

Bromate가 흰쥐의 장기 Glutathione 함량에 미치는 영향

김나영 · 강혜옥 · 이무강 · 최종원*

경성대학교 환경문제 연구소

Effects of Bromate on the Glutathione Synthesis in Various Organs of Rats

Na-Young Kim, Hye-Ok Kang, Mookang Lee and Jongwon Choi*

Environmental Science and Technology Research Center, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

Abstract

The effects of bromate administration on glutathione were studied in rats. The contents of glutathione in the liver and kidney were significantly decreased but the alteration was not significant in lung and blood by bromate administration. The decrease occurred without concomitant increases in oxidized glutathione (GSSG) or in the GSSG/GSH+GSSG ratio. The activities of γ -glutamylcysteine synthetase in the liver and kidney were decreased by bromate administration. γ -Glutamyl transpeptidase activities was significantly decreased in the kidney and not significantly decreased in the lung of bromate treated-rats. These results suggest that the decreased synthesis of glutathione by bromate may be an important reason for the decreased level of glutathione in the liver and kidney, thus the decreased glutathione transport would be a factor on the changes of glutathione contents in bromate-treated rats.

Key words – Bromate, glutathione content, γ -glutamyl transpeptidase, oxidized glutathione, γ -glutamylcysteine synthetase

서 론

해수를 이용하는 양식장이나 또는 이를 냉각수로 이용하는 발전소 등에서 미생물에 의한 오염을 방지하기 위해 오존처리를 하는 경우가 많다. 오존(O₃)은 산화력이 강한 물질로서, 원형질 등에 직접 작용하여 세포를 살상하기 때문에 많은 분야에서 살균제로 사용되고 있다. 특히 정수장의 소독뿐만 아니라 강한 산화력으로 인한 탈취, 탈색, 탁도의 제거와, 암모니아 및 아질산의 산화 등의 효능을 가지

고 있기 때문에 병원미생물의 살균과 배출수의 수질정화를 목적으로 다용도로 사용되고 있다[25]. 해수를 이용하는 양식장인 경우에는 해수 중에 존재하는 브롬이온이나 염소이온 등이 오존과 반응하여 oxidant를 생성하기[4,5] 때문에 담수와는 다른 살균기구가 존재할 가능성이 있다[24,27]. 담수중의 브롬화합물은 지질의 생성, 해수의 침입과 인위적인 요인에 의해 존재하게 된다. 인위적인 요인으로는 농약, 비료, 산업폐수 및 도시 하수 등의 유입에 의한 것이다[13]. 상수원수에 극히 낮은 브롬이온의 농도가 포함하고 있을 지라도 오존처리에 의해 유기브롬화물 및 무기브롬화합물의 산화분해에 의해 브롬산화물 및 무기산화물(TRO; Total Residual Oxidant) 등을 생성하게 된다. 또한

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-620-4883, Fax : 051-628-6540
E-mail : jwchoi@star.ac.kr

차아브롬산(Hypobromous acid: HOBr)도 동시에 생성하게 되며, 더욱 산화가 진행되면 bromate(BrO₃⁻)를 생성하게 된다[28]. 이러한 TRO 및 BrO₃⁻ 등은 장기간 동물이 섭취하면 신장 등에 치명적인 영향을 미치는 발암성 물질로 알려져 있다[9,28]. 생물체는 유리기에 의한 손상으로부터 자신을 보호할 수 있는 여러 가지 방어기전을 갖고 있다[10]. 유리기 손상에 대한 방어계로는 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 peroxidase 등 항산화 효소계와 glutathione, ascorbic acid, sulfhydryl groups, uric acid, vitamine E 및 bilirubin 등 비효소계 항산화 물질이 있다 [2,10,15]. SOD는 superoxide를 과산화수소를 전환시키며 [6,15], catalase와 glutathione peroxidase는 과산화수소를 제거하는데, glutathione peroxidase는 전자수용체로서 glutathione(GSH)을 이용한다[3,19]. Glutathione(L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine)은 단백질이나 DNA의 합성, 물질의 이동, thiol기의 저장 및 효소활성 조절등 생물학적으로 중요한 여러 반응에 직접 또한 간접적으로 관여하며, 약물의 대사나, 방사선 조사 또는 활성산소에 대한 해독반응에도 작용한다[2,15]. Glutathione이 저하되면 glutathione의 효소적 및 비효소적 항산화 작용의 감소로 인하여 여러 가지 산화적 손상에 대한 감수성이 증가되며, bromate는 superoxide, NO, ONOO⁻ 등을 생성하는데 신장의 독성의 경우 NO와 ONOO⁻에 의해 일어난다고 보고 되었다[26]. 본 논문은 bromate를 음료수 대신 장기적으로 농도별로 투여함으로써 간, 신장 및 폐에서 glutathione량이 감소됨을 관찰하였는데, bromate에 의한 glutathione의 변화는 bromate 독성의 한 요인이 될 것으로 생각되므로 이의 원인을 glutathione 합성에 관여하는 효소인 γ -glutamylcysteine synthetase 활성과 glutathione 이동에 관여하는 γ -glutamyl transpeptidase 활성을 측정하여 추정함으로써 bromate에 의한 동물의 각 장기의 독성발병 기전을 효소학적인 차원에서 구명함으로써 본 오염물질로 야기되는 질병의 예방 및 치료에 기초적인 자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

동물 및 처치

실험동물은 (주) bio-Link(충북, 음성)로부터 분양 받아

동물사의 일정한 조건(온도 : 20±2℃, 습도 : 40~60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)하에서 2주 가량 충분히 적응시켜 사육한 체중 100~120g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였고, 실험 시작 전 24시간 동안 물만 주고 절식하였다. 이때 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 실험 동물을 일정 시간(오전 10:00~12:00) 내에서 처치하였다. Potassium bromate(KBrO₃)를 음료수에 0.1, 0.2, 0.4 g/L되게 첨가하여 실험동물에 물 대신 임의대로 6개월간 섭취케 하였다.

조효소액의 조제

동물을 CO₂ gas로 가볍게 마취시킨 후, 복부 정중선을 따라 개복하고 복부대동맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고, 간장, 신장 및 폐를 적출하여 생리식염수로 씻은 다음, 여지로 간에 남아 있는 혈액 및 기타 이물질을 제거한 후, 각조직 1g 당 4배량의 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 빙냉상에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 냉장 원심분리기로 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상정액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

γ -Glutamylcysteine synthetase 활성도 측정

γ -Glutamylcysteine synthetase 활성도는 Meister 등의 방법[16]에 의해서 측정하였다. 효소반응액(50mM KCl, 10mM ATP, 5mM glycin, 20mM MgCl₂, 2mM EDTA 및 50mM L- γ -glutamyl-L- α -aminobutyrate(GAB)를 함유한 100mM Tris-HCl buffer(pH 7.8)에 조효소 용액을 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 10% 5-sulfosalicylic acid(SSA) 0.02ml를 가하여 반응을 정지시켜 생성된 ADP를 0.5mM phosphoenolpyruvate, 1unit pyruvate kinase, 0.2mM NADH, 50mM KCl 및 40mM MgCl₂를 함유한 250mM phosphate buffer 0.9ml를 가하고 LDH 1unit를 가하여 340nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성도는 NADH 흡광계수 6.22mM/cm을 이용하여 단위시간당 산화되는 NADH의 μ mol 수로 표시하였다.

γ -Glutamyl transpeptidase 활성도 측정

γ -Glutamyl transpeptidase 활성도는 Tate 등의 방법

[22]에 의해 측정하였다. 효소반응액[1mM L- γ -glutamyl-P-nitroanilid(GPNA)와 20mM glycylglycine를 함유한 0.1mM Tris-HCl, pH 8.0] 2.95ml를 37°C에서 3분간 방치시킨 후, 조효소액 0.05ml를 첨가해 410nm에서 변화되는 흡광도를 측정하였다. 효소활성도는 1분 동안에 1 μ mol의 p-nitroaniline을 생성할 수 있는 효소량을 1 unit로 하였다.

Glutathione 정량

Tietze의 방법[23]에 의해 측정하였다. 간과 신장을 절제한 후, 즉시 dry ice-ethanol 혼합액으로 동결시킨 후, 10배(w/v)의 5%(w/v) SSA를 가해 조직을 마쇄하고 10,000 \times g로 15분간 원심분리하여 상정액을 시료로 사용하였다. 총 glutathione reductase를 함유한 100mM DTNB 및 0.45U glutathione reductase를 함유한 100mM phosphate buffer (pH 7.5) 2.9ml에 시료액 25 μ l를 가해 30°C에서 3분간 방치한 후, NADPH를 최종농도가 1 μ M이 되게 가하여 415nm에서 흡광도의 변화를 1분간 측정하였다. Oxidized glutathione(GSSG)은 2-vinyl pyridine(VP)을 가해 reduced glutathione(GSH)를 제거한 후 glutathione과 같은 방법으로 정량하였다.

단백질 정량 및 통계처리

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법[12]에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, Fr. V)을 표준품으로 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결과 및 고찰

Bromate의 장기 섭취가 백서 간, 신장, 혈액 및 폐 glutathione에 미치는 영향

Bromate를 투여한 백서의 간 총 glutathione량은 bromate를 용량별로 6개월간 섭취케 했을 때 용량 의존적으로 감소하였는데, bromate 0.2g/L의 섭취에서 정상 대조군에 비해 약 20%가 감소되었고($p < 0.05$), 0.4g/L의 섭취에서는 간 glutathione(GSH)의 함량이 현저히 억제되었다. GSH가 감소된 세포는 방사선 조사에 대한 감수성이 증가되고[7,8], oxygen radicals에 의한 GSH 감소는 bromate 독성의 한 요인이 될 것으로 생각된다. Bromate를 투여한 백서의 간 GSSG량은 총 glutathione량과 유사한 유형의 변화를 나타냈고, GSSG/GSH + GSSG의 차이는 관찰되지 않았다(Table 1). GSH는 glutathione peroxidase, glutathione oxidase, oxygen radicals 및 방사선 조사 등에 의하여 GSSG로 전환된다[15]. 본 실험에서 bromate의 투여로 인해 간 GSSG+GSH는 감소되었으나, GSSG/GSH+GSSG 비율의 변화는 없는 것으로 나타나, GSH 산화의 증가나, GSSG 환원량의 감소로 인한 GSH량의 변화에 미치는 bromate의 영향은 적을 것으로 생각된다. 신장에서 bromate투여에 의한 총 glutathione량의 변화는 간에서와 유사한 유형을 나타내었으며, bromate 0.2g/L의 섭취에서 정상군에 비하여 약 20%가 감소되어 간보다 감소율이 더 컸다(Fig. 1). 혈액 총 glutathione은 bromate 0.1g/L 섭취 후 약간 감소되었고, 0.2g/L, 0.4g/L의 섭취에서 감소되는 경향은 보였으나 통계적 의의는 없었으며 이러한 결과는

Table 1. Effects of bromate on glutathione contents in the rat liver

Treatment	Dose(g/L)	Glutathione content(mmmole/g of tissue)			
		GSH+GSSG	GSSG	% GSSG	
Control		7.59 \pm 1.06 ^a	0.80 \pm 0.17 ^a	10.5	
KBrO ₃	0.1	6.60 \pm 0.92 ^{a,b}	0.65 \pm 0.18 ^{a,b}	9.9	
	0.2	6.03 \pm 0.88 ^{a,b}	0.59 \pm 0.09 ^{a,b}	9.8	
	0.4		5.73 \pm 0.63 ^b	0.51 \pm 0.10 ^b	8.9

Rats were given with bromate in drinking water for 24 weeks and killed 24 hr after the last treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D. for five experiments. Values followed by the different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test from control($p > 0.05$).

Bromate가 흰쥐의 장기 Glutathione 함량에 미치는 영향

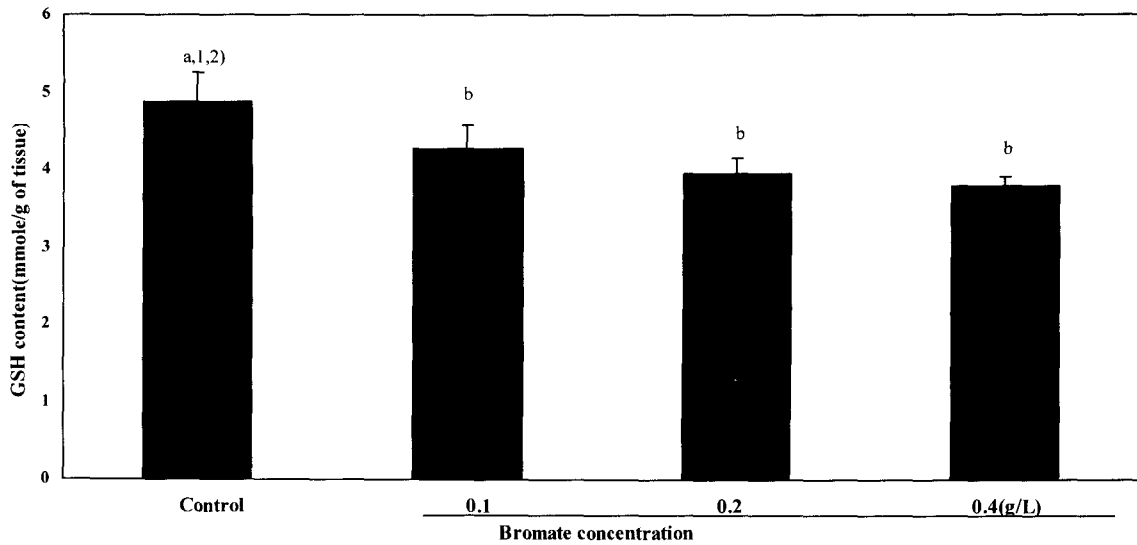


Fig. 1. Effects of various concentrations of bromate administration on glutathione contents in the rat kidney.

1) Values are mean \pm S.D. (n=5).

2) Values followed by the different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test from control ($p > 0.05$).

폐에서의 glutathione의 농도 변화와 유사하였다(Fig. 2). Glutathione은 주로 간과 신장에서 합성되어 혈액을 통해서 폐 등 다른 장기로 이동되었는데[11], 본 실험에서 간과 신장에서 bromate에 의한 glutathione 변화 유형이 유사하고, 혈액 및 폐에서는 변화가 없었다. 이러한 결과로 보아 bromate의 장기간 섭취에 의한 간 및 신장독성의 증가는

glutathione을 합성하는 장기에 영향을 주는 것임을 시사한다.

Bromate의 장기 섭취가 glutathione 합성에 미치는 영향

Glutathione은 간과 신장에서 glutamic acid, cystein 및

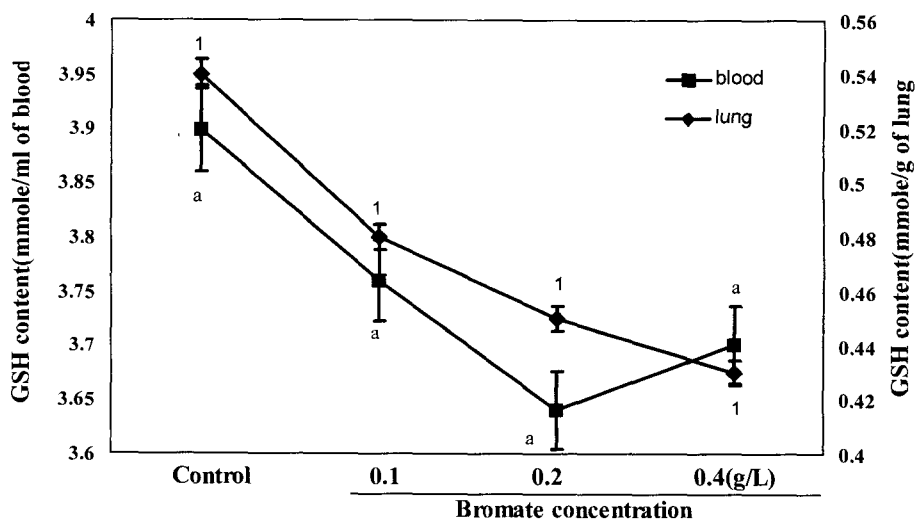


Fig. 2. Effect of various concentration of bromate administration on glutathione content in blood and lung of rats.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D. for five experiments. Values followed by the different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test from control ($p > 0.05$).

glycine을 기질로 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase에 의해 합성된다[1]. 본 논문에서는 bromate의 장기 섭취가 γ -glutamylcysteine synthetase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과(Fig. 3), 간장 및 신장에서 모두 bromate 0.1g/L의 섭취에서 효소활성 감소를 나타냈고, 이러한 감소효과는 0.2g/L, 0.4g/L의 섭취에서 유의성 있게 보다 감소하였다. 본 논문에서 bromate 섭취에 의한 γ -glutamylcysteine synthetase 활성 감소는 GSH 합성 감소를 초래하며, GSH 감소는 bromate에 의해 생성된 유리기 제거능력이 저하되어 bromate 독성이 나타날 것으로 생각되므로 bromate 독성의 한 원인이 될 것으로 추측된다.

Bromate의 장기 섭취가 γ -glutamyl transpeptidase 활성에 미치는 영향

포유동물에서 세포내 glutathione량을 혈정보다 약 100배정도 더 높기 때문에 혈 GSH가 수동적으로 세포내로 이동되는 것은 거의 불가능하다. γ -Glutamyl transpeptidase는 막단백질로서 세포막 내측과 외측에서 모두 GSH를 기질로 이용할 수 있으며, 세포의 GSH를 세포내로 이동시켜 glutathione의 재분배에 작용하는데[20], 생쥐나 백서에 γ -

glutamyl transpeptidase 억제제를 주사하면 glutathione 혈중 이나, glutathione 뇨증이 초래되어 GSH의 이동에 관여하는 γ -glutamyl transpeptidase 기능이 증명되었다[14, 17]. γ -Glutamyl transpeptidase는 신장에서 가장 높은 효소활성을 나타내며, 췌장, 부고환, 소장 점막세포, 간 및 비장 순으로 효소활성이 낮아진다[18,21]. 본 논문에서 bromate의 섭취에서 신장 γ -glutamyl transpeptidase활성이 대조군에 비해서 0.2g/L 및 0.4g/L의 섭취에서 각각 약 30%, 35% 감소되었다. 한편 폐에서 bromate 투여군에서는 용량 의존적으로 다소 감소하나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 4). 따라서 생성된 glutathione은 혈액으로부터 폐로 이동되어 glutathione량에 변동을 초래하나 본 실험에서는 폐에서의 glutathione의 양에는 영향이 적었으나 신장중의 glutathione의 양은 현저히 억제되는 것은 신장에서 γ -glutamyl transpeptidase 활성이 저하되어 신장의 총 glutathione량이 저하된 것으로 생각된다.

이상의 실험결과, bromate를 투여한 백서의 간 및 신장의 총 glutathione량이 감소되었는데, 간과 신장에서 총 glutathione 감소는 γ -glutamylcysteine synthetase 활성감소로 인한 glutathione 합성 감소에 의해 나타난 결과로 생각되고, 혈액 glutathione 변화가 적은 것은 γ -gluta-

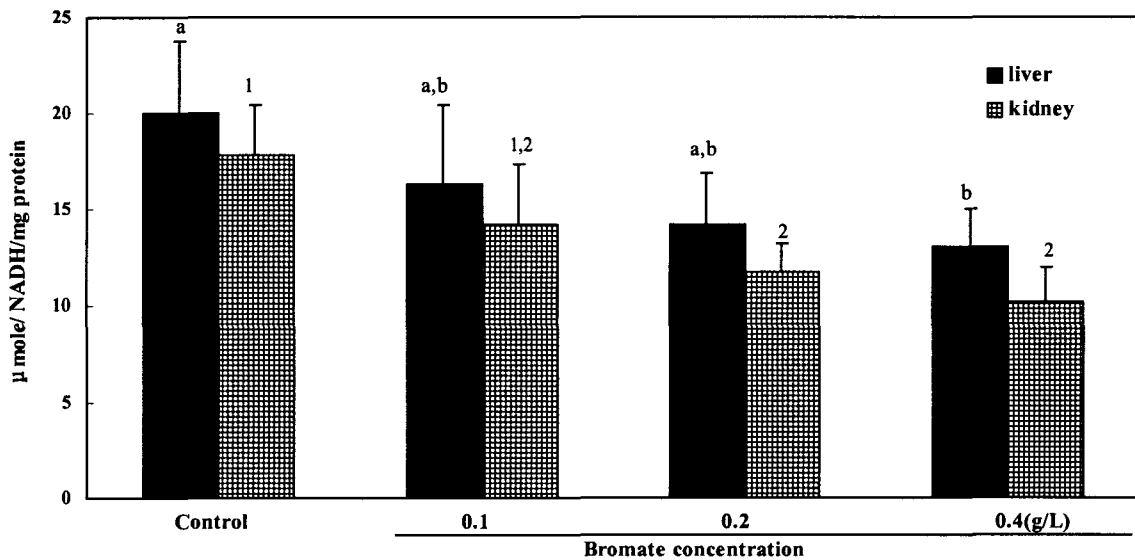


Fig. 3. Effect of various concentration of bromate on the activities of γ -glutamylcysteine synthetase in the rat liver and kidney.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D. for five experiments. Values followed by the different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test from control ($p > 0.05$).

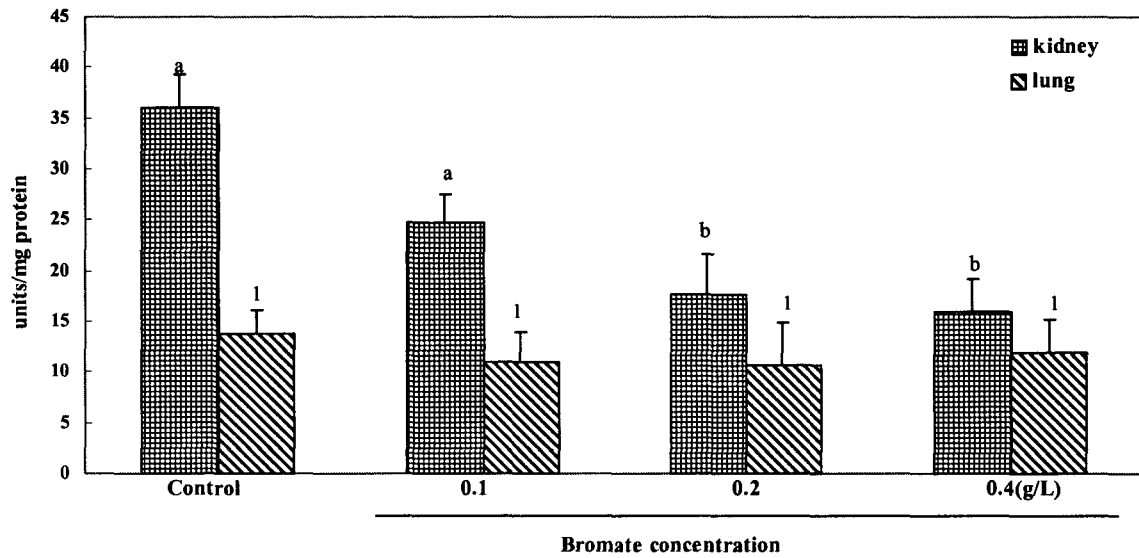


Fig. 4. Effect of various concentration of bromate on the activities of γ -glutamyl transpeptidase in the rat kidney and lung.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D. for five experiments. Values followed by the different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test from control ($p > 0.05$).

mylcysteine synthetase 활성 감소로 glutathione 합성량이 저하되어 혈액내로 glutathione 유출량이 저하되고, γ -glutamyl transpeptidase 활성 저하로 인해 혈액으로부터 각 장기내로 glutathione 이동이 감소되는 복합적 원인에 의해서 나타난 결과로 생각된다. 또한 간에 비하여 신장에서 glutathione의 함량이 현저히 감소되는 것은 γ -glutamylcysteine synthetase 활성이 감소되어 glutathione 합성량이 감소되고, γ -glutamyl transpeptidase 활성이 저하되는 현상으로, 이는 혈액으로부터 폐세포로 유입되는 glutathione의 이동량과는 상관이 없는 것으로 생각된다. 그러나 장기에 따라서 bromate에 의한 glutathione 감소율이 차이가 나는데, 이는 각장기의 bromate 축적농도의 차이나, glutathione이 단백질의 sulphhydryl기와 mixed disulfide를 형성하는 반응 등과 관련이 있을 것으로 추측되나, 이의 원인규명에 대해서는 앞으로 계속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

백서에 bromate의 장기간 섭취로 간 및 신장의 glutathione량이 감소되는데, 간과 신장은 유사한 감소양상을 나타냈고, 폐 및 혈액에서는 감소하는 경향은 있었으나 통

계적인 유의성은 없었다. Bromate 섭취로 γ -glutamylcysteine synthetase와 γ -glutamyl transpeptidase 활성이 감소되었다. 따라서 간과 신장의 glutathione 감소로 γ -glutamylcysteine synthetase 활성이 감소됨으로서 glutathione 합성저하에 의해 나타난 결과로 생각되고, 폐에서 γ -glutamylcysteine synthetase 및 γ -glutamyl transpeptidase 활성에는 별다른 영향이 없었다. 혈액에서는 γ -glutamylcysteine synthetase와 γ -glutamyl transpeptidase 활성감소로 glutathione의 혈액내로 유입과 타장기로 유출이 모두 저하되어 glutathione량의 변화가 없는 것으로 생각된다. Bromate에 의한 장기내 glutathione량 감소는 유리기 제거가 미흡할 것으로 생각되므로 bromate 독성의 한 요인이 될 것으로 추측된다.

감사의 글

이 논문은 2003학년도 경성대학교 환경문제연구소 지원금에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Anderson, M. E. 1998. Glutathione biosynthesis.

- Pathophysiology*. **5**, 59.
2. Bendich, A., L. J. Machlin, O. Scandurra, G. W. Burton and D. D. M. Wayner. 1986. The antioxidant role of vitamine C. *Advances in Free Radical Biology Medicine* **2**, 419-444.
 3. Chae, H. Z., S. J. Chung and S. G. Rhee. 1994. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* **269**, 27670-27678.
 4. da Silva, M. V., P. A. Gibbs and R. M. Kirby. 1998. Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 802-810.
 5. David, J. and L. S. Vernon. 1980. Water chemistry. pp. 354. John Wiley & Sons. New York.
 6. den Hartog, Gertjan J. M., G. R. M. M. Haenen, E. Veegt, W. J. F. van der Vijgh, A. F. Wim and A. Bast. 2003. Superoxide dismutase: the balance between prevention and induction of oxidative damage. *Chemico. Biological Inter.* **145**, 33-39.
 7. Deschavanne, P. J., E. P. Malaise and L. Revesz. 1981. Radiation survival of glutathione-deficient human fibroblasts in culture. *The British J. Radiology.* **54**, 361-362.
 8. Edgren, M., A. Larsson, K. Nilsson, L. Revesz and O. C. Scott. 1980. Lack of oxygen effect in glutathione-deficient human cells in culture. *International J. Radiation Biology & Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine* **37**, 299-306.
 9. Haag, W. R., J. Hoine and H. Bader. 1984. Improved Ammonia Oxidation by Ozone in the Presence of Bromide Ion During Water Treatment. *Wat. Res.* **18**, 1125-1128.
 10. Halliwell, B. and J. M. Gutteridge. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* **186**, 1-85.
 11. Klaus, J. and W. Henke. 1996. Developmental changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from rats. *Free Radical Biology & Medicine*. **20**, 613-617.
 12. Lowry, O. H., N. J. Rodebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256.
 13. Mari A. A. T. and M. Yasumoto. 1996. Bromate ion Formation Inhibition by Coexisting Organic Matters in Ozonation Process. *Japan Society on Water Environment.* **19**, 930-936.
 14. Marie. H. H. 1998. γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chemico. Biological Inter.* **111**, 333-342.
 15. Meister, A. and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochem.* **52**, 711-760.
 16. Meister, A. and P. G. Richman. 1975. Regulation of γ -glutamylcysteine synthesis by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* **250**, 1422-1426.
 17. Meister, A., S. S. Tate and O. W. Griffith. 1981. Gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods in Enzymology* **77**, 237-253.
 18. Moshe, Y. G. and J. F. Thompson. 1967. γ -Glutamyl transpeptidase from kidney. *Biochem. Biophys. Acta.* **132**, 15-26.
 19. Netto, L. E., H. Z. Chae, S. W. Kang, S. G. Rhee and E. R. Stadtman. 1996. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 15315-15321.
 20. Roselyne, C., C. Lherbet and J. W. Kejllor. 2002. Mapping of the active site of rat kidney γ -glutamyl transpeptidase using activated esters and their amide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 4185-4191.
 21. Tate, S. S. and A. Meister. 1981. gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Molecular & Cellular Biochem.* **39**, 357-368.
 22. Tate, S. S. and A. Meister. 1985. gamma-Glutamyl transpeptidase from kidney. *Methods in Enzymology* **113**, 400-419
 23. Tietze, F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**, 502-522.
 24. Uchida, K. and K. Tejima. 1974. Use of a mixture of a phenol reagent and a urease solution in the urease-indophenol method (analysis of blood urea nitrogen). *Rinsho. Byori.* **22**, 207.
 25. Verde, L., F. Meucci and G. C. Vanini. 1969. On the behavior of anionic detergents in ozone-treated water. *L'Igiene Moderna* **62**, 277-285.
 26. Watanabe, S., T. Shin-ichi and F. Tetsuya. 2002. Contribution of nitric oxide to potassium bromate-induced elevation of methaemoglobin concentration in mouse blood. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **25**, 1315-1319.

27. Weinberg, H. S., H. Yamada and R. J. Joyce. 1998. New, sensitive and selective method for determining sub-microgram/l levels of bromate in drinking water. *J. Chromatogr. A.* **804**, 137-142.
27. Yuji K. 1990. Toxicity and Carcinogenicity of Potassium Bromate, - A New Renal Calcinogen, *Environmental Health Perspectives.* **87**, 309-335.

(Received July 8, 2003; Accepted September 17, 2003)