

氏名(本籍)	川名清子 (千葉県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	乙第70号
学位授与年月日	平成6年9月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者
学位論文の題名	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
論文審査員	主査 教授 河内 佐十 副査 教授 山下 三郎 副査 教授 高橋 朋子

論文内容の要旨

臭素酸カリウム(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、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。 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 KBrO_3 については、最終食品の完成前に KBrO_3 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。

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。

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、 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がある。一方、 KBrO_3 の発癌性について腎腫瘍の高率の発現が報告されている。

著者は、食品添加物である KBrO_3 の毒性について検討を行い、以下の結果を得ることが出来た。

1. 第1章では、 KBrO_3 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_3 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

KBrO₃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、LD₅₀値は157 mg/kgと求められた。また、投与後24時間に投与したKBrO₃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KBrO₃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。

KBrO₃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KBrO₃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(GSH)、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、KBrO₃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KBrO₃単独投与群、並びに1週間目と2週間目にベンゾ[a]ピレン(B[a]P)を併用投与(100mg/kg)したKBrO₃-B[a]P併用群について、体重変化、臓器重量、血漿中のα-フェトプロテイン(AFP)量、アルカリホスファターゼ(ALP)及びγ-グルタミルトランスペプチターゼ(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KBrO₃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%、脾は約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、KBrO₃-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KBrO₃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_3 の毒性に対するビタミンE(VE)の効果について検討を行った。ラットに KBrO_3 1000 $\mu\text{g/ml}$ 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、 KBrO_3 を投与しない対照群とについてVE摂取による影響を比較検討した。その結果、 KBrO_3 投与群では体重減少が認められ、臓器重量は、 KBrO_3 投与群において、腎に顕著な重量増加を認めた。この際、血清中の尿素窒素(UN)量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、腎機能障害ととも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_3 投与群では対照群の約60%に減少した。しかし、VE強化飼料を与えるると本酵素活性の抑制率は約70%にとどまりVEの効果を明かにすることが出来た。またチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)含量は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、GSH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_3 投与時の毒性発現に対するビタミンC(VC)の抑制効果について検討した。 KBrO_3 の投与方法は、ラットに KBrO_3 500 $\mu\text{g/ml}$ 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_3 -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_3 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_3 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_3 投与群の腎上清画分のALP、 γ -GTP及びグルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)活性は飼料に強化したVC濃度に依存して減少した。

KBrO_3 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_3 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_3 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、5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid(DTNB)法により KBrO_3 との直接的な反応によるGSHの減少を認めた。また、 KBrO_3 とGSHの添加により、リノール酸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_3 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_3 及びGSHの添加量に依存することを認めた。この反応がアジ化ナトリウム(NaN_3)の添加により抑制されたことから、 KBrO_3 とGSHの直接的な反応により、 $\text{GS}\cdot$ の生成を経て $^1\text{O}_2$ が生成すると考えられ、 KBrO_3 の毒性発現機構のひとつとして、 $^1\text{O}_2$ に由来する脂質過酸化反応が存在する可能性を明らかにした。

以上、 KBrO_3 の代謝及び毒性発現機構について検討し、活性酸素種の関与が生体内における KBrO_3 の毒性発現機構として存在する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、小麦粉改良剤として食品添加物に指定されている臭素酸カリウム (KBrO_3) の安全性を評価するために行われたものである。

論文内容は、 KBrO_3 をラットに投与したときの体内動態および毒性発現の機構について検討したものである。

第1章では、 KBrO_3 のラットにおける急性毒性 (LD_{50}) 値は $157\text{mg}/\text{kg}$ であり、投与量の約95%は胃から速やかに吸収されて血液に移行し、腎を経て一部は尿中に排泄されることを明らかにしている。吸収された KBrO_3 の大部分 (85~89%) は各臓器中の還元型グルタチオン (GSH) などの酸化還元系と共役的に反応し、消失することを示した。

第2章では、 KBrO_3 をマウスにベンゾ[a]ピレンと併用投与すると血漿中AFP量、ALP 及び γ -GTP活性が増加したことにより、 KBrO_3 は標的臓器の細胞内で活性酸素ラジカルを生じ、細胞を直接損傷して血清中の腫瘍マーカーを上昇させるものと推論している。

第3章では、 KBrO_3 の毒性に対する抗酸化ビタミンのひとつである α -トコフェロール (E) の効果について、ラットに KBrO_3 と E を併用投与する実験系で検討した。その結果、E は KBrO_3 と GSH 関与と考えられる活性酸素種による障害作用に対して抑制的に作用することを明らかにしている。

第4章では、 KBrO_3 の毒性発現に対するビタミンCの効果を検討し、ビタミンCは KBrO_3 による血清 TBARS値の上昇に対し、顕著に抑制的に作用することを認めているが、肝、腎等の器官における TBARS値の上昇に対する抑制効果は顕著でないことを明らかにした。

第5章では、*in vitro*の実験系を用いた KBrO_3 の脂質過酸化反応とその反応機構について検討し、 KBrO_3 と GSH の直接反応により、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の生成することを確認し、この $^1\text{O}_2$ による脂質過酸化反応が KBrO_3 の毒性発現機構のひとつである可能性を示している。

KBrO_3 による中毒事故は、大量に使用する理容従事者に多く見られたが、毒性発現機構に関する研究はほとんど行われていなかった。1982年にマウスにBHENを投与し、長期的に KBrO_3 を与える実験系で腎腫瘍が高率に発現することが報告されて以来、食品添加物としての KBrO_3 の安全性について再検討することが要請されていた。従来、 KBrO_3 を食品添加物として使用した場合、食品中の

GSH と反応して還元消去されるものと考えられていたが、 KBrO_3 を摂取した場合には、生体内において GSH の関与による活性酸素種の生成に基づく脂質過酸化障害が、 KBrO_3 の毒性発現機構のひとつである可能性を明確にすると共に、 KBrO_3 による毒性が抗酸化ビタミン E 及び C により抑制されることを明らかにしている。

以上のように本論文の内容は、 KBrO_3 の生体内動態と毒性発現に一重項酸素の生成が関与することを明らかにすると共に、この毒性発現に対して抗酸化ビタミン E 及び C が抑制的に作用することを明らかにしたものであり、博士（薬学）の学位論文に値するものと認め判定した。