

臭素酸カリウムの発がん性について

(2004年1月30日受付)

(2004年2月23日受理)

黒川雄二

財団法人 佐々木研究所

1. 臭素酸カリウムと私との関わり

しばらく前に、臭素酸カリウムについて書けとの話を頂戴した。今回その発がん性について、過去の経緯もまとめたので、やや詳しく紹介してみたい。

私は、医学部を出てから臨床を目指したのだが、どういうわけか基礎医学(実験腫瘍学)を東北大学と米国留学も含め約13年ほどしてから、当時の国立衛生試験所安全性生物試験研究センター病理部長として招かれた。そこで昭和53年に当時の小田嶋部長から最初の業務として命ぜられたのが、臭素酸カリウムの発がん性試験であった。しかし私にとってこの業務としての実験には、何の魅力も感じられなかった。なぜなら、長期の発がん性試験という方法論は何も目新しいものではなく、臭素酸カリウムは既に食品添加物としての効用もよく知られ、長年使われてきた物質に過ぎないと考えたからである。そして単に長期の実験に初めて挑戦するという意義しか感ぜずに開始したのであった。しかし試験を終了してデータを纏めてみれば、腎臓がんなどを誘発する明らかな発がん物質であることが判明したのである。所属する病理部では、既に厚生省がん研究助成金研究班「突然変異原性物質の動物発癌テストに関する研究(小田嶋成和班長)」によってかなりの数の物質について発がん性試験を行っていたが、クロと出たのは初めてのことであった(以前、小田嶋部長が過酸化水素の発がん性問題で苦慮されたが実験は他の大学で行われた)。いよいよ厚生省班会議で公表することになった日の深夜、当時のF食品化学課長から電話で、「マスコミ関係が大勢来るがそれへの対処は私がするから安心して冷静にしてくれ」とのこと。小生に取って、今までの学会での発表とは全く違う事態で過酸化水素での経緯もよく知っていただけに、緊張した一日であった。が、意外に大した騒ぎもなく、むしろそれからの食品衛生調査会での発表やら、来日中のブルメンタール米国FDA長官への説明などは新鮮な経験として印象に残っている。たまたま保存しておいて昭和57年4月12日の朝日新聞朝刊では、一面の中段から下段にかけてかなり大きな扱いで報道してある。タイトルは、「パン添加物に発がん性、国立衛

生試験所確認、市販食品は大丈夫」としてあり、F課長の談話として、「詳しいデータが提出され次第、扱いを検討することになる」がある。コメントとして、動物実験で見つかる発がん物質の強度にはピンからキリまでであること、すぐに代替品を使ってむしろ危険な場合があるなどと記載があるのは、その前に過酸化水素の発がん性で余りに理屈に合わない大騒ぎがあったことを踏まえての書きぶりかとも推測される。

さてこれらのことについて、私は、ある業界誌に当時大凡以下のように書いている。

『科学をある観点で見れば、「発見の科学」と「奉仕の科学」に分けてもいいのではないか。前者は端的に言えば、本当に新しい科学上の発見であり、それらは科学への絶対的な貢献度からしてノーベル賞へつながるような研究といえよう。後者は、既成の方法論を用い、これまでよく知られている物質や現象に付いての新事実を発見するにある。臭素酸カリウムの場合はガイドラインに準じた試験を行っただけの様に見えるが、発がん性をこの物質に見いだしたことは明かな新発見なのである。たとえどんなに小さな一つの結果であっても何かについて新しく発見された事実の重みを認識すべきである。だから、「奉仕の科学」は、むしろ「発見の科学」よりも、より早く社会に反映・還元され、究極的には人類の福祉へとつながることは自明である。』

書いた当時から更に十年以上経てみれば、どこか青臭いところも感じられるが、要するに、大学から国立衛生試験所に来て、行政指向の業務に大なる疑問を感じていたのが、このことをきっかけにそれらの意義も理解できるようになったというわけであるし、私の才能がこの方向でいいのだと納得できたのであった。発がん性に関しては、すぐさま英文の速報を出し、その後、発がん性がDNAの酸化的傷害に基づくという観点から、若い研究者とかなりの数の実験をし、論文も発表出来、最終的に総説として1990年に米国専門誌に掲載されたりなど、「発見の科学」をも少しは経験することができた(私は、その後も、酢酸レチノールの発がん性にも遭遇し、数編の論文をものにする事が出来た)。以下に、主として我々が行った実験結果について記載する。

II. 毒性に関する実験結果

1. 急性毒性

経口LD₅₀値は、ラット、マウス、ハムスター雌雄で、280-495mg/kgと、種差、雌雄差は明らかではなく、低毒性物質であり、一般症状の変化に特異的なものはない。一方ヒトでは臭素酸カリウムがコールドパーマ用溶液として用いられることから、その誤飲ないし自殺目的での服用後の毒性に関する報告が多い。一般症状では、初期の悪心、嘔吐、腹痛、下痢等の消化器症状から、急性腎不全(乏尿、無尿)、内耳毒性症状(難聴、眩暈)などが発現し、致死率はかなり高い。病理組織学的には、腎近位尿細管の変性、壊死および内耳蝸牛細胞の変性が観察されるが、これらは、ラット、モルモットでも認められており、種を超えた臓器特異性と考えられる。臭素酸カリウムによる腎及び内耳毒性は、ある種の抗生物質、利尿剤でも認められている。

2. 亜急性・慢性毒性・多世代試験

ラットに600ppmの濃度で10週間飲水投与した結果では、近位尿細管上皮の変性、壊死が見られ、細胞内に $\alpha_2\mu$ グロブリンの蓄積が認められている。マウスでは特段の所見は認められていない。一方、英国では臭素酸カリウムで処理した小麦粉から作ったパンを混餌飼料として、ラット、イヌに長期ないし多世代に投与した報告があるが、特記すべき所見はない。

3. 変異原性

復帰突然変異性は弱陽性であるが、染色体異常試験および小核試験の結果は、*in vitro*、*in vivo*ともに強陽性である。

III. 発がん性に関する実験結果

1. 発がん性試験

雌雄F344ラット(各群53匹)に臭素酸カリウムを、500, 250, 0ppmの濃度で110週間飲水投与した。その結果、雌雄の投与群で腎細胞腫瘍の発生率が対照群に比し有意に増加し、腎に対する発がん性が明らかであった(なお、雄マウス・ハムスターにおいても有意差は示さなかったが、腎細胞腫瘍の発生が認められている)。ラットではその他に、雄で腹膜由来中皮腫の発生率が有意であった。

2. 用量反応試験

この結果に基づき、雄ラットによる104週間の用量反応を求める低濃度試験(500, 250, 125, 60, 30, 15, 0ppm)が行われた。有意な腎細胞腫瘍発生率の上昇が、125ppm以上の投与群で見られ、更に発がん性試験では観察されなかった甲状腺腫瘍の発生が500ppm群で認められた。このデータに基づき、実質安全量(VSD)を算定した結果、 10^{-6} レベルでの値は0.95ppmであった。

3. 投与期間・投与濃度と腎細胞腫瘍発生率の検討

雄ラットに500ppmを投与し、13, 26, 38, 52, 104週後に屠殺して病理組織学的に検索したところ、腎細胞腫瘍は26週間投与後に既に認められた。一方、500ppmを13, 26, 38, 52週間投与しその後蒸留水のみ与えて104週後に屠殺観察したところ、13週間のみの投与で腎細胞腫瘍が発生することが明らかとなった。13週間の臭素酸カリウム投与量は、4.2-4.3mg/kgであった。

4. プロモーター作用の検討

N-エチル-N-ヒドロキシエチルニトロサミンをイニシエーターとして2週間投与し、その後、臭素酸カリウムを15-500ppmの濃度で与えた結果、30ppm以上の投与群で、腎細胞腫瘍に対するプロモーター作用が認められた。

IV. 臭素酸カリウムの発がん機構

臭素酸カリウムはAmes試験、染色体異常試験、小核試験などに陽性結果を示すことから変異原性発がん物質と考えられている。しかし、抗酸化剤の併用投与により小核誘発能が低下するなど、その変異原性にはある種の活性酸素が関与する可能性が示唆されており、酸化剤としての化学的性質を考慮に入れると、その発がん機構には酸化的ストレスの関与が強く疑われる。

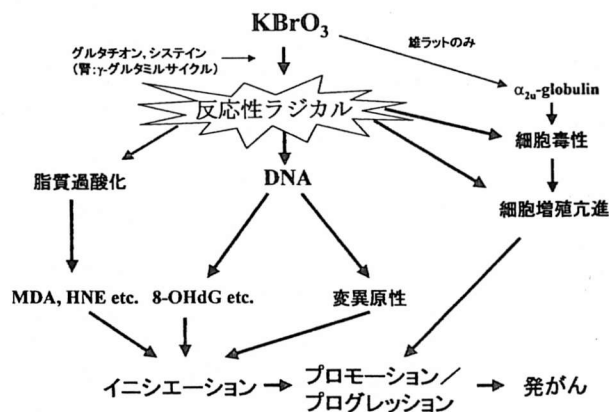


図1 臭素酸カリウムの発がん機構模式図

1. ラジカル産生

ラット腎遊離細胞と臭素酸カリウムを*in vitro*で反応させると、ESRにより活性酸素種の発生が検出される。そのシグナルはスーパーオキシド、過酸化水素、OHラジカルの各分解酵素には影響されず、ヒスチジンおよびアジ化ナトリウムにより抑制される。従って、発生したラジカル種は一重項酸素の可能性が高く、ケミルミネッセンスの測定においてもそれを支持する結果を得ている。しかし最近の報告では、ウシ胸腺DNAと臭素酸カリウムとの反応系において、グルタチオンあるいはシステイン共存下で高率に臭素酸カリウムは還元され、グアニンに特異的に反応する一酸化臭素ラジ

カルや臭素ラジカルが産生されている可能性も報告されている。腎臓における γ -グルタミルサイクルの存在を考えると、SH化合物の還元作用を介した臭素酸カリウムによるラジカル産生が標的臓器の腎臓に特異的に生じている可能性を示唆している。

2. 脂質過酸化

ラジカルによる生体影響の中で特に重要なものの一つに脂質の過酸化が上げられる。臭素酸カリウムをラットに投与すると腎臓の脂質過酸化(マロンジアルデヒド:MDA)レベルが上昇し、さらにこの上昇は抗酸化剤のビタミンC、メラトニン、NOドナーのグリセリルトリニートレートの投与により抑制される。従って、臭素酸カリウムの産生するラジカルは標的臓器の腎臓において脂質の過酸化を引き起こし、結果としてMDAを含む多種多様の過酸化脂質産物を産生している可能性が考えられる。MDAはアデノシンと直接結合し、変異原として作用することが知られており、また脂質過酸化反応における代表的産物の一つ、4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)はSH基を持つ細胞内蛋白と容易に結合しその機能を不活化し、またデオキシグアノシンとはエクソサイクリック付加体を形成するなど脂質過酸化生成物の直接的な発がん過程への関与が知られている。

3. 酸化的DNA傷害

活性酸素や脂質過酸化反応などの酸化的ストレスは直接DNAにも作用して、DNAの酸化的損傷を引き起こすことが知られている。損傷塩基として今までに8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)、チミングリコール、2-ヒドロキシデオキシアデニン、5-ヒドロキシデオキシシトシンなどが報告されているが、中でも8-OHdGはその発がん性への関与の可能性からもっとも研究が進んでいる。8-OHdGはグアノシンが本来対合するシトシンと同頻度でアデニンと誤対合を形成し、その結果GCからTAのトランスバージョンを引き起こすと考えられている。さらに8-OHdGにはOGG1遺伝子にコードされた特異的修復酵素が存在し、この損傷塩基の生物学的有意性を裏付けるものとして注目されている。臭素酸カリウムをラットに単回投与すると24時間後には腎臓DNA中の8-OHdGレベルが上昇し、非標的臓器の肝臓では変化は認められない。また抗酸化剤の併用投与によりその上昇は抑えられ、さらに、長期発がん性試験と同様に飲水に混じて投与してもその上昇が観察される。これらの結果は、臭素酸カリウムにより生じる酸化的ストレスが直接DNAに障害を与え、その結果生じた8-OHdGが発がん過程に関与している可能性を示唆している。一方、臭素酸カリウムのラットへの単回投与後に認められる8-OHdGレベルの上昇は以後漸減するという結果が示すように8-OHdG付加体に対してはOGG1蛋白に代表される除去修復機構が存在する。しかし、OGG1遺伝子過剰発現細胞に臭素酸カリウムを作用させると確かに生成される8-OHdGの除去修復は進むものの点突然

変異の頻度には正常細胞と差がないことが最近報告されており、臭素酸カリウム発がん過程への酸化的ストレス修復機構の関わりは今後の研究課題である。

4. その他

臭素酸カリウムは雄ラット特有の尿中蛋白 α_{2u} グロブリンを腎臓に蓄積させる。その結果、腎尿管上皮の細胞増殖を亢進させ、腎プロモーション作用を発揮する。臭素酸カリウムは雌雄ラットに酸化的ストレスを及ぼすと同時に、雄ラットには α_{2u} グロブリンを介したプロモーション作用を発揮すると考えられ、この事が臭素酸カリウム腎臓がんあるいは腎プロモーション作用で認められた雌雄差の一部を説明しているものと考えられている。

V. 臭素酸カリウムに関わる文献から見た実験の流れ

さて、現在の私は全く実験から離れてしまい、デスクワークのみの生活である。そこで、インターネットを活用して臭素酸カリウムに関する文献の整理・分類を試みた。情報元として、米国NLM(National Library of Medicine)のPubMedを用い、キーワードとしてpotassium bromateを入力して検索した。当然のことながら数秒で114編の文献がリストアップされた。今更ながら、昔のIndex Medicusを使いながらの検索に比しての凄まじい差を思い知らされた。我々が最初に臭素酸カリウムの発がん性を論文発表したのが1982年であるのでそれ以後2002年5月までとして検索された94編とし、更にモルモットを用いた耳毒性、人における中毒例、酸化剤としての食品添加物に関する論文及び臭素酸カリウム発がん性に関する総説を除外した実験的研究論文57編を対象として様々な分類を試みた。

まず、全論文は*in vivo*41編、*in vitro*17編に大別される(1編は両者を扱っていた)。*in vivo*での実験を分類すると、当然ながら発がん性を病理組織学的に研究したものが16編と最も多く、次に、*in vivo*における酸化的ストレスをあつかったものが11編である。さらに、*in vivo*小核試験で用いた論文が10編あり、臭素酸カリウムが陽性対照物質として有用であることを示している。一方*in vitro*では、当然ながらAmes試験での作用機序、細胞培養での増殖への影響、DNAへの酸化的傷害などが研究されている。全論文で、様々な見地から酸化的ストレス(酸化的DNA傷害、8-OH-dG、脂質過酸化、ESR、抗酸化剤の影響など)を扱ったものが31編(54%)であり、この物質がこの分野の研究に多用されていることが明らかである。年代的に見ると、当然であるが最初の我々の発表(1982年)から約10年間の20編は日本(国立衛生試験所の病理部、変異原性部)からのみであったが、1992年の米国からを初めに諸外国の発表も増加している。国別に論文数を見ると、日本30(うち、我々が19)、米国10、ドイツ4、インド3、英国・韓国2、スペイン・ナイジェリア、イタリー、フランス、エジプト、デンマーク各1となっている。

VI. 臭素酸カリウムの過去と将来

最後に臭素酸カリウムの辿った歴史と今後の研究課題について簡単に触れたい。日本においては、先ず昭和28年に食品添加物として指定されたのだが、昭和51年に変異原性が指摘されるまで20数年間問題なく使用されてきたわけである。ところがその変異原性により最初に業界の使用自粛があり、ついで毒性・発がん性試験が一気に開始され、驚いたことにこれまでJECFA評価でA(1)リストに掲げられていた臭素酸カリウムに明確な発がん性が証明されたのである。それ以後は、厚生省、JECFAで次々と使用基準改正が行われ、平成2年には英国・EUでついに使用禁止の措置が、さらにJECFA評価でもA(1)リストから除外という結末を迎えた。その後日本では、厚生労働委員会などで安全性への懸念が討議され、現在は、新高感度測定法の開発とそれを用いたパンにおける残留量を検討中とのことで

ある。

食品添加物としての有用性があることは確かだとは聞いているが、このまま行けば、臭素酸カリウムの食品添加物としての生命は終わることはまず明らかであろう。しかしながら、長期投与試験で証明された発がん性により、今後、臭素酸カリウムは特に腎臓を標的とした発がん物質として、と同時に、発がん機構に関わる酸化的ストレスを研究するために好適な物質としての生命を与えられたと言えるのではないだろうか。なお、今後の課題として、先ず、マウスにおける発がん性を明確にすることが必要と思われるが、20年ほど前実験開始当時には思いもつかなかった遺伝子改変動物を用いる（国立医薬品食品衛生研究所、西川私信）ことなどにより、近い将来その答えが出るであろうし、更に思いがけない新たな事実の発見も可能ではないかと密かに期待しているところである。

表1 臭素酸カリウム小史

	西暦	事項	備考
昭和 28	1953	日本で食品添加物に指定	小麦粉改良剤として 50ppm 以下、魚肉練り製品品質改良剤として 270ppm 以下
昭和 39	1964	JECFA における最初の評価	
昭和 51	1976	変異原性陽性	厚生省発表
昭和 52	1977	日本小麦粉業界添加自粛 毒性試験（急性、慢性等）開始	国立衛生試験所
昭和 53	1978	ラット発がん性試験開始	国立衛生試験所
昭和 54	1979	JECFA 評価で、A(1) リスト	小麦粉改良剤として、75ppm 以下
昭和 55	1980	日本パン業界使用自粛	
昭和 57	1982	ラット腎臓などへの発がん性公表	厚生省班会議、米国 FDA、国内専門誌等
昭和 58	1983	厚生省で使用基準の改正 JECFA 評価	パン用小麦粉以外の使用禁止（50ppm 以下から 30ppm 以下に変更。最終食品に残存しないこと） 小麦粉改良剤として、75ppm 以下（但し最終食品に残存しないこと）
平成 1	1989	JECFA 評価で ADI 設定不可能、使用基準改正	小麦粉改良剤として、60ppm 以下（最終食品に残存しないこと）。その他の用途の設定を認めず。
平成 2	1990	英国・EU で、使用禁止措置	最終食品への残留の確証なしの理由。
平成 4	1992	JECFA 評価	遺伝毒性発がん物質であり、小麦粉改良剤としての使用は不適切と結論
平成 7	1995	JECFA 評価	新高感度分析法によるデータから、小麦粉改良剤としての使用は不適切との結論を支持。A(1) リストから除外
平成 9	1997	輸入小麦粉への混入が判明し回収 衆・参議院委員会で安全性への質問 厚生労働省でパン中の新高感度分析法（HPLC 法）を通知	
平成 13	2001	衆議院厚生労働委員会で安全性についての質問（5月） 食品衛生分科会における検討（9月） 衆議院厚生労働委員会で安全性の検査実施に関する質問に対する答弁（10月）	英国・EU で禁止の食品添加物を使用している理由 新高感度分析法による現在市販のパンの残留量検査実施を決定 食品衛生分科会での結論を報告
平成 14	2002	新高感度分析法による現在市販のパンの残留量検査	国立医薬品食品衛生研究所

VII. 謝辞

臭素酸カリウムの実験等に関して、昭和52年(1977)以来、国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)安全性生物試験研究センターの病理部と毒性部に属する多くの方々にご協力頂いた。この紙面をお借りして謝辞を呈する次第である。今回の原稿作成に関しては、梅村隆志博士にお世話になったことを特記したい。

VIII. 文献

(我々研究グループからの内、最も重要と思われるものだけを挙げた)

1. Kurokawa, Y., Hayashi, Y., Maekawa, A., Takahashi, M. & Kokubo, T.: Induction of renal cell tumors in F-344 rats by oral administration of potassium bromate, a food additive. *Gann*, 73: 335-338 (1982).
2. 大野裕子、小野寺博志、高村直子、今沢孝喜、前川昭彦、黒川雄二:臭素酸カリウムのラットにおける癌原性について。衛生試験、100: 93-100 (1982)
3. Kurokawa, Y., Hayashi, Y., Maekawa, A., Takahashi, M., Kokubo, T. & Odashima, S.: Carcinogenicity of potassium bromate administered orally to F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 71: 965-972 (1983).
4. Kasai, H., Nishimura, S., Kurokawa, Y. and Hayashi, Y.: Oral Administration of the Renal Carcinogen, Potassium Bromate, Specifically Produces 8-Hydroxydeoxy-guanosine in Rat Target Organ DNA, *Carcinogenesis*, 8, 1959-1961 (1987)
5. Kurokawa, Y., Maekawa, A., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: Toxicity and Carcinogenicity of Potassium Bromate-A New Renal Carcinogen, *Environm. Health Perspect.*, 87, 309-335 (1990)
6. Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.: A possible role for cell proliferation in KBrO₃ carcinogenesis., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119, 463-469 (1993)
7. Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R., and Kurokawa, Y.: A possible role for oxidative stress in potassium bromate (KBrO₃) carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 16, 593-597 (1995)
8. Umemura, T., Takagi, A., Sai, K., Hasegawa, R., and Kurokawa, Y.: Oxidative DNA damage and cell proliferation in kidneys of male and female rats during 13-weeks exposure to potassium bromate (KBrO₃). *Arch Toxicol.*, 72, 264-269 (1998)