Jpn. J. Toxicol. Environ. Health
 衛生 化学 学
 39 (5) 445-452 (1993)

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

渡辺 聡,^a 宮坂一善,^a 川名清子,^b 河内佐十^a
 星薬科大学,^a 神奈川県衛生研究所^b

Production of Active Oxygen Species and Lipid Peroxidation by the Reaction of Potassium Bromate and Reduced Glutathione

SATOSHI WATANABE,^a KAZUYOSHI MIYASAKA,^a KIYOKO KAWANA,^b
 and SAJU KAWAUCHI^a

Hoshi University,^a 4-41, Ebara 2 chome, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan and
 Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory,^b 52 Nakaocho, Asahi-ku,
 Yokohama-shi, Kanagawa
 241, Japan

(Received March 12, 1993)

Potassium bromate (KBrO_3), a food additive, has renal toxicity with the possibility of active oxygen species. It was recognized with the DTNB method that the reduced glutathione (GSH) content in the reaction mixture was correlatively decreased by the addition of KBrO_3 . The peroxidation of linoleic acid micelle by the addition of GSH and KBrO_3 was measured by the ultraviolet absorption method and oxygen electrode method. Moreover, thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) content was correlatively increased by the addition of GSH and KBrO_3 on the microsomal system *in vitro*. But the increase of TBARS content was inhibited by the addition of sodium azide and it was not inhibited by the addition of superoxide dismutase, catalase, mannitol, uric acid, DTPA and EHPG respectively. The addition of sodium azide correlatively inhibited the production of TBARS in the reaction mixture. These results suggested that the singlet oxygen was produced by the reaction of GSH and KBrO_3 and was related to the lipid peroxidation.

Keywords — potassium bromate; singlet oxygen; lipid peroxidation; reduced glutathione; sodium azide

緒 言

臭素酸カリウム (以下 KBrO_3) は食品添加物として製パン用の小麦粉などの品質改良剤の目的で使用されているが、過氧化物としての性質を有することから、生体に対する安全性が懸念されている。¹⁾ 近年、 KBrO_3 の腎臓に対する障害性²⁾ や、腎臓細胞内の核酸塩基に対する修飾作用³⁾ 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 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⁴⁾ ことから、著者らは *in vitro* 実験系を用いた KBrO_3 の脂質過酸化反応とその機構について検討した。 KBrO_3 は生体内で還元型グルタチオン (以下 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。⁵⁾ そこで、まず 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 KBrO_3 の直接的な過酸化反応を、紫外外部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、

KBrO₃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、KBrO₃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。

実験方法

1. KBrO₃とGSHの反応性⁹⁾ 0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.9 mlにGSH 100 nmol (終濃度 0.1 mM)を加えて全量 1.0 mlとし、KBrO₃ 0—10 μmol (終濃度 0—10 mM)を加えて攪拌後5分間室温で放置した。反応後試験溶液 0.5 mlを分取して5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (以下DTNB) 溶液 (2 mg/ml 0.1 Mリン酸カリウム緩衝液) 2.5 mlを加え、5分間室温で放置した後、412 nmの吸光度を測定した。

2. KBrO₃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⁷⁾——リノール酸 28 mgに30 mM塩化ナトリウム溶液 10 ml及び0.8%ラウリル硫酸ナトリウム (以下SDS) 溶液 10 mlを加え激しく攪拌した後、30 mM塩化ナトリウム溶液を加えて全量 80 mlに調整し、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 2.5 ml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、KBrO₃ 1.0 μmol (終濃度 0.4 mM) 及びGSH 0—10 μmol (終濃度 0—4 mM)を加えて37°Cで90秒間反応させ、234 nm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⁸⁾——リノール酸ミセル溶液 1 ml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 1 ml) に入れ、マグネチックスターラーで攪拌した。これにGSH 100 nmol (終濃度 0.1 mM)を加え、さらにKBrO₃ 0—100 nmol (終濃度 0—0.1 mM)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KBrO₃の添加量を100 nmol (終濃度 0.1 mM)とし、GSH 0—100 nmol (終濃度 0—0.1 mM)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. 肝ミクロゾームの脂質過酸化反応系へのKBrO₃とGSHの添加の影響 1) ラット肝ミクロゾーム分画の調製⁹⁾——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、0.25 Mショ糖溶液で10%ホモジネートを作成した。これを0°Cで9000×g、20分間遠心分離した上清を分取

し、さらに0°Cで105000×g、60分間遠心分離して得たペレットを、0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)に懸濁した。この懸濁液をラット肝ミクロゾーム分画液として実験に使用した。

2) KBrO₃とGSHの添加によるミクロゾームの脂質過酸化反応への影響¹⁰⁾——ラット肝ミクロゾーム分画 200 μg protein, 硫酸第一鉄アンモニウム 0.26 μmol (終濃度 0.26 mM), GSH 100 nmol (終濃度 0.1 mM) 及びKBrO₃ 0—100 nmol (終濃度 0—0.1 mM)を添加し、0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で全量 1.0 mlに調整した。この反応混液を37°Cで5分間反応後、TCA-TBA-HCl 溶液 [15%トリクロロ酢酸 (以下TCA), 0.375%チオバルビツール酸 (以下TBA), 0.5 M塩酸] 2.0 mlを加えて反応を止め、2%ジブチルヒドロキシルエーテル (以下BHT)/エタノール溶液 0.1 ml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、535 nmの吸光度の増大からチオバルビツール酸反応性物質 (以下TBARS) 生成量を測定した。上記の反応混液にKBrO₃ 100 nmol (終濃度 0.1 mM) とGSH 0—100 nmol (終濃度 0—0.1 mM)を添加して、同様にTBARS生成量を測定した。

3) KBrO₃とGSHの反応により生成する活性酸素種の検討——2)に記した肝ミ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 100 nmol (終濃度 0.1 mM)を添加した後、各系列に活性酸素種の消去剤としてスーパーオキシドジスムターゼ (以下SOD) 5 unit, カタラーゼ 80 unit, マンニトール 13 nmol (終濃度 13 μM), 尿酸 13 nmol (終濃度 13 μM), diethylenetriamine-N, N, N', N'', N''-pentaacetic acid (以下DTPA) 100 nmol (終濃度 0.1 mM), エチレンジアミン (o-ヒドロキシフェニル酢酸) (以下EHPG) 100 nmol (終濃度 0.1 mM), アジ化ナトリウム (以下NaN₃) 40 nmol (終濃度 40 μM)をそれぞれ別々に加え、最後にKBrO₃ 100 nmol (終濃度 0.1 mM)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NaN₃について、さらに0—100 nmol (終濃度 0—0.1 mM)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 KBrO₃, EHPG: 東京化成工業製, リノール酸, TBA, BHT, マンニトール, 尿酸, DTPA, NaN₃: 和光純薬工業製, DTNB, GSH, SOD, カタラーゼ: Sigma社製, その他の試

薬は和光純薬工業特級をそれぞれ使用した。また、生化学用溶存酸素測定装置は飯島電子工業 MD-1000 型、分光光度計は日立 U-2000 型を使用した。

結 果

1. KBrO_3 と GSH の反応性

100 nmol (終濃度 0.1 mM) の GSH に対して KBrO_3 を 0–10 μmol (終濃度 0–0.1 mM) の濃度段階で添加した結果、Fig. 1 に示したように反応溶液中の GSH 量は KBrO_3 の添加量の増大に依存して約 60 nmol (終濃度 60 μM) まで減少した。

2. KBrO_3 及び GSH の添加によるリノール酸の過酸化反応

Fig. 1. Relation of the Decrease of GSH Content by the Addition of KBrO_3

Reaction mixture contained with 100 nmol of GSH and 0–10 μmol of KBrO_3 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), adjusted to 1.0 ml.

Fig. 2. Effect of the Addition of GSH on the Peroxidation of Linoleic Acid

Reaction mixture contained with 2.4 ml of linoleic acid micelle solution, 1.0 μmol of KBrO_3 and 0–10 μmol of GSH, adjusted to 2.5 ml.

1) 共役ジエンの測定 SDS でミセル状としたリノール酸溶液に、 KBrO_3 の一定量 (1.0 μmol ; 終濃度 0.4 mM) を加え、これに GSH を 0–10 μmol (終濃度 0–4 mM) の濃度段階で添加したときの過酸化反応は、Fig. 2 に示したように GSH の添加量に依存して 234 nm の吸光度は約 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 (100 nmol; 終濃度 0.1 mM) を加え、 KBrO_3 を 0–100 nmol (終濃度 0–0.1 mM) の濃度段階で添加したときの酸素吸収速度は、Fig. 3 に示したように KBrO_3 の添加量に依存して、約 $0.8 \times 10^{-6} \text{ M/s}$ から約 $1.3 \times 10^{-6} \text{ M/s}$ まで増大した。

一方、一定量の KBrO_3 (100 nmol; 終濃度 0.1 mM) に対して GSH を 0–100 nmol (終濃度 0–0.1 mM) の濃度段階で添加したときの酸素吸収速度は、Fig. 4 に示したように GSH の添加量に依存して、

Fig. 3. Effect of the Addition of KBrO_3 on the Oxygen Uptake of Linoleic Acid

Reaction mixture contained with 1 ml of linoleic acid micelle solution, 0.26 μmol of ferrous ammonium sulfate, 100 nmol of GSH and 0–100 nmol of KBrO_3 .

Fig. 4. Effect of the Addition of GSH on the Oxygen Uptake of Linoleic Acid

Reaction mixture contained with 1 ml of linoleic acid micelle solution, 0.26 μ mol of ferrous ammonium sulfate, 100 nmol of KBrO_3 and 0–100 nmol of GSH.

約 0.7×10^{-6} M/s から約 1.2×10^{-6} M/s まで増大した。

3. 肝ミクロゾームの脂質過酸化反応系への KBrO_3 と GSH の添加の影響

ミクロゾーム蛋白質 200 μ g を添加した本反応系に一定量の GSH (100 nmol; 終濃度 0.1 mM) の添加に対して KBrO_3 を 0–100 nmol (終濃度 0–0.1 mM) の濃度段階で添加したときの TBARS 生成量は, Fig. 5 に示したようにミクロゾーム蛋白質 1 mg 当り 1 分間当りのマロンジアルデヒド (以下 MDA) 量 (MDA nmol/min/mg protein) に換算して表した場合, KBrO_3 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_3 (100 nmol; 終濃度 0.1 mM) の添加に対して GSH を 0–100 nmol (終濃度 0–0.1 mM) の濃度段階で添加したときの TBARS 生成量は, Fig. 6 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_3 及び GSH をそれぞれ 100 nmol (終濃度

Fig. 5. Effect of the Addition of KBrO_3 on the Production of TBARS in the Microsomal System

Reaction mixture contained with 200 μ g of microsomal protein, 0.26 μ mol of ferrous ammonium sulfate, 100 nmol of GSH and 0–100 nmol of KBrO_3 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.

0.1 mM) ずつ添加した反応混液に SOD 5 unit, カタラーゼ 80 unit, マンニトール 13 nmol (終濃度 13 μ M), 尿酸 13 nmol (終濃度 13 μ M), DTPA 100 nmol (終濃度 0.1 mM), EHPG 100 nmol (終濃度 0.1 mM) 又は NaN_3 40 nmol (終濃度 40 μ 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 I に示したように, NaN_3 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_3 を 0–100 nmol (0–0.1 mM) の濃度段階で添加した場合, Fig. 7 に示したように TBARS 生成量は NaN_3 の添加量の増大に依存して約 0.15 まで減少した。

Fig. 6. Effect of the Addition of GSH on the Production of TBARS in the Microsomal System

Reaction mixture contained with 200 μ g of microsomal protein, 0.26 μ mol of ferrous ammonium sulfate, 100 nmol of KBrO_3 and 0–100 nmol of GSH 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.

考 察

KBrO_3 は過酸化物質であり、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ている。⁵⁾ しかし、 KBrO_3 の投与による腎臓機能への障害作用、腎細胞での 8-ヒドロキシデオキシグアノシンの生成³⁾ 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もつ物質が生成する可能性があると考えられる。 KBrO_3 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_3 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。

著者らはリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中での KBrO_3 と

TABLE I. 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_3	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_3	0.061	30.5

The reaction mixture contained with 200 μ g protein of microsomal fraction, 0.26 μ mol of ferrous ammonium sulfate, 100 nmol of GSH and 100 nmol of KBrO_3 adjusted to 1.0 ml with potassium phosphate buffer (pH 7.4). 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_3 was added in the reaction mixture before addition of KBrO_3 .

GSH の直接的な反応について、DTNB 法⁶⁾ による SH 基の定量から検討した結果、Fig. 1 に示したように、 KBrO_3 10 μ mol (終濃度 10 mM) の添加により、反応溶液中の GSH は約 60 nmol (終濃度 60 μ M) まで減少することを認めた。すなわち、 KBrO_3 と GSH の反応は、GSH の減少又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質によって酸化を受け、その際生成した共役ジエンに由来する 234 nm の吸光度が増大する。⁷⁾ すなわち 234 nm の吸光度の増大から、過酸化物質の脂質過酸化作用が測定できる。Fig. 2 に示したように、反応溶液中の 0.875 mg のリノール酸 (=3.1 μ mol) 及び 1.0 μ mol (終濃度 0.4 mM) の KBrO_3 に対して GSH を 0–10 μ mol (終濃度 0–4 mM) の濃度段階で添加した結果、234 nm の吸光度は GSH の添加量に依存して増大したが、一方 GSH 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。この結果から、GSH と KBrO_3 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. 3 に示したように、リノール酸 3.1 μ mol 及び

Fig. 7. Effect of the Addition of NaN_3 on the Production of TBARS in the Microsomal System

Reaction mixture contained with 200 μg of microsomal protein, 0.26 μmol of ferrous ammonium sulfate, 100 nmol of KBrO_3 , 100 nmol of GSH and 0–100 nmol of NaN_3 in 0.1 M 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.

GSH 100 nmol (終濃度 0.1 mM) の存在下で KBrO_3 を 0–100 nmol (終濃度 0–0.1 mM) 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 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 μmol 及び KBrO_3 100 nmol (終濃度 0.1 mM) に対して GSH を 0–100 nmol (終濃度 0.1 mM) の濃度段階で添加した場合には、Fig. 4 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、 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。¹¹⁾ 本実験において 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はほぼ直線的に進行した。すなわち 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。¹²⁾ 実験結果より本反応系においては、 KBrO_3 100 nmol と GSH 100 nmol の反応により、約 30 nmol の活性酸素種が生成したと考えられる。

細胞のミクロゾーム分画を用いた脂質過酸化反応

系に GSH 100 nmol (終濃度 0.1 mM) を添加し、 KBrO_3 を 0–100 nmol (終濃度 0–0.1 mM) の濃度段階で添加した結果、Fig. 5 に示したように、 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 KBrO_3 100 nmol (終濃度 0.1 mM) を添加し、GSH を 0–100 nmol (終濃度 0.1 mM) の濃度段階で添加した結果、Fig. 6 に示したように、GSH の添加量に依存した TBARS 生成量の増大が認められた。一方、この TBARS の生成は GSH 又は 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 KBrO_3 の反応により生成した活性酸素種が、ミ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 ($^1\text{O}_2$)、¹³⁾ 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 (O_2^-)、¹⁴⁾ 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 ($\text{HO}\cdot$)¹⁴⁾ 等の活性酸素種の関与が考えられた。そこで、ミクロゾーム分画を用いた反応系に、GSH 及び KBrO_3 をいずれも 100 nmol (終濃度 0.1 mM) 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 I に示したように、 NaN_3 の添加により TBARS の生成抑制が見られたが、SOD、カタラーゼ、¹⁵⁾ マンニトール及び尿酸¹⁶⁾ による抑制は見られなかった。この結果から GSH と KBrO_3 の反応により発生する活性酸素種は $^1\text{O}_2$ であると推測された。¹⁴⁾ また鉄キレート剤の DTPA や EHPG¹⁴⁾ 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_3 の添加による TBARS の生成抑制は、Fig. 7 に示したように NaN_3 の添加量に依存することが認められ、 NaN_3 でクエンチングされることが知られている $^1\text{O}_2$ が、¹⁷⁾ GSH と KBrO_3 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_3 の直接的な反応から、グルタチオンチールラジカル ($\text{GS}\cdot$) を経て $^1\text{O}_2$ が生じ、 $^1\text{O}_2$ と不飽和脂肪酸との反応により、脂質ヒドロペルオキシドが生成すると考えられる。¹³⁾

生体内の還元性物質が過酸化物質と反応した結果、過酸化ラジカル等を生じることが近年多く研究されているが、GSH から生成した $\text{GS}\cdot$ 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。¹⁴⁾ この $\text{GS}\cdot$ 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 ($\text{GSOO}\cdot$) が生成し、 $\text{GSOO}\cdot$ の自己反応によるジスルフィドの生成反応が、 $^1\text{O}_2$ の生成起源であると考えられる。¹⁸⁾ $^1\text{O}_2$ 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,¹⁹⁾ 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言われている。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 ($\text{LO}\cdot$) が生成することが知られており、この $\text{LO}\cdot$ がラジカル連鎖反応の引金として働き、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、²⁰⁾ 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、 $\text{LO}\cdot$ 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^- , $\text{HO}\cdot$, $^1\text{O}_2$ 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。²¹⁾ 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、¹⁾ 活性酸素や過酸化脂質に由来する腎疾患²²⁾ との関連について今後検討す

べきであると考ええる。

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⁴⁾ など多くのことが知られている。²³⁾ KBrO_3 はそれ自身が過酸化物質であり、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。⁶⁾ 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 $^1\text{O}_2$ 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。

結 論

1. 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。
2. KBrO_3 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_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。
3. 肝ミクロゾーム分画を用いた反応系において、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 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連鎖反応が存在する可能性が示唆された。

引 用 文 献

- 1) 石館守三監修, “食品添加物公定書解説書,” 第4版, 広川書店, 東京, 1979, B 443—446.
- 2) Y. Kurokawa, V. Waite, J. Hardy, N. Fisher, J.B. Hutchinson, R. Berry, *Food Cosmet. Toxicol.*, **17**, 41 (1979).
- 3) a) 葛西 宏, “活性酸素測定マニュアル”, 浅田浩二, 中野 稔, 柿沼カツ子編, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1992, pp.173—175; b) H. Kasai, S. Nishimura, Y. Kurokawa, Y. Hayashi, *Carcinogenesis*, **8**, 1959 (1987); c) S. Kawauchi, K. Ishihara, T. Soejima, S. Watanabe, Y. Toyama, K. Kawana, *Toxicol. Lett.*, Suppl. 1992, P.218.
- 4) F. Marks, G. Füruslenberger, “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, pp.455—495.
- 5) 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**, 266 (1991).
- 6) 東 胤昭, 蛋白質・核酸・酵素, **33**, 1370 (1988).
- 7) 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, pp.69—72.
- 8) 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, pp.10—11.

- 9) 松田義宏, “生物化学実験のてびき 1 生物試料調製法,” 泉 美治, 中川八郎, 三輪谷俊夫共著, 化学同人, 京都, 1985, pp.57-63.
- 10) a) E. Cadenas, H. Sies, *Eur. J. Biochem.*, **124**, 349 (1982); b) G. Minotti, *Arch. Biochem. Biophys.*, **273**, 144 (1989).
- 11) 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).
- 12) 渡辺 聡, 河内佐十, ビタミン, **67**, 51 (1993).
- 13) E. Cadenas, “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, pp. 334-335.
- 14) 浅田浩二, “活性酸素,” 二木鋭雄, 島崎弘幸編, 医歯薬出版, 東京, 1987, pp.33-63.
- 15) 福沢健治, “過酸化脂質と生体,” 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編著, 学会出版センター, 東京, 1985, pp.45-49.
- 16) 二木鋭雄, ビタミン, **65**, 491 (1991).
- 17) N. Hasty, P.B. Merkel, P. Radlick, D.R. Kearns, *Tetrahedron Lett.*, 49 (1972).
- 18) H. Wefers, H. Sies, *Eur. J. Biochem.*, **137**, 29 (1983).
- 19) 二木鋭雄, “活性酸素,” 二木鋭雄, 島崎弘幸編, 学会出版センター, 東京, 1987, pp.14-17.
- 20) 山本互二, 川西正祐, 活性酸素・フリーラジカル, **3**, 650 (1992).
- 21) 伊藤正吾, 活性酸素・フリーラジカル, **3**, 22 (1992).
- 22) a) 青柳一正, 治療学, **26**, 592 (1992).; b) 青柳一正, “活性酸素と病態,” 井上正康編著, 学会出版センター, 東京, 1992, pp.471-483.
- 23) 古倉 聡, 吉川敏一, 近藤元治, 治療学, **26**, 568 (1992).