

臭素酸カリウムの生体内動態および  
その毒性に及ぼす抗酸化ビタミンの  
影響に関する研究

川名清子

# 目 次

結 論 .....	1
第 1 章 臭素酸カリウムのラットにおける吸収, 代謝, 排泄 .....	4
第 1 節 急性毒性試験 .....	4
第 2 節 代謝試験 .....	5
第 3 節 血液の吸収スペクトル .....	9
第 4 節 急性毒性量投与時の異常所見 .....	10
第 5 節 本章のまとめ・考察 .....	11
実験の部 .....	13
第 2 章 臭素酸カリウムとベンゾ [ a ] ピレン併用投与時 における肝障害の検討 .....	16
第 1 節 体重変化 .....	17
第 2 節 飲料水摂取量 .....	19
第 3 節 臭素酸カリウム総摂取量 .....	20
第 4 節 臓器重量 .....	20
第 5 節 血漿生化学的試験 .....	21
第 6 節 肝 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチターゼ活性 .....	24
第 7 節 本章のまとめ・考察 .....	24
実験の部 .....	28
第 3 章 臭素酸カリウム投与時におけるビタミン E の効果 .....	31
第 1 節 成育状況と体重 .....	32
第 2 節 臭素酸カリウム及びビタミン E 摂取量 .....	33
第 3 節 臓器重量 .....	34
第 4 節 血清成分の分析 .....	34
第 5 節 肝及び腎の酵素活性とグルタチオン量 .....	36

第6節	チオバルビツール酸反応性物質量の測定	38
第7節	本章のまとめ・考察	39
	実験の部	40
第4章	臭素酸カリウム投与時におけるビタミンCの効果	43
第1節	成育状況と体重	44
第2節	臭素酸カリウム及びビタミンC摂取量	45
第3節	臓器重量	46
第4節	血清中の尿素窒素及びクレアチニン量	47
第5節	血清中の酵素活性	48
第6節	肝及び腎の酵素活性とグルタチオン量	48
第7節	チオバルビツール酸反応性物質量の測定	50
第8節	本章のまとめ・考察	51
	実験の部	54
第5章	臭素酸カリウムと還元型グルタチオンの反応による 活性酸素種の発生と脂質過酸化反応	56
第1節	臭素酸カリウムとグルタチオンの反応性	56
第2節	臭素酸カリウム及びグルタチオンの添加による リノール酸の過酸化反応	57
第3節	肝ミクロゾームの脂質過酸化反応系への臭素酸カリウム とグルタチオンの添加の影響	59
第4節	本章のまとめ・考察	62
	実験の部	66
結 論		69
謝 辞		72
文 献		73

## 糸者 言論

わが国における今日の食生活は「飽食の時代」と称されることがある。事実、市場には多種多様な食材が溢れ、それぞれの選択により豊かな食生活が可能となった。しかし、満たされた食生活に対して、常にいくばくかの健康への危惧を抱きながら暮らしていることもまた事実である。

人口に占める高齢者の比が高くなり、いわゆる高齢化社会が進行しているという。人口の都市集中化は外食産業を活発にし、それに対応する市場の変革が従来の日本型食生活に大きな影響を与え、欧米型食生活へと変換されつつある。一方、近年各種の成人病の増加に対して、食生活のみなおしといくつかの警鐘が提示されている。その結果、豊かでその上、より健康な食生活が求められるようになり、食生活あるいは食品そのものの安全性が問われるようになった。ながい食習慣に培われた食材が安全であると考えた天然物志向が時代の流れとなり、化学的合成品、食品添加物に疑念が持たれるようになった。

わが国における食品添加物の規制は昭和23年1月から施行された。食品衛生法及び同施行規則を骨格とするものである。食品衛生法第二条第2項において「添加物とは、食品の製造の過程において又は食品の加工若しくは保存の目的で食品に添加、混和、浸潤その他の方法によって使用する物をいう」と定められている。わが国の食品添加物の規制ではポジティブリスト方式（指定制度）（許可品目リスト方式 Permitted List System）が採用されており、化学的合成品を使用することを原則的に禁止しており、「人の健康を害する虞のない場合として厚生大臣が食品衛生調査会の意見をきいて定める場合を除いては、食品添加物として用いることを目的とする化学的合成品並びにこれを含む製剤及び食品は、これを販売し、又は販売の用に供するために、製造し、輸入し、加工し、使用し、貯蔵し、若しくは陳列してはならない」としている。

食糧の困窮のなかで定められた本制度が当時の食糧事情において、有害物質

を排除しようとする基本的施策のなかで効を奏したことは事実であった。

昭和30年に起きたヒ素ミルク中毒事件は、添加物として使用したリン酸塩中の不純物であるヒ素化合物であることが判明した。これらの事故を背景として、食品添加物に対する安全性への懸念が一層高まっていった。

食品添加物の国際的な安全性評価は、WHO（World Health Organization 世界保健機構）とFAO（Food and Agriculture Organization of the United Nations 国連食糧農業機関）が合同してJECFA（Joint Expert Committee on Food Additives 食品添加物専門家委員会）を設置して、毒性に関する評価が行われている。JECFAの食品添加物に関する安全性評価基準は、ADI（Acceptable Daily Intake 1日摂取許容量）を中心とするものである。食品添加物はその毒性により、A1からC2までの5段階に分類されている。A1は安全性評価が終了している最も安全性の高いもの、A2、Bは評価が完了していないが、A1に準ずるものである。C1、C2は食品添加物として使用しないように勧告しているものである。

臭素酸カリウム( $\text{KBrO}_3$ )は小麦粉改良剤としての食品添加物である。本物質はFAO/WHOのA2リスト品目である。わが国では、昭和28年3月25日食品添加物に指定され、「パン（小麦粉を原料として使用するものに限る）以外の食品に使用してはならない。 $\text{KBrO}_3$ の使用量は、臭素酸として小麦粉1kgにつき0.03g以下でなければならない。また、使用した $\text{KBrO}_3$ については最終食品の完成前に $\text{KBrO}_3$ を分解又は除去しなければならない」と定められている。 $\text{KBrO}_3$ を製パン時に添加することにより、蛋白分解酵素の活性を適度に抑制し、グルテンの性質を向上させることによる製パン効果を期待するものである。

$\text{KBrO}_3$ による中毒事故はパーマメントウェーブ第2液として大量に利用する理容従事者にみられたが、 $\text{KBrO}_3$ の体内吸収、蓄積性、排泄などに関する研究は少なく不明な点が多い。また、臭素酸塩の毒性については、腫瘍発現率に増加を認めなかったという報告<sup>26, 27)</sup>がある。一方、 $\text{KBrO}_3$ の発癌性について腎腫瘍の高率の発現が報告<sup>28)</sup>されている。

著者は、 $\text{KBrO}_3$ の毒性について生体内挙動における吸収、排泄の状況を経時的に観察した。その結果、胃から速やかに消失し、血液に移行し、腎を経て尿中に排泄されることを認めた。また、 $\text{KBrO}_3$ の発癌促進作用を検討する目的でベンゾ[a]ピレン(B[a]P)との併用投与を試み、腫瘍マーカー値の変動から活性酸素種の関与を推定した。さらに、抗酸化作用を持つビタミンE(VE)及びC(VC)に着目し、毒性軽減効果の有無について検討を行った。これらの実験をもとに、 $\text{KBrO}_3$ の毒性発現機構の考察を試み、グルタチオン関与による活性酸素種による障害が、 $\text{KBrO}_3$ の毒性発現機構のひとつとして存在する可能性が示唆された。

# 第 1 章 臭素酸カリウムのラットにおける吸収，代謝，排泄

KBrO<sub>3</sub>は小麦粉改良剤として製パン<sup>1)</sup>に使用許可されている食品添加物である。KBrO<sub>3</sub>による中毒事故<sup>2)</sup>は食品関係よりも、パーマメントウェーブ第2液として大量に使用する理容業従事者<sup>3-15)</sup>にしばしば見られ、KBrO<sub>3</sub>を自殺の目的で飲用する場合である。KBrO<sub>3</sub>の毒性については、従来、実質細胞毒、血液毒及び中枢神経麻痺作用を持つことが知られているが、吸収、体内蓄積性、排泄などに関する詳細な研究は少なく、メトヘモグロビン生成作用についても不明の点が多い。本研究では、KBrO<sub>3</sub>少量投与実験では臭素酸塩の体内動向を調べるのが困難であるので、急性毒性量に近い大量投与実験により吸収、体内蓄積性並びに排泄の関係を調べ、以下の結果を得た。<sup>16)</sup>

## 第 1 節 急性毒性試験

急性毒性量のKBrO<sub>3</sub>をラットに経口投与したときの投与量と生存時間ならびに生存率の関係をTable 1に示した。Table 1より明らかなように、KBrO<sub>3</sub>を体重1kg当り85mg投与した群ではすべてのラットは生存し続けたが、159mg投与した群では72時間後の生存率が20%であった。また、KBrO<sub>3</sub>を体重1kg当り177mg投与した群では投与後48時間で5匹すべてが死亡した。Table 1の結果では投与量と生存時間との間に厳密な比例関係は見い出されなかったが、この原因としてラットに個体差のあることも考えられる。Table 1の実験結果からKBrO<sub>3</sub>経口投与後36時間における死亡率からLitchfield Wilcoxon法<sup>17)</sup>によりLD<sub>50</sub>値を計算した結果、157mg/kg(信頼限界132-181mg/kg, P<0.05)と求められた。

Table 1. Rate of Survival in Rats Administered Orally with  $\text{KBrO}_3$ 

No. of experimental group	No. of animals	Body weight (g)	Sex	Dose mg (mg/kg)	No. of survival after dosage					Rate of survival (%)
					12	24	36	48	72h	
1	5	164±7.2	♂	14.0 (85)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	100
2	5	175±7.0	♂	27.85(159)	5/5	5/5	3/5	1/5	1/5	20
3	5	156±6.1	♀	27.85(177)	5/5	4/5	1/5	0/5		0
4	5	170±7.3	♂	55.7 (325)	5/5	5/5	2/5	0/5		0
5	5	165±6.0	♀	55.7 (337)	5/5	5/5	0/5			0
6	5	185±6.4	♂	111.4 (602)	2/5	0/5				0

## 第 2 節 代 謝 試 験

通常食摂取ラット群及び12時間絶食ラット群に、体重1kg当り300-400mgの $\text{KBrO}_3$ を経口投与し、投与後30分、60分、120分及び240分間における胃及び小腸内容物中の臭素酸塩の残存量、血漿中の臭素酸塩量及び各臓器組織中の臭素酸塩を測定し、その結果をTable 2 に示した。

Table 2 の結果から明らかなように通常食摂取ラット群の胃内容物のpH値は12時間絶食ラット群よりも僅かに酸性側に傾いているが、両投与群共に $\text{KBrO}_3$ の投与により投与前のpH3.82から投与後ではpH約5.0以上の値を示し、胃内塩酸の減少が観察された。この原因は投与した $\text{KBrO}_3$ と胃内塩酸が反応し、遊離の臭素酸と塩化カリウムを生成するためと考えられるが、この反応により生成する臭素酸は酸化性が強く、胃粘膜に作用して変性脱離を起こさせると共に、胃の表皮部を膨化させているのが見られた。したがって、 $\text{KBrO}_3$ 投与後短時間内に胃酸生成能が著しく障害されることが推定された。

胃内容物中の臭素酸塩の残存量をTable 2(A)の投与後30分から240分について観察すると、残存量が経時的に僅かに増加する傾向が見られる。

通常食摂取ラットに55.7mgの $\text{KBrO}_3$ (350mg/kg)を投与し、1時間後胃内に残留する臭素酸塩並びに臭素イオンをイオンクロマトグラフィーにより調べた結果

をFig. 1に示した.

この結果から投与後1時間の胃内に $\text{BrO}_3^-$ と $\text{Br}^-$ が約5.5:4.5の割合で残留していることを認めた.  $\text{KBrO}_3$ の胃内残存量が投与後30分において投与量の僅かに0.7%及び1.7%にとどまることは臭素酸塩の胃での消失が早いことを示している. 一方, 動物の体重の2.5%を全血液量と仮定し, 血漿中の臭素酸塩量を算出すると, 投与後30分において投与量の約10%は血漿中に存在するが, 投与後 60分, 120分及び240分と時間の経過に伴って減少することが明らかにされた. また, 各臓器組織中の臭素酸塩量を測定した結果はTable 2 に示した通りであるが, 肝, 腎, 脾, 膵, 脳, 心, 肺, 胃, 小腸のいずれの組織中にも認められなかった. この結果は胃から吸収された臭素酸塩が血液により運搬されて肝, 腎, 脾その他の主要器官を循環する過程において, 生体の生化学的還元系により消失することを示していた.

Table 3 は $\text{KBrO}_3$ 経口投与24時間後における胃内容物, 動物体内全血漿及び各臓器組織中の臭素酸塩量並びに尿中への排泄量を測定した結果を示した.

Table 3 からわかるように胃内容物中には微量の臭素酸塩の残留が見られたが, 血漿中からは完全に消失していた. 投与24時間後の全尿中の臭素酸塩の排泄量を見ると, Table 3 に示したように $\text{KBrO}_3$  27.85mg投与群では 雌, 雄にそれぞれ3.56mg(投与量の13%)と4.12mg(投与量の15%)の排泄が見られた. 一方, 55.7mg投与群では雌, 雄, に7.44mg(投与量の13%)と8.15mg(投与量の15%)の尿中排泄が観測された. 上記の結果はラットにおいては $\text{KBrO}_3$ の投与量に対する尿中排泄率に著しい性差の認められなかったこと及び通常食摂取ラット群と12時間絶食ラット群との間に差がないことを示していた.

Table 2. Distribution of Bromate in Organs and Plasmas of Rats Administered Orally with KBrO<sub>3</sub>

(A) Groups of Rats Fed with Feeding Food

Time after treatment (min)	No. of animals	Body weight (g)	Sex	Dose	Stomach contents		Small intestine contents		Plasma	Contents of KBrO <sub>3</sub> in organs <sup>a)</sup>									
				mg (mg/kg)	pH	KBrO <sub>3</sub> (mg)	pH	KBrO <sub>3</sub> (mg)	KBrO <sub>3</sub> (mg/body)	L <sup>a)</sup>	K	Sp	P	B	H	Lu	St	SI	
30	4	168±3.5	♂	55.7(331)	5.15±0.37	0.39±0.10	6.70±0.10	0	5.30±1.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
60	4	159±8.6	♂	55.7(350)	4.81±0.13	0.41±0.17	6.47±0.13	0	2.99±0.23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
120	4	170±0.0	♀	55.7(327)	6.10±0.25	1.85±0.26	6.50±0.06	0	2.09±0.38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
240	4	185±7.0	♀	55.7(301)	5.96±0.25	2.02±0.71	6.78±0.16	0	1.35±0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

(B) Groups of Rats Fostered for Abstinence from Food for 12hrs

Time after treatment (min)	No. of animals	Body weight (g)	Sex	Dose	Stomach contents		Small intestine contents		Plasma	Contents of KBrO <sub>3</sub> in organs <sup>a)</sup>									
				mg (mg/kg)	pH	KBrO <sub>3</sub> (mg)	pH	KBrO <sub>3</sub> (mg)	KBrO <sub>3</sub> (mg/body)	L <sup>a)</sup>	K	Sp	P	B	H	Lu	St	SI	
30	4	139±4.8	♂	55.7(400)	6.08±0.63	0.96±0.64	6.75±0.22	0	5.30±0.85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
60	4	130±2.9	♀	55.7(428)	6.69±0.16	0.42±0.29	6.68±0.02	0	2.76±0.96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
120	4	164±9.5	♂	55.7(339)	6.82±0.12	0.14±0.06	6.63±0.13	0	2.43±0.21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
240	4	178±8.7	♂	55.7(312)	7.31±0.08	1.10±0.44	6.85±0.12	0	0.62±0.28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Values represent means ±S.D..

Bromate contents were expressed as total value in organs.

Bromate value was calculated as potassium bromate.

The pH value of stomach contents from rats fed with feeding food was 3.82.

a) L; liver, K; kidney, Sp; spleen, P; pancreas, B; brain.

H; heart, Lu; lung, St; stomach, SI; small intestine.

Table 3. Contents of Bromate in Organs, Plasma, Urines and Feces of Rats Administrated with  $\text{KBrO}_3$  after 24h

(A) Groups of Rats Fed with Feeding Food

No. of animals	Body weight (g)	Sex	Dose mg(mg/kg)	Stomach contents		Small intestine contents		Plasma $\text{KBrO}_3$ (mg/body)	Contents of $\text{KBrO}_3$ in organs <sup>a)</sup>									Urines $\text{KBrO}_3$ (mg)	Feces $\text{KBrO}_3$ (mg)	
				pH	$\text{KBrO}_3$ (mg)	pH	$\text{KBrO}_3$ (mg)		L <sup>a)</sup>	K	Sp	P	B	H	Lu	St	SI			
4	153±7.2	♀	27.85(182)	6.68±0.50	0	7.00±0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.56±0.93	0
4	165±5.7	♀	55.7(337)	6.85±0.58	1.24	7.55±0.18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.44±0.70	0

(B) Groups of Rats Fostered for with Abstinence from Food for 12h

No. of animals	Body weight (g)	Sex	Dose mg(mg/kg)	Stomach contents		Small intestine contents		Plasma $\text{KBrO}_3$ (mg/body)	Contents of $\text{KBrO}_3$ in organs <sup>a)</sup>									Urines $\text{KBrO}_3$ (mg)	Feces $\text{KBrO}_3$ (mg)	
				pH	$\text{KBrO}_3$ (mg)	pH	$\text{KBrO}_3$ (mg)		L <sup>a)</sup>	K	Sp	P	B	H	Lu	St	SI			
4	178±7.5	♂	27.85(156)	7.54±0.52	0	7.74±0.59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.12±1.16	0
4	203±8.2	♂	55.70(274)	7.17±0.48	0.71±0.05	7.43±0.13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.15±2.33	0

Values represent means±S.D.

Bromate contents were expressed as total value in organs.

Bromate value was calculated as potassium bromate.

The pH value of stomach contents from rats fed with feeding food was 3.82.

a) L; liver, K; kidney, Sp; spleen, P; pancreas, B; brain,

H; heart, Lu; lung, St; stomach, SI; small intestine.

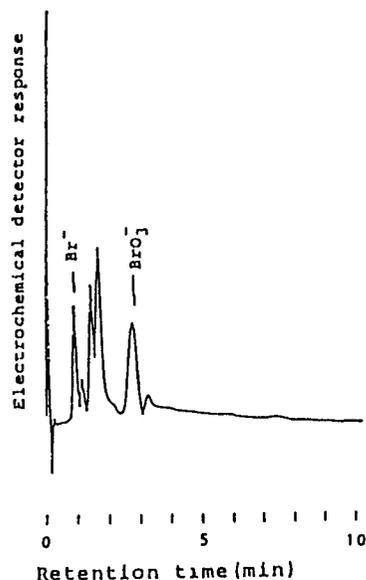


Fig.1. Analysis of BrO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Br<sup>-</sup> Using the HPLC-ECD System

IC conditions: column, Shodex IC 1-521A; eluent, 2.5mM phthalic acid-Tris solution (pH 4.0); flow rate, 1.0 ml min<sup>-1</sup>; sample volume, 10 μl; detection, electrochemical detector. sample solution: dialysates of the stomach contents from a rat administered orally with KBrO<sub>3</sub> after 60 min (refer to Table 2 (A)).

### 第3節 血液の吸収スペクトル

KBrO<sub>3</sub>の毒性はその強力な酸化作用による臓器組織の実質毒と血液毒ならびに特異な中枢神経麻痺作用が報告されている。これらの毒作用のうち血液毒作用としてはメトヘモグロビン生成作用、臭素イオンによる溶血作用および血栓形成などが指摘されている。<sup>18)</sup>しかし、メトヘモグロビン生成については塩素酸カリウムの作用との関連で同一視されているが、正確な報告は少ない。

本実験ではKBrO<sub>3</sub>投与時のメトヘモグロビン生成を確認する目的で次の実験を行った。すなわち、雄ラットに体重1kg当り348.1mgのKBrO<sub>3</sub>を経口投与し、血漿中から臭素酸塩が完全に消失しない4時間後に採血し、pH6.0(A)及びpH11.2(B)における可視領域の吸収スペクトルを測定した。結果はFig.2に示したようにKBrO<sub>3</sub>投与ラット血液では635nm近傍に僅かな吸収が見られるが、アルカリ性

におけるヘモグロビンの吸収スペクトルとはほとんど同じであり、酸性メトヘモグロビン特有の大きな吸収は見られなかった。したがって、 $\text{KBrO}_3$ によるメトヘモグロビン生成能は他のメトヘモグロビン生成薬物に比べて著しく弱いものと推定された。

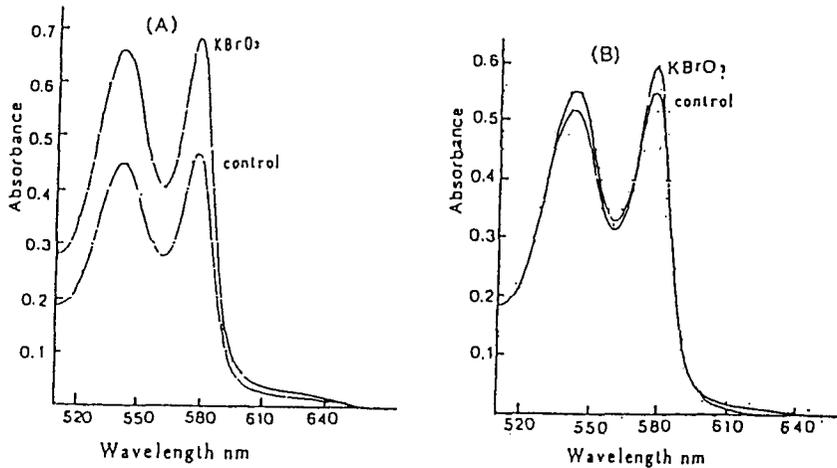


Fig. 2. Absorption Spectra of Blood from Rat Administered Orally with  $\text{KBrO}_3$ .  
 (A) pH 6.0 in 0.05M acetate buffer. (B) pH 11.2 in 0.5%  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

#### 第 4 節 急性毒性量投与時の異常所見

$\text{KBrO}_3$  をラットに経口投与し、24時間経過すると鼻出血、下痢等が見られ、剖検すると脳、肺に顕著な出血が見られ、肝、腎、脾等の器官に血色素の沈着あるいはうっ血が見られた。

体重160g(8週令)の雄、雌ラットに $\text{KBrO}_3$ 55.7mgを経口投与し、60分後の肝、腎、脾の変化をFig. 3に示した。

肝及び腎ではControlとの相違は明瞭ではないが、脾では明らかに $\text{KBrO}_3$ 投与のものに血色素の沈着が見られた。

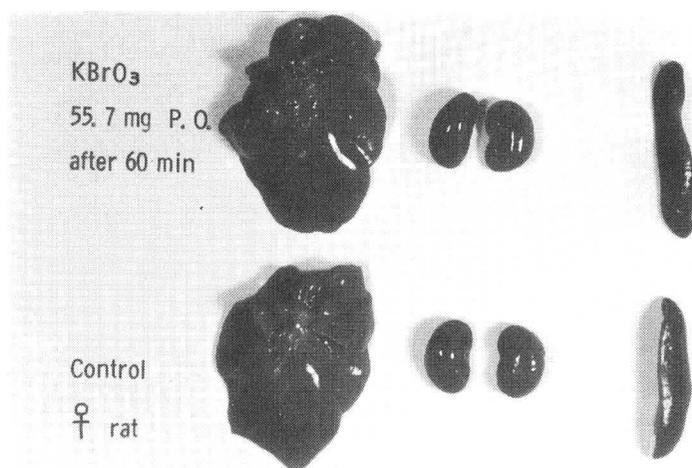


Fig. 3. Observation of Liver, Kidneys and Spleen of a Female Rat Administered Orally with KBrO<sub>3</sub> (428 mg/kg).

## 第 5 節 本章のまとめ・考察

ウイスター系ラットに急性毒性量のKBrO<sub>3</sub>を経口投与することにより，吸収，血中濃度の変化，臓器分布，尿中への排泄に至る全過程を観察した。

投与量を急性毒性量以下にすると臭素酸塩は短時間内に胃から消失してしまい，体内分布や排泄過程を観察することができない。本実験では，比較的大量のKBrO<sub>3</sub>を投与して代謝実験を行うための基礎資料を得るため，まず経口投与量と生存率の関係を求めた。その結果，ラット体重1kg当り160-340mgの投与では24時間以上生存することが明かにされ，36時間後における生存率からLD<sub>50</sub>値は157mg/kg(信頼限界132-181mg/kg, P<0.05)と求められた(Table 1)。そこで，上記の投与量範囲でKBrO<sub>3</sub>の胃からの吸収，血漿中濃度，各臓器分布，尿中排泄の関係を明らかにした。

KBrO<sub>3</sub>の胃からの消失速度は速く，投与30分から60分後では投与量の95%以上が消失した(Table 2)。24時間後には微量を確認した。投与後60分の胃内容物

の $\text{BrO}_3^-$ と $\text{Br}^-$ イオンの含有比率は約1:1に近く、投与した $\text{KBrO}_3$ の約50%は胃内で還元されるものと考えられた。経口投与した $\text{KBrO}_3$ は小腸内では認められなかった。投与された臭素酸塩の85-87%は肝、腎、脾その他の器官へ血液を介して運ばれ、還元型グルタチオンやSH-タンパク質と反応して消失するものと考えられるが、そのとき組織細胞に実質毒として働くものと推定した。腎を経て尿中に排泄される臭素酸塩量は投与24時間後において投与量の約13-15%であった (Table 3)。投与24時間後においては血漿中に臭素酸塩が検出されなかった。

$\text{KBrO}_3$ は血液毒でメトヘモグロビン生成能が強いものとされていたが、急性毒性量を投与し、4時間経過した血液の吸収スペクトルを測定したが、メトヘモグロビンの形成は極めて僅かであった。しかしながら、投与後4時間において剖見すると、腎や脾に溶血作用により生じた血色素の沈着が顕著に認められた (Fig. 3)。

以上の実験の結果、従来明らかにされなかった $\text{KBrO}_3$ の生体内における経時的な挙動について吸収、臓器分布、排泄の観点から新たな知見を得ることが出来た。また、臓器溶血による血色素の沈着を認め今後の毒性試験への指針を得ることが出来た。

## 実験の部

### 1. 試薬及び装置

1)  $\text{KBrO}_3$  溶液:  $\text{KBrO}_3$  は小宗化学薬品の試薬特級品。投与液は  $\text{KBrO}_3$  (分子量 167.01) 5.57g に水を加えて溶かし全量を 100ml とした (5.57%  $\text{KBrO}_3$  溶液)。この溶液の pH は 6.87 (20° C) であった。

2) 装置: ラットの代謝ケージは夏目製作所製, pHメーターはラジオメーター社製 PHM84, 吸収スペクトルは日立ダブルビーム分光光度計 200-10, ラットの各組織の破壊には Janke-Kunkel 社製の IKA-Ultra-Turrax TP18-10 を用い, 破壊液はさらにテフロン-ガラスホモジナイザーで処理した。イオンクロマトグラフは日立製 HPLC 用 L-6000 ポンプに BAS 社製エレクトロケミカル検出器 LC-4B を接続した。分離カラムは昭和電工製 Shodex IC 1-524A を使用した。

### 2. 急性毒性試験

ウィスター系雄ラット (7-8週令, 平均体重約 178g) 及び雌ラット (7-8週令, 平均体重約 169g) のそれぞれ 5匹を一群とし, 各群に 5.57%  $\text{KBrO}_3$  溶液を 0.25ml ( $\text{KBrO}_3$  14mg), 0.50ml ( $\text{KBrO}_3$  27.85mg), 1.00ml ( $\text{KBrO}_3$  55.7mg) 及び 2.00ml ( $\text{KBrO}_3$  111.4mg) ずつ胃ゾンデにより経口投与し, 生存時間並びに生存率を観察した。

### 3. 代謝試験

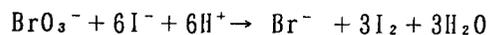
ウィスター系雄ラット (7-8週令, 平均体重約 169g) 及び雌ラット (7-8週令, 平均体重 161g) それぞれ 4匹を一群とし, 12群を用意し, 各群に 5.57%  $\text{KBrO}_3$  溶液 1.00ml ( $\text{KBrO}_3$  55.7mg) または 0.50ml ( $\text{KBrO}_3$  27.85 mg) を経口投与した。投与後 30分, 60分, 120分, 240分後及び 24時間後に各群 4匹ずつをとりだし, エーテル麻酔下で心臓穿刺によりヘパリン処理した注射器で採血した。つぎに, 胃及び小腸の内容物が流動しないように注意しながら胃及び小腸を摘出した。さらに, 肝, 腎, 脾, 膵, 脳, 心, 肺を摘出し, 生理食塩液でよく洗滌したのち各臓

器の重量を測定した。血液は3000rpmで10分間遠心分離して血球と血漿に分けた。胃及び小腸の内容物は生理食塩液で洗い、洗液と内容物を合わせ、全量が50mlになるように調製し、3000rpmで15分間遠心分離した上清を試験溶液として用いた。肝及び小腸はその一部2gをはかりとり、腎、脾、膵、脳、心、肺、胃は器官のすべてを内容100mlのビーカーにとり、これに0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)約40mlを加え、IKA-Turraxで5分間処理して組織を破壊した。つぎに、それぞれに0.1Mリン酸緩衝液を加え、全容量を50mlとしたのち、再びガラス—テフロンホモジナイザーに移し、氷浴中1000rpmで3分間処理した。各器官のホモジネートは5°Cに冷却し、6000×gで40分間遠心分離し、上清の脂肪を除くために直ちに乾燥ろ紙(東洋NO.50)でろ過し、ろ液を臭素酸塩定量用の試験溶液とした。血漿はそれぞれ1mlを精密にとり、0.1Mリン酸緩衝液49mlを加えて希釈し、臭素酸塩定量用の試験溶液とした。尿は、投与24時間後に代謝ケージを生理食塩液で洗滌し、この洗液を全量100mlとし、試験溶液とした。糞は投与24時間後に集め、生理食塩液で分散させ、全量100mlとしたのち5000rpmで15分間遠心分離し、その上清を試験溶液とした。

#### 4. 臭素酸塩の定量法

Williamsら<sup>19, 20)</sup>の方法に従って次のように行った。

試験溶液25mlを内容約100mlのビーカーにとり、精製水を加えて全量50mlとする。この液にヨウ化カリウム試液1ml及び希硫酸10mlを加え、マグネチックスターラーで5分間よく攪拌する。この時遊離するヨウ素をマイクロビュレットを用い、0.02Nチオ硫酸ナトリウム液で滴定する。滴定の終末点はデンプン試液3mlを加え、青色が脱色するときとする。試験溶液の代わりに精製水を取り、空試験を行い補正した。



試験溶液中の臭素酸塩の算出：0.02Nチオ硫酸ナトリウム液1mlはKBrO<sub>3</sub>

0.5567mgに対応するので、0.02Nチオ硫酸ナトリウム液の消費(ml)に0.5567を

乗じ、各器官の臭素酸塩の総量を計算した。血漿または尿中の臭素酸塩の化学形は、ナトリウム塩であるかカリウム塩であるか不明であるが、計算はすべて  $\text{KBrO}_3$  として算出した。

#### 5. イオンクロマトグラフィー

通常食を摂取させたウィスター系雄ラット(8週令, 体重160g)に5.57% $\text{KBrO}_3$ 溶液1.00mlを経口投与し(350mg/kg), 60分後に胃部を切除した。胃内容物を少量の蒸留水で洗いだし, 透析膜に入れ, 蒸留水に対して2時間透析後, その外液をイオンクロマトグラフィー用試験溶液とした。イオンクロマトグラフィーの溶離液には2.5mMフタル酸-トリス溶液(pH4.0)を用いた。

#### 6. 血液の吸収スペクトル測定法

ウィスター系雄ラット(8週令, 体重160g)に5.57% $\text{KBrO}_3$ 溶液1.00mlを経口投与し(350mg/kg), 4時間後にエーテル麻酔下に心臓穿刺により, ヘパリン処理した注射器で採血する。コントロールは無投与の雄ラットから投与ラットと同様の操作で採血した。

吸収スペクトル測定試料溶液は投与及びControl血液それぞれ0.5mlずつを内容100mlのメスフラスコ2個ずつに分取し, 一方のフラスコには0.5%炭酸カリウム溶液(pH11.2)を加え, 希釈して全量100mlとする。他方のフラスコは, 0.05M酢酸緩衝液(pH6.0)を加え希釈して全量100mlとしたものを用いた。吸収スペクトルは500nmから670nmの領域をスリット2.0nm, レスポンスmedium, スキャンスピード 60nm/min, 室温で測定した。

## 第2章 臭素酸カリウムとベンゾ [ a ] ピレン併用投与時における肝障 害の検討

KBrO<sub>3</sub>は小麦粉中のカロチノイド色素等を酸化退色させ、小麦粉中のタンパク質分解酵素を活性化するトリペプチドのグルタチオンに作用し、タンパク質分解酵素の作用を抑制する結果、良好なグルテンが得られるため製パン用のイーストフードの成分として使用される場合が多い。また、KBrO<sub>3</sub>は加熱時に臭素イオンに分解され、臭素酸イオンとしてはほとんど存在しない。<sup>18, 21-25)</sup>

臭素酸塩の毒性についてFisherら<sup>26, 27)</sup>はマウス及びラットにおいて KBrO<sub>3</sub>投与104週目に、腫瘍の発現率に増加を認めなかったと報告した。Kurokawaら<sup>28)</sup>はKBrO<sub>3</sub>の発癌性について、F-344ラットを用い KBrO<sub>3</sub> 500ppm及び250ppmの経口投与試験において、腎腫瘍の高率の発現を認めた。さらに、Kurokawaら<sup>29)</sup>はF-344ラットによりN-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine(EHEN)とKBrO<sub>3</sub>との併用投与により、KBrO<sub>3</sub>はその腎腫瘍形成を促進させると報告している。

B[a]Pは石油などの燃焼時に生成する癌原物質であり、生体内での代謝活性化体は7,8-ジヒドロジオ-ル-9, 10-エポキシドであるといわれている。<sup>30-</sup><sup>34)</sup> 既に、食品中には微量の癌原物質としてB[a]Pの検出される事実が報告されている。<sup>35-42)</sup> 一方、食品添加物のKBrO<sub>3</sub>に限定するなら、使用される小麦粉中の残留量は約0.15ppbとの報告がある。<sup>43)</sup>

著者は、KBrO<sub>3</sub>の発癌促進作用の機構を解明する目的で、マウスにKBrO<sub>3</sub>の単独投与とB[a]Pとの短期併用投与実験を行い、一般に腫瘍マーカーとされているα-フェトプロテイン(AFP)量、アルカリホスファターゼ(EC 3.1.3.1, ALP)活性、及びγ-グルタミルトランスぺプチターゼ(EC 2.3.2.2, γ-GTP)活性を指標にした生化学的測定法による検索を試み、以下の知見を得た。<sup>44)</sup>

## 第 1 節 体重変化

Chart 1のプロトコールに従って作成した $\text{KBrO}_3$ -B[a]Pの併用投与群(A-E群),  $\text{KBrO}_3$ のみの単独投与群(F-J群), B[a]P単独投与群(C2群)及び無処理対照群(C1群)につき, 投与開始から2週間における各群の平均体重の推移をFig. 4及びFig. 5に示した.

投与期間中, A群では3日目から体重減少が認められ, 以後, 痩身化が著しかった. 投与開始時の平均体重31.0gに対し, 終了時の体重は28.2gであり, 経時的に減少する傾向が認められた. また, 体重増加量(投与終了体重-投与開始体重)は-2.8g, 体重増加率(体増加量/投与開始体重  $\times$  100)は-9.0%であった. B群においては, 投与開始3日目に体重減少を認めたが7日目に回復し, 投与終了時まで維持し, 全体に体形は小さめであった. 体重増加量は1.6gで, 体重増加率は5.4%であった. 対照群に比してA, B両群では体重減少が認められ, 体重増加量, 体重増加率ともに統計的に有意の差を認めた( $P < 0.01$ ).

$\text{KBrO}_3$ 単独投与のF群(5000ppm)では, A群と同様に体重減少が認められ, 投与開始時の平均体重31.4gに対し, 終了時の平均体重28.4gで体重増加に関しては抑制的傾向が明確であった. 体重増加量は-3.0gであり, 体重増加率は-9.6%で痩身化が認められた. G群では, 3日目に体重減少を認め, 以後回復しているが, 体形は小さめであった. 体重増加量は1.2gで, 体重増加率は4.9%であり, 対照群に対して有意差を認めた( $P < 0.01$ ). C及びD群では, 対照群の増加推移に平行して増加傾向を示した. E群は3日目以降7日目までは対照群を上回る推移を示したが, B[a]P投与後において減少傾向に転じた. H, I, J群(Fig. 5)では, ほぼ対照群に一致する増加推移を示した.

B[a]P単独投与のC2群は対照群に平行する推移を示し, 有意差を認めなかった. C2群とA, B及びC群の間には統計的に有意差を認め( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),  $\text{KBrO}_3$ -

B[a]Pの併用投与群は, B[a]P単独投与群よりも体重増加に関しては抑制的に

作用していた。KBrO<sub>3</sub>-B[a]P併用投与群と、KBrO<sub>3</sub>単独投与群では有意差を認めなかった。

Exptl. groups	KBrO <sub>3</sub> (ppm)	B[a]P mg/kg b.w.	Treatment		
			0	1	2
A	5000	100	Weeks		
B	2500	100			
C	1000	100			
D	500	100			
E	100	100			
F	5000	—			
G	2500	—			
H	1000	—			
I	500	—			
J	100	—			
Control(C1)	—	—			
Control(C2)	—	100			

B[a]P: Benzo(a)pyrene, I: B[a]P treatment.

Chart 1. Experimental Protocol for Evaluation of the Effect of Potassium Bromate

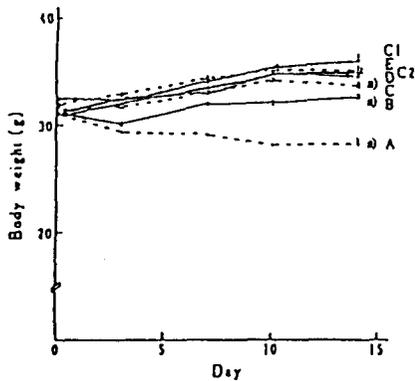


Fig.4. Changes in Body Weight by Administration of Potassium Bromate and Benzo[a]pyrene

A:KBrO<sub>3</sub> 5000ppm+B[a]P, B:KBrO<sub>3</sub> 2500ppm+B[a]P  
 C:KBrO<sub>3</sub> 1000ppm+B[a]P, D:KBrO<sub>3</sub> 500ppm+B[a]P  
 E:KBrO<sub>3</sub> 100ppm+B[a]P, C1:not treatment, C2:  
 KBrO<sub>3</sub> free B[a]P.  
 B[a]P were treated at 100mg/kg weekly in twice.  
 a): Significantly different from C1 at P<0.01.

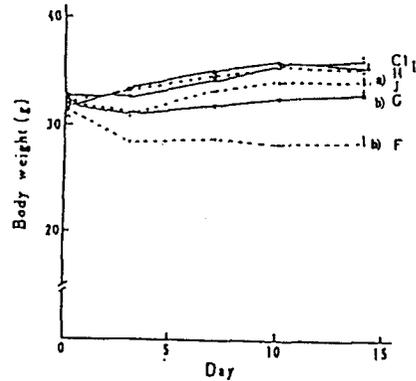


Fig.5. Changes in Body Weight by administration of Potassium Bromate

F:KBrO<sub>3</sub> 5000ppm, G: KBrO<sub>3</sub> 2500ppm  
 H:KBrO<sub>3</sub> 1000ppm, I: KBrO<sub>3</sub> 500ppm  
 J:KBrO<sub>3</sub> 100ppm, C1: not treatment.  
 a):Significantly different from C1 at P<0.05.  
 b):Significantly different from C1 at P<0.01.

## 第 2 節 飲料水摂取量

各群における1匹あたりの日平均飲料水摂取量の推移をFig. 6に示した。

投与期間中，A，B及びF，G群は低値を示し，対照群を下回って推移した。しかし，その他の群では対照群との間に差が認められなかった。A，B，F，G群では味覚の点から忌避反応により，当初飲用しなかったが次第になれて飲用したものと考えられる。これらの群では $\text{KBrO}_3$ は濃度的に高いが，実験期間中継続的に摂取させることが出来た。

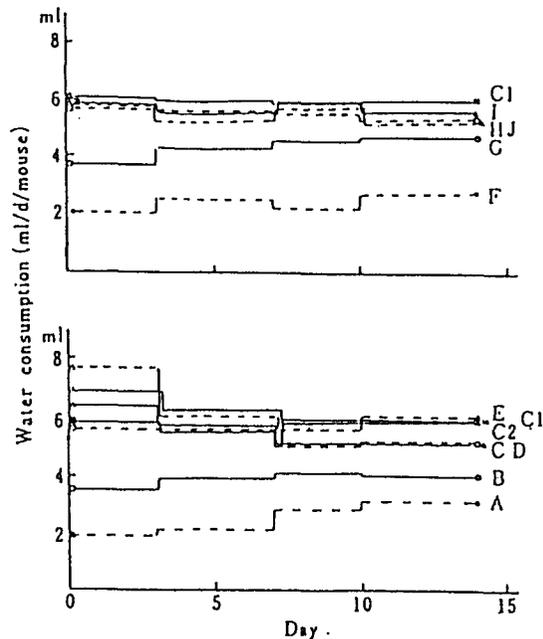


Fig.6. Changes in Consumption of Water Contained Potassium Bromate in Mice

A:  $\text{KBrO}_3$ , 5000 ppm + B(a)P, B:  $\text{KBrO}_3$ , 2500 ppm + B(a)P,  
 C:  $\text{KBrO}_3$ , 1000 ppm + B(a)P, D:  $\text{KBrO}_3$ , 500 ppm + B(a)P,  
 E:  $\text{KBrO}_3$ , 100 ppm + B(a)P, C1: not treated, C2:  
 $\text{KBrO}_3$ , free, B(a)P,  
 F:  $\text{KBrO}_3$ , 5000 ppm, G:  $\text{KBrO}_3$ , 2500 ppm  
 H:  $\text{KBrO}_3$ , 1000 ppm, I:  $\text{KBrO}_3$ , 500 ppm  
 J:  $\text{KBrO}_3$ , 100 ppm.

### 第 3 節 臭素酸カリウム総摂取量

第 2 節に示した飲料水摂取量に基づき、実験動物当りの試験期間累積検体  $\text{KBrO}_3$  投与量を算出した結果を Table 4 に示した。

全試験期間を通して、 $\text{KBrO}_3$  の総投与量は、 $\text{KBrO}_3$ -B[a]P 併用投与群では、9.6-183.5mg/匹であった。また、 $\text{KBrO}_3$  単独投与群では 8.4-178.0mg であった。これらの投与量は、終了時の各群の平均体重から換算すると、前者では 0.27-6.51g/kg、後者では 0.25-6.27g/kg であった。

Table 4. Total Administration of Potassium Bromate

KBrO <sub>3</sub> , mg/mouse/14 d <sup>a)</sup>			
Exptl. groups		Exptl. groups	
A	183.5	F	178.0
B	148.5	G	165.3
C	81.7	H	83.9
D	42.8	I	45.0
E	9.6	J	8.4

a)  $\text{KBrO}_3$ , mg/mouse/14 d is expressed as the average value of animals ( $n=9$ ).

### 第 4 節 臓器重量

各実験群の肝、腎及び肺について臓器重量を測定した結果を Fig. 7 に示した。投与終了時における体重 100g あたりの肝湿重量の平均値は、全投与群において対照群に対し体重比重量の増加が認められた。B[a]P 投与の C2 群に対しては、A, B, C, D, G, H, I 群に有意差が認められた。また、 $\text{KBrO}_3$ -B[a]P 併用投与群と  $\text{KBrO}_3$  単独投与群とでは、C 群と H 群との間に差が認められた。

腎重量では、D 群において対照群に対して体重比重量の減少が認められたが、

その他の群はいずれも平均体重比は増加の傾向がみられ、特に、 $\text{KBrO}_3$ 単独投与群では用量に依存する重量増加が認められた。 $\text{KBrO}_3$ -B[a]P併用投与群と $\text{KBrO}_3$ 単独投与群との間の差は認められなかった。

肺重量では、 $\text{KBrO}_3$ 高濃度投与群で体重比増加が顕著で、B[a]P併用投与群と $\text{KBrO}_3$ 単独投与群とも用量に依存する増加傾向が認められた。また、両群間の差は認められなかった。

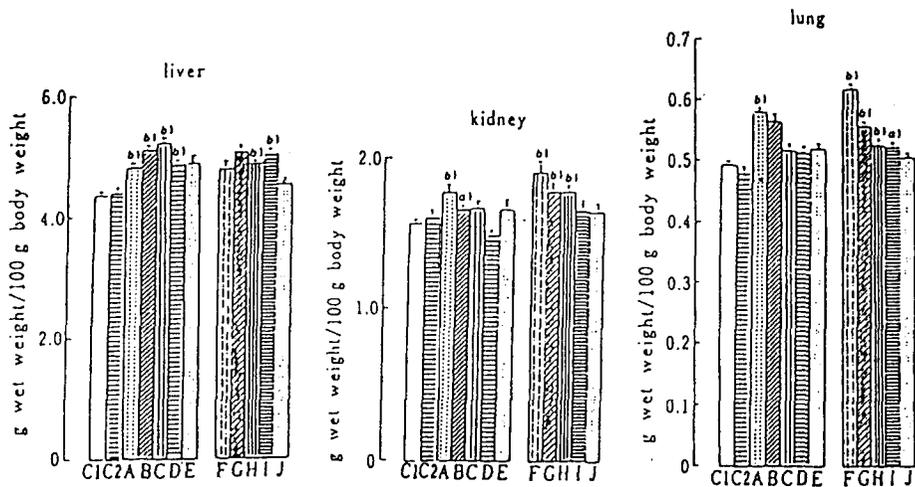


Fig.7. Changes in Wet Weight of the Liver, Kidney and Lung

a) : Significantly different from C1(control) at  $p < 0.05$ .

b) : Significantly different from C1(control) at  $P < 0.01$ .

## 第 5 節 血漿生化学的試験

各実験群の血漿生化学的試験の結果、得られたALP活性値をFig. 8、AFP量をFig. 9に、血漿 $\gamma$ -GTP活性値をFig. 10にそれぞれ示した。

血漿ALP活性はFig. 8に示した様に $\text{KBrO}_3$ -B[a]P併用投与群では、対照群に対してA群で明確な上昇がみられた( $P < 0.01$ )。また、A群はB[a]P単独投与のC2群に対しても統計的に有意に上昇を示した( $P < 0.01$ )。E群は対照群に比して低値で

あり、C2群に比しても同様に低値であった。KBrO<sub>3</sub>単独投与群、特にF群は、対照群に対して明確な上昇傾向がみられた(P<0.01)。また、G群においても上昇が認められた(P<0.05)。I及びJ群では、対照群に対して統計的に低値を示した(P<0.05, P<0.01)。一方、A群とF群の間には、有意差を認めなかった。B群とG群についても同様であった。血漿AFP量は、Fig. 9に示した様にKBrO<sub>3</sub>-B[a]P併用投与群では、A, B, C, D, E群のいずれの群においても上昇傾向を示し、対照群に対して有意差を示した。また、B[a]P単独投与のC2群に比しても有意に高値を示した。KBrO<sub>3</sub>投与群では、F, G, I, J群が対照群に対して統計的に有意な上昇が認められた。C2群との間も同様であった。また、A群とF群、B群とG群の間には、有意差を認めなかった。C群とH群では明確に有意差が認められた。

血漿γ-GTP活性は、Fig. 10のようにKBrO<sub>3</sub>-B[a]P併用投与群ではいずれも対照群より高い傾向を示した。KBrO<sub>3</sub>単独投与群では、高濃度投与群のF, G, H群から高いγ-GTP活性値を測定し得たが、低濃度投与群のI, J群ではγ-GTP活性をほとんど認めなかった。また、AとF群ではA群の方が高い傾向がみられたが、BとG群ではほぼ同様の傾向であった。

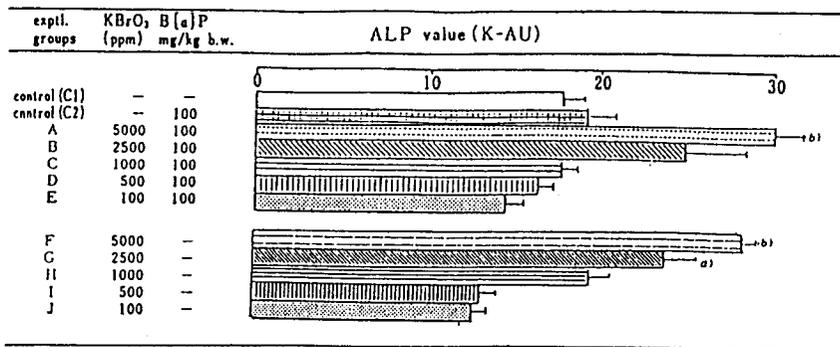


Fig. 8. Changes of Plasma ALP in Administration of Potassium Bromate and Benzo[a]pyrene

The specific activity of ALPase is expressed as King-Armstrong Unit (K-AU).  
The values are expressed as phenol mg released /15 min/100 ml plasma.

- a) : Significantly different from C1(control) at p<0.05.
- b) : Significantly different from C1(control) at P<0.01.

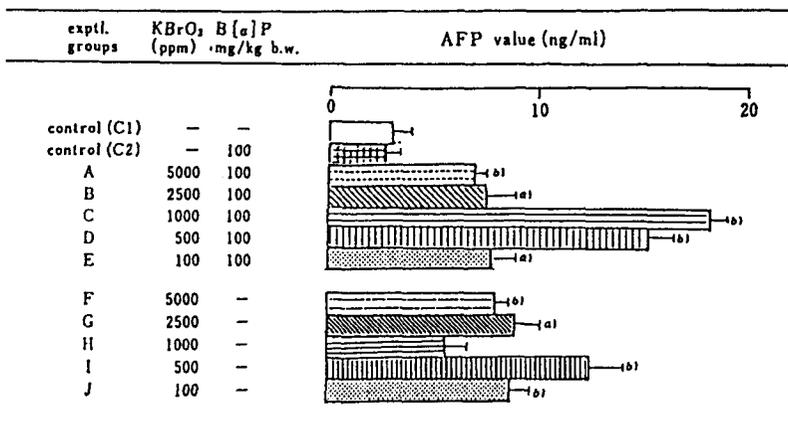


Fig. 9. Changes of Plasma AFP in Administration of Potassium Bromate and Benzo[a]pyrene

a) : Significantly different from C1(control) at  $p < 0.05$ .

b) : Significantly different from C1(control) at  $P < 0.01$ .

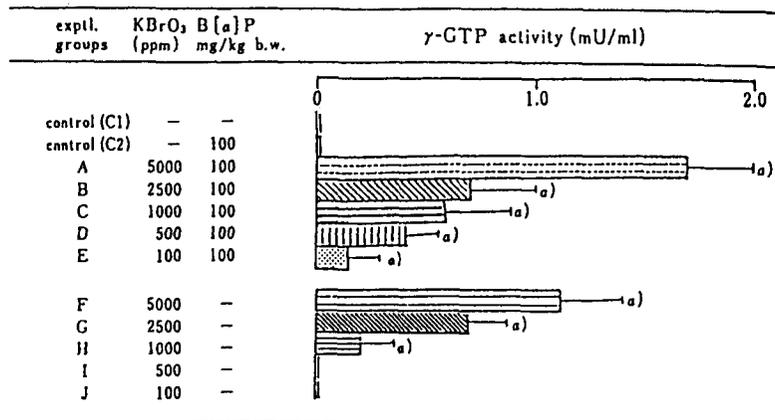


Fig. 10. Changes of Plasma  $\gamma$ -GTP in Administration of Potassium Bromate and Benzo[a]pyrene

The specific activity of  $\gamma$ -GTPase is expressed as nmoles  $\alpha$ -naphthylamine released/min/ml plasma.

a) : Significantly different from C1(control) at  $P < 0.01$ .

## 第 6 節 肝 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチターゼ活性

各実験群の肝  $\gamma$ -GTP活性値をTable 5に示した.

KBrO<sub>3</sub>-B[a]P併用投与群では, 5000ppm(A群), 2500ppm(B群)及び100ppm(E群), KBrO<sub>3</sub>単独投与群では 5000ppm(F群), 2500ppm(G群), 1000ppm(H群)において対照群(C1群)に比して有意(P<0.01)の上昇傾向が認められた. また, 併用投与群と単独投与群では, 100ppm(EとJ群)において, 併用投与群に増加傾向が認められたが, 他の群での差は認められなかった.

Table 5. Specific Activities of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase ( $\gamma$ -GTPase) in Liver

Exptl. groups	n	$\gamma$ -GTP	Exptl. groups	n	$\gamma$ -GTP
A	7	0.40±0.06 <sup>a)</sup>	F	5	0.46±0.10 <sup>a)</sup>
B	8	0.48±0.07 <sup>b)</sup>	G	8	0.41±0.03 <sup>b)</sup>
C	9	0.17±0.03	H	8	0.45±0.03 <sup>b)</sup>
D	8	0.36±0.05	I	8	0.39±0.06
E	8	0.52±0.05 <sup>b)</sup>	J	7	0.30±0.06
			C1	8	0.24±0.03
			C2	7	0.45±0.05 <sup>b)</sup>

Values are expressed as mean±SE.

The specific activity of  $\gamma$ -GTPase is expressed as nmoles *p*-nitroanilide released/min/mg protein.

a) Significantly different from C1(control) at  $p<0.05$ .

b) Significantly different from C1(control) at  $P<0.01$ .

## 第 7 節 本章のまとめ・考察

食品添加物として市販されているKBrO<sub>3</sub>を, 5種の濃度(100, 500, 1000, 2500, 5000ppm)の水溶液とし, マウスに飲用させた. KBrO<sub>3</sub>単独投与群並びにKBrO<sub>3</sub>-B[a]P併用投与群について, 体重変化, 剖検, 臓器重量変化, 血漿生化学的試験, 肝  $\gamma$ -GTP活性を測定し, 毒性発現様式の相違を比較検討した. その結果, 高濃度KBrO<sub>3</sub>(5000-1000ppm)の投与群では単独投与とB[a]P併用投与とにか

かわらず、両群共に $\text{KBrO}_3$ の用量依存的な体重増加の抑制が認められた。特に $\text{KBrO}_3$ 最高濃度のA, F群では試験期間中に約180mg/匹の $\text{KBrO}_3$ を摂取し、投与開始時より、体重減少の経過をたどりながら死亡例をみなかったことは、 $\text{KBrO}_3$ が短期間では比較的速やかに排泄あるいは解毒されることを示唆するものと考えられる。C及びD群では、体重増加は対照群を下回っているが、ほぼ近似した増加曲線を示した。E群では、7日目まで順調に体重増加し、以後対照群を下回った推移を示した。このことは、同濃度の $\text{KBrO}_3$ 単独投与のJ群が対照群に平行する体重曲線を示していることからB[a]P投与による影響と考えられる。 $\text{KBrO}_3$ 単独投与のH及びI群は、対照群を上回りほぼ平行する推移を示し、投与10日目まで継続したが、以後は増加することはなかった。 $\text{KBrO}_3$ の高濃度投与A, B及びF, G群の体重推移曲線は、摂水量に対応していることが示された。これらの4群は、対照群に対して極めて低い摂水量であった。また、対照群に平行する体重推移を示す群は、摂水量においてもおよそ6ml/匹/日の前後を維持していた。E群において投与7日まで対照群を上回る摂水量であることも体重増加に一致した。従って体重増加曲線は、ほぼ摂水量に依存していることが推察された。

$\text{KBrO}_3$ の毒性として、腎障害、血液障害が知られているが、 $\text{KBrO}_3$ 高濃度投与群における体重増加の抑制が $\text{KBrO}_3$ のもつ毒性によるものか、 $\text{KBrO}_3$ 含有飲料水への試験動物の順応性に依存するものか明かではない。

$\text{KBrO}_3$ -B[a]P併用投与群と $\text{KBrO}_3$ 単独投与群における投与期間終了時における剖検所見は肝、腎、肺、のいずれの臓器にも明白な異常は認めなかった。

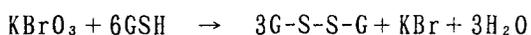
しかし、各臓器の重量を測定した結果、Fig. 7 に示したように両群共に高濃度の $\text{KBrO}_3$ 投与により、有意( $P < 0.01$ )に肝、腎、肺の重量の増加を認めた。

血漿生化学的試験は、血漿中のALP活性、AFP量、 $\gamma$ -GTP活性を測定し、対照群と $\text{KBrO}_3$ 単独投与群及び $\text{KBrO}_3$ -B[a]P併用投与群について比較検討を行った。

血漿ALP活性の測定結果は、Fig. 8 に示したように $\text{KBrO}_3$ -B[a]P併用投与群と、 $\text{KBrO}_3$ 単独投与群共に高濃度の $\text{KBrO}_3$ 投与群(A, B, F, G群)において有意( $P <$

0.01,  $P < 0.05$ )に活性の上昇することを認めたが、 $\text{KBrO}_3$ 濃度1000ppm以下の実験群(C, D, E, H, I, J群)においては有意差を認めなかった。血漿AFP量は、Fig. 9に示したように、 $\text{KBrO}_3$ の投与によって、対照群(C1群)あるいはB[a]P単独投与群(C2群)に比して、いずれも有意に上昇を示した。なかでも $\text{KBrO}_3$ -B[a]P併用投与群中の $\text{KBrO}_3$  1000ppm及び500ppm(C, D群)で $\text{KBrO}_3$ 単独投与群(H, I群)に比して有意な増加あるいは増加傾向が認められた。これは $\text{KBrO}_3$ -B[a]P併用投与による特異的なAFP量の増加現象である。高濃度の $\text{KBrO}_3$ 投与群(A, B, F, G群)においても有意( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )な高値を示したが、C, D群と比べると増加傾向が小さいことが明らかになった。すなわち、血漿中のAFP量は $\text{KBrO}_3$ -B[a]P併用投与のうち高濃度投与群(2500, 5000ppm)と低濃度投与群(100ppm)において、対照群(C1群)の約3倍の上昇が見られたが、 $\text{KBrO}_3$ の投与量に対するAFP値の濃度依存性は顕著に認められない。しかしながら、 $\text{KBrO}_3$ (500, 1000ppm)-B[a]P併用投与群(C, D群)においては対照群(C1, C2群)の約8-10倍の高値を示した。この事実は $\text{KBrO}_3$ とB[a]Pの一定量の投与が腫瘍マーカーの発現に大きく寄与しているものと考えられる。一方、血漿中 $\gamma$ -GTP活性はFig. 10の結果から明らかなように、対照群(C1, C2群)においてはほとんど活性が認められないが、 $\text{KBrO}_3$ 単独投与群並びに $\text{KBrO}_3$ -B[a]P併用投与群において、 $\text{KBrO}_3$ の投与量に比例して $\gamma$ -GTP活性の上昇が認められた。この $\gamma$ -GTP活性の上昇はB[a]Pの併用投与時に特に顕著である。肝 $\gamma$ -GTP活性はTable 5のように未処理の対照群(C1群)に比して $\text{KBrO}_3$ -B[a]P併用投与群(A, B, D, E群)と $\text{KBrO}_3$ 単独投与群(F, G, H, I, J群)はいずれも約1.5-2.0倍の活性上昇を認めた。この結果は $\text{KBrO}_3$ の投与量(100-5000ppm)に大きな濃度差があるにもかかわらず、 $\gamma$ -GTP活性に大きな変動を与えない投与濃度範囲であることを示している。この理由としては $\text{KBrO}_3$ が肝で大量に合成される還元型グルタチオン(GSH)と反応して酸化型グルタチオン(GSSG)に変わることにより、結果的に解毒されるためと理解される。一般に $\text{KBrO}_3$ を投与した場合には生体内GSHの減少状態を惹起することが

知られている。本実験のKBrO<sub>3</sub>単独投与群において、腫瘍マーカーの測定値が高値を示し、KBrO<sub>3</sub>-B[a]P併用投与群において、KBrO<sub>3</sub>単独投与群よりも腫瘍マーカー測定値がさらに高値を示す結果を得た。この結果はKBrO<sub>3</sub>の細胞毒性に対して、B[a]Pが増強効果を有するためと考えられる。これらの結果は、EHENによる腎腫瘍の発現をKBrO<sub>3</sub>が促進するというKurokawaら<sup>28, 29)</sup>の報告を支持するものである。しかしながら、本実験においては初めにKBrO<sub>3</sub>を継続投与し、B[a]P後投与によって腫瘍マーカー測定値の上昇することを確認したので、生体に摂取されたKBrO<sub>3</sub>は還元型グルタチオン(GSH)やシステインとの相互作用により次式のように消滅することが考えられる。



しかしながら、本実験に示したようにKBrO<sub>3</sub>を継続的に投与すると、生体は酸素ラジカルによる酸化的ストレス状態を起こしH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>やO<sub>2</sub><sup>-</sup>の生成と、OH<sup>•</sup>ラジカルによる細胞障害<sup>45)</sup>を誘発するものと推察される。Dendaら<sup>46)</sup>は、ラット肝における発癌剤によるイニシエーションには発癌剤によるDNA障害が起こり、そのDNA部分の修復過程において低メチル化DNAが形成されるとイニシエーションが固定化されて細胞は増殖し、組織γ-GTP fociの増加することを認めている。

細胞は、s期においてDNA合成が開始されるが、生成したDNAはDNA(cystine-5)-methyltransferaseによるメチル化を受けて制限酵素による切断に対して抵抗性を付与されている。

Chenら<sup>47)</sup>は直接発癌剤 N-acetoxy-N'-acetyl-2-aminofluorene, methyl nitrosooureaおよびN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidineの作用機作はDNA-methyltransferase活性を抑制して低メチル化DNAを増加させることが、細胞のイニシエーションであると述べている。

以上の事実から考察すると、KBrO<sub>3</sub>単独投与におけるγ-GTP活性の顕著な濃度依存的上昇は、KBrO<sub>3</sub>がイニシエーターとして寄与していることを積極的に支持するものである。

## 実験の部

### 1. 試薬及び被検溶液

1)  $\text{KBrO}_3$  : 試薬特級, 和光純薬工業社製.

2) B[a]P : approx. 98% シグマ社製品.

3) コーン油 : 林市次商店.

4) ALP kit: アルカリ性ホスファターゼ測定用, 和光純薬工業社製.

5)  $\gamma$ -GTP kit:  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチターゼ測定用, 和光純薬工業社製.

6) AFP kit:  $\alpha$ -フェトプロテイン測定用, 和光純薬工業社製.

7)  $\text{KBrO}_3$  溶液 : イオン交換水を用い,  $\text{KBrO}_3$  100ppm, 500ppm, 1000ppm, 2500ppm及び5000ppm溶液とし, 1週間に2度使用直前に新たに調製した.

8) B[a]P 溶液 : B[a]P 250mgをコーン油に溶かして50mlとした. コーン油1mlはB[a]P 5mgを含有する.

9) 肝  $\gamma$ -GTP測定用試薬 : L- $\gamma$ -グルタミル-P-ニトロアニリド, グリシルグリシン, P-ニトロアニリン (シグマ社製), ポリオキシエチレンノニルフェノール (日光ケミカルズ社製), バルビタールナトリウム (和光純薬工業社製).

10) タンパク質定量用試薬 : 牛血清アルブミン, フェノール試薬 (和光純薬工業社製).

### 2. 実験動物及び飼育条件

日本SLC生産の生後4週令, SPF-ddy 雄マウスを購入し, 1週間予備飼育したのち, 異常の認められないものを用いた. 投与開始時の平均体重は31.6gであった. 実験期間中の飼育環境は温度 $22 \pm 3^\circ \text{C}$ , 湿度 $55 \pm 8\%$ で, 固形飼料 (日本クレア(株), CE-2)と $\text{KBrO}_3$ 添加飲料水を自由摂取させた.

### 3. 投与群及び投与方法

入手したマウスは各群8-9匹で12群とし, 投与期間は2週間とした.  $\text{KBrO}_3$ -

B[a]Pの併用投与群(A-E群), KBrO<sub>3</sub>のみの単独投与群(F-J群), B[a]P単独投与群(Control 2(C2)群)及び無処理対照群(Control 1(C1)群)とした。いずれも経口投与とし、これらの実験群のプロトコールをChart 1に示した。

投与方法は渡辺らの方法<sup>4,8)</sup>に従った。A-E群は、KBrO<sub>3</sub>を飲料水に添加した溶液(100-5000ppm)を1週間自由摂取させた後、体重100mg/kgのB[a]P溶液を1回経口投与した。引き続き1週間KBrO<sub>3</sub>添加飲料水を自由摂取させ、再び、100mg/kgのB[a]Pを経口投与した。F-J群はKBrO<sub>3</sub>添加飲料水(100-5000ppm)のみを2週間自由摂取させた。C1群は、通常飲料水の自由摂取で飼育した対照群であった。C2群は、KBrO<sub>3</sub>無添加の通常飲料水を自由摂取させ、A-E群と同様B[a]Pを1週間毎に2回経口投与した。

#### 4. 体重及び摂水量の測定

投与期間中、全動物の体重を3-4日毎に測定した。また、摂水量(KBrO<sub>3</sub>摂取量)も併せて測定した。

#### 5. 血漿生化学的試験法

2回目のB[a]P投与20時間後に、ハロタン麻酔下で開胸し、心臓より真空採血管(ベノジェクト, テルモVT-AS076)を用いて採血した。採取した血液を遠心分離(3000rpm 15min)して得られた血漿について、ALP活性、AFP量及び $\gamma$ -GTP活性の測定を行った。ALP活性はフェニルリン酸法<sup>49, 50)</sup>に従い酵素単位は血漿100mlが37°Cにおいて15分間基質に作用しフェノール1mgを生成する酵素量を1 King-Armstrong単位(K-A単位)とした。AFP量は酵素免疫測定法<sup>51-53)</sup>に従った。また、 $\gamma$ -GTP活性は $\gamma$ -グルタミル- $\alpha$ -ナフチルアミン基質法<sup>54)</sup>に従った。本法は37°Cにおいて基質から1分間に1 $\mu$ molの $\alpha$ -ナフチルアミンを遊離させる酵素量を1単位とし、血漿1mlが示す単位をmUとした。

#### 6. 肝 $\gamma$ -GTP活性の測定

マウス肝臓1gに対して0.25Mショ糖溶液9mlを加えて10%肝ホモジネート溶液を調製し、このホモジネート溶液について、各群の肝 $\gamma$ -GTP活性を測定した。

測定方法はTamaokiら<sup>55)</sup>の方法に従った。酵素活性単位は、本法により得られたL- $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリドから1分間に1 nmolのp-ニトロアニリンを遊離する酵素量を1単位とした。別に、酵素溶液のタンパク質量をLowry法で定量し、タンパク質1mg当りの比酵素活性nmol/min/mg proteinとして示した。

#### 7. 剖検及び臓器重量

上記の血漿生化学的試験のために採血致死したマウスの剖検を行った。肉眼的観察の後に肺、肝、腎について重量を測定し臓器重量体重比の算出を行った。

#### 8. 統計処理

対照群とその他の実験群の間で体重、摂水量、臓器重量及び血漿生化学的試験について、多くの場合各群毎に平均値±標準誤差で示し、有意差検定はt検定を採用し、1%危険率(\*\* ;  $P < 0.01$ )及び5%危険率(\* ;  $P < 0.05$ )で算出した。

### 第3章 臭素酸カリウム投与時における ビタミンEの効果

KBrO<sub>3</sub>は、小麦粉改良剤として製パン時に使用が認められている食品添加物である。<sup>56)</sup> KBrO<sub>3</sub>の使用量は、臭素酸として小麦粉1kgにつき0.030g以下とされ、使用したKBrO<sub>3</sub>については、最終食品の完成前にKBrO<sub>3</sub>を分解または除去しなければならないと定められている。著者は、さきにKBrO<sub>3</sub>の発癌促進作用機構を解明する目的で、マウスを用いた実験系において比較的高濃度のKBrO<sub>3</sub>溶液とB[a]P併用投与による実験を試み、血漿生化学的検索を行った。<sup>44)</sup> その結果、血漿中の腫瘍マーカー値はKBrO<sub>3</sub>投与により濃度依存的な上昇が認められた。また、B[a]Pを併用投与した場合に腫瘍マーカー値は相加的に上昇した。このことより、KBrO<sub>3</sub>は標的臓器の細胞内において酸素ラジカルを生じ、細胞に損傷を与えることによりそれらの値を上昇させたと推論した。

また、生体内の活性酸素生成による臓器DNA中の8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)が注目され種々報告されている。<sup>57-62)</sup> 著者は、さきの実験結果からKBrO<sub>3</sub>をはじめとする酸素酸塩の活性酸素生成に注目し、臓器DNA中の8-OH-dGについて検討したところ、<sup>63)</sup> KBrO<sub>3</sub>投与群において腎細胞DNA中の8-OH-dG量の増加を認め、Kasaiら<sup>61)</sup>及びSaiら<sup>62)</sup>の報告を支持するものであった。

本研究では、KBrO<sub>3</sub>投与時の毒性発現の因子として活性酸素種の関与<sup>64)</sup>が明らかになったので、さらに抗酸化作用を持つビタミンE(VE)に着目して毒性軽減効果の有無を調べることにした。Shklar<sup>65)</sup>はVEを経口投与する時、発癌抑制作用を示すことを報告している。一方、Saiら<sup>66)</sup>はKBrO<sub>3</sub>による腎障害に対してはVEは影響しないことを報告している。また、Nittaら<sup>67)</sup>はVEの大豆油溶液をラットの皮下に反復注射すると投与部位に腫瘍の形成されることを報告しており、VEの生体内における相互作用については不明な点が多い。そこで著者は、ラットにVE強化食を摂取させ飲料水としてKBrO<sub>3</sub>溶液を継続的に与えた時の肝及び腎

臓のALP活性,  $\gamma$ -GTP活性及び過酸化脂質量の測定並びに血清中の尿素窒素(UN)とクレアチニン量の変化を指標として,  $\text{KBrO}_3$ の毒性発現とVEの抑制効果について検討した。<sup>68)</sup>

## 第 1 節 成育状況と体重

Table 6に示した投与群に従って作成した $\text{KBrO}_3$ -VE強化食群(B群)及びVE強化食のみの対照群(C群)の各群について投与開始時, 投与開始14日目及び29日目の体重を測定した結果についてTable 7に示した。

体重は $\text{KBrO}_3$ 投与群(B-1, 2, 3)では投与開始2週目まではおだやかに上昇したが, 以後減少し, ほぼ初期体重のままで実験を終了し, 1-4匹が死亡した。特に, VE多量摂取群(B-3)では4匹が死亡した。この死亡は, 実験終了の4日前であった。また, 対照群(C-1, 2, 3)では順調に体重増加が認められ, すべてのラットが生存した。従って, 上記の $\text{KBrO}_3$ 投与群におけるラットの死亡については, 主なる死因は $\text{KBrO}_3$ 摂取によるものと考えられた。

Table 6. Effects of Vitamin E on Potassium Bromate Administration to Rats

Eptl. groups	n	$\text{KBrO}_3$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Vitamin E <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )
KBrO <sub>3</sub> +Vitamin E			
B-1	6	1000	70 <sup>b)</sup>
B-2	6	1000	320
B-3	6	1000	1070
Vitamin E			
C-1	6	0	70 <sup>b)</sup>
C-2	6	0	320
C-3	6	0	1070

a) dl- $\alpha$ -tocopherol acetate.

b) Commercial diet(CE-2) contained about 70  $\mu\text{g/g}$  of VE.

Table 7. Changes in the Body Weight by the Administration of Potassium Bromate

Exptl. groups	n	Body weight					
		Initial(g)		14th d(g)		29th d(g)	
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin E							
B-1	6	202.7 ± 2.2	6	239.2 ± 5.3 <sup>C1)</sup>	5	203.1 ± 4.3 <sup>C1)</sup>	
B-2	6	196.9 ± 2.9	6	229.5 ± 7.7 <sup>C1)</sup>	4	209.9 ± 13.3 <sup>C1)</sup>	
B-3	6	201.0 ± 2.9	6	223.1 ± 5.0 <sup>C1)</sup>	2	205.9 ± 7.3 <sup>C1)</sup>	
Vitamin E							
C-1	6	195.7 ± 2.2	6	284.3 ± 1.3	6	313.6 ± 1.3	
C-2	6	197.3 ± 2.4	6	280.9 ± 4.4	6	324.8 ± 6.7	
C-3	6	195.4 ± 1.8	6	279.5 ± 3.8	6	325.1 ± 6.5	

Values are expressed as the means ± S.E. for 2-6 rats.

C1): Significantly different from C-1 group at  $p < 0.05$

## 第 2 節 臭素酸カリウム及びビタミン E 摂取量

各群のKBrO<sub>3</sub>及びVEの総摂取量をまとめてTable 8 に示した。

KBrO<sub>3</sub>とVE強化飼料摂取群では、飼料中のVE含有量の高い群(B-3)でKBrO<sub>3</sub>溶液の摂取量と摂餌量の減少が認められ、実験終了時までの死亡率が高かった。この結果は、KBrO<sub>3</sub>投与時のVEの多量摂取が毒性を強化するものと推測された。

Table 8. Total Oral Dose of Potassium Bromate and Vitamin E to Rats

Exptl. groups	KBrO <sub>3</sub> , mg/rat/29 d (ml/rat/29 d) <sup>a)</sup>	Vitamin E mg/rat/29 d (g/rat/29d) <sup>b)</sup>
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin E		
B-1	672.3 ± 20.2 <sup>B3)</sup> (672.3 ± 20.2)	25.9 ± 0.3 (370.0 ± 4.5) <sup>B3,C1)</sup>
B-2	685.2 ± 1.5 <sup>B3)</sup> (685.2 ± 1.5)	112.3 ± 0.7 (351.0 ± 2.2) <sup>B3,C2)</sup>
B-3	555.0 ± 31.3 (555.0 ± 31.3)	329.6 ± 11.8 (308.5 ± 11.0) <sup>C1)</sup>
Vitamin E		
C-1	0 (1037.0 ± 7.2)	31.2 ± 1.3 (445.0 ± 18.4)
C-2	0 (1078.5 ± 34.7)	153.0 ± 3.2 (478.0 ± 10.3)
C-3	0 (1079.0 ± 5.8)	509.3 ± 1.7 (476.5 ± 1.6)

Values are expressed as the means ± S.E.

B3,control(C1,C2,C3): Significantly different from B-3 and control

(C-1,C-2,C-3) groups at  $p < 0.05$ .

a): Water intake. b): Feed intake

### 第 3 節 臓器重量

実験終了時、肝、腎及び肺を摘出秤量した。これらの値を体重100 gあたりの換算値とともにTable 9に示した。

肝実測値では、B群の重量は対照C群より減少したが、体重あたりでは差がなかった。腎実測値では、B及びC群の間に差は認められなかった。しかし、体重あたりでは明らかな重量増加が認められた。肺についても体重あたりでは増加が認められた。

Table 9. Effects of Potassium Bromate on the Weight of Liver, Kidneys and Lungs of Rats

Exptl. groups	n	Weight		
		Liver(g) % of body weight	Kidneys(g) % of body weight	Lungs(g) % of body weight
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin E				
B-1	5	6.0 ± 0.3 <sup>C1)</sup>	2.4 ± 0.1	0.9 ± 0.0 <sup>C1)</sup>
		3.0 ± 0.1	1.2 ± 0.0 <sup>C1)</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>C1)</sup>
B-2	4	6.3 ± 0.5 <sup>C1)</sup>	2.5 ± 0.1	0.9 ± 0.0 <sup>C1)</sup>
		3.0 ± 0.1	1.2 ± 0.0 <sup>C1)</sup>	0.4 ± 0.0 <sup>C1)</sup>
B-3	2	6.6 ± 0.1 <sup>C1)</sup>	2.4 ± 0.0	1.0 ± 0.1 <sup>C1)</sup>
		3.2 ± 0.1	1.2 ± 0.0 <sup>C1)</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>C1)</sup>
Vitamin E				
C-1	6	10.1 ± 0.2	2.3 ± 0.0	1.1 ± 0.0
		3.2 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.0
C-2	6	10.0 ± 0.3	2.3 ± 0.0	1.2 ± 0.0
		3.1 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.0
C-3	6	10.2 ± 0.3	2.4 ± 0.1	1.2 ± 0.0
		3.1 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.0

Values are expressed as the means ± S.E.

C1): Significantly different from C-1 group at  $p < 0.05$ .

### 第 4 節 血清成分の分析

血清中の尿素窒素(UN)量及びクレアチニン量を測定し、Table 10に示した。また、ALP、 $\gamma$ -GTP、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(EC 2.6.1.2, GPT)及びグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(EC 2.6.1.1, GOT)活性について Table 11に示した。

UN量では、B-2及びB-3群で明らかにC-1群を上回った。B-2群では約1.4倍、B-3群では約2.5倍のUN量を検出した。この場合のC群のUN量はVE摂取量による影

響が認められない。しかし、B群では例数が少ないがVE摂取量に依存してUN量は上昇し、腎機能の低下が予測された。クレアチニン量では、B-1及びB-3群においてC-1群を上回り、それぞれ約2倍以上の値を示した。しかし、B-2群では対照群と同程度であった。このことから、B-1、B-2、B-3群のクレアチニン量は同一濃度のKBrO<sub>3</sub>投与の値を反映し、VE依存性はないものと考えられた。むしろ、VE摂取によって障害が強まるような結果が示された。腎機能障害の指標として求めたUN量及びクレアチニン量はKBrO<sub>3</sub>投与群(B-1、B-3)では明らかに対照群(C-1、C-3)よりも高くVE量に非依存的な腎障害の起こる可能性が示された。血清ALP活性は、対照群(C-1、2、3)ではVE摂取量が増すと高値となる傾向がみられるが、KBrO<sub>3</sub>とVE強化飼料摂取群B-1、B-2及びB-3群では対照群のそれぞれ75%、71%及び87%に低下した。γ-GTP活性は、対照群ではVEの摂取量の増加に伴って低い値を示した。しかし、KBrO<sub>3</sub>投与群ではVE摂取による有意差はみられないが増加する傾向を示した。GPT活性については、対照群ではVEの関与がみられなかった。KBrO<sub>3</sub>投与群でVEの摂取量が高いB-3群では上昇傾向を示したが有意差ではなかった。GOT活性についても同様な傾向がみられ、高用量のVEとKBrO<sub>3</sub>の併用投与によって肝機能の低下することが予測された。

Table 10. Effects of Potassium Bromate on UN and Creatinine Contents in Rat Serum

Exptl. groups	"	UN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin E			
B-1	5	29.34 ± 7.27	0.56 ± 0.06 <sup>C1)</sup>
B-2	4	35.27 ± 2.95 <sup>C1)</sup>	0.33 ± 0.12
B-3	2	62.85 ± 3.15 <sup>C1)</sup>	0.52 ± 0.01
Vitamin E			
C-1	6	25.42 ± 2.23	0.23 ± 0.11
C-2	6	28.16 ± 1.57	0.37 ± 0.12
C-3	6	28.35 ± 1.69	0.27 ± 0.09

Values are expressed as the means ± S.E.

C1): Significantly different from C-1 group at  $p < 0.05$ .

Table 11. Changes in Serum Enzyme Activities upon the Oral Dose of Potassium Bromate in Rats

Exptl. groups	n	ALP (mU/ml)	$\gamma$ -GTP (mU/ml)	GPT (mU/ml)	GOT (mU/ml)
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin E					
B-1	5	123.5 $\pm$ 15.1 <sup>C1)</sup>	0.4 $\pm$ 0.0	37.6 $\pm$ 4.5	115.8 $\pm$ 5.6
B-2	4	160.6 $\pm$ 24.6	2.3 $\pm$ 1.0	34.3 $\pm$ 1.4	104.0 $\pm$ 2.1
B-3	2	188.5 $\pm$ 45.5	1.5 $\pm$ 0.5	63.0 $\pm$ 2.5	144.5 $\pm$ 22.5
Vitamin E					
C-1	6	163.8 $\pm$ 11.1	1.2 $\pm$ 0.7	35.0 $\pm$ 2.4	104.8 $\pm$ 12.4
C-2	6	223.8 $\pm$ 19.7 <sup>C1)</sup>	0.3 $\pm$ 0.2	30.3 $\pm$ 2.4	102.2 $\pm$ 9.7
C-3	6	214.0 $\pm$ 10.4 <sup>C1)</sup>	0.0 $\pm$ 0.0	38.2 $\pm$ 2.2	94.0 $\pm$ 4.7

Values are expressed as the means  $\pm$  S.E.

C1): Significantly different from C-1 group at  $p < 0.05$ .

## 第5節 肝及び腎の酵素活性とグルタチオン量

肝及び腎のALP,  $\gamma$ -GTP, GPT及びGOT活性について測定し, 結果をTable 12及び13に示した. また, GSH量についてTable 14に示した.

肝のALP及び $\gamma$ -GTP活性(Table 12)が僅かではあるがB群で認められた. これらの酵素は本来, 肝には認められないことから肝障害が予測された. また, B-3群のGPT活性は対照群C-3の約50%に低下している. しかしながら, 血清中のB-3群のGPT活性(Table 11)はC-3群の1.6倍を示しており, 肝のGPTが血清中に滲出していることが推測された. 腎のALP,  $\gamma$ -GTP, GPT及びGOT活性を測定した結果をTable 13に示した. ALP活性はKBrO<sub>3</sub>投与群(B-1, 2, 3)で対照群(C-1, 2, 3)の約47%, 55%及び78%に抑制された. また,  $\gamma$ -GTP活性はKBrO<sub>3</sub>投与群(B-1, 2, 3)では, 対照群(C-1, 2, 3)に比べて約57%, 65%及び66%の値が得られた. GOT活性は, KBrO<sub>3</sub>投与群では対照群の約67-70%に低下することが顕著に認められたが, VEの影響はみられなかった.

肝及び腎臓のGSII及びGSSG量を測定した結果をTable 14に示した. GSII量は, B-2群で高い結果であった. 肝臓中のGSII量はKBrO<sub>3</sub>投与群(B-1, 2, 3)と対照群(C-1, 2, 3)との間に有意差はなかった. しかし, 腎臓中のGSII量はKBrO<sub>3</sub>投与群に僅かに上昇が認められ, 一方, GSSG量は有意差は認められなかった. Saiらは

KBrO<sub>3</sub>の単回腹腔内投与により、GSH量が6-72時間後において上昇することを報告している。<sup>6,11)</sup> これらのことから、酸化ストレス状態においてはGSH量の上昇する機構が存在することを示していると考えられた。

Table 12. Changes in the Oral Dose of Potassium Bromate on the Enzyme Activities in Rat Liver

Exptl. groups	n	ALP (mU/mg protein)	$\gamma$ -GTP (mU/mg protein)	GPT (mU/mg protein)
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin E				
B-1	5	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	293 ± 49
B-2	4	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	248 ± 29
B-3	2	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	152 ± 11
Vitamin E				
C-1	6	0	0.1 ± 0.0	286 ± 36
C-2	6	0	0.1 ± 0.0	234 ± 32
C-3	6	0	0.1 ± 0.0	298 ± 43

Values are expressed as the means ± S.E.  
GOT: Negligible

Table 13. Changes in the Oral Dose of Potassium Bromate on the Enzyme Activities in Rat Kidneys

Exptl. groups	n	ALP (mU/mg protein)	$\gamma$ -GTP (mU/mg protein)	GPT (mU/mg protein)	GOT (mU/mg protein)
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin E					
B-1	5	66 ± 10 <sup>***</sup>	200 ± 20 <sup>***</sup>	6 ± 1	440 ± 40 <sup>***</sup>
B-2	4	72 ± 10	240 ± 20	7 ± 1	440 ± 60
B-3	2	90 ± 10	250 ± 40	7 ± 1	460 ± 10 <sup>***</sup>
Vitamin E					
C-1	6	140 ± 10	350 ± 30	7 ± 1	630 ± 60
C-2	6	130 ± 20	370 ± 60	8 ± 1	660 ± 110
C-3	6	115 ± 20	380 ± 40	8 ± 1	660 ± 40

Values are expressed as the means ± S.E.  
C1, C3): Significantly different from C-1 and C-3 groups at  $p < 0.05$ .

Table 14. Changes in GSH and GSSG Contents of Liver and Kidneys Caused by the Oral Dose of Potassium Bromate in Rats

Exptl. groups	n	Liver		Kidneys	
		GSH $\mu$ g/g	GSSG $\mu$ g/g	GSH $\mu$ g/g	GSSG $\mu$ g/g
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin E					
B-1	5	1802 ± 418	433 ± 155	326 ± 54	174 ± 21
B-2	4	2332 ± 606	433 ± 122	297 ± 60	183 ± 28
B-3	2	2141 ± 485	530 ± 70	252 ± 30	143 ± 15
Vitamin E					
C-1	6	2004 ± 441	380 ± 34	302 ± 100	151 ± 19
C-2	6	2120 ± 245	428 ± 57	262 ± 43	141 ± 15
C-3	6	1858 ± 315	414 ± 85	266 ± 17	140 ± 12

Values are expressed as the means ± S. D.  
B1, C1): Significantly different from B-1 and C-1 groups at  $P < 0.05$ .

## 第 6 節 チオバルビツール酸反応性 物質量の測定

血清及び肝，腎のホモジネートについてチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)量を測定した結果をTable15に示した。

脂質過酸化の指標とされるTBARS量については血清では，KBrO<sub>3</sub>投与群(B)は対照群(C)の約50%に低下し，VE摂取量に依存しなかった。また，腎臓ではKBrO<sub>3</sub>投与群(B-3)で低い傾向を示した。これに対して，対照群(C-2, 3)ではVE摂取量に依存したTBARS量の低下を認めた。

著者は第1章第2節の代謝実験において，KBrO<sub>3</sub>投与後の臓器組織中に臭素酸塩が認められないことを報告した。<sup>16)</sup>このことはGSH関与によりKBrO<sub>3</sub>が，細胞膜の脂質過酸化のために利用されるためと考えられた。そこで，VE強化飼料を与えた時の組織中のTBARS量を測定し，KBrO<sub>3</sub>の脂質過酸化作用におけるVE及びGSHの関与を検索した。その結果KBrO<sub>3</sub>投与によってGSH量の有意な上昇が認められた。一方，強化飼料中のVEは，肝及び腎組織の脂質過酸化に対して抑制的に作用していることが観察された。

Table 15. Changes in TBARS Contents of Liver, Kidneys and Serum Caused by the Oral Dose of Potassium Bromate in Rats

Exptl. groups	n	TBARS	TBARS	TBARS
		(nmol as MDA/g) Liver	(nmol as MDA/g) Kidneys	(nmol as MDA/ml) Serum
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin E				
B-1	5	168.9 ± 22.5	103.2 ± 3.4	8.7 ± 0.9 <sup>CI)</sup>
B-2	4	100.7 ± 22.5 <sup>CI)</sup>	115.0 ± 6.0	9.6 ± 0.7
B-3	2	106.9 ± 9.7 <sup>CJ)</sup>	62.0 ± 1.2 <sup>CI)</sup>	8.8 ± 1.6
Vitamin E				
C-1	6	223.4 ± 30.2	137.2 ± 11.4	16.7 ± 2.8
C-2	6	99.9 ± 10.4 <sup>CI)</sup>	93.3 ± 4.2 <sup>CI)</sup>	14.5 ± 1.7
C-3	6	82.3 ± 5.9 <sup>CI)</sup>	90.4 ± 7.2 <sup>CI)</sup>	11.4 ± 0.9

Values are expressed as the means + S.E.

BI, CI, CJ): Significantly different from B-1, C-1 and C-3 groups at  $p < 0.05$ .

## 第7節 本章のまとめ・考察

第2章においては、 $\text{KBrO}_3$ による毒性の発現は標的臓器の細胞内で酸素ラジカルを産生し、直接細胞に損傷を与えるものと推論した。そこで、本章では、 $\text{KBrO}_3$ の毒性発現因子として活性酸素種の関与に対して、抗酸化作用を持つVEに着目し、VEの毒性軽減作用の有無について検討を行った。ラットを用い、 $\text{KBrO}_3$  1000  $\mu\text{g/ml}$ 溶液を飲料水として与えた。飼料にはVEを強化したものを調製し、それぞれ自由摂取とした。本実験結果から、高濃度 $\text{KBrO}_3$ 投与下VEの継続投与において血清中のALP活性は低下したが、VEの強化飼料により、酵素活性値の低下を阻止する作用が観察された。また、 $\text{KBrO}_3$ 投与による血清中のUN及びクレアチニン量の増加に対して、VEは明かな抑制効果を示さなかった。また、臓器TBARS量はVEの摂取量に依存して抑制され、膜酸化に対してVEが抑制的に作用することが予測され、 $\text{KBrO}_3$ の毒性に対してVEの効果を明らかにすることが出来た。

## 実験の部

### 1. 試薬

- 1)  $\text{KBrO}_3$  : 試薬特級, 和光純薬工業社製.
- 2) VE : dl- $\alpha$ -tocopherol acetate, シグマ社製.
- 3) 2-チオバルビツール酸(TBA) : メルク社製. 1.1.3.3-テトラエトキシプロパン : 東京化成工業社製.
- 4) 過酸化脂質キット : 和光純薬工業社製.
- 5) その他の試薬 : 試薬特級あるいはそれに準ずるものを使用した.

### 2. 装置

- 1) 生化学自動分析装置 : (株)ニッテク SUPER Z 818型.
- 2) 分光蛍光光度計 : 日本分光工業(株), FP-777型.

### 3. 被検溶液及び飼料の調製

- 1)  $\text{KBrO}_3$ 溶液 : イオン交換水を用い,  $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液とし, 1週間に2度調製した.
- 2) 飼料 : 市販飼料(日本クレア社製 CE-2, VE 70ppm)を対照飼料とした. 別に同一ロットの対照飼料にVEを250及び1000ppm添加した固形飼料を調製した.

### 4. 実験動物及び飼育条件

生後5週令, SPF-SD雄ラット(日本エスエルシー(株))を購入し, 1週間対照飼料で飼育したのち, 異常の認められないものを1群6匹として実験に用いた. 温度 $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ , 湿度 $55 \pm 8\%$ で飼育し, 飼料と $\text{KBrO}_3$ 溶液を自由に摂取させた.

### 5. 投与群及び投与方法

投与実験群をTable 6に示した.  $\text{KBrO}_3$ とVE強化飼料投与群をB群とし, VE強化飼料のみを与えた対照群をC群とした. B及びC群のVE強化飼料はVEとしてそれぞれ70, 320及び $1070 \mu\text{g}/\text{g}$ を含み, それぞれB-1, B-2, B-3及びC-1, C-2, C-3群とした. B-1, 2, 3群には,  $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ の $\text{KBrO}_3$ を実験期間の4週間摂取さ

せた。C-1, 2, 3群には,  $\text{KBrO}_3$ 無添加のイオン交換水を飲料水として自由に摂取させた。本実験系では, 飼料中での $\text{KBrO}_3$ の反応を考慮し, 水溶液として投与することとした。また, VEは継続的に投与することを目的としたために飼料への添加とした。

#### 6. 体重, 摂水量及び摂餌量

体重は実験期間中1週間に2回測定した。その際に飲料水としての $\text{KBrO}_3$ 溶液及び摂餌量について測定した。

#### 7. 臓器重量

$\text{KBrO}_3$ 投与終了後, 採血致死したラットについて, 肉眼的観察の後に肝, 腎, 肺を摘出秤量した。

#### 8. 試料の調製

投与終了後, ハロタン麻酔下に開胸し, 心臓より真空採血管を用いて採血した。採取した血液は $1600 \times g$ , 15分間遠心分離し, 血清を得た。この血清について, UN量, クレアチニン量及び酵素ALP,  $\gamma$ -GTP, GPT及びGOTの測定を行った。また, 各群の摘出肝及び腎臓については, 重量の9倍の1.15%塩化カリウム溶液でホモジナイズした。ホモジネートの一部は過酸化脂質測定のための試験溶液とし, 残りは $3^\circ\text{C}$ ,  $10000 \times g$ , 10分間遠心分離し上清をALP,  $\gamma$ -GTP, GPT, GOT活性, 総タンパク質測定のための試験溶液とした。また, 肝及び腎臓のグルタチオンについてはHissinら<sup>69, 70)</sup>の方法により試験溶液を調製した。

#### 9. 測定方法

UN量はウレアーゼ法, クレアチニンはピクリン酸法, ALPはp-ニトロフェニルリン酸法,  $\gamma$ -GTPは $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド法, GPT, GOTはUV法によりそれぞれ生化学自動分析装置により測定した。過酸化脂質については, TBA法により, 血清の場合は過酸化脂質キット(八木法, 蛍光法)を用いた。また, 肝, 腎ホモジネートについては嵯峨井ら<sup>70)</sup>の方法に従った。グルタチオンはオルトフタルアルデヒドによる蛍光法<sup>69, 70)</sup>に従った。

数値は、各群毎に平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、t検定の後 5% 危険率( $P < 0.05$ )で求めた。

## 第4章 臭素酸カリウム投与時における ビタミンCの効果

KBrO<sub>3</sub>は、製パン時に使用が認められている食品添加物である。<sup>56)</sup> 本物質の食品中からの残存は見いだされなかったが、<sup>25)</sup> 使用量の過誤による中毒発生の可能性もある。Kurokawaら<sup>28)</sup>は、ラットにKBrO<sub>3</sub>(250及び500ppm)を経口投与する時、腎腫瘍が高率に発現することを認めている。KBrO<sub>3</sub>は過酸化物質としての性質を有し、多量摂取時に生体は酸化的ストレス状態に陥ることが考えられるが、このような酸化的状態において、抗酸化剤のビタミンC(VC)を同時に経口摂取させた時の生体内における相互作用については不明の点が多い。著者はすでに、KBrO<sub>3</sub>の大量投与実験において、ラットにおいては胃から速やかに消失し、臓器蓄積性は認められないが、肝、腎、脾に血色素沈着、うっ血が観察されたことから、吸収された臭素酸塩は生体内酸化還元系と反応して細胞に障害を示すものと考えた。<sup>16)</sup> 一方、毒性評価の指標のひとつとしてKBrO<sub>3</sub>をマウスに投与し、血液中のALP及びγ-GTP活性の測定を試みたところ、KBrO<sub>3</sub>投与により、ALP、γ-GTP活性値に増加が見られた。したがって、吸収されたKBrO<sub>3</sub>が細胞内で活性酸素を生成し、細胞に損傷を与えたものと推察した。<sup>44)</sup> 一方、KBrO<sub>3</sub>投与により、腎DNA中の8-OH-dG生成量の増加することが認められ、KBrO<sub>3</sub>に由来するヒドロキシラジカル(OH<sup>•</sup>)などの活性酸素種の生成が予測された。<sup>62・63)</sup> また、肝ミクロゾームを用いた *in vitro* の反応系において、KBrO<sub>3</sub>とGSHの直接反応によりthyl radical(GS<sup>•</sup>)を生成し、酸素の存在下でperoxylsulfenyl radical(GSOO<sup>•</sup>)を経て、一重項酸素(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)に由来する脂質過酸化反応の進行する過程を検討した。<sup>64)</sup> これらの結果から、抗酸化剤であるVEに着目し、KBrO<sub>3</sub>の毒性発現への抑制効果を検討したところ、腎におけるALP及びγ-GTP活性値の低下と、腎におけるTBARS量が顕著に低下することを認めた。しかしながら、KBrO<sub>3</sub>と共に高濃度のVE(320, 1070 μg/g)含有飼料飼育群では、VE濃度に比例して死亡率

が高く、 $\text{KBrO}_3$ の毒性を高めていることを示唆する結果を得た。<sup>68)</sup>そこで、本実験では抗酸化作用をもつVC強化食と $\text{KBrO}_3$ を同時に摂取させる実験系を用いて、 $\text{KBrO}_3$ の毒性に及ぼすVCの影響について検討した。<sup>71)</sup>

## 第 1 節 成育状況と体重

$\text{KBrO}_3$ -VC強化食群(B群)及びVC強化食のみの対照群(C群)の各実験群はTable 16に従って作成した。各群の投与開始時、投与開始15日目及び29日目の体重を測定した結果をまとめてTable 17に示した。

体重は対照群では順調な増加が認められた。 $\text{KBrO}_3$ 投与群では投与開始15日目までは増加したが、対照群を下回っていた。実験終了時では明らかに $\text{KBrO}_3$ 投与群の体重は対照群を下回った。実験期間中における死亡例はなく、すべてのラットが生存した。 $\text{KBrO}_3$ 投与群のうち、B-1群の体重はVC摂取量の多いB-3群の体重を下回った。しかし、B-2群とB-3群では差がなかった。

Table 16. Effects of Vitamin E on Potassium Bromate Administration to Rats

Exptl. groups	n	$\text{KBrO}_3$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Vitamin C <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )
<b><math>\text{KBrO}_3</math>+Vitamin C</b>			
B-1	6	500	310 <sup>b)</sup>
B-2	6	500	1310
B-3	6	500	3310
<b>Vitamin C</b>			
C-1	6	0	310 <sup>b)</sup>
C-2	5	0	1310
C-3	6	0	3310

a) L-Ascorbyl stearate was used.

b) Commercial diet (CE-2) contained about 310  $\mu\text{g/g}$  of VC.

Table 17. Changes in the Body Weight by the Administration of Potassium Bromate

Exptl. groups	Body weight						
	Initial (g)		15th d (g)		29th d (g)		
	"	"	"	"	"	"	
KBrO <sub>3</sub> +Vitamin C	B-1	6	191.3±10.1	6	255.8±10.3 <sup>***</sup>	6	259.0± 6.6 <sup>***</sup>
	B-2	6	191.2± 5.2	6	259.9±17.2	6	271.7±27.4
	B-3	6	189.6± 9.8	6	257.2± 9.5	6	277.2±12.1 <sup>***</sup>
Vitamin C	C-1	6	195.7± 8.9	6	283.1±13.7	6	320.5±22.0 <sup>*</sup>
	C-2	5	193.0± 9.6	5	277.6±16.7	5	322.9±23.6
	C-3	6	191.5± 3.2	6	277.2±10.3	6	306.2±18.4

Values are expressed as the means±S.D. for 5-6 rats.

B1, C1): Significantly different from B-1 and C-1 groups at  $p < 0.05$

## 第 2 節 臭素酸カリウム及びビタミン C 摂取量

各群のKBrO<sub>3</sub>及びVCの総摂取量をまとめてTable 18に示した。

KBrO<sub>3</sub>投与B-1群は、対照C-1群に比較して摂取量の低下が認められた。また、

VC摂取量の多いB-3群でKBrO<sub>3</sub>溶液の摂取量の減少が認められた。

Table 18. Total Oral Dose of Potassium Bromate and Vitamin C to Rats

Exptl. groups	n	KBrO <sub>3</sub> mg/rat/29 d (ml/rat/29 d) <sup>a)</sup>	Vitamin C mg/rat/29 d (g/rat/29 d) <sup>b)</sup>
KBrO <sub>3</sub> +Vitamin C			
B-1	6	465.0±25.1 (930.5±49.8) <sup>c)</sup>	184.0± 1.2 <sup>c)</sup> (593.5± 3.8) <sup>c)</sup>
B-2	6	455.5±16.9 (911.5±33.4)	870.9±34.1 (665.0±26.3) <sup>c)</sup>
B-3	6	422.5± 6.0 <sup>c)</sup> (845.0±12.0)	2 066.5±12.5 (624.5± 3.8) <sup>c)</sup>
Vitamin C			
C-1	6	0 (1 047.0±21.9)	211.5± 6.0 (684.5±19.1)
C-2	5	0 (998.5±62.9)	924.2±15.3 (705.8±12.0)
C-3	6	0 (952.5±84.8)	2 096.5±59.7 (633.5±18.1)

Values are expressed as the means ± S. D.

B1,C1) : Significantly different from B-1 and C-1 groups at  $p < 0.05$ .

a): Water intake.

b): Feed intake.

### 第 3 節 臓器重量

実験終了時、肝、腎及び肺を摘出して秤量した結果と、体重100 gあたりの重量に換算した値をTable 19に示した。

肝実測値では、KBrO<sub>3</sub>投与群の重量は対照群より減少したが、体重あたりでは差がなかった。腎実測値では、KBrO<sub>3</sub>投与B-3群は対照C-3群を上回った。体重あたりでは、KBrO<sub>3</sub>投与群で重量増加が認められた。肺については、体重あたりでは変化が認められなかった。

Table 19. Effects of Potassium Bromate on the Weight of Liver, Kidneys and Lungs of Rats

Exptl. groups	"	Weight		
		Liver (g) (% of body weight)	Kidney (g) (% of body weight)	Lungs (g) (% of body weight)
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin C				
B-1	6	8.2±0.4 <sup>C1)</sup> (3.2±0.1)	2.4±0.2 (0.9±0.1) <sup>C1)</sup>	1.0±0.1 <sup>C1)</sup> (0.4±0.0)
B-2	6	8.4±1.5 (3.0±0.2)	2.3±0.3 (0.9±0.1) <sup>B1)</sup>	1.1±0.1 (0.4±0.0)
B-3	6	8.3±0.4 (3.1±0.1) <sup>B1)</sup>	2.4±0.2 (0.9±0.1) <sup>B1)</sup>	1.0±0.1 (0.4±0.0)
Vitamin C				
C-1	6	10.1±0.8 (3.1±0.2)	2.3±0.1 (0.7±0.0)	1.2±0.1 (0.4±0.0)
C-2	5	10.5±1.4 (3.1±0.2)	2.3±0.2 (0.7±0.0)	1.1±0.1 (0.4±0.0)
C-3	6	9.5±0.6 (3.1±0.1)	2.1±0.2 (0.7±0.1)	1.1±0.1 (0.3±0.0)

Values are expressed as the means±S.D..

B1,C1) : Significantly different from B-1 and C-1 groups at  $p < 0.05$ .

#### 第4節 血清中の尿素窒素及びクレアチニン量

血清中のUN量及びクレアチニン量を測定した結果を、Table 20に示した。

UN量では、KBrO<sub>3</sub>投与B-1群は僅かではあるが、対照C-1群を上回ったが、クレアチニン量では、変化は認められなかった。

Table 20. Effects of Potassium Bromate on UN and Creatinine Contents in Rat Serum

Exptl. groups	"	UN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin C			
B-1	6	21.93±2.50 <sup>C1)</sup>	0.48±0.06
B-2	6	20.30±1.92	0.53±0.06
B-3	6	20.05±1.23	0.53±0.09
Vitamin C			
C-1	6	17.53±3.74	0.43±0.03
C-2	5	17.82±1.94	0.41±0.04
C-3	6	18.10±2.86	0.42±0.03

Values are expressed as the means±S.D..

C1) : Significantly different from C-1 group at  $p < 0.05$ .

## 第 5 節 血清中の酵素活性

血清中のALP,  $\gamma$ -GTP, GPT及びGOT活性について測定した結果をTable 21に示した。血清ALP活性は, KBrO<sub>3</sub>投与群ではB-1群でもっとも高い値を示したが, 有意な差ではなかった。  $\gamma$ -GTP活性は, KBrO<sub>3</sub>投与群で対照群を下回ったが両群の間に有意な差はなかった。 GPT活性についても有意差は見られなかった。 GOT活性は, KBrO<sub>3</sub>投与群において対照群よりも僅かに高い値を示した。

Table 21. Changes in Serum Enzyme Activities upon the Oral Dose of Potassium Bromate in Rats

Exptl. groups	"	ALP (mU/ml)	$\gamma$ -GTP (mU/ml)	GPT (mU/ml)	GOT (mU/ml)
KBrO <sub>3</sub> +Vitamin C					
B-1	6	193.3±46.6	1.2±1.2	23.3±7.3	63.8± 2.9 <sup>C1)</sup>
B-2	6	154.3±21.8	1.3±1.3	23.0±6.9	66.8± 5.0
B-3	6	173.5±66.0	0.7±0.7	27.7±7.4	76.8±11.6
Vitamin C					
C-1	6	175.8±22.6	1.8±1.7	29.3±3.9	55.3± 2.9
C-2	5	156.4±21.3	1.8±1.8	28.4±4.2	52.4± 7.1
C-3	6	154.2±12.3	0.5±0.5	27.0±6.9	56.7± 6.1

Values are expressed as the means±S.D..

C1) : Significantly different from C-1 group at  $p < 0.05$ .

## 第 6 節 肝及び腎の酵素活性とグルタチオン量

肝及び腎上清画分のALP,  $\gamma$ -GTP, GPT及びGOT活性について測定した結果をTable 22及び23に示した。また, グルタチオン量についてはTable 24に示した。肝のALP活性は, KBrO<sub>3</sub>投与群及び対照群で僅かに検出されたが, 両群の間に差はなかった。肝のGPT活性はKBrO<sub>3</sub>投与群で上昇した。腎のALP,  $\gamma$ -GTP活性

はKBrO<sub>3</sub>投与B-3群で減少し活性低下が認められた。また、GPT活性では、変動が認められなかった。GOT活性は、KBrO<sub>3</sub>投与群では対照群より低下することが認められた。肝GSH及びGSSG量はKBrO<sub>3</sub>投与群と対照群で有意差は認められなかったが、GSSG量はKBrO<sub>3</sub>投与群で若干上昇傾向であった。しかし、VC強化により対照値に近似した。また、腎GSSGについても同様な傾向が認められた。

Table 22. Changes in the Oral Dose of Potassium Bromate on the Enzyme Activities in Rat Liver Cytosol

Exptl. groups	n	ALP (mU/mg protein)	GPT (mU/mg protein)
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin C			
B-1	6	0.8±0.4	214± 40
B-2	6	1.0±0.6	311± 78
B-3	6	0.8±0.4	271±107
Vitamin C			
C-1	6	1.0±0.0	172± 63
C-2	5	1.0±0.0	141± 23
C-3	6	0.8±0.4	152± 36

Values are expressed as the means±S.D.  
 $\gamma$ -GTP and GOT: Negligible

Table 23. Changes in the Oral Dose of Potassium Bromate on the Enzyme Activities in Rat Kidneys Cytosol

Exptl. groups	n	ALP (mU/mg protein)	$\gamma$ -GTP (mU/mg protein)	GPT (mU/mg protein)	GOT (mU/mg protein)
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin C					
B-1	6	192±37	469±45	41±36	1421±209 <sup>c</sup>
B-2	6	168±16	453±33	11± 4	1471±194
B-3	6	124±16 <sup>a</sup>	357±17 <sup>a</sup>	21± 9	1246±105
Vitamin C					
C-1	6	247±95	528±166	30± 5	1947±265
C-2	5	195±51	473±156	12± 1	1703±363
C-2	6	302±60	827±126	31± 3	2276±284

Values are expressed as the means±S.D.

B1,C1) : Significantly different from B-1 and C-1 groups at  $p < 0.05$ .

Table 24. Changes in GSH and GSSG Contents of Liver and Kidneys by the Oral Dose of Potassium Bromate in Rats

Exptl. groups	n	Liver		Kidneys	
		GSH	GSSG	GSH	GSSG
		$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin C					
B - 1	6	1955 ± 321	745 ± 205	377 ± 56	312 ± 73
B - 2	6	2002 ± 250	645 ± 237	306 ± 53	182 ± 22 <sup>B)</sup>
B - 3	6	2023 ± 300	613 ± 166	306 ± 34	204 ± 53 <sup>B)</sup>
Vitamin C					
C - 1	6	1632 ± 167	668 ± 166	286 ± 39	168 ± 32
C - 2	5	1716 ± 57	637 ± 68	319 ± 45	145 ± 24
C - 3	6	1773 ± 163	633 ± 116	336 ± 65	163 ± 14

Values are expressed as the means ± S. D..

B): Significantly different from B-1 group at  $P < 0.05$ .

## 第 7 節 チオバルビツール酸反応性物質量の測定

血清及び肝、腎のホモジネートについて、TBARS量を測定した結果をTable 25に示した。肝におけるTBARS量は、KBrO<sub>3</sub>投与群と対照群に変化は見られなかった。しかし、腎のTBARS量はKBrO<sub>3</sub>投与B-1群では、対照C-1群よりも上昇した。血清のTBARS量は、対照群の場合にはVC摂取量による差は認められなかったが、KBrO<sub>3</sub>投与B-1群では対照C-1群の約7倍に上昇した。

Table 25. Changes in TBARS Contents of Liver, Kidneys and Serum Caused by the Oral Dose of Potassium Bromate in Rats

Exptl. groups	n	TBARS (nmol as MDA/g)	TBARS (nmol as MDA/g)	TBARS (nmol as MDA/ml)
		Liver	Kidneys	Serum
KBrO <sub>3</sub> + Vitamin C				
B-1	6	521.0 ± 146.3	507.0 ± 15.7 <sup>C11</sup>	23.2 ± 9.6 <sup>C11</sup>
B-2	6	507.6 ± 169.4	446.7 ± 61.3 <sup>B11</sup>	14.3 ± 4.0 <sup>B11</sup>
B-3	6	353.9 ± 149.4	425.9 ± 69.2 <sup>B11</sup>	3.3 ± 0.6 <sup>B11</sup>
Vitamin C				
C-1	6	562.9 ± 101.4	377.3 ± 104.7	3.2 ± 0.7
C-2	5	600.8 ± 67.4	403.1 ± 111.5	3.9 ± 0.3
C-3	6	483.5 ± 170.5	425.4 ± 48.7	3.8 ± 0.7

Values are expressed as the means ± S.D.

B1, C11 : Significantly different from B-1 and C-1 groups at  $p < 0.05$ .

## 第 8 節 本章のまとめ・考察

KBrO<sub>3</sub>の毒性軽減効果をVCについて検討した。KBrO<sub>3</sub>は生体内還元性物質であるGSHとの反応により、結果的に解毒消去されると考えられたが、著者はGSHとの反応に際して活性酸素種の生成することが予測されたので種々検討を試み、KBrO<sub>3</sub>とGSHの直接的な反応によりGS・ラジカルの生成を経て<sup>1</sup>O<sub>2</sub>が生成することを報告した。<sup>64)</sup>

Saiら<sup>72)</sup>は、KBrO<sub>3</sub>をF344ラットの腹腔内に単回投与したときの腎毒性の発現について研究を行い、VCの投与によりKBrO<sub>3</sub>による腎DNA中の8-OH-dGの生成は顕著に抑制され、腎の過酸化脂質の生成量もわずかに抑制されることを認めている。著者は第3章において、KBrO<sub>3</sub>の毒性に対するVEの効果を観察するために比較的高濃度(1000 μg/ml)のKBrO<sub>3</sub>溶液を飲用させながら、VE強化飼料(VE 320及び1070 μg/g)を与える実験系で検討したところ、強化したVE量に比例してラットの死亡率が高くなることを認めた。<sup>68)</sup>そこで、本章ではKBrO<sub>3</sub>投与濃度を500 μg/mlとし、普通飼料(VC 310 μg/g)にVCを強化した飼料(VC 1310及び3310 μg/g)を摂取させる実験を行った。KBrO<sub>3</sub>-VC投与群では、対照群(VC強化飼料のみ)に比べて明らかに体重増加は抑制されたが対照群は順調に成育し、KBrO<sub>3</sub>-

VC及び対照群共にすべてのラットが生存した。この結果は、KBrO<sub>3</sub>投与濃度を500 μg/mlに変えたためであると考えられる。総摂餌量では、KBrO<sub>3</sub>-VC投与B-1群で少なく、B-2及びB-3群では対照群との著しい差は見られなかった。また、KBrO<sub>3</sub>投与によって腎重量の増加することは既に知られており、<sup>44, 72)</sup> 本実験においても明らかに腎重量の増加を認めたが、VC強化食摂餌による影響はほとんど見られなかった。肝及び肺の臓器重量への影響は認められなかった。腎機能を示すUN及びクレアチニン量はKBrO<sub>3</sub>投与群で僅かに上昇したが、VCの影響は認められなかった。本実験では体重減少と腎肥大が認められているが、腎機能の障害までには至っていないものと考えられた。血清中の酵素活性については、本実験系で投与した500 μg/mlのKBrO<sub>3</sub>ではALP、γ-GTP、GPT及びGOT活性値に大きな影響は見られなかった。また、これらの酵素活性を肝及び腎上清画分について測定した結果、肝のALP及びGPT活性はKBrO<sub>3</sub>投与群と対照群との間に差は見られなかった。また、γ-GTP及びGOT活性は検出されなかった。γ-GTP活性は肝では極めて低いことが知られており、<sup>73)</sup> 検出されなかったものと考えられた。また、肝GOTのアイソエンザイムの臓器分布では、ミトコンドリアにおいてGOT活性の高いことが知られている。<sup>74)</sup> このため、本実験で用いた細胞上清画分では検出されなかったものと考えられた。腎上清画分におけるALP、γ-GTP、GPT及びGOT活性値は、KBrO<sub>3</sub>-VC投与群においてVC摂取量の増加によって低下する傾向を示した。腎におけるTBARS量はKBrO<sub>3</sub>投与により上昇したが、VC強化食により対照群のレベルに回復した。血清のTBARS量は対照群ではVC摂取による差は見られなかった。しかし、KBrO<sub>3</sub>投与によりTBARS量は上昇し、VC摂取量に依存して減少し、対照群のレベルを示した。以上の結果からKBrO<sub>3</sub>投与は、腎及び血清中のTBARS量を上昇させるが、この上昇はVC投与濃度に依存して明らかに抑制されることがわかった。抗酸化剤の作用は抗酸化剤が細胞障害を示す報告もあり、必ずしも一様ではない。<sup>67, 75)</sup> 著者は、肝ミクロゾーム分画における、KBrO<sub>3</sub>及び還元型グルタチオンの直接反応によるTBARS量の生成から、活性酸素

種の生成を推定した。<sup>64)</sup> 活性酸素種と腎障害については、糸球体への影響が知られているが、<sup>76)</sup> 腎障害と過酸化脂質との関係については不明な点が多い。しかし、腎虚血障害に対し $\alpha$ -トコフェロール投与の有効性が示され、フリーラジカル生成による過酸化脂質の関与が予測されている。<sup>77)</sup> 本研究では、比較的 low 濃度の  $\text{KBrO}_3$  投与による、毒性発現に対する VC の防護効果について検討したが、本実験条件下では顕著な軽減効果を示さないことが示唆された。著者は、 $\text{KBrO}_3$  の酸化作用に基づく臓器の障害作用に対して、抗酸化剤 (GSH, VE, VC) の毒性軽減効果を検討してきたが、高用量の  $\text{KBrO}_3$  と高濃度の抗酸化剤投与実験においては、抗酸化剤のラジカルを相対的に高濃度に形成して酸化促進剤として機能し、 $\text{KBrO}_3$  の毒性を増強する可能性のあることに注目し、更に検討すべき課題であると考えた。

以上の実験結果から、VC の  $\text{KBrO}_3$  毒性軽減効果は腎及び血清中の TBARS 量の上昇に抑制的に作用していることが考えられたが、顕著なものではないと結論した。

## 実験の部

### 1. 試薬

- 1)  $\text{KBrO}_3$  : 試薬特級, 和光純薬工業社製.
- 2) VC : L-Ascorbyl stearate, 和光純薬工業社製.
- 3) 2-チオバルビツール酸(TBA) : メルク社製.
- 4) 1,1,3,3-テトラエトキシプロパン : 東京化成工業社製.
- 5) 過酸化脂質キット : 和光純薬工業社製.
- 6) その他の試薬 : 試薬特級あるいはそれに準ずるものを使用した.

### 2. 装置

- 1) 生化学自動分析装置 : (株)ニッテク, SUPER-Z 818型.
- 2) 分光蛍光光度計 : 日本分光工業(株), FP-777型.

### 3. 被検溶液及び飼料の調製

1)  $\text{KBrO}_3$ 溶液 : イオン交換水を用い,  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液とし, 1週間に2度調製した.

2) 飼料 : 市販飼料(日本クレア社製 CE-2, VC  $310 \mu\text{g}/\text{g}$ )を対照飼料とした. 別に, 同一ロットの対照飼料にL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルを用いて, VCとしてgあたり $1000 \mu\text{g}$ 及び $3000 \mu\text{g}$ を強化した固形飼料を調製した.

### 4. 実験動物及び飼育条件

生後5週令, SPF-SD雄ラット(日本エスエルシー(株))を購入し, 1週間対照飼料で飼育したのち, 1群5-6匹として実験に用いた. 温度 $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ , 湿度 $55 \pm 8 \%$ で飼育し, 飼料と $\text{KBrO}_3$ 溶液を4週間自由に摂取させた.

### 5. 投与群及び投与方法

投与実験群をTable 16に示した.  $\text{KBrO}_3$ とVC強化飼料摂取群をB群とし, VC強化飼料のみを与えた対照群をC群とした. B及びC群のVC強化飼料はVCとして, それぞれ $310$ ,  $1310$ 及び $3310 \mu\text{g}/\text{g}$ を含み, それぞれB-1, B-2, B-3及びC-1, C-2,

C-3群とした。B群には、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\text{KBrO}_3$ を実験期間の4週間摂取させた。C群には、 $\text{KBrO}_3$ 無添加のイオン交換水を飲料水として自由に摂取させた。本実験系では、VCを継続的に投与することを目的としたために飼料への添加とした。

#### 6. 体重、摂水量及び摂餌量

体重は実験期間中1週間に2回測定した。その際に飲料水としての $\text{KBrO}_3$ 溶液及び摂餌量について測定した。

#### 7. 臓器重量

投与終了後、採血致死したラットについて、肝、腎、肺を摘出秤量した。

#### 8. 試料の調製及び測定方法

投与終了後、ハロタン麻酔下に開胸し、心臓より真空採血管を用いて採血し、1600 $\times$ g、15分間遠心分離し、血清を得た。血清について、UN量、クレアチニン量及び酵素ALP、 $\gamma$ -GTP、GPT、GOT活性及び過酸化脂質(チオバルビツール酸反応性物質.TBARS)量を測定した。各群の摘出肝及び腎臓については、重量の9倍の1.15%塩化カリウム溶液でホモジナイズした。ホモジネートの一部は、TBARS量測定のための試験溶液とし、他は3 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 $\times$ g、10分間遠心分離し、上清についてALP、 $\gamma$ -GTP、GPT、GOT活性の測定を行った。測定方法は、UN量(ウレアーゼ法)、クレアチニン量(ピクリン酸法)、ALP(p-ニトロフェニルリン酸法)、 $\gamma$ -GTP( $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド法)、GPT(UV法)及びGOT(UV法)は生化学自動分析装置により測定した。グルタチオンについては、オルトフタルアルデヒドによる蛍光法に従った。<sup>69,78)</sup> 過酸化脂質量は、血清の場合は過酸化脂質キット(八木法、蛍光法)を用いた。また、肝、腎ホモジネートについては、2-thiobarbituric acid(TBA)法によった。<sup>70)</sup> 数値は、各群毎に平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。有意差検定は、t検定の後、5%危険率( $p < 0.05$ )で求めた。

## 第5章 臭素酸カリウムと還元型グルタチオンの反応による活性酸素種の発生と脂質過酸化反応

近年、 $\text{KBrO}_3$ の腎臓に対する障害性<sup>79)</sup>や、腎臓細胞内の核酸塩基に対する修飾作用<sup>61-63, 80)</sup>などが報告されているが、その機構の詳細については報告されていない。一方、 $\text{KBrO}_3$ に由来する脂質過酸化反応が発癌のプロモーション作用として働くことが検討されていることから<sup>81)</sup> 著者は、*in vitro*実験系を用いた $\text{KBrO}_3$ の脂質過酸化反応とその機構について検討した。 $\text{KBrO}_3$ は、生体内還元型グルタチオン(GSH)やシステイン等のSH基を有する還元性物質と反応して分解することが指摘されている。<sup>44)</sup> そこで、まず $\text{KBrO}_3$ との直接的な反応によるGSHの減少を確認し、さらに、不飽和脂肪酸であるリノール酸に対する $\text{KBrO}_3$ の直接的な過酸化反応を紫外吸収法による共役ジエンの測定並びに酸素電極法による酸素吸収速度の測定から検討した。また、肝ミクロゾーム分画による脂質過酸化反応系を用いて、 $\text{KBrO}_3$ の添加による脂質過酸化反応への影響を検討し同反応系に活性酸素ラジカルの捕捉剤を添加した結果から、 $\text{KBrO}_3$ に由来する活性酸素種の発生及び脂質過酸化反応の機構を推測した。<sup>64)</sup>

### 第1節 臭素酸カリウムとグルタチオンの反応性

GSH 100nmol(終濃度0.1mM)に対して $\text{KBrO}_3$ を0-10 $\mu\text{mol}$ (終濃度0-10mM)の濃度段階で添加した結果、Fig. 11に示したように反応溶液中のGSH量は $\text{KBrO}_3$ の添加量の増大に依存して約30nmol(終濃度30 $\mu\text{M}$ )まで減少した。

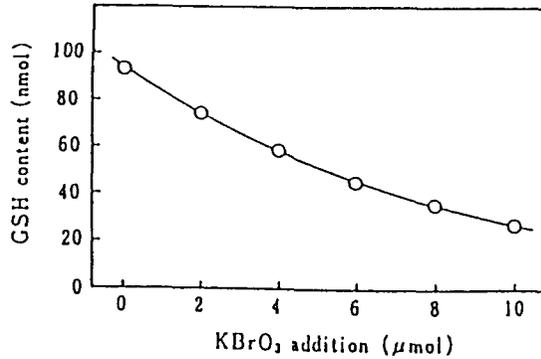


Fig. 11. Relation of the Decrease of GSH Content by the Addition of KBrO<sub>3</sub>

Reaction mixture contained 100 nmol of GSH and 0–10 μ mol of KBrO<sub>3</sub> in 0.1M phosphate buffer(pH 7.4), adjusted to 1.0 ml.

## 第 2 節 臭素酸カリウム及びグルタチオンの添加によるリノール酸の過酸化反応

### 1. 共役ジエンの測定

0.8%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)溶液でミセル状としたリノール酸溶液に、KBrO<sub>3</sub>の一定量(1.0 μ mol : 終濃度0.4mM)を加え、これにGSHを0–10 μ mol(終濃度0–4mM)の濃度段階で添加したときの過酸化反応は、Fig. 12に示したようにGSHの添加量に依存して234nmの吸光度は0.4/minまで増大した。

### 2. 酸素電極法によるリノール酸の過酸化反応の測定

SDSでミセル状としたリノール酸溶液に一定量のGSH(100nmol : 終濃度0.1mM)を加え、KBrO<sub>3</sub>を0–100nmol(終濃度0–0.1mM)の濃度段階で添加したときの酸素吸収速度は、Fig. 13に示したようにKBrO<sub>3</sub>の添加量に依存して約 $0.8 \times 10^{-6}$  M/Sから約 $1.3 \times 10^{-6}$  M/Sまで増大した。

一方、一定量のKBrO<sub>3</sub>(100nmol : 終濃度0.1mM)に対してGSHを0–100nmol(終濃度0–0.1mM)の濃度段階で添加したときの酸素吸収速度はFig. 14に示したように

GSHの添加量に依存して約 $0.7 \times 10^{-6} \text{ M/S}$ から約 $1.2 \times 10^{-6} \text{ M/S}$ まで増大した。

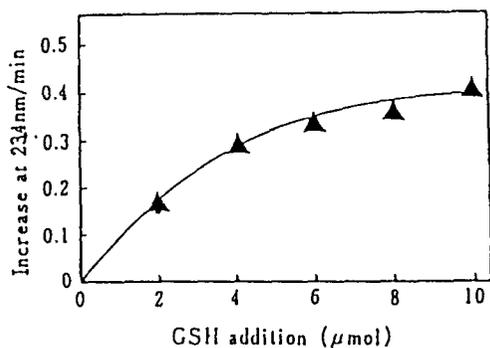


Fig. 12. Effect of the Addition of GSH on the Peroxidation of Linoleic Acid

Reaction mixture contained 2.4 ml of linoleic acid micelle solution,  $1.0 \mu\text{ mol}$  of  $\text{KBrO}_3$  and 0–10  $\mu\text{ mol}$  of GSH, adjusted to 2.5 ml.

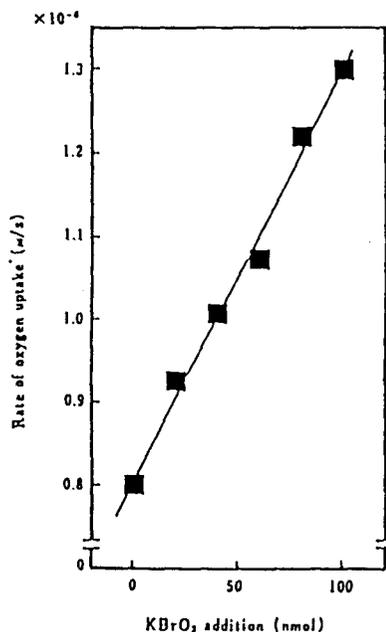


Fig. 13. Effect of the Addition of  $\text{KBrO}_3$  on the Oxygen Uptake of Linoleic Acid

Reaction mixture contained 1 ml of linoleic acid micelle solution,  $0.26 \mu\text{ mol}$  of ferrous ammonium sulfate, 100 nmol of GSH and 0–100 nmol of  $\text{KBrO}_3$ .

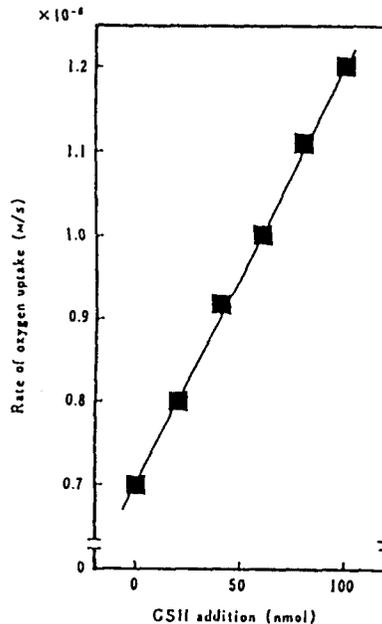


Fig. 14. Effect of the Addition of GSH on the Oxygen Uptake of Linoleic Acid

Reaction mixture contained 1 ml of linoleic acid micelle solution,  $0.26 \mu\text{ mol}$  of ferrous ammonium sulfate, 100 nmol  $\text{KBrO}_3$  and 0–100 nmol of GSH.

### 第3節 肝ミクロゾームの脂質過酸化 反応系への臭素酸カリウムと グルタチオンの添加の影響

ミクロゾームタンパク質200 $\mu$ gを添加した本反応系に一定量のGSH(100nmol:終濃度0.1mM)の添加に対してKBrO<sub>3</sub>を0-100nmol(終濃度0-0.1mM)の濃度段階で添加したときのTBARS生成量は、Fig. 15に示したように、ミクロゾームタンパク質1mg当たり1分間当たりのマロンジアルデヒド(MDA)量(MDA nmol/min/mg protein)に換算して表した場合、KBrO<sub>3</sub>の添加量の増大に依存して約0.20まで直線的に増大した。

また、一定量のKBrO<sub>3</sub>(100nmol:終濃度0.1mM)の添加に対してGSHを0-100nmol(終濃度0-0.1mM)の濃度段階で添加したときのTBARS生成量は、Fig. 16に示したようにGSHの添加量の増大に依存して約0.20まで直線的に増大した。

KBrO<sub>3</sub>及びGSHをそれぞれ100nmol(終濃度0.1mM)ずつ添加した反応混液に、SOD 5unit, カタラーゼ 80unit, マンニトール13nmol(終濃度13 $\mu$ M)尿酸 13nmol(終濃度13 $\mu$ M), diethylenetriamine-N,N,N',N',N'-pentaacetic acid(DTPA)100nmol(終濃度0.1mM), エチレンジアミン(o-ヒドロキシフェニル酢酸)(EHPG)100nmol(終濃度0.1mM)または、アジ化ナトリウム(NaN<sub>3</sub>)40nmol(終濃度40 $\mu$ M)を添加した反応液についてTBARS生成量を測定した結果は、Table 26に示したように、NaN<sub>3</sub>の添加によりコントロールの約30%に抑制されたが、その他の添加ではいずれもコントロールと比較して有意な変動は認められなかった。

NaN<sub>3</sub>を0-100nmol(0-0.1mM)の濃度段階で添加した場合、Fig. 17に示したようにTBARS生成量はNaN<sub>3</sub>の添加量の増大に依存して約35%まで減少した。

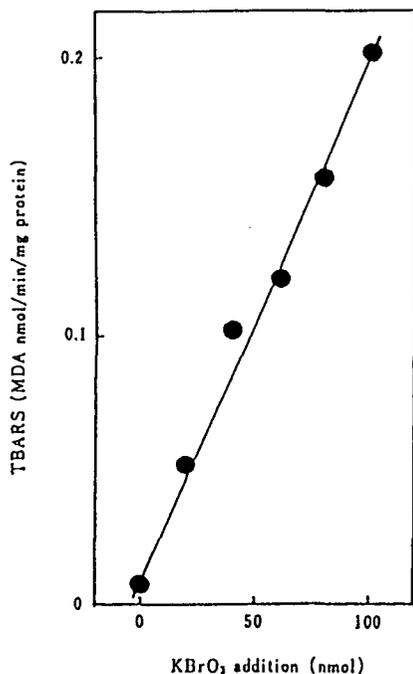


Fig. 15. Effect of the Addition of  $\text{KBrO}_3$  on the Production of TBARS in the Microsomal System

Reaction mixture contained  $200 \mu\text{g}$  of microsomal protein,  $0.26 \mu\text{mol}$  of ferrous ammonium sulfate,  $100 \text{nmol}$  of GSH and  $0-100 \text{nmol}$  of  $\text{KBrO}_3$  in phosphate buffer (pH 7.4), adjusted to  $1.0 \text{ml}$ . The reaction was carried out at  $37^\circ\text{C}$  for  $5 \text{min}$  and then stopped by the addition of  $2 \text{ml}$  of TCA-TBA-HCl solution, and reaction mixture was heated in boiling water for  $15 \text{min}$  after the addition of  $0.1 \text{ml}$  of BHT/ethanol solution.

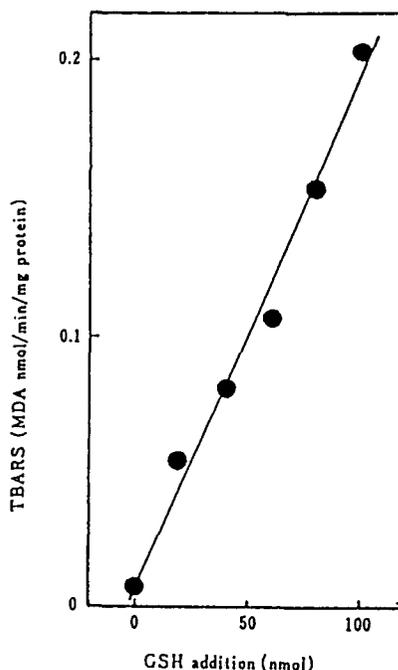


Fig. 16. Effect of the Addition of GSH on the Production of TBARS in the Microsomal System

Reaction mixture contained  $200 \mu\text{g}$  of microsomal protein,  $0.26 \mu\text{mol}$  of ferrous ammonium sulfate,  $100 \text{nmol}$  of  $\text{KBrO}_3$  and  $0-100 \text{nmol}$  of GSH in phosphate buffer (pH 7.4), adjusted to  $1.0 \text{ml}$ . The reaction was carried out at  $37^\circ\text{C}$  for  $5 \text{min}$  and then stopped by the addition of  $2 \text{ml}$  of TCA-TBA-HCl solution, and reaction mixture was heated in boiling water for  $15 \text{min}$  after the addition of  $0.1 \text{ml}$  of BHT/ethanol solution.

Table 26. The Inhibitory Effects of Scavengers on the TBARS Production in Microsomal System

Condition	TBARS production	
	MDA nmol/min/mg protein	%
Control	0.200	100.0
-KBrO <sub>3</sub>	0	0
-GSH	0	0
+SOD	0.218	109.0
+Catalase	0.212	106.0
+Mannitol	0.198	99.0
+Uric acid	0.189	94.5
+DTPA	0.200	100.0
+EHPG	0.198	99.0
+NaN <sub>3</sub>	0.061	30.5

Reaction mixture contained 200  $\mu$  g of microsomal protein, 0.26  $\mu$  mol of ferrous ammonium sulfate, 100 nmol of GSH and 100 nmol of KBrO<sub>3</sub> in phosphate buffer (pH 7.4), adjusted to 1.0 ml. Five units of SOD, 80 units of catalase, 13 nmol of mannitol, 13 nmol of uric acid, 100 nmol of DTPA, 100 nmol of EHPG or 40 nmol of NaN<sub>3</sub> was added in the reaction mixture before addition of KBrO<sub>3</sub>.

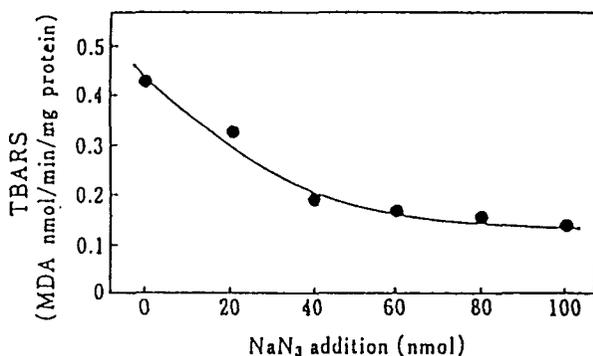


Fig. 17. Effect of the Addition of NaN<sub>3</sub> on the Production of TBARS in the Microsomal System

Reaction mixture contained 200  $\mu$  g of microsomal protein, 0.26  $\mu$  mol of ferrous ammonium sulfate, 100 nmol of GSH and 100 nmol of KBrO<sub>3</sub> and 0-100 nmol of NaN<sub>3</sub> in phosphate buffer (pH 7.4), adjusted to 1.0 ml. The reaction was carried out at 37 °C for 5 min and then stopped by the addition of 2 ml of TCA-TBA-HCl solution, and reaction mixture was heated in boiling water for 15 min after the addition of 0.1 ml of BHT/ethanol solution.

## 第4節 本章のまとめ・考察

KBrO<sub>3</sub>は過酸化物であり、生体内の還元性物質であるGSHとの反応による分解・消去が解毒機構として考えられる。<sup>44)</sup>しかし、KBrO<sub>3</sub>の投与による腎臓機能への障害作用、腎細胞での8-OH-dGの生成<sup>61, 63, 79)</sup>等、臓器障害性や核酸修飾性が知られていることから、GSHとの反応に際して細胞毒性を持つ物質が生成する可能性があると考えられる。KBrO<sub>3</sub>の細胞障害作用として酸化ストレスを生じることが知られていることから、活性酸素種の生成が推定される。しかし、KBrO<sub>3</sub>に起因する活性酸素種の生成機構については、現在のところ詳細には検討されていない。

著者は、リン酸緩衝液(pH7.4)中でのKBrO<sub>3</sub>とGSHの直接的な反応について、5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB)法<sup>82)</sup>によるSH基の定量から検討した結果、Fig. 11に示したように、KBrO<sub>3</sub>10 $\mu$ mol(終濃度10mM)の添加により、反応溶液中のGSHは約30nmol(終濃度30 $\mu$ M)まで減少することを認めた。すなわち、KBrO<sub>3</sub>とGSHの反応は、GSHの減少または分解を伴うものと考えられる。

不飽和脂肪酸であるリノール酸は過酸化物によって酸化をうけ、その際生成した共役ジエンに由来する234nmの吸光度が増大する。<sup>83)</sup>すなわち、234nmの吸光度の増大から、過酸化物の脂質過酸化作用が測定出来る。Fig. 12に示したように、反応溶液中の0.875mgのリノール酸(3.1 $\mu$ mol)及び1.0 $\mu$ mol(終濃度0.4mM)のKBrO<sub>3</sub>に対してGSHを0-10 $\mu$ mol(終濃度0-4mM)の濃度段階で添加した結果、234nmの吸光度はGSHの添加量に依存して増大したが、一方KBrO<sub>3</sub>のみを添加した場合には吸光度の増大は認められなかった。この経過から、GSHとKBrO<sub>3</sub>の直接的な反応による活性酸素種の生成が示唆された。

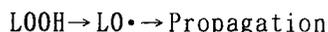
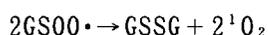
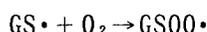
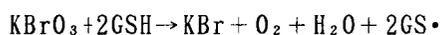
また、酸素電極法を用いた実験系で検討した結果、Fig. 13に示したように、リノール酸3.1 $\mu$ mol及びGSH100nmol(終濃度0.1mM)の存在下で、KBrO<sub>3</sub>を0-100nmol(終濃度0-0.1mM)の濃度段階で添加した場合には、反応溶液中の溶存酸

素の減少量が $\text{KBrO}_3$ の添加量に依存して増大した。すなわち、酸素吸収速度が増大した。一方、リノール酸 $3.1\ \mu\text{mol}$ 及び $\text{KBrO}_3$  $100\text{nmol}$ (終濃度 $0.1\text{mM}$ )に対してGSHを $0-100\text{nmol}$ (終濃度 $0.1\text{mM}$ )の濃度段階で添加した場合にはFig. 14に示したように、反応溶液中の溶存酸素の減少量がGSHの添加量に依存して増大した。すなわち、酸素吸収速度が増大した。以上の結果から、 $\text{KBrO}_3$ とGSHの反応生成物により、リノール酸の過酸化反応が起こることが示唆された。脂質の過酸化に際して反応溶液中の溶存酸素が消費されることから、反応溶液中の溶存酸素の減少量、すなわち酸素吸収速度を測定して、脂質の過酸化反応を測定する方法が知られている。<sup>84)</sup> 本実験において $\text{KBrO}_3$ とGSHの添加により、リノール酸の酸素吸収は測定時間中ほぼ直線的に進行した。すなわち、 $\text{KBrO}_3$ とGSHの添加により、リノール酸は一定速度で酸化され、共役ジエンヒドロペルオキシドを定量的に生成したと考えられる。<sup>85)</sup>

細胞のマイクロゾーム分画を用いた脂質過酸化反応系にGSH $100\text{nmol}$ を(終濃度 $0.1\text{mM}$ )添加し、 $\text{KBrO}_3$ を $0-100\text{nmol}$ (終濃度 $0-0.1\text{mM}$ )の濃度段階で添加した結果、Fig. 15に示したように $\text{KBrO}_3$ の添加量に依存したTBARS生成量の増大が認められた。また、同様に $\text{KBrO}_3$  $100\text{nmol}$ (終濃度 $0.1\text{mM}$ )を添加しGSHを $0-100\text{nmol}$ (終濃度 $0.1\text{mM}$ )の濃度段階で添加した結果を、Fig. 16に示したようにGSHの添加量に依存してTBARS生成量の増大が認められた。一方、このTBARSの生成は、GSHまたは $\text{KBrO}_3$ を添加しない反応系ではほとんど認められなかった。以上の結果から、本反応系においてGSHと $\text{KBrO}_3$ の反応により生成した活性酸素種がマイクロゾーム分画に含有される脂質の過酸化反応に関与していると考えられる。

この脂質過酸化の開始反応に、GSHに由来するチールラジカル( $\text{GS}\cdot$ )を中間体として生成する一重項酸素( $^1\text{O}_2$ )、<sup>86)</sup>  $\text{KBrO}_3$ に由来する酸素の代謝により生成するスーパーオキシド( $\text{O}_2^-$ )、<sup>87)</sup>  $\text{O}_2^-$ の不均化による過酸化水素から、Fenton反応に由来して生成するヒドロキシラジカル( $\text{HO}\cdot$ )<sup>87)</sup>等の活性酸素種の関与が考えられた。そこで、マイクロゾーム分画を用いた反応系に、GSH及び $\text{KBrO}_3$ をいす

れも100nmol(終濃度0.1mM)添加し、それぞれの活性酸素種に対する捕捉剤を添加して検討した。その結果は、Table 26に示したように、NaN<sub>3</sub>の添加によりTBARSの生成抑制が見られたが、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ、<sup>86)</sup> マンニトール及び尿酸<sup>89)</sup>による抑制は見られなかった。この結果からGSHとKBrO<sub>3</sub>の反応により発生する活性酸素種は<sup>1</sup>O<sub>2</sub>であると推測された。<sup>87)</sup> また、鉄キレート剤のDTPAやEHPG<sup>87)</sup>の添加時においてはTBARSの生成抑制効果が認められなかったことから、本反応系におけるTBARSの生成にはFenton反応のような鉄触媒に影響される反応が関与する可能性はないと考えられる。NaN<sub>3</sub>の添加によるTBARSの生成抑制はFig. 17に示したようにNaN<sub>3</sub>の添加量に依存することが認められ、NaN<sub>3</sub>でクエンチングされることが知られている<sup>90)</sup> <sup>1</sup>O<sub>2</sub>がGSHとKBrO<sub>3</sub>の直接的な反応により生成する活性酸素種であることが示唆された。すなわち、以下に示したような機構でGSHとKBrO<sub>3</sub>の直接的な反応から、グルタチオンチールラジカル(GS•)を経て<sup>1</sup>O<sub>2</sub>が生じ、<sup>1</sup>O<sub>2</sub>と不飽和脂肪酸との反応により脂質ヒドロパーオキシドが生成すると考えられる。<sup>86)</sup>



生体内の還元性物質が過酸化剤と反応した結果、過酸化ラジカル等を生じることは近年多く研究されているが、GSHから生成したGS•の反応性は高く、かなりの速度で親核性化合物と反応することが知られている。<sup>87)</sup> このGS•と酸素分子との反応によりチオールパーオキシラジカル(GSOO•)が生成し、GSOO•の自己反応によるジスルフィドの生成反応が、<sup>1</sup>O<sub>2</sub>の生成起源であると考えられる。<sup>91)</sup> <sup>1</sup>O<sub>2</sub>は二重結合と速やかに反応(ene反応、1.4付加反応、ジオキセタン生成反応等)するが<sup>92)</sup> この反応は非ラジカル反応であり、連鎖反応とはならないといわ

れている。しかし、過酸化脂質から遷移金属イオンと還元性物質の存在でアルコキシラジカル(L0•)が生成することが知られており、このL0•がラジカル連鎖反応の引き金として働き、脂質過酸化連鎖反応を生じると考えられる。生体内での遷移金属に由来する活性酸素種の生成については種々のことが知られており、<sup>93)</sup>生体内にはチトクロームP-450をはじめとする金属含有酵素が多く存在することから、L0•の生成によるラジカル連鎖反応が生じる可能性は十分大きいと考えられる。

活性酸素種に由来する腎臓障害性については、 $O_2^-$ 、 $HO\cdot$ 、 $^1O_2$ のそれぞれについていずれも糸球体障害等を生じることが知られている。<sup>76)</sup>  $KBrO_3$ の腎臓に対する毒性として、尿細管閉塞、尿量減少、尿閉等が知られているが、<sup>56)</sup>活性酸素や過酸化脂質に由来する腎疾患<sup>94)</sup>との関連について今後検討すべきであると考えられる。

過酸化脂質の毒性については、臓器障害性や発癌プロモーター作用<sup>81)</sup>など多くのことが知られている。<sup>95)</sup>  $KBrO_3$ はそれ自身が過酸化物であり、強い酸化作用を有するが、生体内に高濃度で存在するGSHとの反応が一種の解毒機構と考えられている。<sup>82)</sup>しかし、本実験の結果から、この反応から生成する活性酸素種の $^1O_2$ に起因して過酸化脂質が生成し、この過酸化脂質と遷移金属によるラジカル連鎖反応に由来して、発癌プロモーション等の生体に対する毒性が生じる機構が $KBrO_3$ の毒性発現機構のひとつとして存在する可能性が示唆された。

## 実験の部

### 1. $\text{KBrO}_3$ とGSHの反応性<sup>8,2)</sup>

0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)0.9mlにGSH 100nmol(終濃度0.1mM)を加えて全量を1.0mlとし、 $\text{KBrO}_3$  0-10 $\mu\text{mol}$ (終濃度0-10mM)を加えて攪拌後5分間室温で放置した。反応後、試験溶液0.5mlを分取してDTNB溶液(2mg/ml 0.1Mリン酸カリウム緩衝液)2.5mlを加え、5分間室温で放置した後、412nmの吸光度を測定した。

### 2. $\text{KBrO}_3$ 及びGSHの添加によるリノール酸の過酸化反応

1) リノール酸ミセル溶液の調製<sup>8,3)</sup> : リノール酸28mgに30mM塩化ナトリウム溶液10ml及び0.8%SDS溶液10mlを加え激しく攪拌した後、30mM塩化ナトリウム溶液を加えて全量80mlに調製し、ボルテックスミキサーで激しく攪拌した。

2) 共役ジエンの測定 : リノール酸ミセル溶液2.5mlを石英セルに入れ、37°Cにした分光光度計恒温セルホルダーにセットし、 $\text{KBrO}_3$  1.0 $\mu\text{mol}$ (終濃度0.4mM)及びGSH 0-10 $\mu\text{mol}$ (終濃度0-4mM)を加えて37°Cで90秒間反応させ、234nmの吸光度の増大を測定した。

3) 酸素電極法によるリノール酸の過酸化反応の測定<sup>9,6)</sup> : リノール酸ミセル溶液1mlを37°Cの温水を循環して保温した酸素電極用密閉セル(容量1ml)に入れ、マグネチックスターラーで攪拌した。これにGSH 100nmol(終濃度0.1mM)を加え、さらに $\text{KBrO}_3$  0-100nmol(終濃度0-0.1mM)を添加して、容器に接続した酸素電極で5分間連続して溶存酸素の減少量を測定した。またこの反応系で $\text{KBrO}_3$ の添加量を100nmol(終濃度0.1mM)とし、GSH 0-100nmol(終濃度0-0.1mM)を添加して同様に5分間連続して溶存酸素の減少量を測定した。

### 3. 肝マイクロゾームの脂質過酸化反応系への $\text{KBrO}_3$ とGSHの添加の影響

1) ラット肝マイクロゾーム分画の調製<sup>9,7)</sup> : 8週令のSD系雄性ラットの肝臓を生理食塩水で灌流後摘出し、0.25Mショ糖溶液で10%ホモジネートを作成した。

これを0℃で9000×g, 20分間遠心分離した上清を分取し, さらに0℃で105000×g, 60分間遠心分離して得たペレットを, 0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)に懸濁した. この懸濁液をラット肝マイクロゾーム分画液として実験に使用した.

2) KBrO<sub>3</sub>とGSHの添加によるマイクロゾームの脂質過酸化反応への影響<sup>9,10)</sup>: ラット肝マイクロゾーム分画200μg protein, 硫酸第一鉄アンモニウム0.26μmol(終濃度0.26mM), GSH 100nmol(終濃度0.1mM)及びKBrO<sub>3</sub> 0-100nmol(終濃度0-0.1mM)を添加し, 0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)で全量1.0mlに調製した. この反応混液を37℃で5分間反応後, TCA-TBA-HCl溶液 [15%トリクロロ酢酸(TCA), 0.375%チオバルビツール酸(TBA), 0.5M塩酸] 2.0mlを加えて反応を止め, 2%ジブチルヒドロキシルエーテル(BHT)/エタノール溶液 0.1mlを加えて攪拌後沸騰水浴中で15分間加熱した. 加熱終了後試験管を水冷し, 室温下1000×gで10分間遠心分離した上清について, 535nmの吸光度の増大からTBARS生成量を測定した. 上記の反応混液にKBrO<sub>3</sub> 100nmol(終濃度0.1mM)とGSH 0-100nmol(終濃度0-0.1mM)を添加し, 同様にTBARS生成量を測定した

3) KBrO<sub>3</sub>とGSHの反応により生成する活性酸素種の検討: 2)に記した肝マイクロゾーム反応系の反応混液を10系列作成し, それぞれにGSH 100nmol(終濃度0.1mM)を添加した後, 各系列に活性酸素種の消去剤としてSOD 5単位, カタラーゼ80単位, マンニトール13nmol(終濃度13μM), 尿酸13nmol(終濃度13μM), DTPA 100nmol(終濃度0.1mM), EHPG 100nmol(終濃度0.1mM), NaN<sub>3</sub> 40nmol(終濃度40μM)をそれぞれ別々に加え, 最後にKBrO<sub>3</sub> 100nmol(終濃度0.1mM)を添加して同様の操作でTBARS生成量を測定した. この反応系でNaN<sub>3</sub>について, さらに0-100nmol(終濃度0-0.1mM)の濃度段階で添加して同様に測定を行った.

#### 4. 試薬及び装置

- 1) KBrO<sub>3</sub>, EHPG: 東京化成工業製.
- 2) リノール酸, TBA, BHT, マンニトール, 尿酸, DTPA, NaN<sub>3</sub>: 和光純薬工業製.

- 3) DTNB, GSH, SOD, カタラーゼ : Sigma社製.
- 4) その他の試薬 : 和光純薬工業製特級.
- 5) 生化学用溶存酸素測定装置 : 飯島電子工業製 MD-1000型
- 6) 分光光度計 : 日立製 U-2000型.

## 糸吉 論

KBrO<sub>3</sub>の生体内動態と抗酸化ビタミンとの相互作用について研究を行い、以下の結果を得ることが出来た。

1. 第1章では、KBrO<sub>3</sub>を大量に経口投与した時の臭素酸塩の吸収、体内蓄積性及び排泄について検討した。その結果、KBrO<sub>3</sub>は胃から速やかに約95%が消失し、血液に移行し、腎を経て尿中に排泄されることが明らかとなった。

ラットに急性毒性量のKBrO<sub>3</sub>を経口投与した実験において、投与後36時間における死亡率から、LD<sub>50</sub>値は157mg/kgと求められた。また、投与後24時間に投与したKBrO<sub>3</sub>の13-15%が尿中に排泄されたが、排泄速度に性差は認められなかった。ラットにKBrO<sub>3</sub>を過量投与(330-420mg/kg)したときの血漿中の臭素酸塩量は投与後の時間の経過に比例して低下する傾向を示したが、胃内容物の臭素酸塩濃度は低濃度に保たれ消失しにくい傾向を示した。KBrO<sub>3</sub>は投与後30分から240分において、肝、腎、脾、膵、脳、心、肺、胃、小腸のいずれの組織にも臭素酸塩は認められなかった。この事実はKBrO<sub>3</sub>は胃から吸収されて血液に移行し、一部は尿中に排泄されるか、吸収された大部分(85-87%)の臭素酸塩は各臓器に移行し、組織中の還元型グルタチオン、SHタンパク質あるいはおそらく生体内の酸化還元系と共役して作用し、消失するものと推論した。

2. 第2章においては、KBrO<sub>3</sub>の発癌促進作用を解明する目的で行われた。実験動物はSPF-ddy系雄性マウスを用い、比較的高濃度(5000, 2500, 1000, 500, 100 ppm)の5種類の水溶液を飲料水として飲用させたKBrO<sub>3</sub>単独投与群、並びに1週間目と2週間目にB[a]Pを併用投与(100mg/kg)したKBrO<sub>3</sub>-B[a]P併用群について、体重変化、臓器重量、血漿中のAFP量、ALP及びγ-GTP活性を測定し、精製水を飲用させた対照群の測定値と比較検討を行い、次の結果を得た。体重変化は高濃度のKBrO<sub>3</sub>投与群で減少する傾向を示したが、実験期間中すべ

ての動物は生存し続けた。臓器重量は高濃度群(5000, 2500, 1000ppm)において対照群の肝よりも平均約20%, 腎は約12.5%, 肺は約21%増加することを認めた。また, 血漿成分では, AFP量は両群とも対照群の2-3倍以上の高値を示し, ALP活性は高濃度投与群(5000, 2500ppm)において両群とも濃度依存的に高値を示した。γ-GTP活性は両群とも投与濃度に依存的に顕著な活性値の上昇を認めた。また, KBrO<sub>3</sub>-B[a]P併用投与群の活性値は相加的な高値を示した。しかしながら, 肝のγ-GTP活性は対照群に比べて相違は認められなかった。

以上の実験結果から, 投与されたKBrO<sub>3</sub>の一部は胃から吸収され, 血液を介して各組織に移行し, 肝, 腎, 肺などの標的臓器の細胞内で酸素ラジカルを生じ, 直接細胞に損傷を与えることにより, 血漿中の腫瘍マーカー値を上昇させるものと推論した。

3. 第3章では, KBrO<sub>3</sub>の毒性に対するVEの効果について検討を行った。

ラットにKBrO<sub>3</sub> 1000 μg/ml溶液を飲料水として与え, 飼料には, VE強化飼料を用い, 成育状況及び肝, 腎の酵素活性等の測定を行い, VE摂取による影響をKBrO<sub>3</sub>を投与しない対照群と比較検討した。その結果, KBrO<sub>3</sub>投与群では体重減少が認められ, 臓器重量はKBrO<sub>3</sub>投与群において腎に顕著な重量増加を認めた。

この際, 血清中のUN及びクレアチニン量の増加が認められ, 腎障害の起こっていることが明らかとなった。また, 血清中の腫瘍マーカー値に変動がみられ, 腎機能障害と共に肝機能障害を惹起していることが推察された。腎のγ-GTP活性は一般に高い活性を示すが, KBrO<sub>3</sub>投与群では対照群の約60%に減少した。

しかし, VE強化飼料を与えると本酵素活性の抑制率は約70%にとどまりVEの効果进行を明かにすることが出来た。また, TBARS量はVE強化飼料摂取群で低値を示し, VEが脂質過酸化に抑制的に作用していることが認められた。

以上の結果から, VEは本実験系において, グルタチオン関与と考えられる活性酸素による障害に抑制的に作用するものと推論した。

4. 第4章では, KBrO<sub>3</sub>投与時の毒性発現に対するVCの抑制効果について検討

した。KBrO<sub>3</sub>の投与方法は、ラットにKBrO<sub>3</sub> 500 μg/ml溶液を飲料水として与えた。飼料にはVC強化飼料を用い、成育状況及び肝、腎の酵素活性等の測定を行い、KBrO<sub>3</sub>-VC併用投与群とVC単独投与対照群とについてVCの摂取量の相違による影響を比較検討した。その結果、KBrO<sub>3</sub>投与群では体重増加の抑制が認められ臓器重量についてはKBrO<sub>3</sub>投与群において腎に重量増加を認めたが、VCの濃度による差は認められなかった。また、KBrO<sub>3</sub>投与群の腎上清画分のALP、γ-GTP及びGOT活性は飼料に強化したVC濃度に依存して減少した。

KBrO<sub>3</sub>投与群の腎及び血清中のTBARS量は、飼料に強化したVC濃度に依存して低値を示したが、VC強化飼料のみを摂取させた対照群のTBARS量はほぼ一定の値を示した。以上の結果から、KBrO<sub>3</sub>投与ラットに対するVCの毒性軽減効果を考察すると、本実験条件下では腎及び血清中のTBARS量の低下作用に寄与していることが考えられるが、その効果は顕著なものではないと結論した。

5. 第5章では、*in vitro*実験系を用いてKBrO<sub>3</sub>の脂質過酸化反応とその機構について検討を行った。その結果、DTNB法によりKBrO<sub>3</sub>との直接的な反応によるGSHの減少を認めた。また、KBrO<sub>3</sub>とGSHの添加により、リノール酸の過酸化反応が生じることを共役ジエンの測定及び酸素電極法を用いて確認し、この反応はKBrO<sub>3</sub>及びGSHの添加量に依存することから、両者の反応生成物が関与することを認めた。

肝ミクロゾーム分画を用いた反応系では、TBARS生成量の増大はKBrO<sub>3</sub>及びGSHの添加量に依存することを認めた。この反応がNaN<sub>3</sub>の添加により抑制されたことから、KBrO<sub>3</sub>とGSHの直接的な反応によりGS<sup>•</sup>の生成を経て<sup>1</sup>O<sub>2</sub>が生成すると考えられ、KBrO<sub>3</sub>の毒性発現機構のひとつとして<sup>1</sup>O<sub>2</sub>に由来する脂質過酸化反応が存在する可能性を示唆することができた。

## 謝 辞

本研究にあたり，終始御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました星薬科大学教授 河内佐十博士に謹んで感謝申し上げます。

また，本研究の遂行にあたり，御指導，御鞭撻をいただきました神奈川県衛生研究所 食品薬品部長 堀口佳哉博士に深く感謝申し上げます。

さらに，本研究の機会を賜り，多大の御高配，御鞭撻をいただきました神奈川県衛生研究所長 衛藤繁男博士，神奈川県衛生研究所 食品添加物科 中岡正吉科長，神奈川県薬剤師会 渡辺重信理事に深く感謝申し上げます。

終わりに臨み，本研究に対し終始御協力をいただきました星薬科大学 渡辺聡氏，宮坂一善氏に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 田中康夫, 小柳 妙, 川口真理子, 食品総合研究所研究報告, 30, 29 (1975).
- 2) A. Warren, W. V. Gross, *Pediatrics*, 5, 954(1950).
- 3) I. Dunsky, *Am. J. Dis. Child.*, 74, 853(1947).
- 4) 上田英雄, 日内科誌, 54, 1408(1965).
- 5) 佐藤順造, 内科, 22, 1189(1968).
- 6) 加藤宣雄, 内科, 24, 819(1970).
- 7) 佐川史郎, 日内科誌, 60, 145(1971).
- 8) 飯島元博, 日腎臓誌, 13, 553(1971).
- 9) 平岡耕造, 皮膚と泌尿, 27, 699(1965).
- 10) 八十島信之助, 日法医誌, 9, 423(1955).
- 11) 丹羽豊郎, 日腎臓誌, 13, 554(1971).
- 12) 老沼次男, 日大医誌, 33, 759(1974).
- 13) T. Niwa, T. Ito, E. Matsui, *Japn. Circ. J.* 38, 387(1974).
- 14) 淀井省三, 寒川昌明, 吉岡敏治, 岡田芳明, 黒岩 宏, 外科治療, 39, 227(1978).
- 15) RB. Mack, *N. C. Med. J.*, 49, 243(1988).
- 16) 川名清子, 中岡正吉, 堀口佳哉, 渡辺重信, 渡辺 聡, 河内佐十, 衛生化学, 37, 258(1991).
- 17) J. T. Jr. Litchfield, F. Wilcoxon, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 96, 99 (1949).
- 18) 石館守三, 谷村顕雄監修, “第五版食品添加物公定書解説書, 1987年版” 広川書店, 東京, 1987, p. D-435.
- 19) W. John Williams, “Hand Book of Anion Determination”, Butter

- Worths, London, 1979, p.262.
- 20) R.Pribil, V.Markova, Anal. Abstr., **14**, 2544(1967).
  - 21) 川城 巖, 藤井清次, 慶田雅洋, “食品添加物ハンドブック” 光生館, 東京, 1979, p.51.
  - 22) B.H.Thewlis, J.Sci.Food Agric. **25**, 1471(1974).
  - 23) 渡辺 功, 田中 涼一, 樫本 隆, 食衛誌, **22**, 246(1981).
  - 24) 百川 滉, 日向やよい, 堺 敬一, 食衛誌, **20**, 49(1979).
  - 25) 日高利夫, 桐ヶ谷忠司, 上条昌弥, 鈴木幸夫, 河村太郎, 食衛誌, **24**, 383(1983).
  - 26) N.Fisher, J.B.Hutchinson, R.Berry, J.Hardy, A.V.Ginocchio, V.Waite, Food Cosmet.Toxicol., **17**, 33(1979).
  - 27) A.V.Ginocchio, V.Waite, J.Hardy, N.Fisher, J.B.Hutchinson, R.Berry, Food Cosmet.Toxicol., **17**, 41(1979).
  - 28) Y.Kurokawa, Y.hayashi, A.Maekawa, M.Takahashi, T.Kokubo, Gann **73**, 335(1982).
  - 29) Y.Kurokawa, M. Takahashi T. Kokubo, Y. Y. Ohno, Y. Hayashi, Gann **74**, 607(1983).
  - 30) S. A. Lesko, Jr., A. Smith, P. O. P. Ts'o, R. S. Umans, Biochemistry, **7**, 434(1968).
  - 31) 松島泰次郎, 蛋白質 核酸 酵素, **23**, 429(1978).
  - 32) 根本信雄, 蛋白質 核酸 酵素, **21**, 957(1976).
  - 33) 根本信雄, トキシコロジーフォーラム **6**, 73(1983).
  - 34) S. K. Yang, J. K. Selkirk, E. V. Plotkin, H. V. Gelboin, Cancer Res., **35**, 3642(1975).
  - 35) J. W. Howard, T. Fazio, Agr. Food Chem., **17**, 527(1969).
  - 36) Y. Masuda, M. Kuratsune, Gann **62**, 27(1971).

- 37) 白石慶子, 白鳥つや子, 坂上米次, 食衛誌., 13, 41(1972).
- 38) 松下秀鶴, 江角凱夫, 分析化学 21, 1594(1972).
- 39) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍, 食衛誌., 14, 173(1973).
- 40) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍, 食衛誌., 15, 18(1974).
- 41) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍, 食衛誌., 16, 178(1975).
- 42) 白石慶子, 白鳥つや子, 高島英伍, 食衛誌., 16, 187(1975).
- 43) 増田義人, 島村京子, 矢野弘重, 食衛誌., 18, 362(1977).
- 44) 川名清子, 中岡正吉, 堀口佳哉, 渡辺 聡, 河内佐十, 衛生化学, 37, 266(1991).
- 45) T.Nakayama, T.Kimura, M.Kodama, C.Nagata, Carcinogenesis 4, 765 (1983).
- 46) A.Denda, P.M.Rao, S.Rajalakshmi, D.S.R.Sarma, Carcinogenesis 6, 145(1985).
- 47) J.Y.H.Chen, M.Ruchrawat, Jean-Numa Lapeyre, F.F.Becker, Carcinogenesis 4, 1097(1983).
- 48) 渡辺 聡, 大竹啓子, 河内佐十, 日本薬学会第105年会 講演要旨集, 1985, p.273.
- 49) P.R.N.Kind, E.J.King, J.Clin.Path., 7, 322(1954).
- 50) 柴田 進, 北村元仕, “日常臨床生化学定量法” 中山書店, 東京, 1964, P.340.
- 51) C.G.Bergstrand, B.Czar, Scand.J. Clin.Lab. Invest., 8, 174(1956).
- 52) 石川栄治, 河合 忠, 宮井 潔編 “酵素免疫測定法” 医学書院, 東京, 1978, p.36.
- 53) 向島 達, Medical Technology 7, 751(1979)
- 54) M.Orlowski, A.Szewczuk, Clin.Chim. Acta 7, 755(1962)
- 55) H.Tamaoki, S.Minato, S.Takei, K.Fujisawa, Clin.chim. Acta 65, 21

(1975).

- 56) 石館守三, 鈴木郁生, 谷村顕雄 監修, “第六版食品添加物公定書  
解説書,” 1992年版, 廣川書店, 東京, 1992, p.D-521.
- 57) M.Dizdaroglu, *Biochemistry*, **24**, 4476(1985).
- 58) H.Kasai, P.F.Crain, Y.Kuchino, S. Nishimura, A.Ootsuyama,  
H.Tanooka, *Carcinogenesis*, **7**, 1849(1986).
- 59) H.Kasai, H.Tanooka, S.Nishimura, *Gann*, **75**, 1037(1984).
- 60) H.Kasai, S.Nishimura, *Gann*, **75**, 841(1984).
- 61) H.Kasai, S.Nishimura, Y.Kurokawa, Y.Hayashi, *Carcinogenesis*,  
**8**, 1959(1987).
- 62) K.Sai, A.Takagi, T.Umemura, R.Hasegawa, Y.Kurokawa, *Jpn. J.  
Cancer Res.*, **82**, 165(1991).
- 63) S.Kawauchi, K.Ishihara, T.Soejima, S.Watanabe, Y.Toyama,  
K.Kawana, *Toxicol. Lett.*, suppl., 1992, p.218.
- 64) 渡辺 聰, 宮坂 一善, 川名清子, 河内佐十, *衛生化学*, **39**, 445  
(1993).
- 65) G.Shklar, *J. Natl. Cancer Inst.*, **68**, 791(1982).
- 66) K.Sai, T.Umemura, A.Takagi, R.Hasegawa, Y.Kurokawa, *Jpn. J. Cancer  
Res.*, **83**, 45(1992).
- 67) Y.Nitta, K.Kamiya, M.Tanimoto, S. Sadamoto, O.Niwa, K.Yokoro, *Jpn.  
J. Cancer Res.*, **82**, 511(1991).
- 68) 川名清子, 中岡正吉, 堀口佳哉, 渡辺 聰, 河内佐十, *衛生化学*,  
**39**, 514(1993).
- 69) P.J.Hissin, R.Hilf, *Anal. Biochem.*, **74**, 214(1976).
- 70) 佐藤哲男, 上野芳夫, 遠藤 仁(編), “毒性試験講座(6)” 地人書館,  
東京, 1989, p.147.

- 71) 川名清子, 中岡正吉, 堀口佳哉, 渡辺 聰, 河内佐十, 衛生化学,  
40, 154(1994).
- 72) K.Sai, T.Umemura, A.Takagi, R.Hasegawa, Y.Kurokawa, Jpn. J.  
Cancer Res. 83, 45(1992).
- 73) 藤沢 洌, 渡部幸夫, 北原敏久, 栗原宣夫, 臨床病理, 特集55, 42(1981).
- 74) a)高橋忠雄 監修, “肝臓,” 医学書院, 東京, 1972, pp.427-429. ;b)  
寺西 啓, 和田 博, 日本臨床, 47, 201(1989).
- 75) a)N.Ito, M.Hirose, Adv. Cancer Res., 53, 247(1989). ;b)倉田 靖,  
広瀬雅雄, 加藤俊男, 河辺真弓, 今井田克己, 萩原昭裕, 伊東信行, 第  
52回癌学会総記事, 1993, p.86.
- 76) 伊藤正吾, 活性酸素・フリーラジカル, 3, 22(1992).
- 77) 川崎 尚, ビタミン, 61, 373(1987).
- 78) 佐藤哲男, 上野芳夫, 遠藤 仁(編), “毒性試験講座(6)” 地人書館,  
東京, 1989, p.286.
- 79) Y.Kurokawa, V.Waite, J.Hardy, N.Fisher, J.B.Hutchinson, R.Berry,  
Food Cosmet.toxicol., 17, 41(1979).
- 80) 葛西 広, “活性酸素マニュアル,” 浅田浩二, 中野 稔, 柿沼カツ子編,  
講談社サイエンティフィック, 東京, 1992, p.173.
- 81) F.Marks, G.Furuslenberger, “活性酸素と疾患,” H.Sies編, 井上正康  
監訳, 学会出版センター, 東京, 1987, p.455.
- 82) 東 胤昭, 蛋白質・核酸・酵素, 33, 1370(1988).
- 83) a) E.D.Khrasch, R.F.Novak, J.Biol. Chem., 260, 10645(1985).; b) 福  
沢健治, 寺尾純二, “化学と生物実験ライン 2脂質過酸化実験法,” 広川  
書店, 東京, 1990, p.69.
- 84) a) K.Fukuzawa, T.Tadokoro, K.Kishikawa, K.Mukai, J.M.Gebicki,  
Arch. Biochem. Biophys., 260, 146(1988).;b) 二木鋭雄, ビタミン,

- 57, 193(1988); c) T. Toyosaki, T. Mineshita, *Milchwissenschaft*, **44**, 292(1989).
- 85) 渡辺 聡, 河内佐十, *ビタミン*, **67**, 51(1993).
- 86) H. Sies編, 井上正康監訳, “活性酸素と疾患,” 学会出版センター, 東京 1987, p. 334.
- 87) 二木鋭雄, 島崎弘幸編, “活性酸素,” 医歯薬出版, 東京, 1987, p. 33.
- 88) 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編著, “過酸化脂質と生体,” 学会出版センター, 東京, 1985, p. 45.
- 89) 二木鋭雄, *ビタミン*, **65**, 491(1991).
- 90) N. Hasty, P. B. Merkel, P. Radlick, D. R. Kearns, *Tetrahedron Lett.*, **49** (1972).
- 91) H. Wefers, H. Sies, *Eur. J. Biochem.*, **137**, 29(1983).
- 92) 二木鋭雄, 島崎弘幸編, “活性酸素,” 学会出版センター, 東京, 1987, p. 14.
- 93) 山本瓦二, 川西正祐, *活性酸素・フリーラジカル*, **3**, 650(1992).
- 94) a) 青柳一正, *治療学*, **26**, 592(1992).; b) 井上正康編, “活性酸素と病態,” 学会出版センター, 東京, 1992, p. 471.
- 95) 古倉 聡, 吉川敏一, 近藤元治, *治療学*, **26**, 568(1992).
- 96) a) W. A. Pryor, T. Strickland, D. F. Church, *J. Biol. Chem.*, **260**, 10645(1985).; b) 福沢健治, 寺尾純二, “化学と生物実験ライン 2 脂質過酸化実験法,” 広川書店, 東京, 1990, p. 10.
- 97) 泉 美治, 中川八郎, 三輪谷俊夫共著, “生物化学実験のてびき1生物試料調製法,” 化学同人, 京都, 1985, p. 57.
- 98) a) E. Cadenas, H. Sies, *Eur. J. Biochem.*, **124**, 349(1982).; b) G. Minotti, *Arch. Biochem. Biophys.*, **273**, 144(1989).