臭素酸カリウムの発がん病理研究

梅村隆志

Cancer research for potassium bromate

Takashi Umemura

Safety assessment of potassium bromate has already been evaluated as a food additive and contaminant. In this paper, based on our review article entitled "Etiology of bromate-induced cancer and possible modes of action-studies in Japan", potassium bromate-related data including carcinogenicity tests, tumor initiation/promotion studies, *in vivo* mutagenicity tests and modes of action studies were outlined. In particular, the contents focused on formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), one of oxidized DNA damages, following exposure to potassium bromate and its inducing mutation spectra. In addition, on-going studies leading to clarification of the relationship between oxidative stress and cancer, and new experimental animal models of human colorectal cancer using potassium bromate were introduced.

Keywords: potassium bromate, carcinogenic modes of action, 8-hydroxydeoxyguanosine, experimental model of human colorectal cancer

1. はじめに

臭素酸カリウムは1953年より食品添加物(小麦粉処理剤及び魚肉ねり製品への使用)に指定されていたが、1976年に当所変異遺伝部で実施されたデータに基づき厚生省がその変異原性試験の陽性結果を公表した。引き続き当所病理部にてラットを用いた2年間の長期間反復試験が実施され、その発がん性が明らかとなり¹¹、1982年、厚生省よりその内容が公表された。その結果、使用基準が改正され、パン以外への使用と最終製品に残存することが禁止され、以降、残留性を監視する観点から、食品中の臭素酸分析法の改正が行われてきている。このように食品添加物としての安全性評価に一定の区切りがついた中、新たな経路からの暴露の可能性が報じられた。それは、塩素に代わる新たな水道水消毒に使用されたオゾンにより、あるいは消毒剤としての次亜塩素酸生成時に不純物の臭素が酸化され、何れも臭素酸が生成されると

2. 発がん性試験

2.1. ラット発がん性試験

雌雄F344ラット(各群53匹)に臭素酸カリウムを500(60週目より雄は400)ppmあるいは250ppmの濃

言うもので、汚染物質として評価の必要性が求められた. 2008年には食品安全員会から清涼飲料水中に含まれる汚 染物質としての臭素酸について、2015年には殺菌料と しての添加物次亜臭素酸より生じる臭素酸について、安 全性評価が行われている. このように臭素酸は古くて新 しい環境化学物質と言えるが、時代を通じて行われてき た安全性評価は、1978年に当所病理部で開始された発 がん性試験とそれに続く二段階発がん性試験等の試験成 績を基に行われてきた. 当時これらの試験を担当された 元当所病理部室長(のちに安全性生物試験研究センター 長)の黒川雄二先生が度々、臭素酸に関して述懐されて おられるように²⁾、当所病理部にとって臭素酸は非常に 縁の深い化学物質であると共に、病理学的に多くの興味 深い特徴を有している化学物質である. 本稿では、著者 が黒川先生と共に2006年に発表した総説3をもとに近年 のデータなどを加えながら、臭素酸の病理学的特徴を概 説し、未だ解明されていない点、さらには新たな発がん 研究のモデル化合物としての役割について言及する.

^{*} To whom correspondence should be addressed: Takashi Umemura; Division of Pathology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9819; Fax: +81-3-3700-1425

度で110週間飲水投与した. その結果, 腎細胞腺腫並びに腎細胞癌の発生頻度, さらに二つの腫瘍を併せた発生頻度が雌雄の投与群で対照群に比して有意な高値を示した. また, 雄の投与群で腹膜中皮腫の発生頻度が対照群に比して有意に高かった¹⁾. 臭素酸カリウムの腎発がん機序に関しては後述のように多くの研究が行われ, 酸化ストレスの関与が考えられている. 一方, 腹膜中皮腫の発生機序についての研究はほとんどない. しかし, 臭素酸カリウムと同様に腎発がん性が報告され, その発がん機序に酸化ストレスの関与が考えられている鉄ニトリロ三酢酸も同様に腹膜中皮腫を併発している事実は興味深いところである.

2.2 用量反応試験

雄のF344ラット(各群20~24匹)に臭素酸カリウムを15,30,60,125,250ならびに500ppmの濃度で104週間,飲水投与した。その結果,腎細胞がんが500ppm群で20匹中3匹に認められ,腎細胞腺腫を含む腎細胞腫瘍の発生率は125ppm以上の群で有意に高値を示した。また,甲状腺濾胞腺腫と腺癌を合わせた発生率並びに腹膜中皮腫の発生率が500ppm投与群で有意に高かった 4 .その後に発表されたDeAngeloらのグループによる試験 5 がより低用量からの試験で1群当たりの匹数も多いことから,WHOやEPAをはじめ,食品安全委員会の清涼飲料水中の臭素酸の安全性評価にはこちらの試験結果が用いられている。

2.3 マウス発がん性試験

各27匹の雄のB6C3F₁、BDF₁、CDF₁系マウスに臭素酸カリウムを750ppmの濃度で88週間,飲水投与した. その結果,腎細胞腫瘍の発生率に対照群との間に有意な発生率を示す系統はなかったが,腎細胞癌がB6C3F₁系統のマウス投与群で1例と腎細胞腺腫が3つの系統のマウスで計4例認められた.また,CDF₁マウスの小腸の腺腫並びにB6C3F₁の肝細胞腺腫の発生率が有意に高かった⁶、マウスではこのように明らかな腎発がん性が認められなかったが,このCDF₁マウスで認められた小腸腫瘍の誘発は後述の遺伝子改変動物による試験が実施されるに至り,大きな意味を持つものとなった.

3. 発がんイニシエーション, プロモーション試験

3.1. 発がんイニシエーション試験

各15匹のF344ラットに臭素酸カリウムを60, 125, 250ならびに500ppmの濃度で13週間,飲水投与した. 2週間の休薬後,腎発がんプロモーター物質のニトリロ三酢酸 (NTA) を1%の濃度で混じた飼料を37週間自由に摂取させた.その結果,臭素酸カリウム500ppmを投

与した群の異型腺管の1匹あたりの個数と異型過形成の発生頻度と1匹あたりの個数が蒸留水を投与後、NTAを投与した群に比して有意な高値となった⁷. 従って、臭素酸カリウムは発がんイニシエーション活性を有していることが明らかとなったが、生じた病変は前がん病変にとどまり、腫瘍形成は認められなかったことから、その活性は非常に低いものと考えられた.

3.2. 発がんプロモーション試験

雄のF344ラット、120匹にN-ethyl-N-hydroxymethyl-nitrosamine (EHEN) を500 ppm の濃度で2週間,飲水投与し、その後、臭素酸カリウムを15、30、60、125、250、500 ppm の濃度で24週間投与した。その結果、単位面積当たりの異型腺管の数が30 ppm 以上の群で用量相関性に増加し、有意な高値となった 8 、また、雌を用いた試験においても、EHEN 誘発の腎腫瘍を500 ppm の臭素カリウムを30週間投与したところ、発がん促進作用が認められた 9 .

4. 腎発がん機序

4.1. 発がんイニシエーション作用

4.1.1. 酸化的 DNA 損傷

酸化的 DNA 損傷の一つ,8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) を国立がんセンターの葛西先生が発見され,世界で最初に $in\ vivo$ での8-OHdG レベルの上昇を報告したのが臭素酸カリウムをラットに投与した実験であった 10 . その後,各群 5 匹の雌雄 F 344 ラットに臭素酸カリウムを 500 ppm の濃度で1, 2, 3, 4, 13 週間,飲水投与する実験が行われ,その結果,雄ラットでは腎臓 DNA中の<math>8-OHdG レベルが1 週目より,雌ラットでは3 週目より有意な上昇が確認された 11 .

4.1.2. In vivo 変異原性試験

元当所変異遺伝部長能美健彦先生が開発されたgptをレポーター遺伝子とするgpt delta動物を用いたin vivo変異原性試験が行われている.gpt deltaラットに臭素酸カリウムを60,125,250ならびに500ppmの濃度で13週間飲水投与した.また,500ppm投与群では投与1,5,9週目にも検査を実施した.その結果、腎臓DNA中の主に点突然変異を検出するgptの変異頻度は250ppm以上の投与群で上昇傾向は認められたが有意な変化とならなかった.一方,主に欠失変異を検出するred/gam (Spi)の変異頻度は500ppm投与群で投与開始9週目より有意な高値を示した⁷.

4.1.3. 現在の研究

臭素酸カリウムは発がん実験条件下で8-OHdGレベ

ルの上昇が認められ、その発がん過程初期への酸化的 DNA損傷の関与が想定されている. 特に、gpt delta 動物を用いた実験では, in vivo変異原性試験に加え, 8-OHdGの測定も同一動物で同時に行えることから, 8-OHdG形成と遺伝子突然変異との関連に関する研究が 現在も病理部では行われている. 8-OHdGはアデニンと 誤対合することから、最終的にG:C-T:Aのトランスバー ジョン変異を引き起こすと考えられているが、上述の ように、主に点突然変異を検出するgpt assayでは有意 な遺伝子突然変異頻度の上昇は認められていなかった. そこで、臭素酸カリウムの発がん標的部位が腎皮質部 であることに着目し、腎臓全体からDNAを抽出してい たそれまでの方法に代え、腎皮質部のみからDNAを抽 出する方法を用いたところ、欠失変異と共にG:C-T:Aの トランスバージョン変異を含むgpt遺伝子突然変異頻度 の有意な上昇を観察している (未発表データ). そこで 現在では、8-OHdGを上昇させるものの遺伝子突然変異 を誘発しないアリザリンを臭素酸カリウムと併用投与 する試験、抗酸化酵素群の転写因子であるNrf2をホモ に欠損させたgpt deltaマウスなどを用いた試験により、 8-OHdG形成を実験的に上昇させると臭素酸カリウムに より生じる欠失変異は頻度が上昇すると共に欠失サイズ も大きくなることが突き止められており(未発表デー タ)、これらの研究を発展させて、8-OHdGが直接的に 関与する遺伝子突然変異スペクトラムの同定を目指して いる. また、8-OHdGによるイニシエーション活性は非 常に弱いものであるとの仮説を立て、実際の8-OHdGが 有する発がんポテンシャルを明らかにする研究を進めて いる.

4.2. 発がんプロモーション作用

4.2.1. 細胞増殖活性

雌雄のF344ラットに500ppmの濃度の臭素酸カリウムを飲水投与して、投与開始後、1、2、3、4ならびに13週間の腎尿細管のbromodeoxyuridine(BrdU)の取り込み率(BrdU-LI)を検索した。その結果、発がん標的部位の近位曲部尿細管のBrdU-LIが雄ラットでは投与開始後1週目より、雌ラットでは13週目に有意な高値を示した 10 、また、雌雄のF344ラットに臭素酸カリウムを15、30、60、125、250ならびに500ppmの濃度で4週間、飲水投与して、近位曲部尿細管のBrdU-LIを検索したところ、雄ラットでは30ppm以上から、雌ラットでは250ppm以上から有意な高値となった 12

4.2.2. α_{2u} -globulinの蓄積

雄のF344ラットに臭素酸カリウムを15,30,60,125,250ならびに500ppmの濃度で4週間,飲水投与し

て, 腎臓中の α_{2u}-globulin 蛋白量を ELISA 法により測定 した結果、30ppm以上から用量相関性に増加が認めら れ, 125 ppm 以上で有意の高値となった¹²⁾. α₂₁-globulin は雄ラット特有の尿中蛋白で、その蓄積により細胞障害 さらには細胞増殖を誘発する. 臭素酸カリウムによる腎 尿細管の細胞増殖活性は上述のように雄ラットで非常 に顕著に認められ、また、発がんプロモーション作用 も雄は雌に比して高い. 雄で観察されるこれらの作用に α_{2u}-globulinの蓄積が大きく寄与していると考えられる. しかし、臭素酸カリウムは、雌においても発がんプロモー ション活性を有しており、その発生機序に α₂₁-globulin の蓄積以外のメカニズムが関与していることは明らか である. 一つの有力な機序として, 酸化ストレスを引き 金とした細胞周期シグナル伝達の活性化が考えられる が、この分野の研究は進んでいない。また、 α_{2u} -globulin の蓄積は、α₂₀-globulinポケットと呼ばれる化学構造部 位と外来化学物質の共有結合により、細胞質内のライソ ゾームによる分解に抵抗性を持つことがその発生機序で あると考えられている.しかし、臭素酸カリウムの化学 構造から判断して、α21-globulinとの共有結合の可能性 は低く、ライソゾームの分解酵素が酸化によって失活す ることが原因である可能性も示唆されているが詳細は不 明のままである.

5. 発がん研究への新たな役割

5.1. 8-OHdG修復酵素欠損マウス

MUTYH は8-OHdGの修復酵素として知られてい るが、その変異が遺伝性大腸腺腫症患者に見つかり、 MUTYH-associated polyposis (MAP) と呼ばれている. また、8-OHdGの修復酵素の可能性が高いと考えられて いるMsh2の変異が遺伝性非大腸腺腫症(HNPCC)患 者から見つかっている. これら遺伝性大腸がんの病態研 究のために、それぞれの遺伝子欠損マウスに臭素酸カリ ウムを投与して, 小腸腫瘍を検索する実験モデルが提 唱されている^{13,14)}. 生じた腫瘍は小腸腫瘍ではあるもの の、それぞれの欠損マウスで高率に腫瘍が認められ、腫 瘍組織から抽出したAPCやCtnnb1遺伝子には変異が観 察され、MAP患者の腫瘍にAPCの変異が認められてい ることと一致していた. さらに, Ctnnb1 の $GSK-3\beta$ に よるリン酸化部位における点突然変異のスペクトラム は、Msh2欠損マウスに臭素酸カリウムで誘発した腫瘍 とHNPCC患者の腫瘍とで一致していた. これらの事実 から、MUTYHあるいはMsh2欠損マウスに臭素酸カリ ウムを投与して誘発した小腸腫瘍は当該遺伝子変異に起 因した遺伝性大腸がんの研究に大いに役立つものと考え られている.

Genotype	KBrO ₃ (ppm)	Effective no. of mice	Preneoplastic lesion		Neoplastic lesions				
			Atypical hyperplasia		Adenoma		Adenocarcinoma		Combined incidence of
			Incidence	Multiplicity (no. of lesions/mouse)	Incidence	Multiplicity (no. of lesions/mouse)	Incidence	Multiplicity (no. of lesions/mouse)	preneoplastic and neoplastic lesions
Nrf2 +/+	0	20	0	0	0	0	0	0	0
	750	18	0	0	0	0	0	0	0
	1500	16	0	0	0	0	0	0	0
Nrf2 -/-	0	21	1 (5%)	0.05 ± 0.22	0	0	0	0	1 (5%)
	750	21	2 (10%)	0.19 ± 0.68	0	0	0	0	2 (10%)
	1500	22	4 (18%)	0.18 ± 0.39	1 (5%)	0.05 ± 0.21	1 (5%)	0.05 ± 0.21	6 (27%)*,†

Table 1 Incidences and multiplicities of neoplastic proliferative lesions of the small intestine in *Nrf2*^{+/+} and *Nrf2*^{-/-} mice treated with KBrO₃ for 52 weeks

5.2. Nrf2欠損マウス

我々は上述の実験モデルにヒントを得て、ある種の遺 伝子欠損マウスに臭素酸カリウムを投与して, 小腸腫瘍 の発生を解析することで、当該遺伝子の発現異常を遺伝 的に有しているヒト集団の酸化ストレスに起因した大腸 発がんリスクを評価することが可能であると考えた. 抗 酸化酵素群の転写因子Nrf2には遺伝子多型が存在する ことが知られており、その発現プロモーター領域に多型 があることから、おそらくこの集団ではNrf2が不活化 している可能性が考えられている. そこで、Nrf2欠損 マウスに臭素酸カリウムを投与する実験モデルを用い て、その集団の酸化ストレスに起因した大腸発がんリス クを検証した. Nrf2ホモ欠損マウス (Nrf2^{-/-}) とその 野生型 (*Nrf2*^{+/+}) マウスに臭素カリウムを750あるいは 1500ppmの濃度で52週間,飲水投与して,小腸の腫瘍 性増殖性病変について病理組織学的に検索した. 生じた 腫瘍性増殖性病変に β-catenin ならびに cyclin D1 の蓄積 が認められ、遺伝性大腸がんの動物実験モデルで認めら れた腫瘍とその組織学的特徴が一致した. その発生頻度 は Table 1. に示す. Nrf2^{+/+}マウスでは腫瘍性増殖性病 変は観察されなかったが、Nrf2-/-マウスでは、臭素酸 カリウムの高用量投与群で小腸の前腫瘍性病変と腫瘍性 病変を併せた発生頻度が対照群に比して有意な高値とな り、Nrf2の遺伝子多型を有するヒト集団では、酸化ス トレスに起因した大腸がんリスクが高い可能性が示され た15).

6. まとめ

食品添加物としての安全性評価に続き、汚染物質としての安全性が議論されてきた臭素酸カリウムは本稿で紹介してきたようにその腎発がん機序の解明を中心に研究が進んできた。国内外の評価機関における評価値の算出には腹膜中皮腫の発生頻度が用いられていることは少々皮肉な面もあるが、この腎発がん機序の研究により、酸

化的 DNA 損傷の一つである 8-OHdG の生物学的意義を 深めることになった. 近年の研究からは、8-OHdGのア デニンとの誤対合反応により生じるG:C-T:Aトランス バージョン変異は生体内では比較的起きにくく、おそら くグリコシラーゼによる塩基除去修復過程に起因すると 考えられる欠失変異が主な変異であるらしいことが分 かってきた. また、このDNA修飾自体の発がんポテン シャルはそれほど高くないであろうとの仮説から、現在 も研究が進行中である. これらの研究は、添加物であり 汚染物質である臭素酸カリウム自身の研究の枠を超え, 酸化ストレスと発がんという大きなテーマにつながって いる. そのような中で近年, 遺伝子改変マウスに臭素酸 カリウムを投与して小腸腫瘍を検索するヒト大腸がんモ デルが発表され、新たな臭素酸カリウムの活躍の場が現 れた. マウスの小腸腫瘍は1990年に黒川先生が行われ た数種類の系統のマウスを用いた発がん性試験の中で1 つの系統にのみ認められた腫瘍であり、四半世紀の時を 超えてあらためて注目されるに至ったのである.黒川先 生のほくそえむ表情を想像しながら、先生の跡を継いで 臭素酸カリウムの実験を継続してきた著者の特論をここ で終わりとしたい.

引用文献

- 1) Kurokawa Y, Hayashi Y, Maekawa A, Takahashi M, Kokubo T: *Gann.* 1982:73:335-8.
- 2) Kurokawa Y: Jpn J Food Chem 2004;11:43-7.
- 3) Umemura T, Kurokawa Y: *Toxicology*. 2006:221:154-7.
- 4) Kurokawa Y, Aoki S, Matsushima Y, Takamura N, Imazawa T, Hayahsi Y: *J Natl Cancer Inst.* 1986;77:977-82.
- 5) DeAngelo AB, Geroge MH, Kilburn SR, Moore TM, Wolf DC: *Toxicol Pathol.* 1998;26:587-94.
- 6) Kurokawa Y, Maekawa A, Takahashi M, Hayashi Y:

^{*:} p < 0.05 vs. the relevant control, †: p < 0.05 vs. KBrO₃(1500 ppm) in Nrf2 +/+

- Environ Health Perspect. 1990;87:309-35.
- Umemura T, Kanki K, Kuroiwa Y, Ishii Y, Okano K, Nohmi T, Nishikawa A, Hirose M: Cancer Sci. 2006;97:829-35.
- 8) Kurokawa Y, Aoki S, Imazawa T, Hayashi Y, Matsushima Y, Takamura N: *Jpn J Cancer Res*. 1985;76:583-9.
- 9) Umemura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y: *Carcinogenesis*. 1995;16:593-7.
- 10) Kasai H, Nishimura S, Kurokawa Y, Hayashi Y: *Carcinogenesis*. 1987;8:1959-61.
- 11) Umemura T, Takagi A, Sai K, Hasegawa R,

- Kurokawa Y: Arch Toxicol. 1998;72:264-9.
- 12) Umemura T, Kitamura Y, Kanki K, Maruyama S, Okazaki K, Imazawa T, Nishimura T, Hasegawa R, Nishikawa A, Hirose M: Cancer Sci. 2004;95:393-8.
- 13) Sakamoto K, Tominaga Y, Yamauchi K, Nakatsu Y, Sakumi K, Yoshiyama K: *Cancer Res.* 2007;67:6599-604.
- 14) Isoda T, Nakatsu Y, Yamauchi K, Piao J, Yao T, Honda H: *Int J Biol Sci.* 2014;10:940-7.
- 15) Yokoo Y, Kijima A, Ishii Y, Takasu S, Tsuchiya T, Umemura T: *Cancer Med*. 2016;5:1228-38.