検索は月に1度、gnotobiotte A 群においては Tryptic soy agar (Difco 社製) および一般乳酸菌保存検出用培地 (ニッスイ製薬製) を用い、gnotobiotte B 群においては Tryptic soy agar

およびドリガルスキー改良培地 (栄研化学製) を用いて糞1g 当りのコロニー数を算出した。

III. L. arabinosus の MAM acetate を基質とする esterase活性の in vitro 検索

MAM acetate が L. arabinosus の酵素作用により直接脱アセチル化されるか否かを検索するため、in vitro で MAM acetate を基質とし、L. arabinosus の esterase 活性を測定した。

esterase 活性の測定は Zedeck らの方法で行った⁴⁾。4.8g L. arabinosus を154mM NaCl, 20mM triethanolamine buffer (pH. 7.8) に入れ全量16ml とした後、20KHz の Bronson Sonifier model 185を用いて20分間超音波処理し、L. arabinosus sonicate を作る。20mM triethanolamine (pH. 7.8), 154mM NaCl buffer 中に1.5g L. arabinosus sonicate と3mM MAM acetate を加え全量5ml とし、35°C で incubate し、0分、45分、3時間および4時間後発生する acetic acid を pH を測定することにより検出した。

標準曲線は1.5g L. arabinosus sonicate に0~70 μ mol の acetic acid を加え20mM triethanolamine (pH 7.8), 154mM NaCl で全量5ml とし pH を測定することによって作製した。

実験結果

I. 実験1

1. 無菌および通常マウスの大腸腫瘍発生数の比較

無菌および通常マウス群の腫瘍形成動物数、1匹当りの MAM acetate の平均総投与量、総腫瘍形成数および悪性腫瘍数を比較した (Table 1)。

無菌マウス群では MAM acetate の平均総投与量は10.03mg で、検索可能であった無菌マウス8匹中7匹の大腸に計90個の良性腫瘍を認めた。平均生存日数は121日 (108~140日) であった。通常マウス群では投与期間中に半数が死亡したため、その後生存した10匹について検索した。MAM acetate の平均総投与量は5.06mg で、腫瘍は10匹中6匹の大腸に計40個が認められた。そ

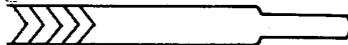
Table 1. Incidence of Tumors in both Germfree and Conventional ICR Mice treated with MAM Acetate

Group	Effective Number of Mice	Number of Mice with Tumor	Mean Total Dose (mg)	Total Number of Tumors	Mean Survival Days
Germfree :	8	7	10.03	90	121.0
Conventional :	10	6*(5)	5.06	40(27)	247.8

* () Number of mice with cancer.

() Total number of cancer.

Table 2. Incidence of Colonic Tumors in Both Germfree and Conventional ICR Mice Treated with MAM Acetate

effective animal No.	survival period (days)	survival period (days) 		
		1	8	4
Germfree				
G-1	108	1	8	4
G-2	108		4	
G-3	118		8	3
G-4	120		12	1
G-5	129		9	
G-6	132	2	12	12
G-7	140		14	
G-8	113			
total		3	67	20
Conventional				
C-1	134			
C-2	155	1	22(15)	
C-3	169			
C-4	205		3(3)	
C-5	242		1(1)	1(1)
C-6	274			
C-7	282		1	2
C-8	296			
C-9	310		5(5)	3(1)
C-10	411			1(1)
total		1	32(24)	7(3)

** () No. of cancer

のうち5匹に腺癌を認め、総数は27個であった。また1例には腸間膜リンパ節に転移を認めた。平均生存日数は247.8日(134~411日)であった。

腫瘍の局在は無菌マウス群では直腸部に20個、膨大部に67個、盲結腸口附近に3個の良性腫瘍が認められた。

通常マウス群では直腸部に7個の腫瘍を認め、うち3個が腺癌で、膨大部に32個の腫瘍を認め、うち24個が腺癌であった。また盲結腸口附近に1個の良性腫瘍を認めた。最初に腺癌を認めた動物の生存日数は155日であった (Table 2)。

2. 大腸腫瘍の病理学的所見

無菌マウス群に発生した腫瘍は直径が0.5mm~1.7mmの大きさで、主に灰白色を呈し、乳頭状、円盤状、広基性ないし有茎性ポリープ状のものが多かった。組織学的にはすべて良性腺腫であった (Fig. 1)。

通常マウス群に発生した腫瘍は直径2mm~9mmの大きさで、円盤状、乳頭状および有茎性ポリープ状のも

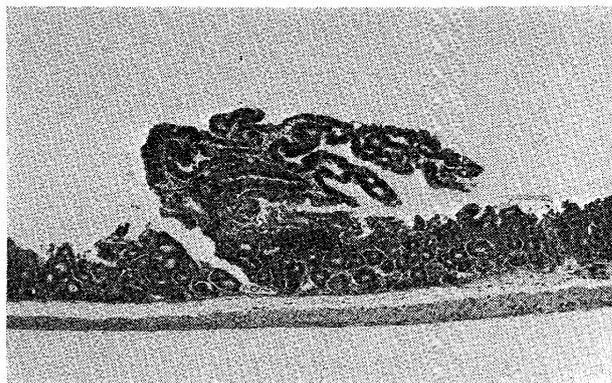


Fig. 1. Adenoma of the colon (germfree mouse) H.E. ×40

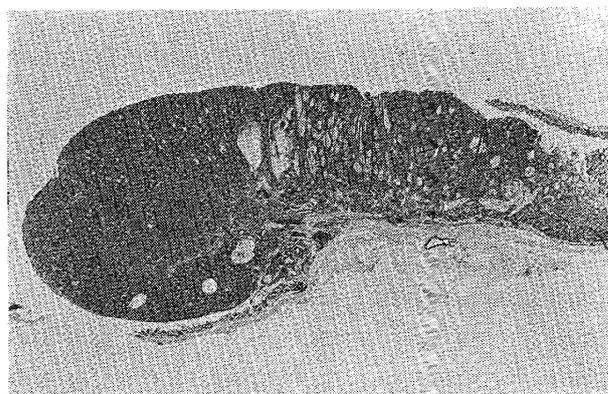


Fig. 2. Adenocarcinoma of the colon (conventional mouse) H.E. ×4.5



Fig. 3. Invasion of tumor cell into serosa of the colon (conventional mouse) H.E. ×40

のが多く、組織学的には腺腫および高分化型腺癌であった。腺腫は円柱状細胞が基底部に単層に配列して腺管を形成し、周囲正常組織との境界は明瞭であった。細胞質は好塩基性が強く、核は卵円形ないし長円形で大きく、かつ濃染し、軽度の異型性を示した。

腺癌は円柱形で濃染した核を有する細胞が腺管を形成し、中等度の構造異型を示している。そして粘膜筋板を

Table 3. Incidence of Tumors in both Germfree and Gnotobiotic ICR Mice treated with MAM Acetate

Group	Effective Number of Mice	Number of Mice with Tumor	Mean Total Dose (mg)	Total Number of Tumors
Germfree :	10	9	7.24	59
Gnotobiotic A :	10	10*(8)	8.24	209(51)
Gnotobiotic B :	10	10	8.49	46

: p.o., 0.2 mg/10 g body weight, once a week for 12 weeks.

* () Number of mice with cancer.

() Total number of cancer.

Gnotobiotic A: *Lactobacillus arabinosus*

Gnotobiotic B: *E. coli*

破壊して浸潤し、時に漿膜下にまで達する (Fig. 2, 3)。

II. 実験2

1. 無菌および gnotobiotic マウスの大腸腫瘍発生の比較

無菌および gnotobiotic マウス群の腫瘍形成動物数、1匹当りの MAM acetate の平均総投与量、総腫瘍形成数および悪性腫瘍数を比較した (Table 3)。

無菌マウス群では MAM acetate の平均総投与量は 7.24mg で、10匹中9匹に良性腫瘍が認められ、合計59個であった。

gnotobiotic A群 (*L. arabinosus*) では MAM acetate の平均総投与量は 8.24mg で、10匹中10匹に腫瘍が認められ、うち8匹に悪性腫瘍が認められた。腫瘍総数は 209 個であり、うち51個が悪性腫瘍であった。

gnotobiotic B群 (*E. coli*) では MAM acetate の平均総投与量は 8.49mg で、10匹中10匹に腫瘍が認められ、合計46個であった。悪性腫瘍は 1 例も認められなかった。

次に各群の腫瘍の局在を比較すると無菌群は直腸部に16個、膨大部に43個の腫瘍が認められ、悪性例は認められなかった。gnotobiotic A群 (*L. arabinosus*) は直腸部に86個の腫瘍がみられ、うち19個が悪性であり、膨大部に122個の腫瘍がみられ、うち32個が悪性であった。また盲結腸口附近に1個の良性腫瘍が認められた。gnotobiotic B群 (*E. coli*) は直腸部に29個、膨大部に17個の良性腫瘍が認められた (Table 4)。

2. 大腸腫瘍の病理学的所見

無菌マウス群の腫瘍は直径 0.5mm~2mm の大きさで実験1と同様に乳頭状、円盤状、ポリープ状のもので、組織学的にはすべて良性腺腫であった。

gnotobiotic A群 (*L. arabinosus*) に発生した腫瘍は直径が 3mm~8mm の大きさで、円盤状ないしポリープ状をなしていた。組織学的には腺腫および腺癌であっ

た。腺癌は主に高分化型腺癌であり、腫瘍細胞は円柱形、濃染核を有する細胞が多列に並び、腺管を形成し、中等度の異型を示し、細胞分裂も著明であった。腫瘍細胞は粘膜筋板を破壊し、粘膜下および筋層に達した。また浸潤癌細胞が一部粘液産生のある粘液細胞癌の像を示し、この様な例では浸潤は筋層を破壊し漿膜下および周囲脂肪組織にまでおよんでいた (Fig. 4, 5, 6, 7)。

gnotobiotic B群 (*E. coli*) に発生した腫瘍は直径が 0.5mm~2mm の大きさで、乳頭状、円盤状ないしポリープ状をなしていた。組織学的にはすべて良性腺腫であった (Fig. 8)。

III. *L. arabinosus* の MAM acetate を基質とする esterase 活性の in vitro 検索結果

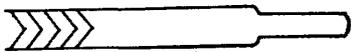
L. arabinosus の MAM acetate に対する esterase 活性の経時変化を Fig. 9 に示した。

esterase の活性は45分値より計算して *L. arabinosus* 1g 当り 8.62 μ mol/hr であった。なお buffer 中での MAM acetate の自然分解は無視出来る程度であった。

考 察

西田ら^{5,6)}は、ソテツの種子より分離抽出した有毒配糖体を cycasin (methylazoxymethanol- β -D-glucoside) と命名し、これが本邦におけるソテツ中毒の本体である事を実験的にも証明した。一方、ソテツを食用とするグアム島住民らに筋委縮性側索硬化症が頻発する事^{7,8)}からソテツ中毒の実験をすすめてきた Laqueurらはグアム島産ソテツ *Cycas circinalis* L., の種子粉末を飼料にまぜてラットに与えたところ肝臓、腎臓、肺臓および大腸に腫瘍発生を認め、ソテツの発癌性を証明した⁹⁾。そして、cycasin を無菌ラットに与えても肝毒性や発癌性を示さず¹⁰⁾、cycasin が発癌性を現すには腸内細菌のもつ β -glucosidase の酵素作用により、aglycon

Table 4. Incidence of Colonic Tumors in Both Germfree and Gnotobiotic ICR Mice Treated with MAM Acetate.

effective animal No.		
Germfree :		
G-B-1	2	1
G-B-2	2	1
G-B-3		
G-B-4	3	
G-B-5	5	3
G-B-6	5	6
G-B-7	4	3
G-B-8	16	2
G-B-9	3	
G-B-10	3	
total	43	16
Gnotobiotic A :		
L-A-1	1	5
L-A-2	10	6
L-A-3	17(2)	12
L-A-4	16(1)	10
L-A-5	1 12(1)	16
L-A-6	9(3)	1
L-A-7	17(5)	9(5)
L-A-8	23(10)	7(3)
L-A-9	4(1)	10(4)
L-A-10	13(9)	10(7)
total	1 122(32)	86(19)
Gnotobiotic B :		
E-A-1		1
E-A-2		1
E-A-3	1	2
E-A-4		2
E-A-5	2	3
E-A-6	1	3
E-A-7		2
E-A-8	3	4
E-A-9	4	5
E-A-10	6	6
total	17	29

() : No. of cancer

Gnotobiotic A : *Lactobacillus arabinosus*

Gnotobiotic B : *E. coli*

である methylazoxymethanol (MAM) が代謝されることが必要で、MAM が proximate carcinogen であると報告した¹⁾。Matsumoto ら¹¹⁾は化学的に安定な

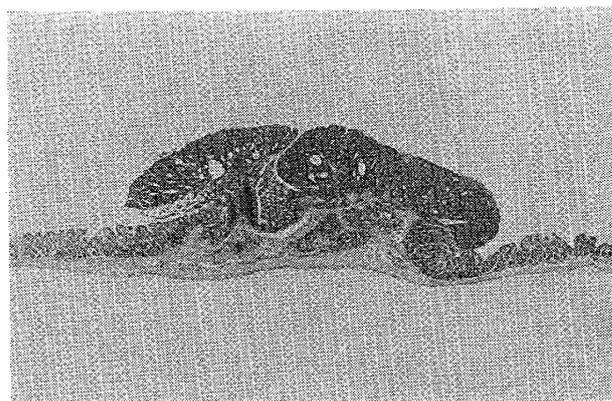


Fig. 4. Adenocarcinoma of the colon (gnotobiotic A) H.E. ×4.5

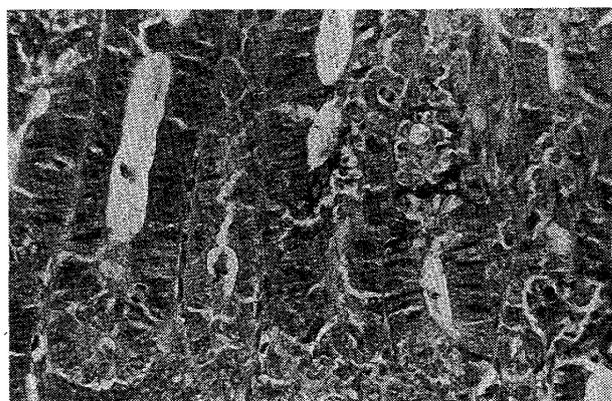


Fig. 5. Highly differentiated adenocarcinoma of the colon (gnotobiotic A) H.E. ×200

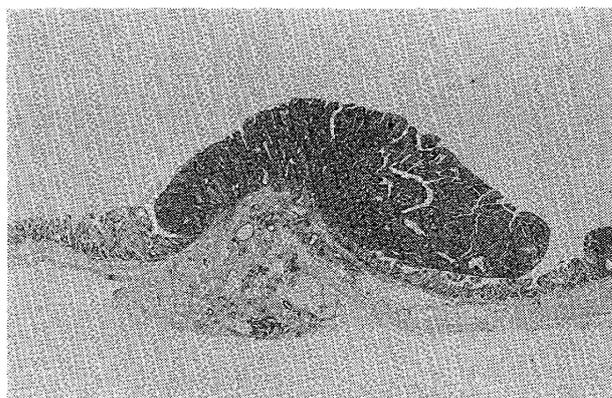


Fig. 6. Invasion of adenocarcinoma with mucin production (gnotobiotic A) H.E. ×4

MAM acetate を合成した。MAM および MAM acetate は無菌ラットに cycasin と同様の肝毒性および発癌性を示した¹⁾。さらに興味ある事実は、Laqueur ら¹⁾は MAM acetate を飼料にまぜ無菌ラットに食べさせ、無菌状態のまま維持したものと3カ月後に ex-germfree として conventional 環境にもどしたものを比較すると

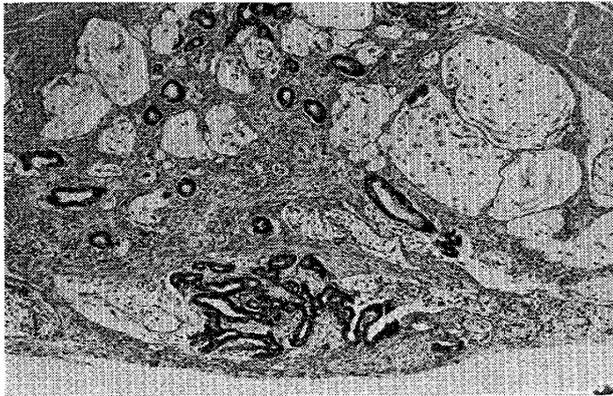


Fig. 7. Invasion of mucinous carcinoma into serosa of the colon (gnotobiotte A)
H.E. $\times 40$

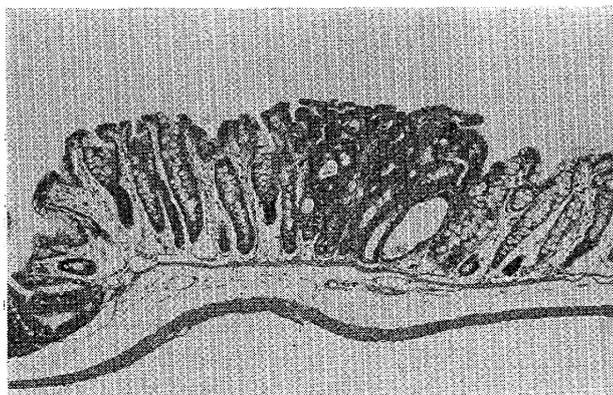


Fig. 8. Adenoma of the colon (gnotobiotte B)
H.E. $\times 40$

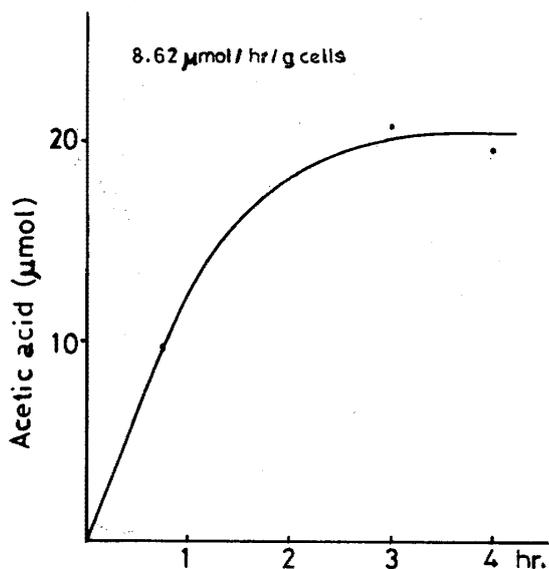


Fig. 9. Formation of acetic acid from MAM acetate by *L. arabinosus*.

ex-germfree のみに大腸癌が発生した。この事より大腸癌発生に腸内細菌が関与する可能性が推察された。

今回の実験1において、無菌マウスは MAM acetate の平均総投与量が10.03mg で、8匹中7匹の大腸に90個の良性腫瘍が認められ、通常マウスは MAM acetate の平均総投与量が5.06mg で、10匹中6匹の大腸に計40個の腫瘍がみられ、うち5匹に計27個の腺癌を認めた。MAM acetate の投与量が無菌マウスの約 $1/2$ 量である通常マウスにおいて155日で腺癌が発生した事は大腸腫瘍の悪性化に腸内細菌が関与する可能性を強く推察させた。

大腸腫瘍発生に関係する腸内細菌叢の役割は一般的に腸内細菌が食餌などに含まれる外因物質や生体側にある内因物質を発癌物質または補発癌物質に変換させることにあると考えられている。腸内細菌の作用として、Weisburger ら¹²⁾は腸内細菌は β -glucosidase や β -glucuronidase などの加水分解酵素をもっており、肝臓でグルクロン酸抱合等により不活性化された抱合型癌原物質を脱抱合して活性化させるといっている。また、外来物質より癌原物質の生成をする作用として、King-Thom ら¹³⁾は腸内細菌は tryptophanase をもっておりトリプトファンから補発癌作用のあるインドールを産生するとし、また、腸内細菌は二級アミンを産生し、細菌のもつ nitrate reductase により還元されてできた亜硝酸と非特異的に反応してニトロサミンを生成すると考えられる。一方、腸内細菌が生体の内因物質より癌原性物質を生成する作用を有すると主張する Hill らは胆汁酸のステロイド核が腸内細菌の脱水素作用により methylchoranthrene や cyclopentaphenanthrene などの発癌性芳香族多環式炭化水素になると仮定し¹⁴⁾、ステロイド核の脱水素作用は嫌気性菌の *Clostridium paraputrificum* にあり、この菌は大腸癌患者や大腸癌多発国のヒトの糞便中に多いと報告している¹⁵⁾。このように諸家によって大腸癌と腸内細菌の関係は研究されてきたが、現在まで特定の細菌が癌化に直接関係する証明はなされていない。

MAM acetate の腸管に対する作用について Narisawa ら¹⁶⁾はラットの腸注実験を行い、MAM acetate が直接接触しない近位大腸および遠位大腸に多発腫瘍が発生することより、MAM acetate の大腸粘膜への直接作用を否定し、吸収された発癌物質が胆汁中に排泄され発癌性を示すとしている。Weisburger¹²⁾によれば吸収された MAM は一部肝臓でグルクロン酸抱合され胆汁中に排泄される。この説に基いてグルクロン酸抱合型 MAM は腸管内で腸内細菌叢により脱抱合され再び活性型となり、腸肝循環をされると考えられている。一方、

Zedeck ら⁴⁾ は総胆管外胆汁瘻を作成したラットに MAM acetate を1回静脈内投与し、腸管への胆汁排泄を完全に遮断し、腸管上皮の DNA 合成能を検索した結果、MAM acetate は十二指腸と大腸の DNA 合成を抑制し、腸管上皮が発癌性変化を示すことから MAM acetate の作用発現には腸管への胆汁移送を必要としないとしている。また、直接作用と胆汁を介する作用の両者の可能性も否定出来ないとする説もある¹⁷⁾。そこで、今回、Weisburger らの主張に基づき、Hawksworth ら¹⁸⁾ のいう β -glucuronidase の活性の違う菌群より、活性の高い *E. coli* と活性の低い *L. arabinosus* を選び無菌マウスに単一感染させ、MAM acetate 投与後の大腸腫瘍発生を比較したところ、実験2の結果を得た。すなわち、MAM acetate を0.2mg/10g/週、で計12回経口投与した無菌マウス群、*L. arabinosus* を単一感染させた gnotobiot A 群、マウス由来 *E. coli* を単一感染させた gnotobiot B 群の大腸腫瘍発生を比較すると無菌マウス群は10匹中9匹に腫瘍を認め、総数は59個で、組織学的にはすべて良性腫瘍であった。gnotobiot A 群 (*L. arabinosus*) は10匹中10匹に腫瘍を認め、うち8匹に悪性腫瘍が認められた。腫瘍総数は209個で、組織学的にはそのうち51個が悪性腫瘍であった。gnotobiot B 群 (*E. coli*) は10匹中10匹に腫瘍を認め、総数は46個ですべて良性腫瘍であった。この結果、*L. arabinosus* は MAM acetate の大腸腫瘍の発生数と悪性化を促進し、マウス由来 *E. coli* は MAM acetate の大腸腫瘍発生に抑制的に働きうる事が分った。また、MAM acetate の代謝に関して、MAM acetate が生体内のエステラーゼにより脱アセチル化され MAM となる事は諸家の認めるところであるが、Druckrey や Fiara は MAM が非特異的に Methylziazonium になり、Methylziazonium が Ultimate carcinogen であるとしている^{19,20,21,22,23)}。最近、Feinberg と Zedeck²⁴⁾ は MAM は生体の alcohol dehydrogenase によりアルデヒド型の methylazoxymethanal となり、これは非特異的にすみやかに methylziazonium になる事を証明した。methylziazonium はアルキル化剤として核酸や蛋白合成に関与するといわれている^{19,20,21,22)}。Fiara²³⁾ はまた MAM は直接核酸塩基に水素結合により結合する可能性があるとして述べている。そこで、*L. arabinosus* が MAM acetate の脱アセチル化に関与し、MAM を作るか否かについて、MAM acetate を基質にして、*L. arabinosus* の esterase 活性を測ったところ、*L. arabinosus* の esterase 活性は8.62 $\mu\text{mol/hr/g cells}$ と低い事が分った。Zedeck ら⁴⁾ の研究によればラットの各臓器における esterase 活性は肝臓で

4000 $\mu\text{mol/hr/g tissue}$ 、大腸で400 $\mu\text{mol/hr/g tissue}$ 、血中で30 $\mu\text{mol/hr/g}$ であり、このことから *L. arabinosus* の esterase 活性は直接的には MAM acetate の脱アセチル化に関与しないものと考えられ、むしろ生体の酵素が関与する可能性が推察された。

最近、Laqueur ら²⁵⁾ は Methylazoxymethanol- β -D-glucosiduronic acid を通常ラットと無菌ラットに投与した実験で、発癌には腸内細菌の β -glucuronidase の活性が必要で生体側の酵素活性ではないと主張している。

今回の実験から *L. arabinosus* がマウスの MAM acetate の大腸腫瘍の悪性化に関与する要因としては、① in vitro における esterase の直接活性は否定出来る事より、*L. arabinosus* が生体側の酵素活性を促進する。② Hawksworth ら¹⁸⁾ の報告から推察して、脱抱合酵素である β -glucuronidase の活性は *L. arabinosus* と *E. coli* の糞中総菌数から計算して、両者とも同レベルであったので、菌自体の直接作用ではなく、生体特に肝や腸管での β -glucuronidase 活性を *L. arabinosus* が高める。③ *L. arabinosus* が他の promoter (たとえば二次胆汁酸の産生) の産生に関与する。④ *L. arabinosus* 自身が腸管粘膜上皮細胞の発癌物質に対する感受性を高めることなどが考えられる。特に *L. arabinosus* が生体内の酵素活性を促進し、さらに腸管粘膜上皮細胞の発癌物質に対する感受性を高める事により大腸腫瘍の悪性化が起ると推察される。Barthold ら²⁶⁾ はマウスの *Citrobacter freundii* の感染症が大腸の過形成を起す Transmissible murine colonic hyperplasia の病因である事から、*Citrobacter freundii* を NIH swiss マウスに感染させ、1,2-dimethylhydrazine の発癌への作用を検討し、*Citrobacter freundii* は潜伏期間を早めたが発生した腫瘍には影響をおよぼさなかったと報告している。今回の実験において *L. arabinosus* は大腸腫瘍の発生および悪性化に深く関与する事が証明出来た。

総括

1. 通常マウスと無菌マウスの MAM acetate による大腸腫瘍発生を比較したところ、MAM acetate の投与量が無菌マウスの約 $\frac{1}{2}$ 量である通常マウスにおいて155日で腺癌が発生し、大腸腫瘍の悪性化に腸内細菌が関与すると考えられる。

2. 無菌群、gnotobiot A 群 (*L. arabinosus*) および gnotobiot B 群 (*E. coli*) の腫瘍発生を比較したところ、*L. arabinosus* ATCC 8014は MAM acetate のマウスにおける大腸腫瘍の発生および悪性化に深く関与し、マウス由来 *E. coli* は MAM acetate のマウスに

における大腸腫瘍の発生数および悪性化に関与しなかった。

3. 大腸腫瘍の悪性化にある種の腸内細菌が関与する可能性を確かめたものとする。

4. MAM acetate に対する *L. arabinosus* の esterase 活性を *in vitro* で検索した結果, MAM acetate の esterase 活性には直接的に *L. arabinosus* が関与しないものと考えられる。

結 論

大腸腫瘍の発生および悪性化に腸内細菌が深く関与すると考えられる。

謝 辞

稿を終るにあたり, 本論文の生化学検索に御協力いただいた千葉大学医学部第2生化学教室橋正道教授ならびに教室の諸先生方に深く感謝いたします。

なお, 本論文の要旨は第38回および第40回日本癌学会総会において発表した。

SUMMARY

Large intestinal tumorigenesis due to methylazoxymethanol (MAM) acetate was comparatively studied using germfree, conventional and gnotobiotic male ICR mice.

1) Weekly oral doses of 0.3 mg/10 g MAM acetate were administered to conventional and germfree mice for 6 and 12 weeks, respectively. Malignant tumors were induced in the large intestine of conventional, but not germfree mice. These results suggest that the intestinal bacterial flora is important in malignant transformation of large intestinal tumors due to MAM acetate.

2) Weekly oral doses of 0.2 mg/10 g MAM acetate for 12 weeks were given to germfree mice and gnotobiotic mice inoculated with murine *E. coli* or *Lactobacillus arabinosus* ATCC 8014. The incidence of large intestinal tumors in *Lactobacillus*-gnotobiotic mice was significantly greater than in germfree or *E. coli*-gnotobiotic mice at 214 days. Malignant tumors occurred only in *Lactobacillus*-gnotobiotic mice.

These results suggest that a certain part of the intestinal flora plays the important role in MAM acetate tumorigenesis and malignant transforma-

tion.

文 献

- 1) Laqueur, G. L., McDaniel, E. G. and Matsumoto, H.: Tumor induction on germfree rats with methylazoxymethanol (MAM) and synthetic MAM acetate. *J. Natl. Cancer Inst.* **39**, 355-371, 1976.
- 2) 前島一淑, 柏崎 守, 上村文雄: 実験動物のための無菌動物技術1~73; 171~179 ソフトサイエンス社, 1978年.
- 3) 日本薬局, 第10版: 無菌試験法. 日本公定書協会, 736~742, 1981年.
- 4) Zedeck, M. S., Grab, D. J. and Sternberg, S. S.: Differences in the acute response of the various segments of rat intestine to treatment with the intestinal carcinogen, methylazoxymethanol acetate. *Cancer Res.* **37**, 32-36, 1977.
- 5) Nishida, K., Kobayashi, A. and Nagahama, T.: Studies on Cycasin, a new toxic glucoside of *cycas revoluta* Thunb. 1. Isolation of structure of cycasin. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan.* **19**, 77-84, 1955.
- 6) 西田孝太郎, 小林 昭, 永浜伴紀, 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**, 22, 1956.
- 7) Arnold, A., Edgren, D. C. and Palladino, V. S.: Amyotrophic lateral sclerosis; fifty cases observed on Guam. *J. Nerv Ment Dis.* **117**, 135-139, 1953.
- 8) Kurland, L. T. and Mulder, D. W.: Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 1. Preliminary report on geographic distribution, with special reference to the Mariana island, including clinical and pathologic observations. *Neurology.* **4**, 355-378, 438-448, 1954.
- 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. Natl. Cancer Inst.* **31**, 919-951, 1963.
- 10) Laqueur, G. L.: Carcinogenic effects of cy-

- cade meal and cycasin, methylazoxymethanol glycoside, in rats and effect of cycasin in germfree rats. *Fed Proc.* **23**, 1386-1387, 1964.
- 11) Matsumoto, H., Nagahama, T. and Larson, H. O.: Studies on methylazoxymethanol, the aglycon of cycasin: A synthesis of methylazoxymethanol acetate. *Biochem. J.* **95**, 13c, 1965.
- 12) Weisbuger, J. H.: Colon carcinogenesis: Their metabolism and mode of action. *Cancer* **28**, 60-70, 1971.
- 13) King-thom, Chung., Fulk, G. E. and Slein, M. W.: Tryptophanase of fecal flora as a possible factor in the etiology of colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **54**, 1073-1078, 1975.
- 14) Hill, M. J.: Some implications of steroid hormones in cancer. (eds. by Williams, D. C. and Briggs, M. H.) Heinemann. London. P. 94-106, 1971.
- 15) Hill, M. J., Drasar, B. S., Williams, R. E. O., Meade, T. W., Cox, A. G., Simpson, J. E. P. and Morson, B. C.: Faecal bile-acid and Clostridia in patients with cancer of the large bowel. *Lancet* **1**, 535-538, 1975.
- 16) Narisawa, T. and Nakano, H.: Carcinoma of the large intestine of rats induced by rectal infusion of methylazomethanol. *GANN.* **64**, 93-96, 1973.
- 17) Watanabe, K., Yoshii, M., Iwashita, H., Muta, K., Hamada, Y., Hamada, K., Isaka, H. and Nishi, M.: Intestinal tumors of rats by gastric or intestinal administration of cycad extract and cycasin. *GANN.* **66**, 449-452, 1975.
- 18) Hawksworth, G., Drasar, B. S. and Hill, M. J.: Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. *J. Med. Microbiol.* **4**, 451-459, 1971.
- 19) Miller, J. A.: Comments on chemistry of cycads. *Fed. Proc.* **23**, 1361, 1964.
- 20) Miller, J. A. and Miller, E. C.: Natural and synthetic chemical carcinogens in the etiology of cancer. *Cancer Res.* **25**, 1292-1304, 1965.
- 21) Morita, N., Tomomatsu, H., Shiwaku, Y., Hayashi, T. and Yunoki, K.: Methylation of nucleic acid with aglycon of cycasin and its possible mechanisms of carcinogenesis. *Acta, Med. Univ. Kagoshima.* **28**, 739-758, 1976.
- 22) Druckrey, H.: Topics in chemical carcinogenesis. (eds. by Nakahara, W. et al.) Univ. Tokyo Press. P. 73-101, 1972.
- 23) Fiara, E. S.: Investigation into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer* **40**, 2436-2445, 1977.
- 24) Feinberg, A. and Zedeck, M. S.: Production of a highly reactive alkylating agent from the organospecific carcinogen methylazoxymethanol by alcohol dehydrogenase. *Cancer Res.* **40**, 4446-4450, 1980.
- 25) Laqueur, G. L., Matsumoto, H. and Yamamoto, R. S.: Comparison of the carcinogenicity of methylazoxymethanol- β -D-glucosiduronic acid in conventional and germfree Sprague-Dawley rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **67**, 1053-1055, 1981.
- 26) Barthold, S. W. and Jonas, A. M.: Morphogenesis of early 1,2-dimethylhydrazine-induced lesions and latent period reduction of colon carcinogenesis in mice by variant of *Citrobacter Freundii*. *Cancer Res.* **37**, 4352-4360, 1977.